

摘要

伴隨著人口老齡化問題越來越嚴重，神經退行性疾病的發病率越來越高，大大加重了社會的醫療、經濟負擔。近年研究表明氧化損傷能够引起神經元細胞的凋亡，并且同時誘發神經退行性疾病。所以，在抗氧化劑、抗凋亡劑中尋找具有治療神經退行性疾病功效的潛在藥物，被視為一種成本低，風險小的治療神經退行性疾病新藥開發策略。

虎杖是被報導的具有抗氧化活性的常用中藥之一，某些成份已報導具有神經保護作用。爲了進一步探究虎杖的抗氧化作用的藥效物質基礎，以及尋找具有神經保護作用的潛在化合物及探究其作用機制，本研究採用與多巴胺神經元細胞有很多相似之處腎上腺嗜鉻細胞瘤細胞株 PC12 作為實驗對象，使用叔丁基過氧化氫（*t*-BHP）誘導其氧化損傷，造成氧化应激模型。利用該模型篩選從虎杖中分離得到的多種成份的抗氧化活性，我們發現 2-甲氧基-6-乙酰基-7-甲基胡桃醌（MAM）展現了很好的抗氧化活性和 PC12 細胞的保護作用，而該成份的抗氧化活性尚未有報導。

本研究採用 MTT 法以及乳酸脫氫酶（LDH）漏出率分別測試 *t*-BHP 所致的細胞存活率下降和細胞膜損傷的程度，以及 MAM 的保護作用，並且採用硫辛酸和白藜蘆醇作為陽性對照。結果表明，MAM 預處理 24 小時可以明顯拮抗 *t*-BHP 所致的 PC12 細胞存活率下降以及 LDH 的大量釋放，隨著 MAM 濃度增加保護作用呈增強趨勢。其保護作用強於硫辛酸和白藜蘆醇。在 MTT 法測試中，5 μ M 濃度的 MAM ($111.5 \pm 4.8\%$) 可以完全拮抗 *t*-BHP 所致的細胞存活率下降 ($26.8 \pm 13.2\%$)。而硫辛酸 (100 μ M, $52.1 \pm 6.6\%$) 與白藜蘆醇 (50 μ M, $97.6 \pm 6.4\%$) 也在不同程度上改善了 *t*-BHP 導致的細胞毒作用。LDH 漏出率測試結果與 MTT 發結果基本一致，5 μ M 濃度的 MAM ($6.2 \pm 5.3\%$, LDH 漏出率) 大大降低了 *t*-BHP 所致的細胞膜損傷 ($68.8 \pm 12.6\%$)，硫辛酸 (100 μ M, $43.0 \pm 12.1\%$) 與白藜蘆醇 (50 μ M, $11.9 \pm 12.1\%$) 同樣起到了不同程度的細胞膜保護作用。

爲了考察 MAM 是否具有抗凋亡作用，我們選用 Hoechst 33342 DNA 螢光染料定性觀察細胞核形態變化，以及 TUNEL 法和流式細胞儀技術定量考察 PC12 凋亡細胞比例。Hoechst 33342 細胞核染色結果顯示，*t*-BHP 刺激組有大量的細胞核呈濃染緻密的固縮形態，有凋亡小體產生，並且細胞密度較正常照組低；而不同濃度的 MAM 預處理組改善了 *t*-BHP 所致的細胞核固縮情況，以及大大降低了凋亡小體的產生，提示 MAM 具有很好的抗凋亡作用。TUNEL 法流式細胞儀檢測結果與 Hoechst 33342 細胞核染色結果相近，同樣顯示了 *t*-BHP 能夠誘導大量凋亡細胞產生，而不同濃度的 MAM 預處理后凋亡細胞的比例大大降低，進一步證明 MAM 具有很好的抗凋亡效果。

爲了進一步探究 MAM 保護作用的潛在細胞機制，我們觀察了有絲分裂素活化蛋白酶（MAPK）信號轉導通路的蛋白表達變化。MAPK 級聯途徑是細胞外刺激信號轉導致細胞核，從而介導細胞產生反應的信息傳遞通路，在細胞凋亡中起重要作用。MAPK 級聯途徑主要由三條信號通路組成分別爲：細胞外調節蛋白激酶（ERK）通路，c-Jun 氨基末端激酶（JNK）通路、P38 MAP 激酶通路。蛋白印跡法（western blotting）結果顯示，*t*-BHP 刺激在 15 分鐘內磷酸化 ERK、JNK、p38 MAPK 的表達達到最大值；而 MAM 預處理很好地抑制了 ERK、JNK、p38 MAPK 的激活，呈現濃度依賴性。

總之，本研究初次報導了 MAM 是虎杖中具有抗氧化活性的成份之一，並且通過下調氧化應激介導的 ERK、JNK、p38 MAPK 的激活，發揮很好的抗凋亡作用。MAM 可能會在氧化損傷造成的神經退行性疾病的預防和治療中起重要作用。

關鍵詞：2-甲氧基-6-乙酰基-7-甲基胡桃醌；抗氧化；凋亡；神經退行性疾病；MAPK