

國立臺灣大學生命科學院生化科技學系

博士論文



Department of Biochemical Science and Technology

College of Life Science

National Taiwan University

Doctoral Dissertation

紅麴山藥與中草藥對老年疾病預防之效果

**The effect of red mold dioscorea and Chinese herb for
elderly people geriatric disease prevention**

陳建利

Chien-Li Chen

指導教授：潘子明 博士

102Advisor: Tzu-Ming Pan, Ph.D.

中華民國 103 年 1 月

January, 2014

國立臺灣大學（碩）博士學位論文
口試委員會審定書

中文題目：

紅麴山藥與中草藥對老年疾病預防之效果

英文題目：

The effect of red mold dioscorea and Chinese herb for elderly
people geriatric disease prevention

本論文係 陳建利 君（學號 d97b47102）在國立臺灣大學生化科技學系
完成之碩（博）士學位論文，於民國 103 年 01 月 23 日承下列考試委員
審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：

潘子明

（簽名）

（指導教授）

王銘富

李勝煌

張淑貞

花茂慧

李俊傑


蘇慕寰

黃慶琛

（簽名）

系主任、所長


謝 誌



時光荏苒，博士生涯即將畫上一句點。承蒙恩師潘子明特聘教授給予懇切叮嚀指導與殷殷教誨，陪伴學生在每個階段的成長及學習。感謝恩師鼓勵與開導之下耐心的忍受學生的不才及駑鈍，讓學生了解永不止境的學習及自我要求才是進步的原動力。恩師與我談論如何進行實驗設計，規劃實驗進度，原本以為嚴肅的老師，卻也關心了我的家庭及生活狀況，讓我感到非常的欣慰，原來老師是一位和藹可親，也默默關心學生的益師益友。在學術上他是我的老師，在生活上他是我的朋友，記得老師說過研究生最害怕發生的事，實驗經費不足。我永遠會記得老師說的這一句話：實驗的經費不用擔心，我收了學生這是我的責任我會想辦法，又跟我說：當生活上有任何困難在他能力範圍內絕對排除萬難幫助到底。在這現實的社會當中，老師給了我最大的溫暖與支持，此種感受如人飲水，冷暖自知。非筆墨能形容也。雖然我和老師相處的時間，只不過是人生中短短的幾年，但是和老師在一起的時光，不論是喜、怒、哀、樂，都成為我人生中最重要回憶與發展。為了我們的課業，不辭辛勞的教導我們，總是比我們早到實驗室，比我們晚離開實驗室，不讓學生擔心經費不足，更會細心觀察隨時幫助我們排除困難，供給一流的設備給我們研究，在論文整理與撰寫期間，不厭其煩地校閱斧正，使本論文得以順利完成。使我了解要知足、感恩，要學的不僅是科學，更要提升人文素養、與人分享，師恩浩瀚，永銘肺腑，特誌卷首，聊表無比之謝忱。

自論文資格考試起，經論文預口試至最終的論文口試，特別要感謝北市聯合醫院神經外科部主任兼仁愛院區醫務長蕭勝煌博士、國立臺灣大學心理系花茂琴博士、臺灣大學食品科技研究所謝淑貞博士、杏輝醫藥集團總經理蘇慕震博士、靜宜大學食品營養系王銘富博士、台東大學生命科學系李俊霖博士，撥冗給予詳細賜正並惠與寶貴意見，使本研究順利完成更臻完善，謹此致上最高謝忱。

感謝這輩子能夠在椰林大道下、杜鵑花叢中、農化舊館 105 室裡獲得那些人、事、物的點點滴滴。實驗期間，非常感謝已畢業的宗佑學長與富美學姐這期



間的照顧並協助我處理報帳事宜與學校事務，曾經每天都很早出晚歸管理實驗室整潔的宗偉學長、凡事都懂的生活小百科志輝學長、帶我進入紅麴領域的秉穎學長與雨青學姐，至實驗室參與 meeting，給我們大家寶貴的意見的雅雯學姐與岳廷、力川學長，將紅麴在糖尿病研究領域中發揚光大的保宏與小花及加入老年失智症研究的曄婷，碩士班與大學部的學弟妹，讓我在博士班生涯除了專業更充滿溫馨與快樂的色彩，有了這群實驗室的夥伴們，縱使當我遇到再大的困難或再忙碌的時刻都會讓我暫時忘記一切的煩惱。摯友啟諭、書慶在我遇到挫折及困難時不斷的給我支持與鼓勵。在此特別要感謝萬華鴻福宮靈安尊王冥冥之中給予我無形的關懷與心靈上的寄託，以紓解生活上的煩悶。總之，謝謝大家的一路相伴。

在台大這個第一學府的環境下讓我人生茁壯與學習失敗、記取教訓後成長，同時也增添了許多的厚度與寬闊視野，在這裡經歷失去母親的不捨也讓我體會與辨識人間的善惡與美醜，真的是樹欲靜而風不止，子欲養而親不待，親恩高如九重天，子孫欲報層層難，已經成為爸爸的我，深深體會到養兒方知父母恩!!感恩父、母親多年來含辛茹苦的栽培與教養，在家裡經濟並非十分寬裕的時候，還是無怨無悔的給予我最舒適溫馨的家庭生活。最後要感謝生命中不畏辛勞給予支持的另一半太太靜雯，幫我生出了一位可愛的女兒 Q 庇，如果沒有你們的支持與寬容，博士班生涯無法走得如此平順，本論文的完成代表著我在台灣大學所努力的成果。最後我也願以此論文一同分享，獻給每一位愛我的人及我愛的人，願以最誠摯與感恩的心，祝福你們平安快樂心想事成。

陳建利 謹識於

國立臺灣大學

生化科技學系

潘子明特聘教授實驗室

中華民國一百零三年一月

縮寫表



- ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline- 6-sulphonic acid) : 2,2'-聯氮雙(3-乙基苯並噻唑
啉-6-磺酸)二銨鹽
- ACh (acetylcholine) : 乙醯膽鹼
- AChE (acetylcholinesterase) : 乙醯膽鹼酯酶
- AD (Alzheimer's disease) : 阿茲海默症
- AICD (APP intracellular domain) : 類澱粉樣前驅蛋白胞內片段
- Aph-1 (anterior pharynx defective-1) : 前咽缺陷蛋白質- 1
- ApoE (apolipoprotein E) : 載脂蛋白 E
- APP (amyloid precursor protein) : 類澱粉樣前驅蛋白
- ATP (adenosine triphosphate): 三磷酸腺苷
- A β (amyloid β -protein) : 類澱粉樣蛋白
- A β_{1-40} (amyloid β_{1-40}) : 類澱粉樣蛋白 β_{1-40}
- BACE (beta-site cleaving enzyme, β -secretase) : β -切位剪切酶
- BHT (butylated hydroxytoluene) : 羥甲苯丁酯
- BSA (bovine serum albumin) : 牛血清白蛋白
- CA (*Centella asiatica*) : 雷公根
- CAT (catalase) : 過氧化氫酶
- ChAT (choline acetyltransferase) : 乙醯膽鹼合成酵素
- CSF (cerebrospinal fluid) : 腦脊髓液
- CTF (carboxy-terminal fragments) : 羧基終端片段
- DCFH-DA (2,7-dichlorofluorescein diacetate) : 2,7 二氯螢光黃雙乙酸酯
- DMSO (dimethyl sulfoxide) : 二甲基亞砜
- DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) : 2,2-二苯基苦味肼基自由基
- DSM-IV(Diagnostic and Statistical Manual IV) : 精神疾病診斷與統計手冊第四版
- DTNB (5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid) : 5,5-二硫(2-硝基苯甲酸)
- EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) : 乙烯二胺四乙酸
- ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) : 酵素免疫分析法
- EOAD (early onset Alzheimer's disease) : 早發性阿茲海默氏症

FAD (family Alzheimer's disease)：家族型阿茲海默症

FBS (fetal bovine serum)：胎牛血清

FH (familial hypercholesterolemia)：家族性高膽固醇血症

fMRI (functional magnetic resonance imaging)：功能性核磁共振攝影

GABA (γ -aminobutyric acid)： γ -胺基丁酸

GPx (glutathione peroxidase)：麩胱甘肽過氧化酶

GR (glutathione reductase)：麩胱甘肽還原酶

GSH (glutathione)：麩胱甘肽

GSSG (glutathione disulfide)：麩胱甘肽二硫化物

H₂O₂ (hydrogen peroxide)：過氧化氫

HDL-C (high-density lipoprotein cholesterol)：高密度脂蛋白膽固醇

HMG-CoA (3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A)：羥甲基戊二酸輔酶 A

ICD-10 (International Classification of Disease 10)：國際疾病與相關健康問題統計分類第十版

IDE (insulin-degrading enzyme)：胰島素降解酶

IDL (intermediate low density lipoprotein)：中密度脂蛋白膽固醇

IGT (impaired glucose tolerance)：葡萄糖耐受性不良

iNOS (inducible nitric oxide synthase)：誘導型一氧化氮合成酶

ITS (internal transcribed spacer)：轉錄間隔區

LDL-C (low-density lipoprotein cholesterol)：低密度脂蛋白膽固醇

LOAD (late-onset Alzheimer's disease)：晚發型阿茲海默症

LPS (lipopolysaccharide)：脂多糖

MDA (Malondialdehyde)：丙二醛

Met (methionine)：甲硫氨酸

MMP (mitochondrial membrane potential)：粒線體膜電位

MMSE (mini-mental state examination)：精神狀態簡易速檢表

MRI (magnetic resonance imaging)：核磁共振攝影

MRS (magnetic resonance spectroscopy)：核磁共振光譜

MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)：3-(NULL,5)-雙甲基-2-噻唑-(NULL,5)-二苯基溴化四氮唑藍



NAA (N-acetyl aspartate) : N-乙醯天門冬胺酸鹽

NAD (nicotinamide adenine dinucleotide) : 菸鹼胺醯胺腺嘌呤雙核酸

NADH (reduced nicotinamide adenine dinucleotide) : 還原態之菸草醯胺腺嘌呤雙核酸

NADPH (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) : 菸草醯胺腺嘌呤二核苷酸磷酸鹽

NBT (nitro blue tetrazolium) : 氮藍四唑

NEP (neutral endopeptidase) : 中性胜肽內切酶

NFTs (neurofibrillary tangles) : 神經纖維纏結

NINCDS/ADRDA (National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and Alzheimer's Disease and Related Disorders Association) : 國際神經與溝通疾患機構暨阿茲海默症相關疾患協會

NMDA (N-methyl D-aspartate) : N-甲基-D-天門冬胺酸鹽

NMDAR (N-methyl D-aspartate receptor) : N-甲基-D-天門冬胺酸鹽受器

NO (nitric oxide) : 一氧化氮

NSAIDs (non-steroidal anti-inflammatory drugs) : 非類固醇類的抗發炎藥物

PBS (phosphate buffer saline) : 磷酸鹽緩衝溶液

PD (Parkinson's disease) : 帕金森氏症

Pen-2 (presenilin enhancer-2) : 早老素增強子-2

PET (positron emission tomography) : 正子射出斷層掃描

PI (propidium iodide) : 碘化丙啶

PS1 (presenilin 1) : 早老素 1

PS2 (presenilin 2) : 早老素 2

ROS (reactive oxygen species) : 活性氧分子

sAPP α (soluble amyloid precursor protein α -secretase cleaved fragment) : 水溶性類澱粉樣前驅蛋白 α -分泌酶剪切片段

sAPP β (soluble amyloid precursor protein β -secretase cleaved fragment) : 水溶性類澱粉樣前驅蛋白 β -分泌酶剪切片段

SOD (superoxide dismutase) : 超氧歧化酶

TC (total cholesterol) : 總膽固醇

TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity) : Trolox 等價抗氧化力

TG (triglyceride) : 三酸甘油酯



TNF- α (tumor necrosis factor- α) : 腫瘤壞死因子- α

Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) : 水溶性維生素 E

ZS (*Semen Ziziphi spinosae*) : 酸棗仁



目錄

圖目錄.....	V
表目錄.....	VIII
摘要.....	X
Abstract.....	XII
第壹章 緒論	1
一、老化的定義.....	1
二、代謝症候群.....	2
三、高血脂症 (hyperlipidemia) 與血脂異常 (dyslipidemia).....	3
四、糖尿病簡介.....	7
五、高血壓之簡介.....	9
六、阿茲海默症.....	10
七、中藥之開發與應用.....	32
八、中草藥簡介.....	34
九、紅麴菌.....	37
第貳章 研究動機與目的	46
第參章 材料與方法	49
一、實驗材料.....	49
(一) 儀器.....	49
(二) 藥品.....	49
二、探討紅麴山藥與藥物併用對降血脂、血壓、血糖之功效及對引發橫紋肌 溶解症之風險評估.....	51
(一) 紅麴山藥與降血脂藥物併用對高血脂倉鼠降血脂功效及其對生理 之影響.....	51
(二) 紅麴山藥與降血糖藥物 thiazolidinedione 併用對糖尿病大鼠影響 評估.....	52
(三) 紅麴山藥與降血壓藥物 amlodipine 對高血壓大鼠降血壓之影響評 估.....	55

三、中草藥對於改善記憶學習能力暨輔助治療阿茲海默症之研究.....	57
(一) 中藥對於阿茲海默症輔助治療之體外細胞試驗.....	57
(二) 雷公根 20%、酸棗仁 40% 酒精萃取物與紅麴山藥改善阿茲海默症與記憶學習之動物試驗.....	62
(三) 雷公根飲品安全性評估試驗.....	72
第肆章 結果與討論	91
第一部份 探討紅麴山藥與藥物併用對降血脂、血壓、血糖之功效及對引發橫紋肌溶解症之風險評估.....	91
一、RMD 與降血脂藥物併用對高血脂倉鼠降血脂之功效及其對生理之影響...	91
(一) 實驗動物體重與攝食量之變化.....	91
(二) RMD 對血脂濃度變化情形.....	91
(三) 實驗動物肝臟中 TC 與 TG 濃度之變化.....	96
(四) 安全性分析—血液肝指數變化及肝功能檢測.....	96
(五) 安全性分析—腎功能、電解質與橫紋肌溶解症.....	101
二、RMD 產品與降血糖藥物併用對糖尿病大鼠血糖及其對生理之影響.....	103
(一) 實驗動物體重與攝食量之變化.....	103
(二) 葡萄糖耐受性測試結果.....	103
(三) 實驗動物血液中血脂之濃度變化.....	106
(四) 實驗動物血清胰島素和糖化血紅蛋白的變化情形.....	106
(五) 安全性分析—肝、腎功能與電解質.....	108
三、RMD 與降血壓藥物併用對高血壓大鼠降血壓之影響評估.....	113
(一) 試驗動物之單一餵食後 24 小時內收縮、舒張血壓及心律短期變化...	113
(二) 試驗動物餵食 8 週後之收縮、舒張血壓及心律長期變化.....	113
(三) 實驗動物血液中脂質含量.....	116
(四) 安全性分析—肝、腎功能與電解質.....	116
第二部份、中藥與紅麴山藥對阿茲海默症輔助治療效益之研究.....	121
一、中藥對於阿茲海默症輔助治療之體外細胞試驗.....	121
二、中草藥萃取物對 IMR-32 細胞存活率之影響.....	121

三、聚合 A β 1-40 濃度對 IMR 32 之影響	123
四、雷公根、酸棗仁與玫瑰萃取物對 IMR-32 細胞抵抗聚合 A β 1-40 神經 毒性	123
五、雷公根萃取物對 IMR 32 細胞之毒性與抗 A β 1-40 毒性能力評估	123
(一) SOD 活性分析	123
(二) Catalase 活性分析	127
(三) GPx 與 GR 活性分析	127
(四) GSH 與 GSSG 含量分析	130
六、基原鑑定	130
(一) 雷公根之外觀鑑定與組織切片鑑定	130
(二) 酸棗仁之外觀鑑定與組織切片鑑定	134
(三) 雷公根與酸棗仁之 DNA 鑑定	138
七、雷公根 20 %、酸棗仁 40 % 酒精萃取物與 RMD 改善阿茲海默症與記 憶學習之體內動物試驗	138
(一) 實驗動物體重與攝食量之變化	138
(二) 記憶學習能力試驗	138
八、大鼠血液與腦部海馬迴組織之各項功能檢測	156
(一) 餵飼雷公根 20 % 與酸棗仁 40 % 酒精萃取物與 RMD 對大鼠血液 中與腦部海馬迴組織之乙醯膽鹼酶活性之影響	156
(二) 餵飼雷公根 20 % 與酸棗仁 40 % 酒精萃取物與 RMD 對大鼠血液 與腦部海馬迴組織之乳酸脫氫酶活性之影響	157
(三) 餵飼雷公根 20 % 與酸棗仁 40 % 酒精萃取物與 RMD 對大鼠血液 中與腦部海馬迴組織之總抗氧化力活性之影響	159
(四) 餵飼雷公根 20 % 與酸棗仁 40 % 酒精萃取物與 RMD 對大鼠血液 與腦部海馬迴組織中過氧化氫酶活性之影響	162
(五) 餵飼雷公根 20 % 與酸棗仁 40 % 酒精萃取物與 RMD 對大鼠血液 與腦部海馬迴組織中超氧歧化酶活性之影響	162
(六) 餵飼雷公根 20 % 與酸棗仁 40 % 酒精萃取物與 RMD 對大鼠血液 與腦部海馬迴組織一氧化氮合成酶活性之影響	166

九、安全性試驗分析·····	170
(一) 血漿脂質含量分析·····	170
(二) 肝功能分析·····	170
(三) 腎功能分析·····	170
(四) 電解質平衡狀態·····	170
十、健康食品安全分類第二類產品雷公根飲品之安全性評估試驗·····	176
(一) 評估雷公根飲品之沙門氏菌回復突變試驗·····	176
(二) 評估雷公根飲品之體外哺乳類細胞染色體異常試驗·····	176
(三) 評估雷公根飲品之齧齒類週邊血液微核試驗·····	177
(四) 評估雷公根飲品之大鼠 28 天重複劑量亞急性毒性試驗·····	183
第伍章 結論 ·····	190
第陸章 參考文獻 ·····	193
附錄—已發表之文章·····	215

圖目錄

圖 1.1、類澱粉樣蛋白前驅物藉由兩種路徑進行序列切割.....	13
圖 1.2、聚合型 A β 的產生模型.....	15
圖 1.3、類澱粉樣蛋白造成粒線體損傷.....	16
圖 1.4、抗氧化酵素系統.....	18
圖 1.5、簡易智能狀態測驗.....	25
圖 1.6、乙醯膽鹼系統.....	31
圖 1.7、紅麴米之生產.....	38
圖 2.1、本研究之大綱.....	48
圖 3.1、ALZET 腦部輸注幫浦.....	64
圖 3.2、改善阿茲海默症大鼠之記憶學習試驗日程表.....	66
圖 3.3、被動迴避學習反應測定裝置.....	67
圖 3.4、水迷宮電腦劃分區域示意圖.....	69
圖 4.1、餵食不同量紅麴山藥對於倉鼠肝臟中總膽固醇與三酸甘油酯濃度之影響.....	97
圖 4.2、餵食不同量紅麴山藥對於糖尿病大鼠體重、攝食量與飲水量之影響.....	104
圖 4.3、每兩週餵食不同劑量紅麴山藥對於糖尿病大鼠血液中口服葡萄糖耐受性之影響.....	105
圖 4.4、單一次餵食紅麴山藥後收縮血壓、舒張血壓與心律變化情形.....	114
圖 4.5、餵食紅麴山藥八週間收縮血壓、舒張血壓與心律變化情形.....	115
圖 4.6 不同濃度聚合 A β_{1-40} 對 IMR 32 細胞存活率之影響.....	124
圖 4.7 雷公根 20% 酒精萃取物萃取物與聚合 A β_{1-40} 共處理對 IMR 32 細胞中 SOD (A) 與 catalase (B) 活性之影響.....	128
圖 4.8 雷公根 20% 酒精萃取物萃取物與聚合 A β_{1-40} 共處理對 IMR 32 細胞中 GR (A) 與 GPx (B) 活性之影響.....	129
圖 4.9 雷公根 20% 酒精萃取物萃取物與聚合 A β_{1-40} 共處理對 IMR 32 細胞中 GSH/GSSG 比值之影響.....	131
圖 4.10、雷公根外觀 (a) 全草 (b) 果實 (c) 葉.....	132

圖 4.11 雷公根之組織切片。(a) 莖組織 (b) 莖橫切面 (c) 莖內表皮及後角細胞 (d) 外韌型維管束 (e) 莖內髓部 (f) 經內分泌道 (g) 上表皮細胞與氣孔 (葉) (h) 下表皮細胞與氣孔 (葉).....	133
圖 4.12 酸棗仁外觀 (a) 數顆 (b) 單顆一面 (c) 單顆另一面.....	135
圖 4.13 酸棗仁之組織切片。(a) 種子橫切面 (b) 子葉橫切面 (c) 藥材橫切面 (d) 種皮內柵狀細胞.....	136
圖 4.14 酸棗仁之組織切片。(a) 胚乳內澱粉粒及糊粉粒 (b) 胚乳內脂肪油 (c) 子葉內維管束 (d) 子葉內維管束 (e) 子葉內糊粉粒 (f) 子葉內脂肪油 (g) 子葉內草酸鈣結晶 (h) 子葉內草酸鈣結晶。將酸棗仁製成切片後於顯微鏡下觀察。(a) 與 (e) 加入澱粉液 (b) 與 (f) 加入蘇丹三號溶液 (g) 與 (h) 以偏光顯微鏡觀察.....	137
圖 4.15、餵飼不同劑量雷公根 20%、酸棗仁 40% 酒精萃取物與紅麴山藥在被動迴避試驗中大鼠經電擊訓練後於不同天數於明室停留時間.....	143
圖 4.16、餵飼不同劑量雷公根 20%、酸棗仁 40% 酒精萃取物與 RMD 在參考記憶試驗中大鼠於不同天數找到逃逸平台之游泳時間.....	145
圖 4.17、餵飼不同劑量雷公根 20%、酸棗仁 40% 酒精萃取物與紅麴山藥在參考記憶試驗中大鼠於第四象限與其他三象限平均停留時間比例.....	147
圖 4.18、餵飼不同劑量雷公根 20%、酸棗仁 40% 酒精萃取物與紅麴山藥在 90 秒空間性探測試驗中大鼠於於第四象限與其他三象限平均停留時間比例.....	149
圖 4.19、餵飼不同劑量雷公根 20%、酸棗仁 40% 酒精萃取物與 RMD 在工作記憶試驗中大鼠於不同天數找到逃逸平台之游泳時間.....	151
圖 4.20、餵飼不同劑量雷公根 20%、酸棗仁 40% 酒精萃取物與紅麴山藥工作記憶試驗第一天大鼠於第一象限與其他三象限平均停留時間比例.....	153
圖 4.21、餵飼不同劑量雷公根 20%、酸棗仁 40% 酒精萃取物與紅麴山藥工作記憶試驗第二天大鼠於第二象限與其他三象限平均停留時間比例.....	154
圖 4.22、餵飼不同劑量雷公根 20%、酸棗仁 40% 酒精萃取物與紅麴山藥工作記憶試驗第三天大鼠於第三象限與其他三象限平均停留時間比例.....	155

圖 4.23、	飼不同劑量雷公根 20%、酸棗仁 40% 酒精萃取物與紅麴山藥對大	
	鼠血液 (A) 與腦部海馬迴組織 (B) 乙醯膽鹼酶活性之影響.....	158
圖 4.24、	飼不同劑量雷公根 20%、酸棗仁 40% 酒精萃取物與紅麴山藥對大	
	鼠血液 (A) 與腦部海馬迴組織 (B) 乳酸脫氫酶活性之影響.....	159
圖 4.25、	飼不同劑量雷公根 20%、酸棗仁 40% 酒精萃取物與紅麴山藥對大	
	鼠血液 (A) 與腦部海馬迴組織 (B) 總抗氧化力之影響.....	161
圖 4.26、	飼不同劑量雷公根 20%、酸棗仁 40% 酒精萃取物與紅麴山藥對大	
	鼠血液 (A) 與腦部海馬迴組織 (B) 中過氧化氫酶活性之影響.....	163
圖 4.27、	飼不同劑量雷公根 20%、酸棗仁 40% 酒精萃取物與紅麴山藥對大	
	鼠血液 (A) 與腦部海馬迴組織 (B) 中超氧歧化酶活性之影響.....	165
圖 4.28、	飼不同劑量雷公根 20%、酸棗仁 40% 酒精萃取物與紅麴山藥對大	
	鼠血液 (A) 與腦部海馬迴組織 (B) 中一氧化氮合成酶活性之影響.....	167
圖 4.29、	飼不同劑量雷公根 20%、酸棗仁 40% 酒精萃取物與紅麴山藥對於	
	大鼠腦部海馬迴組織中類澱粉樣蛋白沉積量之影響.....	168
圖 4.30、	飼不同劑量雷公根 20%、酸棗仁 40% 酒精萃取物與紅麴山藥對於	
	大鼠腦部海馬迴組織中類澱粉樣蛋白沉積量圖量之影響.....	169

表目錄

表 1.1、精神疾病診斷與統計手冊第四版阿茲海默症診斷準則	22
表 1.2、國際疾病與相關健康問題統計分類第十版阿茲海默症診斷準則	23
表 1.3、國際神經與溝通疾患機構暨阿茲海默症相關疾患協會診斷準則	24
表 1.4、阿茲海默症可能的腦脊髓液生物標記	28
表 1.5 典型三種生物標記在阿茲海默症與其他失智症表現	29
表 4.1、各組實驗動物之平均體重	92
表 4.2、各組實驗動物之每日平均飼料攝食量	93
表 4.3、餵食不同劑量紅麴山藥對於倉鼠血液中總膽固醇、三酸甘油酯、高密度脂蛋白膽固醇與低密度脂蛋白膽固醇濃度之影響	94
表 4.4、餵食不同量紅麴山藥倉鼠血液中天門冬胺酸轉胺酶、丙胺酸轉胺酶、鹼性磷酸酶與總蛋白量之影響	99
表 4.5、餵食不同量紅麴山藥對於倉鼠血液中白蛋白、球蛋白與 γ -麩胺醯轉移酶之影響	100
表 4.6、餵食不同量紅麴山藥對於倉鼠血液中尿素氮、肌酸酐、尿酸、鈉、鉀與肌酸激酶之影響	102
表 4.7、 餵食不同量紅麴山藥對於糖尿病大鼠血液中總膽固醇、三酸甘油酯、高密度脂蛋白膽固醇與低密度脂蛋白膽固醇濃度之影響	107
表 4.8、 餵食不同量紅麴山藥對於糖尿病大鼠血液中尿素氮、肌酸酐、糖化血色素、胰島素與肌酸激酶濃度之影響	109
表 4.9、餵食不同量紅麴山藥大鼠血液中天門冬胺酸轉胺酶、丙胺酸轉胺酶、鹼性磷酸酶與總蛋白量之影響	111
表 4.10、餵食不同量紅麴山藥對於糖尿病大鼠血液中鈉、鉀、氯、鈣與磷之影響	112
表 4.11、餵食不同量紅麴山藥對於高血壓大鼠血液中三酸甘油酯、總膽固醇、高密度脂蛋白膽固醇與低密度脂蛋白膽固醇濃度之影響	117
表 4.12、餵食不同量紅麴山藥對於高血壓大鼠血液中天門冬胺酸轉胺酶、丙胺酸轉胺酶、鹼性磷酸酶、白蛋白、球蛋白、 γ -麩胺醯轉移酶與總蛋白量之影響	118

表 4.13、餵食不同量紅麴山藥對於高血壓鼠血液中尿素氮、肌酸酐、尿酸、鈉、鉀與肌酸激酶之影響.....	120
表 4.14、不同劑量中藥酒精萃取物對於 IMR 32 細胞存活率之影響.....	122
表 4.15、聚合的類澱粉樣蛋白與玫瑰或酸棗仁之不同劑量萃取物共同培養對於 IMR 32 細胞存活率之影響.....	125
表 4.16、聚合的類澱粉蛋白與雷公根或山楂之不同劑量萃取物共同培養對於 IMR 32 細胞存活率之影響.....	126
表 4.17、雷公根之 ITS 序列.....	139
表 4.18、酸棗仁之 ITS 序列.....	140
表 4.19、餵飼不同劑量雷公根 20%、酸棗仁 40% 酒精萃取物與紅麴山藥對於大鼠每週平均體重之影響.....	141
表 4.20、餵食不同劑量雷公根 20%、酸棗仁 40% 酒精萃取物與紅麴山藥對於大鼠血液中總膽固醇、三酸甘油酯、高密度脂蛋白與低密度脂蛋白膽固醇之影響.....	171
表 4.21、餵食不同劑量雷公根 20%、酸棗仁 40% 酒精萃取物與 RMD 對大鼠血液中肝功能天門冬胺酸轉胺酶、丙胺酸轉胺酶、鹼性磷酸酶之影響.....	172
表 4.22、餵食不同劑量雷公根 20%、酸棗仁 40% 酒精萃取物與紅麴山藥對大鼠血液中血清總蛋白量、白蛋白與球蛋白之影響.....	173
表 4.23、餵食不同劑量雷公根 20%、酸棗仁 40% 酒精萃取物與紅麴山藥對大鼠血液中腎功能尿素氮、肌酸酐與尿酸之影響.....	174
表 4.24、餵食不同劑量雷公根 20%、酸棗仁 40% 酒精萃取物與 RMD 對大鼠血液中電解質鈉、鉀、氯、鈣與磷之影響.....	175
表 4.25、雷公根飲品之沙門氏菌回復突變試驗結果.....	177
表 4.26、雷公根飲品之體外哺乳類細胞染色體異常試驗.....	179
表 4.27、雷公根飲品之齧齒類週邊血液微核試驗.....	182
表 4.28、餵飼雷公根飲品大鼠 28 天重複劑量亞急性毒性試驗血液學結果.....	184
表 4.29、餵飼雷公根飲品大鼠 28 天重複劑量亞急性毒性試驗血清生化結果.....	186
表 4.30、餵飼雷公根飲品大鼠 28 天重複劑量亞急性毒性試驗各器官組織重量.....	189

摘要

隨著生活水準提高與醫療科技的進步，人類的平均壽命延長，伴隨著年齡增長而引發的慢性疾病與老化現象的研究議題逐漸受到國人的重視及探討。本研究以不同模式之代謝症候群老鼠同時給予紅麴山藥及控制血脂、血糖及血壓之藥物，探討是否會引起非預期性效應。在高血脂部份，以敘利亞倉鼠 (Syrian Hamster) 誘導高血脂模式老鼠，實驗結果得知，高膽固醇飲食倉鼠每百克體重餵食紅麴山藥一倍以上劑量可顯著降低血液中膽固醇濃度達 23.3% 以上 ($p < 0.05$)。以 streptozotocin 誘導並施打 nicotinamide 保護劑，誘導為第二型糖尿病之模式動物。在糖尿病大鼠每公斤體重餵食紅麴山藥 176.0 mg 之一倍以上劑量血液中胰島素含量與糖尿病組相比，可顯著增加 3.0 IU/mL 以上 ($p < 0.05$)。在糖化血色素方面與糖尿病組相比，則可顯著降低 3.4% 以上 ($p < 0.05$)。在高血壓部份，以自發性高血壓大鼠為模式老鼠，將紅麴山藥與 amlodipine 併用，以單次餵食紅麴山藥 (176 mg/kg) 顯著降低收縮壓與舒張壓 6.1% 和 7.0% ($p < 0.05$)。在肝、腎功能方面，無論是正常組或是高血脂、糖尿病與高血壓組，在服用紅麴山藥或是紅麴山藥與藥物併用下，對於肝、腎代謝或是生理功能並未造成其負擔且未引發橫紋肌溶解症。

在第二部分，本研究經衛生福利部認可之可供食品使用且文獻曾記載具延緩老化之中藥作為素材，篩選出萃取物具高抗氧化力之中草藥，後續探討開發預防阿茲海默症之保健食品。以 IMR 32 神經細胞為模擬細胞，分析其細胞毒性與抗類澱粉樣蛋白₁₋₄₀ (amyloid β -peptide₁₋₄₀, $A\beta_{1-40}$) 引起之細胞傷害。由 IMR 32 細胞試驗得知，雷公根與酸棗仁酒精萃取物對細胞不會產生毒性造成細胞凋亡的現象，再以聚集的 $A\beta_{1-40}$ 所產生的神經毒素與細胞共培養也具有保護 IMR32 細胞免於受到 $A\beta_{1-40}$ 神經毒性傷害。

針對篩選出抗 $A\beta_{1-40}$ 毒性之雷公根與酸棗仁兩種中草药萃取物，以 8 週大之 Sprague-Dawley 系雄性大鼠為模式動物，應用腦部手術以 ALZET 腦部輸注幫浦在大鼠腦部海馬迴處連續輸注 $A\beta_{1-40}$ ，造成其在腦部沉積並破壞海馬迴組織，誘導大鼠產生阿茲海默症 (Alzheimer's disease, AD)。除此之外，由本研究室先前利用傳統變異法篩選得到 *Monascus purpureus* NTU 568 之紅麴菌株，其以紅麴米發酵之產物經研究證實對阿茲海默症危險因子具改善作用，且已發表多篇期刊論文證實以山藥當基質之紅麴發酵物具改善數種氧化壓力及發炎反應相關代謝症候群疾病的能力，推測此菌

株發酵生產之紅麴山藥對 A β 腦部輸注之阿茲海默症大鼠記憶學習能力應具改善潛力，因此與篩選出之中藥一併進行各項試驗。經過連續餵飼 28 天酸棗仁、雷公根萃取物或紅麴山藥在記憶學習和行為能力皆有改善現象，達到延緩衰老之功效。實驗動物犧牲後分析血液中脂質含量、肝、腎功能和電解質均無顯著差異。再分析腦部海馬迴組織中連續輸注類澱粉樣蛋白會增加乙醯膽鹼酯酶活性和氧化壓力傷害，降低總抗氧化能力。由動物記憶、行為試驗和血液安全性與功效性指標實驗與分析結果得知，酸棗仁、雷公根萃取物與紅麴山藥，在科學性的多方試驗下，對於以 A β ₁₋₄₀ 誘導之阿茲海默症大鼠確實能減緩阿茲海默症產生的失憶，提供更充分的證據證實其功效，在治療上或許能達到輔助效果。未來將以此優勢開發多效性之延緩老化保健食品。

關鍵詞：紅麴山藥、酸棗仁、雷公根、阿茲海默症、延緩老化

Abstract

With improvements in living conditions and advances in medical technologies, humans are living longer. Aging puts people at a greater risk for health issues, metabolic syndrome and chronic diseases related to aging have an impact on society as a whole. The aging related issues have brought great attention to the world and have been discussed extensively.

In this study, we aimed to investigate the effects of interaction of red mold dioscorea (RMD), which has long been considered a food product, with medicines in different animal models of metabolic syndrome. Results obtained from hyperlipidemia groups indicated that the blood cholesterol levels in groups that feeding RMD more than 22.96 mg/100 g hamster were significantly decreased by 23.3% ($p < 0.05$). Rat models of streptozotocin (STZ)-induced type II diabetes were established. These animals were divided into groups that feeding RMD more than 176 mg/kg rat the insulin concentrations were increased significantly up to 3.0 IU/mL ($p < 0.05$). Furthermore, in glycated hemoglobin significant decreases 3.4% ($p < 0.05$). Further, we used RMD with amlodipine to investigate RMD's effect on the anti-hypertension effect of amlodipine in a rat model of spontaneous hypertension. The results indicated that a single oral dose of RMD (176 mg/kg) administered over an 8-h period significantly ($p < 0.05$) decreased systolic blood pressure (SBP) and diastolic blood pressure (DBP) by 6.1% and 7.0%, respectively. No change in heart rate was observed. We did not observe rhabdomyolysis, a potentially dangerous side effect of statin drugs, in any experiments with animal models of metabolic syndrome. Furthermore, no animal exhibited signs of liver or kidney dysfunction.

In the second part, we aimed to develop functional foods by using Chinese herbs to counteract the effects of Alzheimer's disease (AD). For this purpose, extracts of the Chinese herbs *Rosa rugosa*, *Crataegus pinnatifida*, *Centella asiatica*, and Semen *Zizyphi spinosae* were selected from their high antioxidant activity. In the aggregated $A\beta_{1-40}$ neurotoxin model of IMR 32 cells, we found that *Centella asiatica* and the Semen *Zizyphi spinosae* ethanol extract had lower cell toxicity and protected IMR 32 cells from aggregation of the neurotoxic $A\beta_{1-40}$ peptide.

We established an animal model of AD by continuously injecting $A\beta_{1-40}$ into the hippocampus of SD rats by using an ALZET brain infusion pump. Groups fed *Centella asiatica*, Semen *Zizyphi spinosae* ethanol extract, or RMD demonstrated slight improvements in learning and memory capacity. After the animals were sacrificed, serum

biochemical analyses for liver function, renal function, and electrolyte balance were performed. No changes were observed in any of these parameters. Serum and hippocampus samples were collected to examine AD risk factors. A β ₁₋₄₀ infusion increased acetylcholinesterase activity and decreased total antioxidant status and superoxide dismutase activity in the brain; however, these damages were potently reversed upon administration of *Centella asiatica*, Semen *Zizyphi spinosae* ethanol extract, or RMD. Moreover, the protection afforded by these herbs was more significant than that afforded by cholinesterase inhibitor drugs.

In conclusion, our study provides further efficacy data in support of traditional functional foods for the treatment of diseases. We found that *Centella asiatica*, Semen *Zizyphi spinosae*, and RMD inhibit A β -induced neurotoxicity and may play a role in preventing the deleterious effects associated with AD. On the basis of these findings, we recommend the development of functional foods for therapy or as adjuvant agents for the prevention of AD.

Keyword: red mold dioscorea, Semen *Zizyphi spinosae*, *Centella asiatica*, Alzheimer's disease, ageing delaying.

第壹章 緒論

一、老化的定義 (李, 1995, 謝, 1996)

老化是指生物體在型態上和生理功能上隨年齡而有衰退的現象，所有生物的生命期都必經歷此一過程。推測造成老化的因素，可能與基因、激素、自由基理論及自體免疫等等有關，例如輻射線導致細胞的變異，因而降低細胞的機能，甚至導致細胞的死亡。所以老化的過程，通常是由細胞的衰變開始，接著組織器官退化而致整個個體老化。其可由功能 (function)、行為 (behavior) 及外表 (performance) 的變化來判定。在生理過程的老化是一種普遍性 (universal)、內因性 (intrinsicity)、進行性 (progressive) 及有害性 (deleteriousness) 之內外因素所導致之生理衰退。由於生物個體間、不同細胞器官系統間、不同人生階段或時期的老化步伐及表現不一，所以無法以單一或簡單的模式來加以判斷。隨年齡的增加，族群間之歧異 (diversity/heterogeneity) 也變大，增加很多複雜性。因此老化是身體構造與機能一連串改變而降低其功能。有關老化的研究以及被提出的理論多不勝數，其中以 Harman 於1956年提出的自由基老化理論，廣泛引起重視。此一理論主張自由基的產生會造成細胞的傷害而導致個體的衰退老化 (Harman, 1956)。自由基老化理論得到許多實驗證據的支持，例如：1990年 Sohal 等人發現，在不同種類哺乳動物及家蠅的粒腺體產生過氧化氫的速度與該種動物最長生命潛能 (maximum life span potential; MLSP) 成反比 (Sohal and Allen, 1990)。在同一種動物中，家蠅及大白鼠體內粒腺體過氧化氫的產生速率隨年齡而增加。相對地，由於超氧歧化酶 (superoxide dismutase)、觸酶 (catalase)、麩胱甘肽過氧化酶 (glutathione peroxidase) 及麩胱甘肽 (glutathione) 組成的抗氧化防禦系統的活性並未隨個體老化而成一致性的降低，也和動物最長生命潛能的差異無關 (Sohal and Orr, 1992)。亦有學者發現 SAM 系鼠 DNA 氧化損傷會隨著年齡增加而增加，而導致各組織器官受到傷害 (Hosokawa et al., 2000)。然而在老化鼠的中腦尾狀核及小腦發現 DNA 氧化損傷的分子標記 -8- 羥基 -2- 去氧鳥嘌呤核 (8-hydroxy-2-deoxyguanosine; 8-OH-dG) 含量高，則會造成老化及老化相關之各種疾病的主因 (Cardozo-Pelaez et al. 1999)。在正常的生理狀況下，生物體之氧化及抗氧化系統會呈現平衡狀態，然而，隨著年齡增加，體內活性氧物質隨之增加，而抗氧化防禦功能亦會逐漸衰退 (Sohal and Allen, 1990)，由於受到自由基傷害的程度，腦中的粒腺體、膜結構、蛋白質和核酸會隨年齡而增加，而抗氧化能力有降低的趨勢 (Ragusa et al.,

1992, Bowling et al., 1993)。而使此種平衡傾向氧化狀態，導致細胞失去對活性氧物質的防禦能力，自由基因而直接或間接破壞細胞的結構與功能，造成細胞的傷害或死亡。若能提高生物體內抗氧化防禦系統之作用，以減少活性氧物質的產生，則能減少對細胞的傷害，延緩生物體的衰老與死亡 (Janssen et al., 1993, Olanow, 1993, Warner, 1994)。

二、代謝症候群

代謝症候群 (metabolic syndrome) 為 1920 年 Eskil Kylin 首先提出高血壓、高血糖和痛風等三種危險因素，可群集成為一種症候群。爾後於 1947 年 Vague 發現上半身的肥胖與糖尿病及心血管疾病相關。當時並未引起注意。直至 1988 年美國 Gerald Reaven 教授在美國糖尿病學會的班汀獎 (Banting Award) 演說時首次提出 X 症候群 (Syndrome X) 的概念，解釋許多疾病危險因子聚集的現象 (Reaven, 1998)。這些危險因子主要包括高血壓 (或血壓偏高但未達高血壓診斷標準)、血脂異常 (dyslipidemia) (含血中三酸甘油酯偏高、高密度脂蛋白膽固醇偏低等脂質代謝異常)、糖尿病 [或空腹血糖偏高/葡萄糖耐受不良 (glucose intolerance)]、肥胖 [特別指中心肥胖 (central obesity) 或稱腹部肥胖]、以及高尿酸與凝血因子的不正常等等。其他類似的名稱尚有代謝不良症候群 (dysmetabolic syndrome)、胰島素抗性症候群 (insulin resistance syndrome)、多重代謝症候群 (plurimetabolic syndrome) 和死亡四重奏 (deadly quartet) 等 (Kaplan, 1989; Reaven, 1988)。世界衛生組織於 2006 年才統一名稱為代謝症候群，並定義其標準為：「在糖尿病或空腹血糖偏高或葡萄糖耐受不良或胰島素抗性的狀態，合併有以下情況二者及以上者，即為代謝症候群」 (WHO, 2006)：

(1) 肥胖 (男性腰圍除以臀圍比率大於 0.9、女性大於 0.85)，或身體質量指數在 30 以上者。

(2) 脂質代謝異常：三酸甘油酯 (triglyceride, TG) 大於等於 150 mg/dL 或高密度脂蛋白膽固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDL-C) 過低 (男性低於 35 mg/dL、女性低於 45 mg/dL)。

(3) 血壓大於 140/90 mmHg。

(4) 微白蛋白尿 (microalbuminuria)，指白蛋白的尿液排除率 (excretion rate) 大於 20 $\mu\text{g}/\text{min}$ 。

2001 年美國國家膽固醇教育計畫 (National Cholesterol Education Program, NCEP) 更訂出一個較簡單且最被廣泛使用的診斷標準，符合下列症狀標準 (含) 三項以上者，即為代謝症候群。

- (1) 男性腰圍大於 102 公分、女性大於 88 公分。
- (2) 三酸甘油酯大於 150 mg/dL。
- (3) 男性高密度脂蛋白膽固醇低於 40 mg/dL、女性低於 50 mg/dL。
- (4) 血壓大於等於 130/85 mmHg。
- (5) 空腹血糖大於等於 110 mg/dL。

歐美各國所定的診斷標準不同，各有其優劣，目前仍未統一，其中以 NCEP 定義較常被使用。台灣地區 2007 年國民健康局所公佈的代謝症候群診斷標準，即以 NCEP 版本為藍圖，在腰圍部分接受國內專家學者的建議，修正為適合亞洲人體型的標準之後定出。並在 2007 年時，為推動公共衛生政策，決議將我國代謝症候群判定標準以腹部肥胖，取代身體質量指數 (body mass index, BMI)，並將代謝症候群之空腹血糖異常值下修至 100 mg/dL，使我國之判定標準與國際接軌 (行政院衛生署國民健康局, 2007)。在 2009 年，國際糖尿病聯合會、美國心肺血研究所 (National Heart, Lung, and Blood Institute)、美國心臟學會 (American Heart Association)、世界心臟聯合會 (World Heart Federation)、國際動脈硬化學會 (International Atherosclerosis Society)、與國際肥胖研究學會 (International Association for the Study of Obesity)，發表聯合聲明，代謝症候群的診斷可參考 2001 NCEP ATP III (Adult Treatment Panel III) 定義為基準，配合 2005 國際糖尿病聯合會 (International Diabetes Federation) 定義中，依照族裔別不同而調整的腰圍標準 (Alberti et al., 2009)。

三、高血脂症 (hyperlipidemia) 與血脂異常 (dyslipidemia)

行政院衛生福利部統計資料顯示 (行政院福利部, 2013)，心血管疾病是國人十大死因之一，且有逐年升高之趨勢，而高血脂是心血管致病的重要因子。高血脂症是由於血中脂肪過高所產生之疾病，為造成動脈硬化症和心臟病發生的重要危險因素。每 100 人中約有一人發生此症，且男性高於女性。高血脂症可因遺傳 (家族遺傳性高血脂症)、次發性的因素 (糖尿病、肥胖症、腎病症候群)，或飲食因素導致 (Kinosian et al., 1994; Stampfer et al., 1991)。

體內脂質的來源如下：

(1) 從食物吸收的外來途徑 (exogenous pathway) 所攝取的脂肪中，短鏈或中鏈脂肪酸直接由腸細胞送入門靜脈到肝臟；長鏈脂肪酸及單甘油酯 (30-70%) 則在腸道中以乳糜微粒形式吸收，經由淋巴系統 (lymphatic system) 流入靜脈中，再經血管內皮細胞分泌的脂解酶 (lipoprotein lipase) 分解成游離脂肪酸，供細胞使用，其餘乳糜粒殘留物則與肝臟細胞的受體結合代謝。

(2) 由肝臟合成的內生途徑 (endogenous pathway)，肝臟每天將多餘的脂肪酸合成 TG 與 TC 結合成極低密度脂蛋白膽固醇，或是藉由肝臟中酵素合成 HDL-C。

(3) 脂肪 (lipid) 包括 TC、TG 及磷脂質 (phospholipid)。TC 為人體內合成細胞膜、膽汁、腎上腺素、荷爾蒙與維生素 D 的來源。TG 由肝臟及脂肪細胞產生及儲存，是一種能量來源，過多時會進入血液，磷脂質為構成細胞膜重要元素，尤其在腦和神經細胞含量特別多，這些脂溶性物質與血漿蛋白結合成脂蛋白，並藉由血液運輸至各器官及組織。

(4) 脂蛋白是血液中運送疏水性 TG 及 TC 的一種球狀顆粒，核心由 TG 及膽固醇酯組成，外圍是由磷脂質、游離膽固醇 (non-esterified cholesterol)、及脂蛋白元 (apolipoprotein) 所組成的親水性表面，其中脂蛋白元與特定細胞受體的結合及酵素系統的活化有關。

(5) 人體脂蛋白包括乳糜微粒 (chylomicron)、極低密度脂蛋白 (very low density lipoprotein, VLDL)、LDL 和 HDL 四種 (Thompson, 1989)。乳糜微粒在小腸合成，由 TG (85-95%)、TC (3-4%)、磷脂質 (2-6%) 及蛋白質組成。

(6) VLDL 主要於肝臟或小腸合成，運送由肝臟合成的內生性 TG 及 TC 至末梢組織，含 TG (50-60%)，TC (20-30%)、磷脂質 (12-16%) 及蛋白質。當 VLDL 顆粒被脂蛋白脂肪酶代謝分解後，會形成中間產物中密度脂蛋白，再轉化成 LDL，經由胞噬作用 (endocytosis) 進入細胞質後，嵌入溶小體 (lysosome)，去除顆粒外衣，最後釋出游離 TC (Steinberg et al., 1997)。

(7) LDL-C 由 TC (35-45%)、游離膽固醇 (6-15%)、磷脂 (22-26%)、TG (5-6%) 及蛋白質組成。HDL 在肝臟及小腸合成，包括蛋白質 (45%)、磷脂 (25%)、膽固醇酯 (10-20%)、游離膽固醇 (5%) 和中性脂肪 (7%)。血液中有 60-70% 的膽固醇是由 LDL 所攜帶 (LDL-C)，主要是將 TC 由肝臟帶到週邊組織。20-30% 的 TC 主要是由 HDL 運送 (HDL-C)，其來源為肝臟合成、乳糜粒的脂解作用、或極低密度脂蛋白

斷裂發展而成。HDL-C 能清除過多的 LDL-C，對心臟血管有保護作用 (Yan et al., 2007)。



世界衛生組織 (WHO)，將高血脂症臨床分類為五種型態：

Type I：因乳糜微粒過高而造成 TG 高達 1000-2000 mg/dL，TC 反而不高。

Type IIa：家族性高膽固醇血症，為體染色體顯性遺傳 (autosomal dominant)，病人年紀輕輕時即罹患冠心病 (coronary heart disease)，患者低密度脂蛋白過高 (LDL-C 高於 200 mg/dL)，同時造成 TC 高達 300 mg/dL 以上。

Type IIb：除 LDL-C 過高造成膽固醇過高外，且有輕-中度的極低密度脂蛋白 VLDL 過高造成的 TG 過高。

Type III：由於乳糜微粒殘餘物 (remnants) 與中密度脂蛋白 (intermediate density lipoprotein-cholesterol, IDL) 累積造成患者血液中 TC 及 TG 過高。

Type IV：患者極低密度脂蛋白升高造成的 TG 過高，且常有輕-中度的膽固醇過高現象，唯患者 LDL-C 正常。

Type V：患者由於乳糜粒脂蛋白與極低密度脂蛋白過高造成的 TG 過高症。

近年來在臨床上提出簡單分類如下：

- (1) 高膽固醇血症 (血液中 TC 濃度或 LDL-C 濃度高於正常值)。
- (2) 高三酸甘油酯血症 (禁食 12 小時後，血中 TG 濃度高於正常值)。
- (3) 混合型高血脂症 (血中 TC 及 TG 均高於正常值)。

HDL-C 是影響高血脂症治療的重要因子，當 HDL-C 小於 40 mg/dL 且合併高 TG 症者會增加冠心病的危險，反之 HDL-C 大於 60 mg/dL 則對心臟有保護作用。某些病患可能由其他疾病或代謝異常而引起高血脂症，例如甲狀腺功能偏低、肝腎病變、阻塞性肝臟疾病、服用藥物如黃體素 (progestins)、類固醇、利尿劑、過量飲酒、抽煙，或其他內分泌疾病，等會增加血液中 LDL-C 或降低 HDL-C 濃度易導致血脂異常，稱為次發性高血脂症 (Kinoshita et al., 1994; Stampfer et al., 1991)。

LDL-C 過高所引起的高膽固醇血症為動脈硬化和心臟疾病危險因子 (Daniel et al., 1989; Moghadasian et al., 1999)。

(一) 3-Hydroxy-3-glutaryl-CoA (HMG-CoA) 還原酶抑制劑

HMG-CoA 還原酶在肝臟催化 HMG-CoA 變成 mevalonic acid，這是 TC 生合成的主要速率決定步驟；而 mevalonic acid 為包括 TC 在內之固醇類化合物的前驅物。當 HMG-CoA 還原酶被抑制而減少 TC 合成，細胞為了維持正常的生理功能運作，會開始消耗儲存的 TC。當細胞內儲存的 TC 消耗殆盡時，可促使肝臟細胞增加低密度脂蛋白受體的數量與活性，使 LDL-C 從血液中被攝取利用，因而降低血中 TC 及 LDL-C，同時也影響其他脂類的代謝。

HMG-CoA 還原酶抑制劑是現今常使用之降膽固醇藥物之一，如 statin 類藥物，但 HMG-CoA 還原酶抑制劑在阻斷膽固醇的生合成過程中，會抑制 ubiquinone (coenzyme Q) 的產生，而 ubiquinone 是粒線體細胞膜上與腺嘌呤核糖三磷酸 (adenosine triphosphate, ATP) 合成有關的一種重要成分，細胞中 ATP 生成受阻，便導致細胞死亡及橫紋肌溶解 (rhabdomyolysis) (Omar *et al.*, 2001)。

(二) Statins 類降血脂藥

自從 statins 類降血脂藥問市以後，高血脂的治療有了突破性的發展。根據相關研究報告指出，此類藥物可以減少 TC 17% 至 29%，以及 LDL-C 24% 至 61%。其作用機轉主要是經由競爭性地抑制 HMG-CoA 還原酶而減少 TC 的合成 (Maron *et al.*, 2001)。目前上市的 statins 類降血脂藥包括有 simvastatin、atorvastatin、lovastatin、pravastatin、fluvastatin 以及 rosuvastatin (唐等, 2003)。

Lovastatin、simvastatin 皆為 lactones，主要經由肝臟中的 cytochrome P450 的 3A4 酵素代謝，二者皆屬於親脂性藥物，由於親脂性質可以強化穿透肌肉的能力，故也同時會有增加橫紋肌溶解症等肌肉毒性 (myopathy) 的風險。Statin 類藥物單獨給予時，造成肌肉病變的機率約為 0.1% 至 0.5%，而且常和劑量有關，若與其他和 statins 類藥物有共同代謝途徑的藥物或食品併用時，造成肌肉病變的機率則會增加 10 倍 (Williams and Feely, 2002)。

(三) Statin 藥物的肌肉毒性作用

Statin 類降血脂藥物所引發的肌肉毒性，以下簡略介紹。

1. 次要代謝中間產物的耗盡

最近已有許多研究顯示 statins 藥物在抑制合成 TC 的過程中，如 mevalonate 或 farnesyl pyrophosphate、geranylgeraniol 等次要產物，才是參與 statins 藥物引起肌

肉毒性 (Flint *et al.*, 1997) 的因素，TC 並非主要因素。研究顯示，statins 藥物會造成細胞內 ubiquinone (coenzyme Q) 缺乏 (Folkers *et al.*, 1990)，其原因有二。其一，statins 藥物被認為阻斷了 farnesyl pyrophosphate (ubiquinone 合成過程中的中間產物)，造成 ubiquinone 含量下降；其二，ubiquinone 是在低密度脂蛋白粒子中被運送的，當 statins 藥物降低了 LDL-C 的濃度後，ubiquinone 的濃度也會因此而降低 (Thompson *et al.*, 2003)。而 ubiquinone 是粒線體細胞膜上與腺嘌呤核苷三磷酸 (adenosine triphosphate, ATP) 合成有關的一種重要成分，細胞中 ATP 生成受阻，便導致細胞死亡及橫紋肌溶解。

一個使用 simvastatin 治療失敗的 6 個月研究中顯示在骨骼肌肉中的高能量磷酸與 ubiquinone 濃度有明顯的差異 (Laaksonen *et al.*, 1995)。

2. 引發凋亡細胞死亡

Simvastatin 可以導致血管平滑肌細胞 (vascular smooth muscle cells, VSMCs) 的凋亡作用增加，並呈現隨劑量增加而凋亡作用增加的現象 (Guijarro *et al.*, 1998)。

3. 氯離子通道傳導的改變

由於 statins 藥物會改變 TC 與磷脂質之比例，因此會導致細胞膜的性質發生變化，進而影響氯離子的通透性，並影響到肌肉的舒張性。已有研究顯示 simvastatin 可以降低 20% 的氯離子通道傳導能力 (Pierno *et al.*, 1992)。Tomoyuki 等人的研究中指出，simvastatin 會引起已分化的人類 rhabdomyosarcoma 細胞 (RD cells) 中肌酸磷酸激酶 (creatine phosphokinase, CPK) 的增加，進而增加肌肉毒性的風險，臨床上使用 statins 藥物治療時肌酸磷酸激酶濃度來作為此類藥物的不良反應的評估之用 (Tomoyuki *et al.*, 2003)。

四、糖尿病簡介

糖尿病 (diabetes mellitus, DM) 是體內醣類代謝障礙所造成的一種慢性疾病，其主要的原則是胰島素 (insulin) 分泌不足或胰島素功能缺陷，或兩者之共同缺陷所導致的慢性代謝疾病。其涉及碳水化合物 (carbohydrate)、脂肪 (fat) 及蛋白質 (protein) 的代謝異常，主要症狀為慢性的高血糖 (chronic hyperglycemia)。

糖尿病會造成各種器官長期的損傷、功能失調及衰退。視代謝異常嚴重程度，患

者往往會有易口渴、多尿 (polyuria)、視力模糊及體重下降的症狀，急性併發病譬如：糖尿病酮酸血症 (diabetic ketoacidosis, DKA) 或高血糖高滲透壓無酮酸症 (nonketotic hyperosmolar state)，若患者缺乏適當的照護常會造成死亡或後遺症的產生 (WHO, 1999)。糖尿病患者倘若血糖控制不當，長期處於高血糖的狀態，便會產生一些慢性併發症對視網膜 (retina)、腎絲球體 (renal glomerulus)、周圍神經 (peripheral nerve) 及血管內皮細胞造成不可逆之傷害，而產生諸如視網膜病變 (retinopathy)、腎臟病變 (nephropathy)、神經病變 (neuropathy) 等小血管性病變 (microvascular pathology)。糖尿病也會誘發高脂血症、促進動脈粥樣硬化 (atherosclerotic) 及凝血機制異常，而造成週邊血管疾病 (peripheral vascular disease, PVD)、腦血管疾病 (Cerebral Vascular Diseases, CVD) 以及冠狀動脈心臟病 (coronary heart disease, CHD)。因此糖尿病病患發生心肌梗塞 (myocardial infarction)、腦中風 (stroke) 及截肢 (limb amputation) 的危險性是一般人的二至四倍 (Meigs *et al.*, 1997; Brownlee, 2001)。

(一) 糖尿病診斷標準

1. 糖尿病:

隨機靜脈血漿葡萄糖值 ≥ 200 mg/dL (11.1 mmol/L) 或空腹 8 小時或口服葡萄糖耐受性試驗 (oral glucose tolerance test, OGTT) 之靜脈血漿葡萄糖濃度分別 ≥ 126 mg/dL (7.0 mmol/L) 和 ≥ 200 mg/dL (11.1 mmol/L);

2. 葡萄糖耐受性不良 (impaired glucose tolerance, IGT):

空腹靜脈血漿葡萄糖濃度 < 126 mg/dL (7.0 mmol/L)，且 140 mg/dL (7.8 mmol/L) \leq OGTT 靜脈血漿葡萄糖值 < 200 mg/dL (11.1 mmol/L);

3. 空腹血糖偏高 (impaired fasting glucose, IFG):

空腹靜脈血漿葡萄糖介於 110 mg/dL (6.1 mmol/L) 與 126 mg/dL (7 mmol/L) 之間，且 OGTT 靜脈血漿葡萄糖值 < 140 mg/dL (7.8 mmol/L)。

IFG 及 IGT，是指介於正常血糖與糖尿病之間的代謝異常狀態。依據美國糖尿病學會 (American Diabetes Association, ADA) 的解釋，是屬於潛糖尿病 (pre-diabetes) (The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 2003)。其二者致病機轉並不完全相似，國內外的流行病學研究發現，IGT 與

IFG 個案數約是糖尿病人數的兩倍，長期的觀察也發現，這些潛伏性糖尿病個案，將來得到心血管疾病的機會比正常人多出 1.5 倍。而且這些潛伏性糖尿病個案，每年有 5-10% 的機會會發展成第 2 型糖尿病 (Chou *et al.*,1998)。此外 IGT 的病人中肥胖者較多，常伴有高血壓、高血脂症，因而發生心血管病變，如：心肌梗塞、心絞痛的危險性也相對提高 (WHO, 1999)。

五、高血壓之簡介

一般正常血壓為收縮壓低於 130 mmHg，舒張壓低於 85 mmHg，若收縮血壓高於 140 mmHg，舒張血壓高於 90 mmHg 即為高血壓。高血壓分為兩類：

(1) 原發性高血壓 (essential hypertension)，佔全部高血患者 90% 左右，為遺傳性高血壓，罹患就無法根治，必須長期靠降壓物質控制。

(2) 續發性高血壓 (secondary hypertension)，大多是由腎臟機能衰弱、內分泌失調、神經性疾病或懷孕所引起，病情隨症狀治療後即消失。

高血壓以及其相關疾病更在國人十大死因中佔了五項，包括中風、心臟病、糖尿病、腎炎以及高血壓，高血壓初期除了血壓上升外，幾乎沒有任何症狀，故很容易因忽略而造成相關併發症，包括心臟肥厚、心臟衰竭、冠狀動脈硬化、腦中風、主動脈瘤、腎血管疾病、視網膜異常及失明等。故血壓的控制對於預防心血管疾病極為重要。

(一) 血壓之調控

影響血壓變化的因子很多，正常人能維持適當血壓，主要是由以下機制影響：

(1) 荷爾蒙調節：腎素-血管收縮素系統 (rennin-angiotensin system, RAS)。此為較長時間的調節反應，作用時間可到數小時甚至數日。

(2) 神經調節：經血管壁上的自律神經調節，自律神經又分為交感神經與副交感神經，分別造成血管的收縮與舒張。此為最快速的調節反應，可在數秒內就快速調節血壓。

(3) 血管平滑肌調節：血管平滑肌是保持血管柔軟的細胞，當細胞內外鈉、鉀和鈣離子濃度發生改變時，會影響血管壁收縮或舒張 (區，2002)。

(二) 降血壓藥物的使用之作用機制

目前可用的降血壓藥物作用機轉有很多，如下列所示：

(1) 利尿劑：促進鈉、水排出以達降血壓效果。

(2) 腎上腺素性抑制劑：降低交感神經活性，以降低血壓。

(3) 影響血管收縮素 II：分為兩大類，一為血管收縮素轉化酵素抑制劑 (angiotensin I converting enzyme inhibitor, ACEI)，二為血管收縮素受體拮抗劑 (angiotensin II receptor blocker)。

(4) 鈣離子通道拮抗劑：抑制平滑肌及心肌之鈣離子進入細胞，使血管平滑肌鬆弛，心臟收縮力降低。

(5) 血管擴張劑：直接鬆弛血管平滑肌。

這些藥物因個人體質不同效果不一定相同，而且皆具有相當的副作用（蔡等，2002）。

六、阿茲海默症

(一) 失智症與阿茲海默症盛行率

根據 2009 年全球失智症研究報告，估計在 2010 年底，全球約 3,600 萬人口被診斷為失智症，2030 年將達到 6,600 萬人，2050 年將高達 11,500 萬人。將近 3 分之 2 的患者為低中收入國家的國民，也正是老年人口成長快速的地方 (Alzheimer's Disease International, 2009)。台灣為因應人口老化，衛生福利部委託台灣失智症協會進行民國 100 年 1 月至 100 年 12 月的全國失智症盛行率調查，指出台灣 65 歲以上長者的失智症盛行率為 4.97%，相當於 65 歲以上老年人中，每 20 人就有一人罹患失智症。若依年齡區分，65 - 69 歲人口失智症盛行率為 2.98%，70 - 74 歲人口失智症盛行率為 2.85%，75 - 79 歲人口失智症盛行率為 6.72%，80 - 84 歲人口失智症盛行率為 11.6%，85 - 89 歲人口失智症盛行率為 20.31%，90 歲以上人口失智症盛行率為 34.08% (邱等, 2013)。研究指出 65 歲以上老人失智症之發生率為每年每千人有 13 名失智症患者，當中將近半數是由阿茲海默症 (Alzheimer's disease, AD) 引起 (劉等, 2000)。根據 2010 全球失智症研究報告指出，2009 全球對失智症的照護支出已高達 6040 億美金，相當於 1% 全球總國民生產毛額 (gross domestic product, GDP) (Alzheimer's Disease International, 2010)，隨著未來失智症人口增加，費用也將成比例攀升。

失智症 (dementia) 並非單一疾病，而為數種症狀的組合，其症狀多元，除了記憶力減退外，其他認知功能也會受到影響，包含語言能力、空間感、抽象思考能力、注意力功能產生退化現象，同時可能出現性格改變、干擾行為、妄想或幻覺等症狀。這

些症狀足以影響患者人際關係與工作能力，使患者需要人力長期照護。引發失智症的原因相當多元，可以大致分為兩類：退化性和血管性，但患者有時候會同時具有多種病因，最常見的為 AD 與血管性失智症並存。血管性失智症是因為腦中風或腦血管疾病，造成腦細胞死亡進而智力減退，為失智症的第二大原因。整體而言，中風病患若存活下來，初期約有 5% 病患會有失智症狀，經過 5 年長期追蹤，發現腦中風後病患得失智症的機會約 25%。退化型失智症則以 AD 為最大宗，約佔所有病例 70% (Fratiglioni *et al.*, 1999; Small *et al.*, 1997)，因此 AD 可謂是失智症中最重要的疾病。因此針對改善 AD 之研究為近年來相當重要的議題。為了對抗 AD，美國總統歐巴馬於 2011 年 1 月 4 日簽署了全國阿茲海默症法案 (National Alzheimer's Plan)，目標為在 2025 年前找到預防或治療這種疾病，並改善已患病者症狀的方法。2013 年 4 月 2 日宣布研究人類大腦的大型計畫「推進創新神經技術腦部研究」(Brain Research through Advancing Innovative Neurotechnologies, BRAIN)，了解健康大腦運作方式，進而研發治療 AD 等腦部疾病的藥物，計畫初步預定在 2014 年投入一億美元。

(二) 阿茲海默症之發現與分類 (Arvin *et al.*, 1996; Behl *et al.*, 1994)

阿茲海默症又稱老年失智症，由德國 Alois Alzheimer 醫生於西元 1907 年發表之患有失智 (dementia) 症狀的 51 歲女性個案研究報告中首次記錄 (Alzheimer, 1907)，因此以其名命名，是最常見的失智症。報告中說明，該名女性患者因為出現幻覺 (delusions) 而求助治療，但治療效果並不顯著，病情持續惡化，出現記憶力、語言能力喪失與妄想 (paranoia) 等多種認知功能失調。患者於西元 1906 年死於敗血症後，腦部解剖結果發現其血管出現粥狀動脈硬化現象 (arteriosclerosis)，以及過去未曾報告過的兩大病徵，第一為部分大腦皮質 (cortex) 神經纖維相互纏繞糾結，第二為皮質層上部出現許多不明的沉積斑點。上述兩種大腦病徵，現今被視為 AD 的重要臨床症狀，前者被命名為神經纖維糾結 (neurofibrillary tangles, NFTs)；後者的斑塊 (senile plaque) 則被發現由類澱粉樣蛋白質 (amyloid β , A β) 積聚而成。

AD 依發病時間可分成兩大類型，65 歲以前被診斷的 AD，稱為早發性阿茲海默氏症 (early onset Alzheimer's disease, EOAD)，約占 AD 族群的 5-10%，其中又有大約一半的病例，是屬於遺傳體質而造成的家族型阿茲海默症 (family Alzheimer's disease, FAD)。而 65 歲之後被診斷為 AD 的病患，稱為晚發型阿茲海默症 (late-onset

Alzheimer's disease, LOAD)。

LOAD 患者發病通常在 65 歲以上，為最主要的患者類型，至今尚未發現特定的致病基因，其發病原因目前亦尚未明瞭。目前學術界有一派假說認為， $A\beta$ 引起神經細胞氧化性傷害或發炎反應造成神經死亡，導致 AD 的發生。目前這個假說也是被廣泛討論以及應用的假說。

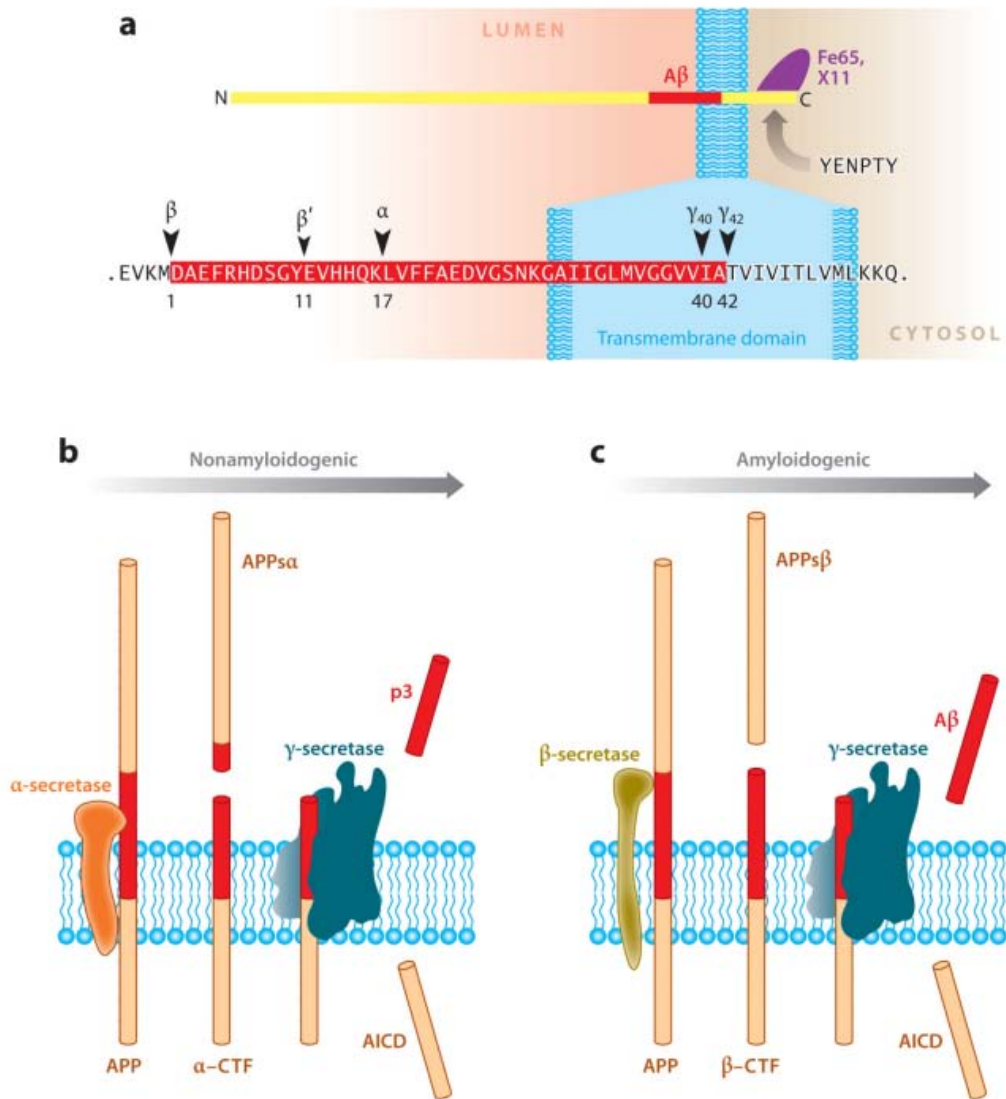
(三) 阿茲海默症之病理成因

AD 之病理機制並非單一因子所造成，而是多種因子交互影響，目前學術界對 AD 的致病機轉依然不完全瞭解。西元 1984 年，Glenner 和 Wong 在 AD 患者腦中斑塊中發現分子量 4 kDa 的 $A\beta$ (Glenner and Wong, 1984)，推測 $A\beta$ 可能是致病因子。爾後十年內，陸續發現 FAD 患者基因突變的位置，主要以 *PSEN 1* 基因與 *APP* 基因為主，這兩類物質均與 $A\beta$ 的產生有關 (Selkoe, 1997; Schweber, 1985)。這些證據使科學家認為 $A\beta$ 可能是 AD 疾病的關鍵致病因子。於是在 2002 年，Hardy 和 Selkoe 提出 $A\beta$ 假說 (amyloid β hypothesis) (Hardy and Selkoe, 2002)，假設沉積在大腦中的 $A\beta$ 藉由一連串的反應造成了 AD 的症狀。伴隨眾多證據指出 $A\beta$ 引起的神經損傷和 $A\beta$ 代謝異常是造成 AD 的主要因素 (Mattson, 2004)，目前科學界普遍認可此假說為造成 AD 的主因。

1. 類澱粉樣蛋白前驅物切割 (amyloid precursor protein processing)

Amyloid precursor protein (APP) 在神經元當中會大量產生，且代謝速度迅速 (Lee *et al.*, 2008)。有多種途徑會造成 APP 降解，部分會產生 $A\beta$ ，部分不會。APP 功能尚未十分了解，目前已知可作為軸突運輸的受器 (Kamal *et al.*, 2000)。在細胞表面上，APP 可直接被 α -secretase 切割後， γ -secretase 進行再切割，此途徑不會產生 $A\beta$ ，稱為 non-amyloidogenic pathway。或者經由 β -secretase 切割後， γ -secretase 進行再切割，此途徑會產生 $A\beta$ ，稱為 amyloidogenic pathway (圖 1.1)。

α -Secretase 在 APP 上 $A\beta$ 胺基酸序列的第 +17 位置進行切割。APP 經 α -secretase 切割後產生 secreted APP α (sAPP α) 與含 83 個胺基酸的 CTF 83 (carboxy-terminal fragments 83) 兩片段。sAPP α 具有穩定細胞靜止膜電位 (resting membrane potential)、幫助神經突觸生成、細胞固著與保護神經等功能 (Mattson *et al.*, 1993; Mattson, 1997; Furukawa *et al.*, 1996; Gakhar-Koppole *et al.*, 2008)。而 CTF83 經



(O'Brien *et al.*, 2011)

圖 1.1、類澱粉樣蛋白前驅物藉由兩種路徑進行序列切割。(a) 類澱粉樣蛋白前驅物被切割的位置。(b) 非類澱粉樣途徑。(c) 類澱粉樣途徑。

Figure 1.1 Sequential cleavage of the amyloid precursor protein (APP) occurs by two pathways. (a) The position APP is cut. (b) Nonamyloidogenic processing of APP. (c) Amyloidogenic processing of APP.

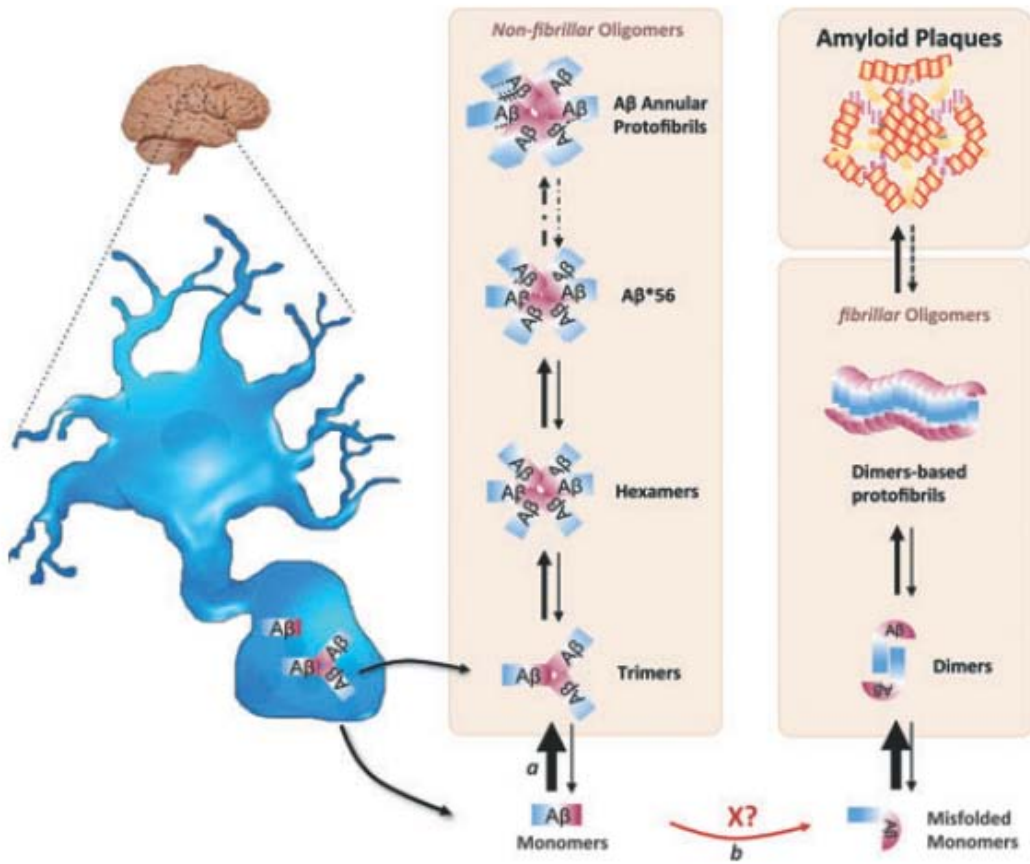
γ -secretase 切成 p3 與 APP intracellular domain (AICD) 兩部分。p3 之生理功能目前尚不明瞭，而 AICD 可進入細胞中與 Fe65 蛋白質結合啟動訊息傳遞 (Chow *et al.*, 2010) 與細胞凋亡 (Müller *et al.*, 2008)。 β -secretase 為一種穿膜蛋白酶，直接在 APP 上 A β 胺基酸的第 +1 或 +11 位置進行切割。APP 經 β -secretase 切割後產生 secreted APP β (sAPP β) 與 CTF 99 (carboxy-terminal fragment 99) 兩片段。sAPP β 不具有如 sAPP α 之神經保護功能 (Furukawa *et al.*, 1996)，但具有修飾發展中的中樞與週邊神經突觸之功能 (Nikolaev *et al.*, 2009)。而 CTF 99 繼續被 γ -secretase 在胺基酸的第 +40 和 +42 的位置進行切割，產生 A β 與 AICD，產生的 A β 主要為 A β ₁₋₄₀ (amyloid beta₁₋₄₀) 型態，少量為 A β ₁₋₄₂ (amyloid beta₁₋₄₂) 型態。 γ -Secretase 是一種多種蛋白質形成的複合體，包含早老素 1 (presenilin 1, PS2)、早老素 2 (presenilin 2, PS2)、nicastrin、Aph-1 和早老素增強子-2 (presenilin enhancer-2, Pen-2)。

2. 類澱粉樣蛋白聚集

目前已知 A β 的單體和三聚體由神經元直接產生，一旦進入組織間液，A β 以三聚體為基礎開始聚合。此類 A β 不會形成纖維，但經過不明原因的刺激，A β 單體構型出現錯誤，形成雙聚體，進而形成原纖維 (protofibrils)，最終形成纖維 (圖 1.2) (Larson and Lesné, 2012)。單體的 A β 並不具有毒性，經過自體聚集 (self-association) 後，聚集之 A β 才具備神經毒性。AD 患者大腦出現的斑塊是由 A β 高度聚集成的纖維束 (fibers) 堆積而成，因此過去學界推測纖維形態的 A β 為主要毒性成分 (Hardy and Higgins, 1992)。但部分研究指出大腦斑塊多寡與失智嚴重程度並無直接相關，暗示纖維形態的 A β 可能不是毒性主要元凶 (Katzman *et al.*, 1988; Terry, 1994)。日後的研究發現，可溶性的低聚體 (oligomer) A β 具有較高的神經毒性，可能為 A β 產生毒性的主要來源 (Naslund *et al.*, 2000)。

3. 類澱粉樣蛋白造成氧化壓力與粒線體損傷

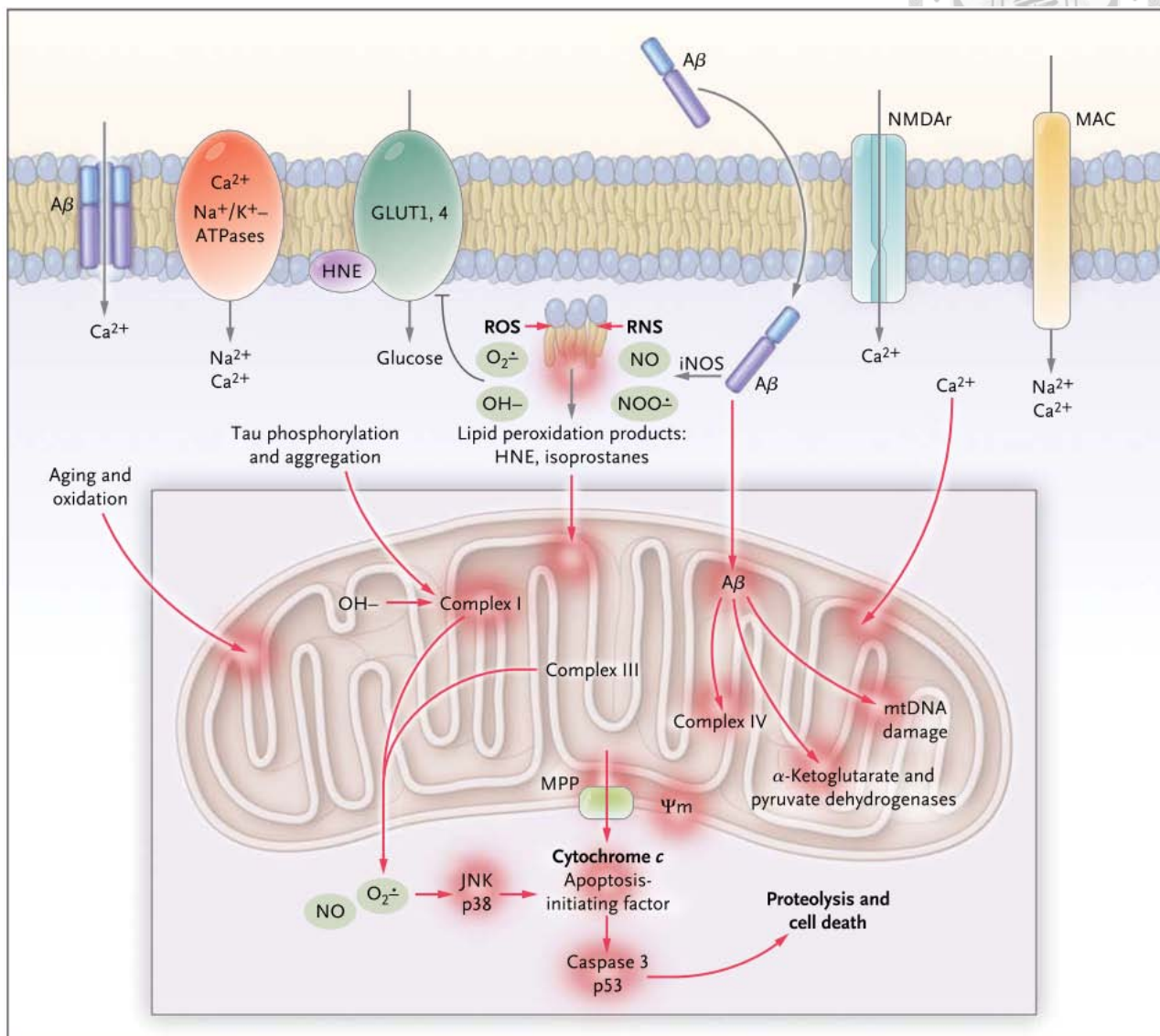
在 AD 患者腦中，A β 會抑制腦中的關鍵粒線體酵素，尤其是細胞色素 c 氧化酶 (Mungarro-Menchaca *et al.*, 2002)。因此粒線體的功能，包含電子傳遞鏈、三磷酸腺苷產生功能、粒線體膜電位 (mitochondrial membrane potential, MMP) 等皆會受到損傷。上述粒線體的功能損傷會造成細胞色素 c 釋出、氧化壓力上升以及細胞凋亡增加 (圖 1.3)。除了酵素功能損傷外，AD 與正常老化過程，皆會使粒線體 deoxyribonucleic acid



(Larson and Lesne, 2012)

圖 1.2、聚合型 A β 的產生模型。

Figure 1.2 Proposed model for oligomeric A β production



(Querfurth and LaFerla, 2010)

圖 1.3、類澱粉樣蛋白造成粒線體損傷。

Figure 1.3. Aβ causes mitochondrial dysfunction

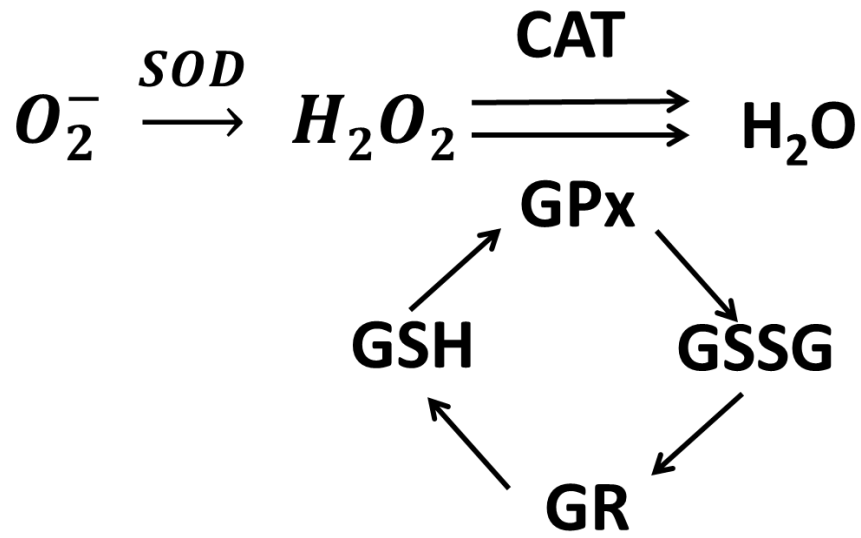
(DNA) 維持在因氧化壓力造成的高度損傷狀態，使粒線體 DNA 逐漸累積突變，構造性與功能性蛋白質再生失衡，最後造成神經細胞突觸消失 (Cho *et al.*, 2009)。

在 AD 患者與正常老年人的腦中，氧化自由基皆會對腦部產生較高的氧化壓力 (Good *et al.*, 1996)。A β 會產生活性氧分子 (reactive oxygen species, ROS) 和活性氮分子 (reactive nitrogen species, RNS)，為造成氧化壓力的始作俑者。A β ·ROS 和 RNS 會造成細胞脂質與蛋白質等組成分子的過氧化。膜脂質的過氧化會產生有毒的醛類 [hydroxynonenal (HNE) 與 malondialdehyde (MDA)]，進而造成粒線體酵素嚴重受損 (Keller *et al.*, 1997; Humphries *et al.*, 1998)，蛋白質被過氧化則造成功能與構型的喪失，以及被氧化成羰基衍生物。此外 A β 藉由一些受器，如 *N*-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR)，或直接形成離子選擇性孔洞，造成細胞質與粒線體中鈣離子濃度上升。鈣離子濃度上升除了會使粒線體受損，也會使 ROS 增加 (Mattson, 2004)。

A β 片段上的第 35 號胺基酸 methionine (Met-35) 為產生氧化壓力的主要胺基酸。Met-35 上的硫分子，被氧化成 sulfuranyl free radical 後，會攻擊神經細胞引發脂質與蛋白質氧化，直接造成細胞組成分子的氧化傷害。除此之外可與金屬離子如亞鐵離子 (Fe²⁺) 相互結合形成複合物。此類複合物在有氧環境下，會持續進行氧化還原反應，產生大量 ROS 包含 hydrogen peroxide (H₂O₂)、singlet oxygen、超氧陰離子 (superoxide) 與 NO 等，造成氧化性損傷 (Clementi *et al.*, 2005)。

4. 體內的抗氧化防禦系統與阿茲海默症

為了對抗體內與體外的各種氧化物質，人體本身具有一套抗氧化系統保護自己免於氧化傷害，如圖 1.4 所示，包含抗氧化酵素，如過氧化氫酶 (catalase, CAT)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 與穀胱甘肽過氧化酶 (glutathione peroxidase, GPx) 等，以及其他小分子如穀胱甘肽 (glutathione, GSH)、維生素 C (vitamin C)、維生素 E (vitamin E) 等，可以清除 ROS 或降低 ROS 在人體內含量 (Chong *et al.*, 2005)。SOD 將超氧陰離子自由基 (superoxide radical) 轉換成 H₂O₂。CAT 和 GPx 將 H₂O₂ 進一步轉化成水，藉由此途徑可以將超氧陰離子自由基與 H₂O₂ 兩種有毒物質轉換成無毒的水 (Li *et al.*, 2000)。當抗氧化系統與自由基含量失去平衡，便會造成氧化壓力 (oxidative stress)。大腦本身對氧需求極高，為代謝氧速率最高的組織 (Maiese, 2002)，因此會有大量 ROS 產生，而腦內脂質含量高，產生脂質過氧化的機率增加。

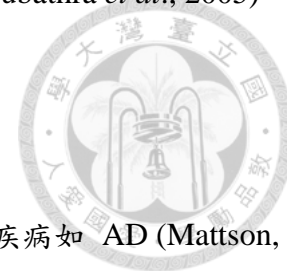


(Li *et al.*, 2000)

圖 1.4、抗氧化酵素系統。

Figure 1.4. Antioxidant enzyme system

隨著年紀增長，抗氧化系統能力逐漸下降，造成 ROS 含量增加 (Subathra *et al.*, 2005)，導致 AD 主要發生在年長者身上。



5. 類澱粉樣蛋白造成細胞凋亡

細胞凋亡不只發生在正常的神經發展，也發生在神經退化性疾病如 AD (Mattson, 2003)。AD 患者的大腦細胞凋亡相關蛋白以及特定的 DNA 片段表現量特別高，但是卻只有極少量的神經元，會表現出細胞凋亡的型態 (Jellinger, 2011)，可能是因為長期且有效率地清除細胞凋亡的神經元，導致型態與一般細胞有所差異。

(四) 阿茲海默症的危險因子

AD 中患者大多為 65 歲以上老人，隨著年齡增長，罹患該疾病的機會也增加，因此可知老化為其中一項危險因子，推測是因為人類逐漸老化引起大腦退化和清除自由基的能力減弱有關 (Frank and Gupta, 2005)。除了年齡，遺傳基因也是重要的危險因子，目前已知與 AD 相關遺傳基因都是從研究 FAD 而來，包含位於第 1 號染色體上之 PS2 基因 (*PSEN2*)，第 14 號染色體上之 PS1 基因 (*PSEN1*)、第 21 號染色體上的 APP 基因 (Goate *et al.*, 1991)。在 LOAD 中，第 19 對染色體上的 APOE 基因也是危險因子。以下將針對基因進行介紹。

1. APP 基因

APP 為 $A\beta$ 的前驅蛋白質，APP 經過一系列切割後產生形成 $A\beta$ 。APP 基因位於第 21 號染色體上，和第 21 號染色體相關的最著名疾病為唐氏症 (Down's syndrome)，特色為具有三個第 21 號染色體。研究指出唐氏症患者容易罹患 AD，但若唐氏症患者的第三個 21 號染色體沒有 APP 基因，則大腦不易發展出 AD 的病理特徵 (Schweber, 1985)，顯示 APP 基因與 AD 發生具有高度關聯性。APP 基因突變和 AD 病程有關，而突變的位置主要分佈在 γ -secretase 和 β -secretase 切位與 $A\beta$ 序列中。當突變位在 β -secretase 切位，例如瑞典雙突變 (Swedish double mutation) 會增加 β -secretase 與 APP 之親和性。 α -Secretase 和 β -secretase 相互競爭切割 APP，當 β -secretase 親和性增加，會導致 APP 代謝途徑走向 amyloidogenic 路徑，形成較多的 $A\beta$ (De Strooper and Annaert, 2000)。當突變位置靠近 γ -secretase 切位，會使人體內 $A\beta_{1-42}$ 與 $A\beta_{1-40}$ 比例改變， $A\beta_{1-40}$ 表現量下降， $A\beta_{1-42}$ 上昇。(Citron *et al.*, 1997; De Strooper and Annaert, 2000)。

2. PSEN1 與 PSEN2 基因

1995 年找到兩個和 AD 有關聯的基因，一個是在第 14 號染色體的 PSEN1 (Sherrington *et al.*, 1995)，另一個則是在第 1 號染色體的 PSEN2 (Levy-Lahad *et al.*, 1995)，FAD 約有 70% 的原因是 PSEN1 與 PSEN2 基因突變 (Selkoe, 1997)。PSEN1 與 PSEN2 基因分別轉譯出蛋白質 PS1 與 PS2，這兩個蛋白質為 γ -secretase 的核心部位，此兩基因突變會造成 γ -secretase 活性增加，更容易切割出 A β (Castellani *et al.*, 2008)，且使 A β ₁₋₄₂:A β ₁₋₄₀ 比例上升 (Citron *et al.*, 1992)。

3. APOE 基因

APOE 基因位於第 19 號染色體上，其轉譯形成之蛋白質為載脂蛋白 E (apolipoprotein E, apoE)，為運輸脂質的分子，apoE2 和 apoE3 運輸高密度脂蛋白，apoE4 運輸極低密度脂蛋白。擁有 APOE4 基因的人顯著的增加罹患 AD 的機會 (Roses and Saunders, 1994)。APOE 會幫助形成高密度脂蛋白顆粒，促進可溶性形式的 A β 的降解 (Donkin *et al.*, 2010; Jiang *et al.*, 2008)。

(五) 阿茲海默症之臨床診斷

過去藉由外顯的認知缺損和行為異常，判斷病患是否罹患 AD 有極大不確定性，因 AD 與其他失智症有多種相似的外顯行為與認知症狀，易發生誤判。現今針對 AD 的診斷除了認知能力測驗，也結合了影像與生物標記的方式，可以早期發現 AD 病症，並早期投入治療。以下將從認知能力診斷、影像學診斷與生物標誌三方面逐一介紹。

1. 認知能力診斷

AD 患者最主要的病徵為記憶力缺損，一開始以短期記憶 (short-term memory) 受損為主，對於剛發生的事經常性遺忘，但依然記得過去的事。隨著疾病發展，長期記憶 (long-term memory) 功能也逐漸出現損傷，過去的回憶也漸漸淡忘。除了記憶力缺損，其他認知功能也會出現損傷，如失語 (aphasia)、失用 (apraxia) 及失認 (agnosia)。失語為語言障礙，早期病患可使用的詞彙變少，流暢度降低。進而開始無法想起詞彙，導致經常出現錯誤的字彙替換，也漸漸失去讀寫能力。失用是在無運動或感覺障礙時，在作出有目的或精細動作時表現無能為力的狀況，有時也意味著不能

在全身動作的配合下，正確地使用一部分肢體去作已形成習慣的動作。失認為物體辨認出現困難，例如無法辨認出帽子。除了認知能力與記憶，易怒、憂鬱 (depression)、攻擊性 (aggression)、幻覺 (hallucinations) 與妄想 (delirium) 等症狀也逐漸出現 (Dawbarn and Allen, 2008)。

AD 診斷以臨床病史為主，除了病人及家屬提供臨床病史外，醫生還需要透過 AD 診斷的準則，來判定是否患罹患 AD。目前國際間常用的 AD 診斷準則有三種：一是國際疾病分類第十版 (International Classification of Disease 10, ICD-10)，二是美國精神科協會發展的精神疾病診斷準則手冊第四版 (Diagnostic and Statistical Manual IV, DSM-IV)，三則為國家神經與溝通疾病與中風機構暨阿茲海默症相關疾病學會 (National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and Alzheimer's Disease and Related Disorders Association, NINCDS/ADRDA) 所訂的老年失智症診斷準則，其中第三者最被研究者廣泛使用。其共同特色為記憶力及其他一種以上的認知功能缺損，病人的意識是清醒的，並無意識混亂的情形下，缺損會逐步的進展惡化造成病人的日常生活功能障礙。詳細標準列於表 1.1 至表 1.3。而 NINCDS/ADRDA 準則會再依據簡易智能狀態測驗 (mini-mental state examination, MMSE) (Folstein *et al.*, 1975)、電腦斷層掃描等多重方面診斷失智症患者是否為 AD，增加診斷確度。

MMSE 為神經科醫師最廣泛用於檢測失智症的檢查項目之一，滿分是 30 分，約 10 分鐘內可完成，且檢測項目廣泛，包括人時地定向 (10 分)，三項詞句之覆頌 (3 分)，注意力和計算能力 (5 分)，回憶 (3 分)，語言能力 (8 分)，及空間建構能力 (1 分)。當測得 MMSE 分數為 25 分以下，開始出現輕度神經認知功能障礙 20 分以下，為輕度阿茲海默氏失智症，14 分以下，為中度阿茲海默氏失智症，5 分以下，為中重度阿茲海默氏失智症，0 分為重度阿茲海默氏失智症。MMSE 列於圖 1.5。

2. 影像學診斷

除了以認知量表進行判斷外，隨著技術突破，人類也可以使用影像來檢視腦部是否有病變，進而提升診斷阿茲海默症的準確率。現行臨床用以診斷的影像技術主要有三種，包含核磁共振攝影 (magnetic resonance imaging, MRI)、功能性核磁共振攝影 (functional magnetic resonance imaging, fMRI) 以及正子發射斷層掃描 (positron



表 1.1、精神疾病診斷與統計手冊第四版阿茲海默症診斷準則

Table 1.1 Diagnostic and Statistical Manual IV Alzheimer's disease criteria

Diagnostic criteria for dementia of the Alzheimer's type

A The development of multiple cognitive deficits manifested by both memory impairment (impaired ability to learn new information or to recall previously learned information one (or more) of the following cognitive disturbances

- Aphasia (language disturbance)
- Apraxia (impaired ability to carry out motor activities despite intact motor function)
- Agnosia (failure to recognize or identify objects despite intact sensory function)
- Disturbance in executive functioning (ie planning, organizing, sequencing, abstracting)

B The cognitive deficits in Criteria A1 and A2 each cause significant impairment in social or occupational functioning and represent a significant decline from a previous level of functioning.

C The course is characterized by gradual onset and continuing cognitive decline.

D The cognitive deficits in Criteria A1 and A2 are not due to any of the following

- Other central nervous system conditions that cause progressive deficits in memory and cognition (e.g. cerebrovascular disease, Parkinson's disease, Huntington's disease, subdural haematoma, normal-pressure hydrocephalus, brain tumour)
- Systemic conditions that are known to cause dementia (e.g. hypothyroidism, vitamin b₁₂ or folic acid deficiency, niacin deficiency, hypercalcaemia, neurosyphilis, HIV infection)
- Substance-induced conditions

E The deficits do not occur exclusively during the course of a delirium

F The disturbance is not better accounted for by another Axis 1 disorder (e.g. major depressive disorder, schizophrenia).

(Dawbarn and Allen, 2008)



表 1.2、國際疾病與相關健康問題統計分類第十版阿茲海默症診斷準則

Table 1.2 International Classification of Disease 10 Alzheimer's disease criteria

Diagnostic guidelines
The primary requirement for diagnosis is evidence of decline in both memory and thinking which is sufficient to impair personal activities of daily living
Symptoms and impairments should be evident for <i>at least 6 months</i> for a confident clinical diagnosis of dementia to be made
The following features are essential for a definite diagnosis:
(a) Presence of a dementia as described above
(b) Insidious onset with slow deterioration. While the onset usually seems difficult to pinpoint in time, realization by others that the defects exist may come suddenly. An apparent plateau may occur in the progression
(c) Absence of clinical evidence, or findings from special investigations, to suggest that the mental state may be due to other systemic or brain disease which can induce a dementia (e.g. hypothyroidism, hypercalcaemia, vitamin B ₁₂ deficiency, niacin deficiency, neurosyphilis, normal-pressure hydrocephalus, or subdural haematoma)
(d) Absence of a sudden apoplectic onset, or of neurological signs of focal damage such as hemiparesis, sensory loss, visual field defects, and incoordination occurring early in the illness (although these phenomena may be superimposed later)

(Dawbarn and Allen, 2008)

表 1.3、國際神經與溝通疾患機構暨阿茲海默症相關疾患協會診斷準則

Table 1.3 National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and Alzheimer's Disease and Related Disorders Association criteria

Diagnostic criteria¹

- A Alzheimer's disease is characterized by progressive decline and ultimately loss of multiple cognitive functions, including both:
- Memory impairment (impaired ability to learn new information or to recall previously learned information)
 - And at least one of the following
 - Loss of word comprehension ability, e.g. inability to respond to 'Your daughter is on the phone' (aphasia)
 - Loss of ability to perform complex tasks involving muscle coordination, e.g. bathing or dressing (apraxia)
 - Loss of ability to recognize and use familiar objects, e.g. clothing (agnosia)
 - Loss of ability to plan, organize, and execute normal activities, e.g. going shopping
- B The problems in A represent a substantial decline from previous abilities and cause significant Problems in everyday functioning
- C The problems in A begin slowly and gradually become more severe
- D The problems in A are not due to:
- Other conditions that cause progressive cognitive decline, including stroke, Parkinson's disease, Huntington's chorea, brain tumour, etc.
 - Other conditions that cause dementia, including hypothyroidism, HIV infection, syphilis, and deficiencies in niacin, vitamin B12, and folic acid
- E The problems in A are not caused by episodes of delirium
- F The problems in A are not caused by another mental illness: depression, schizophrenia, etc.

Criteria for diagnosis of probable Alzheimer's disease

- Dementia established by clinical examination, and documented by a standard test of cognitive function (e.g. Mini-Mental State Examination, Blessed Dementia Scale, etc.) and confirmed by neuropsychological tests
- Significant deficiencies in two or more areas of cognition, e.g. word comprehension and task-completion ability
- Progressive deterioration of memory and other cognitive functions
- No loss of consciousness
- Onset from age 40–90, typically after age 65
- No other diseases or disorders that could account for the loss of memory and cognition

A diagnosis of probable Alzheimer's disease is supported by:

- Progressive deterioration of specific cognitive functions: language (aphasia), motor skills (apraxia), and perception (agnosia)
- Impaired activities of daily living and altered patterns of behaviour
- A family history of similar problems, particularly if confirmed by neurological testing
- The following laboratory results:
 - normal cerebrospinal fluid (lumbar puncture test)
 - normal electroencephalogram (EEG) test of brain activity
 - evidence of cerebral atrophy in a series of CT scans

(Dawbarn and Allen, 2008)

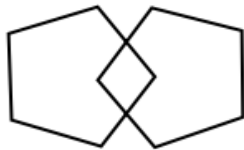
簡易智能狀態測驗

Mini-Mental Status Examination (MMSE)

Name: _____ Study ID: _____ Date: 西元_____年__月__日
 Chart No.: _____ Handness: _____ Examination: _____

錯 正 不
 誤 確 明

- 0 1 9 1) 今年是哪一年?
 0 1 9 2) 現在是什麼季節?
 0 1 9 3) 今天是幾號?
 0 1 9 4) 今天是禮拜幾?
 0 1 9 5) 現在是哪一個月份?
 0 1 9 6) 我們現在是在那一個縣、市?
 0 1 9 7) 這棟樓房/建築是做什麼用的?用途是什麼?
 0 1 9 8) 這間醫院(診所)的名稱?
 0 1 9 9) 現在我們是在幾樓?
 0 1 9 10) 這裡是哪一科?
 0 1 9 11) 樹木『牡丹』 請重複這三個名稱,按第一次複述結果計分,
 0 1 9 剪刀『汽車』 最多只能重複練習三次;練習次數: _____
 0 1 9 火車『石頭』
 12) 請從 100 開始連續減 7,一直減 7 直到我說停為止。
 93_____; 86_____; 79_____; 72_____; 65_____;
 0 1 9 13) 樹木(三分鐘以後)
 0 1 9 14) 剪刀
 0 1 9 15) 火車
 0 1 9 16) (拿出手錶)這是什麼? _____
 0 1 9 17) (拿出鉛筆)這是什麼? _____
 0 1 9 18) “知足天地寬『心安菜根香』”
 0 1 9 19) “請閉上眼睛”
 0 1 9 20) 請用左/右手(非利手)拿這張紙
 0 1 9 把它折成對半
 0 1 9 然後置於大腿上面
 0 1 9 21) 請在紙上寫一句語意完整的句子。(含主詞動詞且語意完整的句子)
 0 1 9 22) 這裡有一個圖形,請在旁邊畫出一個相同的圖形。



總分

(圈選 9 的部分不予計入,並說明無法施測之原因)

(台北市士林區健康服務中心, 2013)

圖 1.5、簡易智能狀態測驗

Figure 1.5 Mini-Mental Status Examination

emission tomography, PET)。



(1) 核磁共振攝影 (MRI)

阿茲海默症患者大腦會出現灰質 (grey matter) 減少情形，特別是海馬迴 (hippocampus) 以及皮層 (cortex) 部位，造成腦組織體積萎縮，因此可利用 MRI 測量大腦體積，判斷是否出現腦部組織萎縮情形 (Nagy *et al.*, 1996)。

(2) 功能性核磁共振攝影 (fMRI)

神經細胞活化時會消耗氧氣，神經細胞附近的微血管以紅血球運輸氧氣。因此當腦神經活化時其附近的血流會增加以補充消耗掉的氧氣。fMRI 藉由偵測血流中的血氧濃度，可分析大腦何處呈現高活動狀態。AD 患者乙醯膽鹼系統相關腦區異常，使該腦區活化程度降低。可藉由 fMRI 技術判斷乙醯膽鹼系統相關腦區活化程度，診斷 AD (Goekoop *et al.*, 2006)。

(3) 正電子發射電腦斷層掃描 (PET)

PET 是核子醫學領域最先進的臨床檢查影像技術。PET 技術是目前唯一使用解剖形態方式進行功能、代謝和受體顯像的技術，為全身提供三維與功能運作的圖像，並具有無創傷性的特點。利用 PET 診斷 AD 有兩種方式，一為使用 2-氟-2-脫氧-D-葡萄糖 (^{18}F -2-fluro-2-deoxy-D-glucose, FDG) 正子掃描藥劑，測量腦中葡萄糖消耗程度的 FDG-PET 法 (Alexander *et al.*, 2002; Hirono *et al.*, 2004)，二為使用會與 $\text{A}\beta$ 結合的 ^{11}C -labeled Pittsburgh compound-B (^{11}C -PIB) 正子掃描藥劑檢測腦中 $\text{A}\beta$ 的 amyloid-PET 法 (Klunk *et al.*, 2004; Jack *et al.*, 2008)。

3. 生物標記 (biomarker)

AD 為一種不可逆性的疾病，只能延緩病程，無法完全醫治。越早期開始治療，

效果越好，因此如何早期診斷出 AD，成為研究人員重視的課題。過去診斷的基準以外顯行為和腦影像鑑定進行診斷，但此類方法無法早期發現 AD。隨著科學的進步，對 AD 的致病機轉有較深入的了解，發展出透過檢測腦脊髓液 (cerebrospinal fluid, CSF) 中的 AD 生物標記進行早期的診斷。生物標記的方法主要為酵素免疫分析法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)，其次為直接測量酵素活性。

目前依靠 ELISA 測定的生物標記有許多種 (表 1.4)，CSF 中的 $A\beta_{1-42}$ 、 $A\beta_{1-40}$ 、總 tau 蛋白質與磷酸化 tau 蛋白質含量為最主要標記。AD 患者的 CSF 中 $A\beta_{1-42}$ 含量會降低 50%， $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$ 比例會顯著下降 (Blennow, 2004)，磷酸化 tau 蛋白質比例以及總 tau 蛋白質上升 (Blennow and Hampel, 2003; Blennow, 2004)。上述物質除了表現量改變明顯可作為生物標記外，另一個優點則是具有部分專一性，並非所有類型的失智症會出現與 AD 相同的改變 (表 1.5)，但是還是有部分疾病會有類似 AD 之改變，顯示利用 CSF 生物標誌診斷，可能具有效診斷 AD，大幅增加早期發現 AD 的機會。

(六) 阿茲海默症之治療策略


過去對 AD 的治療以乙醯膽鹼酯酶抑制劑為主，隨著對 AD 機轉的了解，也開始嘗試不同的方式。以下將從乙醯膽鹼酯酶抑制劑、 $A\beta$ 代謝系統與抗氧化治療三種治療策略進行介紹。

1. 乙醯膽鹼酶抑制劑

除了前述的類澱粉樣假說 (amyloid hypothesis)，膽鹼假說 (cholinergic hypothesis) 為最早被提出可能造成 AD 的原因，此假說認為 AD 患者腦內乙醯膽鹼濃度急劇下降導致細胞死亡，對人腦記憶與認知功能有很大的影響。在突觸前細胞內，乙醯輔酶 A (acetyl-CoA) 與膽鹼 (choline) 藉由乙醯膽鹼轉化酶 (choline acetyltransferase, ChAT) 合成乙醯膽鹼 (acetylcholine, ACh)。ACh 藉釋放至突觸間

表 1.4、阿茲海默症可能的腦脊髓液生物標記

Table 1.4 Cerebrospinal fluid biomarkers in Alzheimer's disease



Biomarkers	Pathogenic process	Changes seen in AD
Nonspecific or basic biomarkers		
CSF cell count	Inflammation	Normal
CSF:serum albumin ratio	BBB function	Normal
Intrathecal immunoglobulin synthesis	Inflammation	Normal
Specific or core biomarkers		
Total-tau	Neuronal injury	Marked increased (but not specific for AD)
Phosphorylated-tau	Neurofibrillary tangles	Marked increase (more specific for AD)
A β 1-42	Amyloid plaque	Marked reduction
Novel biomarkers		
CSF BACE1	Amyloidogenesis	Increased
Truncated amyloid- β isoforms	Amyloidogenesis	Increased
APP isoforms	APP products	Increased
F2-isoprostane	Mitochondrial dysfunction	Increased
Biomarkers of synaptic degeneration	Synaptic dysfunction	Increased

(Hampel *et al.*, 2010)



表 1.5 典型三種生物標記在阿茲海默症與其他失智症表現。

Table 1.5. Typical three-marker test results in Alzheimer's disease and important differential diagnoses

Diagnosis	CSF biomarker		
	T-tau	P-tau	A β 42
AD	Increase	Increase	Decrease
Normal ageing	Normal	Normal	Normal
Depression	Normal	Normal	Normal
Vitamin B deficiency	Normal	Normal	Normal
Anaemia	Normal	Normal	Normal
Hypothyreosis	Normal	Normal	Normal
Alcohol dementia	Normal	Normal	Normal
PD	Normal	Normal	Normal
PSP	Normal	Normal	Normal
CJD	Very marked increase	Normal	Normal to marked decrease
FTD	Normal to mild increase	Normal	Normal to moderate decrease
DLB	Normal to mild increase	Normal to mild increase	Moderate decrease
VAD	Normal to mild increase	Normal	Mild to moderate decrease
Acute stroke	Mild to very marked increase	Normal	Normal
Non-acute CVD without dementia	Normal	Not examined	Normal

AD, Alzheimer's disease; PD, Parkinson's disease; PSP, progressive supranuclear palsy; CJD, Creutzfeldt-Jakob disease; FTD, frontotemporal dementias; DLB, dementia with Lewy bodies; VAD, vascular dementia; CVD, cerebrovascular disease.

(Dawbarn and Allen, 2008)

隙後，部份的 ACh 和突觸後細胞細胞膜上的乙醯膽鹼受體結合，另一部份被乙醯膽鹼酯酶 (acetylcholinesterase, AChE) 分解 (圖 1.6)。早期 AD 藥物主要是以此假說來發展，採取減緩 ACh 被 AChE 分解的方式增加 ACh 濃度 (Scarpini *et al.*, 2003)。此藥物統稱為乙醯膽鹼酯酶抑制劑 (AChE inhibitors)，為目前最廣泛使用且有效的用藥。常見的有愛憶欣 (Aricept, donepezil)、憶思能 (Exelon, rivastigmine)、利憶靈 (Reminyl, galantamine) 等 (Dawbarn and Allen, 2008)。但此類藥物只能減緩記憶與認知功能上的喪失，無法完全治癒 AD。

2. A β 代謝

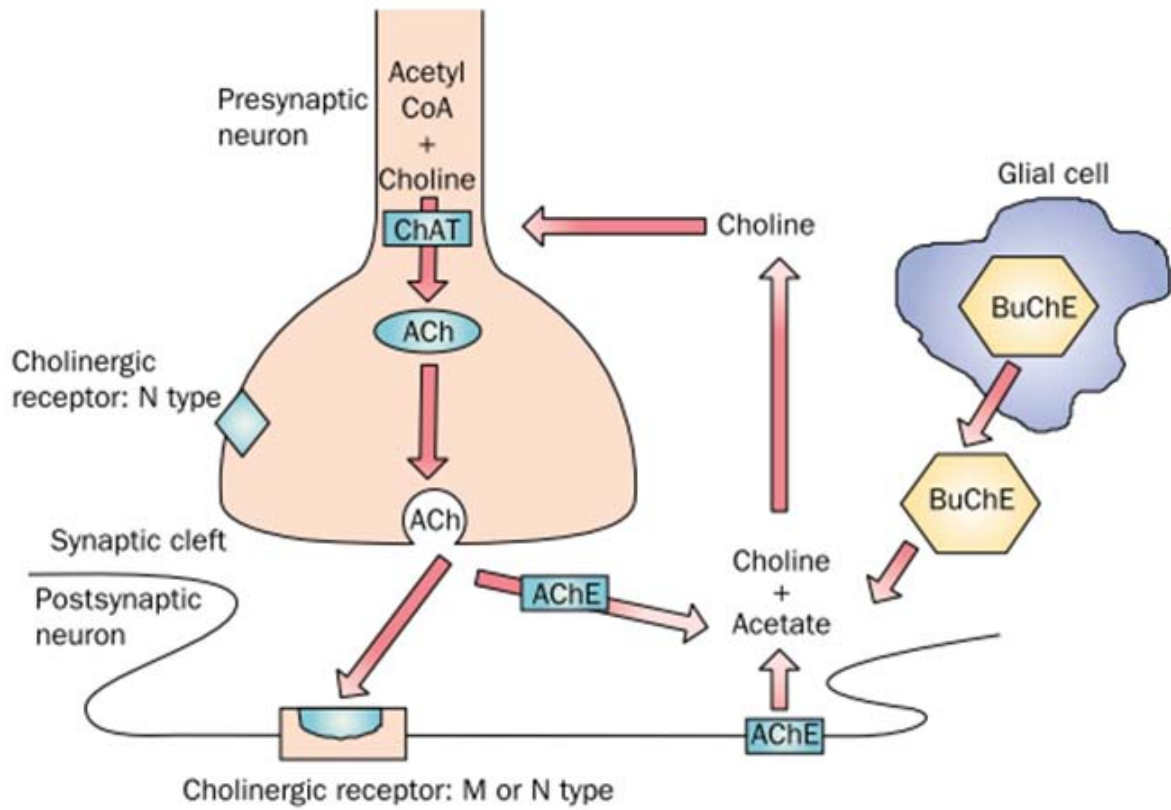
根據類澱粉樣蛋白假說，A β 被視為 AD 的主因，因此針對 A β 代謝的治療方針逐漸發展。以下針對阻擋 A β 合成與增進 A β 降解兩種方法進行介紹。

(1) 阻擋 A β 合成

β -Secretase 及 γ -secretase 是將 APP 切割成的 A β 片段關鍵酵素。若能降低兩種酵素的活性，使 A β 產量下降，就有可能減緩 AD。現行發展的 β -secretase 抑制劑主要是抑制 β -secretase 上 aspartyl 催化位，包含 OM99-2 (Hong *et al.*, 2000)、GRL-8234 (Ghosh *et al.*, 2008) 等。而目前發展降低 γ -secretase 活性的方法有兩種，一種為抑制劑，一種為調控劑。LY405139 為 γ -secretase 抑制劑，在 5 個月的治療後，70 位 AD 的病人的血漿中 A β 明顯下降 (Siemers *et al.*, 2006)。但 γ -secretase 也會對其他蛋白質進行切割，產生副作用。為避免副作用產生，發展出了調控劑，專一性地抑制 γ -secretase 切割 CTF 99 之 γ cleavage site。

(2) 增加 A β 降解

加速降解系統方面，可利用兩種途徑代謝 A β ，第一為增加 A β 降解酵素能力，分解 A β ；第二為透過 A β 與抗體結合減低 A β 含量。大腦降解 A β 的酵素包含胰島素降解酶 (insulin-degrading enzyme, IDE)、血管收縮素轉化酶



(Scarpini *et al.*, 2003)

圖 1.6、乙醯膽鹼系統

Figure 1.6 Acetylcholinergic system

(angiotensin-converting enzyme, ACE) 以及中性胜肽內切酶 (neutral endopeptidase, NEP), 但目前尚缺乏有效藥物可以專一提升這些酵素活性 (Van- Marum, 2008)。在抗體治療法發現, 合成聚集的 $A\beta_{1-42}$ 會引發基因轉殖小鼠中的免疫反應而產生抗體, 可有效降低 $A\beta$ 沉積形成 (Schenk *et al.*, 1999)。接續的研究利用 $A\beta$ 免疫反應, 可以改善因 $A\beta$ 引起之記憶力損失 (Janus *et al.*, 2000; Morgan *et al.*, 2000)。

3. 抗氧化

根據前述 $A\beta$ 之毒性與產生氧化壓力有關, 因此利用抗氧化劑可以幫助細胞對 $A\beta$ 產生之神經毒性。抗氧化劑治療可分成兩種方式, 第一種為直接移除 $A\beta$ 產生之氧化性物質如 ROS。第二種方式為提升細胞中抗氧化酵素之活性。目前研究指出 vitamin E、vitamin C 等抗氧化劑預防 AD 形式, 多以第一種路徑為主, 他們進入細胞中與 $A\beta$ 產生之 H_2O_2 或超氧陰離子等氧化物反應, 防止神經受到 $A\beta$ 毒性影響 (Dawbarn and Allen, 2008)。天竹黃萃取物則走第二種路徑, 提升細胞中 CAT、SOD 以及 GPx 等酵素活性 (Jeong *et al.*, 2005)。

七、中藥之開發與應用

(一) 全球中草藥之市場趨勢及概況

根據美國、加拿大與歐洲的統計, 以植物製成的藥品已佔總體市場的四分之一, 而每年全球植物衍生藥品的銷售額, 約可達 400 億美元。目前也針對已知的治療性草藥, 以混合使用的方式進行新的開發及應用 (廖, 2001)。依據世界衛生組織 (WHO) 的估計: 全世界約有 80% 人口 (42 億), 是以中草藥作為某種程度的初級醫療。歐洲的中草藥市場崛起較美國早, 最主要的市場是德國, 80% 德國人會使用中草藥, 而美國使用中草藥的人口約只佔 40% 以下 (江, 2000), 若根據生物技術開發中心之統計: 全球各區域之中草藥市場佔有率, 以歐洲 41% 為首, 其次為北美洲 22%、東南亞 17%、日本 14%, 台灣的比例並不高, 但因中草藥於我國已有五千年的傳

統，還是具有發展的機會與空間 (秦，2001)。台灣之中草藥市場，整體市場規模約有新台幣 150 至 250 億元，食補保健約佔整體之 80%，用於治療疾病 20% 中，科學中藥佔 13%，傳統中藥佔 7%，由此可以得知目前中草藥市場的需求是以食補保健發展為主要趨勢 (巢，2001)。



(二) 傳統中草藥的研究發展現況

中國人使用中草藥預防及治療疾病已有幾千年歷史，中草藥在治療疾病上的療效越來越受到重視，雖然中草藥的發展歷史比西藥來得久遠，但大多屬先人用藥的經驗累積，較無明確的科學實驗證據，近幾年，中草藥植物的開發與運用，已成為世界性的發展趨勢。主要著重在發展先進的萃取與分析技術，再搭配科學性的評估與研究，探討中草藥植物的生物活性與藥理作用等 (許，2001)。世界各國在疾病的治療中，植物原料仍是很重要的資源，植物原料經由生藥學的研究，可以發展出新的治療藥劑 (程，2005)。不同臨床應用的報導顯示，中草藥的成分如：chlorogenic acid、flavonoids、pentacycli triterpenes 等，有抗腫瘤和抗突變等作用。此外，植物的藥用功效還包括增加心臟血管的健康、微血管的承受力、組織的健全、美化皮膚的外觀與增強免疫系統機能、減少動脈硬化、癌症、關節炎和腸胃疾病等風險。當然以研究的方向而言，涵蓋各領域，更包括：自由基清除能力的探討、抗發炎作用的研究、抑制微生物的能力、抗腫瘤、癌症的治療、提升免疫能力、抗胃潰瘍作用、糖尿病的治療、抗憂鬱等各種身體出現的疾病處理 (Fenglin, 2004)。因此，研究的結果常被應用在醫藥、食品、化妝品、保健維護等領域，最終目的則在預防疾病、開發新的成分以協助各種疾病的治療、發展新功能以滿足大眾的需求、進而提升生活品質與人口素質 (Cos, 2004)。

八、中草藥簡介

(一) 山楂 (Shan-Cha) *Crataegi Fructus* :

山楂學名為 *Crataegus pinnatifida* 屬於薔薇科 (Rosaceae) 的乾燥成熟果實，別名山裏紅 (食鑑)、山楂果、山查 (香港)、山楂子 (日本)。台灣現將果實通稱為山楂，將種子稱為山楂子。山楂取其成熟果實食用或去籽乾燥後可當藥用或加工食用，山楂在中藥分類中，歸類於消導藥的一種。凡是可健脾開胃，消積導滯，幫助消化的藥物稱為消導藥；一般適用於因食不消化所致的胸生腫滿，噯氣吞酸，噁心嘔吐，大便失常，以及脾胃虛弱，消化不良等症狀 (賴，1976)。因此，常用於製造一些幫助消化的零食，如山楂餅。

山楂之生理活性分述如下 (Nakatani *et al.*, 2000, Aramendia *et al.*, 2000) :

(1) 綠原酸 (chlorogenic acid, 5-*O*-caffeoylquinic acid)，分子量為 354.30 kDa。熔點為 208°C，溶於熱水、乙醇、丙酮，微溶於乙酸乙酯。其六水合物為針狀晶體。酸、鹼或酵素的水解形成 caffeic acid 及 *D*-quinic acid。在植物中含有 3-*O*-caffeoylquinic acid (isochlorogenic acid) 及 4-*O*-caffeoylquinic acid (neochlorogenic acid) 等異構物，是植物組織中新陳代謝的要素。可以清除氮、氧活性物種，抑制亞麻油酸氧化形成共軛雙烯 (conjugated diene)。

(2) 表兒茶素 (epicatechin)，與兒茶素同屬黃烷醇類 (flavanols)，互為向差異構物 (epimeric isomers)。分子量為 290.28 kDa，熔點為 245°C，富含於植物來源的食物中，如葡萄酒、巧克力、果實。其中又以茶葉中的含量最多。除了預防阻止自由基在不同生物系統中造成傷害，其結構的另一項特色是可以將游離的金屬離子整合，以減少由金屬離子活化的活氧分子產生。同時可以抑制以銅離子所誘發的 LDL 氧化反應。

(3) 槲皮素 (quercetin, 3,5,7,3',4'-pentahydroflivone)，分子量為 302.23 kDa。熔點為 314°C，溶於熱乙醇、冰醋酸，21°C 時對水溶解度 < 0.1 g/100 mL，鹼性水溶液呈黃色。

(4) 異槲皮苷 (isoquercitrin, quercetin-3-*O*-glucoside), 分子量為 464.37 kDa。熔點為 225-227°C, 為黃色針狀物。溶於熱水、鹼性溶液中。

(5) 金絲桃苷 (hyperoside, quercetin-3-*O*-galactoside), 分子量為 482 kDa, 黃色針狀結晶體, 溶於乙醇。為歐美常用的抗憂鬱草藥聖約翰草 (St. John's Wort) 的活性成分之一。

(6) 柚皮苷 (naringin), 4',5,7-trihydroxy-flavanone 7-rhamnoglucoside, 分子量為 580.53 kDa。熔點為 166°C, 旋光度 $[\alpha]_D^{19}$ -82°, 溶於丙酮、乙醇。可以從葡萄樹的花、果皮、果實與柚的花、外皮單離出來。

其中最受矚目的是黃酮類和三萜類, 因為這兩種成份目前已證實對心血管疾病有正面的影響 (Rajendran *et al.*, 1996)。研究證明, 具有擴張血管, 降低血壓及膽固醇, 促進子宮收縮的作用; 並且能促進腸胃蠕動, 增加消化酶的分泌以助消化; 另外, 對痢疾桿菌和綠膿桿菌有明顯抑制作用 (Ong *et al.*, 2000)。而且, 山楂能擴張血管, 增加冠狀動脈血流量, 並且能抗心律不整和抗房室震動, 因此可以治療腦血管疾病和外周血管阻塞而有止痛作用, 並可減輕血管粥狀硬化的病況, 降低血脂及血壓 (Zhang *et al.*, 2002)。但使用山楂時必須注意, 由於其含酸量較高, 過食會損傷脾胃的消化、吸收功能, 胃潰瘍患者不宜使用。此外, 其所含的有機酸亦會腐蝕牙齒的琺瑯質而導致牙病 (黃, 1987)。

(二) 玫瑰之簡介

玫瑰屬薔薇科 (*Rosa rugosa*), 一般作觀賞用植物, 入藥使用其乾燥花蕾部分。主要產地位於中國江蘇、浙江、福建、四川與河北等地, 味甘、微苦、性溫, 主治功能, 行氣解鬱、和血止痛, 用於肝胃氣痛、月經失調等症狀。玫瑰具有多量的多酚類其中以沒食子酸 (gallic acid) 為主要成分, 這些多酚類與其衍生物及玫瑰多醣, 是玫瑰的抗氧化活性的主要來源 (Ng *et al.*, 2005)。同時這些抗氧化物質針對易衰老小鼠研究也發現, 能夠提高早衰小鼠體內的超氧歧化酶 (SOD) 基因表現 (牛

等，2004)，並增加血液中與肝臟的過氧化氫 (catalase) 與穀胱甘肽過氧化酶 (glutathione peroxidase) 活性，延長早衰小鼠的平均壽命 (Ng *et al.*, 2005)。



(三) 酸棗仁之簡介

酸棗仁是鼠李科植物酸棗 (*Ziziphus jujuba* Mill. var. *Spinoza*) 的乾燥成熟種子，主要分布於河北、陝西、遼寧、內蒙古、山東、山西、甘肅與河南等地。秋末冬初採收成熟酸棗果實，除去果肉及核殼，收集種子，曬乾及製成中藥材中的酸棗仁。傳統醫學中記載，酸棗仁味甘、酸，性平，主要用於補肝、寧神、防汗與生津。酸棗仁含有高達 32% 油脂，並有多種必需胺基酸及 Fe、Mn、Zn、Se、Cu 與 Ni 等微量元素、維生素 C 及有機酸如阿魏酸等，與三萜皂苷類也是酸棗仁主要成分之一。由藥理文獻得知，酸棗仁具有增強小鼠免疫功能，而酸棗仁之水草物中，也發現所含的黃酮類能夠對抗心臟的心律不整症狀 (苗，2001)。

(四) 雷公根之簡介

雷公根學名稱為 *Centella asiatica* (L.) Urban，屬於繖形花科，生長區域散佈於熱帶、沼澤區如印度、巴基斯坦、斯里蘭卡、馬達加斯加與南非，其根與葉都具有藥效。在《神農本草經》中雷公被用來治療可能是由肉體不適引起的情緒失調，譬如抑鬱症；並用來解熱及解除感冒和上呼吸道感染引起的充血症狀。在斯里蘭卡，傳說雷公根有延長壽命的功效，其葉子通常是用來餵食大象。近年來西方人流行將雷公根當作神經滋補品，雷公根有良好的抗氧化效力，並且對於阿茲海默症能夠有效降低其 A β 在海馬迴區域的沉積 (Leigh *et al.*, 2009)，及保護帕金森氏症模式中小鼠之神經元 (Nagaraja and Kumar, 2010)。

九、紅麴菌

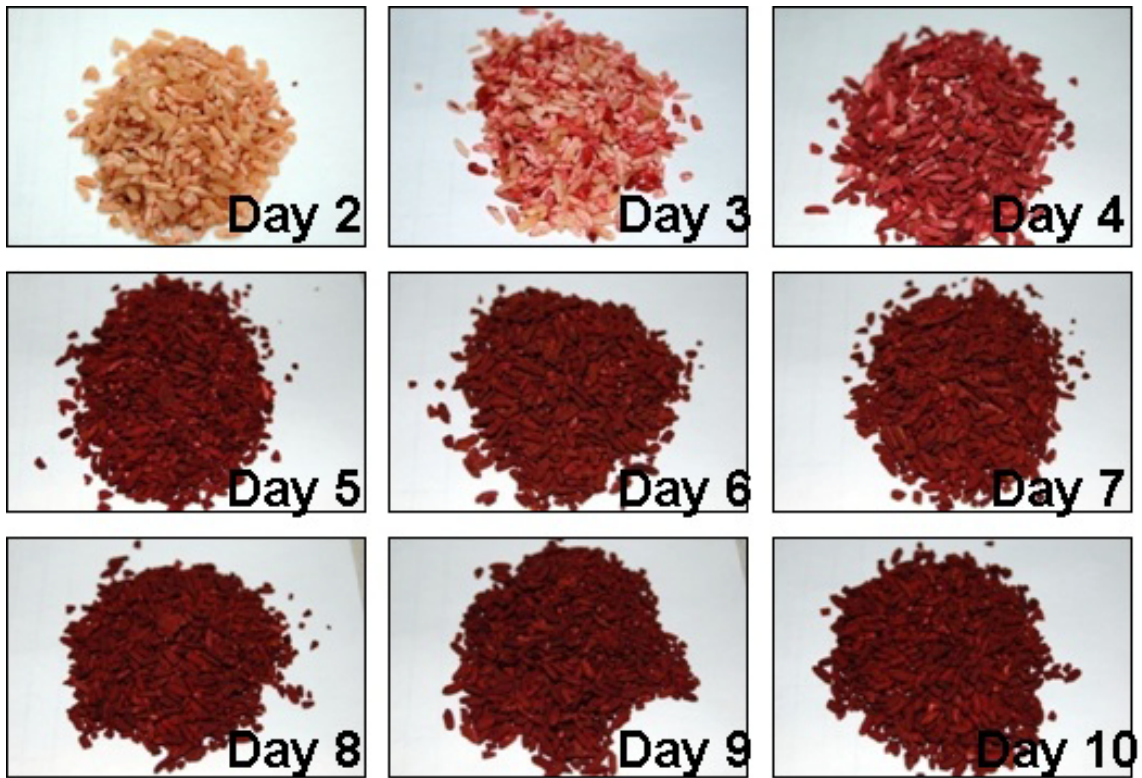
(一) 紅麴菌特性

紅麴菌屬 (*Monascus*) 是由法國學者 van Tieghem 於 1884 年所分離、建立，此屬菌株的特徵為菌絲呈無色、褐色或紅色，具有橫隔，藉末端產生一個大型的有性厚壁子囊或以單一細胞之分生孢子進行繁殖。紅麴菌在分類系統屬於真菌界 (Fungi)、子囊菌門 (Ascomycota)、子囊菌綱 (Ascomycetes)、散囊菌目 (Eurotiales)、紅麴菌科 (Monascaceae) (van Tieghem, 1884)。現今有 58 種紅麴菌 (*Monascus* species) 保存於美國菌種中心 (American Type Culture Collection, ATCC)，大多數屬於 *Monascus pilosus*、*Monascus purpureus* 及 *Monascus ruber* (Hawksworth and Pit, 1983)，而用於紅麴米生產者多為 *M. purpureus*。

紅麴菌於飲食、醫藥、工業上之應用，在亞洲地區已有千年歷史，自北宋朝初期便有相關文獻記載，本草綱目中也記載紅麴主治消食活血，健脾燥胃。紅麴普遍用於食品著色劑 (food colorants) 及日常飲食原料。以米做為基質進行固態發酵所生產之紅麴稱為紅麴米 (red mold rice)，在亞洲國家為常用之食品及傳統中草藥。近年研究發現，紅麴米含有許多具生物活性之代謝產物，其中某些化合物已被純化及鑑定。

(二) 紅麴之固態發酵 (solid-state fermentation)

紅麴米之製備至今仍以傳統之固態發酵為主要方式。首先，將米粒蒸至半糊化之狀態 (semigelatinized state)，接種 (inoculation) *Monascus* 種菌後，於培養箱進行培養並控制溫度，於培養過程不斷翻拌 (flip) 及補水 (dampen)，直至米粒之中心呈現深紅色。其發酵方式大致如下：第一天，接種；第二天，翻拌米粒並混勻；第三天，首次補水；第四天，第二次補水；第五天，最終次補水；第六至第七天，熟成 (maturation)；第八至第九天，乾燥 (drying)；第十天，得到最終產物 (圖 1.7)。由於固態紅麴發酵易受污染，濕度及溫度為紅麴米品質的重要指標，通常會以棉布蓋



(吳，2008)

圖 1.7、紅麴米之生產

Fig. 1.7 Production of red mold rice

住米粒，以維持含水量及溫度。為了最佳之增殖及菌絲的生長，發酵過程之溫度應維持在 30-35°C，米粒應每日適時翻拌以減緩因微生物代謝而產生的熱。一般發酵過程約 7 至 10 天，直至米粒中心形成深紅色始完成。將發酵結束之終產物放進烘箱，以 45°C 進行脫水 24 至 48 小時後即可儲存，最終之濕度大約為 10%。

(三) 紅麴生產之二級代謝產物

1. 膽固醇合成抑制劑 (monacolins)

1969 年，日本東京農工大學的遠藤教授首先由紅麴菌 *M. ruber* 的培養液中分離出 monacolin K (Endo, 1979)。Monacolin K 的結構與 HMG-CoA (3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A) 類似，會與 HMG-CoA reductase 競爭，進而抑制該酵素，使 mevalonic acid 無法生成，間接抑制膽固醇合成，達到降低細胞內膽固醇含量之效果。此外，臨床研究指出，monacolin K 具有降低體內發炎反應的作用 (Lefer, 2002)，亦有抗癌之功效 (Ho and Pan, 2009)。

2. 色素 (pigments)

紅麴色素的研究很廣，目前已知有八種化學結構被確定，可分為紅色素 (monascorubramine 及 rubropunctamine)、橘色素 (monascorubrin 及 rubropunctatin) 及黃色素 (monascin、ankaflavin、yellow II 及 xanthomonascin A) 三類。橘色素的生成是經由一連串酵素反應合成，對胺基酸有高度親和力，橘色素若和胺基酸反應，則會生成水溶性的紅色素，而黃色素詳細的形成機制尚未完全明瞭 (Juzlova *et al.*, 1996; Blanc *et al.*, 1994)。在紅麴菌的培養過程中，產生的色素易和培養基質中的胺基酸反應，而可溶解於基質中 (Blanc *et al.*, 1994)。長久以來，紅麴廣泛被國人做為食品著色劑及香料使用，且多數中外學者的研究報告也指出紅麴色素的安全性極高，故可認為紅麴色素是很安全的食品添加物。

紅麴橘色素 monascorubrin 及 rubropunctatin 具活潑的 CO 基，很容易與胺基

作用，因此不但可治療胺血症 (ammoniemia)，且很可能是優良的防癌物質。黃色素如 monascin 及 ankaflavin 已被證實具有多種生理活性，monascin 具有抗發炎效果 (Lee *et al.*, 2006b)，且能抑制皮膚癌 (Akihisa *et al.*, 2005)；ankaflavin 藉由誘發癌細胞走向細胞凋亡以達毒殺細胞之效果 (Su *et al.*, 2005)。此外，monascin 與 ankaflavin 對於老鼠脾臟 T 細胞具免疫抑制作用 (Martinkova *et al.*, 1999)。

3. γ -胺基丁酸 (γ -amino butyric acid, GABA)

Kohama 等人發現以紅麴餵食原發性高血壓老鼠 (spontaneously hypertensive rat, SHR) 時，能有效抑制血壓上升 (Kohama *et al.*, 1987)。Tsuji 等人進一步純化鑑定出其降血壓物質為 γ -胺基丁酸 (Tsuji *et al.*, 1998)。GABA 是中樞神經系統主要抑制性的神經傳導物質，為水溶性，GABA 係由 L-glutamate (L-Glu) 經 glutamate decarboxylase (GAD) 催化，經 decarboxylation 而合成。飼料添加 0.2-0.3% 紅麴發酵產物 (含 GABA 與 glucosamine 成分) 餵食原發性高血壓老鼠，可使患有先天高血壓症老鼠的血壓由超過 200 mmHg 降至 180 mmHg 以下 (Singewald *et al.*, 2000)。

4. Dimerumic acid

紅麴的抗氧化能力於 1999 年被 Aniya 等人提出，Aniya 等人進一步純化紅麴抽出物得知具抗氧化能力的成分為 dimerumic acid。Dimerumic acid 為一天然的 siderophore，與 Fe^{3+} 有高度親和力，具抗氧化之功效 (Aniya *et al.*, 1999)。在低濃度時即具有較佳清除 α, α -diphenyl- β -picrylhydrazyl (DPPH) 自由基的能力，並減低 ROS，如超氧陰離子 (superoxide anion, $\cdot\text{O}_2^-$) 及氫氧自由基 (hydroxyl radical, $\cdot\text{OH}$) (Aniya *et al.*, 1999)。Dimerumic acid 能對抗四氯化碳在肝臟中所產生之自由基。Taira 等人於 2002 年提出 dimerumic acid 的抗氧化機制，當含量在 20-200 μM 時可抑制老鼠肝臟微粒體的 NADPH 與 Fe^{2+} 依賴型脂質過氧化 (Fe^{2+} -dependent lipid

peroxidation, LPO) (Taira et al, 2002)。Dimerumic acid 可清除 $\cdot\text{OH}$ 、 $\cdot\text{O}_2^-$ 、ferryl-Mb、peroxyl radical 與對 LPO 的抑制作用，其會提供一個電子給氧化物，使本身氧化為 nitroxide radical (Taira et al, 2002)。Dimerumic acid 也對 RINm5F 胰腺細胞以葡萄糖代謝產物甲基乙二醛誘導細胞死亡和降低胰島素分泌處理，結果顯示 dimerumic acid 提升抗氧化能力降低甲基乙二醛誘導的胰腺細胞的損傷，而且能提高胰島素分泌保護胰臟細胞可以有效預防糖尿病 (Lee et al., 2013)。

(四) 紅麴於預防醫學之應用

1. 紅麴降膽固醇之功效

紅麴菌株 *M. purpureus* NTU 568 所發酵之紅麴山藥餵食高脂飲食倉鼠 8 週後，發現 0.5 倍劑量之紅麴山藥除可避免血清高密度脂蛋白減少外，更可降低血清中之總膽固醇、三酸甘油酯及低密度脂蛋白含量，顯示紅麴山藥可有效預防高脂飲食所造成之氧化壓力，及預防脂質堆積於血管壁上造成動脈粥狀硬化 (Lee et al., 2006a)。此外以 monascin 及 ankaflavin 餵食高膽固醇飲食之倉鼠，除了降低 TC、TG 與 LDL-C 的效果外，更可提升血清中 HDL-C (Lee et al., 2010)。

2. 紅麴菌發酵產物之抗疲勞研究

以紅麴菌株 *M. purpureus* NTU 568 所生產紅麴米餵食 16 週齡雄 Wistar 老鼠 28 天後進行游泳試驗，結果高劑量 (5 g/kg 體重) 組與低劑量 (1 g/kg 體重) 組之游泳時間各增加 65.90% 及 33.59%。在游泳前控制組之乳酸值為 29.52 ± 1.44 mg/dL、低劑量組為 27.72 ± 0.99 mg/dL 及高劑量組為 27.63 ± 1.17 mg/dL，控制組與低劑量組間並無顯著性的差異；游泳後之乳酸值分別為控制組 45.00 ± 0.90 mg/dL、低劑量組 31.41 ± 1.80 mg/dL、高劑量組 28.89 ± 1.62 mg/dL。其他數據亦顯示紅麴確實具有抗疲勞功效 (Wang et al., 2006)。

3. 紅麴發酵產物抑制阿茲海默症之研究

以紅麴菌株 *M. purpureus* NTU 568 所生產紅麴米，及體外試驗模式採用鼠腎上腺髓質嗜鉻細胞瘤 (PC12 cell) 評估 NTU 568 紅麴發酵物對 AD 的預防或治療效果。先將 amyloid β -peptide 1-40 ($A\beta$ 40) 進行聚合反應後，與 PC-12 細胞共同培養使其產生 $A\beta$ 累積，再將紅麴米添加至細胞培養液中觀察 $A\beta$ 40 的累積量與神經毒性。在神經細胞毒性方面，*M. purpureus* NTU 568 發酵之紅麴米酒精萃取物中的 monacolin K 可藉由抑制 geranylgeranyl pyrophosphate (GGpp) 的生成，使 small G-protein 不被活化而抑制 $A\beta$ 40 所誘發的發炎反應，紅麴米亦提供有效的抗氧化能力以防止 $A\beta$ 40 所引發的氧化壓力。此外，紅麴米所呈現的效果會更勝於單純的 lovastatin 藥物處理，這可能是紅麴米中的 monacolin K、抗氧化物質與抗發炎物質共同呈現的協同效果 (Lee *et al.*, 2008)。進一步研究發現，紅麴米酒精萃取物在 10 $\mu\text{g/mL}$ 與 25 $\mu\text{g/mL}$ 濃度下能夠將 PC12 細胞從經 $A\beta$ 40 處理的 62.1% 存活率，分別提升到 88.3% 與 99.2%，並有效抑制 nitric oxide (NO) 與 ROS 等氧化壓力與發炎反應，證實紅麴米酒精萃取物有保護細胞不受 $A\beta$ 40 神經毒性影響。

進一步以大鼠腦部注入 $A\beta$ 40 作為阿茲海默症的動物模式，利用莫氏水迷宮與被動迴避學習，研究紅麴米酒精萃取物對於記憶與學習能力的改善效果，並觀察大鼠犧牲後， $A\beta$ 40 在海馬迴 (hippocampus) 與大腦皮層的累積狀況。結果發現而經歷過 28 天腦內注射 $A\beta$ 40 大鼠，無論餵食高劑量 (755 mg/kg/day) 或低劑量 (151 mg/kg/day) 之紅麴米酒精萃取物，皆能於莫氏水迷宮與被動迴避學習作業表現上，有效改善 $A\beta$ 誘發的記憶與學習能力損傷。同時紅麴米酒精萃取物能回復， $A\beta$ 40 在大鼠大腦皮層與海馬迴引發的乙醯膽鹼酯酶 (acetylcholinesterase) 活性、過氧化物增加、抗氧化程度與超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase) 活性降低。最後大鼠大腦皮層與海馬迴切片染色顯示，紅麴米酒精萃取物能有效降低 $A\beta$ 40 在大腦皮層與海馬迴的累積 (Lee *et al.*, 2007)。

4. 紅麴萃取物降低體脂肪之研究

肥胖是導致心血管疾病與糖尿病之危險因子，利用體外細胞實驗及活體動物實驗，評估紅麴米及紅麴山藥對體脂肪生成之影響。細胞實驗結果顯示，紅麴米水萃取物、酒精萃取物與紅麴山藥酒精萃取物，皆具有抑制前脂肪細胞增生之效果，於高劑量 (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 作用 48 小時後抑制率分別為 22.2%、31.8%、69.1%；在抑制分化方面，紅麴米水萃取物與紅麴山藥水萃取物，於高劑量 (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 抑制率為 42.2%、60.3%，紅麴米酒精萃取物於 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 抑制率為 53.0%，紅麴山藥酒精萃取物於 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 抑制率為 54.9%，酒精萃取物於高劑量下會降低細胞貼附性而影響細胞分化。紅麴米及紅麴山藥水萃取物皆可提高 lipolysis 效率，其中以紅麴米之效果較佳，增加程度為 49%。動物實驗結果顯示，於高油脂飲食中添加紅麴米能顯著減緩體重上升，與對照組相較下降 21.5% 及 30.5%。亦可抑制腎臟及副睪周圍脂肪細胞增大，改善脂肪組織堆積情形，腎臟周圍脂肪組織重量低劑量及高劑量組各下降 26.5% 及 38.6%，副睪周圍脂肪組織重量則各下降 20.2% 及 26.1%。陳等人之研究首次提出紅麴發酵產物能夠改善高油脂飲食引起之體脂肪堆積、血脂紊亂及高血胰島素症狀，具潛力發展為不易形成體脂肪之保健食品 (Chen *et al.*, 2008)。

5. 紅麴山藥降血壓之研究

使用自發性高血壓大鼠為模式老鼠，以非侵入式血壓機測量大鼠的尾脈搏，分別餵食紅麴米與紅麴山藥，評估紅麴米與紅麴山藥在短效性與長效性降血壓效果。結果無論是在短效性或是長效性餵食，紅麴山藥效果皆比紅麴米較佳。在短效性紅麴山藥餵食一倍劑量 (150 mg/kg) 可降低收縮壓 13 mmHg 與舒張壓 19 mmHg ，且持續至 8 小時後仍有效果 (Wu *et al.*, 2009)。

6. 紅麴代謝產物抑制腫瘤之研究

以荷瘤小鼠模式，評估紅麴發酵物對抑制腫瘤之影響。植入小鼠肺癌細胞後，

開始餵食紅麴米酒精萃取物，餵食 100 或 200 mg/kg 紅麴米酒精萃取物至第四週，其腫瘤大小相對於腫瘤對照組分別減少達 23.6% 與 50.8%。紅麴米酒精萃取物中的活性物質 monacolin K 除了抑制腫瘤生長外，並與另一活性成份 ankaflavin 的參與形成加乘效應，而提升腫瘤細胞凋亡的誘發比率。Monacolin K 抑制血管內皮生長因子所誘發的腫瘤侵襲作用，與新血管生成，顯示紅麴酒精萃出物可有效抑制腫瘤生長及轉移的發生率 (Ho and Pan, 2009)。

探討紅麴山藥酒精萃取物之化學防護效應，對口腔癌預防與治療效果：在細胞模式實驗結果顯示，紅麴山藥酒精萃取物促使 SCC-25 細胞停滯在 G2/M 期，此乃透過抑制 NF- κ B 蛋白進而調控 G2/M 期的 Cyclin B1 及 CDK1 蛋白表現量下降。經由 Annexin V-FITC 雙染試驗發現，紅麴山藥酒精萃取物能促使口腔癌細胞凋亡，顯著地透過粒線體路徑，提升促凋亡蛋白 Bax 之表現量，因而活化了 caspase-9 酵素並進而活化 caspase-3 活性 (Hsu *et al.*, 2010a)。以動物模式探討紅麴山藥酒精萃取物，於二甲基苯蒽 (7,12-dimethyl-1,2-benz[a]anthracene, DMBA) 誘導之倉鼠頰囊癌化之預防作用。預防組動物模式結果證實，紅麴山藥酒精萃取物，藉由提升抗氧化酵素之活性，抑制 ROS、NO、PGE₂ 以及促發炎細胞激素因 DMBA 誘導而造成之過度表現，進而延緩腫瘤形成，顯示紅麴山藥酒精萃取物展現良好之抗發炎及抗氧化活性而達預防口腔癌之效果 (Hsu *et al.*, 2010b)。於治療組動物模式中，以 0.5% DMBA，每週 3 次、連續 14 週塗抹敘利亞倉鼠之頰囊，以誘導口腔鱗狀細胞瘤 (oral squamous cell carcinoma, OSCC) 生成。於第 9 週時以相同頻率塗抹試驗樣品，並於 14 週後犧牲動物。結果顯示，紅麴山藥酒精萃取物可減緩 DMBA 造成之 NO、ROS、PGE₂ 及 transforming growth factor- β (TGF- β) 之過度表現。此外，紅麴山藥提升血清中 TNF- α 及 IL-1 β 之含量，因而刺激了 caspase-8 及 caspase-3 之活性，顯示紅麴山藥酒精萃取物延緩 DMBA 所造成之氧化傷害並誘導口腔癌細胞凋亡，因而達到對 OSCC 之治療成效 (Hsu *et al.*, 2011)。

7. 紅麴山藥降血糖之研究

利用 streptozotocin (STZ) 誘導大鼠高血糖，並以米、山藥及薏仁做為基質，利用 *M. purpureus* NTU 568 進行發酵，將發酵產物連續 8 周餵食大鼠 (200 mg/kg)，結果顯示餵食紅麴山藥可延緩大鼠血糖值之提高，亦能降低 amylase、三酸甘油酯及膽固醇 ($p < 0.05$)，三種發酵產物中又以紅麴山藥之改善效果最佳。此外，糖尿病鼠的胰臟組織之 ROS 含量顯著增加，glutathione disulfide reductase、glutathione reductase 及 CAT 等抗氧化相關酵素活性與控制組相較顯著下降，紅麴山藥則能回復此不良效應，顯示紅麴山藥具有良好之抗氧化能力，因而能減低 STZ 造成之胰臟組織氧化傷害，進而具降血糖之功效 (Shi and Pan, 2010a; Shi and Pan, 2010b)。

第貳章 研究動機與目的

隨著台灣地區經濟的快速發展、民眾生活方式日趨靜態以及西化的飲食模式並缺乏運動與人口的老化，罹患心血管疾病的機會大幅增加，三高代謝症候群（高血壓、高血糖、高血脂症）已漸威脅國人健康。根據 2012 年行政院衛生福利部公佈的統計資料，目前台灣十大死亡原因中，與三高相關的疾病包括了第二位心臟病、第三位腦血管疾病、第五位糖尿病、第八位高血壓性疾病及位居第十位慢性腎病，由此可見慢性疾病是造成我國國人死亡的殺手其中高血壓、高血糖、高血脂則是主要的危險因子且國內逾六成中老年人罹患三高，現在 40 歲以上的成年人，有半數以上飽受高血糖、高血壓及高血脂所苦，由此可知，三高問題確實對於健康造成嚴重的危害，儼然已成為現代人的健康隱憂。(行政院衛生福利部，2013)。在 2010 年健保局公布國人前十大藥物除第四名的血友病用藥第八凝血因子，與第七名的抗癌藥基利克外，其餘八項都是三高（高血糖、高血脂、高血壓）用藥，其中各有三種為降血壓與降血脂藥，另有兩種為降血糖藥。每年共消耗掉 3 百多億元健保藥費（行政院中央健康保險局，2009），三高藥物用藥多，表示罹患三高病症國人愈來愈多，在生活水準提高與醫療科技的進步，人類的平均壽命延長，伴隨著年齡增長而引發的慢性疾病與老化現象逐漸受到國人的重視。實驗室先前研發之紅麴山藥及其二級代謝產物，已經證實具有降膽固醇、降血壓與血糖功效，能有效預防三高疾病，唯一深具潛力之保健食品。然而目前國內保健食品開發完成後上市，顯少有探討與藥物併用後所產生的非預期性效應，因此論文第一部份針對此部分，分別以倉鼠餵食高膽固醇飲食誘發高血脂、自發性高血壓大鼠 (spontaneous hypertensive rat, SHR) 與 STZ 誘導第二型糖尿病為試驗模式，探討紅麴山藥與藥物併用對降血脂、血壓、血糖之功效及對引發橫紋肌溶解症之影響。

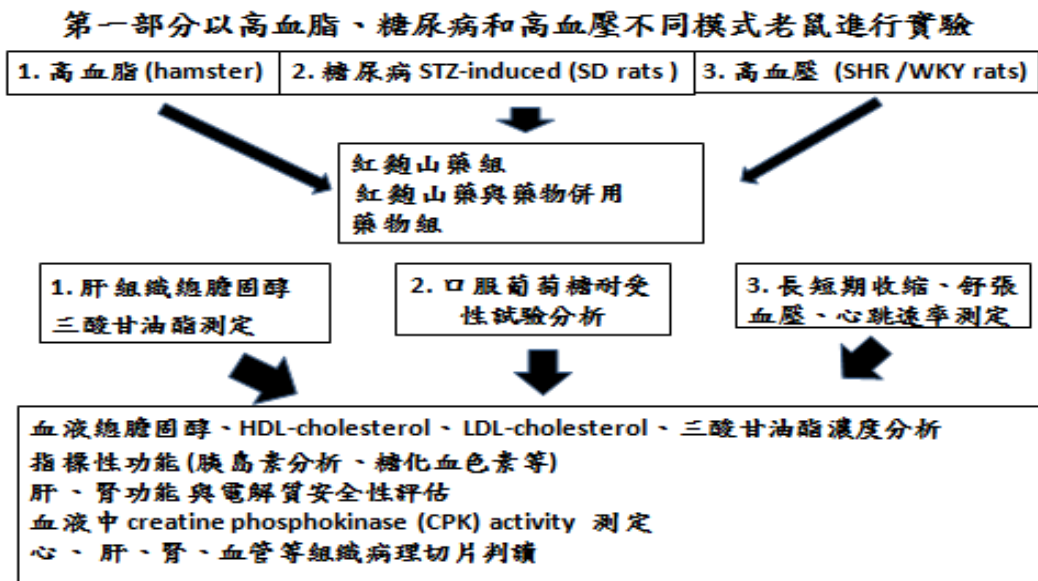
在老化的過程中，因年齡增加而引起中樞神經系統退化及全身性免疫能力下降。根據自由基的老化理論，氧化壓力的程度會隨年齡而增加，腦部被認為是最先產生徵兆的所在而老化會造成腦部功能退化，影響學習記憶能力導致失智症的發生

(Harman, 1956)。根據 2010 全球失智症研究報告指出，2009 全球對失智症的照護支出已高達 6040 億美金，相當於 1% 全球 GDP (Alzheimer's Disease international, 2010)，在失智症當中又以阿茲海默症占居第一位，因此延緩或治療阿茲海默症之研究發展為許多國家的重要課題。中草藥發展至今已超過千年，累積多種對藥草的知識，但顯少有科學化系統的研究。伴隨著科技的發達，中草藥的開發與應用，漸漸成為世界新寵兒。目前著重在發展萃取技術與分析技術，配合科學性的評估與研究，探討中草藥植物的生物活性與藥理作用等 (許, 2001)。中草藥溫和作用與累積多年的運用知識，其安全性相當高，也在抗氧化能力研究上有相當表現 (Winterstein and Storrs, 2001)，因此開發中草藥在阿茲海默症上的應用是具有相當大的潛力。

本研究第二部分，根據本研究室過去研究，從茵陳、紅花、玫瑰、葛根、決明子、薑黃、百合、遠志、雷公根、咸豐草、丹蔘、芝麻、砂仁 與酸棗仁，由味全公司提供多數是被認為具有安神鎮靜、抗氧化能力、改善睡眠等之中草藥進行篩選，發現雷公根與酸棗仁的酒精萃取物可以改善聚合 $A\beta_{1-40}$ 引起的細胞毒性與氧化壓力 (蔡, 2011)。

本研究先以 IMR 32 神經細胞進行雷公根與酸棗仁抗氧化能力分析，藉由測量 GSH/GSSG 比例，GPx、SOD 與 CAT 等抗氧化酵素，討論對抗氧化能力的影響且比對實驗室先前所使用 dPC12 細胞結果後進行動物試驗。然而市售藥材常有中草藥誤用的問題，因此也進行基原鑑定，確認材料為雷公根與酸棗仁，乃以之進行體內動物評估試驗探討對 $A\beta$ 腦部輸注之阿茲海默症大鼠記憶學習能力之影響。最後將針對具有預防阿茲海默症之萃取物進行產品的型態評估，包含設計其產品型態、產品加工條件之建立、品質規格探討與進行產品的安全性試驗。

第一部分、探討紅麴山藥與藥物併用對三高之功效及引發橫紋肌溶解症風險評估



第二部分、中藥與紅麴山藥對阿茲海默症輔助治療效益之研究

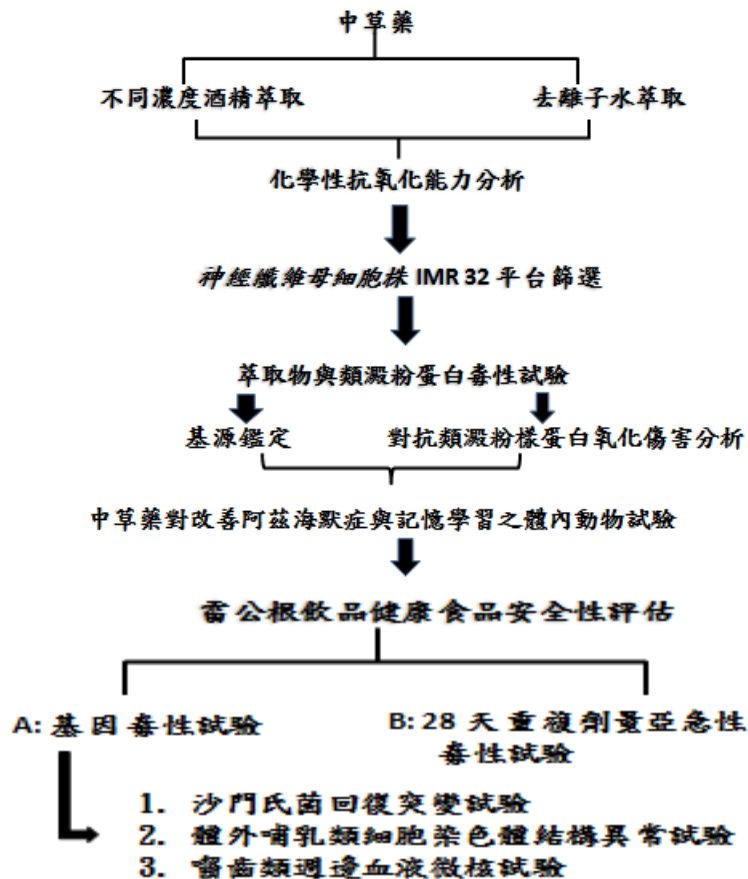


圖 2.1、本研究之大綱。

Figure 2.1. The outline of this study



一、實驗材料

(一) 儀器

1. 殺菌釜 (autoclave) (Model SS-320, Tomy Co., Tokyo, Japan)
2. 恆溫震盪培養箱 (orbital shaker incubator) (Model 717, Hotech Co., Taipei Taiwan)
3. pH meter (Model 6071, Jenco, San Diego, CA, USA)
4. 離心機 (Himac CR-21 Hitachi Co., Tokyo, Japan)
5. 冷凍乾燥機 (freeze dryer) (Model FD24-3S-12P, Kingmech Co., Taipei, Taiwan)
6. 減壓濃縮機 (R200, Buchi Co., Flawil, Switzerland)
7. 超音波洗淨機 (ultrasonic cleaner) (Model 690D, Crest Co., NY, USA)
8. 分光光度計 (spectrophotometer) (Model U-2001, Hitachi Co., Tokyo, Japan)
9. ELISA reader (Thermo Labsystem, Beverly, MA, USA)
10. 微盤讀儀 (microplate reader) (F3, Molecular Devices Inc., Sunnyvale, CA, USA)
11. 水浴恆溫槽 (water bath) (Model DB, Deng Yng Co., Taipei, Taiwan)
12. CO₂ 培養箱 (Model RCO3000TABB, Revco Technologie, Ayheville, NC, USA)
13. 倒立顯微鏡 (ECLIPSE TS100, Nikon., Tokyo, Japan)
14. 數位相機 (Coolpix 5200, Nikon Co., Tokyo, Japan)
15. 流式細胞分析儀 (FACSCanto II, BD Co., Franklin Lakes, NJ, USA)
16. 均質機 (Model PRO 200, PRO Scientific Inc., Oxford, CT, USA)
17. 無菌操作台 (Kansin Co., Taipei, Taiwan)
18. 動物腦部立體定位儀 (Stereotaxic instrument) (Stoelting Co., Wood Dale, IL, USA)
19. 動物非侵入式血壓測定器 (Visitech BP-2000, Napa Place, NC, USA)

(二) 藥品

1. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)、Amyloid β_{1-40}

peptide ($A\beta_{1-40}$)、dimethyl sulfoxide (DMSO)、sulphanilamide、naphthyl ethelene diamine dihydrochlorid、phosphoric acid、5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB)、gallic acid、 Na_2CO_3 、bovine serum albumin (BSA)、 KH_2PO_4 、 $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 6H_2O$ 、KCl、propidium iodide (PI)、Triton-X 100、Folin–Ciocalteu's reagent、 NaN_3 、 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 、nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)、peroxidase、hydrogen proxide (H_2O_2)、2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)、nitro blue tetrazolium (NBT)、2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid (ABTS)、butylated hydroxytoluene (BHT)、 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 、glutathione reductase (GR)、6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox)、 $K_3Fe(CN)_6$ (potassium ferricyanide)、bradford reagent、ferrozine、nicotinamide adenine dinucleotide (NADH)、phenazine methosulphate (PMS)、thioflavin T、fetal bovine serum (FBS)、 K_2SO_4 、NaOH、HCl、購自 Sigma 公司 (Sigma Co., St. Louis, MO, USA)

2. Ethanol 購自臺灣菸酒公司 (Taiwan Tobacco and Liquor Co., Taipei, Taiwan)
3. Minimum essential medium, trypsin-EDTA, penicillin-streptomycin 購自 BioWest 公司 (Biowest Inc., Nuaille, France)
4. Fecal bovine serum (FBS), trypan blue 購自 GIBCO 公司 (GIBCO Inc., Grand Island, NY, USA)
6. Catalase, iNOS, LDH, SOD, TAS kit 分析套組購自 Cayman 公司 (Cayman Co., Ann Arbor, MI, USA)
7. Acetylcholinesterase kit 分析套組購自 Bio Assay Systems 公司 (Bio assay systems Co., Hayward, CA, USA)
8. Albumin, aspartate transaminase, alanine transaminase, alkaline phosphatase, blood urea nitrogen, creatinine phosphokinase, calcium, chloride, creatinine, globulin total cholesterol, triglycerides, uric acid, high density lipoprotein cholesterol, low density lipoprotein cholesterol, potassium, phosphorus, sodium 之分析套組購自 Randox

Laboratories 公司 (Randox Laboratories Ltd., Antrim, UK) ,



二、探討紅麴山藥與藥物併用對降血脂、血壓、血糖之功效及對引發橫紋肌溶解症之風險評估。

(一) 紅麴山藥與降血脂藥物併用對高血脂倉鼠降血脂功效及其對生理之影響

1. 高血脂倉鼠誘導與分組

本實驗參考 Usman 與 Hosono 兩位學者發表之模式加以修改 (Usman and Hosono, 2001)，以測定生化指標為主採用敘利亞倉鼠 (Syrian Hamster) 做為降血脂之實驗動物模式，實驗動物經由 4 週之正常飲食與高膽固醇飲食預養後，進行 8 週之正式動物實驗。以口服方式投予受試物餵食 8 週。以含 monascin 15 mg, ankaflavin 5.8 mg 之紅麴山藥為 1 倍劑量、含 monascin 75 mg, ankaflavin 29 mg 之紅麴山藥為 5 倍劑量，換算成紅麴山藥粉末每人 (體重 65 kg) 每日食用 2.12 g 做為 1 倍劑量；10.62 g 為 5 倍劑量，換算紅麴山藥餵食倉鼠劑量則為每 100 g 倉鼠體重每日餵食 22.96 mg 做為 1 倍劑量；114.8 mg 為 5 倍劑量，另紅麴山藥與降血脂藥物 lovastatin 併用組，lovastatin 購自永信藥品公司 (商品名: 路脂定錠 20 mg) 用於治療高血脂病患中每人每日服用劑量 20 mg，與紅麴山藥併用，換算 lovastatin 餵食倉鼠劑量則為每 100 g 倉鼠體重每日餵食 0.167 mg 劑量搭配 22.96 mg 紅麴山藥做為 1 倍劑量；114.8 mg 為 5 倍劑量。各組於第 8 週時以二氧化碳窒息法進行犧牲，並進行血液與肝臟中之脂質分析。

實驗動物分組如下所示：

- C 組 (正常組，一般飼料飲食組)
- C-1R 組 (正常組添加 1 倍劑量紅麴山藥)
- C-5R 組 (正常組添加 5 倍劑量紅麴山藥)
- HC 組 (高血脂組)
- HC-1R 組 (高血脂組添加 1 倍劑量紅麴山藥)

HC-5R 組 (高血脂組添加 5 倍劑量紅麴山藥)

HC-L 組 (高血脂組, lovastatin 藥物組)

HC-1RL 組 (高血脂組添加 1 倍劑量紅麴山藥與 lovastatin 藥物組)

HC-5RL 組 (高血脂組添加 5 倍劑量紅麴山藥與 lovastatin 藥物組)

各組老鼠每週經口投予 7 天, 試驗執行時間共投予 8 週。



2. 安全性與功能性指標之評估

體重、血液與肝組織 TC 及 TG 測定、血液中 HDL-C、LDL-C 含量分析、肌酸磷酸激酶活性、肝、腎功能分析、電解質平衡狀態分析及組織病理檢驗均依照動物共同實驗所述進行。

3. 生物統計分析方法

依照本論文所述之動物共同實驗進行步驟。

(二) 紅麴山藥與降血糖藥物 thiazolidinedione 併用對糖尿病大鼠影響評估

1. 實驗動物之飼養與糖尿病老鼠的誘導

本研究中調節血糖功能評估, 實驗動物為 6-8 週齡之 Sprague Dawley 雄性大鼠, 購自樂斯科實驗動物中心。將實驗老鼠隨機分組每組 9 隻於飼養籠中分別飼養, 採取自由進食方式, 隨時保持飲用水及飼料充足。以 streptozotocin (STZ) (Sigma) 誘導, 保護劑使用 nicotinamide (Sigma), 誘導大鼠成為第二型糖尿病鼠, 呈現一些人類第二型糖尿病的特徵, 如高血糖、葡萄糖耐受異常症和減少葡萄糖刺激的胰島素分泌。將 8 週大 Sprague Dawley 老鼠絕食 24 小時後, 腹腔注射 pentobarbital 30.0 mg/kg 將之麻醉後, 自股靜脈注射 STZ。STZ 係溶於生理食鹽水, 並含有檸檬酸鈉 (10 mM, pH 4.5) 為緩衝溶劑, 非胰島素依賴型 (第二型) 糖尿病動物則是給予實驗動物 STZ (65 mg/kg) 加上 nicotinamide (230 mg/kg), 1 星期後, 尾巴採血測量

隔夜空腹 (17~24 小時) 血糖值，當老鼠血糖高於 12 mM 則視為誘導成功 (Revers, 1984)。

以 *Monascus purpureus* NTU 568 發酵山藥內含以含 monascin 15 mg, ankaflavin 5.8 mg 之紅麴山藥為 1 倍劑量、含 monascin 75 mg, ankaflavin 29 為 5 倍劑量，換算成紅麴山藥粉末每人 (體重 65 kg) 每日食用 2.12 g 做為 1 倍劑量，換算紅麴山藥餵食大鼠劑量則為每公斤大鼠體重每日餵食 176 mg 做為 1 倍劑量；352 mg 為 2 倍劑量；880 mg 為 5 倍劑量，另與降血糖藥物 thiazolidinedione (TZD) 併用，TZD 藥物購買自台灣武田藥品 (商品名:愛妥糖 30 mg) 用於治療第二型糖尿病患者每人每日服用劑量為 30 mg 與紅麴山藥併用，換算 TZD 餵食大鼠劑量則為每公斤大鼠體重每日餵食 0.52 mg 搭配 176 mg/kg 紅麴山藥做為 1 倍劑量；352 mg 為 2 倍劑量；880 mg/kg 為 5 倍劑量。各組實驗動物於餵食 8 週時以二氧化碳窒息法進行犧牲，並進行血液中肝、腎功能與電解質之安全性分析。

2. 分組及實驗方法

以短期 (24 小時) 及長期 (14 天以上) 口服方式投予受試物；受試物劑量除對照組外，以紅麴山藥一般具有降血脂功效的建議攝取量，及一般常用來治療糖尿病藥物 TZD 併用，以探討紅麴山藥在降血脂與預防動脈粥狀硬化的功效之外，與降血糖藥物同時服用是否會引發非預期效應，與藥物併用是否具有降血糖能力之加乘效果。

實驗動物分組 (每組 9 隻) 如下：

- C 組 (正常組，一般飼料)
- DC 組 (糖尿病組)
- D1R 組 (糖尿病組添加 1 倍劑量紅麴山藥)
- D2R 組 (糖尿病組添加 2 倍劑量紅麴山藥)
- D5R 組 (糖尿病組添加 5 倍劑量紅麴山藥)

DM 組 (糖尿病組添加 TZD 藥物)

D1RM 組 (糖尿病組添加 1 倍劑量紅麴山藥併用 TZD 藥物)

D2RM 組 (糖尿病組添加 2 倍劑量紅麴山藥併用 TZD 藥物)

D5RM 組 (糖尿病組添加 5 倍劑量紅麴山藥併用 TZD 藥物)

各組老鼠每週經口投予 7 天，試驗執行時間共投予 8 週。



3. 口服葡萄糖耐量試驗 (oral glucose tolerance test) (Chen and Liu, 2006)

老鼠禁食 15 小時，測其空腹血糖值，將老鼠分組後管餵紅麴山藥 (176 mg/kg、352 mg/kg、880 mg/kg) 與 1.0 g/kg 葡萄糖溶於 1 mL 去離子水。觀察 30、60、90、120、150、180 分鐘後之血糖變化。

4. 安全性指標之評估

血液中肌酸磷酸激酶、血脂、肝功能分析、腎功能分析、電解質平衡狀態分析及一般組織病理檢查均依照動物共同實驗所述進行。

5. 功能性指標之評估

(1) 葡萄糖分析

抽血後所得血清，取 20 μ L 與葡萄糖 enzymatic kit 試劑 (BioVision Co., Mountain View, CA, USA) 3 mL，在 37°C 下反應 10 分鐘，利用分光光度計在 500 nm 波長下測定吸光值，換算出血清中葡萄糖含量。葡萄糖反應試劑的原理乃利用葡萄糖氧化為葡萄糖酸及過氧化氫，藉著葡萄糖的色素基之氧化呈現不同深淺的紅色。血糖值乃由血清和葡萄糖反應試劑反應所呈現的紅色，藉吸光值判定，與標準品對照換算出血糖值 (mM)。

(2) 胰島素分析

取血清 10 μ L，使用 rat insulin ELISA kit (Mercodia AB, Sweden) 測其吸光值，帶入標準曲線對照即可得樣品的 insulin 濃度 (y 表示為吸光值, $y=0.1734x-0.0235$; $r^2=0.9983$)。



6. 數據處理和結果判定

依照本論文所述之動物共同實驗進行步驟。

(三) 紅麴山藥與降血壓藥物 amlodipine 對高血壓大鼠降血壓之影響評估

1. 實驗動物之飼養

本研究中降血壓功效評估，動物實驗方法 Chobanian 發表之模式 (Chobanian et al., 2003)，使用自發性高血壓大鼠 SHR/Ncrl (spontaneous hypertensive rat, SHR) 72 隻及 WKY/Ncrl 品系雄性大鼠正常血壓對照組 36 隻共 108 隻，8 週齡，購自財團法人國家實驗研究院國家實驗動物中心。隨機分組，每組 12 隻。飼養至 13 週後開始進行 8 週實驗。

2. 試驗物質

本研究受試物以具有降血脂功效紅麴山藥的建議攝取量，及一般常用來治療高血壓藥物 amlodipine，以探討紅麴山藥是否在具有降血脂與預防動脈粥狀硬化的功效之外，與治療高血壓藥物同時服用是否會引發非預期效應，亦或同時具有減緩高血壓之能力。

3. 高血壓大白鼠之誘導與餵食劑量之換算

以口服方式投予受試物餵食 8 週。以 *Monascus purpureus* NTU 568 發酵山藥內含以含 monascin 15 mg, ankaflavin 5.8 mg 之紅麴山藥為 1 倍劑量、含

monascin 75 mg, ankaflavin 29 mg 為 5 倍劑量，換算成紅麴山藥粉末每人 (體重 65 kg) 每日食用 2.12 g 做為 1 倍劑量；10.62 g 為 5 倍劑量，換算紅麴山藥餵食大鼠劑量則為每公斤大鼠體重每日餵食 176 mg 做為一倍劑量；880 mg 為五倍劑量，另與降血壓藥物 amlodipine 併用，amlodipine 購自輝瑞大藥廠 (商品名:脈優 10 mg) 用於治療高血壓患者每人每日服用劑量為 10 mg 以之與紅麴山藥併用，換算 amlodipine 餵食大鼠劑量每公斤大鼠體重每日餵食 0.048 mg/day 搭配 176 mg/kg 紅麴山藥做為 1 倍劑量；880 mg/kg 為 5 倍劑量。各組實驗動物於餵食 8 週後以二氧化碳窒息法進行犧牲，並進行血液中肝、腎功能與電解質之安全性分析。探討攝取不同劑量紅麴山藥且與藥物併用是否會引起非預期性效應。

實驗動物分組如下所示:

WC 組 (正常組，一般飼料)

W1R 組 (正常組添加 1 倍劑量紅麴山藥)

W5R 組 (正常組添加 5 倍劑量紅麴山藥)

SC 組 (高血壓組，一般飼料)

S1R 組 (高血壓組添加 1 倍劑量紅麴山藥)

S5R 組 (高血壓組添加 5 倍劑量紅麴山藥)

SA 組 (高血壓組添加 amlodipine 藥物)

S1RA 組 (高血壓組添加 1 倍劑量紅麴山藥併用 amlodipine 藥物)

S5RA 組 (高血壓組添加 5 倍劑量紅麴山藥併用 amlodipine 藥物)

各組老鼠每週經口投予 7 天，試驗執行時間共投予 8 週。

4. 安全性指標之評估

血液中肌酸磷酸激酶、血脂、肝功能分析、腎功能分析、電解質平衡狀態分析及一般組織病理檢查均依照動物共同實驗所述進行。

5. 功能性指標之評估

(1) 單一餵食後 24 hr 內收縮血壓、舒張血壓、平均血壓、心跳速率測定

收縮壓與舒張壓的測定採用間接測定法，在動物清醒、安靜下進行血壓測量，實驗開始前 1 周開始進行預測量使動物習慣，實驗開始第 1 次管餵試驗物質後 4、8 以及 24 小時後進行血壓測量，測定方法使用尾脈搏法 (tail-cuff method)。測定儀器為市售之血壓測定器 (Visitech BP-2000, Napa Place, North Carolina, USA)。

(2) 長期餵食 8 周之收縮血壓、舒張血壓、平均血壓、心跳速率測定

收縮壓與舒張壓的測定採用間接測定法，在動物清醒、安靜下進行血壓測量，實驗開始前一周開始進行預測量使動物習慣，實驗開始後每 2 週測定 1 次血壓，每次測定為 3-5 次測定值之平均值，測定方法如上節所述。

6. 生物統計分析方法

依照本論文所述之動物共同實驗進行步驟。

三、中草藥對於改善記憶學習能力暨輔助治療阿茲海默症之研究

(一) 中藥對於阿茲海默症輔助治療之體外細胞試驗

1. 實驗材料

本實驗室之前以衛生福利部規定之可食用性中草藥，參考國內外文獻具有抗氧化、益心、肝之血而有安神、活血化瘀、改善睡眠等功效，以山楂、茵陳、紅花、玫瑰、葛根、決明子、薑黃、百合、遠志、雷公根、咸豐草、丹蔘、芝麻、砂仁、酸棗仁等樣品。經由化學性抗氧化分析後以分化 PC12 與 IMR32 神經細胞進行毒性試驗，最後由上述樣品六種萃取方式篩選出山楂、玫瑰、雷公根與酸棗仁 (蔡，2011)。

2. 類澱粉樣蛋白配製-未聚合與聚合 amyloid β_{1-40} peptide 製備

將 $A\beta_{1-40}$ 以 phosphate-buffered saline (PBS) (pH 7.4) 溶解，配置成 230 μ M 溶液，此時溶液定義成未聚合 $A\beta_{1-40}$ 溶液。未使用時儲存於 -20°C 冰箱。取未聚合 $A\beta_{1-40}$ 溶液放置於 37°C 培養箱中放置 7 天，此時 $A\beta_{1-40}$ 因具有自我聚合能力，會形成聚集體，並產生神經毒性 (Rubinsztein, 1997)。定義經過 37°C 7 天聚集之 $A\beta_{1-40}$ 溶液為聚合 $A\beta_{1-40}$ 溶液。

3. 細胞模式試驗

(1) IMR32 人類神經纖維母細胞之培養

IMR32 神經細胞以 90% MEM-EBSS 培養基 (含 2 mM L-glutamine、1.5 g/L sodium bicarbonate、0.1 mM non-essential amino acid、1.0 mM sodium pyruvate 與 10% 胎牛血清) 培養於 37°C 、 CO_2 濃度為 5% 之培養箱中。每 2 到 3 天更換 1 次培養基，每周進行繼代 1 次，所有試驗都在相同代數下進行。中草藥萃取物以 dimethyl sulfoxide (DMSO) 回溶，定量至 250 mg/mL，並保存在 -20°C 。試驗時依比例稀釋至所需試驗濃度。

(2) 細胞存活率測定：MTT 分析

將 5×10^4 個細胞接種於 24 孔盤中，隔夜培養後，吸去培養基並加入含有不同濃度之中草藥萃取物，或 0.4% DMSO 之培養基當作樣品組與控制組。培養 24 或 48 小時後，移去培養基，加入 250 μ L 的 3-(4,5-cimethylthiazol-2-yl)- 2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) 溶液 (0.5 mg/mL)。再培養 6 小時，吸去多餘 MTT 溶液並加入 400 μ L DMSO 回溶 formazan，並搖勻 10 分鐘，測波長 570 nm 的吸光值，吸光值越高表示存活細胞數目越多。

(3) 雷公根、酸棗仁、玫瑰與山楂萃取物對 IMR-32 細胞抵抗 $A\beta_{1-40}$ 神經毒性之影

響

將 1×10^4 個 IMR-32 細胞接種於 24 孔盤的每一孔中，培養隔夜後，吸去培養基，加入含有 10~1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 不同濃度之玫瑰 A、B 與 C 組、山楂 A 組、雷公根 A 與 F 組及酸棗仁 B 組萃取物，並於以上各培養基中加入聚合之 $\text{A}\beta_{1-40}$ 溶液，使每一培養基中聚合 $\text{A}\beta_{1-40}$ 最終濃度達 $2\mu\text{M}$ 當作樣品組，另外亦配置含有 0.8% DMSO 及 $2\mu\text{M}$ 聚合 $\text{A}\beta_{1-40}$ 與含有 0.8% DMSO 不含聚合 $\text{A}\beta_{1-40}$ 溶液以等體積 PBS 取代) 培養基當作控制組與 $\text{A}\beta_{1-40}$ 組。分別將上述樣品組與控制組培養基加入分化 IMR-32 細胞中，進行樣品處理。以 MTT 細胞存活率分析計算樣品處理分化 IMR-32 細胞 24、48 及 72 小時之細胞存活率。

(4) 細胞收集與蛋白質定量

將 1.5×10^6 cell/well 的細胞接種於 10 cm 培養皿，經 $2\mu\text{M}$ $\text{A}\beta_{1-40}$ 與樣品處理 24 小時後，細胞以細胞刮刀刮下，以 PBS 清洗三次。加入 200 μL PBS 以液態氮冷凍， 37°C 水浴槽解凍，快速反覆冷凍解凍 6 次，將細胞打破後以 $10,000 \times g$ ， 4°C 離心 10 分鐘。取上清液為細胞均質液。此均質液以 Bio-Rad protein assay kit 進行蛋白質定量，以 BSA 為標準品，算出蛋白質濃度，並儲存於 -80°C 。

(5) Catalase 活性分析

細胞均質液以 catalase assay kit (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA) 測量細胞中 catalase 活性，利用 catalase 催化 H_2O_2 與甲醇產生反應，產生 formaldehyde，進而利用呈色劑 4-amino-3-hydrazino-5-mercapto-1,2,4-triazole (purpald) 使此產物呈色，最大吸收波長為 540 nm，並用以計算 catalase 的濃度。

(6) Superoxide dismutase (SOD) 活性分析

細胞均質液以 SOD assay kit (Cayman Chemical) 測量細胞中 SOD 活性。其操

作方法將基質試劑 (mixed substrate) 內含 xanthine，操作時加入 xanthine oxidase，使之迅速產生超氧離子 (O_2^-)，而超氧離子遇到基質試劑所含的 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenol)-5-phenyltetrazolium chloride (INT) 即作用產生一紅色的 formazan dye。SOD 能與 INT 競爭，將超氧根離子作用生成氧，抑制紅色形成。分析時以分光光度計測量紅色染劑濃度，代表 SOD 抑制超氧根產生的程度，間接推估 SOD 活性。於 cuvette 加入 850 μ L mixed substrate (內含 0.05 mmol/L xanthine 與 0.025 mmol/L INT)、25 μ L 的標準品或腦組織萃取液，最後再加入 125 μ L 的 xanthine oxidase (80 U/L)，於加入後第 30 sec 及第 210 sec 分別記錄波長 505 nm 之吸光值，再由標準樣品測出檢量線以推算 SOD 之活性。所得活性再以組織萃取液之總蛋白質質量為基準，計算每 mg 的蛋白質質量所含 SOD 活性。

(7) Glutathione peroxidase (GPx) 活性分析

細胞均質液以 GPx assay kit (Cayman Chemical) 測量細胞中 GPx 活性，依要求配置所需藥品與標準品，並將細胞均質液濃度調整至適當濃度後，取 20 μ L 加入 100 μ L 分析緩衝液與 100 μ L 含 NADPH、glutathione 與 glutathione reductase 的混合液。盡快加入 20 μ L 過氧化氫異丙苯開始反應，震盪數秒後，以微盤讀儀測量波長 340 nm 波長下吸光值，每 30 秒測一次，共測五分鐘。取得吸光值對時間的斜率後，依公式計算出 GPx 活性。公式為 $GPx \text{ activity} = (\text{slope}/0.00373 \mu\text{M}^{-1}) \times (0.19 \text{ mL}/0.02 \text{ mL}) = \mu\text{M}/\text{min}$ 。再除以蛋白質含量後，結果以相對於控制組活性強度表示。

(8) Glutathione (GSH) 活性分析

細胞均質液以 GSH assay kit (Cayman Chemical) 測量細胞中 GSH 含量，依要求配置所需藥品與標準品，並將細胞均質液濃度調整至適當濃度後，取 50 μ L 加入 96 孔盤。將 MES buffer、cofactor mixture、enzyme mixture、5,5-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) 依比例混合後新鮮配置，取 150 μ L 加入 96 孔盤中。以微盤讀儀測量

波長 405 nm 波長下吸光值，每 5 分鐘測一次，共測 30 分鐘。和已知量的標準品進行比對，計算 GSH 含量。



(9) Glutathione disulfide (GSSG) 活性分析

細胞均質液以 GSSG assay kit (Cayman Chemical) 測量細胞中 GSSG 含量，將 50 μL 細胞均質液與標準品，加入 3 μL 10 mM 1-methyl-2-vinylpyridinium trifluoromethanesulfonate (M2VP)，靜置一小時。依要求配置所需藥品與標準品，並將細胞均質液濃度調整至適當濃度後，取 50 μL 加入 96 孔盤。將 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid (MES) buffer、cofactor mixture、enzyme mixture、5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) 依比例混合後新鮮配置，取 150 μL 加入 96 孔盤中。以微盤讀儀測量波長 405 nm 下吸光值，每 5 分鐘測一次，共測 30 分鐘。和已知量的標準品進行比對，計算 GSSG 含量。

4. 基原鑑定

(1) 外觀鑑定 (委託財團法人醫藥工業技術中心執行)

取雷公根樣品，和參考文獻比對外觀。(國家藥典委員會, 2010a; 國家藥典委員會, 2009a; 肖, 2002a)。取酸棗仁樣品，和參考文獻比對外觀。(國家藥典委員會, 2010b; 國家藥典委員會, 2009b; 肖, 2002b)。

(2) 顯微鑑別 (委託財團法人醫藥工業技術中心執行)

將雷公根製作成切片，和參考文獻比對。(國家藥典委員會, 2010a; 國家藥典委員會, 2009a; 肖, 2002a)。將酸棗仁製作成切片，和參考文獻比對。(國家藥典委員會, 2010b; 國家藥典委員會, 2009b; 肖, 2002b; 陳等, 2011)。切片製作方法採橫切面製片法，選取樣品後，軟化，用徒手法切成 10 - 20 μm 之薄片。經甘油醋酸試液處理後，用顯微鏡觀察。

酸棗仁在判別時，需鑑定內容物性質，方法如下：

- (a) 澱粉粒：加碘試液，顯藍色或紫色。
- (b) 糊粉粒：加碘試液，顯棕色或黃棕色。
- (c) 脂肪油：加蘇丹 III 試液，顯橘紅色、紅色或紫紅色。
- (f) 草酸鈣結晶：以偏光顯微鏡在黑暗中觀察，可觀察到白色發亮的結晶。



(3) DNA 鑑定 (委託財團法人工業技術研究院執行)

將雷公根與酸棗仁磨碎後，萃取與純化其 DNA，依據工業技術研究院資料庫設計引子對，再以聚合酶連鎖反應複製核醣體轉錄間隔區 (internal transcribed spacer, ITS) 片段，和工業技術研究院資料庫中的 ITS 片段進行序列解讀比對。

(二) 雷公根 20%、酸棗仁 40% 酒精萃取物與紅麴山藥改善阿茲海默症與記憶學習之動物試驗

阿茲海默症形成主要理論之一，是 A β 於腦部大量沉積所引發記憶能力的損傷，而 A β 的生成主要是其前驅蛋白質 APP，於腦部受膽固醇催化之 β -secretase 剪切為具毒性之 A β 。因此動物試驗將探討，對腦部輸注 A β 之阿茲海默症大鼠記憶學習能力之影響。試驗動物直接以 A β 40 輸注於大鼠腦部海馬迴組織中，使 A β 於腦部中大量沉積而引發阿茲海默症，試驗期間每日餵食雷公根 20%、酸棗仁 40% 酒精萃取物與紅麴山藥，以探討其對於已生成之 A β 之毒性抑制效果。

1. 實驗動物與分組

本研究所採用之動物為 Sprague-Dawley 系雄性大鼠，週齡 8 週大，體重約 250~300 g，每組 9 隻預養 1 週後進行隨機分組，飼養條件如動物共同實驗所述。

動物分組如下所示：

實驗動物分組 (每組 9 隻)：

N 組 (正常組, 一般飼料飲食組)

A 組 (類澱粉樣蛋白輸注組)

AM 組 (類澱粉樣蛋白輸注並餵飼 Donepezil HCl 0.52 mg/kg 藥物)

AC1 組 (類澱粉樣蛋白輸注並餵飼 1 倍劑量雷公根 20% 酒精萃取物*)

AC2 組 (類澱粉樣蛋白輸注並餵飼 2 倍劑量雷公根 20% 酒精萃取物*)

AC5 組 (類澱粉樣蛋白輸注並餵飼 5 倍劑量雷公根 20% 酒精萃取物*)

AZ1 組 (類澱粉樣蛋白輸注並餵飼 1 倍劑量酸棗仁 40% 酒精萃取物*)

AZ2 組 (類澱粉樣蛋白輸注並餵飼 2 倍劑量酸棗仁 40% 酒精萃取物*)

AZ5 組 (類澱粉樣蛋白輸注並餵飼 5 倍劑量酸棗仁 40% 酒精萃取物*)

AR1 組 (類澱粉樣蛋白輸注並餵飼 1 倍劑量 176 mg/kg 紅麴山藥*)

AR2 組 (類澱粉樣蛋白輸注並餵飼 2 倍劑量 382 mg/kg 紅麴山藥*)

AR5 組 (類澱粉樣蛋白輸注並餵飼 5 倍劑量 880 mg/kg 紅麴山藥*)

*雷公根 20% 酒精萃取物與酸棗仁 40% 酒精萃取物劑量表示方式, 為人體每日攝取量 1 g/day 作為 1 倍劑量紅麴山藥劑量表示方式, 為人體每日攝取量 2 g/day 作為 1 倍劑量, 動物試驗依照此建議劑量換算為大鼠每公斤每日管餵劑量, 換算方式如動物共同實驗所述。

2. 體內動物試驗

(1) 阿茲海默症模式大鼠之誘導 (Flood *et al.*, 1991)

由滲透壓幫浦 (Mini-Osmotic Pump, Model 2002, 輸注速率 0.5 $\mu\text{L/hr}$, 內容量 200 μL , Alzet[®])、軟管 (長約 4-5 cm, 內容量約 80 μL)、輸注針頭 (Brain Infusion Kit II, 3-5 mm, Alzet[®]) 所構成, 其結構如圖 3.1 所示, 將製備好之 4 μM A β (同細胞實驗方法配製) 注入 Alzet osmotic pump, 接上 brain infusion kit 並使 A β solution 充滿連接 pump 及 kit 之 PE 管。先以 Isoflurane 氣體進行大鼠麻醉, 麻醉後配合

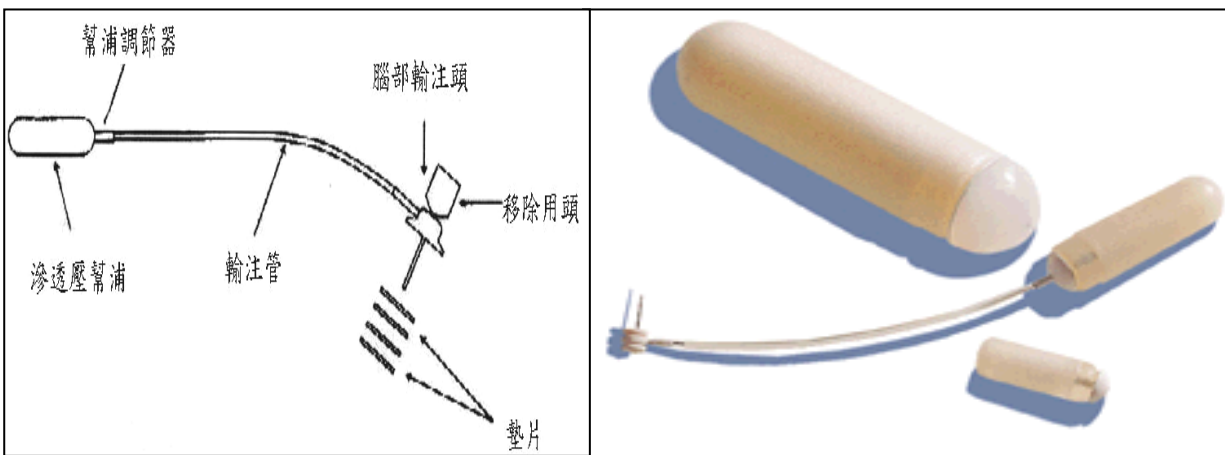


圖 3.1、ALZET 腦部輸注幫浦

Fig. 3.1 The osmotic minipump (2004; Durect Co., Cupertino, CA, USA)

動物立體定位儀 (S 724791) (Narishige, Tokyo, Japan) 固定在頭顱上，對大鼠腦部進行定位將探針刺入腦中側腦室位置，而不傷及其他腦組織，進行側腦室之定位。待側腦室定位後，將 brain infusion kit 置上，並將 Alzet osmotic pump 置於頸後皮下區。最後進行縫合，並歸回飼養籠中照顧。對照組 (sham) 則於 Alzet osmotic pump 填充未含 $A\beta$ 之緩衝液。治療組於埋置好後之次日，持續每天以管餵方式給予受測樣品，直至實驗完成。

(2) 各項試驗之日程

各項試驗，包括行為試驗與生理生化試驗之日程示如圖 3.2。

(3) 被動迴避反應 (passive avoidance test) (Suits and Isaacson., 1968)

被動迴避學習反應測定裝置 (Friedman *et al.*, 1983; Miyamoto *et al.*, 1985; Thal *et al.*, 1988.)，分成 2 部份：實驗箱為一經中間以門分隔為相同大小 2 室的箱子及其控制器；於相同大小 2 室之其中 1 室上方置 1 個 20 W 之電燈泡，將相同大小 2 室區分為明暗 2 室，中以門控制，箱底設有間隔 2 cm 平行排列的金屬桿 (直徑 1.5 mm)，並接上電流器。其裝置如圖 3.3 所示。待大鼠進入暗室後，關閉閘門，同時於底板通以電流 (1 mA, 3 sec)，待電刺激後 5 秒，自暗室取出大鼠，歸回飼養籠；如老鼠一直未進入暗室，待 90 秒後將老鼠推至暗室後，關閉閘門，同時於底板通以電流，再歸回飼養籠。測定期：於訓練後 24 小時、48 小時、72 小時後，再將大鼠置入明室，同時並開啟閘門，記錄大鼠在明室之滯留時間 (Step-Through Latency, STL)。當於明室之滯留時間大於 5 分鐘 (300 秒) 時，則稱大鼠之學習記憶能力正常。

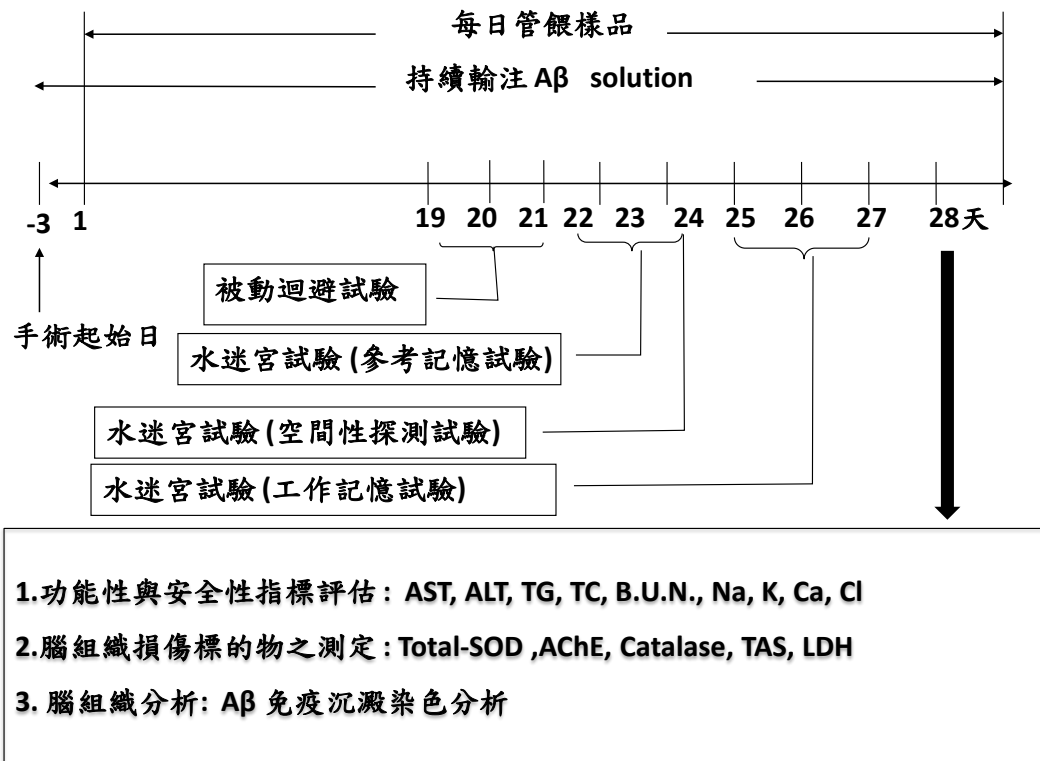
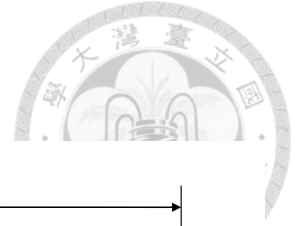


圖 3.2、改善阿茲海默症大鼠之記憶學習試驗日程表

Fig. 3.2 The experiment schedule of learning and memory task for Alzheimer's disease rats

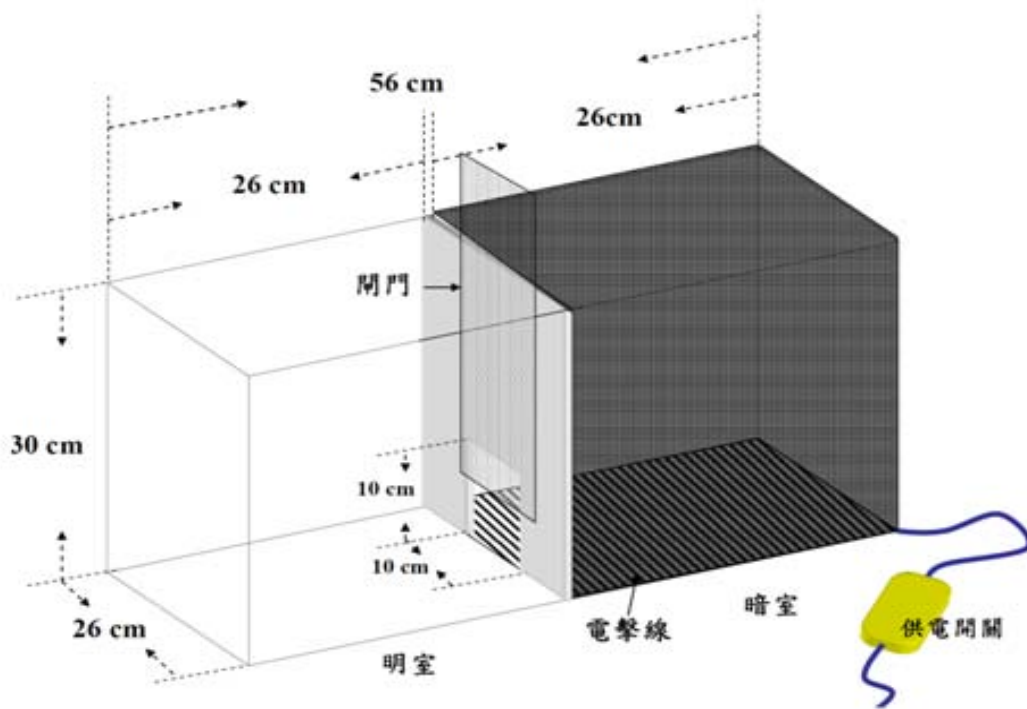


圖 3.3、被動迴避學習反應測定裝置。

Fig. 3.3 Instrument of passive-avoidance task

(4) Morris 水迷宮試驗 (Yamaguchi *et al.*, 2006)

a. 試驗裝置

手術後 22 天開始進行水迷宮記憶學習能力試驗，依次為參考記憶試驗、空間性探測試驗與工作記憶試驗，水迷宮裝置如圖 3.4 所示，圓形泳池之直徑為 180 cm，高度 45 cm，泳池中含有一可移動的休息平臺（或稱逃逸平臺，escape platform）。平臺之直徑為 12 cm，高度為 25 cm。實驗進行前泳池須加水至 27 cm 之液面高度。泳池區分為四個象限（I、II、III 與 IV 區），並設置 5 個起始點，休息平臺放置於任一象限之中心點。試驗期間並於泳池中心點之正上方架設攝影機以記錄實驗動物之游泳時間與路徑。

b. 參考記憶試驗 (reference memory task)

實驗於手術後第 22 至 24 天進行，休息平臺固定置於第四象限內，大鼠頭向外依序隨機分別進入五個進入點，每天訓練 4 次，每次 90 sec；若大鼠於 90 sec 內即找到休息平臺，於休息平臺上讓大鼠休息 30 sec 後，移出泳池休息 30 sec，然後進行下一次之測試；但若大鼠於 90 sec 未找到休息平臺，則將大鼠誘導置休息平臺並且休息 30 sec 讓大鼠記憶休息平臺在泳池空間中的相對位置後，移出泳池休息 30 sec，再進行下一次之訓練，共進行 12 次試驗。

c. 空間性探測試驗 (probe test)

於第 24 天之參考記憶試驗後立即進行空間性探測試驗，將休息平臺移出泳池，大鼠由第一象限之起始點 1 進入泳池，游泳 90 sec，同時紀錄大鼠於原參考記憶試驗中休息平臺放置之象限（第四象限）中所停留之時間。

d. 工作記憶試驗 (working memory task)

實驗於手術完後第 25-27 天進行工作記憶試驗，休息平臺每日放置於不同象限

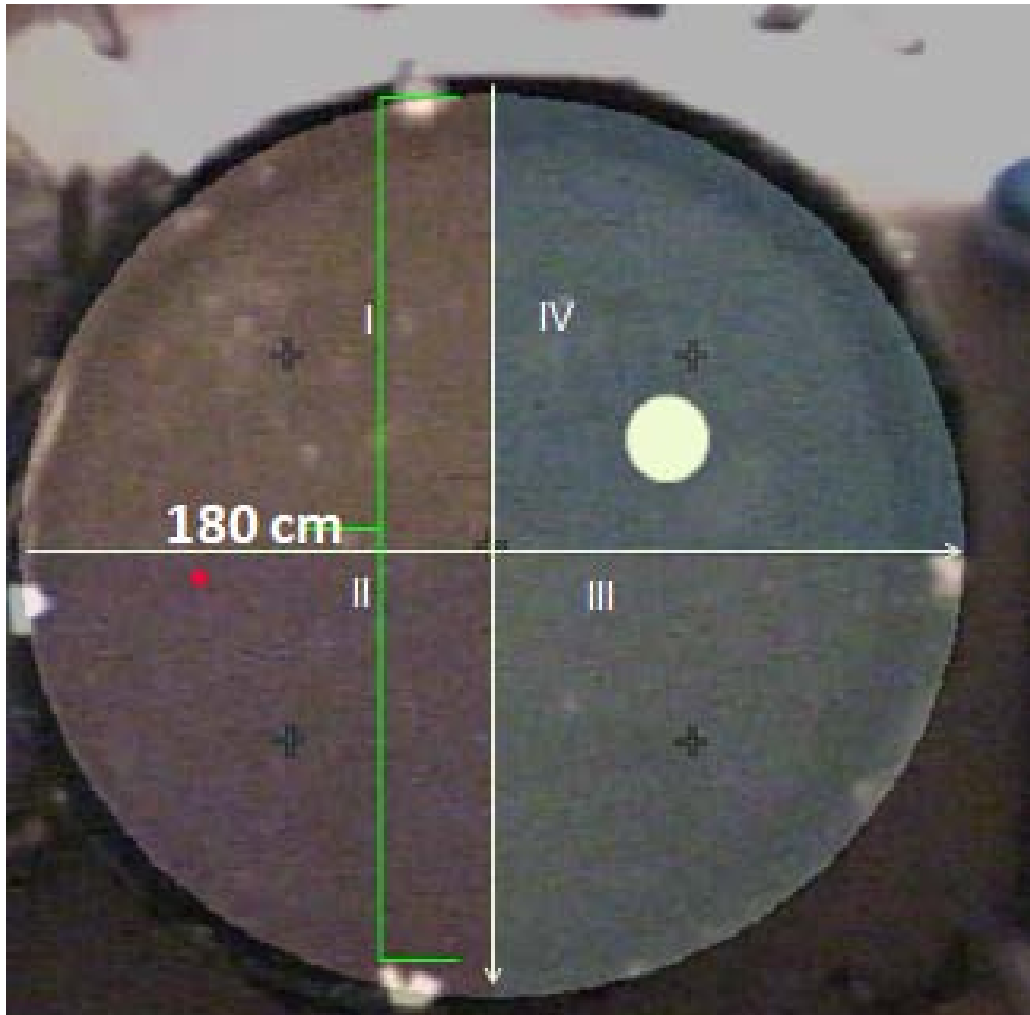


圖 3.4、水迷宮電腦劃分區域示意圖。

Fig. 3.4 The schematic of a water maze task

(第一、二或三象限)，每天訓練 5 次，大鼠頭向外依序隨機分別進入 5 個進入點，每次 90 sec；若大鼠於 90 sec 內即找到休息平臺，讓大鼠於休息平臺上休息 15 sec 後，移出泳池再休息 60 sec，然後進行下一次之測試；但若大鼠於 90 sec 尚未找到休息平臺，則將大鼠誘導至休息平臺並且休息 15 sec 讓大鼠記憶休息平臺在泳池空間中的相對位置後，移出泳池再休息 60 sec，再進行下一次之訓練，試驗結束後將每日之試驗結果進行平均。最後再將每組第 2 次至第 5 次之 3 天平均結果進行平均並統計組間之差異，每日的第 1 次訓練為認知訓練，不列入計算。

(5) 安全性指標之評估

血液中肌酸磷酸激酶、血脂、肝功能分析、腎功能分析、電解質平衡狀態分析及一般組織病理檢查均依照動物共同實驗所述進行。

(6) 腦組織之處理

動物犧牲後取出腦部組織，依照 Glowinski 及 Iversen 方法 (Glowinski and Iversen, 1966) 分成 codex、hippocampus 區域。分別加入 25 mM phosphate buffered solution (PBS) (pH 7.4) (4°C) 均質，再合併兩次之上清液，以 25 mM PBS (pH 7.4) 定量至 1.5 mL。Hippocampus 加入 1 mL PBS buffer 後，均質、離心 (10,000 x g, 30 min) (4°C)，以 25 mM PBS (pH 7.4) 定量至 1 mL。保存於 -80°C，待需要時解凍離心 (8,000 x g, 5 min, 4°C)，取上清液使用。

(7) 蛋白質含量之測定 (Lowry *et al.*, 1951)

以 bovine serum albumin 為標準品，將 protein standard 以 50 mM phosphate buffer 稀釋 3 至 10 個濃度，取 5 μ L sample 和 standard 分別置入 microplate 中。每一小格中先後加入 25 μ L 試劑 A 及 200 μ L 試劑 B (試劑購自 Bio-Rad Dc protein assay kit (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) 混合均勻，靜置 15

分鐘後於波長 750 nm 下測其吸光值。以吸光度求出標準檢量線及公式，再以 sample 的吸光值反推 protein 含量。



(8) 腦部組織 iNOS 表現量測定

在老化的腦部可測得較高的一氧化氮合成酶 (nitric oxide synthase, iNOS) 表現量，表示會生成具有神經毒害的 NO 自由基 (Law *et al.*, 2001; McCann *et al.*, 2005)。一氧化氮合成酶係以 iNOS 商業套組 (Cayman Chemical) 分析組織萃取液中的 iNOS，操作方法如套組說明書所示

(9) 乙醯膽鹼酶 (acetylcholine esterase, AChE) 活性之測定

以 modified Ellmen method 測定之 (Dass *et al.*, 1997)，步驟如下：

以 acetylthiocholine 為受質，使用 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid DTNB 為反應試劑，將 AChE standard 以 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.4) 稀釋 3 到 5 個濃度。取 0.5 μ L sample 和 standard 分別置入 microplate 中，每一小格中加入 4.5 μ L DTNB 並混合均勻，控溫於 26°C 靜置 10 分鐘。爾後每一小格中先後加入 5 μ L acetyl thiocholine (ACtCh) 及 190 μ L sodium phosphate buffer (pH 8.0) 並混合均勻。置入 microplate 混合均勻後放入分光光度計以波長 412 nm、間隔 1 min 測定吸光值的變化。

(10) 大腦海馬迴組織中 LDH 活性表現量之評估

乳酸去氫酶 lactate dehydrogenase (LDH) 在細胞受損時會釋放至細胞外，利用測定其活性可表示細胞受損情形。取 5 μ L 樣品液，加入濃度為 0.244 mmol/L NADH 125 μ L 與 9.76 nmol/L pyruvate 25 μ L 後，置入 microplate 混合均勻後放入分光光度計以波長 339 nm、總反應時間 180 秒，紀錄每 30 秒測定的吸光值變化。

(11) 大腦海馬迴組織中總抗氧化力 (total antioxidant status, TAS) 之評估

總抗氧化力係以 TAS 商業套組 (Cayman Chemical) 分析組織萃取液中的 TAS，操作方法如套組說明書所示。



(12) 大腦海馬迴組織中過氧化氫酶 (catalase) 活性之評估

過氧化氫酶係以 catalase 商業套組 (Cayman Chemical) 進行分析，操作方法如套組說明書所示。

(13) 大腦海馬迴組織中超氧化歧化酶 (superoxidase dismutase, SOD) 之評估

超氧化歧化酶以市售 Ransod-SD125 生化試劑 (Randox Laboratories Ltd) 分析組織萃取液中之活性，操作方法如套組說明書所示。

3. 數據統計

依照本論文所述之動物共同實驗進行步驟。

(三) 雷公根飲品 (健康食品安全分類第二類) 安全性評估試驗

1. 評估雷公根飲品之沙門氏菌回復突變試驗

(1) 菌種基因型鑑定

本試驗所使用之受試菌株為 *Salmonella typhimurium* TA98、TA100、TA102、TA1535 及 TA1537。菌株由 -70°C 菌種保存管中取出，於 $37\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 水浴槽中快速解凍後接種到 Master plates 後，再取單一菌落接種於 OXOID Nutrient Broth No. 2，置於 $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ 培養箱中，搖瓶培養 14~16 小時後進行組胺酸需求性測試 (histidine requirement)、rfa 突變型測定 (rfa mutation)、uvrB 突變型測定 (uvrB mutation) 及 R 質體 (R plasmid) 測定等菌株基因型 (genotype) 鑑定實驗，確定基因型無誤後始進行自然回復突變測試。



(2) 試驗物質之配製

取試驗物質「雷公根複合飲品」粉末 1 g，用 DMSO 配製成 20 mL 濃度為 50 mg/mL 之試驗物質溶液。

(3) 斑點測試 (spot test)

斑點測試在初步測試時，測試劑量設計由最高劑量 50 mg/mL (5 mg/plate) 試驗物質溶液做兩倍系列稀釋，再依結果決定出平板混合測試之劑量。

分別取各菌株保存於 master plate 上之單一菌落至 OXOID NB No. 2 培養液中培養 14~16 小時後，取 0.1 mL 菌液加入含有 histidine 及 biotin 之軟性瓊脂 (soft agar) 中，將其倒至 minimal glucose agar (MA) plate 及 nutrient agar (NA) plate 後，取沾有不同濃度試驗物質之無菌濾紙 (20 μ L/disc) 放於培養基中央，輕壓使之沉於軟性瓊脂中，並於 35 \pm 1 $^{\circ}$ C 倒置培養 48 \pm 1 小時後觀察其生長情形。

若 MA plate 上濾紙周圍出現菌落形成之環帶者，表示該物質具有致突變性；若 NA plate 上濾紙周圍出現抑制圈，表示該物質對測試菌株具有殺傷力，需調整試驗物質最高劑量之濃度。

(4) 平板混合測試 (plate incorporation assay)

取 100 μ L 試驗物質溶液 (50 mg/mL、25 mg/mL、12.5 mg/mL、6.25 mg/mL 及 3.125 mg/mL 試驗物質) 與 100 μ L 隔夜培養之沙門氏菌菌液及 0.5 mL 之 0.2 M 磷酸緩衝溶液 (經活化處理組，則加 0.5 mL S9 混合液) 混合均勻後，再加入已融化且保存於 47 \pm 1 $^{\circ}$ C 的含 histidine/biotin 之軟性瓊脂中，混合均勻後倒於 MA plates 上，待軟性瓊脂凝固後，倒置培養皿於 35 \pm 1 $^{\circ}$ C 定溫箱培養 48 \pm 1 小時後計算菌落數。

五株試驗菌株進行添加與不添加 S9 酵素混合液之組別，各 5 個劑量組、1 個陽性及 1 個陰性對照組共 7 組，並進行三重複試驗。陽性對照組之濃度則以

DMSO 進行濃度調整，如下表所示。

試驗菌株	S9 酵素	致變劑 (陽性對照組)	濃度 (µg/plate)
TA98	—	4-nitroquinoline-N-oxide	0.5
TA100, TA1535	—	Sodium azide	0.4
TA102	—	Mitomycin C	0.5
TA1537	—	9-aminoacridine	4.0
TA1535, TA1537	+	2-aminoanthracene	4.0
TA98, TA102	+	Benzo [a] pyrene	4.0
TA100	+	2-aminofluorene	4.0

大鼠肝臟微粒體懸浮混合液 (S9 mix) 之製備：試驗時所使用之 S9 混合液每 50 mL 中所含成分如下：

成分	每 50 mL 含量 (mL)
Rat liver S9 (Aroclor-1254-induced)	2.50
0.4 M MgCl ₂ -1.65 M KCl	1.00
1 M glucose-6-phosphate	0.25
0.1 M NADP	1.00
0.2 M phosphate buffer (pH 7.4)	25.00
Sterile distilled H ₂ O	19.25

(5) 數據判定

添加 S9 之組別，TA98 之自然突變菌落數約為 15 ~ 50 CFU/plate、TA100 之自然突變菌落數約為 100 ~ 273 CFU /plate、TA102 之自然突變菌落數約為 141 ~

500 CFU/plate、TA1535 之自然突變菌落數約為 12 ~ 30 CFU/plate、TA1537 之自然突變菌落數約為 5 ~ 20 CFU/plate。

未添加 S9 之組別，TA98 之自然突變菌落數約為 14 ~ 50 CFU/plate、TA100 之自然突變菌落數約為 125 ~ 258 CFU /plate、TA102 之自然突變菌落數約為 110 ~ 480 CFU/plate、TA1535 之自然突變菌落數約為 10 ~ 35 CFU/plate、TA1537 之自然突變菌落數約為 5 ~ 20 CFU/plate。

陽性反應之判定標準：至少有一試驗物質劑量組之回復突變數高於陰性對照組之自然回復突變數 2 倍以上，且具有濃度（劑量）反應關係(dose-response relation)者，則認定其為陽性反應。

陰性反應之判定標準：平板混合測試中，試驗物質各劑量組之檢測結果均未達陽性反應之標準，則認定其為陰性反應。

2. 評估雷公根飲品之體外哺乳類細胞染色體異常試驗

(1) 細胞株

本實驗所用之細胞株名稱為 CHO-K1，為中國倉鼠卵巢細胞（Chinese hamster ovary cell），來源自食品工業發展研究所生物資源與保存中心。細胞培養基為 90% Ham F-12 medium 及 10% Fetal bovine serum，培養條件為 37°C 下，5% CO₂ 的濃度培養。

(2) 細胞毒性試驗測試

本試驗取試驗物質粉末進行測試。加入含有 0.1% (v/v) DMSO 之細胞培養液調整試驗物質濃度。於細胞存活數試驗結果顯示，當試驗物質之處理劑量達 5.0 mg/mL 時，其細胞毒性仍未超過 50%，根據染色體結構異常試驗劑量決定原則，此試驗訂定 5.0 mg/mL 為最高處理劑量，而其他劑量經由 2 倍連續稀釋後分別為 2.5、1.25、0.625 及 0.3125 mg/mL。



(3) 染色體異常分析之試驗分組

陽性對照組、三種劑量組及陰性對照組，共 5 組。

- a. 不加 S9 之陽性對照組：2 μ M mitomycin C。
- b. 加 S9 之陽性對照組：80 μ M cyclophosphamide monohydrate。
- c. 陰性對照組：細胞培養液（含 0.1% DMSO）。
- d. 劑量組：加入 5、2.5 及 1.25 mg/mL 之試驗物質。

各組細胞之處理方式：每組細胞皆須以下列三種方式處理。

- a. 不加 S9，以試驗物質之溶液處理 CHO cells 3 小時。
- b. 不加 S9，以試驗物質之溶液處理 CHO cells 20 小時。
- c. 加 S9，以試驗物質之溶液處理 CHO cells 3 小時。

細胞存活數試驗：重複以上各組試驗已處理細胞，於加試驗物質後第 20 小時計算每盤細胞之細胞存活數。

(4) 染色體異常試驗

加試驗物質後第 20 小時，加入 colcemid 再培養 4 小時後進行玻片觀察，每試驗之細胞盤處理均採二重複，以代碼方式（blind code）於 1000 倍顯微鏡下，每一重複處理均觀察 100 個分裂中期細胞。選擇染色體均勻散開，且染色體數目為 18~22 的細胞來做觀察。觀察各類異常染色體結構及形態。

(5) 有效試驗之認定

觀察陰性對照組及陽性對照組玻片，當陰性對照組結果落在 0-3% aberrant cells 範圍內，且陽性對照組顯著高於陰性對照組結果時 ($p < 0.05$)，則接受該次試驗數據。

3. 評估雷公根飲品之體外哺乳類細胞染色體結構異常試驗

(1) 細胞株

中國倉鼠卵巢細胞 (hamster ovary cells, CHO-K1) (BCRC 60006)，購自食品工業發展研究所。細胞之形態為單層紡錘形附著生長，一般呈梭形、菱形、不規則三角形。若細胞形態呈扁平狀，與平面接觸面積較大，細胞質部分向外伸出數個突起，為細胞正在複製；若細胞處於 metaphase 時，與平面接觸面積較小，向上隆起呈球形，有立體感。

(2) 細胞培養

以含 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) Ham's / F-12 培養基 (含 1.0 mM L-glutamine)，調整 pH 值為 7.2 ~ 7.4。於 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 、 $5 \pm 1\%$ CO_2 培養箱培養。

(3) 大鼠肝臟微粒體懸浮混合液 (S9 酵素) 之製備

試驗時所使用之 S9 酵素每 5 mL 中所含成分如下。

成分	每 5 mL 含量 (μL)
Rat liver S9 (Aroclor 1254-induced)	50.0
1 M G6P	2.7
0.1 M NADP	20.5
Ham's / F-12 培養基	4926.8

(4) 試驗物質配製和劑量

取試驗物質粉末進行測試，加入含有 1% DMSO 之 Ham's / F-12 培養基調整試驗物質濃度。由試驗物質濃度 5 mg/mL 為最高劑量，而其他劑量則經由最高劑量 2 倍連續稀釋，依序為 2.5、1.25、0.625 及 0.3125 mg/mL。

a. 試藥處理方式：

本試驗共有下列三種處理方式。

- (a) 試驗物質溶液處理 3 小時，於培養基添加 S9 酵素。
- (b) 試驗物質溶液處理 3 小時，未於培養基添加 S9 酵素。
- (c) 試驗物質溶液處理 20 小時，未於培養基添加 S9 酵素。



b. 試驗組別：

每個試藥處理方式皆包含陰性對照組、陽性對照組及試驗組。細胞存活率試驗的試驗組進行 5 個測試劑量，共 7 組；染色體結構異常試驗進行 3 個測試劑量共 5 組，組別如下表。

試驗組別	添加物質	S9酵素	處理時間 (hrs)
陰性對照組	Ham's / F-12 培養基	+	3
	含10% FBS之Ham's / F-12 培養基	-	3
		-	20
陽性對照組	80 μ M cyclophosphamide	+	3
	6 μ M mitomycin C	-	3
		-	20
試驗組	試驗物質/培養基混合物	+	3
		-	3
		-	20

(5) 細胞存活率試驗

觀察未添加 S9 酵素條件下 5、2.5、1.25、0.625 及 0.3125 mg/mL 之試驗物質；添加 S9 酵素條件下 5、2.5、1.25、0.625 及 0.3125 mg/mL 之試驗物質於 96 孔盤

中每孔植入約 4.0×10^4 個細胞，皆培養於含 $5 \pm 1\%$ CO_2 之 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 培養箱中培養至隔天，去除培養基後，分別加入陰性對照組、陽性對照組及試驗組之測試溶液，每組實驗均進行三重複。以MTT定量法分析 CHO-K1 細胞是否造成細胞毒性。

$$\text{細胞存活率}\% = \frac{\text{陽性對照組或試驗組之吸光值}}{\text{陰性對照組之吸光值}} \times 100\%$$

(6) 染色體結構異常試驗

於 6 公分 盤中植入約 2.0×10^6 個細胞，於含 $5 \pm 1\%$ CO_2 之 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 培養箱中培養至隔天，去除培養基後，分別加入陰性對照組、陽性對照組及試驗組之測試溶液，每組實驗皆進行二重複。

a. 細胞收集及處理：

加入 Demecolcine 後第 4 小時收集細胞。接著以新鮮配置的 0.56% KCl 使細胞膨脹，再加入新鮮冰固定液 (methanol : galactical acetic acid = 3 : 1) 固定細胞。細胞完成固定後，將細胞輕輕拍散均勻進行滴片，待風乾後以 Diff Quik 套裝染劑染色，並以 Neo-Mount Anhydrous Mounting Medium 封片，最後以顯微鏡進行觀察。

b. 玻片染色體異常觀察：

在 2000 倍顯微鏡下觀察染色體均勻散開，且染色體數目為 18 ~ 22 的細胞，每一重複處理均觀察 100 個分裂中期細胞 (metaphase)。觀察各類異常染色體結構及形態，包括 chromosome 或 chromatid 之 gap 和 break、ring、dicentric、interchange 和 intrachange，並計算出現染色體異常的細胞數目。

(7) 結果判讀

當陽性對照組之染色體異常細胞數目高於 3%，且陰性對照組之染色體異常細

胞數目低於 3% 時，本試驗數據視為有效。當試驗組之染色體異常細胞數目高於 3%，並且出現濃度趨勢反應時，本試驗結果視為陽性反應。



4. 評估雷公根飲品之齶齒類週邊血液微核試驗

(1) 實驗動物及飼養環境

ICR 品系雄性小鼠購自樂斯科生物科技股份有限公司，每籠飼養 5 隻，體重約 28.8 ~ 33.3 g 給予 MF-18 飼料 (Oriental Yeast Co., Ltd, Tokyo, Japan)。飼養條件如動物共同實驗所述。

(2) 識別方法

以打耳號方式進行標記，飼育籠以牌卡標示，分別記載籠號、IACUC 編號、性別、劑量組別與動物號碼，以茲識別。

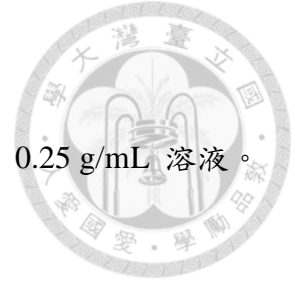
(3) 試驗分組

試驗分為陰性對照組、陽性對照組 (cyclophosphamide, 0.05 g/kg)、低劑量組 (1.25 g/kg)、中劑量組 (2.5 g/kg) 及高劑量組 (5.0 g/kg) 等五組，詳細分組如下：

組別	動物數量	投予物質	劑量	投予體積
陰性對照組	5	RO 水 ^b	-	20 mL/kg
陽性對照組	5	Cyclophosphamide ^a	0.05 g/kg	10 mL/kg
低劑量組	5	試驗物質 ^b	1.25 g/kg	20 mL/kg
中劑量組	5	試驗物質	2.5 g/kg	20 mL/kg
高劑量組	5	試驗物質	5.0 g/kg	20 mL/kg

^aCyclophosphamide：以腹腔注射方式投予

^bRO 水、試驗物質：以餵食針經口餵食



(4) 試驗物質劑量配製

使用 RO 水將試驗物質配製成濃度分別為 0.0625、0.125 及 0.25 g/mL 溶液。

(5) 餵食劑量與觀察

陰性對照物質及試驗物質之投予體積為 20 mL/kg；陽性對照物質之注射體積為 10 mL/kg。試驗時，以不銹鋼餵食針抽取適量的試驗物質，依體重經口餵食每隻試驗小鼠。陰性對照組採用口服投予 RO 水，陽性對照組採用腹腔注射投予 cyclophosphamide。單次投予試驗物質或對照物質後每日觀察動物之臨床症狀，並於投予前及投予後 72 小時測量動物體重。於試驗物質投予後 48 與 72 小時，由小鼠尾靜脈收集 3~4 μ L 血液製備抹片標本。血液置於已預染 acridine orange 的載玻片上，輕輕蓋上蓋玻片，並將血液樣品均勻塗抹至一層血球的厚度。室溫靜置至少 3~4 小時後以螢光顯微鏡觀察血液中網狀紅血球之微核現象是否有增加的情形。

(6) 試驗結果分析

- a. 試驗期間進行臨床症狀觀察，並記錄動物是否有死亡。
- b. 計算網狀紅血球 (Reticulocytes) 數目，以螢光顯微鏡觀察網狀紅血球內會被染成橘紅色螢光，計數每 1,000 個紅血球中網狀紅血球數目。
- c. 計算微核 (Micronucleated reticulocytes) 發生的數目，以螢光顯微鏡計數每 1,000 個橘紅色螢光的網狀紅血球中出現黃綠色螢光之微核的數目。

(7) 結果判讀

各組動物之體重變化、網狀紅血球數及發生微核網狀紅血球數皆利用 SPSS 生物統計軟體中 one-way ANOVA 及 Duncan's multiple range test 進行分析，當 $p < 0.05$ 時表示組間具有顯著性差異。



5. 評估雷公根飲品之大鼠 28 天重複劑量亞急性毒性試驗

(1) 試驗目的

本試驗之目的是測試雷公根飲品經重複給予 28 天後對哺乳類動物可能產生之毒性影響，同時測定無毒性顯示之劑量（No-Observed-Adverse-Effect Level; NOAEL）。

(2) 實驗動物

根據衛生福利部健康食品安全性評估方法，Sprague-Dawley (SD) 品系大鼠為適用於毒性試驗之實驗動物。分別購入 5~6 週齡之 40 隻雄性與 40 隻雌性大鼠，經過至少 1 週檢疫期及至少 5 天之適應期，期間每日進行臨床症狀之觀察，最後經由獸醫師確認健康狀態良好，才用於進行試驗。試驗開始週齡為 7~8 週齡，雌雄大鼠分開飼養，分別以 2 隻一籠，飼養於經高溫高壓滅菌之塑膠製飼育籠並給予 MFG 飼料 (Oriental Yeast Co., Ltd, Tokyo, Japan)。飼養條件如動物共同實驗所述。

(3) 試驗設計

a. 動物分組

動物分組先依臨時編號，將動物稱重後，再按體重大小排序加以編號分組，動物打耳洞方式標記之。

b. 試驗組之識別

各劑量組及對照組飼育籠附上標示卡，標示有關室別、籠號、品系、性別、試驗編號、試驗名稱及試驗期間。

c. 動物數量

每組 20 隻動物，雌雄鼠各半（雌鼠 10 隻、雄鼠 10 隻），共 4 組。



d. 劑量範圍之選定

本試驗係以試驗質凍乾粉末進行測試。每瓶 50 mL 雷公根飲品約可凍乾成 6.6 g 粉末狀檢體。共設置 4 組試驗組，分別為對照組、低、中及高劑量組。低、中及高劑量組大鼠試驗物質投予量分別為 3.3 g/kg、6.6 g/kg 與 9.9 g/kg，為每日建議口服劑量（人體每日 6.6 g/ 60 kg）之 30 倍、60 倍及 90 倍。

詳細分組如下表所示

動物組別	管餵物質	劑量 (g/kg)	投予體積 (mL/kg)	動物數量	
				雄鼠	雌鼠
對照組	逆滲透水	-	20	10	10
低劑量組		3.3	20	10	10
中劑量組	雷公根飲品	6.6	20	10	10
高劑量組		9.9	20	10	10

(4) 試驗物質配製

本產品將以口服方式使用於人體，因此使用口服途徑能反映其使用過程之安全性。試驗期間，每天秤取適量之試驗物質，加入逆滲透水至所需體積，攪拌均勻後配製成濃度分別為 165 mg/mL、330 mg/mL 及 495 mg/mL 之懸浮液。配製完成之試驗物質溶液，限當天使用。以塑膠針筒套上餵食針（12 gauge, 80 mm 長）之方式進行管餵。各劑量組和對照組每日管餵試驗物質或對照物質之總體積為 20 mL/kg。

(5) 檢測項目

a. 臨床症狀觀察

試驗期間每日進行臨床觀察，並記錄投予試驗物質後試驗大鼠是否顯現異常臨床症狀或死亡情形，所有異常臨床症狀與死亡大鼠均須記錄於個別動物臨床觀察紀錄表。



b. 眼睛檢查

眼睛檢查先以肉眼觀察有無外觀之異常，再使用檢眼鏡（ophthalmoscope）檢查眼睛內部構造。所有動物在試驗開始投予前及試驗結束犧牲前一日皆進行眼睛檢查。

c. 體重測定

試驗動物於投予開始前、試驗期間每週量測一次動物體重。

d. 攝食量

試驗期間每週進行 1 次計算，量測方法為體重稱重當日加入定量飼料，一週後結算剩餘飼料量。

e. 尿液分析

於犧牲前一日，將動物置於代謝籠內 16 小時並收集尿液。利用半定量生化驗尿系統分析儀 (Urisys 2400, Roche, Basel, Switzerland) 分析各組大鼠尿液之比重 (specific gravity, SG)、顏色 (color)、蛋白質 (protein)、尿膽素原 (urobilinogen)、酸鹼值 (pH)、酮體 (ketone)、膽紅素 (bilirubin)、葡萄糖 (glucose)、亞硝酸鹽 (nitrite) 及潛血 (occult blood) 反應。將尿液離心後取尿沉渣以顯微鏡檢查其中所含白血球 (white blood cell count, WBC)、紅血球 (red blood cell count, RBC) 及上皮細胞 (epithelial cell, EP) 等細胞種類、尿結晶 (crystals) 及微生物等。

f. 血液學分析

試驗動物於犧牲前經隔夜禁食，以二氧化碳麻醉後經心臟進行血液採樣。血液置於含有EDTA抗凝血管中於室溫下混合均勻，以自動血液分析儀 (Gen.S™, Beckman, Brea, CA, USA) 進行以下之檢測項目：血球容積比 (hematocrit)、血紅素量 (hemoglobin)、紅血球數 (RBC)、白血球數 (WBC)、血小板數 (platelet count)、平均紅血球容積 (mean corpuscular volume, MCV)、平均紅血球血紅素 (mean corpuscular hemoglobin, MCH)、平均紅血球血紅素濃度 (mean corpuscular hemoglobin concentration, MCHC)、淋巴球 (lymphocyte)、嗜中性球 (neutrophil) 及單核球 (monocyte)。另以 sodium citrate 抗凝血管收集血液並以血液凝血酶原分析儀 (CA-1500, Sysmex, Hyogo, Japan) 檢測凝血酶原時間 (prothrombin time)。

g. 血清生化分析

動物經隔夜禁食，以二氧化碳麻醉後經心臟進行血液採樣。血液靜置於室溫待其凝固後，離心分離出血清並以血清生化儀(LX®-20, Beckman) 進行以下之檢測項目：鹼性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP)、麩胺酸胺基轉氨酶 (aspartate aminotransferase, AST)、麩胺酸丙酸轉氨酶 (alanine aminotransferase, ALT)、白蛋白 (albumin)、血總蛋白質 (total protein)、總膽紅素 (total bilirubin)、肌酸酐 (creatinine)、血中尿素氮 (blood urea nitrogen, BUN)、葡萄糖 (glucose)、膽固醇 (cholesterol)、三酸甘油酯 (triglyceride)、磷離子 (phosphorus)、鈣離子 (calcium)、氯離子 (chloride)、鉀離子 (potassium) 及鈉離子 (sodium)。

h. 動物屍體解剖及肉眼病理學檢查

試驗期間，若有動物死亡應盡快進行解剖檢查，並且採集臟器，進一步進行組織病理學檢查。試驗結束後 (試驗第 29 天) 所有存活大鼠，以二氧化碳麻醉後經心臟採血犧牲，並於放血後進行解剖，以肉眼檢查外觀、口腔、顱腔及胸、腹腔內所

有組織及器官，記錄於解剖紀錄表上。採取各試驗組之腦 (brain)、心臟 (heart)、腎臟 (kidney)、肝臟 (liver)、脾臟 (spleen)、腎上腺 (adrenal gland)、睪丸 (testis) 或卵巢 (ovary) 等組織，並將上述組織以 10% 中性福馬林緩衝固定液保存 (各組大鼠睪丸則先以 modified Davidson's solution 固定 24 小時，再以 10% 中性福馬林緩衝固定液保存)。

i. 臟器重量

取下所有存活大鼠的主要器官：腦、心臟、腎臟、肝臟、脾臟、腎上腺、睪丸或卵巢，去除週邊脂肪組織後並分別稱重及記錄上述臟器之絕對重量。另計算各臟器與體重 (試驗第 29 天) 之比值 (organ weight relative body weight ratios)，即臟器相對重量比率 (%) = 臟器重量 (g) ÷ 體重 (g) x 100。

j. 組織病理學檢查

經 10% 中性福馬林溶液固定後之對照組及高劑量組 (9.9 g/kg) 大鼠共 40 隻，將對照組及高劑量組大鼠之腎上腺、腦、心臟、腎臟、肝臟、脾臟、睪丸或卵巢等臟器進行組織病理切片檢查。將完成福馬林溶液固定之腎上腺、腦、心臟、腎臟、肝臟、脾臟、睪丸或卵巢等臟器經粗修後，再經脫水、澄清、石臘浸潤及包埋等步驟處理，製成石臘組織塊，再以石臘組織切片機 (Leica RM 2145, Nussloch, Germany) 切成 5 μm 厚度之組織切片，以 Hematoxylin & Eosin (H&E) 染色，於光學顯微鏡 (Opticphot-2, Nikon, Tokyo, Japan) 觀察各臟器之組織病理變化。

(6) 數據整理與分析

實驗數據以平均值 (mean) 及標準差 (standard deviation, S.D.) 表示。動物之體重、攝食量、臟器重量、血液學分析及血清生化分析等數據，皆利用 SPSS 統計軟體中單因子變異數分析 (OneWay ANOVA) 之 Duncan 檢定法分析各組別間數據之

差異性，並以 p 值小於 0.05 作為顯著差異。



四、動物共同實驗操作步驟

(一) 實驗動物飼養

本研究所採用之動物均飼養於空調的房間，溫度維持在 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ，燈光控制採 12 小時亮 12 小時暗 (09:00 燈亮、21:00 燈暗)，食物與水不予限制。每週測量老鼠體重，實驗結束後比較各組動物體重之變化。

(二) 劑量換算方式

以 FDA 所提供之體表面積換算公式計算 <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm078932.pdf> 利用體表面積方式換算，人體表面積以身高 170 cm，體重 65 kg 為基準，代入 Boyd's 公式， $BSA (\text{m}^2) = 0.003207 \times \text{Height (cm)}^{0.3} \times \text{Weight (grams)}^{(0.07285 - (0.0188 \times \text{LOG (grams)}))}$ ，求出人體表面積約為 1.762 m^2 。倉鼠體表面積則依之公式換算以體重 0.10 kg 為基準， $BSA (\text{m}^2) = 8.99 \times \text{Weight (kg)}^{(0.6899)}/100$ ，求出倉鼠表面積約為 0.019 m^2 。由人體每平方公尺表面積所需劑量，求出倉鼠每公斤體重所需劑量。倉鼠體表面積則以體重 0.08 kg 為基準，求出倉鼠表面積約為 0.016 m^2 。大鼠體表面積則以體重 0.15 kg 為基準，求出大鼠表面積約為 0.025 m^2 。再由人體每平方公尺表面積所需劑量，求出倉鼠或大鼠每公斤體重所需劑量。

(三) 動物犧牲 (sacrifice) 法

禁食 12 小時後以二氧化碳窒息犧牲老鼠。確定老鼠無呼吸心跳開始準備解剖、抽血。

(四) 抽血法

本實驗以針筒自鼠體腹腔大靜脈抽血。使鼠體仰臥腹面朝上，自下 (近尿道出

口處附近) 沿中線向上剪開皮毛層，剪至肋骨下方。再剪開肌肉層，於肋骨下方向左右各剪一刀，使腹腔整個暴露。注意勿剪破橫隔膜，以保持胸腔完整。將腸等翻開並推向右側，使下腔靜脈露出，以鈍頭鑷子小心撕扯 (或以棉花輕拭)，除去包覆下腔靜脈血管之結締組織。將抽血管推到底後與下腔靜脈血管約成 20~30°角，針頭插入血管中緩緩抽出血液，放入未加抗凝血劑之真空管靜置，待有明顯分層出現時，以 $1,750 \times g$ ，離心 15 分鐘，取其上層血清分裝入 eppendorf tube，於 -20°C 冰箱冷凍儲存，待日後分析。

(五) 各項安全性指標之分析

1. 血液與肝組織 TC 測定

使用市售總膽固醇生化分析試劑套組 (CH201, Randox, County Antrim, UK) 分析血液與 TC 含量，操作方法如套組說明書所示。

2. 血液中 HDL-C 含量分析

使用市售高密度脂蛋白膽固醇生化分析試劑套組 (CH203, Randox Laboratories Ltd) 分析血液中 HDL-C 之含量，操作方法如套組說明書所示。

3. 血液中 LDL-C 含量分析

使用市售低密度脂蛋白膽固醇生化分析試劑 (CH1351, Randox Laboratories Ltd) 分析血液 LDL-C 之含量，操作方法如套組說明書所示。

4. 血液中 TG 含量分析

使用市售三酸甘油酯生化分析試劑套組 (TR213, Randox Laboratories Ltd) 分析血液中 TG 含量，操作方法如套組說明書所示。

5. 肝功能分析

使用市售生化試劑分析血液中 aspartate aminotransferase (AST) (AS521, Randox Laboratories Ltd) 及 alanine aminotransferase (ALT) (AL520, Randox Laboratories Ltd) 含量，操作方法如套組說明書所示。



6. 腎功能分析

使用市售生化試劑分析血液中尿酸 (UA233, Randox Laboratories Ltd) 及肌酸酐 (CR510, Randox Laboratories Ltd) 含量，操作方法如套組說明書所示。

7. 電解質平衡狀態

使用市售生化試劑分析血液中鈉 (NA7167, Randox Laboratories Ltd)、鉀 (PT1600, Randox Laboratories Ltd)、鈣 (CA 590, Randox) 及氯 (CL1645, Randox) 的含量，操作方法如套組說明書所示。

(六) 組織病理切片染色 (Hematoxylin-Eosine 染色)

蘇木紫 (hematoxylin) 為嗜鹼性染料，能將細胞核染成紫色；伊紅 (eosine) 為嗜酸性染料，將細胞質染成淡紅色，以進行病理切片之判讀。將切取組織以 10% 中性福馬林浸泡固定，進行石蠟包埋與切片 (3-5 μm /片)。將組織切片置於 superfrost coating slide 上，以 45°C 烘片隔夜。再將切片置於 xylene 中脫蠟 3 次，每次 5 分鐘。隨後依序置入 100%、95%、90%、80%、60% 之乙醇溶液中去除 xylene。滴加 hematoxylin solution 蓋過切片表面約 1 分鐘，以慢速水流洗。滴加 eosine solution，再移至水中水洗，便完成染色。切片再依序浸於 50%、75%、95%、無水之乙醇溶液及 xylene 各約 1 小時以完成脫水。切片滴加 Canada Balsam-Xylene solution，加蓋玻片靜置過夜，完成封片。

(七) 生物統計分析方法

實驗結果以平均值 (mean) \pm 標準偏差 (SD) 表示，採用 SPSS (SPSS Institute, Inc., Chicago, IL, USA) 軟體進行統計分析，以單因子變異數分析 (One-way ANOVA) 比較各組間之差異，再以鄧肯式分析法 (Duncan's tests) 作顯著性差異之比較，分別以不同符號表示 $p < 0.05$ 。



第肆章 結果與討論

第一部份 探討紅麴山藥與藥物併用對降血脂、血壓、血糖之功效及對引發橫紋肌溶解症之風險評估。

一、RMD 與降血脂藥物併用對高血脂倉鼠降血脂之功效及其對生理之影響

(一) 實驗動物體重與攝食量之變化:

實驗動物經由 4 週之正常飲食與高血脂飲食誘導後，進行 8 週之正式動物實驗。試驗期間之體重與攝食量分別如表 4.1 與表 4.2 所示。由結果可知各組實驗動物在試驗過程中，體重與攝食量均隨著時間而正常增加，且試驗期間各組實驗動物之外觀與健康情況，均相當良好並無明顯差異。

(二) RMD 對血脂濃度變化情形

以 *Monascus purpureus* NTU 568 發酵所得的 RMD 進行動物實驗，血液中 TC 與 TG 之變化如表 4.3 所示，先以正常飲食與高血脂飲食預養 4 週後，再連續 8 週分別給予正常飲食與高血脂飲食飼料，血液中 TC 濃度正常飲食之 C 組為 110.5 mg/dL，高膽固醇飲食之 HC 組顯著提高至 227.6 mg/dL，證明高膽固醇飲食的 HC 組其血液中 TC 濃度顯著提高，可做為高膽固醇的實驗動物模式。一般飼料添加 RMD 試驗組：C-1R 組 (RMD 1 倍劑量組)、C-5R 組 (RMD 5 倍劑量組) 經 8 週飼養，C-1R 與 C-5R 組 週時 TC 濃度分別為 108.0 mg/dL 與 102.3 mg/dL，均無顯著低於對照組 ($p < 0.05$)。高膽固醇飲食添加 RMD 試驗組：HC-1R 組 (RMD 1 倍劑量組) 與 HC-5R 組 (RMD 5 倍劑量組) 的血液中 TC 濃度，第八週時分別較高膽固醇飲食組 (HC 組) 顯著降低 30.5 % 與 31.0 % ($p < 0.05$)。

HC-L 組為含降膽固醇藥物 lovastatin 的飲食組，lovastatin 為文獻中已確定具有降低 TC 效果的藥物，且已經正式上市，商品名為 Lozutin，在本研究做為降膽固醇效果的指標，RMD 與藥物試驗組：HC-1RL 組 (RMD 1 倍劑量加 lovastatin 組)、HC-5RL 組 (RMD 5 倍劑量加 lovastatin 組) 與 HC-L 組 (lovastatin 組) 血液中

表 4.1、各組實驗動物之平均體重。

Table 4.1. The body weight of experimental hamster

Group	Body weight (g)								
	0th	1	2	3	4	5	6	7	8
(weeks)									
C	89.9±0.8	94.5±0.8	99.4±0.7	105.2±1.4	109.6±1.1	114.1±1.2	118.6±1.2	122.2±1.2	126.3±1.4
C-1R	89.5±0.5	92.8±0.6	97.1±0.5	103.9±0.8	108.4±0.5	113.8±0.8	118.2±0.7	122.3±1.1	126.9±1.3
C-5R	90.1±0.6	94.4±0.6	99.1±0.6	104.0±0.7	107.8±0.8	112.3±1.5	116.3±1.5	120.3±1.6	124.3±3.1
HC	90.4±0.6	94.5±0.5	98.1±1.1	101.7±1.4	107.0±2.0	112.0±3.3	118.0±3.6	121.0±3.0	126.0±2.4
HC-1R	91.2±0.5	94.8±0.4	99.2±0.7	104.3±1.1	108.6±0.6	113.1±1.2	116.1±1.2	119.8±0.5	124.9±0.5
HC-5R	90.5±0.7	94.3±0.8	98.3±0.8	102.4±1.6	106.7±1.8	111.5±2.1	115.2±2.3	120.2±1.6	125.2±1.6
HC-L	90.5±1.1	94.8±0.9	99.5±1.1	103.8±1.3	108.1±1.7	112.6±1.7	117.9±1.5	122.5±1.2	127.6±1.2
HC-1RL	91.4±0.5	94.8±0.5	99.1±0.5	102.9±1.1	106.0±2.0	110.3±2.1	115.2±2.1	118.9±2.1	124.1±1.4
HC-5RL	91.5±0.8	94.7±1.0	99.1±0.7	103.9±0.2	108.1±0.7	112.5±1.0	116.9±1.1	121.6±1.1	126.7±1.3

Two groups of the hamsters were fed a normal diet (the C group) or a high cholesterol diet (the HC group) without the administration of test materials, respectively. The other hamsters were administrated with lovastatin (the HC-L group), a 1-fold dose of RMD (22.96 mg/kg/day including 15 mg of monascin) (the C-1R group), and a 5-fold dose of RMD (114.8 mg/kg/day including 75 mg of monascin) (the C-5R group), a 1-fold dose of RMD (22.96 mg/kg BW per day including 15 mg of Monascins) and high cholesterol diet (the HC-1R group), a 5-fold dose of RMD (114.8 mg/kg BW per day including 75 mg of monascins) and high cholesterol diet (the HC-5R group), lovastatin (1.66 mg/kg BW per day) and high cholesterol diet (the HC-L group), a 1-fold dose of RMD (22.96 mg/kg BW per day including 15 mg of Monascins), lovastatin (1.66 mg/kg BW per day) and high cholesterol diet (the HC-1RL group); a 5-fold dose of RMD (114.8 mg/kg BW per day including 75 mg of Monascins), lovastatin (1.66 mg/kg BW per day) and high cholesterol diet (the HC-5RL group). Each value is expressed as mean ± SD (n = 8). * Significantly different ($p < 0.05$) vs. the normal group. # Significantly different ($p < 0.05$) vs. the hyperlipidemia group.

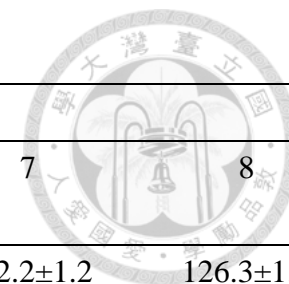
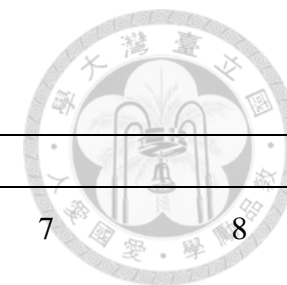


表 4.2、各組實驗動物之每日平均飼料攝食量。

Table 4.2 The daily intake of experimental hamster



Group	Daily feed intake (g/day)								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8
(weeks)									
C	5.2±0.2	5.8±0.4	6.1±0.4	6.2±0.5	6.6±0.6	6.6±0.6	6.9±0.4	7.1±0.3	7.2±0.3
C-1R	5.4±0.3	5.6±0.2	6.2±0.3	6.1±0.6	6.8±0.5	6.7±0.5	6.7±0.2	7.2±0.2	7.5±0.5
C-5R	5.6±0.2	5.4±0.4	5.9±0.6	5.9±0.4	6.7±0.8	6.9±0.4	6.8±0.5	6.9±0.4	7.3±0.4
HC	5.8±0.1	5.6±0.4	5.8±0.5	6.3±0.5	6.5±0.6	6.5±0.5	6.6±0.3	7.2±0.6	7.4±0.3
HC-1R	5.4±0.2	5.4±0.5	5.7±0.6	5.8±0.4	6.5±0.4	6.8±0.8	6.9±0.4	6.8±0.5	7.2±0.6
HC-5R	5.6±0.4	5.5±0.3	5.9±0.4	5.6±0.8	6.9±0.6	6.9±0.4	6.5±0.6	6.7±0.4	7.5±0.5
HC-L	5.3±0.5	5.6±0.3	6.1±0.4	5.8±0.5	6.8±0.7	6.8±0.5	6.9±0.3	6.9±0.4	7.5±0.4
HC-1RL	5.4±0.4	5.6±0.5	5.8±0.3	5.7±0.6	6.8±0.5	6.5±0.6	6.8±0.4	6.8±0.3	7.6±0.4
HC-5RL	5.3±0.3	5.4±0.4	5.9±0.6	5.9±0.7	6.9±0.8	6.7±0.4	6.8±0.5	7.1±0.2	7.3±0.5
HC-S	5.2±0.3	5.5±0.5	5.8±0.3	5.8±0.5	6.9±0.6	6.9±0.4	6.7±0.3	6.9±0.2	7.4±0.3
HC-1RL	5.5±0.1	5.4±0.2	6.1±0.4	5.9±0.2	6.7±0.4	6.6±0.5	6.9±0.5	6.9±0.5	7.3±0.4
HC-5RL	5.4±0.2	5.3±0.3	5.8±0.2	5.9±0.7	6.8±0.5	6.5±0.3	6.8±0.4	6.9±0.2	7.2±0.3

1. Abbreviation meaning of each group is shown in Table 4.1.

2. Data are presented as means ± SD (n=8). Mean values within each column with different superscripts are significantly different (p<0.05)

表 4.3、餵食不同劑量紅麴山藥對於倉鼠血液中總膽固醇、三酸甘油酯、高密度脂蛋白膽固醇與低密度脂蛋白膽固醇濃度之影響。

Table 4.3 Effect of red mold dioscorea powder on experimental hamster performance in terms of serum triglyceride, serum cholesterol, HDL, and LDL levels

Groups	TG	TC	HDL-C	LDL-C	TC/HDL-C	LDL-C/HDL-C
	(mg/dL)					
C	171.8 ± 9.1 [#]	110.5 ± 4.6 [#]	59.6 ± 1.2 [#]	22.7 ± 3.2 [#]	1.8 ± 0.1	0.38 ± 0.05
C-1R	142.1 ± 6.8 [*]	108.0 ± 3.3	68.4 ± 3.3 [*]	20.0 ± 1.6	1.7 ± 0.2	0.29 ± 0.02 [*]
C-5R	127.1 ± 4.9 [*]	102.3 ± 9.2	70.8 ± 2.0 [*]	19.0 ± 2.6	1.8 ± 0.1	0.27 ± 0.03 [*]
HC	355.6 ± 8.5 [*]	227.6 ± 6.4 [*]	90.4 ± 5.4 [*]	34.7 ± 2.3 [*]	1.8 ± 0.1	0.38 ± 0.01
HC-1R	288.7 ± 8.7 ^{#*}	158.2 ± 9.9 ^{#*}	100.7 ± 4.6 [*]	27.8 ± 2.8 [#]	1.5 ± 0.1	0.28 ± 0.02 [#]
HC-5R	253.6 ± 9.2 ^{#*}	157.1 ± 9.7 ^{#*}	101.7 ± 4.8 [*]	26.8 ± 1.4 [#]	1.8 ± 0.1	0.26 ± 0.02 [#]
HC-L	320.8 ± 8.6 [*]	174.6 ± 5.5 ^{#*}	93.9 ± 3.9 [*]	30.0 ± 1.4 [#]	1.7 ± 0.1	0.32 ± 0.01
HC-1RL	237.2 ± 5.9 ^{#*}	158.2 ± 9.7 ^{#*}	102.2 ± 4.3 [*]	27.0 ± 2.3 [#]	1.7 ± 0.1	0.26 ± 0.01 [#]
HC-5RL	208.5 ± 7.5 ^{#*}	157.2 ± 9.9 ^{#*}	106.4 ± 7.5 [*]	26.0 ± 2.1 [#]	1.7 ± 0.1	0.24 ± 0.02 [#]

1. Abbreviation meaning of each group is shown in Table 4.1.

2 TG: triacylglycerol; TC: Total cholesterol; HDL-C: High density lipoprotein cholesterol; LDL-C: Low density lipoprotein cholesterol.

3. Each value is expressed as mean ± SD (n = 8). * Significantly different ($p < 0.05$) vs. the normal group. # Significantly different ($p < 0.05$) vs. the hyperlipidemia group.

TC 濃度，於第八週時分別較高膽固醇飲食組 (HC 組) 顯著降低 30.5%、30.9% 與 23.3% ($p < 0.05$)。

血液中 TG 分析結果，HC 組其 TG 較 C 組顯著提高 ($p < 0.05$)，血液中 TG 高達 355.6 mg/dL。RMD 連續餵食八週後，HC-1R 與 HC-5R 組 TG 濃度較 HC 組顯著降低 18.8% 與 28.7% ($p < 0.05$)。與 lovastatin 藥物併用下，HC-1RL 與 HC-5RL 組連續八週的 RMD 與藥物併用餵食後，血液中 TG 濃度均顯著低於 HC 組，HC-1RL 組、HC-5RL 組與 HC-L 組於第八週時 TG 濃度分別較 HC 組顯著降低 33.3%、41.4% 與 9.8% ($p < 0.05$)，證明 RMD 確實具有降低血液 TC 及 TG 的效果。

血液中 HDL-C 分析之結果，HC 組於第八週之 HDL-C 會顯著高於 C 組。這是因為 HDL-C 與 LDL-C 皆為膽固醇，在高膽固醇飲食之倉鼠，血液中 HDL-C 與 LDL-C 均較正常飲食組顯著提高。由表 4.3 可得知正常飲食組中餵食 RMD 者與 C 組相比皆可以提升 HDL-C 濃度具有顯著差異 ($p < 0.05$)。在高膽固醇飲食組，HC-1R 組、HC-5R 組確實具有降低血液中 TC 與 TG 的效果，可知 RMD 試驗組主要降低的膽固醇為 LDL-C，且餵食 RMD 第八週之 HDL-C 並未因為 TC 的降低而減少；相反地，於第八週餵食 1 倍及 5 倍 RMD 劑量之 HC-1R 組與 HC-5R 組，其 HDL-C 濃度與 HC 組雖無顯著差異，但 HDL-C 濃度有增加的情形。在 LDL-C 方面，HC 組於第八週 LDL-C 濃度均顯著高於正常飲食組 (C 組)。而 1 倍劑量以上之 RMD 試驗組，其 LDL-C 濃度皆顯著低於 HC 組 ($p < 0.05$)。HC-1R 組與 HC-5R 組餵食 RMD 有顯著降低 LDL-C 的效果，HC-5R 組之降幅可達 22.8%。LDL-C 為造成動脈粥狀硬化等心血管疾病的主要成分，RMD 可有效的降低血液中的 LDL-C 濃度，以減低心血管疾病的發生率。

LDL-C/HDL-C 的比值為另一評儉血脂功效之指數，當比值愈低時則表示 HDL-C 的含量在 TC 中所含的比例較高，相對地，可能易形成心血管疾病的 LDL-C 的含量則較低。HC 組於第八週時 LDL-C/HDL-C 的比值升高至 0.38，餵食 RMD 粉末的 HC-1R 組與 HC-5R 組的 HDL-C 的含量皆有增加的趨勢，且 LDL-C 濃度亦

有明顯地下降。HC-1RL 組、HC-5RL 組之 RMD 試驗組於餵食 RMD 粉末後，其 LDL-C 濃度皆顯著低於 HC 組 ($p < 0.05$)。HC-1RL 組與 HC-5RL 組於第八週時具有顯著降低 LDL-C 的效果，且降幅可達 22.2%。與單純服用 lovastatin 藥物 HC-L 組比較，lovastatin 主要是降低血液中的 LDL-C 濃度 (降幅達 13.5%)，但對提升血液中的 HDL-C 濃度，經過八週的餵食只提昇了 3.7%。由統計結果發現餵食 1 倍與 5 倍劑量之 RMD 試驗組其 LDL-C/HDL-C 的比值與 HC 組比較皆顯著下降 ($p < 0.05$)。RMD 與 lovastatin 藥物併用八週後 RMD 與藥物試驗組：HC-1RL 組、HC-5RL 組與 HC-L 組具有降低血液中 TC 與 TG 的效果，且餵食 RMD 第八週之 HDL-C 並未因為 TC 的降低而減少；相反地，於第八週與 lovastatin 藥物併用餵食 1 倍及 5 倍 RMD 劑量之 HC-1RL 組、HC-5RL 組與 HC-L 組之 HDL-C 濃度與 HC 組雖無顯著差異，但 HDL-C 濃度有增加的情形。不管是單純服用 RMD 或是 RMD 與藥物一起併用，由結果得知，效果都明顯的比只服用藥物顯著的降低血液中之 LDL-C 濃度且提升了血液中之 HDL-C 濃度。

(三) 實驗動物肝臟中 TC 與 TG 濃度之變化

實驗動物肝臟中 TC 與 TG 濃度如圖 4.1 所示，HC 組於第八週時，TC 與 TG 濃度會顯著高於 C 組，而正常組服用 RMD 粉末 C-1R 組與 C-5R 組分別降低肝臟中 TC 5.9% 與 8.9%，TG 降低 11.6% 與 17.5% ($p < 0.05$)。高膽固醇飲食 RMD 試驗組 HC-1R 組、HC-5R 組、HC-L 組、HC-1RL 組與 HC-5RL 組皆可使肝臟中 TC 與 TG 濃度顯著下降 ($p < 0.05$)。在 TC 下降幅度分別為 14.5~32.6% ($p < 0.05$)。在 TG 下降幅度分別為 8.4%、15.0%、16.2%、21.2% 與 24.0% ($p < 0.05$)。

(四) 安全性分析—血液肝指數變化及肝功能檢測

由於大多數市售紅麴產品中都含有 citrinin，而 citrinin 又為肝腎毒素，會造成人

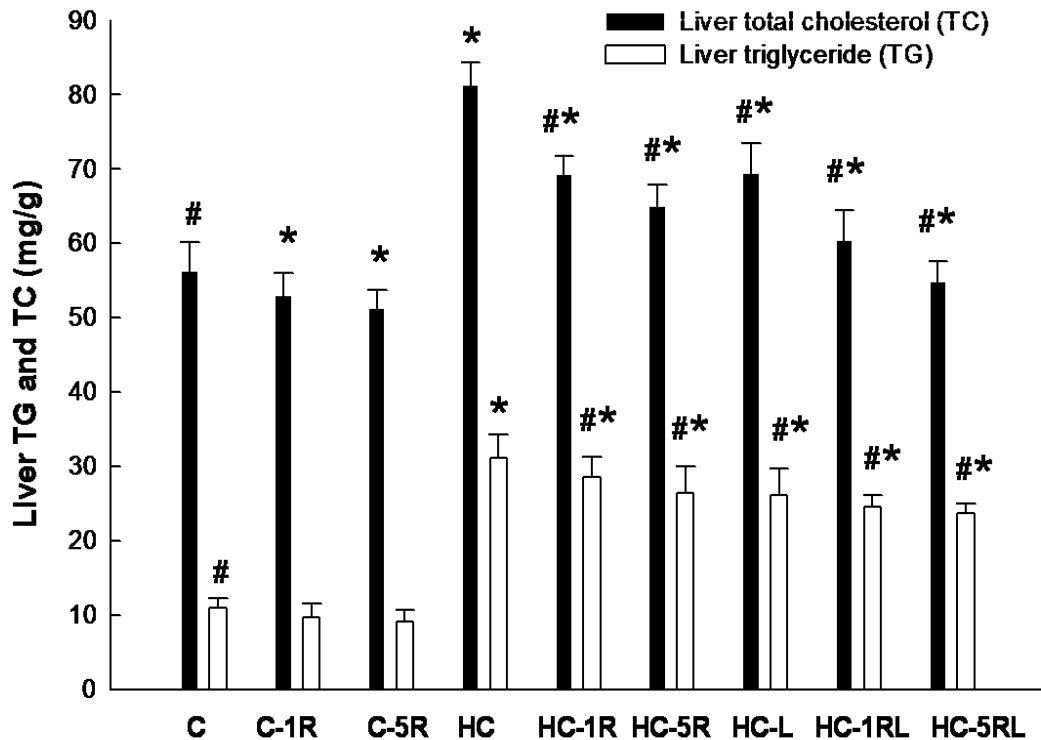


圖 4.1、餵食不同量紅麴山藥對於倉鼠肝臟中總膽固醇與三酸甘油酯濃度之影響

Fig. 4.1. Effect of red mold dioscorea powder on experimental hamster performance in terms of liver total cholesterol (■) and triglyceride (□) levels.

Two groups of the hamsters were fed a normal diet (the C group) or a high cholesterol diet (the HC group) without the administration of test materials, respectively. The other hamsters were administrated with lovastatin (the HC-L group), a 1-fold dose of RMD (22.96 mg/kg/day including 15 mg of monascin) (the C-1R group), and a 5-fold dose of RMD (114.8 mg/kg/day including 75 mg of Monascin) (the C-5R group), a 1-fold dose of RMD (22.96 mg/kg BW per day including 15 mg of Monascins and 0.03 mg citrinin) and high cholesterol diet (the HC-1R group), a 5-fold dose of RMD (114.8 mg/kg BW per day including 75 mg of Monascins and 0.15 mg citrinin) and high cholesterol diet (the HC-5R group), lovastatin (1.66 mg/kg BW per day) and high cholesterol diet (the HC-L group), a 1-fold dose of RMD (22.96 mg/kg BW per day including 15 mg of Monascins and 0.03 mg citrinin), lovastatin (1.66 mg/kg BW per day) and high cholesterol diet (the HC-1RL group); a 5-fold dose of RMD (114.8 mg/kg BW per day including 75 mg of Monascins and 0.15 mg citrinin), lovastatin (1.66 mg/kg BW per day) and high cholesterol diet (the HC-5RL group). Each value is expressed as mean \pm SD (n = 8). * Significantly different ($p < 0.05$) vs. the normal group. # Significantly different ($p < 0.05$) vs. the hyperlipidemia group.

體肝腎損傷。基於紅麴產品的食用安全，本研究以血液肝指數 AST 與 ALT 評估 RMD 之食用安全性。AST、ALT 原存在於肝細胞中，肝細胞壞死時，才會釋放至血液中。

經四週之高血脂飲食預養後，再進行八週之正式動物實驗，由表 4.4 結果得知，正常組及餵食 RMD 之試驗組並未使 AST 與 ALT 值顯著增加。八週高膽固醇飲食組的 HC 組、HC-1R 組、HC-5R 組、HC-L 組、HC-1RL 組與 HC-5RL 組，其 AST 與 ALT 顯著提高，探究其原因可能是高膽固醇飲食引起肝臟代謝負擔太重，而使 AST 與 ALT 的濃度提高。在 RMD 與藥物併用下顯著降低 AST 與 ALT 濃度。有研究曾指出 RMD 發酵產物具有護肝的效果，日本學者發現某些 *M. anka* 菌株可增加 glutathione-s-transferase 及 aspartate aminotransferase 活性，降低化學藥劑引起之肝損傷，具有保護肝臟的效果 (Aniya *et al.*, 1998)。此外，亦有研究指出以 0.2~0.8 g/day 的 RMD 餵食經誘導而引起高膽固醇血症的兔子，結果顯示，除了可降低動脈粥狀硬化的形成，亦可改善肝臟硬化與肝腫大 (hepatomegaly) 的程度 (Li *et al.*, 1998)。鹼性磷酸酶 (Alk-P; alkaline phosphatase) 和麩胺醯轉移酶 (γ -GT; gamma-glutamyl transpeptidase) 為與膽道有關的酵素，Alk-P 除了存在於肝膽亦可來自骨骼、小腸及胎盤 (懷孕)。 γ -GT 亦來自心肌、胰臟、腎臟及腦。兩種酵素都上升，表示發生了膽汁排泄障礙或肝浸潤的病變 (Chen *et al.*, 1997)。如果只有 Alk-P 值上升，可能有骨骼病變，發育中的青少年 Alk-P 值會因為骨骼正在發育而上升，如果只有 γ -GT 值上升，可能有酒精性或藥物性肝病 (Stole *et al.*, 1994)。由表 4.4 及表 4.5 得知，不論是正常組或是高血脂組，Alk-P 並無明顯異常變化，也就是說服用 RMD 或是 RMD 與藥物併用皆不會造成骨骼病變，但是 γ -GT 高血脂組與正常組則有顯著差異 ($p < 0.05$)。有研究報導指出在高血脂飼料，會對肝、腎代謝上造成負擔而影響其生理功能，故應為高血脂飲食所造成 (Reeves, 1977)。所以不管是正常組或是高血脂組在服用 RMD 或是 RMD 與藥物併用下， γ -GT 皆未異常上升反而是下降。綜合上述血液肝指數及肝功能檢測結果，*M. purpureus* NTU 568 發酵之 RMD 對實驗動物肝臟無病變發生且對其機能無影響。

表 4.4、餵食不同量紅麴山藥倉鼠血液中天門冬胺酸轉胺酶、丙胺酸轉胺酶、鹼性磷酸酶與總蛋白量之影響

Table 4.4. Effect of red mold dioscorea powder on experimental hamster performance in terms of serum AST, ALT, alkaline phosphatase, and total protein levels

Groups	AST	ALT	Alkaline phosphatase	Total protein
	(U/L)	(U/L)	(IU/L)	(g/dL)
C	52.6 ± 5.1 [#]	89.5 ± 6.0 [#]	126.1 ± 4.4 [#]	7.1 ± 0.1
C-1R	53.7 ± 7.1	86.8 ± 7.5	116.1 ± 6.9	7.1 ± 0.1
C-5R	50.7 ± 2.6	87.1 ± 4.2	121.8 ± 8.6	7.0 ± 0.2
HC	128.5 ± 3.7 [*]	122.0 ± 2.7 [*]	104.2 ± 7.6	7.4 ± 0.1 [*]
HC-1R	108.5 ± 4.2 [*]	101.1 ± 4.2 ^{#*}	102.7 ± 6.7	7.3 ± 0.1
HC-5R	117.3 ± 4.0 [*]	102.2 ± 3.2 ^{#*}	105.0 ± 6.2	7.3 ± 0.2
HC-L	95.5 ± 3.4 ^{#*}	115.6 ± 4.4 [*]	116.3 ± 4.1	7.2 ± 0.2
HC-1RL	83.8 ± 5.1 ^{#*}	78.5 ± 6.4 ^{#*}	95.3 ± 5.0 [#]	7.4 ± 0.3
HC-5RL	89.6 ± 3.3 ^{#*}	82.6 ± 5.3 ^{#*}	108.7 ± 5.7	7.6 ± 0.2 [*]

1 Abbreviation meaning of each group is shown in Table 4.1.

2 AST: aspartate transaminase; ALT: alanine transaminase.

3 Each value is expressed as mean ± SD (n = 8). * Significantly different ($p < 0.05$) vs. the normal group. # Significantly different ($p < 0.05$) vs. the hyperlipidemia group.

表 4.5、餵食不同量紅麴山藥對於倉鼠血液中白蛋白、球蛋白與 γ -麩胺醯轉移酶之影響

Table 4.5. Effect of red mold dioscorea powder on experimental hamster performance in terms of serum albumin, globulin, and γ -GT levels

Groups	Albumin	Globulin	\square γ GT	AG ratio
	(g/dL)			
C	3.75 \pm 0.05	3.30 \pm 0.07	3.66 \pm 0.54 [#]	1.14 \pm 0.05
C-1R	3.79 \pm 0.06	3.30 \pm 0.11	3.25 \pm 0.66	1.15 \pm 0.05
C-5R	3.79 \pm 0.08	3.26 \pm 0.10	3.50 \pm 0.83	1.16 \pm 0.05
HC	3.75 \pm 0.09	3.66 \pm 0.07	8.58 \pm 0.33 [*]	1.02 \pm 0.05 [*]
HC-1R	3.80 \pm 0.05	3.54 \pm 0.09	7.54 \pm 0.86 ^{#*}	1.07 \pm 0.03
HC-5R	3.79 \pm 0.08	3.54 \pm 0.19	7.39 \pm 0.83 ^{#*}	1.07 \pm 0.07
HC-L	3.75 \pm 0.07	3.44 \pm 0.12	8.16 \pm 0.90 [*]	1.09 \pm 0.05
HC-1RL	3.81 \pm 0.08	3.46 \pm 0.14	7.23 \pm 0.16 ^{#*}	1.10 \pm 0.03
HC-5RL	3.93 \pm 0.04	3.71 \pm 0.13	8.09 \pm 0.53 [*]	1.06 \pm 0.03

1 Abbreviation meaning of each group is shown in Table 4.1.

2 γ -GT: gamma glutamyl transpeptidase.

3 Each value is expressed as mean \pm SD (n = 8). * Significantly different ($p < 0.05$) vs. the normal group. # Significantly different ($p < 0.05$) vs. the hyperlipidemia group.

(五) 安全性分析—腎功能、電解質與橫紋肌溶解症

尿素氮在腎臟的絲球體過濾後排泄到尿中，如果腎臟的排泄機能變差，血液中尿素氮的濃度會增加。因此，尿素氮就成為瞭解腎臟機能是否正常的重要指標。而血液中肌酸酐 (creatinine) 為觀察腎功能是否正常之重要指標，肌酸酐的值愈高，腎臟的障礙愈大。

鈉是體內最重要的細胞外陽離子，對維持體液的滲透壓及調節水份的平衡影響重大。鉀是人體細胞內最重要的陽離子，直接影響肌肉收縮及神經傳導的功能，其在血漿中的濃度是靠腎臟的排泄來調節的。由表 4.6 得知不管是正常組或高膽固醇組的肌酸酐，各組之間並無顯著差異。RMD與藥物併用組或是藥物組之尿素氮則有顯著的差異 ($p < 0.05$)，其他各組則無差異。正常飲食組與高膽固醇飲食組之鈉離子，各組之間並無顯著差異 ($p < 0.05$)，鉀離子則只有 HC 組有顯著差異，其他各組則無顯著差異 ($p < 0.05$)，此結果說明高膽固醇飲食，對於腎臟會造成額外負擔，服用RMD或RMD 與藥物併用下，對腎臟代謝或是生理功能並未明顯增加其負擔。

橫紋肌溶解症指的是骨骼肌 (橫紋肌) 產生了急速的損傷，肌肉損傷的結果會導致肌肉細胞的壞死及細胞膜的破壞，肌肉的蛋白質及肌球蛋白 (myoglobin) 便會進入血液中並隨後出現在尿中。尿中出現肌球蛋白的狀況稱為肌球蛋白尿。當肌肉遭受損傷時，肌肉中的酵素也會釋放到血中，其中最常運用的檢查就是肌酸激 (creatinephospho kinase; CPK)，在產生橫紋肌溶解症時，CPK 值會高達數千或甚至上萬。表 4.6 中說明倉鼠餵食高膽固醇飲食或正常飲食，服用 1-5 倍劑量的RMD或RMD 與藥物併用血清 CPK 值並無顯著增加。

表 4.6、餵食不同量紅麴山藥對於倉鼠血液中尿素氮、肌酸酐、尿酸、鈉、鉀與肌酸激酶之影響

Table 4.6. Effect of red mold dioscorea powder on experimental hamster performance in terms of serum BUN, creatinine, uric acid, sodium, potassium and creatinine phosphokinase levels

Groups	BUN	Creatinine	Uric acid	Sodium	Potassium	Creatinine phosphokinase
	(mg/dL)			(meq/L)		(U/L)
C	24.1±1.4	0.24±0.05	4.1±0.7	144.3±0.5	9.8±0.5	350.13±30.0
C-1R	22.9±1.2	0.21±0.03	3.9±1.2	145.2±0.4	10.3±0.6	345.75±38.5
C-5R	22.7±0.8	0.23±0.04	3.5±0.7	144.2±0.7	10.6±0.5	349.88±34.9
HC	24.1±0.5	0.25±0.05	3.9±1.2	141.9±0.3	11.9±0.4*	344.00±32.4
HC-1R	21.4±1.8	0.29±0.03	5.7±0.8 [#]	143.1±0.8	10.6±1.1	349.38±36.0
HC-5R	20.6±1.7	0.29±0.03	6.1±0.9 [#]	141.3±0.9	10.6±1.2	362.50±38.9
HC-L	19.9±0.8 [#]	0.18±0.04	3.9±0.8	142.6±0.7	10.5±0.7	371.13±39.3
HC-1RL	18.9±2.5 [#]	0.21±0.03	5.2±0.8 [#]	142.2±1.9	10.5±1.1	366.38±41.0
HC-5RL	17.5±0.8 [#]	0.26±0.05	6.4±1.8 [#]	142.9±0.8	10.4±0.5	349.38±44.7

1 Abbreviation meaning of each group is shown in Table 1.

2 Each value is expressed as mean ± SD (n = 8). * Significantly different ($p < 0.05$) vs. the normal group. # Significantly different ($p < 0.05$) vs. the hyperlipidemia group.

二、 RMD 產品與降血糖藥物併用對糖尿病大鼠血糖及其對生理之影響

(一) 實驗動物體重與攝食量之變化

實驗動物經由四週之正常飲食與高血脂飲食預養後，進行八週之正式動物實驗。試驗期間之體重、攝食量與飲水量分別如圖 4.2 所示，糖尿病的症狀是三多（多吃、多喝、多尿）與體重減輕。由結果可知 STZ 誘導的大鼠的體重低於其它各組（圖 4.2A）。8 週後餵 RMD，STZ 誘導的大鼠每天的食物和水的攝入量均高於其他各組（圖 4.2B 和 4.2C）。

(二) 葡萄糖耐受性測試結果

口服葡萄糖耐量實驗 (oral glucose tolerance test, OGTT) 是檢查體內血糖調節功能的一種方法。根據美國糖尿病學會的標準，如果 30、60、90 分鐘分別測得血糖值高於 200 mg/dL，120 分鐘後測得的血糖，也超過此數值時，即可判定為罹患糖尿病。於實驗開始後第二週進行葡萄糖耐受性測試，投予每隻大白鼠 2 g/kg 葡萄糖，並於灌食後第 0、30、60、90、120、150 與 180 分鐘抽尾部靜脈血液，測定血糖濃度，第二、四、六與八周的 OGTT 血糖變化結果如圖 4.3。由結果顯示糖尿病組 OGTT 各時間點血糖濃度，皆較正常組明顯升高 ($p < 0.05$)；正常組與糖尿病各組各周試驗結果中，不論是餵食 RMD 或是 RMD 與藥物併用，各組與其對照組在 OGTT 結果均顯示有差異，各組皆隨著餵食時間的增加，血液中的血糖濃度隨之下降。RMD 或 RMD 與藥物併用組在餵食 4、6、和 8 週後血糖濃度有顯著改善（圖 4.3B、4.3C 和 4.3D）。第 8 週，OGTT 180 分鐘試驗結果，DC 組的血液葡萄糖含量為 452 mg/dL，顯著高於 NC 組（120 mg/dL）。RMD，RMD 藥物併用之各劑量組或藥物組，血液中的葡萄糖濃度顯著降低 8.2-13.3%，14.4-19.9% 和 10.0% ($p < 0.05$ ，圖 4.3）。

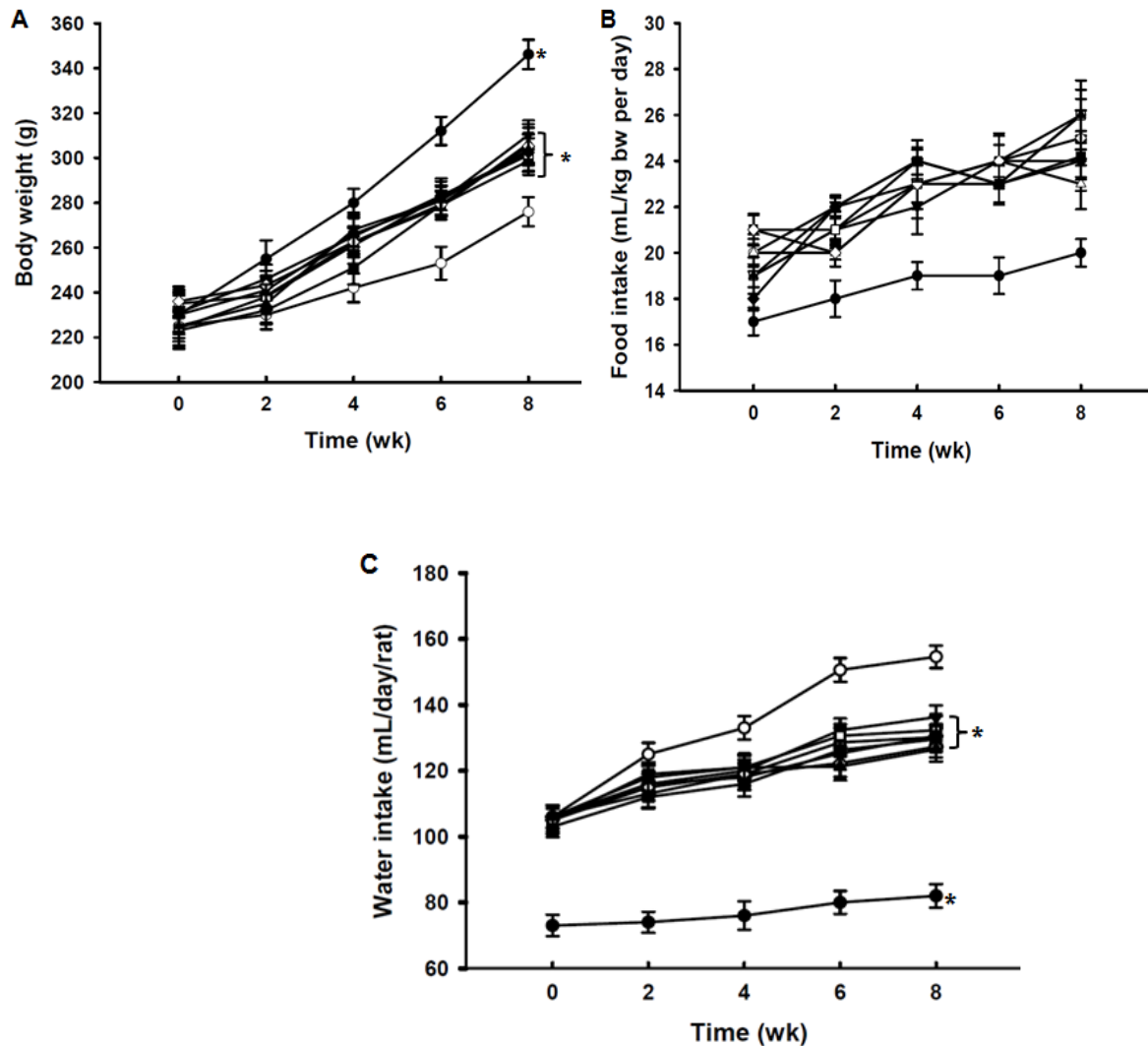


圖 4.2、餵食不同量紅麴山藥對於糖尿病大鼠體重、攝食量與飲水量之影響

Fig. 4.2. Effect of single oral administration of RMD on (A) body weight, (B) food intake, and (C) water intake in experimental STZ-induced diabetic rats.

Sprague-Dawley rats fed a normal diet without the administration of RMD were used as control group (the C group; ●). The diabetes rats were fed a normal diet without the administration of RMD (the DC group; ○). The other diabetes rats were administrated with 1-fold dose of RMD (the D1R group; 176 mg/kg bw per day including 1.2 mg monascin; ▼), a 2-fold dose of RMD (the D2R group; 352 mg/kg bw per day including 2.4 mg of monascin; △), and a 5-fold dose of RMD (the D5R group; 880 mg/kg bw per day including 6.0 mg of monascin; ■), DM group (□), a positive control group, was orally given pioglitazone 2.6 mg/kg bw daily. D1RM (◆), D2RM (◇) and D5RM (▲) were fed the normal diet and orally given pioglitazone (2.6 mg/kg bw daily) with a 1-fold, a 2-fold or a 5-fold dose of RMD, respectively. Each value is expressed as mean ± SD (n = 9). * Significantly different (p < 0.05) vs. the DC group.

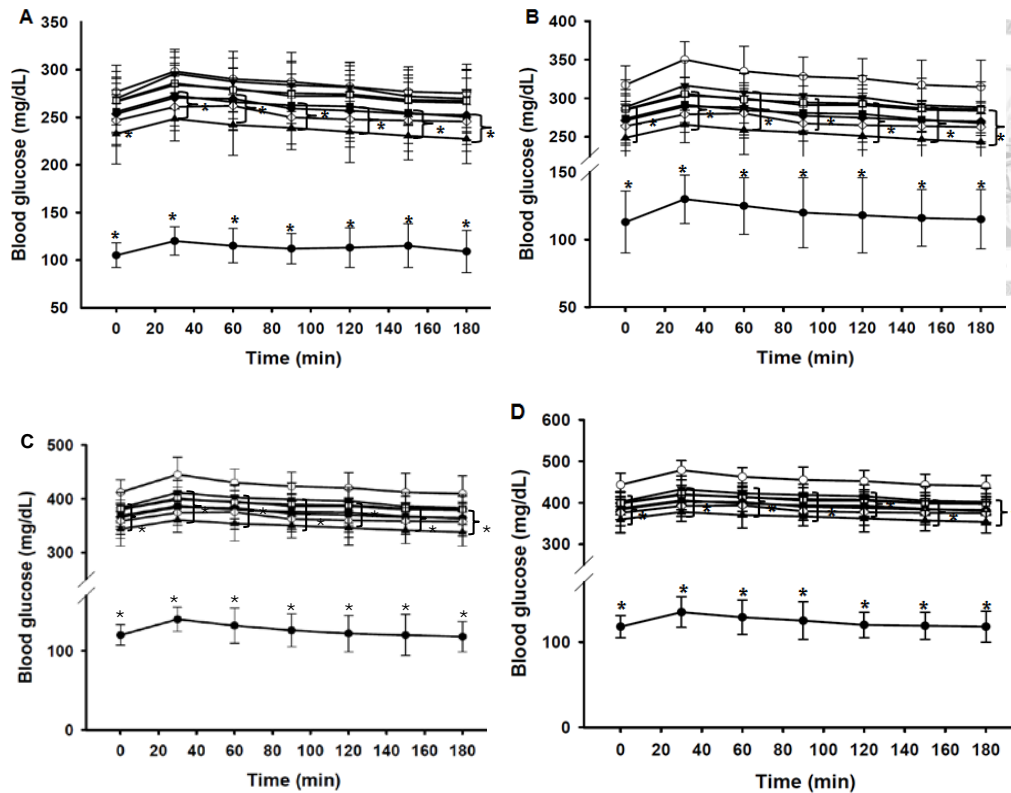


圖 4.3、每兩週餵食不同劑量紅麴山藥對於糖尿病大鼠血液中口服葡萄糖耐受性之影響

Fig. 4.3. Effect of RMD on the blood glucose level of STZ-induced diabetic rats. Blood samples were collected to quantify the blood glucose levels every 2 weeks during the experimental period. (A) 2 weeks, (B) 4 weeks, (C) 6 weeks, and (D) 8 weeks in STZ-induced diabetic rats.

Sprague-Dawley rats fed a normal diet without the administration of RMD were used as control group (the C group; ●). The diabetes rats were fed a normal diet without the administration of RMD (the DC group; ○). The other diabetes rats were administrated with 1-fold dose of RMD (the D1R group; 176 mg/kg bw per day including 1.2 mg monascin; ▼), a 2-fold dose of RMD (the D2R group; 352 mg/kg bw per day including 2.4 mg of monascin; △), and a 5-fold dose of RMD (the D5R group; 880 mg/kg bw per day including 6.0 mg of monascin; ■), DM group (□), a positive control group, was orally given pioglitazone 2.6 mg/kg bw daily. D1RM (◆), D2RM (◇) and D5RM (▲) were fed the normal diet and orally given pioglitazone (2.6 mg/kg bw daily) with a 1-fold, a 2-fold or a 5-fold dose of RMD, respectively. Each value is expressed as mean \pm SD (n = 9). * Significantly different (p < 0.05) vs. the DC group.

(三) 實驗動物血液中血脂之濃度變化

以 *Monascus purpureus* NTU 568 發酵所得的 RMD 粉末，進行糖尿病動物調節血脂功效實驗，血液中 TC 與 TG 之變化如表 4.7 所示，第四週血液中 TC 濃度 C 組為 86.7 mg/dL，D-C 組為 94.5 mg/dL，因為 STZ 誘導之第二型糖尿病實驗動物，會使實驗動物產生胰島素抗性，胰島素主要功能為維持血糖恆定及碳水化合物、蛋白質和脂肪的代謝及貯存，胰島素抗性會造成血液中 TC 與 TG 的升高。故以 STZ 誘導的 DC 組其血液中 TC 濃度顯著提高 ($p < 0.05$)。糖尿病鼠的 RMD 試驗組：D-1R 組 (1 倍之 RMD 組) 與 D-5R 組 (5 倍之 RMD 組) 於第四週時 TC 濃度均顯著低於 D-C 組，分別下降 17.7% 與 17.2% ($p < 0.05$)。RMD 與藥物併用組也具有降低 TC 濃度的效果，其 TC 濃度均顯著低於 DC 組 ($p < 0.05$)。DC 組血液中 TG 較 C 組顯著提高 ($p < 0.05$)，達 229.5 mg/dL，而 D-1R 組與 D-5R 組之值均顯著低於 DC 組。D-1R 組、D-5R 組、D-1RM 組與 D-5RM 組 TG 濃度較 DC 組分別降低 26.1%、40.7%、26.6% 與 29.4% ($p < 0.05$)。證明 RMD 除了有降低糖尿病鼠血液中 TC 與 TG 之效果。RMD

在糖尿病大鼠模式下 HDL-C 之影響如表 4.7 所示，HDL-C 並無顯著提升或降低。TC/HDL-C 的比值為評估心臟血管疾病之危險機率指數，當比值愈低時則表示 HDL-C 的含量在 TC 中所含的比例較高，相對地，可能易形成心血管疾病的 LDL-C 的含量則較低。從單一的 HDL-C 血清生化值中雖然沒有顯著差異，但是 cholesterol/HDL-C 的比值，D-C 組會高至 1.7 具有顯著差異 ($p < 0.05$)。由於 TC/HDL-C 比值與罹患冠狀動脈疾病的機會相關，比值越高罹患冠狀動脈疾病的機會越高，餵食 RMD 組別 TC/HDL-C 的比值與正常組並無顯著差異，顯示 RMD 可降低糖尿病大鼠罹患心臟血管疾病之危險機率。

(四) 實驗動物血清胰島素和糖化血紅蛋白的變化情形

在 STZ 誘導的糖尿病大鼠中，胰島素所測得的值高於餵食 RMD 或 RMD 與藥物併用組 (表 4.7)，糖尿病組大白鼠血清胰島素濃度明顯低於正常組 ($p < 0.05$)，餵食

表 4.7、 餵食不同量紅麴山藥對於糖尿病大鼠血液中總膽固醇、三酸甘油酯、高密度脂蛋白膽固醇與低密度脂蛋白膽固醇濃度之影響

Table 4.7. Effects of RMD powder on the levels of serum TG, TC, HDL-C, and LDL-C in experimental STZ-induced diabetic rats-

Groups	TG	TC	HDL-C	LDL-C	TC/HDL-C
	(mg/dL)				
C	86.3±3.1	86.7±2.1 [#]	59.2±6.8	10.7±3.6	1.5±0.05
DC	229.5±6.3	94.5±4.9	56.5±1.3	9.0±1.4	1.7±0.21
D1R	169.7±2.2 [*]	77.7±1.8 [*]	60.8±3.3	14.5±4.1	1.3±0.26 [*]
D2R	156.7±2.9 [*]	76.7±1.8 [*]	63.8±3.3	12.5±4.1	1.2±0.26 [*]
D5R	136.1±3.9 [*]	72.2±2.1 [*]	62.6±6.2	10.0±1.8	1.2±0.07 [*]
DM	198.1±6.4 [*]	86.8±2.4 [*]	65.6±3.1	20.6±1.9	1.3±0.27 [*]
D1RM	168.5±3.6 [*]	79.7±1.6 [*]	63.7±8.7	12.3±2.5	1.3±0.17 [*]
D2RM	151.5±4.3 [*]	75.7±2.3 [*]	64.7±8.7	10.3±2.5	1.2±0.17 [*]
D5RM	132.1±4.9 [*]	74.8±2.8 [*]	66.5±9.7	8.5±3.5	1.1±0.18 [*]

1 C: Sprague-Dawley rats fed normal diet; DC: STZ-induced diabetic rats fed normal diet; D1R: STZ-induced diabetic rats fed normal diet and administrated with RMD (1X, 176 mg/kg body weight [bw] per day including 15 mg monascin 21.1 mg of GABA); D2R: STZ-induced diabetic rats fed normal diet and administrated with RMD (2X, 352 mg/kg bw per day including 30 mg of monascin and 42.2 mg of GABA); D5R: STZ-induced diabetic rats fed normal diet and administrated with RMD (5X, 880 mg/kg bw per day including 75 mg of monascin and 105.5 mg of GABA); DM: STZ-induced diabetic rats fed normal diet and administrated with pioglitazone; D1RM: STZ-induced diabetic rats fed normal diet and administrated with RMD (1X, 176 mg/kg bw per day including 15 mg monascin 21.1 mg of GABA) and pioglitazone 2.6 mg/kg; D2RM: STZ-induced diabetic rats fed normal diet and administrated with RMD (2X, 352 mg/kg bw per day including 30 mg monascin 42.2 mg of GABA) and pioglitazone 2.6 mg/kg; D5RM: STZ-induced diabetic rats fed normal diet and administrated with RMD (5X, 880 mg/kg bw per day including 75 mg of monascin and 105.5 mg of GABA) and pioglitazone 2.6 mg/kg.

2. TG: triacylglycerol; TC: total cholesterol; HDL-C: high-density lipoprotein cholesterol; LDL-C: low-density lipoprotein cholesterol.

3 Each value is expressed as mean ± SD (n = 9). * Significantly different ($p < 0.05$) vs. the DC group.

RMD 組、RMD 與藥物併用組及藥物組之糖尿病大鼠，血清胰島素濃度則明顯較糖尿病組高 ($p < 0.05$)，顯示服用 RMD 可以提升體內胰島素的分泌對糖尿病所產生的胰島素抗性有改善效果。糖化血紅蛋白 (glycated hemoglobin; HbA1c) 是血紅蛋白與葡萄糖結合的產物，可作為血糖控制一段時間內平均血漿葡萄糖濃度的參考標準。糖尿病的病人，經常需要量測血糖值以監控血糖控制情形，並作為調整藥量的依據。但血糖值只代表抽血當時的血糖高低，而較長時期的血糖控制情形，則須靠 HbA1c。血糖越高，HbA1c 的比例就越高，而紅血球的壽命是 120 天，所以 HbA1c 可用來反應最近期的血糖控制狀況。正常的 HbA1c 值約在 5% 左右，根據臨床研究發現，若能將糖尿病患者的 HbA1c 控制在 7% 以下，將來發生併發症的機會將會減少，其併發症包括：腦血管病變、心臟血管疾病、視網膜病變、周邊神經病變、腎功能失常。糖尿病大鼠 HbA1c 值比正常大鼠升高至 16.7%，而餵食 RMD 或 RMD 與藥物併用，HbA1c 顯著降低至 13.3~10.2% (表 4.8)。說明 RMD 對 STZ 誘導的糖尿病大鼠的降血糖作用降低 HbA1c 在輔助血糖的控制上具有良好的效果。

(五) 安全性分析—肝、腎功能與電解質

尿素氮 (BUN) 是體內蛋白質代謝的產物，由肝臟合成，並由腎臟將其濾到尿中而排出體外。當腎臟受損或腎功能障礙時，此項功能可能因此降低或完全喪失，導致過多的尿素氮累積在血液中，出現濃度上升的情形。血中尿素氮的濃度太高會對身體產生毒性、危害器官，是臨床上最常用的腎功能指標之一。血液中肌酸酐 (creatinine) 可觀察腎功能是否正常，肌酸酐的值愈高腎臟的障礙愈大。糖尿病最先出現的臨床表現是蛋白尿增加，隨後血清尿素氮及肌酸酐逐漸上升，最後演變成尿毒症。由表 4.8 得知，在 DC 組尿素氮濃度顯著增加 ($P < 0.05$)，表示糖尿病大鼠腎功能受損。經餵食 RMD 或 RMD 與藥物併用下，可以顯著下降 BUN 值達 17.0~34.0% ($p < 0.05$)。血液中 creatinine 值各組間並無顯著差異 ($p < 0.05$)。說明 RMD 不會造成受腎功能受

表 4.8、 餵食不同量紅麴山藥對於糖尿病大鼠血液中尿素氮、肌酸酐、糖化血色素、胰島素與肌酸激酶濃度之影響



Table 4.8. Effect of RMD powder on experimental STZ-induced diabetic rats, performance serum BUN, creatinine, glycated hemoglobin, insulin and CPK

Groups	BUN	Creatinine	Glycated hemoglobin	Insulin	CPK
	(mg/dL)	(mg/dL)	(%)	(IU/mL)	(pmol/L)
C	26.9±0.5*	0.66±0.11	6.3±0.4*	42.6±1.3*	467.5±12.4
DC	47.1±0.8	0.51±0.07	16.7±1.3	16.1±1.3	576.6±21.3
D1R	39.1±2.2*	0.55±0.06	13.3±0.9*	19.1±1.1*	491.3±24.5
D2R	37.1±4.2*	0.51±0.08	12.4±1.2*	20.3±1.8*	489.2±10.0
D5R	26.9±9.9*	0.55±0.05	10.6±0.8*	22.6±1.6*	487.2±11.5
DM	30.4±1.5*	0.52±0.05	12.4±0.6*	24.6±1.7*	479.7±23.3
D1RM	34.1±5.2*	0.58±0.08	11.9±0.7*	26.4±2.5*	487.0±12.2
D2RM	32.1±2.2*	0.57±0.09	10.6±1.1*	28.9±1.5*	490.5±12.6
D5RM	31.1±2.6*	0.58±0.07	10.2±0.6*	32.2±2.4*	489.6±12.7

1. Abbreviation meaning of each group is shown in Table 4.7.

2 BUN: blood urea nitrogen; CPK: creatinine phosphokinase.

3. Each value is expressed as mean ± SD (n=9). * Significantly different (p<0.05) vs. the DC group.

損，甚至具有改善糖尿病所導致腎功能不佳的效果。橫紋肌溶解的過程中，受損的肌肉細胞釋放 CPK 酵素。CPK 通常用在臨床的心肌梗塞和肌肉疾病的診斷和監測。表 4.8 顯示，餵食 RMD 或 RMD 與藥物併用組及藥物組之糖尿病大鼠並無顯著增加，表示 RMD 在高劑量下 (5 倍) 也不會造成橫紋肌溶解症的發生。

由表 4.9 結果顯示，糖尿病大鼠 DC 組其 AST 與 ALT 顯著提高 ($p < 0.05$)。Alk-P 也是檢測肝功能的指標之一，此種酵素的指數升高，有可能是肝臟或膽道疾病，Alk-P 除來自肝膽亦可來自骨骼、小腸及胎盤（懷孕）(Chen et al., 1997)。DC 組三種酵素顯著提升 ($p < 0.05$)，探究其原因可能是因為 STZ 所誘導之實驗動物，會造成肝代謝負擔增加，而使 AST、ALT 與 Alk-P 的濃度提高，然而經過四週給予 RMD 後下顯著降低 AST、ALT 與 Alk-P 濃度 ($p < 0.05$)，也就是說 RMD 或 RMD 與藥物併用應不會造成骨骼病變，也有保護肝臟功能之功效。

鈉是體內最重要的細胞外陽離子，對維持體液的滲透壓及調節水份平衡有重大的影響。鉀是人體細胞內最重要的陽離子，直接影響肌肉收縮及神經傳導功能。在血漿中電解質是靠腎臟排泄來調節的，比較血清中電解質之間的平衡情形，由表 4.10 得知，在 STZ 誘導的糖尿病大鼠血清中，有較低的鈉和氯與較高的鉀含量，RMD 或 RMD 與藥物併用組，電解質各組之間並無顯著差異 ($p < 0.05$)。過去研究發現糖尿病患的腎病變，可能是高血糖導致腎臟細胞增生及基底膜增生的誘因，且腎臟肥大的主要特徵是腎絲球及腎小管肥大、細胞增生及細胞外間質的堆積，因此可能是高血糖導致腎臟肥大並進而引起腎病變，服用 RMD 或 RMD 與藥物併用對腎臟代謝或生理功能，並未增加其負擔反而可以提高在體內電解質平衡具有保護效果。

表 4.9、餵食不同量紅麴山藥大鼠血液中天門冬胺酸轉胺酶、丙胺酸轉胺酶、鹼性磷酸酶與總蛋白量之影響

Table 4.9. Effect of RMD powder on the levels of serum AST, ALT, ALP, and total proteins in experimental STZ-induced diabetic rats.

Groups	AST	ALT	ALP	Total protein
	(U/L)	(U/L)	(IU/L)	(g/dL)
C	127.5±3.3*	72.7±3.8*	132.1±2.4*	7.6±0.2
DC	457.5±2.1	297.5±2.1	144.3±2.1	8.5±0.4
D1R	185.0±3.4*	121.3±3.6*	135.8±2.7*	7.9±0.2
D2R	173.0±1.4*	119.3±3.6*	133.5±2.8*	8.0±0.3
D5R	152.6±8.4*	108.3±4.1*	131.5±2.7*	7.8±0.5
DM	184.0±8.4*	120.6±5.9*	134.8±3.1*	7.6±0.4
D1RM	169.3±3.2*	113.8±5.9*	132.3±3.4*	8.2±0.2
D2RM	164.3±3.2*	103.8±5.9*	132.1±2.6*	7.8±0.3
D5RM	142.6±3.5*	91.2±2.8*	131.6±3.4*	7.5±0.2

1 Abbreviation meaning of each group is shown in Table 4.7.

2 AST: aspartate transaminase; ALT: alanine transaminase; ALP: alkaline phosphatase.

3 Each value is expressed as mean ± SD (n=9). * Significantly different ($p < 0.05$) vs. the DC group.

表 4.10、餵食不同量紅麴山藥對於糖尿病大鼠血液中鈉、鉀、氯、鈣與磷之影響

Table 4.10. Effect of RMD powder on the levels of serum sodium, potassium, chloride, calcium, and phosphorus in experimental STZ-induced diabetic rats.

Groups	Sodium	Potassium	Chloride	Calcium	Phosphorus
	(mEq/L)			(mg/dL)	
C	152.6±0.2*	7.9±0.5*	94.5±2.1*	12.4±0.7	14.3±1.3
DC	142.4±0.8	12.1±1.6	83.2±1.4	12.1±0.4	14.2±2.5
D1R	152.3±0.7*	7.6±0.5*	89.5±1.5*	12.3±0.3	14.1±1.2
D2R	149.1±1.1*	8.2±0.5*	90.1±1.3*	12.2±0.5	14.5±1.7
D5R	149.9±1.2*	8.1±0.4*	92.3±1.4*	12.4±0.2	14.7±1.6
DM	151.1±1.4*	8.6±0.6*	91.9±2.3*	12.6±0.8	13.9±2.3
D1RM	152.4±0.9*	8.8±0.4*	92.6±1.2*	12.4±0.5	14.6±2.6
D2RM	150.5±0.7*	8.6±0.6*	92.5±1.4*	12.5±0.7	14.4±3.6
D5RM	149.1±1.1*	8.5±0.8*	93.3±1.3*	12.4±0.6	14.5±2.4

1 Abbreviation meaning of each group is shown in Table 4.7.

2 Each value is expressed as mean ± SD (n = 9). * Significantly different (p < 0.05) vs. the DC group.

三、 RMD 與降血壓藥物併用對高血壓大鼠降血壓之影響評估

(一) 試驗動物之單一餵食後 24 小時內收縮、舒張血壓及心律短期變化

單一次以口服餵食受試物後之血壓變化如圖 4.4 A,B 所示，第 0 小時收縮血壓值約在 180 mmHg，餵食受試物後第 4 小時後血壓開始下降，在 8 小時後效果達到最好，其收縮血壓 S5RM 組由 180 mmHg 降到 160 mmHg，其餘各組 S5R, S1R, S1RM, 和 SM 組則分別降至 163, 168, 163, 和 170 mmHg。餵食 5 倍劑量 RMD 與藥物併用組降至 160 mmHg，其餘 5 倍 RMD 組、1 倍 RMD 組、1 倍 RMD 與藥物併用組、藥物組及高血壓組收縮血壓分別為 165 mmHg、172 mmHg、173 mmHg、170 mmHg 及 179 mmHg，收縮壓和第 0 小時比依序下降了 15 mmHg、13 mmHg、8 mmHg、5 mmHg、9 mmHg 及 0 mmHg。舒張血壓降幅順序和收縮血壓類似，餵食受試物後第 4 小時血壓開始下降，8 小時後效果達到最好，其舒張血壓降低效果可以持續至 24 小時，餵食 5 倍劑量 RMD 與藥物併用組降至 125 mmHg，其餘 S5R, S1R, S1RM, and SM 組收縮血壓分別為 128, 130, 128, 及 134 mmHg 短效餵食試驗結果顯示，5 倍 RMD 與藥物併用有最佳之降血壓效果，RMD 具有輔助之效果，圖 4.4 C 為心率方面結果，試驗過程各組心律無顯著差異。

(二) 試驗動物餵食 8 週後之收縮、舒張血壓及心律長期變化

繼單一次餵食受試物後，又以每日餵食同等劑量以測試長期降血壓效果，血壓變化圖如圖 4.5 A,B，每兩週量測一次血壓直至第八週，每次測量血壓乃在未餵食當日受試物之生理狀態，才能排除當日受試物所產生的影響。先觀察高血壓組，由圖 4.5 A,B 可以發現雖然已是 13 週齡之成鼠，隨著年齡的增加血壓仍持續上升，至試驗八週後，收縮壓已從 179 mmHg 升至 192 mmHg，舒張血壓由 141 mmHg 升至 165 mmHg；而八週時之 S1R, S1RM, S5R, S5RM, SA, 及 SC 組收縮血壓長期餵食之結果顯示，在第八週後收縮壓分別為 174 mmHg、173 mmHg、170 mmHg、165 mmHg、177 mmHg 及 192 mmHg，舒張壓分別為 132 mmHg、130 mmHg、130 mmHg、128 mmHg、135 mmHg 及 165 mmHg 均有降血壓效果，其中功效最好的為 S5RM 組，

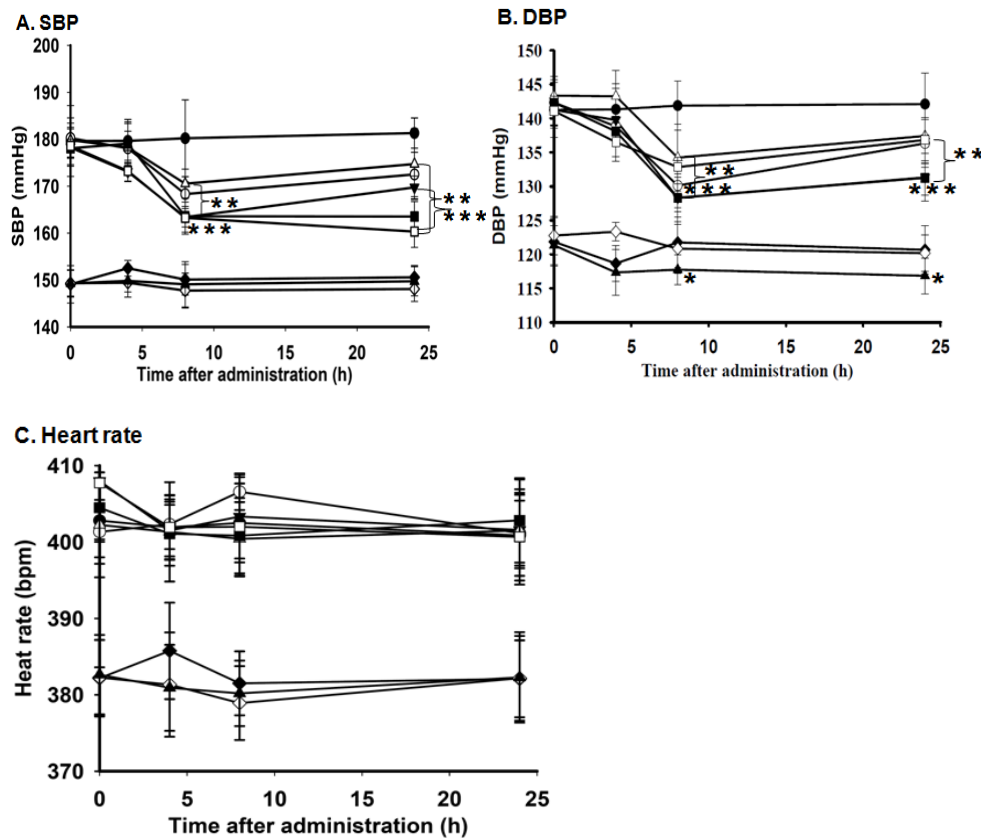


圖 4.4、單一次餵食紅麴山藥後收縮血壓、舒張血壓與心律變化情形

Fig. 4.4. Effect of single oral administration of red mold dioscorea powder on (A) SBP, (B) DBP, and (C) heart rate in SHRs and WKYs.

One group of the SHRs was fed a normal diet without the administration of red mold dioscorea (the SC group; ●). The other SHRs were administrated with 1-fold dose of RMD (the S1R group; 176 mg/kg bw per day, including 1.2 mg monascin; ○), and a 5-fold dose of RMD (the S5R group; 880 mg/kg bw per day, including 6.0 mg of monascin; ▼), S1RM (■) and S5RM (□) were fed the normal diet and orally given amlodipine (0.08 mg/day/kg bw) with a 1-fold or a 5-fold dose of RMD, SM group (Δ), a positive control group, was given orally a amlodipine 0.08 mg/day/kg bw, respectively. In addition, the Wistar-Kyoto strains of normal tensive rat (WKY) groups were fed with a normal chow diet, WC (◆), W1R (◇) and W5R (▲) groups were orally given a 1-fold dose of RMD (176 mg/kg bw per day, including 1.2 mg monascin), and a 5-fold dose of RMD (880 mg/kg bw per day, including 6.0 mg of monascin). Each value is expressed as mean ± SD (n = 12). *Significantly different ($p < 0.05$) vs. the WKYs group. ** Significantly different ($p < 0.05$) vs. the SHRs group. *** Significantly different ($p < 0.05$) vs. the positive control (SA) group.

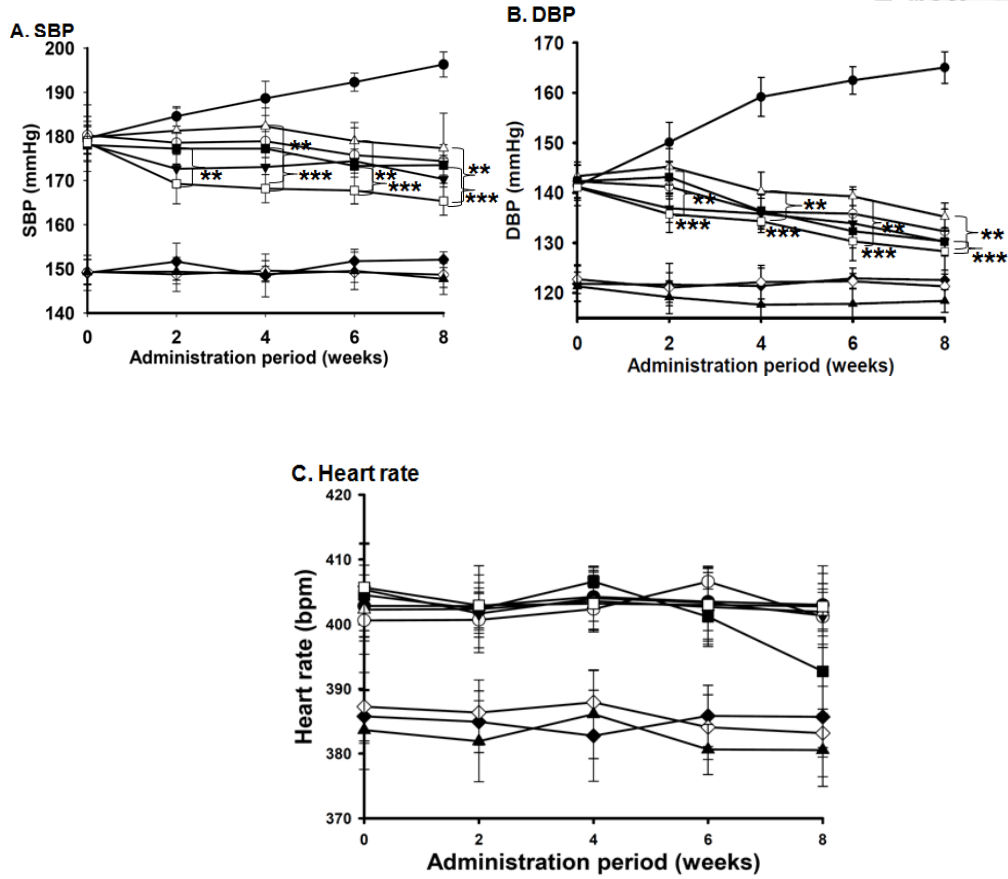
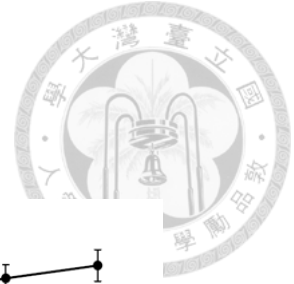


圖 4.5、餵食紅麴山藥八週間收縮血壓、舒張血壓與心律變化情形

Fig. 4.5. Effect of chronic administration of red mold dioscorea powder on (A) SBP, (B) DBP, and (C) heart rate in SHRs and WKYs. Each value is expressed as mean \pm SD ($n = 9$). * Significantly different ($p < 0.05$) vs. the DC group.

1 Abbreviation meaning of each group is shown in Figure 4.4.

收縮壓及舒張壓與 SC 組相比降低了 31 mmHg 與 37 mmHg，由八週的結果顯示，雖然長期餵食 RMD 血壓並未比 8 週前降低，因為此模式大鼠會隨著時間的增加血壓會持續上升，但和高血壓組相比，呈現預防血壓上升之生理功效。長期試驗之心律方面結果如圖 4.5 C，可看到整體心律呈現平緩之趨勢，試驗期間各組間心率均無顯著差異 ($p < 0.05$)，不會造成心律不整的現象發生。

(三) 實驗動物血液中脂質含量

由表 4.11 得知各服用 RMD 之 WKY 組與 SHR 組 TG 都顯著降低 ($p < 0.05$)。表 4.11 之 WKY 組服用 5 倍 RMD 與控制組之 TC 量顯著降低，而 SHR 組除了藥物 SA 組數值無顯著降低外，其餘組別之值皆具顯著差異 ($p < 0.05$)。

表 4.11 中 WKY 組服用 RMD 之 HDL-C 較 WC 組高，SHR 組服用 RMD 之 S1R 及 S5R 組所測得 HDL-C 較控制組高，且具有劑量效應 ($p < 0.05$)，但服用藥物的 SM 組卻無提升效果。由表 4.11 得知 WKY 組服用 RMD 組之 LDL-C 較控制組低，而 SHR 服用 RMD 之 S-5R 組 LDL-C 較 S-1R 組降低許多。藥物與 RMD 搭配服用者，亦有相同趨勢，具有劑量效應。

(四) 安全性分析—肝、腎功能與電解質

由表 4.12 得知 WKY 組服用 RMD 後 AST 及 ALT 之數值皆下降。而 SHR 組無論是服用 RMD 或 RMD 與藥物併用，皆可使 AST 及 ALT 明顯下降，且 RMD 具有劑量效應。Alk-P 方面，WKY 與 SHR 組服用 RMD 後 alkaline phosphatase 皆無顯著變化。在 γ -GT 方面，表 4.12 結果顯示 WKY 組無論有無服用 RMD 其數值皆不變，而 SHR 組每一組數值與 SC 組比較皆降低，而服用 RMD 的效果又比藥物更明顯。在總蛋白 (total protein)、白蛋白 (albumin) 及球蛋白 (globulin) 方面，白蛋白之正常參考值為 3.5-5.0 g/dL。球蛋白 (globulin) 的濃度可用來評估身體的免疫狀態及評估肝臟疾病的嚴重度，球蛋白升高通常意味著體內發生免疫反應，例如病毒入侵、過敏反應、惡性腫瘤等。個體中球蛋白之正常參考值為

表 4.11、餵食不同量紅麴山藥對於高血壓大鼠血液中三酸甘油酯、總膽固醇、高密度脂蛋白膽固醇與低密度脂蛋白膽固醇濃度之影響

Table 4.11. Effect of red mold dioscorea powder on experimental SHR and WKYs performance serum cholesterol, triacylglycerol, HDL and LDL

Groups	TG	TC	HDL-C	LDL-C	TC/HDL-C
	(mg/dL)				
WC	74.4±7.2	79.3±4.2	55.7±2.4	10.8±1.1	1.4±0.1
W1R	64.5±6.2*	74.2±2.1	60.1±3.1*	8.5±1.2*	1.2±0.0
W5R	62.7±6.3*	71.8±2.5*	59.1±3.6*	7.5±2.0*	1.2±0.1
SC	74.8±4.1	84.1±5.3	57.2±4.5	11.5±0.7	1.5±0.1
S1R	67.5±4.4**	74.5±4.1**	62.8±3.9**	9.6±0.7**	1.2±0.1**
S5R	63.5±4.7**	73.5±4.4**	64.9±3.4**	8.2±0.4**	1.1±0.1**
SM	69.3±6.8	79.8±3.6	60.3±1.9	10.0±0.7**	1.3±0.1
S1RM	64.5±4.7**	72.8±4.5**	62.6±3.6**	8.5±1.2**	1.1±0.0**
S5RM	63.1±5.6**	69.2±3.2**	61.1±4.6**	7.8±0.8**	1.1±0.0**

1. WC: WKYs fed normal diet; W1R: WKYs fed normal diet and administrated with red mold dioscorea (1X, 176 mg/day/kg bw including 1.2 mg monascin and 0.18 mg of GABA); W5R: WKYs fed normal diet and administrated with red mold dioscorea (5X, 880 mg/day/kg bw, including 6.0 mg of monascin and 0.9 mg of GABA); SC: SHR fed normal diet; S1R: SHR fed normal diet and administrated with red mold dioscorea (1X, 176 mg/day/kg bw including 1.2 mg monascin and 0.18 mg of GABA); S5R: SHR fed normal diet and administrated with red mold dioscorea (5X, 880 mg/day/kg bw including 6.0 mg of monascin and 0.9 mg of GABA); SM: SHR fed normal diet and administrated with amlodipine; S1RM: SHR fed normal diet and administrated with red mold dioscorea (1X, 176 mg/day/kg bw, including 1.2 mg monascin and 0.18 mg of GABA) and amlodipine; S5RM: SHR fed normal diet and administrated with red mold dioscorea (5X, 880 mg/day/kg bw including 6.0 mg of monascin and 0.9 mg of GABA) and amlodipine.

2. TG: triacylglycerol; TC: Total cholesterol; HDL-C: High density lipoprotein cholesterol; LDL-C: Low density lipoprotein cholesterol.

3. Each value is expressed as mean ± SD (n = 12). *Significantly different (p < 0.05) vs. the WKYs group. **Significantly different (p < 0.05) vs. the SHR group.

表 4.12、餵食不同量紅麴山藥對於高血壓大鼠血液中天門冬胺酸轉胺酶、丙胺酸轉胺酶、鹼性磷酸酶、白蛋白、球蛋白、 γ -麩胺醯轉移酶與總蛋白量之影響



Table 4.12. Effect of red mold dioscorea powder on experimental SHR and WKY performance serum AST, ALT, alkaline phosphatase, albumin, globulin, γ -GT total protein and A/G ratio

Groups	AST	ALT	Alkaline phosphatase	Albumin	Globulin	γ -GT	Total protein	A/G ratio
	(U/L)		(IU/L)	(g/dL)				
WC	124.5±4.8	87.3±8.2	130.3±7.6	5.1±0.2	2.4±0.1	0.3±0.1	7.6±0.2	2.1±0.2
W1R	122.5±5.3	79.2±4.5*	131.3±5.6	5.1±0.1	2.5±0.1	0.2±0.1	7.6±0.3	2.0±0.3
W5R	117.2±7.4*	81.7±4.4*	133.8±2.7	5.1±0.1	2.5±0.1	0.2±0.1	7.4±0.3	2.0±0.2
SC	137.7±7.9	89.1±4.7	135.5±4.6	5.2±0.3	2.6±0.1	0.3±0.1	8.0±0.4	2.0±0.1
S1R	125.1±4.8**	82.3±6.7**	133.5±3.1	5.4±0.2	2.4±0.2	0.2±0.1	7.7±0.2	2.3±0.3
S5R	123.2±3.1**	78.1±7.5**	135.8±4.1	5.5±0.1	2.4±0.1	0.2±0.1	7.6±0.2	2.3±0.2
SM	129.8±4.6**	85.7±6.1**	143.3±7.6	5.4±0.2	2.6±0.1	0.2±0.1	8.2±0.1	2.1±0.4
S1RM	128.2±9.2**	84.6±7.8**	138.1±8.4	5.4±0.3	2.4±0.1	0.2±0.1	7.8±0.3	2.3±0.3
S5RM	127.8±7.4**	81.7±7.9**	135.6±7.6	5.5±0.2	2.4±0.2	0.2±0.1	7.5±0.2	2.3±0.2

1. Abbreviation meaning of each group is shown in Table 4. 11.

2. AST: aspartate transaminase; ALT: alanine transaminase; γ -GT: gamma glutamyl transpeptidase.

3. Each value is expressed as mean \pm SD (n=12). *Significantly different (p<0.05) vs. the WKYs group. **Significantly different (p<0.05) vs. the SHR group.

1.5-3.7 g/dL。白蛋白與球蛋白的比值 (A/G ratio)，其標準值為 1.1~2.5。因疾病的不同，其血清蛋白的組成，也會有所改變，而得知其不同的臨床意義。但若其數值太低，則表示具肝損害疾病或慢性疾病。由表 4.12 得知，WKY 組服用 RMD 後總蛋白量都會增加，但並無顯著差異。而血清中球蛋白及白蛋白的量也稍微增加，同樣 SHR 組其變動幅度並不明顯，但服用藥物組其蛋白量皆會比其他組別高，顯示藥物會造成其負擔但 RMD 具有減緩之效果。表 4.12 顯示 WKY 組服用 RMD 者其 A/G ratio 較控制組還要低，但數值仍在正常範圍。SHR 組服用 RMD 後其數值也會降低，而服用藥物反而增加，兩者搭配服用之數值也比控制組還要低。

血液中尿素氮 (BUN) 由表 4.13 可知，WKY 組服用 RMD 後 BUN 有增加的現象，但在正常範圍內。而在 SHR 組服用 RMD 後顯著降低其數值，以五倍劑量效果最好，而藥物組別反而會使數值增加，使得兩者搭配效果不明顯。在肌酸酐 (creatinine) 方面顯示 WKY 組及 SHR 組皆無顯著變化。尿酸 (uric acid) 其正常範圍值 2-7.3 mg/dL，WKY 與 SHR 組服用 RMD 後，尿酸雖然有增加的現象，但仍然在正常範圍內。

鈉是體內最重要的細胞外陽離子，對維持體液的滲透壓及調節水份的平衡影響重大。鉀是人體細胞內最重要的陽離子，直接影響肌肉收縮及神經傳導的功能，其在血漿中的濃度是靠腎臟的排泄來調節的。在電解質檢測中不論是 WKY 或 SHR 組，服用 RMD 或是藥物併用組與控制組並無顯著差異。橫紋肌溶解症指的是骨骼肌 (橫紋肌) 產生了急速的損傷，當肌肉受損時，肌肉中的 CPK 酵素也會釋放到血中，在產生橫紋肌溶解症時，CPK 值會高達數千或甚至上萬。表 4.13 中說明不論是 WKY 或 SHR 組，服用 RMD 或是藥物併用組與控制組並無顯著增加。

表 4.13、飼食不同量紅麴山藥對於高血壓鼠血液中尿素氮、肌酸酐、尿酸、鈉、鉀與肌酸激酶之影響



Table 4.13. Effect of red mold dioscorea powder on experimental SHR_s and WKY_s performance serum BUN, creatinine, uric acid, sodium, potassium and creatinine phosphokinase

Group	BUN	Creatinine	Uric acid	Sodium	Potassium	Creatinine phosphokinase
	(mg/dL)			(meq/L)		(U/L)
WC	20.5±1.0	0.46±0.1	4.3±0.6	152.6±0.2	7.9±0.5	267.5±12.4
W1R	21.7±0.9	0.48±0.1	4.9±1.3	152.4±0.8	8.1±1.6	276.6±21.3
W5R	23.6±1.5	0.47±0.1	4.5±0.7	152.3±0.7	7.6±0.5	291.3±24.5
SC	23.9±0.9	0.44±0.1	5.8±1.2	149.1±1.1	8.2±0.5	289.2±10.0
S1R	23.5±1.0	0.46±0.1	6.1±1.5	149.9±1.2	8.1±0.4	287.2±11.5
S5R	21.9±0.7	0.43±0.1	5.8±0.8	151.1±1.4	7.8±0.6	279.7±23.3
SA	23.7±0.8	0.48±0.1	5.8±0.6	152.4±0.9	8.8±0.4	287.0±12.2
S1RA	23.1±1.8	0.45±0.1	5.7±0.5	150.5±0.7	8.6±0.6	290.5±12.6
S5RA	23.5±1.2	0.51±0.0	6.4±0.8	149.1±1.1	8.5±0.8	289.6±12.7

1. Abbreviation meaning of each group is shown in Table 4.11.
2. BUN: blood urea nitrogen
3. Each value is expressed as mean ± SD (n =12). *Significantly different (p < 0.05) vs. the WKY_s group. **Significantly different (p < 0.05) vs. the SHR_s group.

第二部分、中藥與紅麴山藥對阿茲海默症輔助治療效益之研究

一、中藥對於阿茲海默症輔助治療之體外細胞試驗

依據本實驗室先前以衛生福利部規定之可食用性中草藥，參考國內外文獻具有抗氧化、益心、肝之血而有安神、活血化瘀、改善睡眠等功效，以山楂、茵陳、紅花、玫瑰、葛根、決明子、薑黃、百合、遠志、雷公根、咸豐草、丹蔘、芝麻、砂仁、酸棗仁等樣品。分別以 20、40、60、80 及 95% 濃度之酒精 (A、B、C、D 及 E 組)，以及去離子水萃取 (F 組)。萃取物以四項體外抗氧化能力指標：總酚類含量、Trolox 等價抗氧化力 (trolox equivalent antioxidant capacity, TEAC)、還原力以及亞鐵螯合能力篩選。選出總酚類含量、TEAC 與還原力三項指標中最佳之玫瑰 A、B、C 組萃取物；以及亞鐵螯合能力最佳之酸棗仁 A、B 組萃取物；另根據文獻指出雷公根具抗阿茲海默症效果，亦選擇雷公根各組萃取物，進行細胞模式篩選，最後由上述樣品經細胞試驗篩選出山楂、玫瑰、雷公根與酸棗仁 (蔡，2011)。

二、中草藥萃取物對 IMR-32 細胞存活率之影響

將篩選之中草藥萃取物分別以 100、250、500 與 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 濃度，添加於細胞培養基中與 IMR32 細胞共同培養 48 小時，結果如表 4.14 所示。玫瑰 A、B 與 C 組萃取物對 IMR32 神經細胞，於四個劑量下，皆不會降低細胞存活率，在 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 與 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 劑量下可提高 IMR32 細胞存活率。山楂 A、B 與 C 組萃取物，除了 C 組對 IMR32 細胞在 100、250、500 與 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 劑量下會分別降低細胞存活率至 56.7、59.8、62.1 與 64.3%，其餘各組於四個劑量下皆不會影響 IMR32 細胞存活率。茵陳 A、B 與 C 組萃取物，在 100、250、500 與 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 劑量下會降低細胞存活率至 79.4% 以下，萃取物本身可能具毒性影響 IMR32 細胞存活率，故在後續實驗中將刪除該組別。對 IMR32 神經細胞僅有雷公根 B 組萃取物會降低細胞存活率達 70%，其餘組別皆不會促進 IMR32 神經細胞死亡或增生。酸棗仁 B 組對 IMR32 細胞在 100、250、500 與 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 劑量下皆未降低細胞存活率。

表 4.14、不同劑量中藥酒精萃取物對於 IMR 32 細胞存活率之影響

Table 4.14. Effect of treating IMR32 cells with different ethanol extracts of Chinese herbs for 48 hrs on the cell viability.



Groups	100	250	500	1000
	(µg/mL)			
Control	100.3±0.4	100.5±0.3	101.7±1.3	100.8±0.9
<i>R. rugosa</i> A	130.0±2.1	129.0±2.3	88.7±4.3	88.1±1.9
<i>R. rugosa</i> B	116.5±4.1	110.4±3.3	93.6±2.2	92.3±4.3
<i>R. rugosa</i> C	116.9±1.5	109.7±4.6	91.2±3.6	90.3±4.3
<i>C. pinnatifida</i> A	112.8±3.4	105.3±3.1	104.1±2.9	101.2±2.6
<i>C. pinnatifida</i> B	90.3±1.9	90.3±1.4	84.8±3.4	80.3±2.6
<i>C. pinnatifida</i> C	56.6±2.8	59.7±3.1	62.1±2.6	64.3±2.9
<i>A. capillaris</i> A	67.2±4.2	67.4±4.5	79.4±5.1	78.9±2.1
<i>A. capillaris</i> B	50.2±3.3	58.5±4.3	62.3±3.3	58.2±4.2
<i>A. capillaris</i> C	60.4±7.7	68.6±6.6	66.3±6.3	65.3±7.3
<i>C. asiatica</i> A	153.3±3.1	120.8±4.1	109.1±2.2	103.3±3.1
<i>C. asiatica</i> B	67.8±2.2	76.1±3.1	78.1±2.1	80.9±3.2
<i>C. asiatica</i> C	112.4±4.1	94.2±4.5	93.8±4.3	96.1±4.3
<i>C. asiatica</i> D	86.1±2.2	80.8±3.1	80.2±4.2	71.6±3.9
<i>C. asiatica</i> E	80.6±3.6	86.1±3.5	78.3±3.2	76.6±3.2
<i>C. asiatica</i> F	125.3±4.5	133.4±6.2	127.9±3.9	129.7±4.5
<i>Z. spinosae</i> B	99.1±6.2	98.7±5.2	98.1±5.4	96.7±5.3

1. *C. pinnatifida*: *Crataegus pinnatifida*; *R. rugosa*: *Rosa rugosa*; *C. asiatica*: *Centella asiatica*; *Z. spinosae*: *Semen Zizyphi spinosae*

2. A: 20% ethanol extract; B: 40% ethanol extract; C: 60% ethanol extract; D: 80% ethanol extract; E: 95% ethanol extract; F: 60% water extract.

三、聚合 $A\beta_{1-40}$ 濃度對 IMR 32 之影響

聚合的 $A\beta_{1-40}$ 具有細胞毒性，但對於不同細胞株的傷害濃度各不相同，因此本實驗探討不同濃度的聚合 $A\beta_{1-40}$ 對細胞傷害程度。結果如圖 4.6 所示。以 0.4-2.8 μM 聚合 7 天之 $A\beta_{1-40}$ 處理 IMR 32 細胞 24 小時，顯示 IMR 32 細胞存活率在 0.8 μM $A\beta_{1-40}$ 處理組之間逐漸下降， $A\beta_{1-40}$ 超過 2 μM 以上，則 24 小時細胞存活率維持在 70 % 左右，結果得知聚合 $A\beta_{1-40}$ 具神經傷害效果，證實 IMR 32 細胞可做為 $A\beta_{1-40}$ 毒殺效果的評估模式，若處理延長至 48 小時，IMR 32 細胞存活率持續降低，當 $A\beta_{1-40}$ 濃度在 2 μM 以上，可使細胞存活率降至 60% 以下。因此選用 2 μM 聚合七天之 $A\beta_{1-40}$ 做為後續實驗使用之 $A\beta$ 毒殺模式劑量。

四、雷公根、酸棗仁與玫瑰萃取物對 IMR-32 細胞抵抗聚合 $A\beta_{1-40}$ 神經毒性

聚合的 $A\beta_{1-40}$ 會表現明顯的神經傷害，因此利用雷公根、酸棗仁和玫瑰萃取物與 2 μM 已聚合 $A\beta_{1-40}$ 溶液共同培養 IMR-32 細胞，比較細胞存活率尋找具有神經保護效果之中草藥萃取物。由表 4.15 與 4.16 得知，以 2 μM 聚合之 $A\beta_{1-40}$ 與 IMR-32 細胞共培養其存活率當 100%，探討各樣品之相對存活率。當聚合之 $A\beta_{1-40}$ 與雷公根 A 與 F 組萃取物以 10~500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 共同培養 IMR-32 細胞，雷公根 F 組在 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 效果最佳，在 24、48 與 72 小時，該組細胞存活率分別是 118.1、121.4 和 136.2% 皆高於已聚合 $A\beta_{1-40}$ 組存活率，顯示雷公根 F 組在 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 會明顯保護 IMR-32 細胞，降低聚合 $A\beta_{1-40}$ 之毒性傷害。酸棗仁 B 組萃取物 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 與聚合之 $A\beta_{1-40}$ 共同培養 IMR-32 細胞，在短時間 (24 hrs) 與長時間 (48 與 72 hrs)，存活率分別為 131.9、126.4 與 122.2% 亦比已聚合之 $A\beta_{1-40}$ 組存活率提高，顯示酸棗仁 B 組萃取物在 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和雷公根一樣具有提升 20~30% 的神經保護效果。然而玫瑰各組萃取物與已聚合 $A\beta_{1-40}$ 共同培養 IMR-32 細胞，皆未能明顯提升細胞存活率。綜合所述以雷公根 F 組與酸棗仁 B 組在 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 具有明顯的抑制聚合 $A\beta_{1-40}$ 的神經毒性。

五、雷公根萃取物對 IMR 32 細胞之毒性與抗 $A\beta_{1-40}$ 毒性能力評估

(一) SOD 活性分析

SOD 能夠將細胞中之超氧陰離子轉變成低毒性的 H_2O_2 。研究發現 $A\beta$ 除產生 H_2O_2 外，亦會攻擊粒線體，產生多量超氧陰離子。造成細胞氧化性損傷 (Mattson,

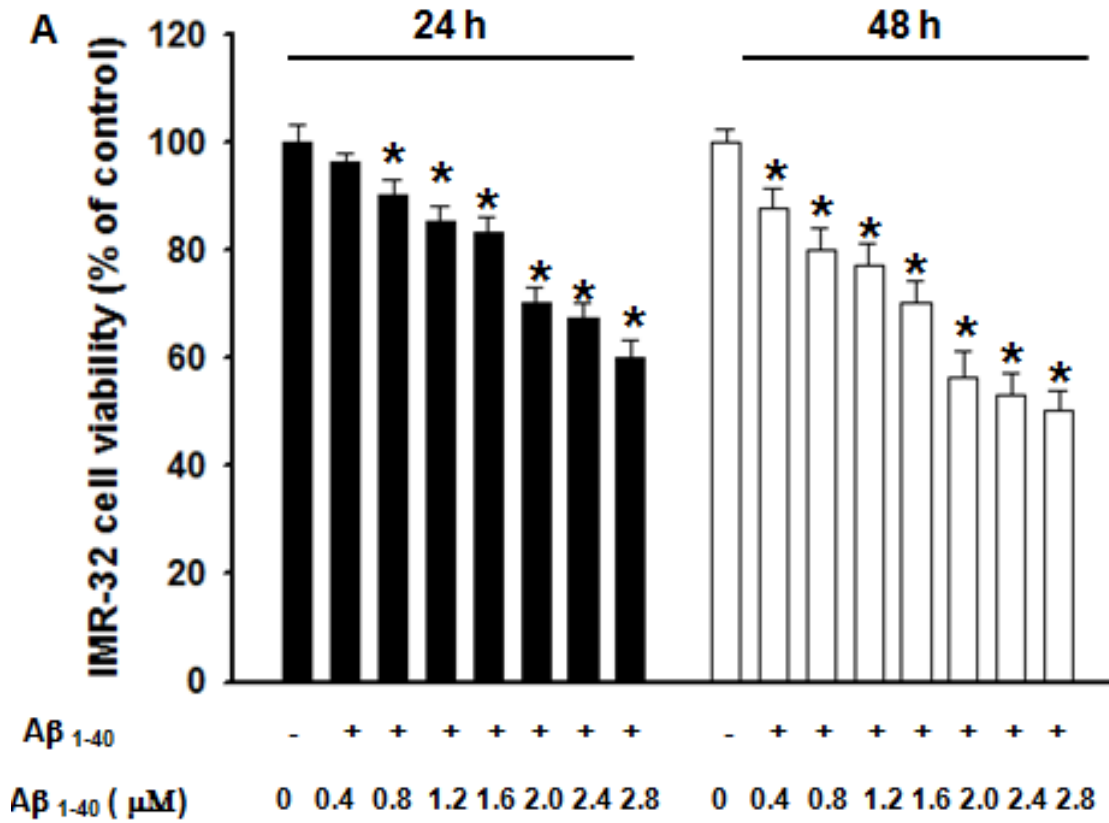


圖 4.6 不同濃度聚合 Aβ₁₋₄₀ 對 IMR 32 細胞存活率之影響

Figure 4.6. The effect of different concentration Aβ₁₋₄₀ on IMR 32 cell viability.

Aβ₁₋₄₀: amyloid β₁₋₄₀. Values are expressed as mean ± SD (n = 6). *Significantly different (P < 0.05) vs. the control group. #Significantly different (P < 0.05) vs. the Aβ₁₋₄₀ treatment alone.

表 4.15、聚合的類澱粉樣蛋白與玫瑰或酸棗仁之不同劑量萃取物共同培養對於 IMR-32 細胞存活率之影響

Table 4.15. The time course of IMR-32 cell viability by treating with different concentration of ethanol extract of rose or Semen *Zizyphi spinosae* in attenuating the cytotoxic effects of aggregated amyloid β protein.

Groups	Treatment time		
	24 hr	48hr	72hr
A β ₁₋₄₀	100.2±0.5	100.4±2.3	100.3±0.3
<i>R. rugosa</i> A 1000	112.2±4.4	92.4±4.2	90.2±2.2
<i>R. rugosa</i> A 500	109.3±3.6	88.4±6.3	87.4±5.1
<i>R. rugosa</i> A 250	101.5±2.8	91.5±4.3	90.5±3.3
<i>R. rugosa</i> A 100	105.2±1.8	94.5±4.6	85.1±5.5
<i>R. rugosa</i> B 500	109.7±8.2	90.7±3.3	87.6±5.2
<i>R. rugosa</i> B 250	106.3±1.3	97.6±2.7	92.2±8.1
<i>R. rugosa</i> B 100	107.4±7.2	91.7±2.8	85.7±4.6
<i>R. rugosa</i> C 500	107.1±6.2	95.3±4.2	87.2±3.6
<i>R. rugosa</i> C 250	106.2±3.6	98.5±7.1	86.2±3.8
<i>R. rugosa</i> C 100	103.4±6.4	96.2±6.7	96.7±4.4
<i>Z. spinosae</i> B 500	128.7±9.7	119.2±8.4	112.1±7.3
<i>Z. spinosae</i> B 250	127.6±1.4	118.2±4.3	113.5±4.2
<i>Z. spinosae</i> B 100	123.8±3.5	120.3±8.6	119.2±9.1
<i>Z. spinosae</i> B 50	131.9±5.3	126.4±4.7	122.2±3.1
<i>Z. spinosae</i> B 10	105.4±2.2	121.2±2.4	116.5±5.1

1. Abbreviation meaning of each group is shown in Table 4.14.

表 4.16、聚合的類澱粉蛋白與雷公根或山楂之不同劑量萃取物共同培養對於 IMR 32 細胞存活率之影響

Table 4.16. The effect of IMR-32 cell viability (%) by the treatment with different concentration ($\mu\text{g/mL}$) of ethanol extract of *Centella asiatica* or hawthorn and amyloid β protein 1-40 under various aggregation time.

Groups	Treatment time		
	24 hr	48 hr	72 hr
A β 1-40	100.2 \pm 0.5	100.4 \pm 2.3	100.3 \pm 0.3
<i>C. asiatica</i> A 500	106.2 \pm 2.3	102.4 \pm 1.9	101.2 \pm 2.3
<i>C. asiatica</i> A 250	104.1 \pm 6.1	116.5 \pm 5.2	112.4 \pm 4.1
<i>C. asiatica</i> A 100	99.7 \pm 3.2	118.2 \pm 4.5	110.2 \pm 3.4
<i>C. asiatica</i> A 50	115.3 \pm 2.4	121.1 \pm 2.2	116.4 \pm 5.2
<i>C. asiatica</i> A 10	101.5 \pm 3.6	118.4 \pm 4.6	109.5 \pm 6.2
<i>C. asiatica</i> F 500	118.5 \pm 2.7	114.5 \pm 3.2	120.1 \pm 5.3
<i>C. asiatica</i> F 250	98.6 \pm 5.1	114.1 \pm 1.8	126.3 \pm 9.1
<i>C. asiatica</i> F 100	106.6 \pm 9.1	119.2 \pm 4.3	121.2 \pm 4.6
<i>C. asiatica</i> F 50	118.1 \pm 3.5	121.4 \pm 2.6	136.2 \pm 3.7
<i>C. asiatica</i> F 10	102.7 \pm 5.7	109.2 \pm 3.1	106.5 \pm 2.8
<i>C. pinnatifida</i> A 500	110.8 \pm 9.1	106.1 \pm 4.4	104.2 \pm 4.3
<i>C. pinnatifida</i> A 250	116.5 \pm 4.5	116.7 \pm 7.1	97.4 \pm 5.2
<i>C. pinnatifida</i> A 100	118.2 \pm 2.8	108.3 \pm 5.5	98.2 \pm 9.1

1. Abbreviation meaning of each group is shown in Table 4. 14.

2004)。雷公根 20% 酒精萃取物與聚合 $A\beta_{1-40}$ 共處理 IMR 32 細胞 24 小時，細胞中 SOD 活性分析，如圖 4.7A 聚合 $A\beta_{1-40}$ 處理之細胞 SOD 活性下降約 40%，與未經處理組有顯著差異 ($p < 0.05$)。雷公根 20% 酒精萃取物在三個劑量下皆可提升 SOD 的活性，幫助代謝因聚合 $A\beta_{1-40}$ 產生的超氧陰離子，顯示雷公根 20% 酒精萃取物透過調控 SOD 活性以清除 $A\beta_{1-40}$ 產生之超氧陰離子。

(二) Catalase 活性分析

Catalase 是細胞中代謝 H_2O_2 的酵素之一，可將 H_2O_2 代謝成無毒性的水分子，防禦細胞受到 H_2O_2 的氧化性攻擊，雷公根 20% 酒精萃取物與聚合 $A\beta_{1-40}$ 共處理 IMR 32 細胞 24 小時，細胞中 catalase 活性分析，如圖 4.7B 所示。結果顯示經 2 μM 聚合 $A\beta_{1-40}$ 處理之 IMR 32 細胞 catalase 活性下降約 40%，與未經處理組有顯著差異 ($p < 0.05$)。表示聚合 $A\beta_{1-40}$ 會引起氧化壓力使 catalase 活性下降，加入雷公根 20% 酒精萃取物則可提升 catalase 活性，在 50 及 100 $\mu g/mL$ 組別則可更進一步提升 15 % catalase 活性，顯示雷公根 20% 酒精萃取物可以透過提昇 catalase 活性將聚合 $A\beta_{1-40}$ 產生之 H_2O_2 代謝清除。

(三) GPx 與 GR 活性分析

GPx 與 GR 為細胞中另一代謝 H_2O_2 之酵素，GPx 可將 H_2O_2 轉化成無毒性之水分子，並消耗兩個 GSH，轉變成 GSSG。而 GR 可將 GSSG 再度轉化具有抗氧化功能之 GSH。雷公根 20% 酒精萃取物與聚合 $A\beta_{1-40}$ 共處理 IMR 32 細胞 24 小時，細胞中 GPx 與 GR 活性分析，如圖 4.8 所示。結果顯示經聚合 $A\beta_{1-40}$ 處理之細胞中 GPx 與 GR 兩者活性不會明顯上升，但經過雷公根 20% 酒精萃取物處理後，GPx 與 GR 酵素活性明顯上升，顯示雖聚合 $A\beta_{1-40}$ 處理後不影響細胞中 GPx 與 GR 酵素活性，但雷公根 20% 酒精萃取物仍可以提升 GPx 與 GR 酵素活性，加速 GPx 與 GR 效率，提升 GSH 的轉換速率，幫助細胞代謝多餘的 H_2O_2 。

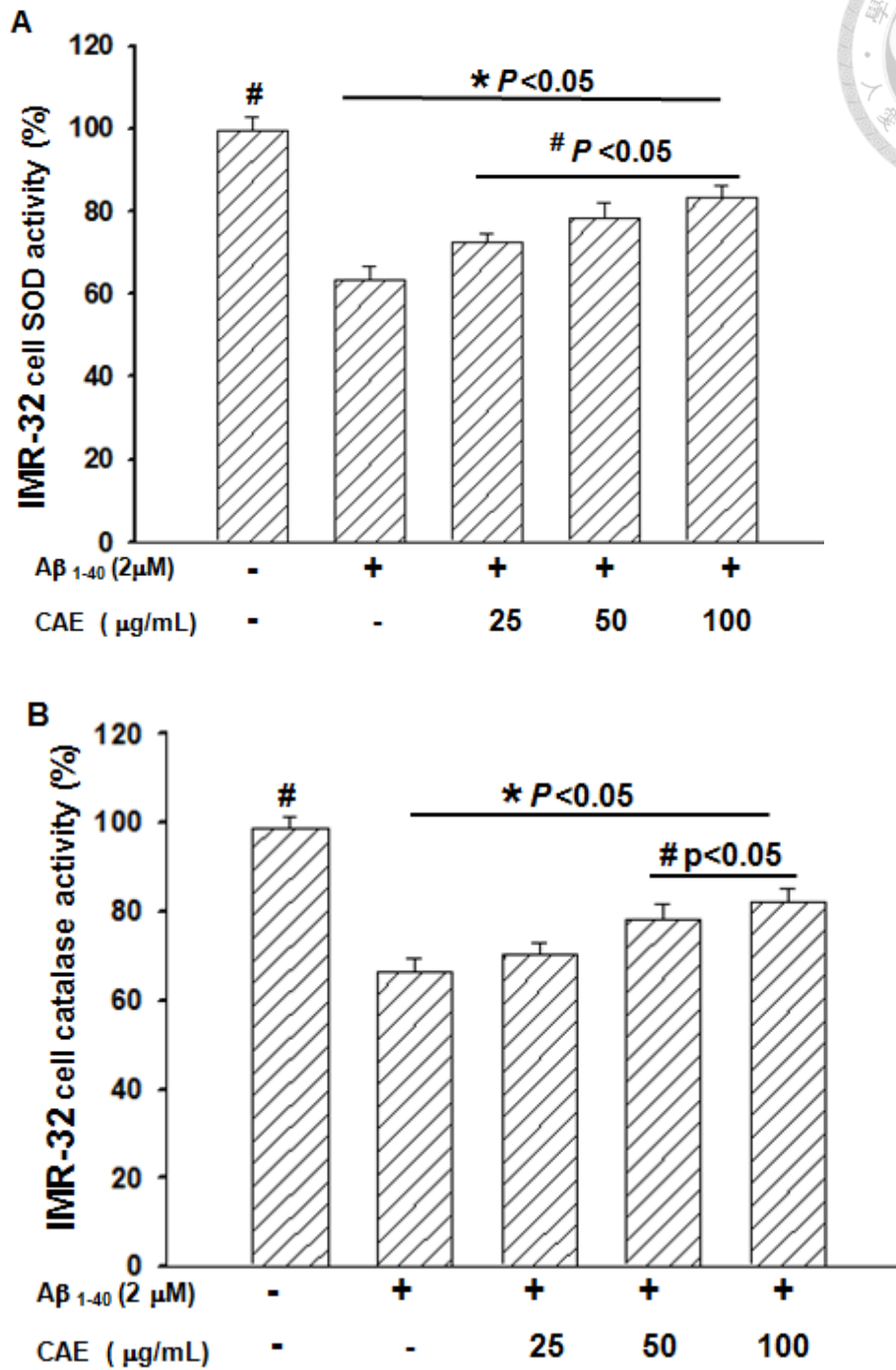


圖 4.7 雷公根 20% 酒精萃取物萃取物與聚合 $A\beta_{1-40}$ 共處理對 IMR 32 細胞中 SOD (A) 與 catalase (B) 活性之影響。

Fig. 4.7 Effect of CAE on SOD (A) and catalase (B) activities in $A\beta_{1-40}$ -treated cells.

SOD : superoxide dismutase. Values are expressed as mean \pm SD (n = 6). * $P < 0.05$ compared to control, # $P < 0.05$ compared to $A\beta_{1-40}$ treatment alone.

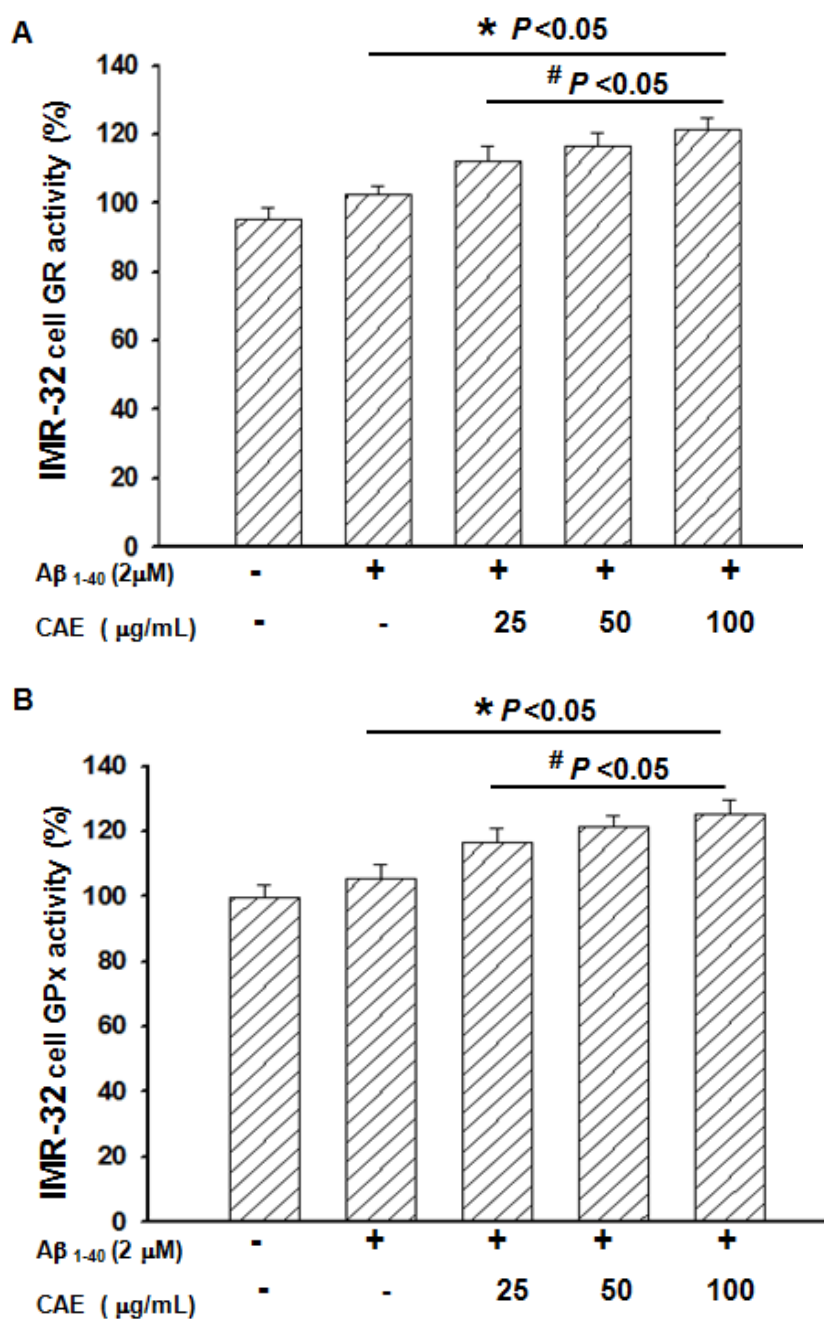


圖 4.8 雷公根 20% 酒精萃取物萃取物與聚合 Aβ₁₋₄₀ 共處理對 IMR 32 細胞中 GR (A) 與 GPx (B) 活性之影響。

Figure 4.8. The GR (A) and GPx (B) activity of *C. asiatica* A group extracts co-treated with Aβ₁₋₄₀ on IMR 32 cells.

GR: glutathione reductase, GPx: glutathione peroxidase. Values are expressed as mean ± SD (n = 6). * $P < 0.05$ compared to control, # $P < 0.05$ compared to Aβ₁₋₄₀ treatment alone.

(四) GSH 與 GSSG 含量分析

GSH 是一種水溶性抗氧化物質，除了可協同 GPx 清除體內 H_2O_2 外，亦可與自由基直接反應，將其轉成無毒性之物質。而 GSSG 則是 GSH 經 GPx 代謝後產物。由於體內 GSH 和 GSSG 比值會維持在一定值，當生物物體處於氧化壓力情形下，會促使 GSH 和氧化物質反應，增加 GSSG 含量。造成 GSH/GSSG 比值下降。因此 GSH/GSSG 比值可當作反應細胞氧化壓力程度指標。

由圖 4.9 中得知，IMR 32 細胞經過聚合 $A\beta_{1-40}$ 處理 24 小時，會使細胞中 GSH 含量下降，GSSG 含量上升，表示細胞中產生氧化性分子，會與 GSH 反應降低 GSH 含量，生成 GSSG。因此造成氧化壓力指標 GSH/GSSG 比值從 34.3 下降到 19.2。而投予 25、50 或 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 劑量之雷公根 A 組萃取物則均可提升 GSH 含量，同時也隨劑量提高降低 GSSG 的含量，顯示雷公根可透過提升 GPx 與 GR 酵素系統加速移除 $A\beta_{1-40}$ 產生的氧化性物質，因此使細胞氧化性指標 GSH/GSSG 比值隨著劑量上升而有逐步改善情形。

六、基原鑑定

(一) 雷公根之外觀鑑定與組織切片鑑定

1. 雷公根之外觀鑑定

圖 4.10 (a) 顯示雷公根從外觀上來看，為捲縮成團狀之乾燥全草。莖細長彎曲，黃棕色，有細縱皺紋，節上長著生鬚狀根。果實如圖 4.10 (b) 所示為雙懸果扁圓形，有明顯隆起的細網路，果梗甚短。葉展平後如圖 4.10 (c) 所示，呈現近圓形或腎形，灰綠色，邊緣有粗鈍齒，葉柄長 3-6 cm。

2. 雷公根之組織切片鑑定

從莖橫切面分析，圖 4.11 (a) 與 (c) 顯示表皮細胞類圓形或方形，下方為 2 至 4 列厚角細胞。由圖 4.11 (a) 與 (b) 可得知具 6 至 8 個外韌型維管束，韌皮部位於

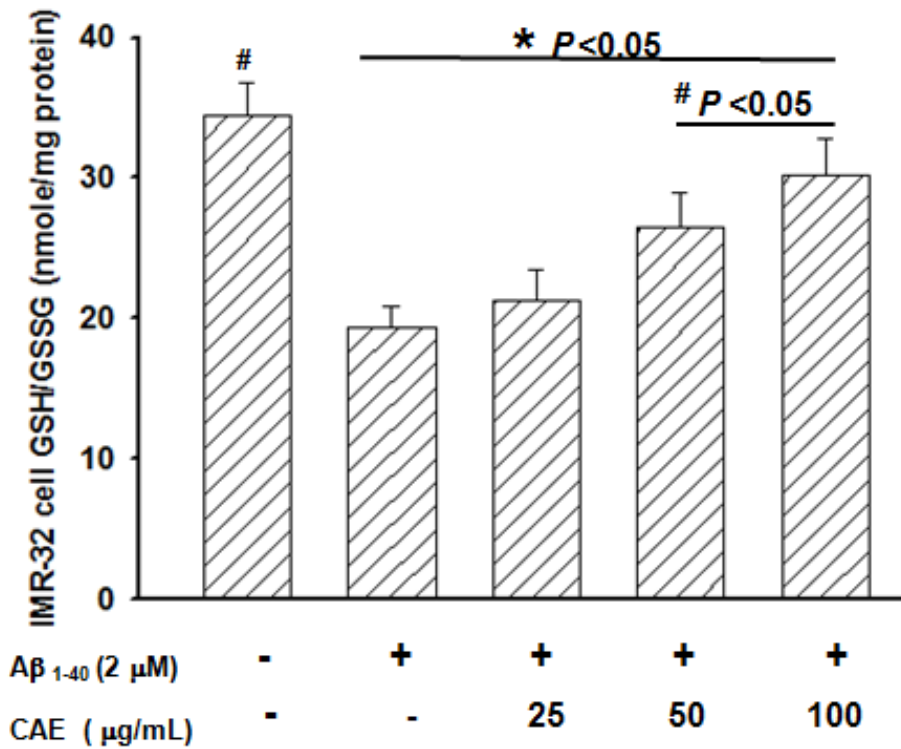


圖 4.9 雷公根 20% 酒精萃取物萃取物與聚合 Aβ₁₋₄₀ 共處理對 IMR 32 細胞中 GSH/GSSG 比值之影響。

Figure 4.9. The GSH/GSSG ratio of *C. asiatica* A group extracts co-treated with Aβ₁₋₄₀ on IMR 32 cells.

GSH: glutathione, GSSG: oxidized glutathione. Values are expressed as mean ± SD (n = 6).

* $P < 0.05$ compared to control, # $P < 0.05$ compared to Aβ₁₋₄₀ treatment alone.

(a)



(b)



1 mm

(c)



5 mm

圖 4.10、雷公根外觀 (a) 全草 (b) 果實 (c) 葉。

Figure 4.10. Appearance of *Centella asiatica* (a) whole herb (b) fruit (c) leaf.

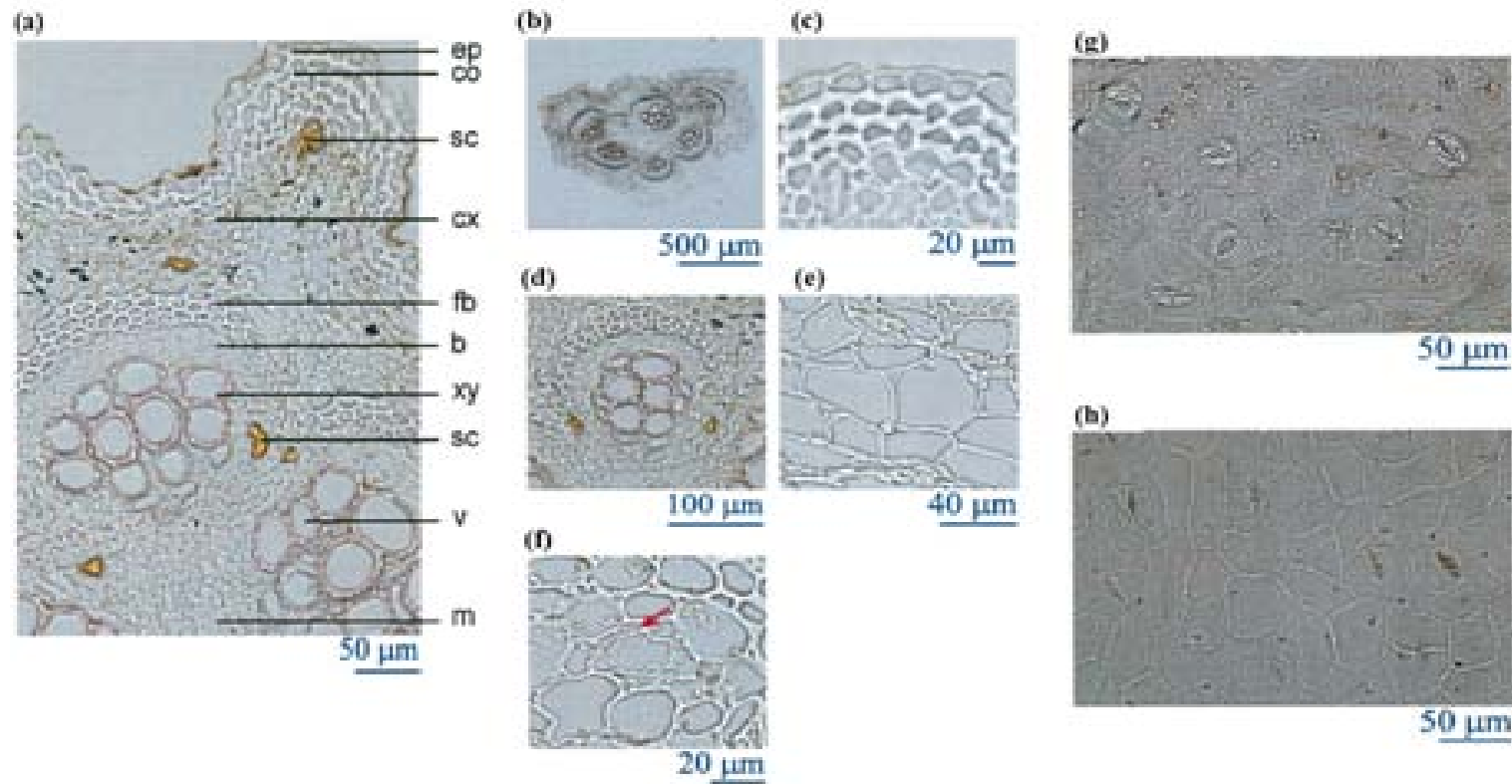


圖 4.11 雷公根之組織切片。(a) 莖組織 (b) 莖橫切面 (c) 莖內表皮及後角細胞 (d) 外韌型維管束 (e) 莖內髓部 (f) 經內分泌道 (g) 上表皮細胞與氣孔 (葉) (h) 下表皮細胞與氣孔 (葉)。

Fig. 4.11. *Centella asiatica* in tissue sections. (a) stem tissues (b) transverse section of stem (c) epidermis and collenchyma cell in stem (d) collateral vascular bundle (e) m in stem (f) secretory canal in stem (g) upper epidermis cells and stomata in leaf (h) lower epidermis cells and stomata in leaf.

木質部外側。韌皮部外側為纖維群，木質部導管徑向排列 (radically arranged)，如圖 4.11 (a) 與 (d) 所示。髓部較大如圖 4.11 (b) 與 (e) 所示。由圖 4.11 (a) 與 (f) 可知皮層和射線中可見分泌道，直徑 23 至 34 μm ，周圍分泌細胞 5 至 7 個。從葉表面切片分析，由圖 4.11 (g) 與 (h) 可得知上下表皮細胞均呈多邊形，上表皮氣孔較下表皮多。

(二) 酸棗仁之外觀鑑定與組織切片鑑定

1. 酸棗仁之外觀鑑定

酸棗仁外觀為扁圓形或扁橢圓形，長 5 至 9 mm，寬 4 至 7 mm，厚約 3 mm。表面為紫色或紫褐色，平滑，有光澤，部分有裂紋；部份酸棗仁兩面均成圓隆狀突起，另一部分一面較平坦，中央有一條隆起的縱線紋，另面稍凸起。種子一端凹陷，可見線型種臍，另端有細小突起合點 (圖 4.12)。

2. 酸棗仁之組織切片鑑定

由圖 4.13 (a) 與 (c) 可知種皮最外為一系列黃色或棕黃色的柵狀細胞，柵狀細胞靠外側有一條明顯的光輝帶，營養層細胞扁縮頹廢，呈棕色。由圖 4.14 (a) 可知胚乳細胞類多角形，圖 4.14 (a) 中以碘試液染胚乳細胞，可以觀察到黑色的澱粉粒與大量黃棕色糊粉粒，圖 4.14 (b) 中胚乳細胞以蘇丹三號試劑染色，可觀察到大量紅色脂肪油。圖 4.14 (e) 中子葉薄壁細胞在加入碘試液可觀察到大量黃棕色糊粉液，圖 4.14 (f) 中加入蘇丹三號的子葉薄壁細胞可觀察到大量紅色脂肪油。

由圖 4.14 (c) 與 (d) 發現子葉中可見維管束，以偏光顯微鏡觀察子葉，如圖 4.14 (g) 與 (h) 所示，子葉細胞間有許多白色亮點，為草酸鈣晶，形成環狀，直徑約 3 至 5 μm 。市場上常用酸棗仁同屬植物滇棗仁 *Ziziphus mauritiana* Lam. 種子混充酸棗仁使用。在台灣北、中、南隨機抽樣 50 件檢體中，32 件 (64%) 為正品 *Semen Zizyphi spinosae*，18 件 (36%) 誤用，誤用品皆為 *Ziziphus mauritiana* Lam. (陳等, 2011)。兩者間最大差異為在子葉細



(b)

(c)



1000 μm



1000 μm

圖 4.12 酸棗仁外觀 (a) 數顆 (b) 單顆一面 (c) 單顆另一面。

Figure 4.12. Appearance of Semen *Zizyphi spinosae* (a) semem granules (b) one side (c) the other side.

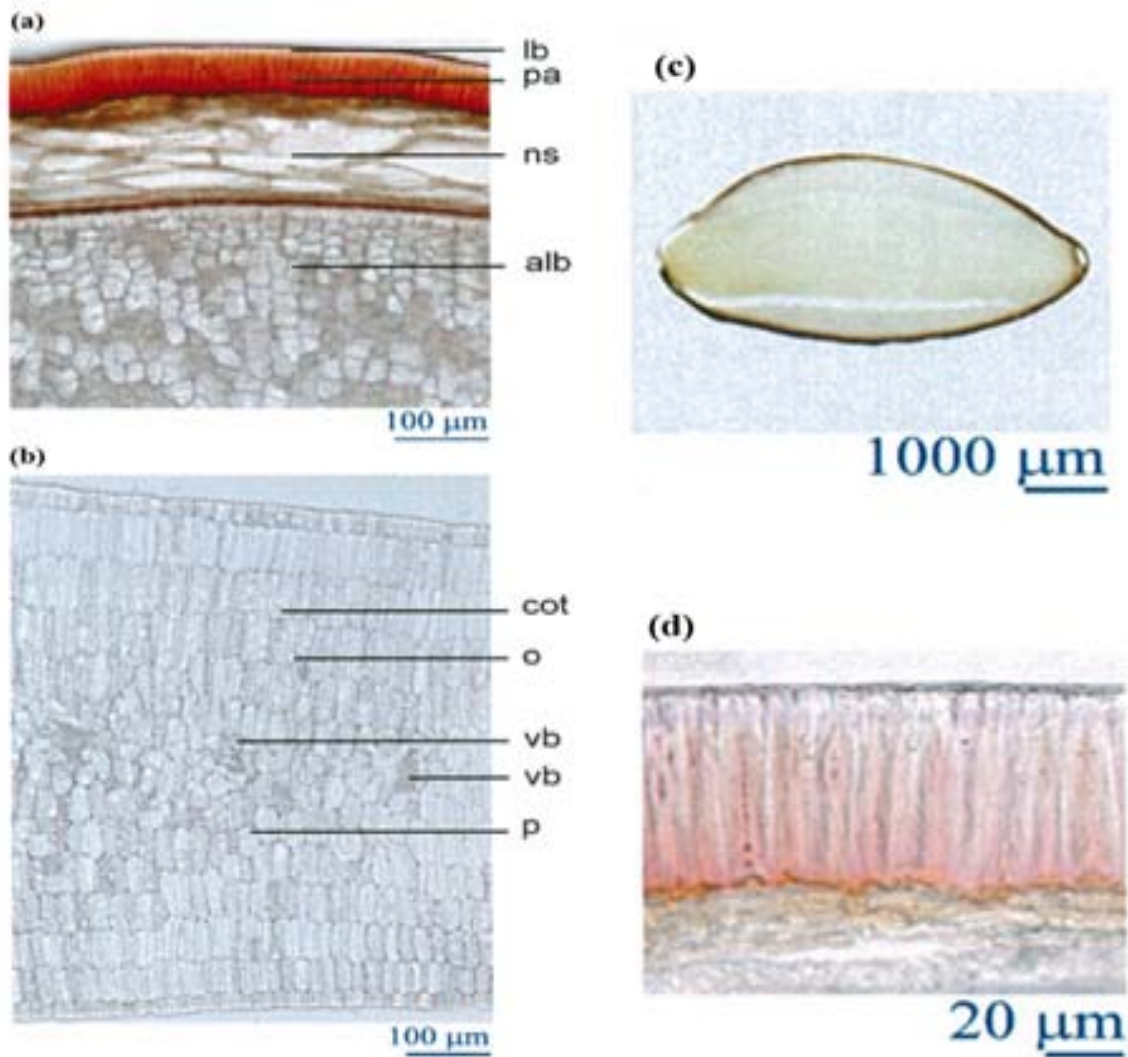


圖 4.13 酸棗仁之組織切片。(a) 種子橫切面 (b) 子葉橫切面 (c) 藥材橫切面 (d) 種皮內
柵狀細胞。

Fig. 4.13. Semen *Zizyphi spinosae* in tissue sections. (a) transverse section of seed (b)
transverse section of cotyledon (c) transverse section of Semen *Zizyphi spinosae* (d) pslisade cells
in seed coat.

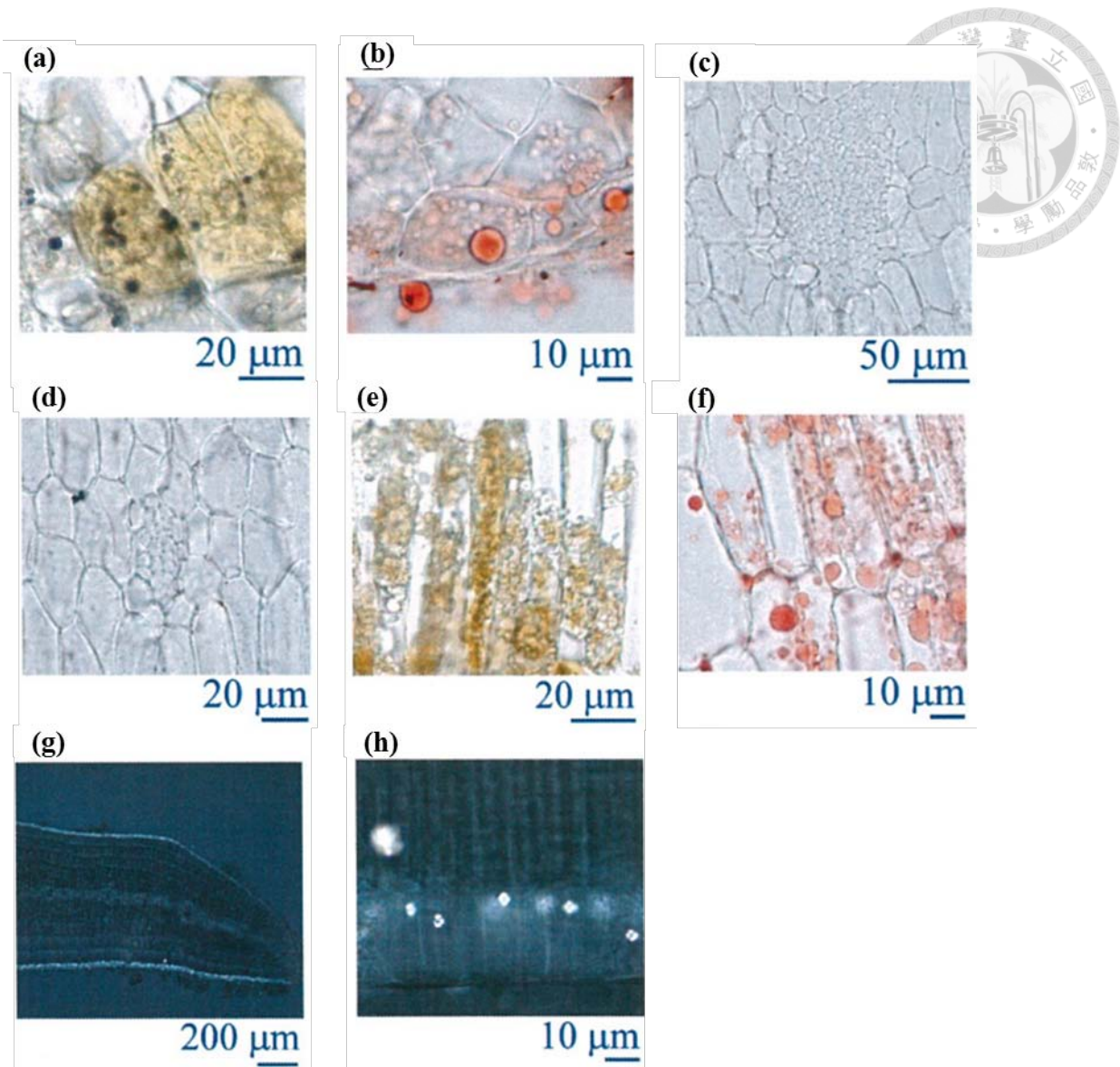


圖 4.14 酸棗仁之組織切片。(a) 胚乳內澱粉粒及糊粉粒 (b) 胚乳內脂肪油 (c) 子葉內維管束 (d) 子葉內維管束 (e) 子葉內糊粉粒 (f) 子葉內脂肪油 (g) 子葉內草酸鈣結晶 (h) 子葉內草酸鈣結晶。將酸棗仁製成切片後於顯微鏡下觀察。(a) 與 (e) 加入澱粉液 (b) 與 (f) 加入蘇丹三號溶液 (g) 與 (h) 以偏光顯微鏡觀察。

Figure 4.14. Semen *Zizyphi spinosae* in tissue sections. (a) starch grains and ag in alb (b) fatty oil in alb (c) vb in cot (d) vb in cot (e) ag in cot (f) fatty oil in cot (g) calcium oxalate crystals in cot (h) calcium oxalate crystals in cot. Observe the slide which made from Semen *Zizyphi spinosae*. (a) and (e) adding starch (b) and (f) adding sudan III (g) and (h) observing by polarizing microscope.

胞中，滇棗仁無草酸鈣結晶，而酸棗仁種子子葉細胞間含草酸鈣結晶（陳等, 2011）。而本研究室樣品含有草酸鈣結晶為正品。



(三) 雷公根與酸棗仁之 DNA 鑑定

不同品系間的 DNA 在特定序列具有差異性，藉由比較此差異性可作為基原鑑定方式。DNA 定序方法最大的特色在於可直接檢測品系之間的遺傳差異性是基於哪些鹼基的遺傳變異。植物細胞核內核糖體 RNA 組成中的 18S 與 26S rDNA 間之 DNA 序列做為主要定序區間，此區間 DNA 序列主要包含 ITS，在植物屬間或種間具有一定的變異性，可作為基原鑑定。由美國國家生物科技資料中心 (national center for biotechnology information, NCBI) 資料庫中比對雷公根之 ITS 序列如表 4.17，酸棗仁之 ITS 如表 4.18，根據 ITS 序列比對結果證實雷公根與酸棗仁皆為正品。

七、雷公根 20 %、酸棗仁 40 % 酒精萃取物與 RMD 改善阿茲海默症與記憶學習之體內動物試驗

(一) 實驗動物體重與攝食量之變化

實驗動物經由預養至 300 g 後，進行 4 週之動物實驗。試驗期間之體重如表 4.19 所示，由結果可知各組實驗動物在試驗過程中其體重均隨著時間而正常增加，且試驗期間各組實驗動物之外觀與健康情況均相當良好，並無明顯差異。

(二) 記憶學習能力試驗

1. 被動迴避試驗 (passive avoidance test) 分析

被動迴避試驗為記憶學習能力的評估方法之一，係測定進入暗室前停留於明室的時間，若在明室停留時間超過 300 秒則認定為記憶正常。本試驗以 $A\beta_{1-40}$ 輸注至大鼠腦部



表 4.17、雷公根之 ITS 序列

Table 4.17. The ITS sequence of *Centella asiatica*

No.	Sequence
1	gtcgaaacct gcaccgcaaa cgaccgcga acacgtaaag caacacgggg cgagcggctc
61	ccggggcgcg agcccctcgg gccgcgaacc cacggacggg gtctcctc gggcgtcccc
121	cgccggcta accaaccg gcgcggcaag cgccaaggaa tcaagaaccg aacgaggccg
181	tctctcccc gttcgcgggc ggcggaggcg tctgtccga aaaacaaac gactctcggc
241	aacggatc tcggtctc catcgatgaa gaacgtagcg aaatgcgata cttggtgta
301	attgcagaat cccgtgaacc atcgagtctt tgaacgcaag ttgcgccga agccactcgg
361	ccgagggcac gtctgcctgg gcgtcacgca tcgctcgc cccccacc gtcggcctcg
421	aaaggggtcg gggcggagg ggcgagaatg gcctcccgtg cctcggggcg cggttggccc
481	aaacgtcagc ccgcggcgac ggacgtcag acaagtgggtg gttgtcaaag gccctcgc
541	gttgctgctg ggtgatccgt cgtcggcgtg agctcgtg acctgttgc cacgccgtgc
601	tcggcgcg ctccgaccg gacccc



表 4.18、酸棗仁之 ITS 序列

Table 4.18. The ITS sequence of Semen *Zizyphi spinosae*

No.	Sequence
1	tccgtaggtg aacctgcgga aggatcattg tcgaaacctg cccagcagaa caaccagcga
61	accctggaat aacacatcgg ggaccccggg gccctgtgtc ccggagcctt ccttggtcgg
121	gggtctgcac ctgcgcctc gccctgat gcgcggttc agccttccg gccgcacaaa
181	cgaaccccgg cgcaaaccgc gccaaaggaac acctaacgaa ttggcattca cccccgcc
241	cggagacggt gtgcggtcgg ggtgtcgtc gtatttcta ttgtaatgtc aaaacgactc
301	tggcaacgg atatctcggc tctcgcacg atgaagaac tagcgaaatg cgatacttg
361	tgtgaattgc agaatcccgt gaaccatcga gttttgaac gcaagttgcg cccgaagcca
421	ttaggccgag ggcacgtctg cctgggcgtc acacaacgtt gcccccatc ccaacctcga
481	cctcagggcg aagagggggc ggatgctggc ctcccgtgtg ccacggtcg cggttgccg
541	aaatacgggt ccccggcgac gagtgccgca gcaatcgggt gttgtccaac cctcggctcc
601	ctgtcgtgtg cgcggatcgc tgctcgggcc ctacagagac ccaatgcgc tgccaatg
661	gcgtctcaa cgcgaccca ggtcaggcgg ggctaccgc tgagttaag catatcaata
721	agcggagga

表 4.19、餵飼不同劑量雷公根 20%、酸棗仁 40% 酒精萃取物與紅麴山藥對於大鼠每週平均體重之影響



Table 4.19. The effect of *Centella asiatica*, Semen *Zizyphi spinosae* ethanol extract or RMD on experimental AD rat's body weight

	0th week	1st week	2nd week	3rd week	4th week
	Body weight (g)				
N	316.3±4.3	336.3±7.3	356.3±6.7	387.0±2.8	414.6±3.2
A	313.6±4.0	337.2±7.6	354.6±6.5	385.2±5.0	413.7±4.5
AM	317.8±6.0	332.4±6.5	355.8±5.7	387.4±6.5	415.3±8.1
AC0.5	314.8±7.2	336.7±3.5	354.8±4.3	387.5±8.7	413.9±8.4
AC1	315.3±5.2	334.6±5.3	356.3±7.5	387.1±3.2	414.6±5.5
AC5	316.4±5.2	336.4±6.3	356.4±7.6	386.2±5.3	413.6±5.2
AZ0.5	312.8±6.2	338.7±3.7	357.8±6.4	387.5±8.7	412.9±8.4
AZ1	313.3±7.2	334.6±5.8	357.3±4.2	387.1±3.2	413.6±5.3
AZ5	316.4±5.2	332.4±6.6	354.4±6.4	386.2±5.3	414.6±5.3
AR1	315.3±6.2	334.5±5.3	356.2±4.7	387.2±2.7	418.5±6.2
AR2	312.2±4.4	336.1±5.8	357.3±3.2	386.9±4.2	414.7±5.6
AR5	314.4±4.2	334.5±6.2	356.2±4.2	386.7±2.3	415.2±4.8

1. N: normal rat; A: amyloid beta injection and normal diet; AM: amyloid beta injection and Donepezil HCl drug (1X, 0.52 mg/day/kg bw); AC0.5: amyloid beta injection and *Centella asiatica* (0.5X); AC1: amyloid beta injection and *Centella asiatica* (1X); AC5: amyloid beta injection and *Centella asiatica* (5X); AZ0.5: amyloid beta injection and Semen *Zizyphi spinosae* (0.5X); AZ1: amyloid beta injection and Semen *Zizyphi spinosae* (1X); AZ5: amyloid beta injection and Semen *Zizyphi spinosae* (5X) AR1: amyloid beta injection and red mold dioscorea (1X, 193.48 mg/day/kg bw); AR2: amyloid beta injection and red mold dioscorea (2X, 386.96 mg/day/kg bw); AR5: amyloid beta injection and red mold dioscorea (5X, 967.40 mg/day/kg bw). Each value is expressed as mean ± SD (n=9).

引發阿茲海默症做為模式動物，評估雷公根 20 %、酸棗仁 40 % 酒精萃取物與 RMD 對預防阿茲海默症的效果。

大鼠性喜暗處，因此正常大鼠在明暗選擇狀況下會選擇進入暗處，但經過暗室通電電擊訓練後，大鼠會記憶在暗處被電擊的經驗故會停留於明室。由圖 4.15 可得知：類澱粉樣蛋白輸注 (A) 組，在電擊訓練後 24 小時試驗，大鼠於明室停留 218 秒後進入暗室，電擊訓練後 48 及 72 小時試驗，大鼠分別在明室停留 160 及 114 秒就進入暗室，推論以類澱粉樣蛋白輸注誘導造成大鼠的海馬迴受損而影響記憶，導致其忘記暗室通電的記憶經驗。

藥物組 (AM) 在電擊訓練後 24、48、72 小時試驗，於明室停留時間分別為 226、176、123 秒，明顯提升在明室滯留時間。當分別餵飼雷公根 20 % 酒精萃取物 0.5 (AC0.5)、1 (AC 1)、5 (AC 5) 倍劑量、酸棗仁 40 % 酒精萃取物 0.5 (AZ0.5)、1 (AZ 1) 與 5 (AZ 5) 倍劑量與 RMD 1 (AR1)、2 (AR2) 、5 (AR5) 倍劑量，電擊 24 小時後於明室停留時間雷公根組為 236、244 與 253 秒，酸棗仁組為 224、237 與 257 秒，RMD 組為 264、268 與 273 秒。過了 48 小時，餵飼雷公根 20 % 酒精萃取物、酸棗仁 40 % 酒精萃取物與 RMD 各劑量組，於明室停留皆超過 202 秒以上且與 A 組具有顯著差異 ($p < 0.05$)。在電擊後 72 小時，餵飼雷公根組於明室停留時間分別為 156、176 與 184 秒，酸棗仁組於明室停留時間分別為 168、187 與 203 秒，RMD 組 158、176 與 221 秒其中以 RMD 五倍劑量組效果最顯著，與類澱粉樣蛋白輸注組比較，於明室停留時間增加了 79.7 %，其他各組則明顯比 A 組提升在明室滯留期間且具有顯著差異 ($p < 0.05$)。

2. 參考記憶試驗 (reference memory task) 分析

參考記憶試驗乃於游泳水槽中固定位置放置休息平台，大鼠參考周圍影像並根據經驗記憶平台位置，大鼠每天在訓練四次後可以記憶平台方位及所在象限，在連續訓練三天後，再以空間性探索試驗依照大鼠在各個象限的停留時間，探討大鼠是否具有前三天的空間記

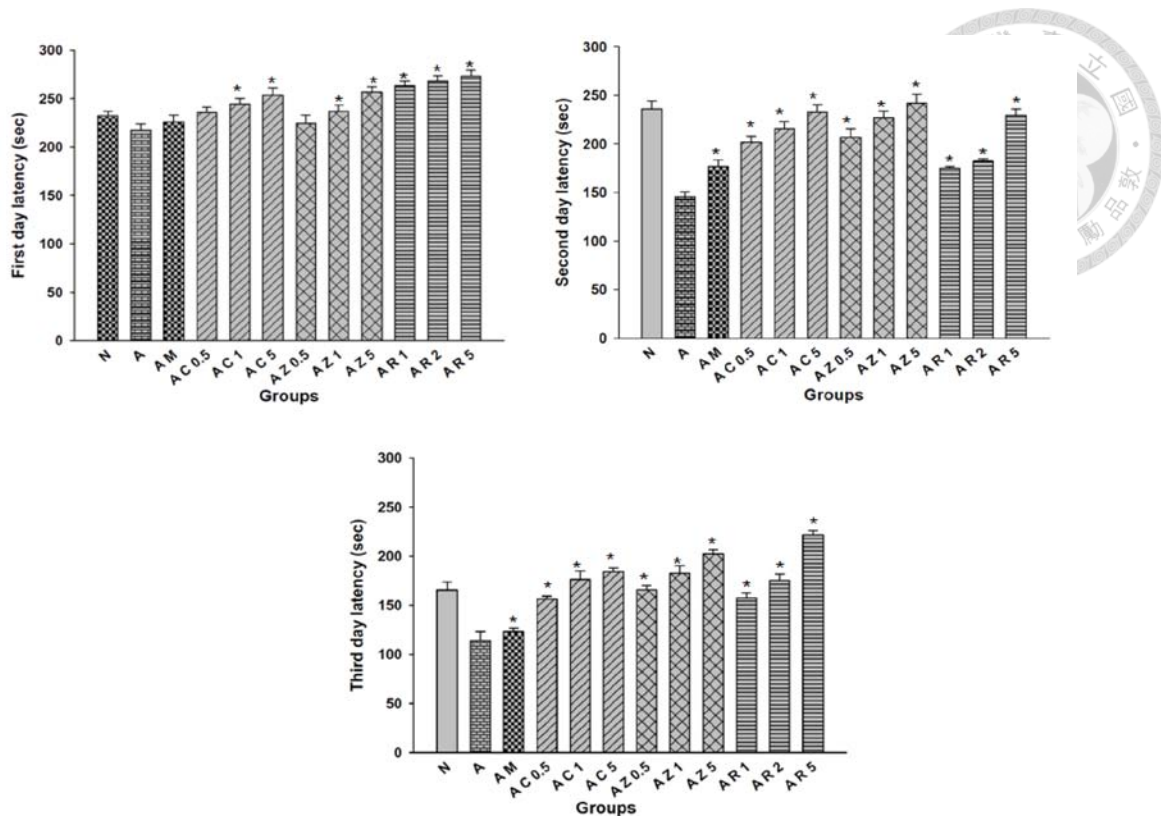


圖 4.15、餵飼不同劑量雷公根 20%、酸棗仁 40% 酒精萃取物與紅麴山藥在被动迴避試驗中大鼠經電擊訓練後於不同天數於明室停留時間。

Fig. 4.15. Effect of *Centella asiatica*, *Semen Zizyphi spinosae* ethanol extract or RMD on memory and learning ability in passive avoidance task in the AD rats.

1. N: normal diet; A: amyloid beta injection and normal diet; AM: amyloid beta injection and Donepezil HCl drug (1X, 0.52 mg/day/kg bw); AC0.5: amyloid beta injection and *Centella asiatica* (0.5X); AC1: amyloid beta injection and *Centella asiatica* (1X); AC5: amyloid beta injection and *Centella asiatica* (5X); AZ0.5: amyloid beta injection and *Zinziphi spinoase* (0.5X); AZ1: amyloid beta injection and *Zinziphi spinoase* (1X); AZ5: amyloid beta injection and *Zinziphi spinoase* (5X) N: normal rat; NC0.5: normal rat and *Centella asiatica* (0.5X); NC1: normal rat and *Centella asiatica* (1X); NC5: normal rat and *Centella asiatica* (5X); NZ0.5: normal rat and *Zinziphi spinoase* (0.5X); NZ1: normal rat and *Zinziphi spinoase* (1X); NZ5: normal rat and *Zinziphi spinoase* (5X); AR1: amyloid beta injection and red mold dioscorea (1X, 193.48 mg/day/kg bw); AR2: amyloid beta injection and red mold dioscorea (2X, 386.96 mg/day/kg bw); AR5: amyloid beta injection and red mold dioscorea (5X, 967.40 mg/day/kg bw).

2. Each value is expressed as mean \pm SD (n=9). *Significantly different (p<0.05) vs. the amyloid beta injection group

憶。以上兩項記憶內容，由印象的深刻程度逐漸縮小搜尋方式與範圍，因此經過三天的練習由大鼠在空間探測試驗的軌跡圖以及在各個象限（方位）停留的時間，可以大致了解大鼠個體的記憶能力與方向學習能力。經餵飼不同劑量雷公根 20%、酸棗仁 40% 酒精萃取物與 RMD，於第 22 日給予持續 3 天的 Morris 水迷宮參考記憶訓練，訓練大鼠在 90 秒內找到水下平台的空間記憶學習能力。

由圖 4.16 得知第一天訓練，A 組的平均逃脫潛伏期（尋找休息平台時間）是 54.6 秒、AM 組為 47.1 秒，類澱粉樣蛋白輸注並餵飼雷公根 20%、酸棗仁 40% 酒精萃取物與 RMD 各劑量組 AC0.5、AC1、AC5; AZ0.5、AZ1、AZ5; AR1、AR2 與 AR5，分別為是 43.3、39.5、36.7; 42.8、40.5、36.5; 32.7、42.7 與 35.2 秒。第二天 A 組的逃脫潛伏期是 47.0 秒、AM 組為 46.8 秒、類澱粉樣蛋白輸注並餵飼雷公根 20%、酸棗仁 40% 酒精萃取物與 RMD 各劑量組分別為是 42.3、39.2、30.9、41.3、39.2、30.7; 42.1、39.2 與 33.9 秒。第三天 A 組的逃脫潛伏期是 39.9 秒、AM 組為 33.1 秒、類澱粉樣蛋白輸注並餵飼雷公根 20%、酸棗仁 40% 酒精萃取物與 RMD 各劑量組，分別為是 28.8、26.7、25.7; 28.8、27.7、25.5; 25.7、23.6 與 22.1 秒。統計結果發現於相同的訓練天數，第一天訓練餵飼雷公根 20%、酸棗仁 40% 酒精萃取物與 RMD 一倍劑量以上，各組大鼠的逃脫潛伏期與 A 組均有顯著的差異 ($P < 0.05$)，但是類澱粉樣蛋白輸注並餵飼雷公根 20%、酸棗仁 40% 酒精萃取物與 RMD 各劑量組別間並無顯著差異，表示各不同劑量組在同一天的訓練中找到平台的能力很相近。隨著訓練天數的增加，每組大鼠的學習記憶的行為皆表現出有明顯的改善降低了逃脫潛伏期。在訓練進入第二天之後，比其第一天者均減少尋找逃逸平台時間，對照組找到平台的時間也明顯縮短，但減少的程度不如餵飼雷公根 20%、酸棗仁 40% 酒精萃取物，與 RMD 各個劑量組明顯。進入第三天訓練期，類澱粉樣蛋白輸注並餵飼雷公根 20%、酸棗仁 40% 酒精萃取物與 RMD 各劑量組、對照組找到平台的能力仍逐漸增進中，統計結果也顯示組別與訓練天數具有交互作用，意謂學習行為因訓練天數而有改善的效果，

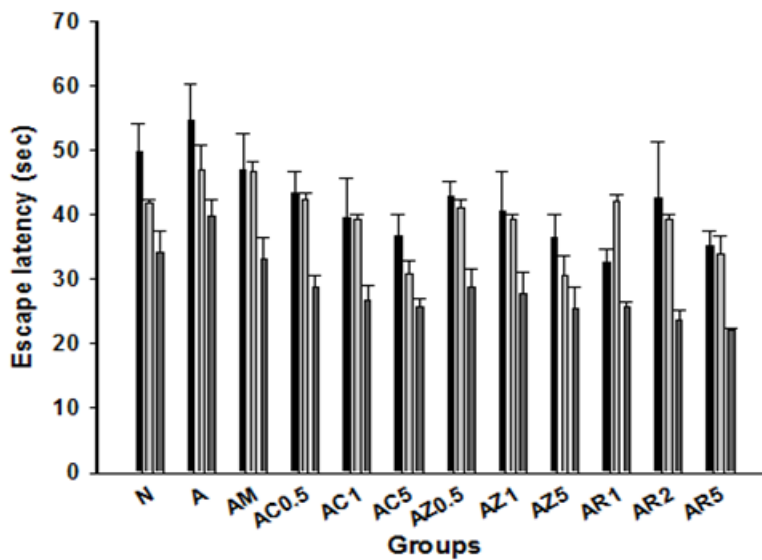


圖 4.16、餵飼不同劑量雷公根 20%、酸棗仁 40% 酒精萃取物與 RMD 在參考記憶試驗中大鼠於不同天數找到逃逸平台之游泳時間。

Fig. 4.16. Effect of *Centella asiatica*, Semen *Zizyphi spinosae* ethanol extract or RMD on memory and learning ability in different day reference memory task in AD rats

1. N: normal diet (●); A: amyloid beta injection and normal diet (○); AM: amyloid beta injection and Donepezil HCl drug (1X, 0.52 mg/day/kg bw) (▼); AC0.5: amyloid beta injection and *Centella asiatica* (0.5X) (Δ); AC1: amyloid beta injection and *Centella asiatica* (1X) (■); AC5: amyloid beta injection and *Centella asiatica* (5X) (□); AZ0.5: amyloid beta injection and *Zizyphi spinosae* (0.5X) (◆); AZ1: amyloid beta injection and *Zizyphi spinosae* (1X) (◇); AZ5: amyloid beta injection and *Zizyphi spinosae* (5X) (▲); AR1: amyloid beta injection and red mold dioscorea (1X, 193.48 mg/day/kg bw) (▽); AR2: amyloid beta injection and red mold dioscorea (2X, 386.96 mg/day/kg bw) (●); AR5: amyloid beta injection and red mold dioscorea (5X, 967.40 mg/day/kg bw) (○).

2. Each value is expressed as mean ± SD (n=9). *Significantly different (p<0.05) vs. the amyloid beta injection group.

且因餵飼雷公根 20%、酸棗仁 40% 酒精萃取物與 RMD 劑量之不同其進步幅度有所差異。

參考記憶三天訓練結果，將四個象限游泳時間總和訂為 100% 分析各組平台所在象限 (第四象限; z4) 停留時間與其他三象限平均停留時間 (az) 之相對關係。由圖 4.17 得知第一天的參考記憶試驗中正常大鼠 (N 組) az 的停留時間比例為 23.6% 於 z4 的停留時間比例為 29.3%。AC 組之停留時間比例 az 為 25.1%; z4 為 24.7%; AM 組之停留時間比例 az 為 24.1%; z4 為 27.6%; 餵飼雷公根 20%、酸棗仁 40% 酒精萃取物與 RMD 劑量各組之停留時間比例 az 為 21.6~24.6%; z4 為 29.4~33.6%。第二天的參考記憶試驗中正常大鼠 (N 組) az 的停留時間比例為 23.4% 於 z4 的停留時間比例為 29.8%。AC 組之停留時間比例 az 為 23.8%; z4 為 28.7%; AM 組之停留時間比例 az 為 24.4%; z4 為 26.7%; 餵飼雷公根 20%、酸棗仁 40% 酒精萃取物與 RMD 劑量各組之停留時間比例 az 為 21.7~24.9%; z4 為 30.3~35.5%。第三天的參考記憶試驗中正常大鼠 (N 組) az 的停留時間比例為 20.1% 於 z4 的停留時間比例為 43.3%。AC 組之停留時間比例 az 為 22.7%; z4 為 31.8%; AM 組之停留時間比例 az 為 22.7%; z4 為 32.0%; 餵飼雷公根 20%、酸棗仁 40% 酒精萃取物與 RMD 劑量各組之停留時間比例 az 為 19.4~22.9%; z4 為 31.2~35.7%。由以上結果顯示各組空間記憶的學習過程與天數之間有顯著的相關性，在 Morris 水迷宮的參考記憶學習過程中，以類澱粉樣蛋白輸注並餵飼雷公根 20% 與酸棗仁 40% 酒精萃取物與 RMD 各個劑量組與單純以類澱粉樣蛋白輸注組比較，因訓練天數的增加可以增強大鼠尋找平台的記憶能力，亦即隨著訓練天數的增加，大鼠在第四象限的停留比例也較其他三象限增加且有顯著差異。在試驗中大鼠在各個象限所停留的時間，每次訓練之間差異非常大，原因可能是大鼠經由學習與記憶造成偏向某一方位 (平台位置) 加強搜尋，透過連續訓練觀察大鼠學習與認知的傾向。由上述分析可以得知，由於休息平台置於第四象限，類澱粉樣蛋白輸注並餵飼雷公根 20%、酸棗仁 40% 酒精萃取物與 RMD 各個劑量組，相較於 A 組，可以增加大鼠於第四象限的停留時間，顯示對於大鼠在學習記憶中對於平台的認知位置有了深刻的記憶，懂得在第四象限中尋找，且改善效果有劑量關係。

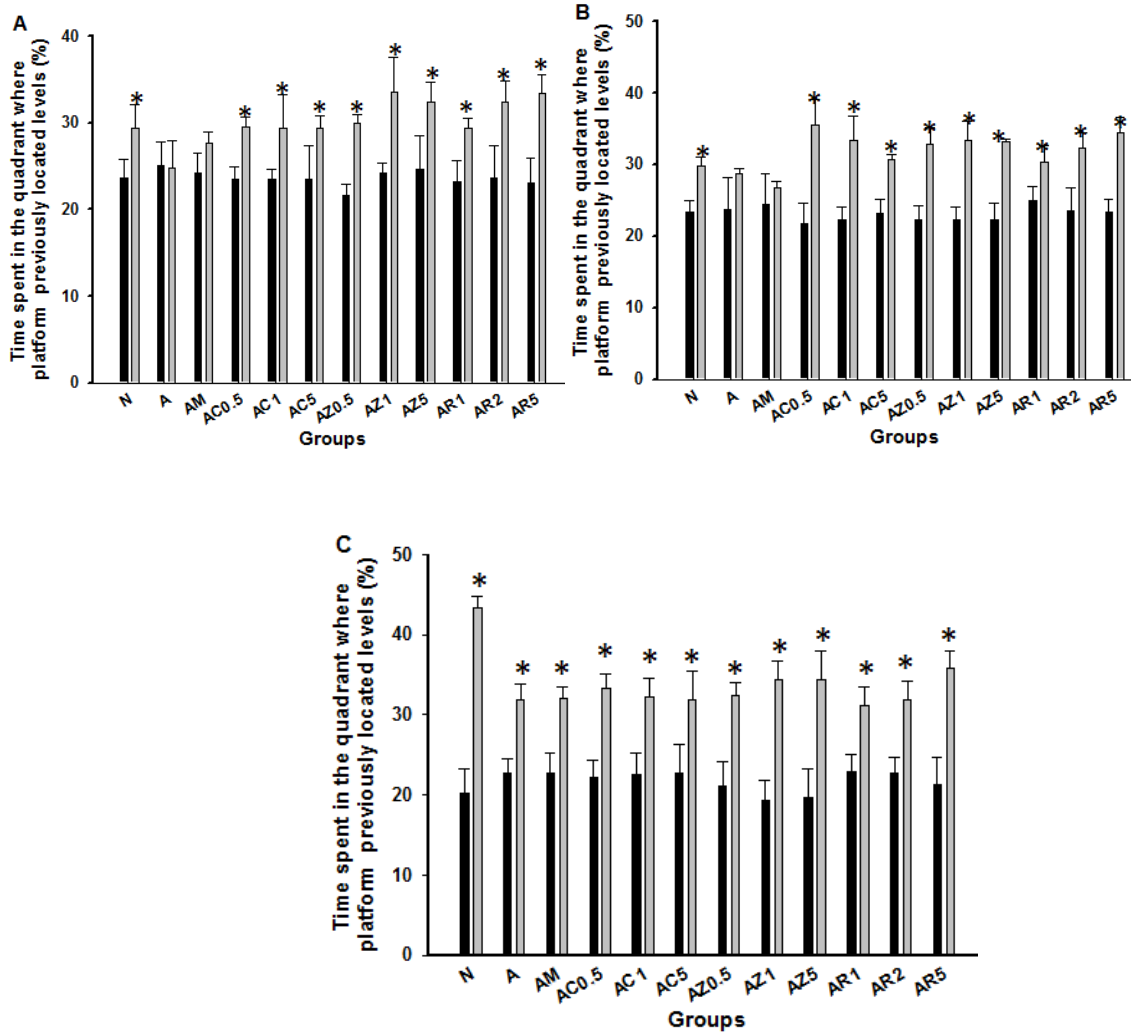


圖 4.17、餵飼不同劑量雷公根 20%、酸棗仁 40% 酒精萃取物與紅麴山藥在參考記憶試驗中大鼠於第四象限與其他三象限平均停留時間比例

Fig. 4.17. Effect of *Centella asiatica*, *Semen Zizyphi spinosae* ethanol extract or RMD on reference memory test rats in the (A) first day, (B) second day and (C) third day of zone 4 and the proportion of residence time in a the others zone average located levels.

1. Abbreviation meaning of each group is shown in Figure 4.15.

2. the others zone average; zone 4.

3. Each value is expressed as mean \pm SD (n=9). *Significantly different ($p < 0.05$) vs. the others zone average.



3. 空間性探測試驗 (probe test) 分析

空間性探測試驗是將原置放在第四象限的平台移走，測試大鼠在獲得平台位置的空間記憶後，其空間認知的表現能力。在參考記憶試驗第三天完成後將休息平台移走，馬上接續進行空間性探測試驗，以大鼠於 90 秒內停留在原休息平台所在象限時間長短評估。在經過前三天的參考記憶訓練後，大鼠對休息平台的位置應已有記憶與學習尋找能力。記錄大鼠在原參考記憶試驗中休息平台位置所停留的時間比例如圖 4.18。

分析 90 秒內大鼠於第四象限與其他三象限停留時間比例與次數，在各象限停留時間與次數則有差異，A 組在原休息平台所在象限的游泳時間明顯少於 AM 組或餵飼雷公根 20%、酸棗仁 40% 酒精萃取物與 RMD 各劑量組，且較無方向性。除 A 組外，其餘各組在第四象限探索的時間比例較多，顯示類澱粉樣蛋白輸注確實造成記憶能力傷害。未輸注類澱粉樣蛋白誘導失智症發生的正常組 C，在第四象限的滯留/探索時間較其他組別短。餵飼雷公根 20% 與酸棗仁 40% 酒精萃取物與 RMD 各劑量組，可能是因為平台在水中第四象限之印象深刻，故停留於該象限時間明顯增加；而失智或記憶力低落的大鼠雖然有平台在第四象限的概念，卻不能確定，只能遵循模糊的記憶搜尋特定位置，這或許與老鼠的記憶與認知行為有相當的關聯性。而餵飼雷公根 20%、酸棗仁 40% 酒精萃取物與 RMD 低劑量和高劑量組老鼠，游泳路徑較集中在原休息平台放置的象限內，顯示雖將休息平台移除，類澱粉樣蛋白輸注並餵飼雷公根 20%、酸棗仁 40% 酒精萃取物與 RMD 組仍能記住原先放休息平台的位置，其在目標象限的停留時間分別較只輸注類澱粉樣蛋白組增加 15.4% 以上，且游泳路徑具方向性，並會在原休息平台位置徘徊。這些現象證明餵飼雷公根 20% 與酸棗仁 40% 酒精萃取物與 RMD 確實可改善阿茲海默症大鼠受損傷之記憶學習能力。

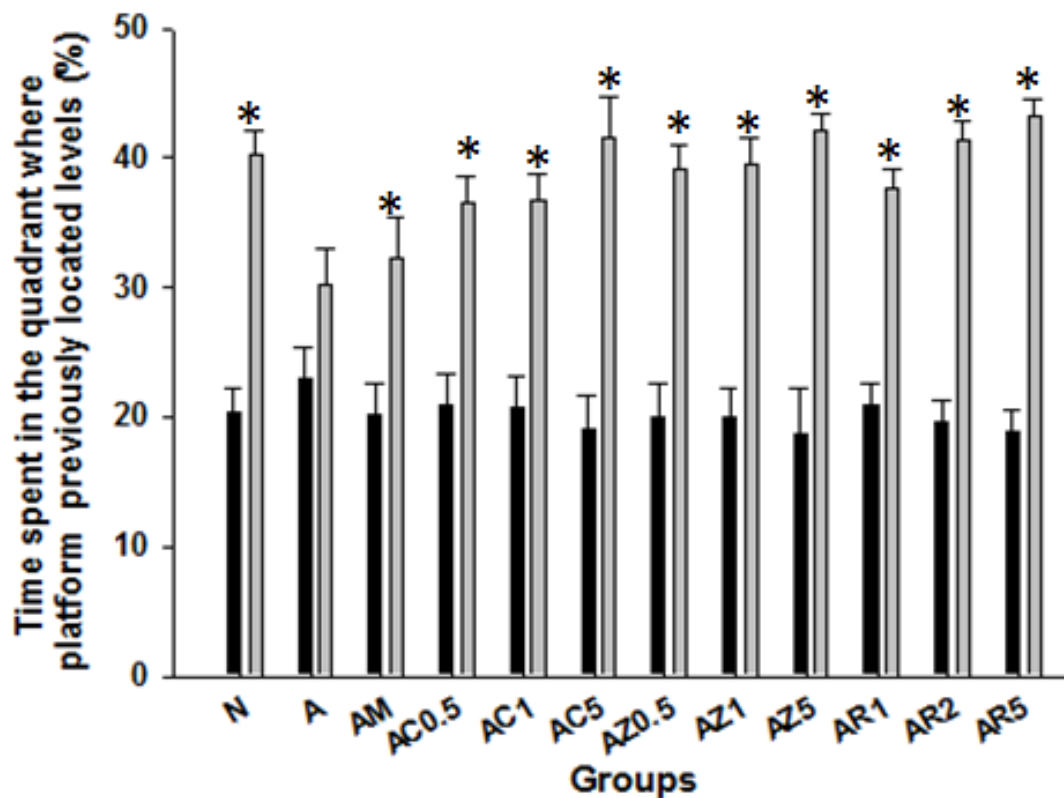
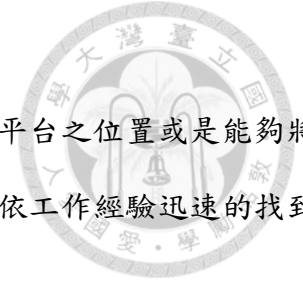


圖 4.18、餵飼不同劑量雷公根 20%、酸棗仁 40% 酒精萃取物與紅麴山藥在 90 秒空間性探測試驗中大鼠於於第四象限與其他三象限平均停留時間比例。

Fig. 4.18. Effect of *Centella asiatica*, *Semen Zizyphi spinosae* ethanol extract or RMD on memory and learning ability in 90 sec probe of zone 4 and the proportion of residence time in a the others zone average located levels.

1. Abbreviation meaning of each group is shown in Figure 4.17.
2. Each value is expressed as mean \pm SD (n=9). *Significantly different (p<0.05) vs. the amyloid beta injection group.



4. 工作記憶試驗 (working memory task) 分析

工作記憶其目的在於觀測大鼠之探索行為，是否純粹記憶休息平台之位置或是能夠將先前的探索經驗轉化成一種行為模式，即使平台在不同位置，也能依工作經驗迅速的找到平台，而這是腦部受損的大鼠較難做到的。

本試驗是動物行為模式記憶試驗最後一個階段，也是較能反映大鼠腦部真實記憶與組織狀況的情境，經過三天的實驗，發現正常組的大鼠其游泳軌跡之形狀和參考記憶試驗後期相似，皆是有方向感的轉折或直線方式前進，原因在於大鼠已經學會如何尋找水中平台，甚至知道水中有個平台之事實。相較於類澱粉樣蛋白輸注組，其游泳路徑很類似參考記憶試驗前期的軌跡，圓滑而沒有定點目標，大鼠這種行為即沒有意識到水中有平台，試圖往邊緣靠，故會沿著水槽邊緣繞圈。造成大鼠這種行為的原因即為腦部因為類澱粉樣蛋白的輸注沉積產生記憶缺陷以及受損。

由圖 4.19 可以得知於工作記憶第一天訓練 (平台置於第一象限)，N 組之逃脫潛伏期是 23.6 秒; A 組的逃脫潛伏期是 27.3 秒; AM 組為 26.4 秒; 類澱粉樣蛋白輸注餵飼雷公根 20%、酸棗仁 40% 酒精萃取物與 RMD 各劑量組 AC0.5、AC1、AC5; AZ0.5、AZ1、AZ5; AR1、AR2 與 AR5 分別為是 24.5、23.7、19.8; 24.6、22.7、19.4; 24.6、22.7 與 19.8 秒。第二天 (平台置於第二象限) N 組的逃脫潛伏期是 35.1 秒; A 組的逃脫潛伏期是 39.2 秒; AM 組為 32.4 秒; 類澱粉樣蛋白輸注並餵飼雷公根 20%、酸棗仁 40% 酒精萃取物與 RMD 各劑量組 AC0.5、AC1、AC5; AZ0.5、AZ1、AZ5; AR1、AR2 與 AR5 分別為是 30.7、29.3、26.2; 30.8、28.4、25.2; 32.7、29.4 與 25.2 秒。第三天 (平台置位於第三象限) N 組的逃脫潛伏期是 25.0 秒; A 組的逃脫潛伏期是 28.1 秒; AM 組為 26.8 秒; 類澱粉樣蛋白輸注並餵飼雷公根 20%、酸棗仁 40% 酒精萃取物與 RMD 各個劑量組 AC0.5、AC1、AC5; AZ0.5、AZ1、AZ5; AR1、AR2 與 AR5 分別為是 24.6、22.6、19.8; 25.1、22.9、19.5; 24.5、21.9 與 18.9 秒。在相同的工作記憶訓練天，第一天類澱粉樣蛋白輸注並餵飼雷公根 20% 與酸棗仁 40% 酒精萃取物與 RMD 除了高劑量 AC5、AZ5 與 AR5 組逃脫潛伏期與 A

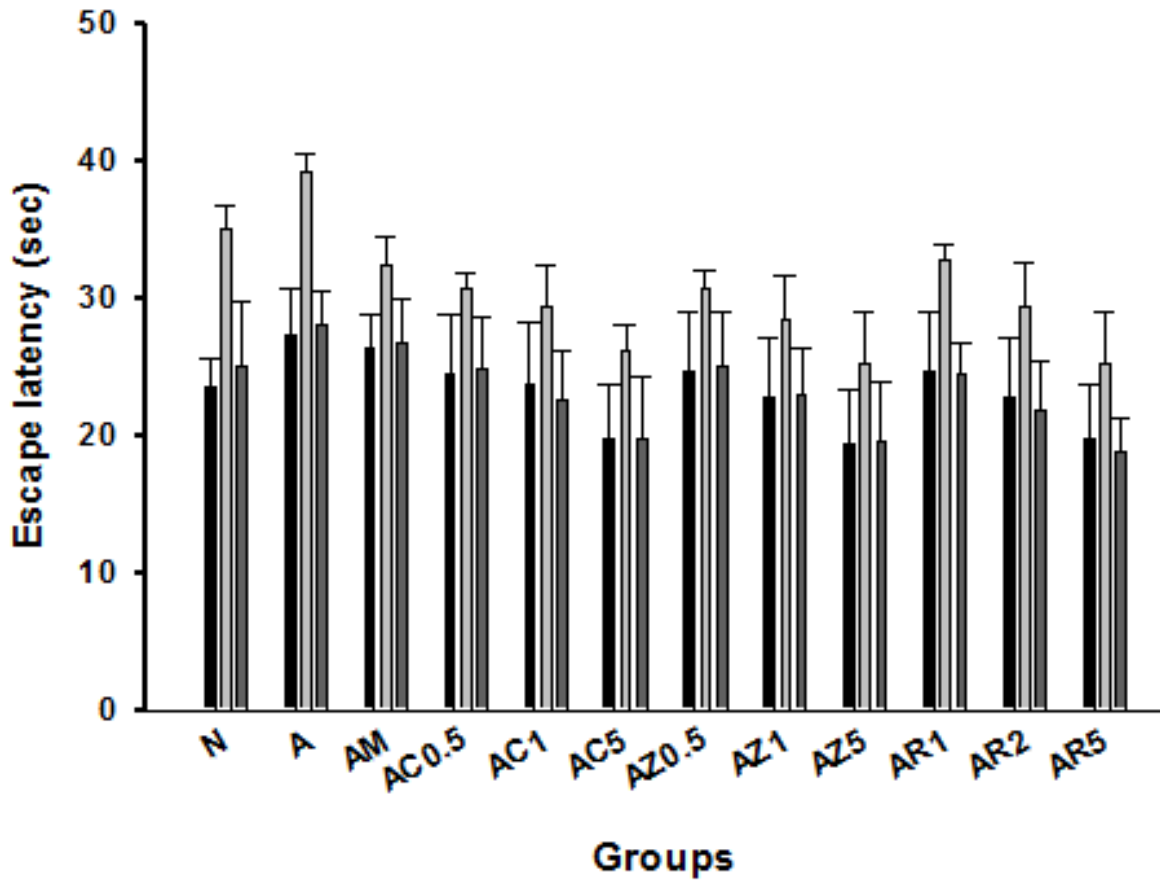


圖 4.19、餵飼不同劑量雷公根 20%、酸棗仁 40% 酒精萃取物與 RMD 在工作記憶試驗中大鼠於不同天數找到逃逸平台之游泳時間。

Fig. 4.19. Effect of *Centella asiatica*, *Semen Zizyphi spinosae* ethanol extract or RMD on memory and learning ability in different day work memory task in AD rats

1. Abbreviation meaning of each group is shown in Figure 4.17.

2. first day ; second day ; third day

3. Each value is expressed as mean \pm SD (n=9).

組有顯著的差異 ($P < 0.05$)，在其他較低劑量組與組之間並無顯著差異，表示各不同劑量組在同一天的訓練中找到平台的能力很相近。而隨著訓練天數與平台移動的位置改變，每組大鼠的工作學習記憶的行為，與單純類澱粉樣蛋白輸注組比較，在餵飼雷公根 20% 與酸棗仁 40% 酒精萃取物與 RMD 1 倍劑量以上，皆明顯降低了逃脫潛伏期，在訓練進入第二天之後，由於平台相對位置與參考記憶（平台位於第四象限）相對在大鼠記憶中屬於較遠的位置，故比其他兩天尋找平台時間增加，就單日訓練來看，A 組尋找平台的時間也明顯增加，但餵飼雷公根 20% 與酸棗仁 40% 酒精萃取物與 RMD 各劑量組尋找平台時間明顯減少，且與 A 組有顯著差異 ($p < 0.05$)。

將工作記憶每日尋找平台的時間，將四個象限游泳時間總和訂為 100% 分析各組平台所在象限（第一天位於第一象限；z1，第二天位於第二象限；z2，第三天位於第三象限；z3）停留時間與其他三象限平均停留時間（az）之相對關係。由圖 4.20 至 4.22 得知第一天的工作記憶試驗中正常大鼠（N 組） az 的停留時間比例為 23.6% 於 z1 的停留時間比例為 29.2%。AC 組之停留時間比例 az 為 24.7%；z4 為 24.2%；AM 組之停留時間比例 az 為 24.1%；z4 為 27.7%；餵飼雷公根 20%、酸棗仁 40% 酒精萃取物與 RMD 劑量各組之停留時間比例 az 為 20.8~23.7%；z1 為 27.7~38.9%。第二天的工作記憶試驗中正常大鼠（N 組） az 的停留時間比例為 23.4% 於 z2 的停留時間比例為 25.5%。AC 組之停留時間比例 az 為 25.2%；z4 為 24.5%；AM 組之停留時間比例 az 為 24.6%；z2 為 26.2%；餵飼雷公根 20%、酸棗仁 40% 酒精萃取物與 RMD 劑量各組之停留時間比例 az 為 21.8~23.8%；z2 為 28.7~34.5%。第三天的工作記憶試驗中正常大鼠（N 組） az 的停留時間比例為 23.3% 於 z3 的停留時間比例為 30.0%。AC 組之停留時間比例 az 為 24.8%；z4 為 25.6%；AM 組之停留時間比例 az 為 22.4%；z3 為 25.9%；餵飼雷公根 20%、酸棗仁 40% 酒精萃取物與 RMD 劑量各組之停留時間比例 az 為 17.3~22.0%；z4 為 33.8~41.5%。

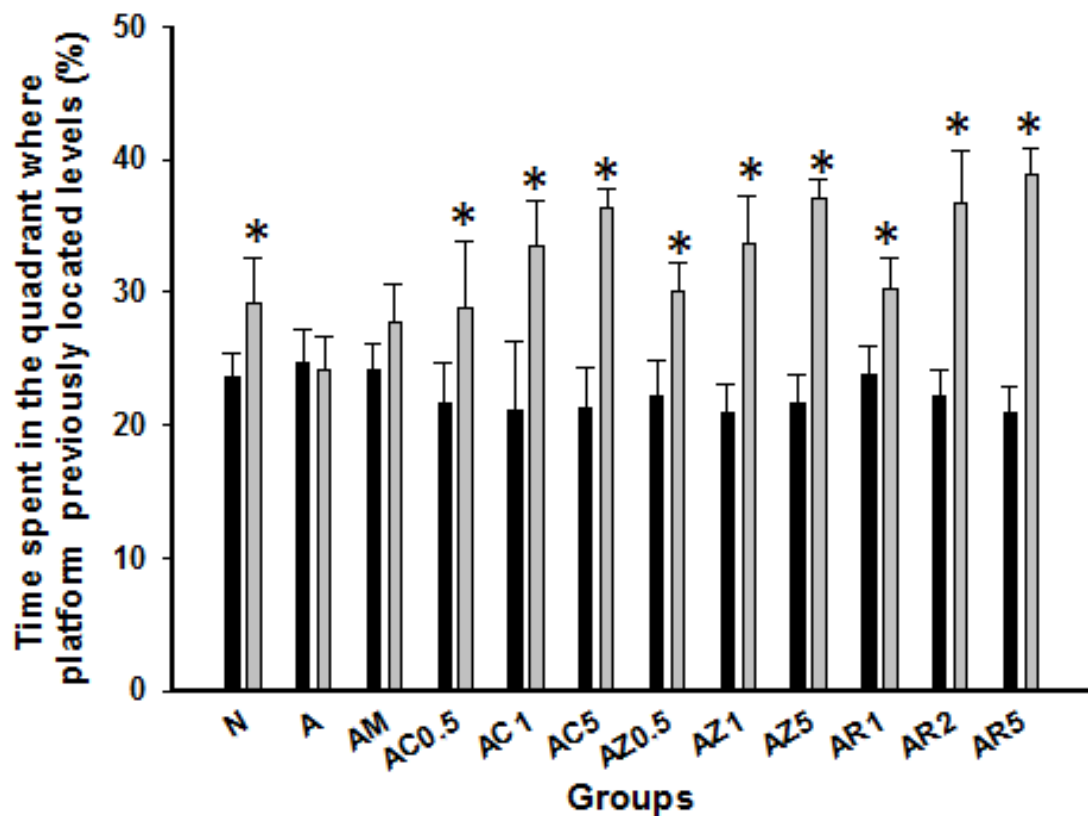


圖 4.20、餵飼不同劑量雷公根 20%、酸棗仁 40% 酒精萃取物與紅麴山藥工作記憶試驗第一天大鼠於第一象限與其他三象限平均停留時間比例。

Fig. 4.20. Effect of *Centella asiatica*, *Semen Zizyphi spinosae* ethanol extract or RMD on working memory test rats in the first day of zone 1 and the proportion of residence time in a the others zone average located levels.

1. Abbreviation meaning of each group is shown in Figure 4.15.

2. the others zone average; zone 1.

3. Each value is expressed as mean \pm SD (n=9). *Significantly different (p<0.05) vs. the others zone average.

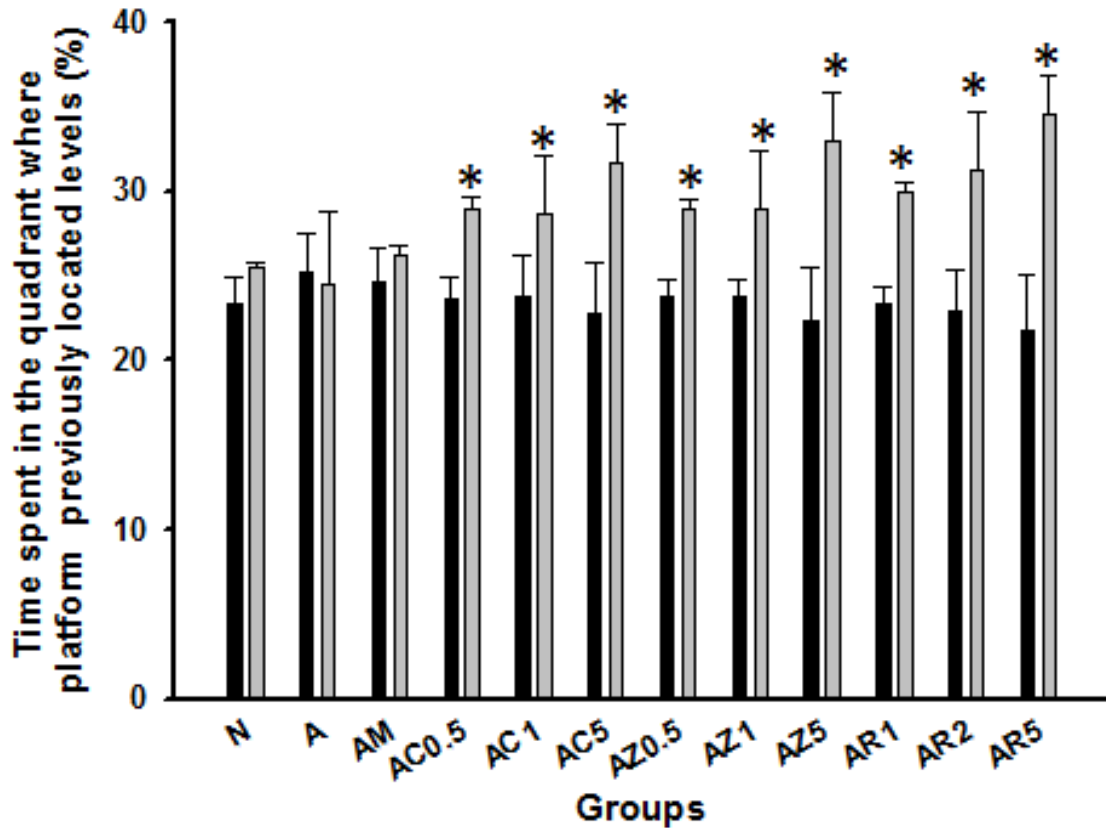


圖 4.21、餵飼不同劑量雷公根 20%、酸棗仁 40% 酒精萃取物與紅麴山藥工作記憶試驗第二天大鼠於第二象限與其他三象限平均停留時間比例。

Fig. 4.21. Effect of *Centella asiatica*, *Semen Zizyphi spinosae* ethanol extract or RMD on working memory test rats in the second day of zone 2 and the proportion of residence time in a the others zone average located levels.

1. Abbreviation meaning of each group is shown in Figure 4.15.

2. ■ the others zone average; ■ zone 2.

3. Each value is expressed as mean \pm SD (n=9). *Significantly different ($p < 0.05$) vs. the others zone average.

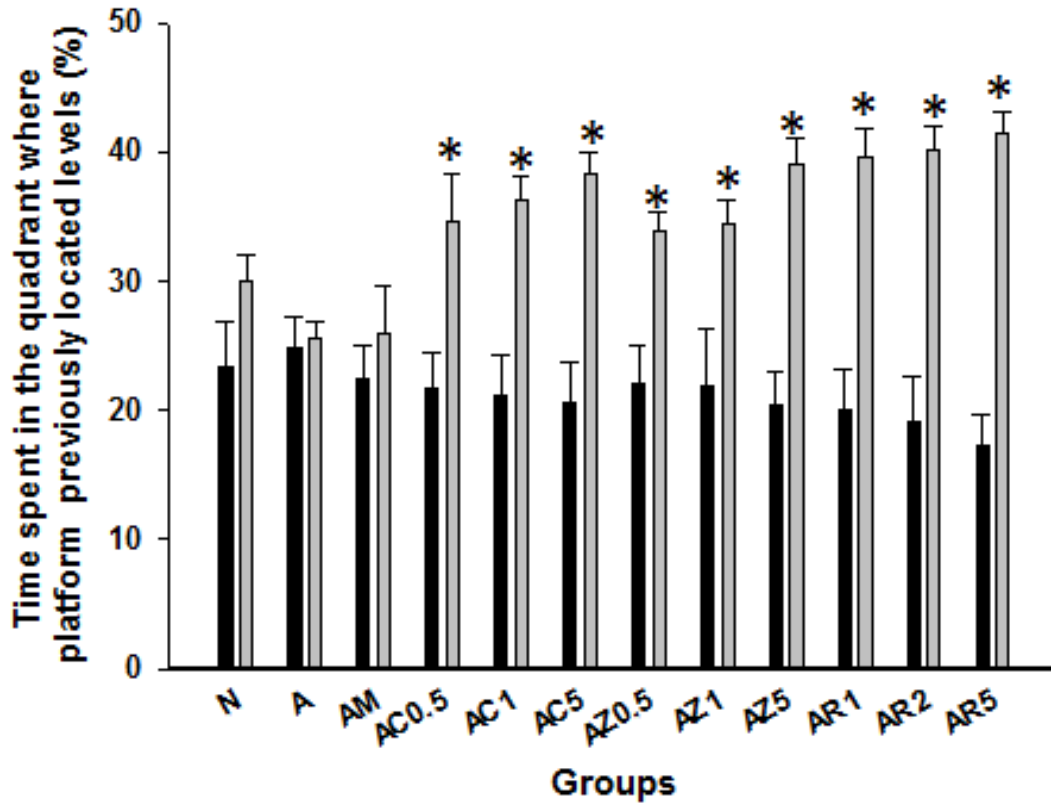
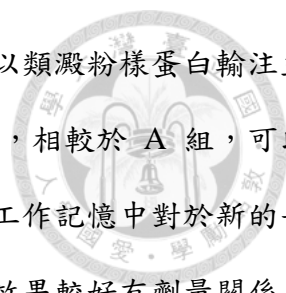


圖 4.22、餵飼不同劑量雷公根 20%、酸棗仁 40% 酒精萃取物與紅麴山藥工作記憶試驗第三天大鼠於第三象限與其他三象限平均停留時間比例。

Fig. 4.22. Effect of *Centella asiatica*, Semen *Zizyphi spinosae* ethanol extract or RMD on working memory test rats in the third day of zone 3 and the proportion of residence time in a the others zone average located levels.

1. Abbreviation meaning of each group is shown in Figure 4.15.
2. the others zone average; zone 3.
3. Each value is expressed as mean \pm SD (n=9). *Significantly different ($p < 0.05$) vs. the others zone average.



上述結果分析可以得知，工作記憶每日將平台置於不同象限，以類澱粉樣蛋白輸注並餵飼雷公根 20 % 與酸棗仁 40 % 酒精萃取物與 RMD 各個劑量組，相較於 A 組，可以增加大鼠於該日訓練休息平台置放之象限之停留時間，顯示大鼠在工作記憶中對於新的平台置放位置可以有學習的記憶，懂得在該象限中尋找，且低劑量組效果較好有劑量關係，顯示餵飼雷公根 20% 與酸棗仁 40% 酒精萃取物與 RMD 各個劑量組工作記憶的學習過程，因前三天參考記憶訓練後，明顯的降低了大鼠尋找休息平台的時間，也就是意謂著增強大鼠尋找平台的記憶能力，亦即隨著訓練天數的增加，大鼠在該平台置放的象限停留比例也較其他象限增加且有差異。每一天在尋找平台的時間，除了類澱粉樣蛋白輸注組平均需要耗時 27.3 秒以上，餵飼 0.5、1 或 5 倍的雷公根 20 % 與酸棗仁 40 % 酒精萃取物與 RMD，大鼠尋找平台所需的時間，明顯的減少 2.7 秒以上，其中 AZ5 組的效果最好，只花 19.4 秒。餵飼雷公根 20% 與酸棗仁 40% 酒精萃取物與 RMD 的大鼠明顯具有增加記憶的效果，由上述各項行為試驗中證實雷公根 20% 與酸棗仁 40 % 酒精萃取物與 RMD 具有延緩類澱粉樣蛋白累積造成之阿茲海默症狀發生。

八、大鼠血液與腦部海馬迴組織之各項功能檢測

(一) 餵飼雷公根 20 % 與酸棗仁 40 % 酒精萃取物與 RMD 對大鼠血液中與腦部海馬迴組織之乙醯膽鹼酶活性之影響

Yamada 等人 (1999) 指出阿茲海默症的重要徵狀為前腦的膽鹼系統功能衰退與不足 (Grutzendler and Morris, 2001)。乙醯膽鹼為腦部膽鹼功能系統中的重要神經傳導物質，而乙醯膽鹼酶抑制劑已常被應用於預防阿茲海默症患者腦部乙醯膽鹼含量的不足 (Krall et al., 1999)。目前阿茲海默症的治療多著重於抑制乙醯膽鹼酶活性以提高乙醯膽鹼濃度與改善認知與記憶行為 (Nabeshima and Nitta, 1994)。阿茲海默症模式動物建立的相關研究亦證實以連續輸注 A β 至大鼠腦部將造成膽鹼神經功能衰退與不足的神經毒性。研究亦證實腦部輸注 A β 阿茲海默症大鼠之腦部乙醯膽鹼含量會較正常大鼠明顯不足 (Arendt et al., 1984;

Darvesh et al., 2004)。隨著乙醯膽鹼濃度的下降與乙醯膽鹼酶活性的增加將使神經元的喪失更為嚴重 (Stephan and Phillips, 2005)。此外，乙醯膽鹼酶活性增加亦被指出會造成 A β 的聚合程度更為嚴重，且形成更為安定與毒性更強的 A β fibrils (Stephan and Phillips, 2005)。因此，抑制乙醯膽鹼酶的活性被認為是間接減輕 A β 引發記憶學習能力不足的神經保護作用。

由圖 4.23A 得知，無論是正常大鼠或是類澱粉樣蛋白輸注餵飼雷公根 20%，與酸棗仁 40% 酒精萃取物與 RMD 各個劑量組，血液中乙醯膽鹼酶活性顯著下降。由圖 4.23B 知 A 組海馬迴組織中之乙醯膽鹼酶活性會較 N 組提高 92.6%，餵飼雷公根 20%、酸棗仁 40% 酒精萃取物與 RMD 各個劑量組均可顯著抑制受 A β 所提高的乙醯膽鹼酶活性，AC0.5、AC1、AC5; AZ0.5、AZ1、AZ5; AR1、AR2 與 AR5 分別降低 11.3、33.3、46.9; 12.3、43.5、48.1; 48.4、55.8 與 70.9% ($p < 0.05$)，可顯著抑制輸注 A β 所提高的乙醯膽鹼酶活性，此結果證實雷公根 20% 與酸棗仁 40% 酒精萃取物與 RMD，顯著抑制輸注 A β 所提高的乙醯膽鹼酶活性，提升了神經傳導物質活性，有助於改善阿茲海默症的認知與記憶行為能力。

(二) 餵飼雷公根 20% 與酸棗仁 40% 酒精萃取物與 RMD 對大鼠血液與腦部海馬迴組織之乳酸脫氫酶活性之影響

乳酸脫氫酶 lactic dehydrogenase (LDH) 是一種葡萄糖代謝的酵素，普遍存在動物細胞中，細胞自然死亡或受傷時即會釋放到血清中。在人體腦部、肝臟、心臟、血液、骨骼、腎臟、腦、肺等組織的細胞多含此酵素，當人體的組織被破壞時則釋放至血液中，故當血液中 LDH 濃度上升時表示身體的某些組織受損傷。一般血液中 LDH 異常提升，常見疾病為急性肝炎、慢性活動性肝炎、肝硬化、急性心肌梗塞、溶血性貧血、皮膚肌炎、腎梗塞、肺梗塞等。由圖 4.24 得知血液中之乳酸脫氫酶活性，在餵飼酸棗仁 40% 酒精萃取物與 RMD 組皆無顯著提升或是下降 ($p < 0.05$)。在腦部組織中之乳酸脫氫酶活性，

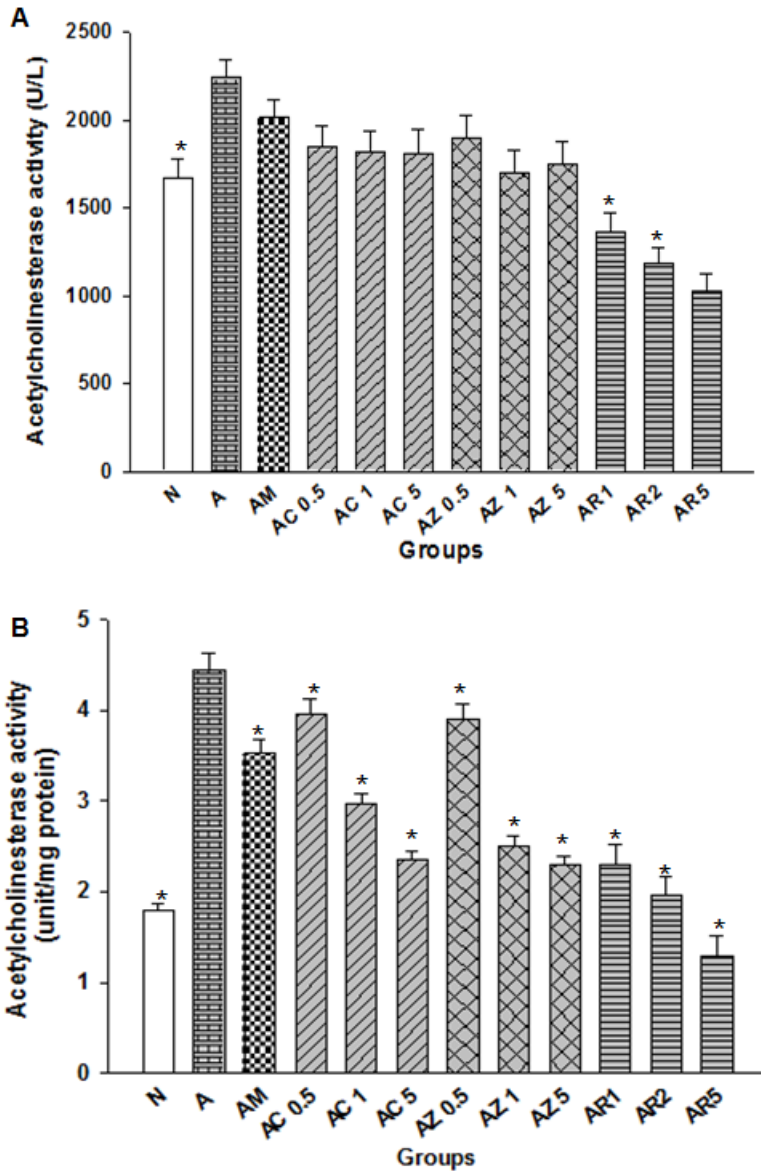


圖 4.23、餵飼不同劑量雷公根 20%、酸棗仁 40% 酒精萃取物與紅麴山藥對大鼠血液 (A) 與腦部海馬迴組織 (B) 乙醯膽鹼酶活性之影響。

Figure 4.23. Effect of *Centella asiatica*, *Semen Zizyphi spinosae* ethanol extract or RMD on levels of acetylcholinesterase activity in the serum (A) and hippocampus (B) of AD rats. Each value is expressed as mean \pm SD (n=9). * Significantly different ($p < 0.05$) vs. the amyloid beta injection group.

1. Abbreviation meaning of each group is shown in Figure 4.15.

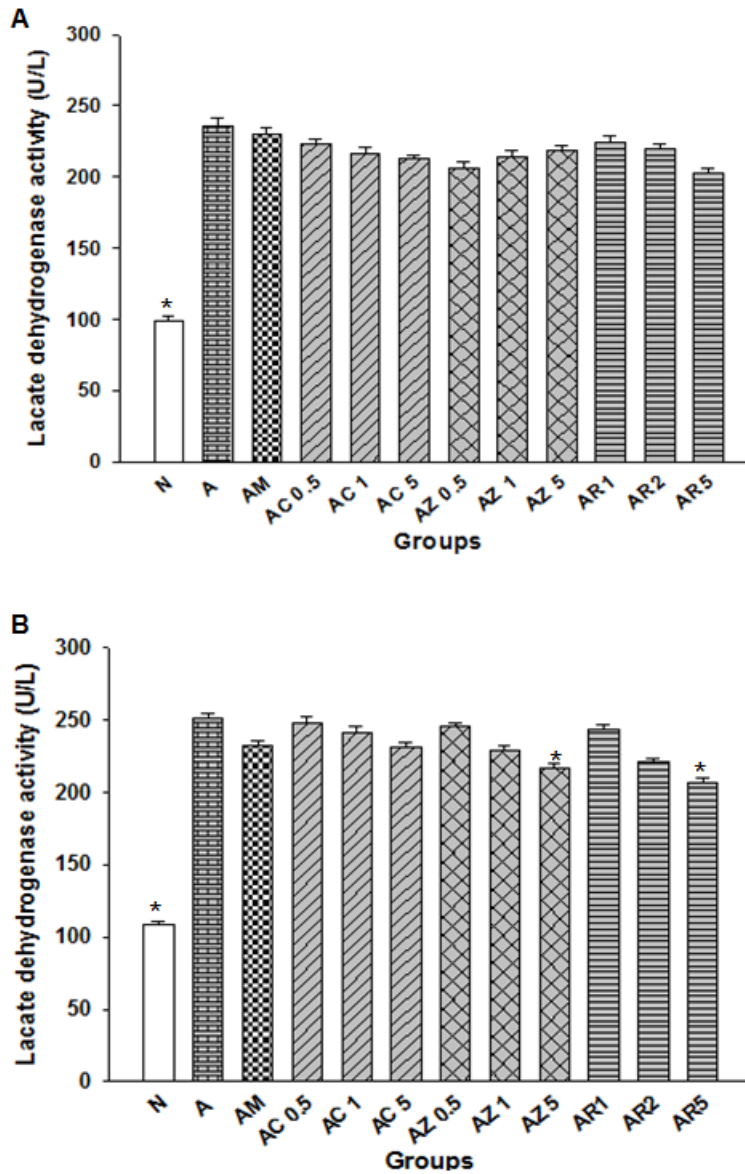


圖 4.24、餵飼不同劑量雷公根 20%、酸棗仁 40% 酒精萃取物與紅麴山藥對大鼠血液 (A) 與腦部海馬迴組織 (B) 乳酸脫氫酶活性之影響。

Fig. 4.24. Effect of *Centella asiatica*, *Semen Zizyphi spinosae* ethanol extract or RMD on levels of lactate dehydrogenase activity in the serum (A) and hippocampus (B) of AD rats. Each value is expressed as mean \pm SD (n=9). * Significantly different ($p < 0.05$) vs. the amyloid beta injection group.

1. Abbreviation meaning of each group is shown in Figure 4.15.

在餵飼酸棗仁 40 % 酒精萃取物與 RMD 兩倍以上 AZ5 與 AR5 組顯著提下降而低劑量組則無顯著提升或是下降 ($p<0.05$)。以上結果證實酸棗仁 40 % 酒精萃取物與 RMD 在五倍劑量以上可降低乳酸脫氫酶活性。



(三) 餵飼雷公根 20 % 與酸棗仁 40 % 酒精萃取物與 RMD 對大鼠血液中與腦部海馬迴組織之總抗氧化力活性之影響

總抗氧化狀態 (total antioxidant status ; TAS) 值代表所有具抗氧化能力物質之總和，各實驗組血液與腦部組織中之總抗氧化能力，如圖 4.25 所示，腦部輸注 $A\beta$ 之 A 組血液中 TAS 較 C 組降低 27.0%。AM 組則減緩 $A\beta$ 所造成的氧化傷害而使 TAS 提升了 9.3%，餵飼雷公根 20 % 與酸棗仁 40 % 酒精萃取物與 RMD 各劑量組，AC0.5、AC1、AC5、AZ0.5、AZ1、AZ5、AR1、AR2 與 AR5 組能提高血液中 TAS 活性顯著提高 26.8、31.0、35.2、14.7、30.9、41.8、65.2、90.6 與 108.9% ($p<0.05$)。腦部輸注 $A\beta$ 之 A 組造成大腦海馬迴組織中的 TAS 活性分別較 C 組降低 27.0%。AM 組則減輕 $A\beta$ 所造成的氧化傷害而使 TAS 提升了 9.2%，餵飼雷公根 20 % 與酸棗仁 40 % 酒精萃取物與 RMD 各劑量組，AC0.5、AC1、AC5、AZ0.5、AZ1、AZ5、AR1、AR2 與 AR5 組能提高大腦海馬迴組織被顯著提高之 TAS 活性 2.8、27.4、41.9、3.9、9.9、11.4、12.8、18.9 與 37.6% ($p<0.05$)。由以上研究結果發現餵飼雷公根 20 % 與酸棗仁 40 % 酒精萃取物與 RMD 1 倍劑量的阿茲海默症大鼠其大腦血液與海馬迴組織中的 TAS 活性均顯著高於 A 組。證明雷公根 20 % 與酸棗仁 40 % 酒精萃取物與 RMD 確實能幫助提升血清中總抗氧化狀態。攝取雷公根 20 % 與酸棗仁 40 % 酒精萃取物與 RMD 之組別彼此都有顯著差異，且其 TAS 活性隨著劑量增加而有明顯提升的趨勢。

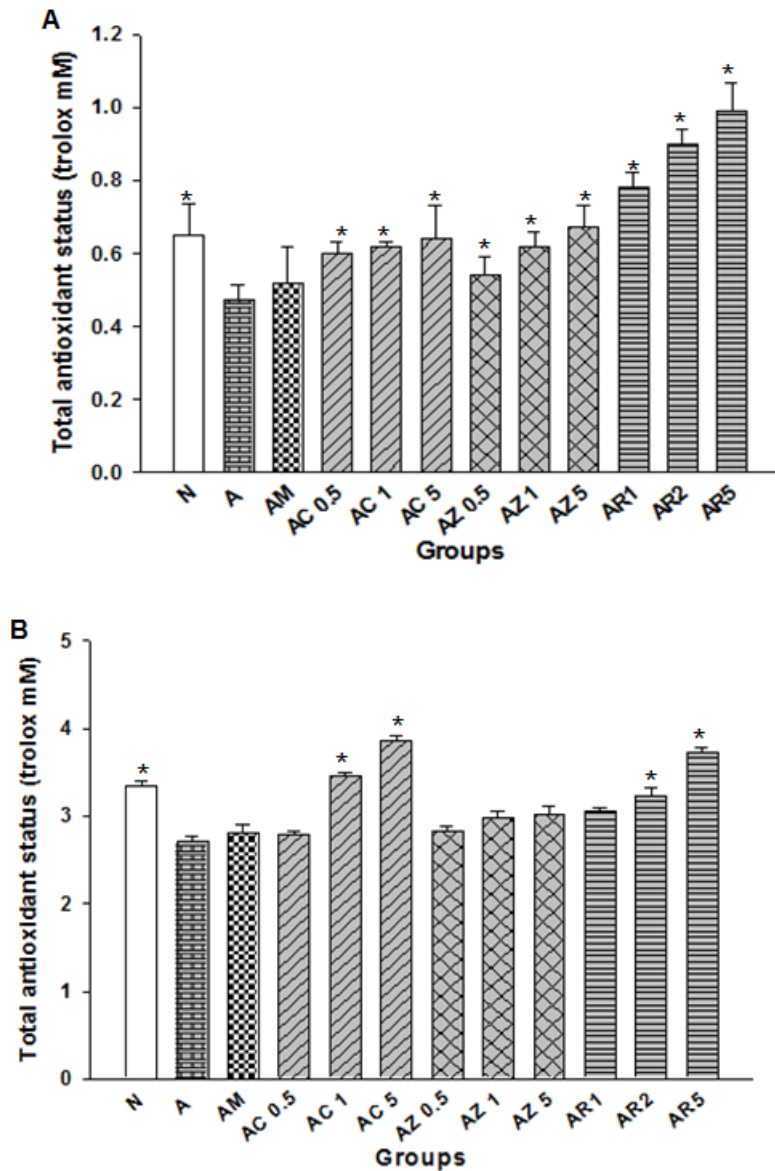


圖 4.25、餵飼不同劑量雷公根 20%、酸棗仁 40% 酒精萃取物與紅麴山藥對大鼠血液 (A) 與腦部海馬迴組織 (B) 總抗氧化力之影響。

Fig. 4.25. Effect of *Centella asiatica*, *Semen Zizyphi spinosae* ethanol extract or RMD on levels of total antioxidant status activity in the serum (A) and hippocampus (B) of AD rats. Each value is expressed as mean \pm SD (n=9). * Significantly different ($p < 0.05$) vs. the amyloid beta injection group.

1. Abbreviation meaning of each group is shown in Figure 4.15.

(四) 餵飼雷公根 20 % 與酸棗仁 40 % 酒精萃取物與 RMD 對大鼠血液與腦部海馬迴組織中過氧化氫酶活性之影響

過氧化氫酶 (catalase) 是一種氧化還原酵素，廣泛存在於各類生物體中，其作用是催化過氧化氫轉化為水和氧氣的反應。由於過氧化氫能對身體造成損害，為避免此種損害，過氧化氫必須被快速地轉化為其他無害或毒性較小的物質。而過氧化氫酶常被細胞用來催化過氧化氫分解，防止過氧化物將細胞氧化，產生危害。

由圖 4.26 得知無論是正常大鼠或是類澱粉樣蛋白輸注並餵飼雷公根 20 % 與酸棗仁 40 % 酒精萃取物與 RMD 各劑量組，血液與腦部組織中之過氧化氫酶活性，在血液中類澱粉樣蛋白輸注並餵飼雷公根 20 % 與酸棗仁 40 % 酒精萃取物與 RMD 二倍以上劑量組 (AC0.5、AC1、AC5、AZ1、AZ5、AR2 與 AR5) 均顯著提升；但酸棗仁與 RMD 低劑量組 (AZ0.5 與 AR1) 則無顯著變化 ($p < 0.05$)。在腦組織方面只有 RMD 2 倍以上劑量組可顯著提升，由以上結果證實餵飼雷公根 20 % 與酸棗仁 40 % 酒精萃取物與 RMD 可提升體內過氧化氫酶活性。

(五) 餵飼雷公根 20 % 與酸棗仁 40 % 酒精萃取物與 RMD 對大鼠血液與腦部海馬迴組織中超氧歧化酶活性之影響

超氧歧化酶 (superoxide dismutase; SOD) 普遍存在動植物體中，有關老化方面的報告報導活性氧、過氧化脂質和超氧歧化酶與人體細胞老化有密切關係 (Miller and Evans, 1996)。生物體生長在有氧環境下進行氧化作用會生成自由基，如超氧陰離子 ($O_2\cdot$)、羥自由基 ($OH\cdot$) 等。超氧陰離子存在於所有電子傳遞鏈上，因此氧的活化可能發生在不同的細胞，包括粒線體、葉綠體、微粒體、乙醛小體，過氧化小體、細胞溶質等。超氧化歧化酶存在於所有好氣性生物細胞中，其可以催化超氧自由基之歧化反應 (dismutation) 而提供細胞防禦氧毒性之傷害。

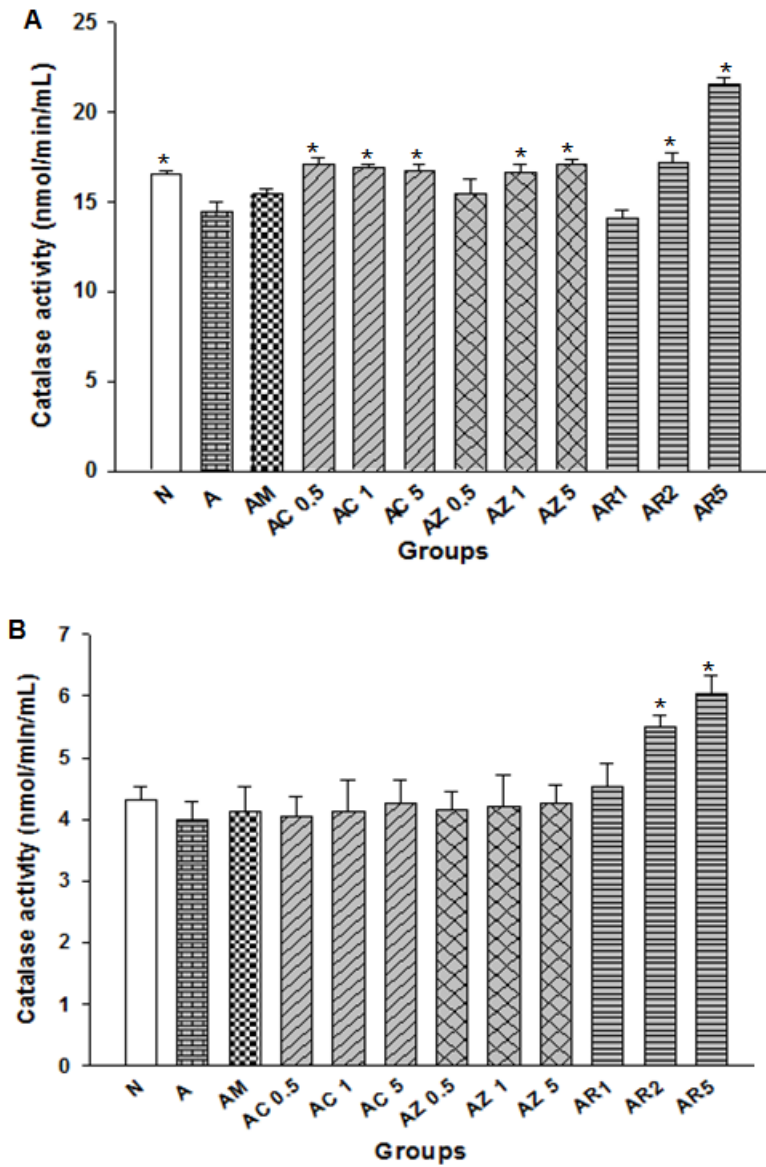
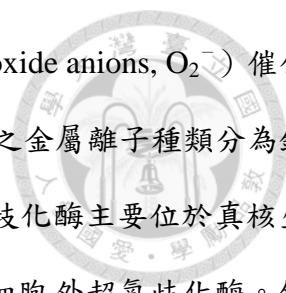


圖 4.26、餵飼不同劑量雷公根 20%、酸棗仁 40% 酒精萃取物與紅麴山藥對大鼠血液 (A) 與腦部海馬迴組織 (B) 中過氧化氫酶活性之影響。

Fig. 4.26. Effect of *Centella asiatica*, *Semen Zizyphi spinosae* ethanol extract or RMD on levels of catalase activity in the serum (A) and hippocampus (B) of AD rats. Each value is expressed as mean \pm SD (n=9). * Significantly different (p<0.05) vs. the amyloid beta injection group.

1. Abbreviation meaning of each group is shown in Figure 4.15.



超氧歧化酶是一金屬結合酶，能將二分子的超氧陰離子 (superoxide anions, O_2^-) 催化為過氧化氫 (hydrogen peroxide, H_2O_2) 及氧分子，可依其活性中心之金屬離子種類分為銅鋅型超氧歧化酶、錳型超氧歧化酶與鐵型超氧歧化酶等；銅鋅超氧歧化酶主要位於真核生物的細胞質中，另一種存在於細胞外液的銅鋅超氧化歧化酶，稱為細胞外超氧歧化酶。錳型超氧歧化酶則位於原核生物細胞質及真核生物的粒線體基質，鐵型超氧歧化酶主要位於原核生物細胞基質及一些植物中。

SOD 主要作用是將活性氧物質轉變為過氧化氫，而過氧化氫又會藉由 catalase 之作用在轉變為水。故在有氧化壓力存在的情形下，體內 catalase 活性會下降 (Lalonde et al., 1997; Marzatico et al., 1997)。無論是正常大鼠或是類澱粉樣蛋白輸注並餵飼雷公根 20%、酸棗仁 40% 酒精萃取物，與 RMD 各劑量組，血液與腦部組織中之 SOD 酵素活性，如圖 4.27 所示。血液中腦部輸注 $A\beta$ 之 AM 組比 A 組減緩 $A\beta$ 所造成的氧化傷害，使腦部 SOD 活性提升了 2.9%，在類澱粉樣蛋白輸注並餵飼雷公根 20% 與酸棗仁 40% 酒精萃取物與 RMD 各劑量組，AC0.5、AC1、AC5、AZ0.5、AZ1、AZ5、AR1、AR2 與 AR5 組能顯著提高大鼠血液中 SOD 活性達 7.1、11.9、16.7、8.7、14.8、19.7、7.1、15.6 與 19.9%。

輸注 $A\beta$ 之 A 組，其大腦海馬迴組織中的 SOD 活性較 C 組降低 30.5%。AM 組則減緩 $A\beta$ 所造成的氧化傷害使 SOD 活性提升了 5.1%，在類澱粉樣蛋白輸注並餵飼雷公根 20% 與酸棗仁 40% 酒精萃取物與 RMD 各劑量組，AC0.5、AC1、AC5、AZ0.5、AZ1、AZ5、AR1、AR2 與 AR5 組其大腦海馬迴組織中 SOD 活性顯著提高 6.6、11.8、21.3、2.8、11.7、19.1、19.1、29.5 與 42.8% ($p < 0.05$)。由以上研究結果發現餵飼 1 倍以上雷公根 20% 與酸棗仁 40% 酒精萃取物與 RMD 劑量的阿茲海默症大鼠，其大腦海馬迴組織中的 SOD 活性均顯著高於 A 組，呈現類似神經元保護效果。

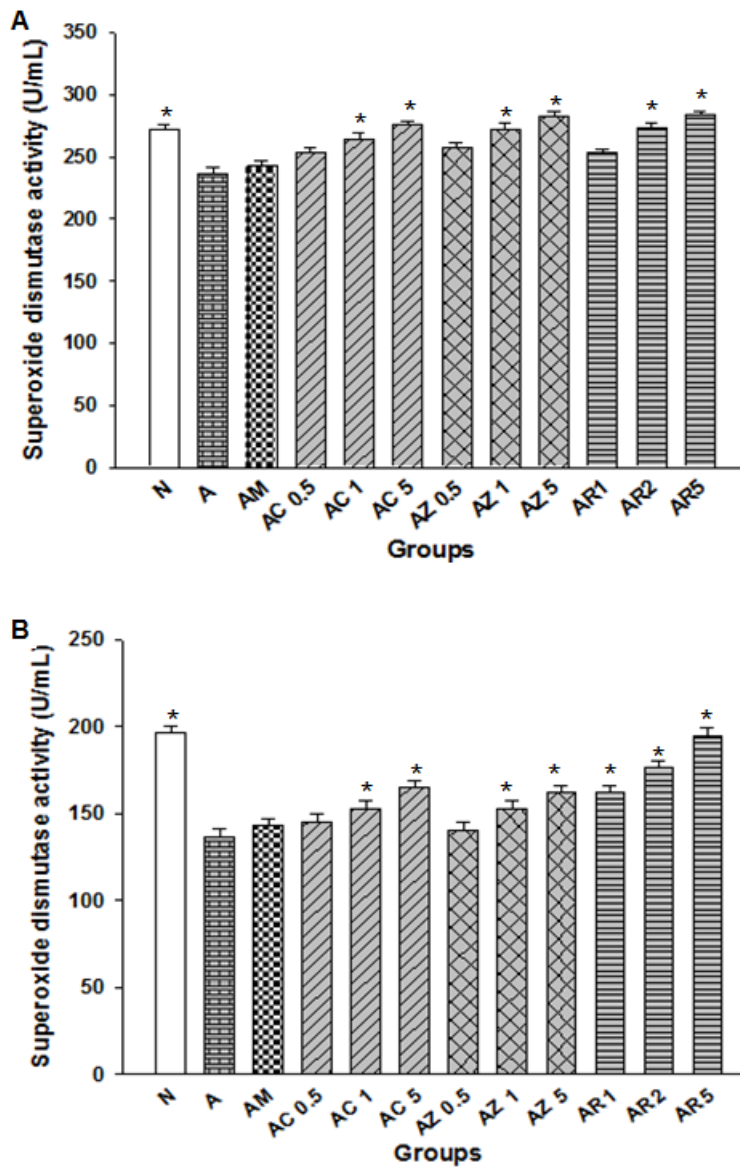


圖 4.27、餵飼不同劑量雷公根 20%、酸棗仁 40% 酒精萃取物與紅麴山藥對大鼠血液 (A) 與腦部海馬迴組織 (B) 中超氧歧化酶活性之影響。

Fig. 4.27. Effect of *Centella asiatica*, *Semen Zizyphi spinosae* ethanol extract or RMD on levels of superoxide dismutase activity in the serum (A) and hippocampus (B) of AD rats. Each value is expressed as mean \pm SD (n=9). * Significantly different ($p < 0.05$) vs. the amyloid beta injection group.

1. Abbreviation meaning of each group is shown in Figure 4.15.

(六) 餵飼雷公根 20 % 與酸棗仁 40 % 酒精萃取物與 RMD 對大鼠血液與腦部海馬迴組織一氧化氮合成酶活性之影響

一氧化氮為小分子氣體，也是自由基成員之一，透過一氧化氮合酶 (nitric oxide synthase; NOS) 作用，於 L-arginine 轉變成 L-citrulline 過程中釋放出來而存在於組織中，在體內可調節不同的生理功能 (Garthwaite et al., 1989)。iNOS 則屬於誘導型，主要存在於免疫細胞內，如 macrophages、lymphocytes、neutrophils 等；需被誘導才會活化表現，如細菌內毒素 LPS 或細胞激素 (TNF- α 、IL-1、IFN- γ 等) 均可誘導 iNOS (Nathan and Xie, 1994)。iNOS 所誘導生成之 NO 具殺菌作用並參與宿主防禦機能，由此途徑誘導生成之 NO，本身為一自由基，會與超氧陰離子作用，生成強氧化劑 peroxynitrite 而對組織細胞產生毒害，引發發炎反應並增加致癌機率 (Ohshima and Bartsch, 1994)。由圖 4.28 得知輸注類澱粉蛋白並餵飼雷公根 20 % 與酸棗仁 40 % 酒精萃取物與 RMD 之各劑量組，血液與腦部組織中之 iNOS 酵素活性，在餵飼 0.5 倍以上劑量時可降低 17.2% 以上 ($p < 0.05$)。

(七) 餵飼雷公根 20 % 與酸棗仁 40 % 酒精萃取物與 RMD 對大鼠腦部海馬迴組織中 A β ₄₀ 蛋白質沈積量之評估

類澱粉樣蛋白是一種不可溶的纖維性蛋白質。在器官中不正常的堆積，會造成類澱粉樣蛋白沉積症 (amyloidosis)。在許多神經性疾病，如阿茲海默症、帕金森氏症中，都可以觀察到神經系統中出現大量類澱粉樣蛋白的累積沉澱。因此，本研究以組織免疫染色進一步評估輸注 A β 於各組實驗動物海馬迴組織中之沈積情形，結果如圖 4.29 與圖 4.30 所示。圖中箭頭所指深紅褐色斑塊為剛果紅染色後聚集的 A β 沉積。C 組為正常組；輸注 A β 之 AC 組，其大腦海馬迴組織中的 A β 沉積量較 C 組增加 39.2%；AM 組則可減緩 A β 沉積，與 AC 組比較降低了 5.2%。在注射類澱粉樣蛋白並餵飼雷公根 20 % 與酸棗仁 40 % 酒精萃取物與 RMD 之一倍以上劑量組，其大腦海馬迴組織中 A β 沉積量較 AC 組顯著降低 9.6- 19.2% ($p < 0.05$)。由以上研究結果發現餵飼 1 倍以上劑量雷公根 20 % 與酸棗

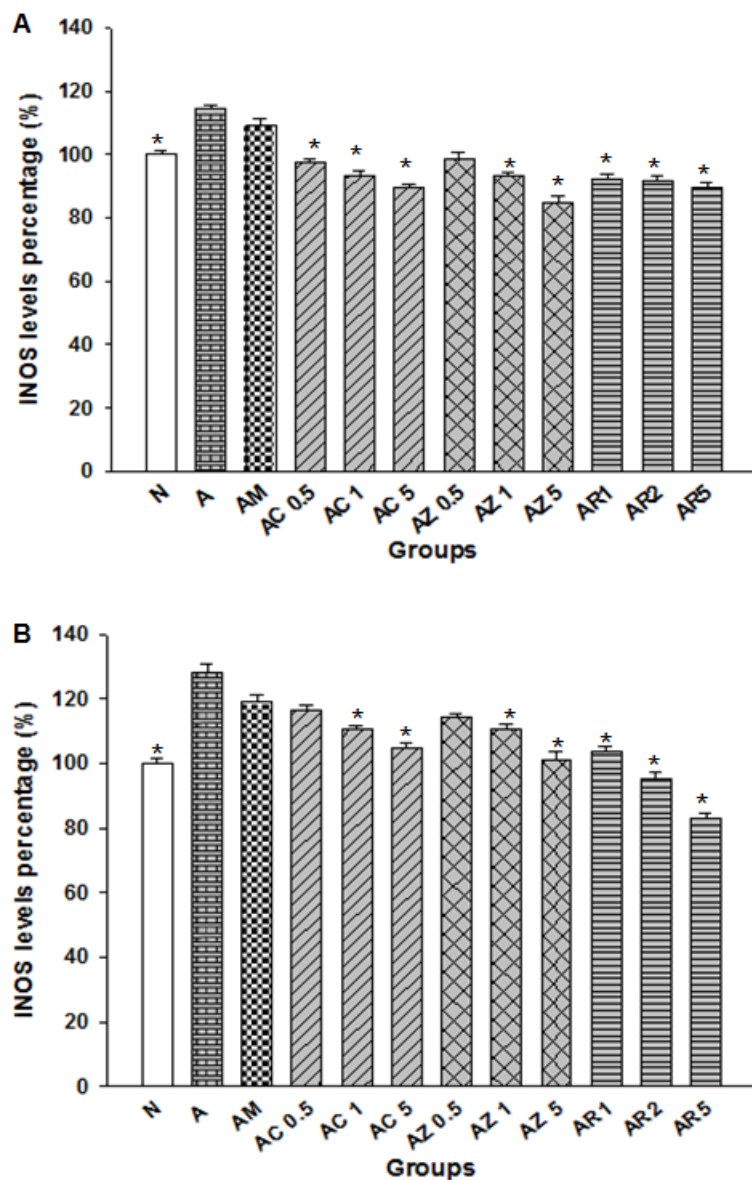


圖 4.28、餵飼不同劑量雷公根 20%、酸棗仁 40% 酒精萃取物與紅麴山藥對大鼠血液 (A) 與腦部海馬迴組織 (B) 中一氧化氮合成酶活性之影響。

Fig. 4.28. Effect of *Centella asiatica*, *Semen Zizyphi spinosae* ethanol extract or RMD on levels of iNOS levels in the serum (A) and hippocampus (B) of AD rats. Each value is expressed as mean \pm SD (n=9). * Significantly different (p<0.05) vs. the amyloid beta injection group.

1. Abbreviation meaning of each group is shown in Figure 4.15.

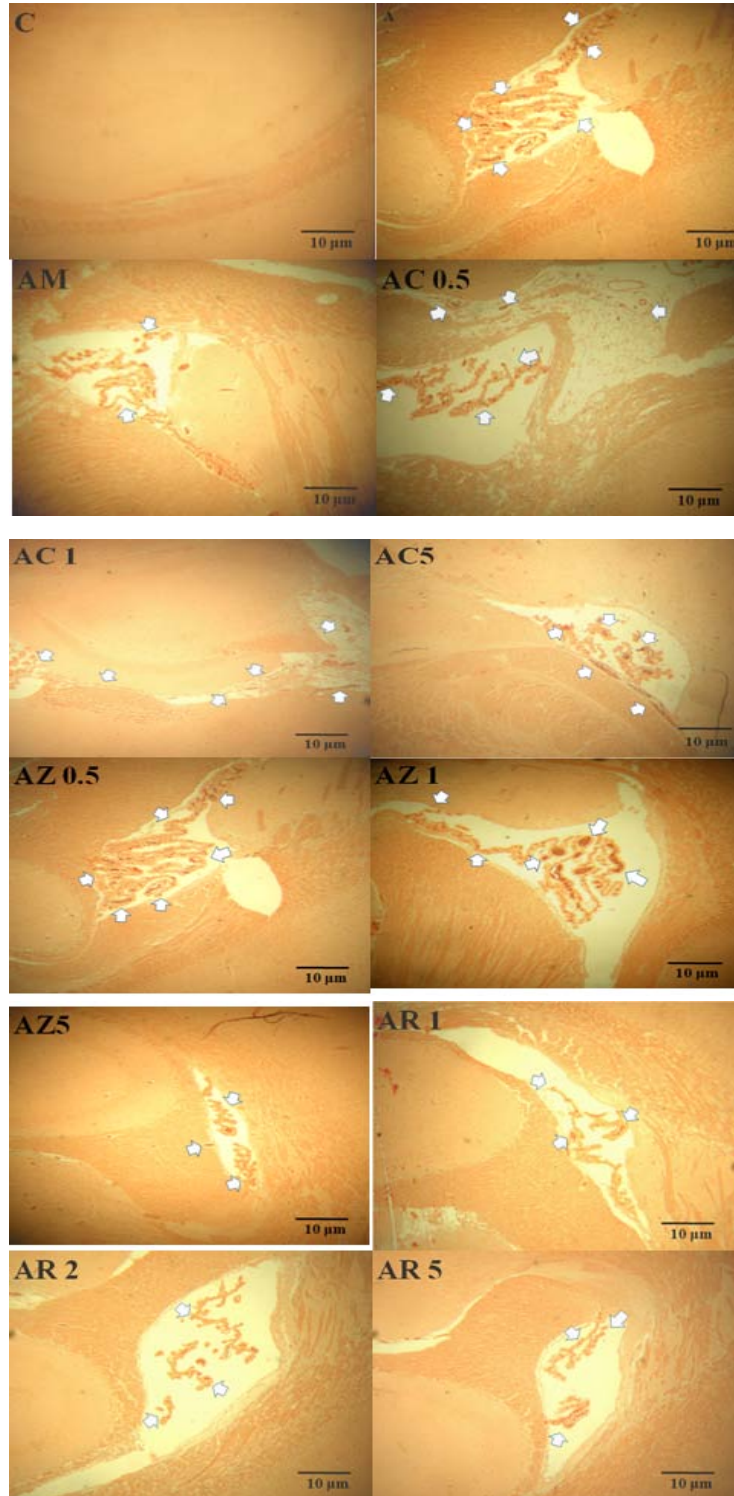


圖 4.29、餵食不同劑量雷公根 20%、酸棗仁 40% 酒精萃取物與紅麴山藥對於大鼠腦部海馬迴組織中類澱粉樣蛋白沉積量之影響。

Fig. 4.29. Effect of *Centella asiatica*, *Semen Zizyphi spinosae* ethanol extract or RMD on A β protein in the hippocampus of AD rats.

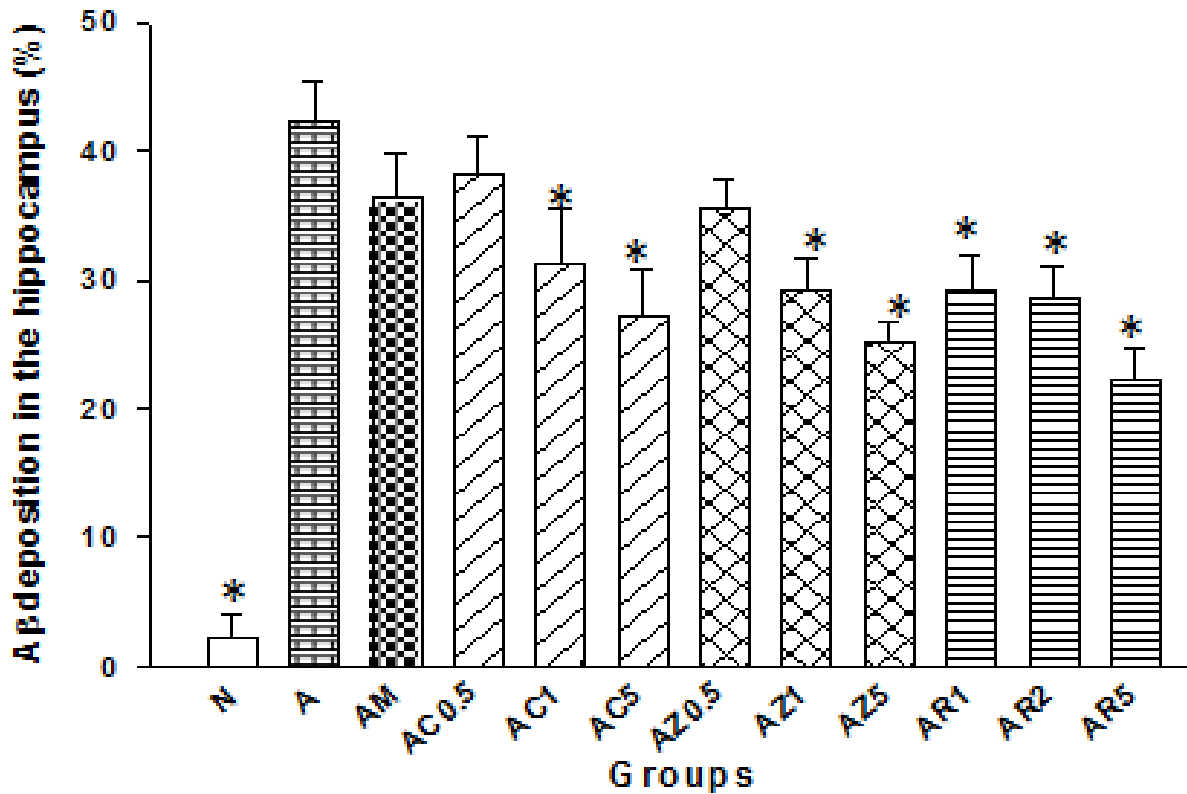


圖 4.30、餵食不同劑量雷公根 20%、酸棗仁 40% 酒精萃取物與紅麴山藥對於大鼠腦部海馬迴組織中類澱粉樣蛋白沉積量化圖量之影響。

Fig. 4.30. Effect of *Centella asiatica*, *Semen Zizyphi spinosae* ethanol extract or RMD on A β protein deposition levels in the hippocampus of AD rats.

1. Abbreviation meaning of each group is shown in Figure 4.15.
2. Each value is expressed as mean \pm SD (n=9). * Significantly different (p<0.05) vs. the amyloid beta injection group.

仁 40 % 酒精萃取物與 RMD 的阿茲海默症大鼠，其大腦海馬迴組織中的 A β 沉積量顯著低於 AC 組，呈現類似神經元保護效果，因為這些保護作用使輸注的 A β 於腦部中不易沈積，且可抑制所形成的氧化壓力與與發炎反應誘發腦部之 A β 生成。



九、安全性試驗分析

(一) 血漿脂質含量分析

由表 4.20 得知，餵飼雷公根 20 % 與酸棗仁 40 % 酒精萃取物與 RMD 各劑量組 TC 與 TG 濃度都在正常範圍內，HDL-C 與 LDL-C，各組間並無顯著差異，TC/HDL-C 亦無明顯改變，因此在本實驗劑量下並不會造成血脂異常。

(二) 肝功能分析

由表 4.21 與 4.22 得知餵飼雷公根 20 % 、與酸棗仁 40 % 酒精萃取物與 RMD 各劑量組之 AST、ALT、鹼性磷酸酶、總蛋白、白蛋白及球蛋白均無顯著差異，故餵飼雷公根 20 % 與酸棗仁 40 % 酒精萃取物與 RMD 在本實驗的劑量下對肝功能並不會造成影響。

(三) 腎功能分析

由表 4.23 得知，餵飼雷公根 20 % 與酸棗仁 40 % 酒精萃取物與 RMD 各劑量組對於大鼠腎功能的三項腎功能指標並無明顯差異。

(四) 電解質平衡狀態

由表 4.24 得知血清中各項電解質，不論是類澱粉樣蛋白輸注組、控制組與輸注類澱粉樣蛋白並餵飼雷公根 20 % 與酸棗仁 40 % 酒精萃取物與 RMD 各劑量組並無顯著差異，因此可以推論在本試驗中，所使用雷公根 20 % 與酸棗仁 40 % 酒精萃取物與 RMD 各個劑量組，並不會改變體內電解質平衡。

表 4.20、餵食不同劑量雷公根 20%、酸棗仁 40% 酒精萃取物與紅麴山藥對於大鼠血液中總膽固醇、三酸甘油酯、高密度脂蛋白與低密度脂蛋白膽固醇之影響。

Table 4.20. Effect of *Centella asiatica*, *Semen Zizyphi spinosae* ethanol extract or RMD on experimental AD rat performance in terms of serum cholesterol, triglyceride, HDL, and LDL levels

Group	TG	TC	HDL-C	LDL-C.	TC/HDL-C
(mg/dL)					
N	66.2±5.7	75.5±9.8	59.6±8.3	9.7±2.3	1.3±0.1
A	67.1±6.0	71.0±6.2	50.1±8.5	9.0±3.3	1.3±0.1
AM	68.4±8.0	69.8±6.6	56.0±4.8	9.3±2.9	1.3±0.1
AC 0.5	69.1±4.9	75.4±6.5	60.4±3.7	10.1±3.1	1.3±0.1
AC 1	66.8±1.7	76.9±8.8	62.0±7.5	11.8±2.8	1.2±0.1
AC 5	68.5±5.3	70.5±4.2	57.3±5.7	12.2±1.5	1.3±0.1
AZ 0.5	65.4±6.2	71.1±4.2	49.6±8.7	10.3±1.5	1.2±0.0
AZ 1	69.4±3.4	72.4±4.8	52.0±7.9	10.5±1.8	1.3±0.1
AZ 5	66.3±6.4	71.3±3.5	51.6±6.9	10.8±1.8	1.2±0.1
C	72.6±4.0	71.1±3.8	47.8±4.5	1.5±0.1	14.8±2.6
AC	70.3±4.2	71.3±3.8	48.3±7.5	1.5±0.2	14.3±1.4
AM	69.6±6.7	71.4±2.5	47.8±8.2	1.5±0.2	13.9±3.1
AR1	70.6±4.6	71.5±3.6	56.4±5.0	11.0±2.3	1.3±0.1
AR2	72.7±4.0	72.8±1.1	60.4±6.0	10.7±1.6	1.2±0.1
AR5	71.0±4.2	71.3±6.2	59.5±6.3	11.5±2.3	1.2±0.2

1. Abbreviation meaning of each group is shown in Table 4.15

2. Each value is expressed as mean ± SD (n=9).

3. TC: total cholesterol; TG: triglyceride; HDL-C: high density lipoprotein cholesterol; LDL-C: low density lipoprotein cholesterol.

表 4.21、餵食不同劑量雷公根 20%、酸棗仁 40% 酒精萃取物與 RMD 對大鼠血液中肝功
能天門冬胺酸轉胺酶、丙胺酸轉胺酶、鹼性磷酸酶之影響。

Table 4.21. Effect of *Centella asiatica*, *Semen Zizyphi spinosae* ethanol extract or RMD on
experimental AD rat performance in terms of serum AST, ALT and alkaline phosphatase
levels

Group	AST	ALT	Alk-p
	(U/L)		(IU/L)
N	114.5± 1.6	48.3± 5.8	126.8±10.5
A	112.6± 8.6	50.8± 4.9	116.1± 7.5
AM	110.6±13.4	51.3± 8.1	114.9± 9.2
AC0.5	112.5± 6.4	53.8± 9.1	133.0± 8.0
AC1	109.9± 8.1	52.8± 8.2	116.0± 8.5
AC5	106.5±10.9	50.5±10.5	116.7± 7.9
AZ0.5	121.0± 8.6	57.8± 7.6	114.1± 6.4
AZ1	122.6± 7.2	56.9± 7.9	112.3± 7.8
AZ5	119.1± 9.4	57.0± 7.7	114.9± 8.0
AR1	113.5± 8.1	45.6± 3.3	130.5± 4.9
AR2	115.3± 5.6	46.5± 0.9	136.2± 6.8
AR5	111.7± 7.2	45.3± 6.0	134.3± 7.3

1. Abbreviation meaning of each group is shown in Table 4. 15.

2. Each value is expressed as mean ± SD (n=9).

3. AST: asparate transaminase; ALT: alanine transaminase. Alk-p: Alkaline phosphatase

表 4.22、餵食不同劑量雷公根 20%、酸棗仁 40% 酒精萃取物與紅麴山藥對大鼠血液中血清總蛋白量、白蛋白與球蛋白之影響。

Table 4.22. Effect of *Centella asiatica*, *Semen Zizyphi spinosae* ethanol extract or RMD on experimental AD rat performance in terms of serum total protein, albumin and globulin levels

Group	Total protein	Albumin	Globulin	A/G Ratio
	(g/dL)			
N	6.6±0.3	4.6±0.1	2.0±0.2	2.4±0.2
A	7.0±0.3	4.8±0.3	2.2±0.2	2.3±0.3
AM	7.0±0.4	4.8±0.2	2.2±0.4	2.3±0.4
AC 0.5	6.7±0.5	4.5±0.3	2.2±0.3	2.1±0.2
AC 1	7.0±0.3	4.7±0.3	2.3±0.3	2.1±0.3
AC 5	7.1±0.3	4.7±0.3	2.4±0.1	2.0±0.1
AZ 0.5	6.8±0.5	4.6±0.4	2.2±0.4	2.2±0.4
AZ 1	6.8±0.5	4.7±0.3	2.1±0.3	2.3±0.1
AZ 5	7.0±0.4	4.8±0.3	2.2±0.2	2.3±0.2
AR1	7.1±0.2	4.7±0.2	2.4±0.2	2.0±0.2
AR2	7.0±0.3	4.6±0.2	2.3±0.3	2.0±0.3
AR5	7.0±0.4	4.5±0.3	2.5±0.3	1.8±0.3

1. Abbreviation meaning of each group is shown in Table4.15.

2. Each value is expressed as mean ± SD (n=9).

表 4.23、餵食不同劑量雷公根 20%、酸棗仁 40% 酒精萃取物與紅麴山藥對大鼠血液中腎功能尿素氮、肌酸酐與尿酸之影響。

Table 4.23. Effect of *Centella asiatica*, *Semen Zizyphi spinosae* ethanol extract or RMD on experimental AD rat performance in terms of serum BUN, creatinine and uric acid levels

Group	BUN	Creatinine	Uric acid
	mg/dL		
N	19.2±1.2	0.50±0.03	5.7±1.0
A	18.7±3.0	0.39±0.03	5.7±1.3
AM	19.6±1.9	0.46±0.08	5.8±2.0
AC 0.5	19.5±3.2	0.45±0.07	5.1±1.5
AC 1	17.5±2.7	0.42±0.07	5.8±1.8
AC 5	17.8±2.1	0.43±0.08	6.4±1.3
AZ 0.5	19.3±1.2	0.51±0.05	6.0±1.9
AZ 1	18.4±3.1	0.47±0.09	6.1±2.2
AZ 5	17.1±1.6	0.43±0.05	6.2±0.8
C	16.8±1.7	0.46±0.06	6.6±2.6
AC	18.4±2.6	0.49±0.06	6.5±1.3
AM	18.4±2.4	0.48±0.07	6.5±1.9
AR1	23.1±3.8	0.46±0.07	5.6±1.3
AR2	21.6±3.7	0.45±0.06	5.8±2.4
AR5	19.6±4.9	0.52±0.08	5.6±1.8

1. Abbreviation meaning of each group is shown in Table 4.15.

2. Each value is expressed as mean ± SD (n=9).

表 4.24、飼食不同劑量雷公根 20%、酸棗仁 40% 酒精萃取物與 RMD 對大鼠血液中電解質鈉、鉀、氯、鈣與磷之影響。

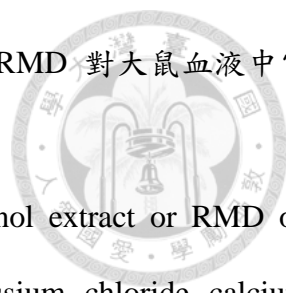


Table 4.24. Effect of *Centella asiatica*, *Semen Zizyphi spinosae* ethanol extract or RMD on experimental AD rat performance in terms of serum sodium, potassium, chloride, calcium and phosphorus levels

Group	Na	K	Cl	Ca	P
	mEq/L			mg/dL	
N	151.2±1.2	7.3±0.8	94.2±1.5	11.3±0.3	14.4±0.7
A	149.0±1.1	6.8±0.4	94.1±1.9	12.3±0.6	10.9±0.6
AM	148.6±1.6	7.6±1.5	93.9±2.3	12.4±0.7	11.9±1.0
AC 0.5	148.6±0.8	8.3±0.7	94.1±1.7	12.1±0.5	13.7±1.0
AC 1	148.4±0.9	7.2±0.9	94.0±1.8	12.4±0.5	11.5±1.2
AC 5	149.3±1.0	7.0±0.9	93.9±1.9	12.6±0.3	11.4±1.2
AZ 0.5	148.3±3.3	8.3±1.5	91.7±3.3	12.1±1.2	14.4±1.7
AZ 1	148.6±2.4	9.3±4.4	94.4±1.9	12.1±0.5	14.4±8.2
AZ 5	149.4±1.1	7.4±0.6	94.9±1.2	12.1±0.6	11.8±0.6
AR1	150.2±1.1	7.5±0.9	91.6±1.6	12.4±0.5	12.0±4.6
AR2	148.8±1.9	7.3±1.6	92.3±1.6	12.5±0.7	13.4±3.6
AR5	148.6±1.6	7.1±1.1	93.3±1.7	12.4±0.6	14.1±2.4

1. Abbreviation meaning of each group is shown in Table 4.15.

2. Each value is expressed as mean ± SD (n=9).



十、健康食品安全分類第二類產品雷公根飲品之安全性評估試驗

(一) 評估雷公根飲品之沙門氏菌回復突變試驗

由表 4.25 結果顯示，本試驗所使用的五株菌株 *Salmonella typhimurium* TA98、TA100、TA102、TA1535 及 TA1537 經鑑定後，其基因型皆符合本試驗所需。由於試驗物質於斑點測試時，並無觀察到對 5 株受試菌株有毒性或致突變性產生，因此本試驗之最高濃度為 50 mg/mL (5 mg/plate)，並以此濃度進行兩倍系列稀釋至 2.5、1.25、0.625 及 0.3125 mg/plate。在本試驗中，所有組別之陰性對照組其自發性突變菌落平均數均落在有效範圍內，而陽性對照組所引起的回復突變菌落數也均符合試驗要求 (表 4.25)，故本次試驗之數據皆為有效數據。本試驗中最高濃度 (5 mg/plate) 之試驗物質於添加 S9 酵素活化處理後，於 TA98、TA100、TA102、TA1535 及 TA1537 五株試驗菌株，所產生的回復突變菌落數平均分別為 23、139、187、17 及 8 CFU/plate；未添加 S9 酵素活化處理後之回復突變菌落數平均分別為 22、130、180、13 及 10 CFU/plate，均未達陰性對照組 2 倍以上顯示其並不具有致變異性，而經連續稀釋後之試驗物質對測試菌株亦不具有致變異性。

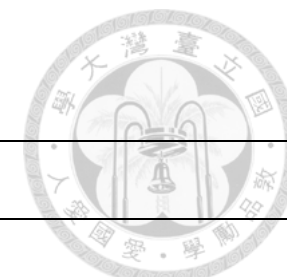
本試驗中各濃度之試驗物質雷公根飲品，於添加 S9 酵素或未添加 S9 酵素活化處理後，TA98、TA100、TA102、TA1535 及 TA1537 五株試驗菌株所產生的回復突變菌落數均未達陰性對照組菌落數兩倍以上。因此，在本試驗條件下，雷公根飲品於沙門氏菌回復突變測試之結果判定為陰性反應。

(二) 評估雷公根飲品之體外哺乳類細胞染色體異常試驗

本試驗係依據 OECD 473 進行體外哺乳類細胞染色體結構異常試驗，評估試驗物質雷公根飲品之基因毒性。在試驗物質濃度 5.0 mg/mL 下，經三種方式 (未添加 S9，處理 3 小時；未添加 S9，處理 20 小時；添加 S9，處理 3 小時) 處理細胞，於加入試驗物質後第 20 小時進行細胞存活數試驗，計算每盤細胞之細胞存活數。由表 4.26 中得知在添加 S9 酵素處理 3 小時，試驗物質濃度為 5 mg/mL 其細胞存活率為 96.8%，而未添加 S9 酵素

表 4.25、雷公根飲品之沙門氏菌回復突變試驗結果。

Table 4.25. Result of bacterial reverse mutation test (Ames test) of *Centella asiatica*



Mean number of revertants (number of colonies/plate) ^a						
Group	Test article concentration(mg/plate)	TA98	TA100	TA102	TA1535	TA1537
S9 mix (-)	5	22±1	130±3	180±9	13±1	10±1
	2.5	24±2	133±4	168±11	14±1	9±1
	1.25	24±2	132±5	174±14	14±2	9±1
	0.625	22±2	131±5	177±12	16±2	9±2
	0.3125	23±2	133±4	165±9	14±2	7±1
S9 mix (+)	5	23±2	139±4	187±11	17±2	8±1
	2.5	24±1	128±13	181±15	15±3	9±2
	1.25	21±1	128±5	204±7	15±1	8±1
	0.625	27±4	126±5	186±16	14±1	10±2
	0.3125	27±2	120±11	177±18	13±2	8±1
Positive	Chemical name	4-nitroquinoline-N-oxide	Sodium azide	Mitomycin C	Sodium azide	9-aminoacridine

Control ^b	Dose($\mu\text{g}/\text{plate}$)		0.5	0.4	0.5	0.4	4.0
S9 mix (-)	Mean revertant colonies/plate		258 \pm 4 ^c	834 \pm 13 ^c	1114 \pm 14 ^c	741 \pm 18 ^c	622 \pm 15 ^c
Negative Control	Mean revertant colonies/plate		22 \pm 4	138 \pm 7	175 \pm 6	11 \pm 2	9 \pm 2
Positive Control ^b	Chemical name		Benzo [a] pyrene	2-aminofluorene	Benzo [a] pyrene	2-aminoanthracene	2-aminoanthracene
S9 mix (+)	Dose		4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
	Mean revertant colonies/plate		217 \pm 16 ^c	421 \pm 7 ^c	515 \pm 11 ^c	88 \pm 9 ^c	35 \pm 3 ^c
Negative Control	Mean revertant colonies/plate		25 \pm 3	137 \pm 6	185 \pm 10	20 \pm 3	9 \pm 1

1. Average colonies shown as Mean \pm S.D. n=3.

2. Positive Control: as table shown.

3. The number of revertants colonies is much more than twice of Negative control, $p < 0.05$ (ANOVA).

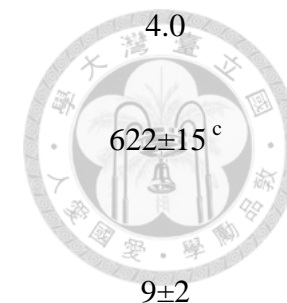


表 4.26、雷公根飲品之體外哺乳類細胞染色體異常試驗。

Table 4.26. Chromosome analysis (chromosome aberration) of Chinese hamster cell of *Centella asiatica* brevage



Group		Number of cells with structural aberrations (per 100 cells) ^{c, d, e}									Total Number of chromosomes with aberrations	Total Number of cells with aberrations	Relative cell growth rate (%)	Final judgement	
		G ^e	B	D	R	G ^e	b	Int	Itr	other					
S9 mix (-) 3 hr	Negative Control ^a	0	0	1	0	0	0	0	1	0	2	2	100.0	—	
	Positive Control ^b	0	2	0	0	0	3	7	0	0	12	10	100.0	+	
	Concentration mg/mL														
	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	85.8	—	
	2.5	0	0	0	0	1	1	1	0	0	2	2	100.0	—	
1.25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	97.4	—		
S9 mix (+) 3 hr	Negative Control ^a	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	100.0	—	
	Positive Control ^b	0	0	2	0	0	4	2	0	0	8	8	83.3	+	
	Concentration (mg/mL)														

S9 mix (-) 20 hr	5	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	96.8	—	
	2.5	0	0	0	0	2	2	0	0	0	2	2	100.0	—	
	1.25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100.0	—	
	Negative Control ^a	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100.0	—	
	Positive Control ^b	0	0	1	0	2	3	5	0	0	9	9	93.1	+	
	Concentration (mg/mL)														
	5	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	100.0	—	
	2.5	0	0	0	0	0	0			0	0	0	90.8	—	
	1.25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	92.9	—	

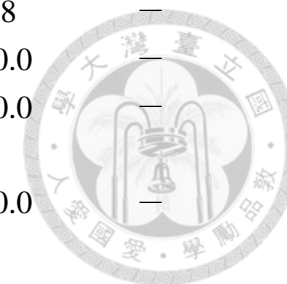
1. Negative Control: Group with S9 supplement is Ham's / F-12 culture media; Group without S9 supplement is Ham's / F-12 culture media with 10% FBS

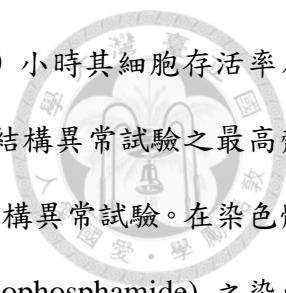
2. Positive Control: 6 μ M mitomycin C ◦

3. All tests are duplicated ◦

4. G: chromosome gap, B: chromosome break, D: dicentric, R: ring, g: chromatid gap, b: chromatid break, Int: Interchange, Itr: Intrachange.

5. Gaps were recorded separately but not included in aberrant cells.





處理 3 小時其細胞存活率為 85.8%，未添加 S9 酵素處理 20 小時其細胞存活率為 100.0%，且皆未觀察到細胞毒性，故以此試驗物質濃度作為染色體結構異常試驗之最高劑量以及 2.5 mg/mL 和 1.25 mg/mL 等 3 個劑量進行未細胞染色體結構異常試驗。在染色體結構異常試驗結果顯示於表 4.26，陽性對照組 (mitomycin C 及 cyclophosphamide) 之染色體異常細胞數高於 3%，且陰性對照組之染色體異常細胞數在 3% 以下，表示此次試驗為有效試驗。且在添加 S9 酵素處理 3 小時、未添加 S9 酵素處理 3 小時和 20 小時的試驗中，各試驗組 3 個劑量之染色體異常細胞數均在 3% 以下。依據上述結果，雷公根飲品在本試驗條件下，體外哺乳類細胞染色體結構異常試驗為陰性反應。

(三) 評估雷公根飲品之齶齒類週邊血液微核試驗

本實驗以 ICR 品系雄性小鼠進行週邊血液微核試驗，以管餵方式餵食試驗物質，在投予試驗物質後第 48 小時及 72 小時，評估對小鼠週邊血液網狀紅血球及網狀紅血球中微核發生率之影響。將小鼠週邊血液之網狀紅血球以 acridine orange 染色於螢光顯微鏡下呈橘紅色，網狀紅血球內可見黃綠色螢光之微核。表 4.27 中表示在投予後 48 小時，陰性對照組小鼠網狀紅血球比率為 48.0%，陽性對照組則為 23.0%，與陰性對照比較呈顯著性下降 ($p < 0.05$)。試驗組之低、中及高劑量組之網狀紅血球數目分別為 45.4、47.0 及 46.0%，與陰性對照組比較則無顯著差異。另外網狀紅血球中含微核數目，陰性對照組小鼠之微核比率為 1.0%，而陽性對照組為 15.8%，與陰性對照組比較呈顯著性增加 ($p < 0.05$)；而試驗組之低、中及高劑量組網狀紅血球中含微核數目比率則分別為 1.2、1.8 及 0.8%，與陰性對照組比較並無明顯差異。

在投予後 72 小時，陰性對照組小鼠網狀紅血球比率為 41.8%，陽性對照組則為 22.4%，與陰性對照組比較呈顯著性下降 ($p < 0.05$)。試驗組之低、中，及高劑量組之網狀紅血球比率分別為 45.2、43.6 及 46.0%，與陰性對照組比較並無明顯差異。另外，網狀紅血球中含微核數目，陰性對照組小鼠之微核比率為 0.8%，而陽性對照組為 16.8%，與陰性對照組

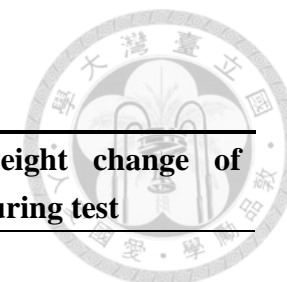
表 4.27、雷公根飲品之嚙齒類週邊血液微核試驗

Table 4.27. The numbers of reticulocytes and the micronucleus in peripheral blood of test mice

Group	Dose(g/kg)	RETs/1,000 RBCs ¹	MN-RETs/1,000 RETs ¹	Clinical Observation	The weight change of mice during test
48 hr					
Negative Control	-	48.0 ± 3.3 ^b	1.0 ± 1.0 ^a	Normal	31.0 ± 1.4 ^a 32.2 ± 1.6 ^a
Positive Control	0.05	23.0 ± 3.0 ^a	15.8 ± 2.4 ^b	Normal	31.0 ± 1.5 ^a 32.1 ± 1.6 ^a
Low dose	1.25	45.4 ± 2.8 ^b	1.2 ± 1.1 ^a	Normal	30.9 ± 1.4 ^a 32.2 ± 1.2 ^a
Medium dose	2.5	47.0 ± 3.9 ^b	1.8 ± 1.1 ^a	Normal	31.0 ± 1.8 ^a 32.4 ± 1.6 ^a
High dose	5.0	46.0 ± 3.8 ^b	0.8 ± 0.8 ^a	Normal	31.2 ± 1.3 ^a 32.3 ± 1.6 ^a
72 hr					
Negative Control	-	41.8 ± 3.0 ^b	0.8 ± 0.8 ^a	Normal	31.0 ± 1.4 ^a 32.2 ± 1.6 ^a
Positive Control	0.05	22.4 ± 2.5 ^a	16.8 ± 3.3 ^b	Normal	31.0 ± 1.5 ^a 32.1 ± 1.6 ^a
Low dose	1.25	45.2 ± 4.1 ^b	0.6 ± 0.5 ^a	Normal	30.9 ± 1.4 ^a 32.2 ± 1.2 ^a
Medium dose	2.5	43.6 ± 3.8 ^b	0.8 ± 0.8 ^a	Normal	31.0 ± 1.8 ^a 32.4 ± 1.6 ^a
High dose	5.0	46.0 ± 3.1 ^b	1.0 ± 1.2 ^a	Normal	31.2 ± 1.3 ^a 32.3 ± 1.6 ^a

RETs: reticulocytes; RBCs: erythrocytes; MN-RETs: micronucleated reticulocytes.

1. All data shows in mean ± SD (n = 5). The difference between groups were calculated by statistic method One-way ANOVA and Duncan`s multiple range test. The letter a, b and c means the difference in statistics, the same letter means that there`s no difference in statistics ($p > 0.05$).



比較呈顯著性增加 ($p < 0.05$)；試驗組之低、中及高劑量組網狀紅血球中，含微核數目比率則分別為 0.6、0.8 及 1.0%，與陰性對照組比較均無明顯差異。綜合以上結果，本試驗各劑量組對小鼠週邊血液之網狀紅血球和網狀紅血球中微核數目均與陰性對照組無顯著性差異，試驗結果為陰性。故雷公根飲品對齧齒類動物之週邊血液微核試驗，於本試驗條件下為陰性反應。

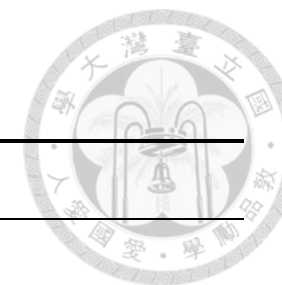
(四) 評估雷公根飲品之大鼠 28 天重複劑量亞急性毒性試驗

本試驗係依據衛生福利部公告之健康食品安全性評估方法，測試雷公根飲品連續餵食大鼠 28 天後對大鼠體內可能產生之毒性變化，作為重複使用安全性之參考。本試驗共設置 4 組試驗組，分別為對照組、低、中及高劑量組。低、中及高劑量組大鼠試驗物質投予量分別為 3.3、6.6 及 9.9 g/kg B.W.，分別為人體每日建議口服劑量（人體每日 6.6 g/60 kg B.W.）之 30 倍、60 倍及 90 倍。每組各使用 10 隻雄性及雌性 Sprague-Dawley (SD) 品系大鼠，以口服管餵方式連續 28 天投予試驗物質，每日由獸醫師對各組試驗大鼠進行 2 次臨床觀察，且每週測量試驗動物之體重及攝食量。結果各劑量組及對照組大鼠均能正常增重，皆未出現任何異常之臨床症狀也未發生死亡情形。各劑量組雄鼠或雌鼠試驗期間均能正常增重，試驗結束時，除中劑量組雌鼠體重與對照組比較呈明顯增加外 ($p < 0.05$)，其餘各組與對照組間均無明顯差異。此外，試驗前後檢查各劑量組及對照組大鼠眼睛，均無發現任何異常。

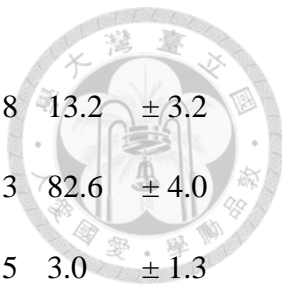
血液學檢測方面，各組雄鼠或雌鼠血液學分析結果如表 4.28 所示，試驗結果顯示各劑量組雄鼠或雌鼠，其各項血液學分析結果與對照組間均無明顯差異 ($p > 0.05$)。血清生化檢測方面 (表 4.29)，各組雄鼠血清生化分析結果除高劑量組，球蛋白量明顯低於對照組 ($p < 0.05$)，及高劑量組血中磷離子濃度明顯高於對照組 ($p < 0.05$) 外，其餘項目各劑量組與對照組間均無明顯差異 ($p > 0.05$)。雌鼠方面，各劑量組與對照組相比較均無明顯差異 ($p > 0.05$)。試驗結束時，各組大鼠經病理解剖及肉眼病理學檢查之結果顯示，各劑量組和對照組大鼠之心臟、肺臟、肝臟、脾臟、腎臟、消化道、腦及生殖泌尿系統等組織器官中，均未發現與試驗物質有關之肉眼病變。主

表 4.28、餵飼雷公根飲品大鼠 28 天重複劑量亞急性毒性試驗血液學分析結果。

Table 4.28. Hematological evaluation in rat gavaged with *Centella asiatica* breverage for 28 days.



Test item	Hematological evaluation													
	Female							Male						
	Control	Low dose	Medium		High dose	Control	Low dose	Medium		High dose				
	0 g/kg	3.3 g/kg	dose	9.9 g/kg	0 g/kg	3.3 g/kg	dose	9.9 g/kg						
		6.6 g/kg					6.6 g/kg							
WBC ($10^3/\mu\text{L}$)	9.7 ± 3.9 ^a	10.4 ± 2.2	10.8 ± 1.8	9.8 ± 3.1	13.6 ± 2.4	12.2 ± 1.7	12.2 ± 3.4	11.7 ± 3.0						
RBC ($10^6/\mu\text{L}$)	8.3 ± 0.4	8.2 ± 0.3	8.3 ± 0.6	8.1 ± 0.2	8.4 ± 0.3	8.3 ± 0.3	8.2 ± 0.2	8.3 ± 0.2						
Hemoglobin (g/dL)	16.5 ± 0.9	15.9 ± 0.5	16.2 ± 0.8	16.0 ± 0.5	16.3 ± 0.9	16.3 ± 0.9	16.1 ± 0.7	16.3 ± 0.7						
Hematocrit (%)	51.0 ± 2.1	49.7 ± 1.5	50.1 ± 2.5	49.8 ± 1.5	50.7 ± 2.4	50.8 ± 2.5	50.3 ± 2.1	50.6 ± 1.9						
MCV (fL)	61.3 ± 2.7	60.6 ± 1.9	60.6 ± 2.0	61.6 ± 1.8	60.4 ± 2.0	61.1 ± 1.4	61.4 ± 2.1	60.9 ± 1.4						
MCH (pg)	19.8 ± 1.1	19.4 ± 0.6	19.6 ± 0.6	19.8 ± 0.7	19.4 ± 0.8	19.6 ± 0.7	19.7 ± 0.6	19.7 ± 0.6						
MCHC (g/dL)	32.3 ± 0.7	32.0 ± 0.4	32.4 ± 0.4	32.1 ± 0.4	32.1 ± 0.5	32.0 ± 0.7	32.1 ± 0.4	32.3 ± 0.4						
Platelet ($10^3/\mu\text{L}$)	761 ± 133	810 ± 117	759 ± 272	806 ± 112	867 ± 172	789 ± 63	795 ± 127	780 ± 106						

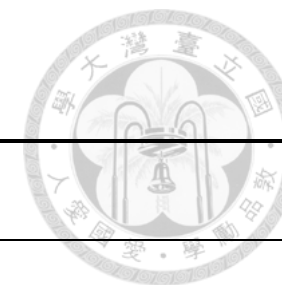


Neutrophil (%)	13.9 ± 4.3	12.8 ± 4.9	12.9 ± 6.6	15.9 ± 5.4	15.4 ± 2.9	14.6 ± 2.0	13.6 ± 3.8	13.2 ± 3.2
Lymphocyte (%)	81.2 ± 5.3	83.3 ± 5.0	82.9 ± 7.7	79.5 ± 5.6	79.2 ± 3.1	80.3 ± 2.1	81.4 ± 4.3	82.6 ± 4.0
Monocyte (%)	3.5 ± 1.5	2.7 ± 1.1	3.1 ± 1.3	3.5 ± 1.5	4.0 ± 1.0	3.8 ± 1.0	3.6 ± 1.5	3.0 ± 1.3
Eosinophil (%)	1.3 ± 0.7	1.0 ± 0.3	0.8 ± 0.3	1.0 ± 0.2	1.3 ± 0.3	1.1 ± 0.2	1.1 ± 0.3	1.0 ± 0.2
Basophil (%)	0.17 ± 0.05	0.20 ± 0.08	0.21 ± 0.07	0.16 ± 0.05	0.18 ± 0.06	0.21 ± 0.10	0.28 ± 0.29	0.20 ± 0.07
Reticulocyte (%)	3.0 ± 0.7	3.1 ± 0.7	3.0 ± 0.4	2.7 ± 0.4	2.6 ± 0.4	2.7 ± 0.3	3.0 ± 0.6	2.7 ± 0.5
Prothrombin Time (sec.)	10.2 ± 0.3	10.2 ± 0.3	10.1 ± 0.2	10.2 ± 0.2	15.1 ± 1.9	15.2 ± 2.5	15.5 ± 4.0	13.7 ± 1.1

^a Data shown as mean±SD. n=10 *Significant from control group (p<0.05).

表 4.29、餵飼雷公根飲品大鼠 28 天重複劑量亞急性毒性試驗血清生化值分析結果。

Table 4.29. Clinical Chemistry evaluation in rat gavaged with *Centella asiatica* for 28 days.



Test item	Clinical Chemistry evaluation							
	Female				Male			
	Control 0 g/kg	Low dose 3.3 g/kg	Medium dose 6.6 g/kg	High dose 9.9 g/kg	Control 0 g/kg	Low dose 3.3 g/kg	Medium dose 6.6 g/kg	High dose 9.9 g/kg
AST (U/L)	123.8± 43.6 ^a	117.1± 59.0	94.5± 17.2	93.3± 18.3	91.2± 17.3	98.0± 16.3	100.6± 26.6	98.7± 36.4
ALT (U/L)	32.7± 19.2	29.0± 15.2	26.9± 6.7	25.5± 5.5	33.1± 5.3	34.2± 7.0	34.2± 7.0	35.1± 14.3
ALP (U/L)	94.6± 25.1	100.3± 23.9	94.2± 15.8	88.3± 11.7	153.3± 32.4	170.9± 34.6	162.3± 21.7	165.8± 35.7
Total bilirubin (µg/dL)	23.6± 11.0	34.5± 12.3	23.0± 8.2	26.8± 7.6	22.4± 7.8	21.1± 12.5	16.9± 5.6	17.3± 8.3
Total protein (g/dL)	6.9± 0.6	7.2± 0.2	7.2± 0.4	7.1± 0.3	6.7± 0.2	6.6± 0.3	6.7± 0.2	6.5± 0.2
Albumin (g/dL)	4.4± 0.4	4.7± 0.1	4.6± 0.2	4.6± 0.2	4.3± 0.1	4.2± 0.2	4.3± 0.1	4.3± 0.1
Globulin (g/dL)	2.5± 0.3	2.5± 0.1	2.6± 0.3	2.5± 0.1	2.4± 0.1	2.4± 0.1	2.5± 0.1	2.3± 0.2*
BUN (mg/dL)	15.9± 3.2	14.8± 1.6	15.7± 1.3	15.2± 1.9	12.7± 0.8	13.2± 1.3	13.9± 2.3	14.2± 1.6
Creatinine (mg/dL)	0.41± 0.08	0.44± 0.04	0.44± 0.04	0.42± 0.05	0.37± 0.07	0.39± 0.06	0.39± 0.07	0.37± 0.06

Glucose (mg/dL)	125.6± 28.0	116.9± 23.0	120.2± 30.9	125.4± 39.0	161.3± 19.2	174.9± 37.6	177.9± 21.7	164.5± 22.4
Triglyceride (mg/dL)	50.7± 17.2	45.2± 11.2	53.2± 24.8	55.8± 24.3	74.0± 44.0	73.3± 42.9	78.1± 24.9	66.6± 12.6
Cholesterol (mg/dL)	76.3± 9.6	81.9± 13.2	90.2± 12.7	79.5± 15.0	71.7± 9.8	69.7± 14.0	76.7± 8.2	62.0± 9.7
Sodium (meq/L)	147.5± 5.2	148.8± 0.8	148.6± 1.2	148.4± 1.6	150.0± 1.8	149.8± 1.5	149.3± 1.3	150.0± 0.9
Potassium (meq/L)	6.9± 0.7	7.0± 0.4	6.4± 0.6	6.8± 0.6	6.8± 0.7	6.7± 0.5	6.7± 0.6	6.7± 0.7
Calcium (mg/dL)	11.5± 1.0	11.7± 0.3	11.9± 0.4	11.9± 0.6	11.8± 0.4	11.7± 0.4	12.0± 0.2	11.6± 0.4
Chloride (meq/L)	103.2± 3.1	103.3± 1.5	102.4± 1.0	102.7± 1.4	102.1± 1.0	101.7± 1.3	101.1± 1.7	102.1± 1.1
Phosphorus (mg/dL)	10.7± 1.3	10.5± 0.4	10.1± 0.6	10.6± 1.3	11.0± 0.7	11.4± 0.9	11.6± 0.9	12.5± 1.3*

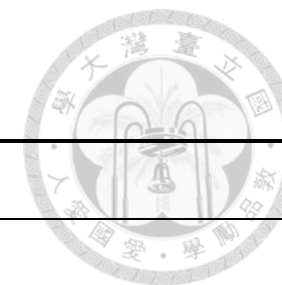
^a Data shown as mean±SD. n=10. *Significant from control group (p<0.05).

要臟器重量 (表 4.30)，除低劑量及高劑量雌鼠心臟相對重量與對照組比較有略為增加之情形外 ($p < 0.05$)，其餘各劑量組主要臟器重量與對照組比較均無明顯差異。

根據組織病理檢查結果，對照組及高劑量組之腦、心臟、腎臟、腎上腺、肝臟、脾臟、睪丸及卵巢均無明顯組織病理變化。部份鼠隻心臟及肝臟出現局部、極微至輕微單核炎症細胞浸潤；腎臟出現局部極微至輕微、腎囊腔、單核炎症細胞浸潤、間質纖維化及腎小管再生；雌雄鼠肝臟均出現多發性、極微至輕微脂肪滴浸潤，此為鼠隻個體間差異，上述病變於對照組與高劑量組病變程度及發生率並無正相關性，為非特异性病變，與試驗物質無關。綜合以上結果，雷公根複合飲品對大鼠 28 天重複劑量，亞急性毒性試驗之無毒性顯示之劑量 (NOAEL) 為大於 9.9 g/kg B.W.。此劑量為人類建議攝取量 (每日 6.6 g/60kg B.W.) 之 90 倍。

表 4.30、飼餵雷公根飲品大鼠 28 天重複劑量亞急性毒性試驗各器官組織重量結果。

Table 4.30. Summary of organ weight/body weight ratio (% of body weight).



Organ	Organ relative weight (g/ 100 g b.w.)												
	Female						Male						
	Control	Low dose	Medium dose	High dose	Control	Low dose	Medium dose	High dose	Control	Low dose	Medium dose	High dose	
	0 g/kg	3.3 g/kg	6.6 g/kg	9.9 g/kg	0 g/kg	3.3 g/kg	6.6 g/kg	9.9 g/kg	0 g/kg	3.3 g/kg	6.6 g/kg	9.9 g/kg	
Ovary/Testis	0.039	± 0.006 ^a	0.038 ± 0.004	0.038 ± 0.008	0.036 ± 0.003	0.80	± 0.05	0.80	± 0.08	0.79	± 0.06	0.79	± 0.06
Spleen	0.22	± 0.03	0.21 ± 0.03	0.23 ± 0.03	0.22 ± 0.03	0.20	± 0.02	0.18	± 0.02	0.19	± 0.02	0.18	± 0.02
Kidney	0.80	± 0.06	0.81 ± 0.07	0.75 ± 0.04	0.78 ± 0.04	0.83	± 0.06	0.84	± 0.07	0.81	± 0.08	0.82	± 0.08
Adrenals	0.027	± 0.006	0.028 ± 0.004	0.028 ± 0.003	0.028 ± 0.002	0.015	± 0.002	0.015	± 0.003	0.015	± 0.003	0.015	± 0.002
Liver	3.18	± 0.18	3.30 ± 0.14	3.26 ± 0.22	3.36 ± 0.18	3.23	± 0.18	3.20	± 0.21	3.32	± 0.19	3.25	± 0.21
Heart	0.39	± 0.02	0.43 ± 0.02*	0.39 ± 0.03	0.42 ± 0.03*	0.39	± 0.03	0.39	± 0.03	0.39	± 0.02	0.38	± 0.04
Brain	0.80	± 0.04	0.79 ± 0.04	0.76 ± 0.03	0.77 ± 0.05	0.50	± 0.03	0.49	± 0.03	0.47	± 0.02	0.49	± 0.04

^a Data shown as mean±SD. n=10. *Significant from control group (p<0.05).

第五章 結論

論文第一部分針對紅麴山藥及其所含二級代謝產物，證實分別具有降膽固醇、降血壓與調節血糖功效，能有效治療三高疾病。以含 monascin 15 mg 之紅麴山藥為一倍劑量、含 monascin 75 mg 之紅麴山藥為五倍劑量，將紅麴山藥與健保局普遍使用之三高藥物併用，探討紅麴產品機能性成分與藥物併用對調節血脂、血壓、血糖之功效及對引發橫紋肌溶解症之影響，順利完成下列項目：

1. 紅麴山藥與降血脂藥物併用對高膽固醇倉鼠血脂及其生理之影響。
2. 紅麴產品與降血壓藥物併用對高血壓大鼠血壓及其生理之影響。
3. 紅麴產品與降血糖藥物併用對糖尿病大鼠血糖及其生理之影響。

結果證明紅麴保健食品中降血脂功效 monascin 之劑量，確實是安全無虞。由於曾有報導指出紅麴代謝物中 citrinin 會引發肝腎毒性，本研究也針對肝功能與腎功能進行檢測，結果發現紅麴山藥中二級代謝產物及其機能性成分，對於餵食不同的大鼠，並未發生任何肝、腎功能之異常與病變。以紅麴山藥的機能性成分 monascin 與 ankaflavin 也經餵食不同病症大鼠，不但不會使其病變惡化，更有改善效果。此外有人認為紅麴長久以來均被視為食品，未有明確的案例指出紅麴會引發橫紋肌溶解症。然而發生橫紋肌溶解症之原因，有部分文獻是指向膽固醇生合成路徑中受到抑制後而引發。本研究也證實服用五倍劑量之紅麴山藥 (monascin 75 mg)，並不會引起橫紋肌溶解症，藉此結果可知存在於紅麴山藥中的 monascin (15 mg) 並不會引發橫紋肌溶解症，對消費者更可以進一步的保障食的安全。

阿茲海默症發生之原因目前仍不清楚，但於患者腦部可發現下列現象：澱粉樣蛋白 (β -amyloid) 的堆積、 τ -蛋白 (tau-protein) 的累積、乙醯膽鹼 (acetylcholine) 濃度減少、發炎反應、氧化壓力增加及腦部血流不足等現象。阿茲海默症的成因頗為複雜，包括基因突變、環境因素與個人習性都可能影響該病的發生及進展；而類澱粉樣蛋白 (amyloid β -peptide, A β) 假說則是目前最為學界所接受的理論 (Blass *et al.*, 2001; Shoghi-Jadid *et al.*, 2002)。該假說指出類澱粉樣蛋白乃是阿茲海默症形成的主要元兇，類澱粉樣蛋白會在大腦皮質 (cortex) 及海馬迴 (hippocampus) 中過度分泌而大量沉

積，導致神經元傷害而產生老年斑 (senileplaque) 和神經纏結 (neuronbhllyartangles)，此為阿茲海默症之病理特徵 (Glennner and Wong., 1984; Abraham *et al.*, 1989; Alzheimer *et al.*, 1995)。因此，Flood 等人於 1991 年以 amyloid β -peptide-(1-40) 於大鼠側腦室中進行連續輸注以誘導大鼠腦中形成似老年斑塊的沉積，並造成神經損壞與學習操作能力障礙，以作為擬似阿茲海默症之動物模武 (Flood *et al.*, 1991)。

論文第二部分是針對老年失智症中比例最高的阿茲海默症開發延緩衰老健康食品素材之研究。經由 IMR-32 神經細胞進行細胞毒性試驗篩選，具有預防 AD 潛力之中草藥，玫瑰對 IMR32 神經細胞並未造成任何細胞凋亡的現象，反而有增生效果，山楂則不會造成細胞凋亡。而 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之 20、60、80% 雷公根酒精萃取物與 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之雷公根去離子水萃取物，僅有雷公根 40% 酒精萃取會降低 40% 的細胞存活率，其餘則皆不會造成 IMR32 神經細胞凋亡。由中藥對神經細胞的安全性，與中草藥萃取物保護細胞免於類澱粉蛋白所產生神經毒性傷害之評估，並且順利篩選到兩種中草藥，確立所萃取濃度與方法。

將具有不同抗氧化能力及細胞增生效果之雷公根與酸棗仁兩種萃取物，進行體內動物評估試驗。此外，由本研究室先前 利用傳統變異法篩選得到 *M. purpureus* NTU 568 之紅麴菌株，並且以紅麴米發酵產物研究證實，其對阿茲海默症危險因子的改善作用，且有多篇期刊研究報告證實以山藥當基質之紅麴發酵物，具改善數種氧化壓力及/或發炎反應相關與代謝症候群疾病的能力，推測此菌株發酵之紅麴山藥，對 $\text{A}\beta$ 腦部輸注之阿茲海默症大鼠記憶學習能力因具改善潛力，因此一併進行各項試驗。結果顯示每日餵食雷公根 20%、酸棗仁 40% 酒精萃取物與紅麴山藥，於被動迴避、參考記憶及工作記憶試驗的表現皆獲得改善。攝食雷公根 20%、酸棗仁 40% 酒精萃取物與紅麴山藥可顯著抑制，因輸注 $\text{A}\beta$ 所提高的乙醯膽鹼酶活性，減少腦部組織損傷，也降低腦部組織中之 iNOS 酵素活性，提升腦內抗氧化力。

最後則是針對具有預防阿茲海默症之萃取物進行產品開發，目前已開發出雷公根飲品，其在衛生福利部健康食品安全性評估方法，歸屬第二類乃進行相關安全試驗。雷公根飲品在沙門氏菌回復突變試驗中，無論是否經過大鼠肝臟酵素代謝作用，皆不

會引發沙門氏菌回復突變。在體外哺乳類細胞染色體結構異常試驗評估試驗物質之基因毒性，以 CHO-K1 細胞進行試驗，並依據試驗物質對於 CHO-K1 的細胞毒性來設定染色體結構異常試驗之最高劑量；染色體結構異常試驗分為 3 種處理方式，分別是添加 S9 酵素處理 3 小時、未添加 S9 酵素處理 3 小時和 20 小時。試驗物質濃度分 5、2.5 和 1.25 mg/mL 等 3 個劑量進行試驗。結果顯示在添加 S9 酵素處理 3 小時、未添加 S9 酵素處理 3 小時和 20 小時的試驗中，各試驗組 3 個劑量之染色體異常細胞數均在 3% 以下，為陰性反應。同時也進行齧齒類週邊血液微核試驗，評估試驗物質是否具有致變異性。試驗期間各組小鼠均無顯現任何毒性症狀，此外各組小鼠體重皆無顯著差異。小鼠週邊血液之網狀紅血球以 acridine orange 染色並於螢光顯微鏡下觀察，試驗結果顯示各劑量組小鼠 48 小時及 72 小時網狀紅血球 (reticulocytes) 數目及網狀紅血球中含微核 (micronucleated reticulocytes) 數目均與陰性對照組間無明顯差異。陽性對照組小鼠之網狀紅血球數目與陰性對照組比較呈顯著性下降，且網狀紅血球中微核數目則呈顯著性增加之情形。各劑量組小鼠經口服投予試驗物質後其週邊血液之網狀紅血球和網狀紅血球中微核數目相較於陰性對照組皆無顯著性差異為陰性反應。最後進行連續餵食大鼠 28 天後對大鼠體內可能產生之毒性變化，作為重複使用安全性之參考。以口服管餵方式連續 28 天投予試驗物質，每日進行試驗動物之臨床觀察，且每週測量試驗動物之體重及攝食量。試驗結束後，犧牲大鼠採集血液及臟器進行血液學分析、血清生化分析及病理學檢查。試驗結果顯示，試驗期間所有試驗大鼠均無出現異常之臨床症狀；各劑量組大鼠均能正常增重，而眼睛檢查結果顯示各組大鼠均未異常。試驗結束時之尿液學檢查、血液學檢查、血清生化學檢查之結果顯示各劑量組和對照組間並無明顯差異。病理解剖、肉眼病變檢查以及組織病理學檢查之結果顯示，各劑量組和對照組大鼠均無明顯組織病理變化。綜合以上實驗結果，雷公根飲品對大鼠 28 天重複劑量亞急性毒性試驗之無毒性顯示之劑量 (NOAEL) 為大於 9.9 g/kg B.W.，此劑量為人類建議攝取量 (每日 6.6 g/ 60 kg B.W.) 之 90 倍。在科學性的多方試驗下，提供更充分的證據證實其功效，以此優勢將開發出雷公根飲品與紅麴為作為多效性之延緩老化保健食品。

第陸章 參考文獻

- 牛淑敏、朱頌華、李巍、王冬、王春發與劉方。2004。中藥材玫瑰花抗氧化及作用機制的研究。開南大學學報 (自然科學版)。37: 29-33。
- 台北市士林區健康服務中心。2013。台北。臺灣。中華民國。
- 江淑芬，2000。植物來源藥市場、技術及應用專題調查。工研院產業經濟與資訊服務中心出版。新竹。臺灣。中華民國。
- 行政院衛生福利部，2013。101年國人主要死因統計結果。臺灣。中華民國。
- 行政院衛生福利部。1999。健康食品安全及功效評估方法。臺灣。中華民國。
- 行政院衛生福利部中央健康保險局，2009。全民健康保險藥物給付項目及支付標準。臺灣。中華民國。
- 吳政倫。2008。含 γ -氨基丁酸與血管收縮素 I 轉化酶抑制劑紅麴山藥之最適化生產與降血壓功效評估。國立臺灣大學微生物與生化學研究所碩士論文。臺灣。中華民國。
- 李世代。1995。老年醫學的發展與貢獻—從老化研究談起。醫學繼續教育 5(3): 287-293
- 肖培根。2002a。新編中藥志第二卷。化學工業出版社。北京市。中華人民共和國。648-653。
- 肖培根。2002b。新編中藥志第三卷。化學工業出版社。北京市。中華人民共和國。260-263。
- 邱銘章、陳達夫、王培寧、白明奇、黃正平及花茂琴。2013。失智症 (含輕度認知功能障礙 (mild cognitive impairment, MCI)) 流行病學調查及失智症照護研究計畫。台北。臺灣。中華民國。
- 苗明三。2001。食療中藥藥物學。科學出版社。北京。中華人民共和國。
- 唐正乾，蔡東榮，王博仁，王德予。2003。綜論 HMG-CoA 還原酶抑制劑 (Statins)。內科學誌。14: 49-57。
- 秦慶瑤。2001。生技及製藥產業。財團法人生物技術開發中心。台北。臺灣。中華民國。
- 區少梅。2002。吃 GABA 降血壓-神奇的 γ -氨基丁酸。元氣齋出版社。台北。臺灣。

中華民國。

國民健康局，2007。成人（20 歲以上）代謝症候群之判定標準。臺灣。中華民國。

<http://www.bhp.doh.gov.tw>

國家藥典委員會。2009a。中華人民共和國藥典-中藥材顯為鑑別彩色圖鑑。人民衛生出版社。北京市。中華人民共和國。348-349

國家藥典委員會。2009b。中華人民共和國藥典-中藥材顯為鑑別彩色圖鑑。人民衛生出版社。北京市。中華人民共和國。435

國家藥典委員會。2010a。中華人民共和國藥典 一部。中國醫藥科技出版社。北京市。中華人民共和國。266-267

國家藥典委員會。2010b。中華人民共和國藥典 一部。中國醫藥科技出版社。北京市。中華人民共和國。343-344

巢佳莉。2001。生技事業發展成功案例分析。財團法人生物技術開發中心。台北。臺灣。中華民國。

許芳華。2001。黃芩抑菌性質及抑菌成分分離純化之研究。中興大學食品科學研究所碩士論文。台中。臺灣。中華民國。

陳文惠、陳佩儀、劉宜祝及羅吉方。2011。市售酸棗仁藥材之鑑別及其成分含量測定。食品藥物研究年報。台北。臺灣。中華民國。2: 360-366

程以識，2005。突破中草藥產業發展瓶頸、邁入輝煌未來。生技時代。臺灣。中華民國。35： 60-65。

黃志清編著。1987。彩色理解中醫藥理學。華香園出版社。台北。臺灣。中華民國。

廖美智。2001。中草藥產業現況與趨勢。財團法人生物技術開發中心。台北。臺灣。中華民國。

劉景寬、戴志達、林瑞泰及賴秋蓮。2000。台灣失智症流行病學。應用心理研究。7: 157-169。

蔡文豪。2011。雷公根與酸棗仁酒精萃取物於分化 PC12 細胞株中對類澱粉樣蛋白 β 胜肽產生神經毒性之保護。國立臺灣大學生化科技學系碩士論文。台北。臺灣。

中華民國。

蔡秋帆、湯念湖、及王耀宏。2002。藥理學。新文京開發出版有限公司。台北。臺灣。

中華民國。

賴榮祥編著。1976。原色生藥學。創譯出版社。台中縣。臺灣。中華民國。

謝瀛華。1996。老年健康維護：「老化理論」與「抗老研究」。社區發展季刊 74: 57-61

Abraham, C. R., Selkoe, D. J., Potter, H., Price, D. L. and Cork, L. C. 1989. Alpha 1-antichymotrypsin is present together with the beta-protein in monkey brain amyloid deposits. *Neurosci.* 32: 715-720.

Akihisa, T., Tokuda, H., Ukiya, M., Kiyota, A., Yasukawa, K., Sakamoto, N., Kimura, Y., Suzuki, T., Takayasu, J. and Nishino, H. 2005. Anti-tumor-initiating effects of monascin, an azaphilone pigment from the extract of *Monascus pilosus* fermented rice (red-mold rice). *Chem. Biodiversity.* 2: 1305-1309.

Alberti, K. G., Eckel, R. H., Grundy, S. M., Zimmet, P. Z., Cleeman, J. I., Donato, K. A., Fruchart, J. C., James, W. P., Loria, C. M. and Smith, S. C. 2009. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention. National Heart, Lung, and Blood Institute. American Heart Association. World Heart Federation. International Atherosclerosis Society. and International Association for the Study of Obesity. *Circulation.* 120: 1640-1645.

Alexander, G. E., Chen, K., Pietrini, P., Rapoport, S. I. and Reiman, E. M. 2002. Longitudinal PET evaluation of cerebral metabolic decline in dementia: a potential outcome measure in Alzheimer's Disease treatment studies. *Am. J. Psychiatry.* 159: 738-745.

Alzheimer, A. 1907. Uber eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allg Z Psychiat Psych-gerichtl Med.* 64: 146-148.

Alzheimer, A., Stelzmann, R. A., Schnitzlein, H. N. and Murtagh, F. R. 1995. An English

translation of Alzheimer's 1907 paper, "Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde".
Clin. Anat. 8: 429-431.



Alzheimer's Disease International. 2009. World Alzheimer Report.

Alzheimer's Disease International. 2010. World Alzheimer Report.

Aniya, Y., Yokomakura, T., Yonamine, M., Nagamine, T., and Nakanishi, H. 1998. Protective effect of the mold *Monascus anka* against acetaminophen-induced liver toxicity in rats. Jpn J Pharmacol. 78: 79-82.

Aniya, Y., Yokomakura, T., Yonamine, M., Shimada, K., Nagamine, T., Shimabukuro, M. and Gibo, H. 1999. Screening of antioxidant action of various molds and protection of *Monascus anka* against experimentally induced liver injuries of rats. Gen. Pharmacol. 32: 225-231.

Aramendia, M. A., Garcia, I. M., Lafont, F., Lizaso, J., Marinas, J. M. and Urbano, F. J. 2000. Rapid determination of chlorogenic acid and related compounds in sunflower seeds by high performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. Mass Spectrometry. 14: 1019-1022.

Arendt, T., Bigl, V., Tennstedt, A., and Arendt, A. 1984. Correlation between cortical plaque count and neuronal loss in the nucleus basalis in Alzheimer's disease. Neurosci. Lett. 48: 81-85.

Arvin, B., Neville, L. F., Barone, F. C. and Feuerstein, G. Z. 1996. The role of inflammation and cytokines in brain injury. Neurosci. Biobehavi. Revi. 20: 445-452.

Behl, C., Davis, J. B., Lesley, R. and Schubert, D. 1994. Hydrogen peroxide mediates amyloid beta protein toxicity. Cell. 77: 817-827.

Blanc, P. J., Loret, M. O., Santerre, A. L., Pareilleux, A., Prome, D., Prome, J. C., Laussac, J. P. and Goma, G. 1994. Pigments of *Monascus*. J. Food Sci., 1994. 59: 862-865.

Blass, J. P. 2001. Brain metabolism and brain disease: is metabolic deficiency the proximate cause of Alzheimer dementia? J. Neurosci. Res. 66: 851-856.

- Blennow, K. and Hampel, H. 2003. CSF markers for incipient Alzheimer's disease. *Lancet. Neurol.* 2: 605-613.
- Blennow, K. 2004. Cerebrospinal fluid protein biomarkers for Alzheimer's disease. *NeuroRx.* 2: 213-225.
- Bowling, A. C., Mutisya, E. M., Walker, L. C., Price, D. L., Cork, L. C. and Beal, M. F. 1993. Age-dependent impairment of mitochondrial function in primate brain. *J. Neurochem.* 60: 1964-1967.
- Brownlee, M. 2001. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature.* 414: 813-820.
- Cardozo-Pelaez, F., Song, S., Parthasarathy, A., Hazzi, C., Naidu, K. and Ramos, S. J. 1999. Oxidative DNA damage in the aging mouse brain. *Mov. Disord.* 14: 972-980.
- Castellani, R. J., Lee, H. G., Zhu, X., Perry, G. and Smith, M. A. 2008. Alzheimer disease pathology as a host response. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 67: 523-531.
- Chen, C. C. and Liu, I. M. 2006. Release of acetylcholine by Hon-Chi to raise insulin secretion in Wistar rats. *Neurosci. Lett.* 404: 117-121.
- Chen, H. W., Ko, J. J., Li, C. K., Ou, C. C. and Sheen, L. Y. 1997. Corn oil enhances gamma-glutamyl transpeptidase-positive foci development in the presence of phenobarbital during hepatocarcinogenesis in rats. *Nutr. Cancer.* 28: 252-257.
- Chen, W. P., Ho, B. Y., Lee, C. L., Lee, C. H. and Pan, T. M. 2008. Red mold rice prevents the development of obesity, dyslipidemia and hyperinsulinemia induced by high-fat diet. *Int. J. Obes.* 32: 1694-1704.
- Cho, D. H., Nakamura, T., Fang, J., Fang, J., Cieplak, P., Godzik, A., Gu, Z., and Lipton, S. A. 2009. S-nitrosylation of Drp1 mediates beta-amyloid-related mitochondrial fission and neuronal injury. *Science.* 324: 102-105.
- Chobanian, A. V., Bakris, G. L., Black, H. R., Cushman, W. C., Green, L. A., Izzo, J. L., Jr Jones, D. W., Materson, B. J., Oparil, S., Wright, J. T. and Jr Roccella, E. J. 2003.

National Heart, Lung, and Blood Institute Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure; National High Blood Pressure Education Program Coordinating Committee. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report. *J. A. M. A.* 289: 2560-2572.

Chong, Z. Z., Li, F. and Maiese, K. 2005. Oxidative stress in the brain: novel cellular targets that govern survival during neurodegenerative disease. *Prog. Neurobiol.* 75: 207-246.

Chou, P. L., Wu, C. L. and Tsai, S. T. 1998. Progression to type 2 diabetes among high-risk groups in Kin-Chen, Kinmen. Exploring the natural history of type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 21: 1183-1187.

Chow, V. W., Mattson, M. P., Wong, P. C. and Gleichmann, M. 2010. An overview of APP processing enzymes and products. *Neuromol. Med.* 12: 1-12.

Citron, M., Oltersdorf, T., Haass, C., McConlogue, L., Hung, A. Y., Seubert, P., Vigo-Pelfrey, C., Lieberburg, I. and Selkoe, D. J. 1992. Mutation of the beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases beta-protein production. *Nature.* 360: 672-674.

Citron, M., Westaway, D., Xia, W., Carlson, G., Diehl, T., Levesque, G., Johnson-Wood, K., Lee, M., Seubert, P., Davis, A., Kholodenko, D., Motter, R., Sherrington, R., Perry, B., Yao, H., Strome, R., Lieberburg, I., Rommens, J., Kim, S., Schenk, D., Fraser, P., Hyslop, P. and Selkoe, D. J. 1997. Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase production of 42-residue amyloid beta-protein in both transfected cells and transgenic mice. *Nat. Med.* 3: 67-72.

Clementi, M. E., Marini, S., Coletta, M., Orsini, F., Giardina, B. and Misiti, F. 2005. A β (31-35) and A β (25-35) fragments of amyloid beta-protein induce cellular death through apoptotic signals: Role of the redox state of methionine-35. *FEBS. Lett.* 579: 2913-2918.

- Cos, P. 2004. Plant substances as anti-HIV agents selected according to their tentative mechanism of action, *J. Natural Products*. 67: 284-293.
- Daniel, S., Sampath, P., Thomas, E. C., John, C. K. and Joseph, L. W. 1989. Beyond cholesterol modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N. Engl. J. Med.* 320: 915-924.
- Darvesh, S., Martin, E., Walsh, R. and Rockwood, K. 2004. Differential effects of lipid-lowering agents on human cholinesterases. *Clin Biochem.* 37: 42-49.
- Dass, P. D., Offutt, D. M., Mejia, M. B., VanGoethem, D., Christenson, W. R., Landes, M. M., Stuart, B. P., Sangha, G. K. and Thyssen, J. H. 1997. Comparative kinetic analysis of cholinesterase methods in rat and human erythrocytes and plasma. *Veter. Human. Toxicol.* 39: 11-17.
- Dawbarn, D. and Allen, S. J. 2008. *Molecular and cellular neurobiology series: neurobiology of Alzheimer's Disease*. 3rd ed. New York. Oxford University Press.
- De Strooper, B. and Annaert, W. 2000. Proteolytic processing and cell biological functions of the amyloid precursor protein. *J. Cell Sci.* 113: 1857-1870.
- Donkin, J. J., Stukas, S., Hirsch-Reinshagen, V., Namjoshi, D., Wilkinson, A., May, S., Chan, J., Fan, J., Collins, J. and Wellington, C. L. 2010. ATP-binding cassette transporter A1 mediates the beneficial effects of the liver X receptor agonist GW3965 on object recognition memory and amyloid burden in amyloid precursor protein/presenilin 1 mice. *J. Biol. Chem.* 285: 34144-34154.
- Endo, A. 1979. A new hypocholesterolemic agent produced by a *Monascus* species. *J. Antibiot.* 32: 852-854.
- Fenglin, H. 2004. Free radical scavenging activity of extract prepared from fresh leaves of selected Chinese medicinal plants. *Fitoterapia.* 75: 14-23.
- Flint, O. P., Masters, B. A., Gregg, R. E. and Durham, S. K. 1997. Inhibition of cholesterol synthesis by squalene synthase inhibitors does not induce myotoxicity in vitro. *Toxicol.*

Appl. Pharmacol. 145: 91-98.

Flood, J. F., Morley, J. E. and Roberts, E. 1991. Amnestic effects in mice of four synthetic peptides homologous to amyloid beta protein from patients with Alzheimer disease. Proc. Nat. Acad. Sci. 88: 3363-3366.

Folkers, K., Langsjoen, P., Willis, R., Richardson, K., Xia, L. J., Ye, C. Q. and Tamagawa, Q. 1990. Lovastatin decreases coenzyme Q levels in humans. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87: 8931-8934.

Folstein, M. E., Folstein, S. D. and McHugh, P. R. 1975. Mini-mental state: a practical method for grading the cognitive state of patients for clinician. J. Psychiatr. Res. 12: 189-198.

Frank, B. and Gutpa, S. 2005. A review of antioxidants and Alzheimer's disease. Ann. Clin. Psych. 17: 269-286.

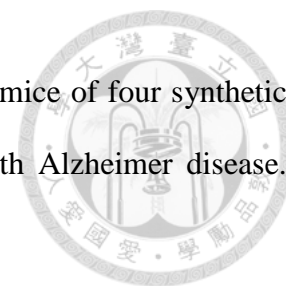
Fratiglioni, L., De Ronchi, D. and Aguero-Torres, H. 1999. Worldwide prevalence and incidence of dementia. Drugs Aging. 15: 365-375.

Friedman, E., Lerer, B. and Kuster, J. 1983. Loss of cholinergic neurons in the rat neocortex produces deficits in passive avoidance learning. Pharmacol. Biochem. Behav. 19: 309-312.

Furukawa K., Barger SW., Blalock EM. and Mattson MP. Activation of K⁺ channels and suppression of neuronal activity by secreted beta-amyloid-precursor protein. Nature, 1996. 379: 74-78.

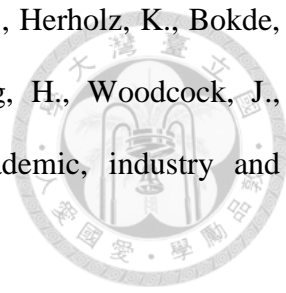
Gakhar-Koppole, N., Hundeshagen, P., Mandl, C., Weyer, S. W., Allinquant, B., Müller, U. and Ciccolini, F. 2008. Activity requires soluble amyloid precursor protein alpha to promote neurite outgrowth inneural stem cell-derived neurons via activation of the MAPK pathway. Eur. J. Neurosci. 28: 871-882.

Garthwaite, J., Garthwaite, G., Palmer, R. M. J. and Moncada, S. 1989. NMDA receptor activation induces nitric oxide synthesis from arginine in rat brain slices. Eur. J.




Pharmacol. 172: 413-416.

- Ghosh, A. K., Kumaragurubaran, N., Hong, L., Kulkarni, S., Xu, X., Miller, H. B., Reddy, D. S., Weerasena, V., Turner, R., Chang, W., Koelsch, G. and Tang, J. 2008. Potent memapsin 2 (beta-secretase) inhibitors: design, synthesis, protein-ligand X-ray structure, and *in vivo* evaluation. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 18: 1031-1036.
- Glenner, G. G. and Wong, C. W. 1984. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 120: 885-890.
- Glowinski, J. and Iversen, L. 1966. Regional studies of catecholamines in the rat brain. 3. Subcellular distribution of endogenous and exogenous catecholamines in various brain regions. *Biochem Pharmacol.* 15: 977-987.
- Goate, A., Chartier-Harlin, M. C., Mullan, M., Brown, J., Crawford, F., Fidani, L., Giuffra, L., Haynes, A., Irving, N. and James, L. 1991. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature.* 349: 704-706.
- Goekoop, R., Scheltens, P., Barkhof, F. and Rombouts, S. A. 2006. Cholinergic challenge in Alzheimer patients and mild cognitive impairment differentially affects hippocampal activation--a pharmacological fMRI study. *Brain.* 129: 141-157.
- Good, P. F., Werner, P., Hsu, A., Olanow, C. W. and Perl, D. P. 1996. Evidence of neuronal oxidative damage in Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* 149: 21-28.
- Grutzendler, J., and Morris, J. C. 2001. Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Drugs.* 61: 41-52.
- Guijarro, C., Blanco-Colio, L. M., Ortego, M., Cavadonga, A., Iñonso, C., Ortiz, A. and Egido, J. 1998. 3-Hydroxy-a-methylglutaryl coenzyme A reductase and isoprenylation inhibitors induce apoptosis of vascular smooth muscle cells in culture. *Circ. Res.* 83: 490-500.

- 
- Hampel, H., Frank, R., Broich, K., Teipel, S. J., Katz, R. G., Hardy, J., Herholz, K., Bokde, A. L., Jessen, F., Hoessler, Y. C., Sanhai, W. R., Zetterberg, H., Woodcock, J., Blennow, K. 2010. Biomarkers for Alzheimer's disease: academic, industry and regulatory perspectives. *Nat. Rev. Drug Discov.* 9: 560-574.
- Hardy, J. and Selkoe, D. J. 2002. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science.* 297: 353-356.
- Harman, D. 1956. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.*, 11: 298.
- Hawksworth, D. L. and Pitt, J. I. 1983. A new taxonomy for *Monascus* species based on cultural and microscopical characters. *Aust. J. Bot.* 31: 51-61
- Hirono, N., Hashimoto, M., Ishii, K., Kazui, H. and Mori, E. 2004. One-year change in cerebral glucose metabolism in patients with Alzheimer's disease. *J. Neuropsych. Clin. Neurosci.* 16: 488-492.
- Ho, B. Y. and Pan, T. M. 2009. The *Monascus* metabolite monacolin K reduces tumor progression and metastasis of Lewis lung carcinoma cells. *J. Agric. Food Chem.* 57: 8258-8265.
- Hong, L., Koelsch, G., Lin, X., Wu, S., Terzyan, S., Ghosh, A. K., Zhang, X. C. and Tang, J. 2000. Structure of the protease domain of memapsin 2 (beta-secretase) complexed with inhibitor. *Science.* 90: 150-153.
- Hosokawa, M., Fujisawa, H., Ax, S., Zahn-Daimler, G. and Zahn, R. K. 2000. Age-associated DNA-damage is accelerated in the senescence-accelerated mice. *Mech. Ageing Dev.* 118: 61-70.
- Hsu, W. H., Lee, B. H. and Pan, T. M. 2011. Effects of red mold dioscorea on oral carcinogenesis in DMBA-induced hamster animal model. *Food Chem. Toxicol.* 49: 1292-1297.
- Hsu, W. H., Lee, B. H. and Pan, T. M. 2010b. Protection of *Monascus*-fermented dioscorea

- against DMBA-induced oral injury in hamster by anti-inflammatory and antioxidative potentials. *J. Agric. Food Chem.* 58: 6715-6720.
- Hsu, W. H., Lee, B. H., Pan, T. M. 2010a. Red mould dioscorea-induced G2/M arrest and apoptosis in human oral cancer cells. *J. Sci. Food Agric.* 90: 2709-2715.
- Humphries, K. M. and Szweda, L. I. 1998. Selective inactivation of alpha-ketoglutarate dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase: reaction of lipoic acid with 4-hydroxy-2-nonenal. *Biochem.* 37: 15835-15841.
- Jack, C. R. Jr, Lowe, V. J., Senjem, M. L., Weigand, S. D., Kemp, B. J., Shiung, M. M., Knopman, D. S., Boeve, B. F., Klunk, W. E., Mathis, C. A. and Petersen, R. C. 2008. 11C-PiB and structural MRI provide complementary information in imaging of Alzheimer's disease and amnesic mild cognitive impairment. *Brain.* 131: 665-680.
- Janssen, Y. M. W., Houten, B. V., Borm, P. J. A. and Mossman, B. T. 1993. Biology of disease-cell and tissue responses to damage. *Lab. Invest.* 69: 261-274.
- Janus, C., Pearson, J., McLaurin, J., Mathews, P. M., Jiang, Y., Schmidt, S. D., Chishti, M. A., Horne, P., Heslin, D., French, J., Mount, H. T., Nixon, R. A., Mercken, M., Bergeron, C., Fraser, P. E., St George-Hyslop, P. and Westaway, D. 2000. Abeta peptide immunization reduces behavioural impairment and plaques in a model of Alzheimer's disease. *Nature.* 408: 979-982.
- Jellinger, K. A. 2001. Cell death mechanisms in neurodegeneration. *J. Cell. Mol. Med.* 5: 1-17.
- Jeong JC., Yoon CH., Lee WH., Park KK., Chang YC., Choi YH. and Kim CH. Effects of *Bambusae concretio Salicea* (Chunchukhwang) on amyloid beta-induced cell toxicity and antioxidative enzymes in cultured rat neuronal astrocytes. *J. Ethnopharmacol.* 2005. 98: 259-266.
- Jiang, Q., Lee, C. Y., Mandrekar, S., Wilkinson, B., Cramer, P., Zelcer, N., Mann, K., Lamb, B., Willson, T. M., Collins, J. L., Richardson, J. C., Smith, J. D., Comery, T. A.,

- 
- Riddell, D., Holtzman, D. M., Tontonoz, P. and Landreth, G. E. 2008. ApoE promotes the proteolytic degradation of Aβeta. *Neuron*. 58: 681-693.
- Juzlova, P., Martinkova, L. and Kren, V. 1996. Secondary metabolites of the fungus *Monascus*: a review. *J. Ind. Microbiol.* 16:163-170.
- Kamal, A, Stokin, G. B., Yang, Z., Xia, C. H., Goldstein, L. S. 2000. Axonal transport of amyloid precursor protein is mediated by direct binding to the kinesin light chain subunit of kinesin-I. *Neuron*. 28: 449–459.
- Kaplan, N. M. 1989. The deadly quartet. Upper-body obesity, glucose intolerance, hypertriglyceridemia, and hypertension. *Arch. Intern. Med.* 149: 1514-1520.
- Katzman, R., Terry, R., DeTeresa, R., Brown, T., Davies, P., Fuld, P., Renbing, X. and Peck, A. 1988. Clinical, pathological, and neurochemical changes in dementia: a subgroup with preserved mental status and numerous neocortical plaques. *Ann. Neurol.* 23: 138-144.
- Keller, J. N., Mark, R. J., Bruce, A. J., Blanc, E., Rothstein, J. D., Uchida, K., Waeg, G., Mattson, M. P. 1997. 4-Hydroxynonenal, an aldehydic product of membrane lipid peroxidation, impairs glutamate transport and mitochondrial function in synaptosomes. *Neuroscience*. 80: 685-696.
- Kinosian, B., Glick, H., and Garland, G. 1994. Cholesterol and coronary heart disease: predicting risks by levels and ratios. *Ann. Intern. Med.* 121: 641-647.
- Klunk, W. E., Engler, H., Nordberg, A., Wang, Y., Blomqvist, G., Holt, D. P., Bergström, M., Savitcheva, I., Huang, G. F., Estrada, S., Ausén, B., Debnath, M. L., Barletta, J., Price, J. C., Sandell, J., Lopresti, B. J., Wall, A., Koivisto, P., Antoni, G., Mathis, C. A. and Långström, B. 2004. Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh compound-B. *Ann Neurol.* 55: 306-319.
- Kohama, Y., Matsumoto, S., Mimura, T., Tanabe, N., Inada, A. and Nakanishi, T. 1987. Isolation and identification of hypotensive principles in red-mold rice. *Chem. Pharm.*

Bull. 35: 2484-2489.

Krall, W. J., Sramek, J. J. and Cutler, N. R. 1999. Cholinesterase inhibitors: a therapeutic strategy for Alzheimer disease. *Ann Pharmacother.* 33: 441-450.

Laaksonen, R., Jokelainen, K., Sahi, T., Tikkanen, M. J. and Himberg, J. J. 1995. Decreases in serum ubiquinone concentrations do not results in reduced levels in muscle tissue during short-term simvastatin treatment in humans. *Harmacol. Ther.* 57: 62-66.

Lalonde, C., Nayak, U., Hennigan, J. and Demling, R. 1997. Plasma catalase and glutathione levels are decreased in response to inhalation injury. *J Burn Care Rehabil.* 18: 515-519.

Larson, M. E. and Lesne, S. E. 2012. Soluble A β oligomer production and toxicity. *J. Neurochem.* 120: 125-139.

Law, A., Gauthier, S., and Quirion, R. 2001. Say NO to Alzheimer's disease: the putative links between nitric oxide and dementia of the Alzheimer's type. *Brain Res. Rev.* 35: 73-96.

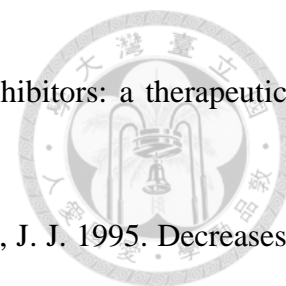
Lee, B. H., Hsu, W. H., Hsu, Y. W. and Pan, T. M. 2013. Dimerumic acid protects pancreas damage and elevates insulin production in methylglyoxal-treated pancreatic RINm5F cells. *J. Fun. Food.* 5: 642-650.

Lee, C. L., Kung, T. H., Wu, C. L., Hsu, Y. W. and Pan, T. M. 2010. Monascin and ankaflavin act as novel hypolipidemic and high-density lipoprotein cholesterol-raising agents in red mold dioscorea. *J. Agric. Food Chem.* 58: 9013-9019.

Lee CL., Kuo TF., Wang JJ., and Pan TM. Red mold rice ameliorates impairment of memory and learning ability in intracerebroventricular amyloid beta-infused rat by repressing amyloid beta accumulation. *J. Neurosci. Res.*, 2007. 85: 3171-3182.

Lee, C. L., Tsai, T. Y., Wang, J. J. and Pan, T. M. 2006a. *In vivo* hypolipidemic effects and safety of low dosage *Monascus* powder in a hamster model of hyperlipidemia. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 70: 533-540.

Lee, C. L., Wang, J. J., and Pan, T. M. 2008. Red mold rice extract represses amyloid beta



- peptide-induced neurotoxicity via potent synergism of anti-inflammatory and antioxidative effect. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 79: 829-841.
- Lee, C. L., Wang, J. J., Kuo, S. L. and Pan, T. M. 2006b. *Monascus* fermentation of dioscorea for increasing the production of cholesterol-lowering agent-monacolin K and antiinflammation agent-monascin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72: 1254-1262.
- Lee, J., Retamal, C., Cuitino, L., Caruano-Yzermans, A. and Shin, J. E. 2008. Adaptor protein sorting nexin 17 regulates amyloid precursor protein trafficking and processing in the early endosomes. *J. Biol. Chem.* 283: 11501–11508.
- Lefer, D. J. 2002. Statins as potent anti-inflammatory drugs. *Circulation.* 106: 2041-2042.
- Leigh, A. M., Hitt, H. R., Tharakan, B., Porter, J. W., Young, K. A. and Manyam, B. V. 2009. *Centella asiatica* extract selectively decreases amyloid β levels in hippocampus of Alzheimer's disease animal model. *Phytother. Res.* 23: 14-19.
- Li, C. L., Zhu, Y., Wang, Y. Y., Zhu, J. S., Chang, J. and Kritchevsky, D. 1998. *Monascus purpureus*-fermented rice (red yeast rice): a natural food product that lowers blood cholesterol in animal models of hypercholesterolemia. *Nutr. Res.* 18: 71-81.
- Li, S., Yan, T., Yang, JQ., Oberley, T. D., Oberley, L. W. 2000. The role of cellular glutathione peroxidase redox regulation in the suppression of tumor cell growth by manganese superoxide dismutase. *Cancer Res.* 60: 3927-3939.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 100: 265-275.
- Maiese, K. 2002. Organic brain disease. In: *Encyclopedia of the Human Brain.* Ramachandran VS (ed.) Elsevier Science. 509-527.
- Maron, D. J., Fazio, S., and Linton, M. F. 2001. Current perspectives on statins. *Circulation,* 101: 207-213.
- Martinkova, L., Patakova-Juzlova, P., Krent, V., Kucerova, Z., Havlicek, V., Olsovsky, P., Hovorka, O., Rihova, B., Vesely, D., Vesela, D., Ulrichova, J. and Prikrylova, V. 1999.

- Biological activities of oligoketide pigments of *Monascus purpureus*. *Food Addit. Contam.* 16: 15-24.
- Mattson, M. P. 1997. Cellular actions of beta-amyloid precursor protein and its soluble and fibrillogenic derivatives. *Physiol. Rev.* 77: 1081-1132.
- Mattson, M. P. 2003. Excitotoxic and excitoprotective mechanisms: abundant targets for the prevention and treatment of neurodegenerative disorders. *Neuromol. Med.* 3: 65-94.
- Mattson, M. P. 2004. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature.* 430: 631-639.
- Mattson, M. P., Cheng, B., Culwell, A. R., Esch, F. S., Lieberburg, I. and Rydel, R. E. 1993. Evidence for excitoprotective and intraneuronal calcium-regulating roles for secreted forms of the beta-amyloid precursor protein. *Neuron.* 10: 243-254.
- McCann SM., Mastronardi C., de Laurentiis A. and Rettori V. The nitric oxide theory of aging revisited. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2005. 1057: 64-84.
- Meigs, J. B., Singer, D. E., Sullivan, L. M., Dukes, K. A., D'Agostino, R. B, Nathan, D. M, Wagner, E. H, Kaplan, S. H. and Greenfield, S. 1997. Metabolic control and prevalent cardiovascular disease in non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM): The NIDDM Patient Outcome Research Team. *Am. J. Med.* 102: 38-47.
- Miller, N. J. and Evans, C. A. R. 1996. The relative contributions of ascorbic acid and phenolic antioxidant to the total antioxidant activity of orange and apple fruit juices and blackcurrant drink. *Food Chem.* 60: 331-337.
- Miyamoto, M., Shintani, M., Nagaoka, A. and Nagawa, Y. 1985. Lesioning of the rat basal forebrain leads to memory impairments in passive and active avoidance tasks. *Brain Res.* 328: 97-104.
- Moghadasian, M. H., Mcmanus, B. M., Godin, D. V., Rodrigues, B. and Frohlic, J. J. 1999. Proatherogenic and antiatherogenic effects of probucol phytosterols in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation.* 99: 1733-1739.

- Morgan, D., Diamond, D. M., Gottschall, P. E., Ugen, K. E., Dickey, C., Hardy, J., Duff, K., Jantzen, P., DiCarlo, G., Wilcock, D., Connor, K., Hatcher, J., Hope, C., Gordon, M. and Arendash, G. W. 2000. Abeta peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease. *Nature*. 408: 982-985.
- Müller, T., Meyer, H. E., Egensperger, R. and Marcus, K. 2008. The amyloid precursor protein intracellular domain (AICD) as modulator of gene expression, apoptosis, and cytoskeletal dynamics-relevance for Alzheimer's disease. *Prog. Neurobiol.* 85: 393-406.
- Mungarro-Menchaca, X., Ferrera, P., Moran, J., and Arias, C. 2002. beta-Amyloid peptide induces ultrastructural changes in synaptosomes and potentiates mitochondrial dysfunction in the presence of ryanodine. *J. Neurosci. Res.* 68: 89-96.
- Nabeshima, T. and Nitta, A. 1994. Memory impairment and neuronal dysfunction induced by beta-amyloid protein in rats. *Tohoku J Exp Med.* 174, 241-249.
- Nagaraja, H. and Kumar, P. 2010. Neuroprotective effect of *Centella asiatica* extract (CAE) on experimentally induced Parkinsonism in aged Sprague-Dawley rats. *J. Toxicol. Sci.* 35: 41-47.
- Nagy, Z., Jobst, KA., Esiri, M. M., Morris, J. H., King, E. M., MacDonald, B., Litchfield, S., and Barnettson, L. 1996. Hippocampal pathology reflects memory deficit and brain imaging measurements in Alzheimer's disease: clinicopathologic correlations using three sets of pathologicdiagnostic criteria. *Dementia.* 7: 76-81.
- Nakatani, N., Kayano, S., Kikuzaki, H., Sumino, K., Katagiri, K. and Mitani, T. 2000. Identification, quantitative determination, and antioxidative activities of chlorogenic acid isomers in prune (*Prunus domestica* L.). *J. Agric. Food Chem.* 48: 5512-5516.
- Näslund, J., Haroutunian, V., Mohs, R., Davis, KL., Davies, P., Greengard, P. and Buxbaum, J. D. 2000. Correlation between elevated levels of amyloid beta-peptide in the brain and cognitive decline. *JAMA.* 283: 1571-1577.
- Nathan, C. and Xie, Q. W. 1994. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell.*

78:915-918.

- Ng, T. B., Gao, W., Li, L., Niu, SM., Zhao, L., Liu, J., Shi, L. S., Fu, M. and Liu, F. 2005. Rose (*Rosa rugosa*)-flower extract increases the activities of antioxidant enzymes and their gene expression and reduces lipid peroxidation. *J. Pharm. Pharmacol.* 58: 529-534.
- Nikolaev, A., McLaughlin, T., O'Leary, D. D. and Tessier-Lavigne, M. 2009. APP binds DR6 to trigger axon pruning and neuron death via distinct caspases. *Nature.* 457: 981-989.
- O'Brien, R. J. and Wong, P. C. 2011. Amyloid Precursor Protein Processing and Alzheimer's Disease. *Annu. Rev. Neurosci.* 34: 185-204.
- Ohshima, H. and Bartsch, H. 1994. Chronic infections and inflammatory processes as cancer risk factors: possible role of nitric oxide in carcinogenesis. *Mut. Res.* 305: 253-264.
- Olanow, C. W. 1993. A radical hypothesis for neurodegeneration. *TINS.* 16: 439-444.
- Omar, M. A., Wilson, J. P. and Cox, T. S. 2001. Rhabdomyolysis and HMG-CoA reductase inhibitors. *Ann. Pharmacother.* 35: 1096-1107.
- Ong, E. S., Woo, S. O. and Yong, Y. L. 2000. Pressurized liquid extraction of berberine and aristolochic acids in medicinal plants. *J. Chromatogr A.* 904: 57-64.
- Pierno, S., De Luca, A. and Tricarico, D. 1992. Experimental evaluation of the effects of pravastatin on electrophysical parameters of rat skeletal muscle. *Pharmacol. Toxicol.* 71: 325-329.
- Querfurth, H. W. and LaFerla, F. M. 2010. Alzheimer's Disease. *N. Engl. J.* 362: 329-344.
- Ragusa, N., Villa, R. F., Magri, G., Ingrao, F., Gorini, A., Turpeenoja, L. and Stella, A. M. G. 1992. Modifications of synaptosomal plasma membrane protein composition in various brain regions during aging. *Int. J. Dev. Neurosci.* 10: 265-272.
- Rajendran, S., Parasakthy, K., Devaraj, H. and Niranjali, S. 1996. Effect of tincture of crataegus on the LDL-receptor activity of hepatic plasma membrane of rats fed an

atherogenic diet. *Atherosclerosis*. 123: 235-241.

Reaven, G. M. 1998. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*. 37: 1595-1607.

Reeves, P. G. 1977. Components of AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet. *J. Nutri.* 127, 838S–841S.

Revers, R. R., Fink, J., Griffin, J., Olefsky, J.M. and Kolterman J. H. 1984. Influence of hyperglycemia on insulin, *s in vivo* effects in type II diabetes. *J. Clin. Invest.* 73: 664-672.

Rubinsztein, D. C. 1997. The genetics of Alzheimer' s disease. *Prog. Neurobiol.* 52: 447.

Scarpini, E., Scheltens, P. and Feldman, H. 2003. Treatment of Alzheimer's disease: current status and new perspectives. *Lancet. Neurol.* 2: 539-547.

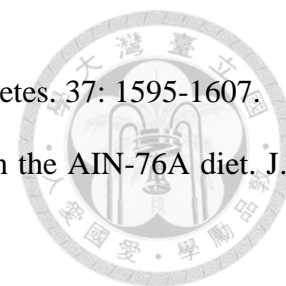
Schenk, D., Barbour, R., Dunn, W., Gordon, G., Grajeda, H., Guido, T., Hu, K., Huang, J., Johnson-Wood, K., Khan, K., Kholodenko, D., Lee, M., Liao, Z., Lieberburg, I., Motter, R., Mutter, L., Soriano, F., Shopp, G., Vasquez, N., Vandevent, C., Walker, S., Wogulis, M., Yednock, T., Games, D. and Seubert, P. 1999. Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature*. 400: 173-177.

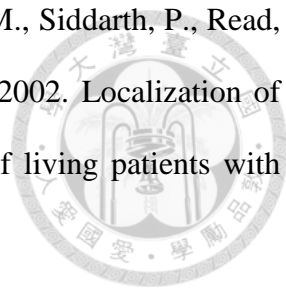
Schweber, M. 1985. A possible unitary genetic hypothesis for Alzheimer's disease and Down syndrome. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 450: 223-238.

Selkoe, D. J. 1997. Alzheimer's disease: genotypes, phenotypes, and treatments. *Science*. 275: 630-631.

Shi, Y. C. and Pan, T. M. 2010a. Anti-diabetic effects of *Monascus purpureus* NTU 568 fermented products on streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Agric. Food Chem.* 58: 7634-7640.

Shi, Y. C. and Pan, T. M. 2010b. Antioxidant and pancreas-protective effect of red mold fermented products on streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Sci. Food Agric.* 90: 2519-2525.



- 
- Shoghi-Jadid, K., Small, G. W., Agdeppa, E. D., Kepe, V., Ercoli, L. M., Siddarth, P., Read, S., Satyamurthy, N., Petric, A., Huang, S. C. and Barrio, J. R. 2002. Localization of neurofibrillary tangles and beta-amyloid plaques in the brains of living patients with Alzheimer disease. *Amer. Geria. Psy.* 10: 24-35.
- Siemers, E. R., Quinn, J. F., Kaye, J., Farlow, M. R., Porsteinsson, A., Tariot, P., Zoulnouni, P., Galvin, J. E., Holtzman, D. M., Knopman, D. S., Satterwhite, J., Gonzales, C., Dean, R. A. and May, P. C. 2006. Effects of a gamma-secretase inhibitor in a randomized study of patients with Alzheimer disease. *Neurology.* 66: 602-604.
- Singewald, N., Kouvelas, D., Mostafa, A., Sinner, C. and Philippu, A. 2000. Release of glutamate and GABA in the amygdala of conscious rats by acute stress and baroreceptor activation: differences between SHR and WKY rats. *Brain Res.* 864: 138-141.
- Small, G. W, Rabins, P. V., Barry, P. P., Buckholtz, N. S, DeKosky, S. T., Ferris, S. H., Finkel, S. I., Gwyther, L. P., Khachaturian, Z. S., Lebowitz, B. D., McRae, T. D., Morris, J. C., Oakley, F., Schneider, L. S., Streim, J. E., Sunderland, T., Teri, L. A. and Tune, L. E. 1997. Diagnosis and treatment of Alzheimer's disease and related disorders. Consensus statement of the American Association for Geriatric Psychiatry, the Alzheimer's Association, and the American Geriatrics Society. *JAMA.* 278: 1363-1371.
- Sofue, M., Yoshimura, Y., Nishida, M. and Kawada, J. 1991. Uptake of nicotinamide by rat pancreatic beta cells with regard to streptozotocin action. *J. Endocrinol.* 131: 135-138.
- Sohal, R. S. and Allen, R. G. 1990. Oxidative stress as a causal factor in differentiation and aging: a unifying hypothesis. *Exp. Gerontol.* 25: 499.
- Sohal, R. S. and Orr, W. C. 1992. Relationship between antioxidants, prooxidants and the aging process. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 663:74-84.
- Stampfer, M. J., Sacks, F. M., Salvini, S., Willett, W. C. and Henneken, C. H. 1991. A prospective study of cholesterol, apolipoproteins, and the risk of myocardial infraction.

N. Engl. J. Med. 325: 373-381.

Steinberg, H. O., Bayazeed, B., Hook, G., Johnson, A., Cronin, J. and Baron, A. D. 1997.

Endothelial dysfunction is associated with cholesterol levels in the high normal range in humans. *Circulation*. 96, 3287-3293.

Stephan, A. and Phillips, A. G. 2005. A case for a non-transgenic animal model of Alzheimer's disease. *Genes Brain Behav.* 4: 157-172.

Stole, E., Smithl, T. K., Manning, J. M. and Meisterl, A. 1994. Interaction of γ -glutamyl transpeptidase with acivici. *J Biol Chem*. 269: 21435-21439

Su, N. W., Lin, Y. L., Lee, M. H. and Ho, C. Y. 2005. Ankaflavin from *Monascus*-fermented red rice exhibits selective cytotoxic effect and induces cell death on Hep G2 cells. *J. Agric. Food Chem.*, 53: 1949-1954.

Subathra, M., Shila, S., Devi, M. A. and Panneerselvam, C. 2005. Emerging role of *Centella asiatica* in improving age-related neurological antioxidant status. *Exp. Gerontol.* 40: 707-715.

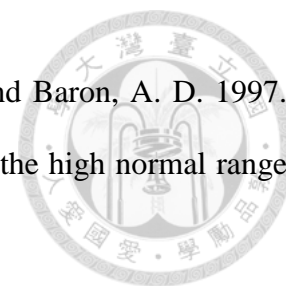
Suits, E. and Isaacson, R. L. 1968. The effects of scopolamine hydrobromide on one-way and two-way avoidance learning in rats. *Int J Neuropharmacol.* 7: 441-446.

Taira, J., Miyagi, C. and Aniya, Y. 2002. Dimerumic acid as an antioxidant from the mold, *Monascus anka*: the inhibition mechanisms against lipid peroxidation and hemeprotein-mediated oxidation. *Biochem. Pharmacol.* 63: 1019-1026.

Terry, R. D. 1994. Neuropathological changes in Alzheimer disease. *Prog. Brain Res.* 101: 383-390.

Thal, L. J., Dokla, C. P. J. and Armstrong, D. M. 1988. Nucleus basalis magnocellularis lesions: lack of biochemical and immunocytochemical recovery and effect of cholinesterase inhibitors on passive avoidance. *Behav. Neurosci.* 102: 852-860.

The American Diabetes Association. 2003. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. Suppl 1:S5-20.



- Thompson, G. R. 1989. Handbook of Hyperlipidemia. Current Science Ltd., London.
- Thompson, D. D., Clarkson, P. and Karas, R. H. 2003. Statin-associated myopathy. JAMA. 289: 1681-1690.
- Tomoyuki, N., Ryu-ichi, T. and Yuichiro, A. 2003. Comparing myotoxic effects of squalene synthase inhibitor, T-91485 and 3-hydroxy-a-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors in human myocytes. Biochem. Pharmacol. 66: 2133-2139.
- Tsuji, A., Sato, H., Kume, Y., Tamai, I., Okezaki, E., Nagata, O., and Kato, H. 1998. Inhibitory effects of quinolone antibacterial agents on gamma-aminobutyric acid binding to receptor sites in rat brain membranes. Antimicrob. Agents Chemother. 32: 190-194.
- Usman. and Hosono, A. 2001. Hypocholesterolemic effect of *Lactobacillus gasseri* SBT0270 in rats fed a cholesterol-enriched diet. J. Dairy Res. 68:617-624.
- Vague, J. 1947. La différenciation sexuelle, facteur déterminant des formes de l'obésité. Presse Med. 30:339-40.
- van Tieghem, M. 1884. *Monascus* genre nouveau de l'ordre des Ascomycetes. Bull. Soc. Bot. Fr. 31: 226-231.
- Wang, J. J., Shieh, M. J., Kuo, S. L., Lee, C. L. and Pan, T. M. 2006. Effect of red mold rice on antifatigue and exercise-related changes in lipid peroxidation in endurance exercise. Appl. Microbiol. Biotechnol. 70: 247-253.
- Warner, H. R. 1994. Superoxide dismutase, aging, and degenerative disease. Free Rad. Biol. Med. 17: 249-258.
- Williams, D. and Feely, J. 2002. Pharmacokinetic-pharmacodynamic drug interactions with HMG-CoA reductase inhibitors. Clin. Pharmacokinet. 41: 343-370.
- Winterstein, A. P. and Storrs, C. M. 2001. Herbal supplements: considerations for the athletic trainer. J. Athletic Training. 36: 425- 432.
- World Health Organization Department of Noncommunicable Disease Surveillance Geneva.

1999. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Report of a WHO Consultation. Part 1: Diagnosis and classification of diabetes mellitus. from: <http://www.who.int/diabetes/currentpublications/en/>.
- World Health Organization. 2006. The World Health Report 2006 - working together for health.
- Wu, C. L., Lee, C. L. and Pan, T. M. 2009. Red mold dioscorea has a greater antihypertensive effect than traditional red mold rice in spontaneously hypertensive rats. *J. Agric. Food Chem.* 57: 5035-5041.
- Yamada, K., Tanaka, T., Han, D., Senzaki, K., Kameyama, T. and Nabeshima, T. 1999. Protective effects of idebenone and alpha-tocopherol on beta-amyloid-(1-42)-induced learning and memory deficits in rats: implication of oxidative stress in beta-amyloid-induced neurotoxicity *in vivo*. *Eur. J. of Neurosci.* 11: 83-90.
- Yamaguchi, Y., Miyashita, H., Tsunekawa, H., Mouri, A., Kim, H. C., Saito, K., Matsuno, T., Kawashima, S. and Nabeshima, T. 2006. Effects of a novel cognitive enhancer, spiro [imidazo- [1,2-a]pyridine- 3,2-indan]-2(3H)-one (ZSET1446), on learning impairments induced by amyloid-beta1-40 in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 317: 1079-1087.
- Yan, R., Lin, G., Ko, N. L. and Tam, Y. K. 2007. Low oral bioavailability and pharmacokinetics of senkyunolide a, a major bioactive component in *Rhizoma Chuanxiong*, in the rat. *Ther. Drug Monit.* 29, 49-56.
- Zhang, Z., Ho, W. K., Huang, Y., James, A. E., Lam, L. W. and Chen, Z. Y. 2002. Hawthorn fruit is hypolipidemic in rabbits fed a high cholesterol diet. *J. Nutr.* 132: 5-10.

附 錄



Published Papers (International Journal; SCI)

1. Chien-Li Chen, Pin-Yi Li, Wen-Hung Hu, Ming-Huei Lan, Ming-Ju Chen, and Hui-Huang Chen. 2007. Using HPMC to improve crust crispness in microwave-reheated battered mackerel nuggets: Water barrier effect of HPMC. *Food Hydrocolloids*. 22:1337-1344.
2. Chien-Li Chen and Tzu-Ming Pan. 2012. Red mold dioscorea: a potentially safe traditional function food for the treatment of hyperlipidemia. *Food Chem*. 134: 1074-1080.
3. Chien-Li Chen and Tzu-Ming Pan. 2013. Red mold dioscorea decreases blood pressure when administered alone or with amlodipine and is a potentially safe functional food in SHR and WKY rats. *J. Funct. Food*. 5: 1456-1465.

Conference Articles

1. 陳建利、洪秀麗、劉碧宏、陳輝煌、陳淑德、郭煌林, 以 HPMC 複合披膜技術改善微波復熱裹麵漿產品麵皮脆度。台灣食品科學技術學會 2005 年會壁報展示論文。台中。2005 年 11 月。
2. Li-Jung Yin, Chien-Li Chen, Sann-Tzong Jiang, Screening of mannanase-producing bacteria and medium effect on mannanase。台灣食品科學技術學會 36 屆年會壁報展示論文。基隆。2006 年 11 月。
3. Li-Jung Yin, Chien-Li Chen, Sann-Tzong Jiang, Isolation of mannanase-producing bacteria and purification of its mannanase。台灣食品科學技術學會 37 屆年會壁報展示論文。彰化。2007 年 11 月
4. Li-Jung Yin, Chien-Li Chen, Sann-Tzong Jiang, Screening of mannanase-producing bacteria and medium effect on mannanase。台灣保健食品學會第 5 屆年會壁報展示論文。台北。2007 年 03 月。

5. Li-Jung Yin, Chien-Li Chen, Sann-Tzong Jiang, Isolation of mannanase-producing bacteria and its purification。台灣保健食品學會第 6 屆年會壁報展示論文，台北。2008 年 02 月。
6. 柯智偉、陳建利、潘子明, 紅麴山藥併用 Amlodipine 對血壓調節之功效評估。台灣食品科學技術學會 39 屆年會壁報展示論文。宜蘭。2009 年 11 月。
7. 朱子萱、陳建利、潘子明, Statin 類藥物與紅麴山藥交互作用下對脂質代謝之影響。台灣食品科學技術學會 39 屆年會壁報展示論文。宜蘭。2009 年 11 月。
8. 陳建利、蔡文豪、潘子明, 16 種中草藥萃取物對 IMR 32 神經細胞株增生及抗類澱粉樣蛋白 A β 神經毒殺之研究，台灣保健食品學會 2011 年會壁報展示論文。台北。2011 年 02 月。
9. 蔡文豪、陳建利、潘子明 2011, 雷公根與酸棗仁萃取物對 PC12 細胞株抗 Amyloid peptide 神經毒殺效應之研究。台灣保健食品學會 2011 年會壁報展示論文。台北。2011 年 02 月。
10. 何平偉、陳建利、郭駿凱、潘子明 2011, 雷公根 (*Centella asiatica*) 萃取物對阿茲海默症大鼠改善學習記憶效果之研究。台灣保健食品學會 2011 年會壁報展示論文。台北。2011 年 02 月。
11. 張光曜、陳建利、郭駿凱、潘子明 2011, 酸棗仁 (*Zinziphi spinosae*) 萃取物對大鼠阿茲海默症之輔助治療功效評估。台灣保健食品學會 2011 年會壁報展示論文。台北。2011 年 02 月。
12. Chien-Li Chen and Tzu-Ming Pan, 2011/11/20-23, Synergistic effects of food supplement with semen *Zinziphi Spinosae* or *Centella asiatica* in the treatment of continuous osmotic minipump infusion of amyloid beta peptide induced Alzheimer's disease rat. The 2011 ICoFF Annual Meeting & Food for Wellbeing-from Function to Processing, Taipei, Taiwan.
13. Chien-Li Chen, Chun-Kai Kuo, Cheng Lun Wu, and Tzu-Ming Pan, 2011/11/20-23, Red mold dioscorea ameliorates impairment of memory and learning in

intracerebroventricular infusion amyloid β -peptide induced Alzheimer's disease rats. The 2011 ICoFF Annual Meeting & Food for Wellbeing-from Function to Processing, Taipei, Taiwan.

14. Chien-Li Chen and Tzu-Ming Pan, 2012/06/16-19, *Monascus purpureus* NTU 568 fermented products and co-treatment decreases blood glucose and represents a potentially safe functional food in streptozotocin-induced diabetic rats. 112 General Meeting of American Society for Microorganism, CA, San Francisco.
15. Chien-Li Chen and Tzu-Ming Pan, 2012/06/25-28, Effects of food supplement with red mold dioscorea in the treatment of continuous osmotic minipump infusion of amyloid beta peptide induced Alzheimer's disease rat. The 2012 IFT Annual Meeting & Food Expo, Las Vegas, NV, USA.
16. Chien-Li Chen, Muh-Hwan Su, Han-Chin Lin and Tzu-Ming Pan, 2012/08/20-23. Effect of TianLife® on memory and learning in an animal model of Alzheimer's Disease. 11th Meeting of Consortium for Globalization of Chinese Medicine (CGCM), Macau.
17. Chien-Li Chen, Yi Jyun Chen and Tzu-Ming Pan, 2013/04/18-20. Ethanol extract of *Ziziphi spinosae* protects differentiated PC12 cell from amyloid beta protein induced neurotoxicity. 28th International Conference of Alzheimer's Disease International, Taipei, Taiwan.
18. Chien-Li Chen and Tzu-Ming Pan, 2013/04/18-20. Effect of red mold dioscorea on memory and learning in an animal model of Alzheimer's disease. 28th International Conference of Alzheimer's Disease International, Taipei, Taiwan.

Award record

1. 陳建利、蔡文豪、潘子明, 16 種中草藥萃取物對 IMR 32 神經細胞株增生及抗類澱粉樣蛋白 A β 神經毒殺之研究。台灣保健食品學會 2011 年會壁報論文傑出獎。

2. 蔡文豪、陳建利、潘子明 2011, 雷公根與酸棗仁萃取物對 PC12 細胞株抗 Amyloid peptide 神經毒殺效應之研究。台灣保健食品學會 2011 年會壁報論文優等獎。
3. 何平偉、陳建利、郭駿凱、潘子明 2011, 雷公根 (*Centella asiatica*) 萃取物對阿茲海默症大鼠改善學習記憶效果之研究。陳安泰醫師研究論文獎學金