

東海大學食品科學研究所
Graduate Institute of Food Science
TUNGHAI UNIVERSITY

食品科技組
Food Technology Section

碩士學位論文
Master Thesis

指導教授：盧錫祺 博士
Advisor : Lu, Hsi-Chi, Ph.D

探討大腦短暫性缺血之細胞凋亡路徑
Study of apoptotic signaling pathway after transient cerebral
ischemia

研究生：周心語 撰
Graduate Student : Chou, Hsin-Yu

中華民國 99 年 01 月
January, 2010

謝誌

在兩年多的研究生活中，感謝多數人的幫忙以及提攜，才能夠順利完成學業。在生活中，時而忙碌，時而艱辛，辛苦的背後卻有無形的力量給予我足夠的能力去完成這艱難的任務。因為你們讓我比更多人得到更多的關愛和照顧，非常感激但只能在短短的謝誌中表達淺淺的感謝，而我心中卻是有許多說不出來的感動。

感謝恩師盧錫祺老師，給予我充分的空間，讓我能夠去找尋更多的研究並時常關心學生還有大大的包容心。另外，謝謝陳春榮博士，亦師亦友，體貼及關懷學生，而我並非冰雪聰明，他總是有耐心慢慢仔細提醒學生，引導我在研究中發揮更多的想像空間。感謝您費心及提供許多寶貴的意見，因為您我真的學到很多。

我很幸運，因為我擁有好多學長學姊，在實驗上，謝謝廖學姊、淑玲姊、Joe、慶憶、小關學長、小董、阿曉他們很忙碌，可是總是會見到他們，撥空時間耐心的教導，初學者難免會犯錯，但是他們也只是微笑帶過，除了感動以外，更增加自己的自信心，不懂要學，一定要自我學習才能跟上你們的腳步，這是在你們身上學到的。另外，謝謝鈺婷、雅妮、小眼、玉汝、玉涵，在我寫論文時，幫忙我處理一些雜務，讓我安心的專心的寫完，感動你們這些美眉的體貼，我會放在心裡。在東海裡也有一群可愛的學長姊像瓜哥、鈺玲、志成、碗糕、茹婕、蘭姊，指導我如何做好研究生的角色，生活上的困難也給予協助，因你們的帶領所以在研究生活中，無後顧之憂。當然還有可愛的佳樺、邁文、奇囉囉、山熊、青蓉、勝志，謝謝你們的幫忙，在外無法抽空時間陪伴你們，感謝你們的體諒，記得要加油歐！此外，我的同窗汝翔和附偉，能夠認識你們真好，一起努力爬啊爬，終於讓我們攻頂了。就算多麼辛苦，只要有你們都忘記了，很感謝你們陪伴我。

另外，從小到大，我沒有很大的目標跟願望，因為我的爸爸、我的媽媽給我這個希望，沒有壓力、沒有要求什麼，無私的付出，默默的耕耘。畢業是送給你們的禮物，對不起沒有即時分享這份喜悅，完成碩士學業雖然是我的，但最大的榮譽在於你們身上，我希望你們除了為我驕傲以外，更要以自己為榮。因為我的爸爸、我的媽媽偉大的扶養我長大，我很幸福，真的很幸福。豬莎、豬子、豬弟，雖然有時候會來亂我，但我知道你們想關心我、問問我，哪怕是點小事，告訴你們，我並不寂寞，因為有你們的體貼讓我很窩心，謝謝！在生活上感謝上天給我 Cookie，謝謝牠的陪伴跟等待，讓我遇到挫折時，有一個傾聽的對象。

研究生涯中，你們都是我的貴人，真的很感激你們，你們的愛我會好好收藏著。這個榮譽是屬於你們的，往後我會更加努力以報答所有愛護我的人。

目錄

| | |
|---|----|
| 中文摘要 | 1 |
| Abstract | 2 |
| 文獻回顧 | 3 |
| 壹、 腦缺血(brain ischemia)介紹 | 3 |
| 一、 分類及其成因 | 3 |
| 二、 治療方式 | 4 |
| 三、 腦缺血後之病理變化腦組織內部的改變 | 5 |
| 貳、 腦缺血/再灌流動物實驗模式 | 10 |
| 參、 腦缺血之細胞死亡 | 10 |
| 一、 腦缺血後之細胞壞死 | 11 |
| 二、 腦缺血後之細胞凋亡 | 11 |
| 肆、 腦缺血再灌流後之細胞凋亡機制 | 12 |
| 伍、 實驗目的 | 17 |
| 材料與方法 | 18 |
| 壹、 材料 | 18 |
| 一、 試藥 | 18 |
| 二、 抗體 | 18 |
| 貳、 實驗方法 | 19 |
| 一、 實驗動物 | 19 |
| 二、 腦缺血/再灌流(ischemia/reperfusion)之動物模型 | 19 |
| 三、 動物行為評估 | 20 |
| 四、 組織處理 | 20 |
| 五、 梗塞區域評估 | 20 |
| 六、 組織病理學染色 | 21 |
| 七、 免疫螢光染色 | 21 |
| 八、 西方轉漬法分析蛋白質表現量 | 22 |
| 結果 | 24 |
| 討論 | 31 |
| 結論 | 36 |
| 圖表 | 37 |
| 參考文獻 | 64 |

圖表目錄

| | |
|--|----|
| 圖甲、大鼠腦缺血/再灌流手術..... | 19 |
| 圖乙、動物實驗之處理程序..... | 20 |
| 圖一、外源性細胞凋亡途徑..... | 14 |
| 圖二、內源性細胞凋亡途徑之粒線體和轉錄因子相關調節..... | 16 |
| 圖三、大鼠腦缺血再灌流前後各個組別的體重變化..... | 37 |
| 圖四、評估腦缺血再灌流後梗塞面積..... | 38 |
| 圖五、腦缺血再灌流前後行為變化..... | 41 |
| 圖六、腦缺血後皮質部、海馬迴與紋狀體之組織病理學變化..... | 44 |
| 圖七、腦缺血再灌流後星狀神經膠細胞活化情形..... | 47 |
| 圖八、偵測腦缺血再灌流後嗜中性白血球的變化..... | 48 |
| 圖九、偵測腦缺血再灌流後巨噬細胞的變化..... | 49 |
| 圖十、偵測腦缺血再灌流後 B 細胞的變化..... | 50 |
| 圖十一、偵測大鼠腦缺血再灌流後細胞凋亡的情形..... | 53 |
| 圖十二、腦缺血再灌流後大腦皮質部 NeuN、GFAP、NF-L 與 NF-M 的表現..... | 54 |
| 圖十三、分析腦缺血再灌流後大腦皮質部發炎相關因子 COX-2 之表現..... | 55 |
| 圖十四、腦缺血再灌流後外源性細胞凋亡相關因子之表現..... | 58 |
| 圖十五、腦缺血再灌流後抗細胞凋亡蛋白之表現..... | 59 |
| 圖十六、腦缺血再灌流後內源性細胞凋亡相關因子的表現..... | 60 |
| 圖十七、腦缺血再灌流後轉錄因子調控之表現..... | 61 |
| 圖十八、腦缺血再灌流後細胞凋亡誘導因子 AIF 的蛋白質表現..... | 62 |
| 圖十九、腦缺血再灌流後 Caspase 3、Caspase 8 及 Caspase 9 的活性分析..... | 63 |
| 表 1 腦血管疾病之分類..... | 4 |

中文摘要

腦中風又稱為腦缺血，是國人常見疾病之一。目前已有缺血性腦中風動物模式，本論文藉由缺血性腦中風動物模式探討腦缺血再灌流時，大鼠腦缺血後其體重、行為、梗塞面積、組織病理、發炎因子及細胞凋亡訊號之變化，並且探討於腦缺血再灌流動物實驗模式下，透過不同的時間，了解腦損傷後其細胞凋亡的原因和機制。實驗結果顯示：腦缺血再灌流後大鼠體重、活動能力及肌肉協調性明顯降低且於第 1 天大腦梗塞面積高達 35% 以上。組織病理檢測發現大腦皮質部神經元細胞核有萎縮之細胞凋亡特徵、神經纖維絲明顯減少，大腦內部調控發炎及保護大腦細胞之星狀神經膠細胞有活化、增生現象。發炎時，嗜中性白血球、巨噬細胞、B 細胞浸潤的情形也分別出現在腦缺血再灌流後前、中後期，並偵測到發炎介質 COX-2 的表現。細胞凋亡路徑分析方面，透過 TUNEL 染色法確認大腦皮質、海馬迴、紋狀體部位細胞凋亡之陽性反應。進一步探討腦缺血後細胞凋亡路徑調控機制，結果顯示，外源性細胞凋亡路徑相關的 TNF- α receptor 1、Fas、TNF- α 以及 FADD 表現增加，其下游媒介分子 Bid 的表現也有增加的情形。另一方面也分析出抗細胞凋亡蛋白 FLIP 的表現上升。於內源性細胞凋亡路徑分析發現，腦缺血後會降低抗細胞凋亡蛋白 Bcl-2 及 Bcl-xL 的表現，增加細胞凋亡蛋白 Bax、PUMA 及 Bad 的表現。腦缺血後 p53 轉錄因子表現增加參與細胞凋亡。於細胞凋亡中，半胱胺酸蛋白酶非依賴性細胞凋亡因子 AIF 於腦缺血後亦可自催化後表現。然而，酵素活性分析半胱胺酸蛋白酶 Caspase 3、Caspase 8 及 Caspase 9 均有活化的現象。這些結果顯示，腦缺血再灌流傷害後可透過半胱胺酸蛋白酶非依賴性及半胱胺酸蛋白酶依賴性的外源性和內源性細胞凋亡路徑，參與細胞凋亡的進行。

Abstract

Stroke, also known as cerebral ischemia, is one common disease of humans. In studying the pathophysiological alterations of stroke, an animal model of transient focal cerebral ischemia in rat was established. Through this animal model of stroke, we were interested to investigate potential post-ischemic brain alterations, particular in the regulation of post-ischemic apoptosis. Global examination found that ischemia/reperfusion caused a significant loss in body weight and deficits in neurobehavior and motor coordination. Ischemia/reperfusion insult caused brain infarction. Histological examination revealed a remarkable atrophy of neuronal nuclei, cell apoptosis, neurofilament loss, and microglia and astrocyte activation. To further elicit the inflammatory response, the activation of resident microglia, the infiltration of neutrophils, macrophages, and B lymphocytes, and the expression of pro-inflammatory mediator cyclooxygenase-2 were detected in ischemic brain tissues. Using TUNEL staining to detect apoptosis-related chromosome breakage, a significant TUNEL-positive signal was detected in cerebral cortex, hippocampus, and striatum after cerebral ischemia/reperfusion. An elevation of protein expression in extrinsic apoptosis pathway-associated molecules such as TNF- α receptor 1, Fas, TNF- α , FADD, and Bid was detected by western blot after cerebral ischemia/reperfusion. Intriguingly, cerebral ischemia/reperfusion also increased the expression of FLIP, a natural antagonist against extrinsic apoptosis. Regarding the intrinsic apoptosis pathway, cerebral ischemia/reperfusion decreased anti-apoptotic Bcl-2 and Bcl-xL expression but increased pro-apoptotic Bad, PUMA, and Bax expression. The apparent expression of p53, a transcription factor critical to apoptosis induction, was detected in ischemic tissues. In addition to caspase-dependent apoptotic cascades, the expression of caspase-independent apoptotic molecule AIF was elevated after cerebral ischemia/reperfusion. Enzymatic measurement further showed the activation of caspase-3, caspase-8, and caspase-9 after cerebral ischemia/reperfusion. These findings suggest that cerebral ischemia/reperfusion triggers caspase-independent and caspase-dependent apoptotic cascades leading to post-ischemic apoptosis.

文獻回顧

壹、腦缺血(brain ischemia)介紹

腦缺血，俗稱為腦中風(stroke)是國人常見的疾病之一，其致死率頗高，根據衛生署統計，台灣地區的十大死亡原因惡性腫瘤位居第一，腦中風位居第二，佔全部死亡人數的百分之十八左右(行政院衛生署網站)。而腦中風主要因腦血管阻塞、破裂所導致突發或陣發性之大腦局部或全面性神經功能失調，進而造成神經系統受損及感覺減退、語言遲緩、運動障礙、記憶衰退、行為改變等臨床症狀。

一、分類及其成因

人類組織器官及大腦養分、糖分、氧氣主要是由血液攜帶運送及供應來維持體內細胞生理代謝和細胞內部離子平衡。大腦血液主要是由兩側內頸動脈和椎動脈所供應，一旦動脈因栓塞、梗塞或其他因素造成血液停止供應，大腦內儲存之養分、糖分及氧氣在瞬間大量減少，使細胞因能量不足進而受損死亡，則會影響大腦功能。在腦血管疾病因臨床上症狀、病因、病理等表現差異，可分為二大類出血性(hemorrhagic)及缺血性(ischemic)腦血管疾病兩大類(如表1)，俗稱出血性(hemorrhagic stroke)及缺血性腦中風(ischemic stroke)。

1. 出血性腦中風

出血性腦中風或稱自發性腦缺血，死亡率及致殘率為所有中風類型最高。由於腦部血管的外膜與中膜不發達，若病人有高血壓合併動脈硬化時，腦血管就容易破裂出血。出血可使該部位發生缺血性壞死；同時出血的血塊可壓迫鄰近腦組織，使機能障礙的範圍擴大。另外，出血量過大時，會使腦壓增加，使得腦部的血液循環不暢，產生種種神經症狀，嚴重時會造成昏迷或死亡。

2. 缺血性腦中風

缺血性之腦中風患者主要因血管壁阻塞、血塊或異物栓塞造成血液無法流通，造成腦組織氧氣及能量不足，腦組織因而變性壞死，又稱為腦梗塞。而缺血性中風根據形成的原因又分為腦栓塞(brain embolism)及腦血栓(brain thrombosis)。腦栓塞的成因，主要是因供應血流來源的心臟及周邊血管中形成血液的凝塊或是感染而造成的增生物，在血管中隨著血液流動而到達腦部阻塞血管，形成栓塞。腦血栓為腦中風最常發生的原因。最常見的病因是腦動脈粥樣硬化，腦動脈炎、結締組織疾病，先天血管畸形、血壓降低和血液凝固性增高。當處於睡眠、失水、心力衰竭、心律失常、紅血球增多等狀態下，引起血壓下降、血

流緩慢、血液黏稠度增加或血凝集功能異常等，而導致血栓形成。

表 1 腦血管疾病之分類

| |
|--|
| 1. 缺血性中風 (Ischemic Stroke) (1) 血栓栓塞性腦梗塞(thromboembolic infarction)，為大血管栓塞。 (2) 腔隙性腦梗塞(lacunar infarction)，為微血管栓塞。 (3) 心因性腦梗塞(cardiogenic brain infarction) |
| 2. 出血性中風 (Hemorrhagic Stroke) (1) 腦出血(brain hemorrhage) (2) 蜘蛛網膜下腔出血(subarachnoid hemorrhage) (3) 動靜脈畸形引起顱內出血(intracranial hemorrhage from an arteriovenous malformation) |

(行政院衛生署)

二、治療方式

針對目前主要的治療方式分為兩大類，分別為：

1. 血栓溶解治療

這種治療方式主要是利用血栓溶解劑-recombinant tissue plasminogen activator (rt-PA)快速的溶解阻斷腦部血流血栓，就能減少因缺血所引起的腦部傷害程度，使得病患的症狀在很短的時間改善甚至於消失。但根據研究報告指出，對於急性缺血性腦中風的病患，必須在「黃金時期」的 3 個小時內經由靜脈給予血栓溶解劑 rt-PA 的治療(Dyker and Lee, 1996)，於治療時效上有非常嚴格的限制，其在治療效果上也有一定難易之度。而其他傳統的藥物，如抗凝血劑、血小板抑制劑，主要僅防止血栓繼續擴大，並無法將以形成的血栓溶解，治療效果更劣於血栓溶解劑 rt-PA。

2. 神經保護

使用神經元保護劑其目標是在於腦中風發生後的缺血(ischemia)/再灌流期(reperfusion)來保護神經細胞，減少細胞的損傷及死亡。雖然實驗研究的結果令人期待，但在人體實驗下，效果卻不佳(Fisher and Tatlisumak, 2005)。大部分神經傳導物質有關的藥物都被證實無效，或者有嚴重的副作用，如 NMDA 阻斷劑、glycine 阻斷劑和 glutamate 阻斷劑都會產生

副作用。但許多學者仍以保護神經元為目標，找尋更多的療程，來達到保護、治療又不具副作用的方法。

三、腦缺血後之病理變化腦組織內部的改變

1. 腦組織內部的改變

一般來說，腦組織各部位以皮質部(cortex)對缺氧最為敏感。腦部發生缺血時，大部分的組織及細胞並不會立即死亡，而是漸進性的透過一連串的組織發炎、離子失衡、氧化壓力、自由基的釋放以及血腦障壁的破壞，導致細胞不可逆的變性和死亡，又稱為神經細胞延遲性死亡(Kirino, 2000)。然而，腦部的損傷範圍或是中風區域的大小與缺血的時間長短有關。中風剛開始的過程中，腦部損傷主要是在阻塞血管的血流供應區域周邊開始形成，稱為梗塞核心區(infarct core)。在核心區域周邊腦組織為缺血半月區(ischemic penumbra)因其他尚未阻塞的血管提供代償性的血液灌注而暫無損傷的形成，但因核心區域的影響，逐漸失去功能。若是缺血無法在短時間內得到舒緩，核心周邊區域則會轉變成為梗塞核心區域(Smith, 2004)。腦缺血過後，因經由不同的方式治療或者是血流壓力造成的血液再灌注，其灌注的時間長短也會造成第二波細胞不可逆的傷害，甚至大量的細胞死亡，而死亡的方式主要以細胞壞死(necrosis)和細胞凋亡(apoptosis)為主。恢復血流一段時間後，自體免疫機制及體內調解會慢慢穩定平衡。在腦中風患者中，也發現患者在一段時間後行為能力及語言能力有漸漸改善的情形。又因後期細胞死亡的程度慢慢減低，已梗塞的區域，大多嚴重毀損，已無法修補，所以腦中風患者還是會留下後遺症，較一般人來的遲緩，往往都是大腦重要調控區中，細胞大量死亡的原因。

2. 細胞型態改變

中樞神經系統的細胞包括神經元細胞(neuron)及神經膠細胞。而神經膠細胞包括星狀神經膠細胞(astrocyte)、寡樹突細胞(oligodendroglia)及具有巨噬細胞特性的微神經膠細胞(microglia)。又因神經元細胞代謝功能旺盛，所以當腦血管的血管、栓塞或是因損傷造成腦血管血液的供應受阻，都會造成神經元細胞及組織缺氧而導致急性的細胞病變。隨著後續離子通道的通透性改變、炎症反應的發生或是生化代謝的異常等等，亦會造成神經膠細胞的活化及啟動修復的功能。以下分別是神經元細胞及神經膠細胞於腦缺血後型態上的改變：

(1) 神經元細胞

神經元細胞就是神經元，是構成神經系統功能的基本單位。從外型上來看神經元細胞的種類繁多，但神經元細胞的基本構造皆包括細胞本體、軸突和樹突。細胞本體是神經元細胞膨大的部分，內含有細胞核，細胞質內有胞器可維持細胞的生長代謝，是神經元細胞的協調中心。在腦缺血再灌流後大多數的神經元細胞型態上會呈現皺縮(shrunken)和多角形的改變。而神經元細胞中特殊的尼氏體(nissle substance)消失、細胞核濃縮、核仁不明顯。另外，腦缺血再灌流後已死亡的神經元細胞會透過免疫系統，在損傷周圍聚集許多的巨噬細胞，進行吞噬作用，稱為神經吞噬現象(neuronophagia)。

(2) 寡樹突細胞

寡樹突細胞主要跟中樞系統之髓鞘(myelin)形成及再生有關。因寡樹突細胞對傷害抵抗性較強，常在腦缺血梗塞的病灶中發現寡樹突細胞會有增生現象，並聚集在變性的神經元細胞周圍，又稱為衛星現象(satellitosis)。長時間腦缺血梗塞的病灶中，受到傷害的寡樹突細胞則會產生細胞凋亡，而未受到傷害的寡樹突細胞則會增生並聚集在梗塞區域周邊，進行組織修復(Mandai et al., 1997)。

(3) 微神經膠細胞

微神經膠細胞具有與巨噬細胞相似的特性及染色的特徵。正常的中樞神經系統中，微神經膠細胞是以未被活化的狀態存在，又稱為休眠的微神經膠細胞(resting microglia)，其型態上，細胞體為波浪狀，分支突起則為放射狀(Rock et al., 2004)。當腦缺血時，微神經膠細胞外型會發生改變，縮回分支突起，呈現阿米巴狀(ameboid state)圓形之外觀，然後移動至腦缺血梗塞的病灶中，進行吞噬作用以清除外來有害物質(Kreutzberg, 1996)。

(4) 星狀神經膠細胞

星狀神經膠細胞含有許多突起，與微血管形成血腦障壁(blood-brain barrier)，提供中樞神經系統穩定不受干擾之環境，並負責中樞系統之物質運輸與支持功能。在神經損傷的情況下，星狀神經膠細胞會被活化，進行再生且大量增殖，稱為肥胖型星狀神經膠細胞(gemistocytic astrocyte)。腦缺血的組織中，急性的缺氧下，會造成梗塞核心區域星狀神經膠細胞腫脹、變性、死亡，細胞突起斷裂、萎縮及破裂(Nedelcu et al., 1999)。在腦缺血再灌流後第二天，可發現梗塞區域中心星狀神經膠細胞消失。梗塞區域周邊，聚集許多已活化之星狀神經膠細胞。其活化型態為細胞變大，細胞質形成細小顆粒狀，突觸變得更長、更多且更粗(Anderson et al., 2003)。另外，許多文獻指出，星狀神經膠細胞對於腦缺血後神經元細胞具有保護及調節離子恆定、調控細胞外麩胺酸濃度的功能(Trendelenburg and Dirnagl,

2005)並釋放促進神經再生的生長因子(Song et al., 2002)。相對地，星狀神經膠細胞對於中樞神經再生亦有負面的影響。當星狀神經膠細胞與寡樹突細胞、微神經膠細胞連同交纏在一起的纖維突觸，出現在梗塞區域周圍時，會形成結構緻密的膠質疤(glial scar)將梗塞區域包覆(Silver and Miller, 2004)。膠質疤能隔絕受傷組織、修補破損的腦血管障壁，降低發炎反應擴大波及周圍部位的神經，這樣的保護方式阻止了受傷神經纖維的延伸，阻斷中樞神經系統內在的修護功能(Ransom, 2003)，使梗塞區域的神經無法再生(Anderson et al., 2003)。此外，中樞神經系統受損引起發炎反應時，星狀神經膠細胞也會受到刺激，加速一氧化氮生成，而一氧化氮會與超氧化物反應，形成有毒物質，傷害神經元細胞，亦可能造成神經元細胞死亡(Maiken et al., 2008)。

3. 腦缺血後之生化反應

(1) 細胞能量不足

大腦組織對於氧氣和葡萄糖消耗需求量非常高，整個腦組織幾乎全部都依靠氧化磷酸化來產生能量。當腦缺血的情況下，血液供應量下降，造成腦組織攝取氧氣和葡萄糖缺乏，導致能量 ATP 不足。在低氧環境下，為了產生能量腦組織會以無氧呼吸的方式代謝葡萄糖，此過程釋放大量的乳酸造成環境酸化，使得許多細胞有酸中毒現象(acidosis)。又因環境的酸化，會讓腦組織自由基增加，引起第二波的傷害。另外，腦缺血後不久，依賴能量之離子幫浦故障，細胞膜通透性增加，導致離子之濃度梯度下降(Pisani et al., 2004)。許多維持體內平衡重要之離子，包括鉀離子(potassium)、鈉離子(sodium)、鈣離子(calcium)、氯離子(chloride)等，在細胞內外都會不斷增加離子的流動率，並且有堆積的現象。例如：鉀離子與鈉、氯離子在細胞內外相互調節轉送運輸一些碳氫鹽類之物質，對於生理代謝是非常重要的。而腦缺血後，腦部組織的損傷，細胞基本架構開始崩解，細胞膜通透力增加，加上代謝的失衡，很快的鉀離子大量堆積在細胞外，此時鈉、氯離子被蓄積在細胞內，導致組織水分含量增加、細胞腫脹(Hossmann et al., 1976)；當腦缺血時鈣離子濃度不斷增加，往往會引起細胞不可逆的傷害，如粒線體功能失調及細胞膜被破壞。此外，受到鈉離子和游離脂肪酸的刺激，粒線體和內質網都會因 ATP 的缺乏釋放出鈣離子。當細胞內有大量的鈣離子存在時，會活化細胞膜磷脂質水解酶水解磷脂質 A 和 C，伴隨游離脂肪酸的釋放，影響大腦結構及功能性，如花生四烯酸(arachidonic acid)。然而腦缺血後這些反應都不斷惡性循環，鈣離子的增加帶給腦部的細胞傷害非常嚴重，甚至會導致梗塞面積擴大，促使細胞凋亡，導致細胞死亡數目增加。

(2) 興奮性毒性物質的釋放

腦組織能量缺乏後，因神經元細胞膜電位消失而去極化(Dirnagl et al., 1999)，使一些興奮性傳遞物質，特別是麩胺酸(glutamate)，由神經元細胞的突觸釋放到胞外堆積，連帶引起大量鈣離子進入細胞。由上述的情況，重複的循環，有更多的鈣離子釋放激活讓許多酵素的活化，而神經元細胞一直處於去極化狀態，使得麩胺酸大量增加，更易造成細胞的死亡。於腦缺血所引起興奮性傳遞物質-麩胺酸，在腦細胞過度刺激下，麩氨酸受體也會被活化，以致離子幫浦異常及水分子湧入細胞內，造成細胞水腫。一連串的效應可以引起興奮毒性導致神經元細胞死亡和其他細胞活化，如星狀神經膠細胞、寡樹突膠細胞、微神經膠細胞被激活其興奮性胺基酸和白血球會遷移啟動的炎症反應，增加局部腦血流量，引起星狀神經膠細胞、寡樹突細胞以及神經元細胞和微神經膠細胞的損傷(Alvarez et al., 2007)。雖然星狀神經膠細胞上的麩胺酸運輸體在中樞神經系統扮演回收者的角色，回收細胞外過多的麩氨酸，以維持細胞間麩氨酸濃度恆定。然而當星狀神經膠細胞上的麩胺酸運輸體功能失調時，很可能會造成過量的麩胺酸累積在細胞間而引起細胞過激毒性而導致神經元細胞死亡。

(3) 自由基的釋放

當體內發生氧化反應時都會伴隨自由基的產生，相對地體內也會有一些自由基清除能力的酵素產生來維持正常的生理平衡。許多研究證明，許多實驗和臨床研究在所有的中風損傷的模式下，證明氧化壓力的提升。自由基參與中風引起的腦損傷，包括超氧陰離子自由基，羥自由基和一氧化氮等等(Loh et al., 2006)。自由基是造成急性腦缺血引發腦組織損傷的重要介質(Love, 1999)。這些自由基的產生主要是因粒線體能量代謝障礙、xanthine oxidase 形成增加、花生四烯酸代謝活性增強等等。這些後果造成脂質的氧化、電子傳遞鏈訊號異常、蛋白質變性，造成細胞損傷。輕微的會使細胞凋亡，嚴重之下，則會造成細胞大量壞死。而自由基也可透過 NADPH 氧化酶系統的下激活微神經膠細胞的產生和周邊血液之白血球的浸潤，影響不同的途徑後擴大傷害(Chang et al., 2007)。

(4) 血腦障壁(blood-brain barrier ; BBB)改變

血腦障壁是腦組織一個完整性且能夠來保護神經細胞的屏障。此構造是由內皮細胞(endothelial cell)、血管周邊巨噬細胞、基底層(basal lamina)、周細胞(pericyte)、星狀神經膠細胞所組成。在正常情形下，內皮細胞表面能夠抑制白血球的黏附、血球凝集、血栓形成。而有研究提出在腦缺血兩小時後，內皮細胞膜會開始溶解(Hamann et al., 1995)以及迅速增加血腦障壁的通透性(Ginsberg et al., 1996)。於早期血液再灌注發現可暫時減輕血腦障壁的改

變，但在血栓治療後可能會加劇血管內皮的損傷(Starkman et al., 2007)，當血管內皮損傷後，微血管破裂，其他組成份的瓦解，會造成細胞間隙孔洞變大，大量體液增加進入腦組織中形成水腫(Juhler et al., 1985)，使得顱內壓進而升高。破壞了腦部原有的保護屏障時，會引起大量的發炎介質，吸引血液中的免疫細胞聚集，擴大炎症反應。

(5) 腦缺血後之炎症反應

在腦缺血再灌流後，發炎細胞、黏附因子、轉錄調節因子傳送出來的分子訊號，往往造成劇烈的炎症反應(Danton et al., 2003)。於發炎的過程中，體內的免疫系統被啟動，吸引大量的免疫細胞聚集浸潤腦缺血區域，導致腦組織的傷害更嚴重，如一些微血管的阻塞、血腦障壁被破壞。在腦缺血再灌流後參與發炎反應的細胞種類很多，如星狀神經膠細胞能夠分泌發炎因子細胞激素(cytokines)和一氧化氮合成酶(nitric oxide synthase; NOS) (Yamagami et al., 1999)；而微神經膠細胞在大腦扮演巨噬細胞的角色，具有吞噬的功能，能清除有毒性物質及壞死細胞(Morioka et al., 1993)。

另一方面跟免疫系統調節相關的細胞，包括淋巴球(lymphocytes)、嗜中性白血球、單核球/巨噬細胞(monocytes/macrophages)。在急性的炎症反應時，淋巴球的數量並不會增加，而是在復原期、亞急性和慢性炎症，數量才會有增加的情形。而淋巴球依功能性可區分為B淋巴細胞(B cell)和T淋巴細胞(T cell)。成熟的B淋巴細胞分化成漿細胞會產生及釋放免疫球蛋白及特異性抗體。特異性抗體可直接和病原體的毒素結合中和，並附著在病原體上，使巨噬細胞更易於吞噬及清除病原體；T淋巴細胞主要負責人體遲發型過敏反應的產生，如異物移植之排斥，移植體對宿主之排斥，抵抗細胞內病原體的感染及對抗癌症細胞等。據文獻指出，當腦缺血再灌流後第四天，T淋巴細胞因調節而活化，造成胸腺、脾臟內的淋巴球凋亡，使得胸腺及脾臟有萎縮的現象(Offner et al., 2006)。

此外，在免疫調節中，多形核白血球又可分為嗜中性、嗜酸性及嗜鹼性白血球。其中以嗜中性白血球為人體防禦系統中的第一線細胞，能有效的吞噬並殺死大部分侵入人體之細胞外病原體。而在腦缺血再灌流相關的研究指出，於腦缺血再灌流後早期腦部嗜中性白血球的數目會大幅提升，且吸引更多其他的白血球至缺血區域(Buck et al., 2001)。然而於腦缺血再灌流後中後期，可以發現大量的單核球及遷移至腦組織梗塞部位，慢慢轉化似巨噬細胞的功能及其活性，以吞噬及殺菌的方式，來對抗感染物質(Grau et al., 2001)。

(6) 腦缺血/再灌注之傷害 (ischemic/reperfusion injury)

腦缺血/再灌流傷害可以迅速恢復血液，減少梗塞範圍。但是血液的再灌注後果能加劇腦損傷。此時白血球於再灌流傷害中扮演很重要的角色，引起內皮細胞損傷及微血管阻塞，破壞了血腦障壁並且釋放細胞激素來擴大發炎反應(Pan et al., 2007)。另一方面，血小板和白血球於再灌流時會進行協同作用，導致損害情況越嚴重時，可能會造成微血管循環系統產生不再流動現象（no-reflow phenomenon）而使組織壞死。另外，過程中釋放出各種生化介質都有可能導致血管痙攣和加劇氧化反應和激發發炎之反應(Zeller et al., 2005)，使得損傷更嚴重。

貳、腦缺血/再灌流動物實驗模式

缺血性腦中風在於臨床的研究、治療非常重要，又因每年患者的百分比不斷增加，因此刺激了許多學者開始建立及開發多種腦缺血相關之實驗動物模式。而局部性缺血常見的包括永久性(permanent)或短暫性(transient)腦缺血模式。然而腦缺血模式已有許多種類動物被應用及建立，但多數是利用大鼠(rat)。由於大鼠價格較便宜、取得容易、操作便利，加上在研究中，對於大鼠的神經調節系統、生理解剖上最清楚及與人類相似性較大(Tamura et al., 1981)，所以大鼠常被用來模擬人類腦缺血之動物模型。

在廣泛的中風患者中，發現最常發生阻塞之血管為中大腦動脈(middle cerebral artery, MCA) (Karpiak et al., 1989)，屬於局部性的腦中風現象。在早期，已有研究學者建立中大腦結紮(middle cerebral artery occlusion, MCAO)實驗模式來引發大鼠局部性缺血(Robinson et al, 1975)，其中大腦結紮之技術主要將大鼠開腦後，電燒中大腦動脈阻斷血液的流通，此方式較具侵襲性且血液不會再灌流回腦組織中(Tamura et al., 1981)。然而，因為此方式容易造成大鼠腦部嚴重的傷害，造成死亡機率增加，而且與人類缺血性腦中風有所不同，例如人類發生缺血性腦中風時，可發生血液再循環的頻率是非常高的(Ringelstein et al., 1992)。經過多年不斷的建立與改良後，目前多數採 Zea Longa 等人所修飾過的線栓(suture)法，它主要是利用一條尼龍線並製作前端突起，將通往中央大腦動脈分支堵塞，經由一段時間後，讓血液得以再灌流，來完成腦缺血/再灌流動物實驗模型(Longa et al., 1989)。

參、腦缺血之細胞死亡

腦缺血再灌流後的損傷會引起細胞壞死及細胞暴發性的死亡、細胞膜崩解和細胞毒性所造成的水腫、內部胞器的瓦解(Martin et al., 1998)。細胞死亡的方式主要遵循缺血程度、細

胞成熟、細胞內游離鈣離子的濃度、細胞環境變化(Choi et al., 1995)，來啟動各種讓細胞死亡的機制。而腦缺血再灌流後細胞死亡的方式最常見的有兩種，包含細胞壞死和細胞凋亡：

一、 腦缺血後之細胞壞死

細胞壞死是受到化學因素，如強酸、強鹼、有毒物質；物理因素，如熱、輻射；生物因素，如病原體。種種的環境因素傷害，引起細胞死亡的現象。於細胞壞死初期，細胞內的粒線體和內質網腫脹、崩解，蛋白質顆粒增多，核發生濃縮或斷裂。隨著細胞質內蛋白變性以及嗜鹼性核蛋白的降解，細胞質內成酸性，環境之 pH 值下降，使得細胞膜通透性發生改變。水分子大量湧入，讓細胞內的含水量變高，促使細胞膨脹後破裂，導致細胞結構完全消失，最後細胞膜和胞器破裂，DNA 降解，細胞內容物流出，引起溶體(lysosome)釋放出各種分解酵素和細胞激素及對細胞有毒性等物質，讓週遭組織受傷引起發炎反應。在腦缺血後，細胞壞死主要發生在梗塞核心區域(Dirnagl et al., 1999)。對於腦部具有強烈的破壞性，可以讓細胞死亡情形擴大。

二、 腦缺血後之細胞凋亡

生物在胚胎發育、免疫調節及維持體內環境恆定裡，必須藉由自殺性的方式來移除多餘或功能不全的細胞。此機制受到遺傳基因的調控，故又稱程式性死亡(programmed cell death)。在惡劣的環境，如過冷、過熱、化學藥物、紫外線、缺氧等都有可能使細胞受到傷害，經由程式性的引發細胞凋亡，具有保護生物個體，避免細胞調節脫離正常軌道。當細胞凋亡一旦發生，在典型的特徵下我們可以發現胞膜起泡(membrane blebbing)、DNA 斷裂(DNA fragmentation)、染色體濃縮(chromatin condensation)、細胞皺縮(cell shrinkage)、細胞架構崩解(cellular component degradation)之情形，因此也成為實驗中偵測細胞凋亡的標記之一。最後，凋亡的細胞可保持完整細胞膜，避免週遭組織的發炎和傷害，稱之為凋亡小體(apoptotic bodies)。而這些凋亡小體很快會被週遭的吞噬細胞(phagocytes)排除及其他細胞的吸收。在腦缺血再灌流後，可發現在腦梗塞與正常腦組織三分之一交界處細胞正進行凋亡(Smith, 2004)。過一段時間後，細胞凋亡的情形會隨著時間慢慢緩和下來，直到腦缺血壓力消失為止(Abe, 1999)。因細胞凋亡是腦缺血再灌流後神經元細胞死亡的重要方式之一，又因梗塞半月區的細胞未死亡，但功能受損，呈可逆可修復的情形，若腦缺血再灌流後傷害程度越大，則梗塞範圍就會擴大，細胞凋亡數目也因此增加，稱為不可逆的傷害。所以目

前許多研究希望藉由藥物或控制血液再灌流的方式，幫助梗塞半月區之細胞恢復功能，減少梗塞範圍為目標(Zhao et al., 2006)。

肆、腦缺血再灌流後之細胞凋亡機制

在腦缺血再灌流後，所引發的細胞凋亡，其發生之過程可能循多種途徑，如獨立的進行或是不同途徑之間相互的影響等(Liou et al., 2003)。而目前的研究調查當中，由大鼠之中央大腦動脈梗塞動物模式下，模擬局部性腦缺血，發現在大腦梗塞核心區域及梗塞半月區內部的細胞凋亡是分成兩個途徑所調節的，以半胱胺酸蛋白酶(cysteiny l aspartate protease, caspase)做區分，包括半胱胺酸蛋白酶依賴性途徑(caspase-dependent pathway)及半胱胺酸蛋白酶非依賴性途徑(caspase-independent)。

一、半胱胺酸蛋白酶依賴性調節途徑

半胱胺酸蛋白酶被激發活化後，會開始展開一連串之半胱胺酸蛋白酶活化水解，導致細胞結構慢慢被瓦解，使得細胞死亡；相對的，半胱胺酸蛋白酶非依賴性調節，主要是由某些關鍵蛋白質的轉移，引起細胞內外，其他分子的相呼應，進而促使細胞凋亡。另外，半胱胺酸蛋白酶又可細分成兩個族群，一為介白素轉化蛋白家族，包括 caspase-1, -4, -5, -11, -12, -14，作用時可伴隨著細胞激素的釋放，引發炎症反應。二為直接促使細胞凋亡之半胱胺酸蛋白酶。依調控時間分配，分為起始型半胱胺酸蛋白酶(initiator caspase)，如 caspase-2, -8, -9, -10 和效應型半胱胺酸蛋白酶(effector caspase)，如 caspase-3, -6, -7。在細胞凋亡的早期，因起始型半胱胺酸蛋白酶的 prodomain 結構較長，可以與細胞膜上的死亡區域(death domain, DD)相互作用及傳遞死亡訊息到下游的蛋白質，藉由引發半胱胺酸蛋白酶水解，刺激及促進細胞凋亡(Earnshaw et al., 1999)；相反地，效應型半胱胺酸蛋白酶的 prodomain 結構較短，這群半胱胺酸蛋白酶可直接分解下游蛋白質及其他受質，快速帶領細胞凋亡。因為這些蛋白質和受質被分解，會造成細胞骨架，如微管蛋白、神經纖維絲(neurofilament)以及 DNA 複製蛋白，如二磷酸腺苷核糖多聚酶(PARP)也連帶受損。而半胱胺酸蛋白酶依賴性調節之途徑又分為外源性(extrinsic)及內源性(intrinsic)。介紹如下：

1. 外源性途徑(extrinsic pathway)

主要以細胞膜表面的細胞死亡受體(death receptor)接續傳遞細胞凋亡的訊息以及重要調節點為 caspase 8 的活化，所引發一連串之效應。而在腦缺血情況下，最常見的細胞膜上的

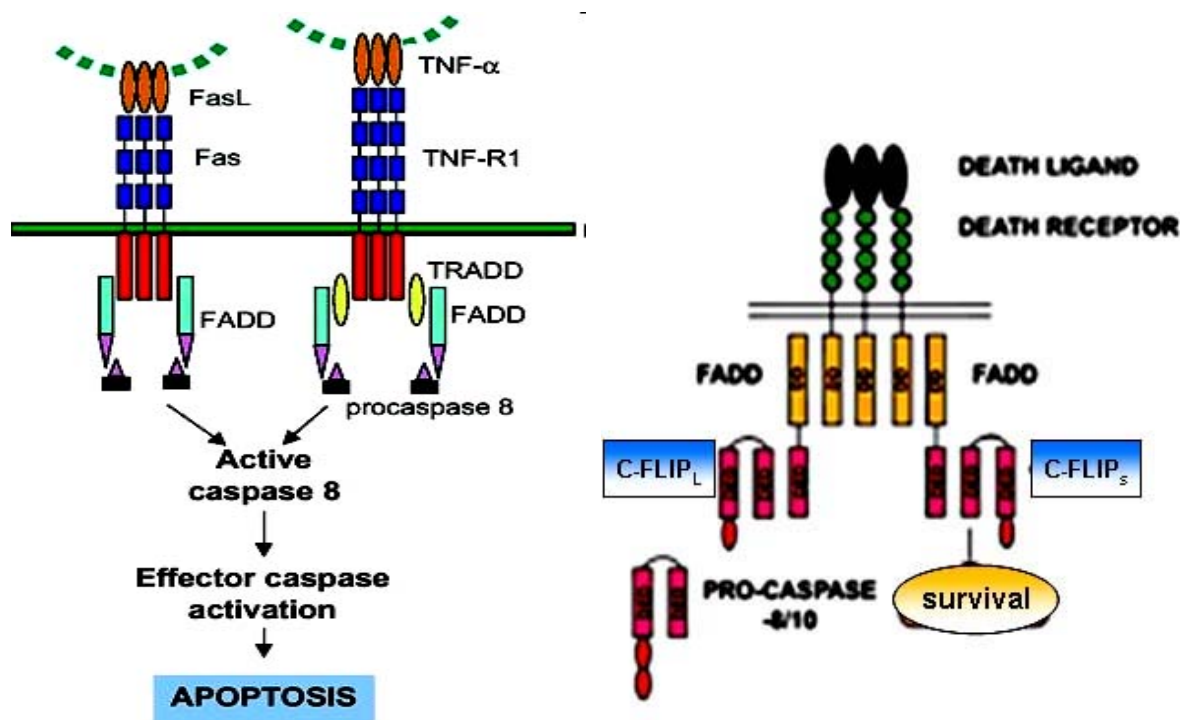
死亡受體主要為腫瘤壞死因子 (tumour necrosis factor, TNF) 家族所調控，其中以 Fas/ CD95 及 TNF receptor-1 (TNF-R1) 為主。其途徑調控機制如下：

(1) Fas/CD95 signal :

當細胞凋亡時，Fas/CD95 受體與配體(ligand)發生偶合，形成三聚體 (trimer)，此過程使得受體在細胞膜下的死亡區域(death domains, DD)也聚合在一起。之後，吸引下游的接受蛋白(adaptor proteins)，例如：細胞內的 Fas-associated death domain (FADD)，結合成誘發死亡訊息複合體(death-inducing signaling complex, DISC)。另外，FADD 具有一個死亡效應區 (death effector domain, DED)，死亡效應區可使細胞內的 pro-caspase 8 結合到 CD95-FADD 的複合體上，當 pro-caspase 8 聚集在一起後，它們便會自行互相切割，形成活化態(Salvesen and Dixit, 1999)。活化的 caspase 8 隨後快速且大量活化下游 caspase，引起細胞內分子 Bid 被切割，稱之 tBid。而 tBid 會轉移到粒線體外膜上，造成粒線體內的細胞色素 c (cytochrome c) 被釋放(Luo et al., 1998)。此外，有文獻指出活化的 caspase 8 也可直接切割並活化 pro-caspase 3 (Scaffidi et al., 1998)，進一步引起細胞凋亡。

(2) TNF-R1 signal :

TNF- α 是由 T-cell 所製造，在身體受到感染的時候可以活化巨噬細胞，引發一連串的發炎或免疫反應。然而在細胞凋亡中，TNF- α 的作用機制大致上和 Fas/CD95 signal 差不多，但是在受體上的死亡區域有所不同。細胞外的 TNF- α 與 TNF-R1 連接後，先接合和細胞內 TNFR 連結死亡區 (TNFR-associated death domain, TRADD) 結合，再利用 TRADD 和 FADD 連接，活化 pro-caspase 8。細胞死亡的訊息透過這些死亡受體的傳導，最終都會激發和裂解下游的 caspase -3, -6, -7，使走向細胞凋亡(圖一)。



圖一、外源性細胞凋亡途徑

另外，在細胞凋亡發生的過程中，據文獻指出某些分子則是有利於細胞的生存，例如抗細胞凋亡之蛋白分子-細胞類轉化酶抑制蛋白 (cellular FLICE like inhibitory protein, c-FLIP)。在於 Fas/CD95 signal 之細胞凋亡傳導路徑，c-FLIP 可抑制 Fas/CD95 死亡訊號的傳遞，作用方式為結合 pro-caspase 8，干擾切割，使得接下來一連串的 caspases 都無法被活化，停止細胞凋亡 (Bertin et al. 1997)。

2. 內源性途徑(intrinsic pathway)

此途徑細胞凋亡並不依賴受體，且本身就具有能力並足夠來執行細胞死亡。而發生地點通常以粒線體為中心。此途徑分別受到粒線體和細胞核內部轉錄因子 p53 的調控。其說明如下：

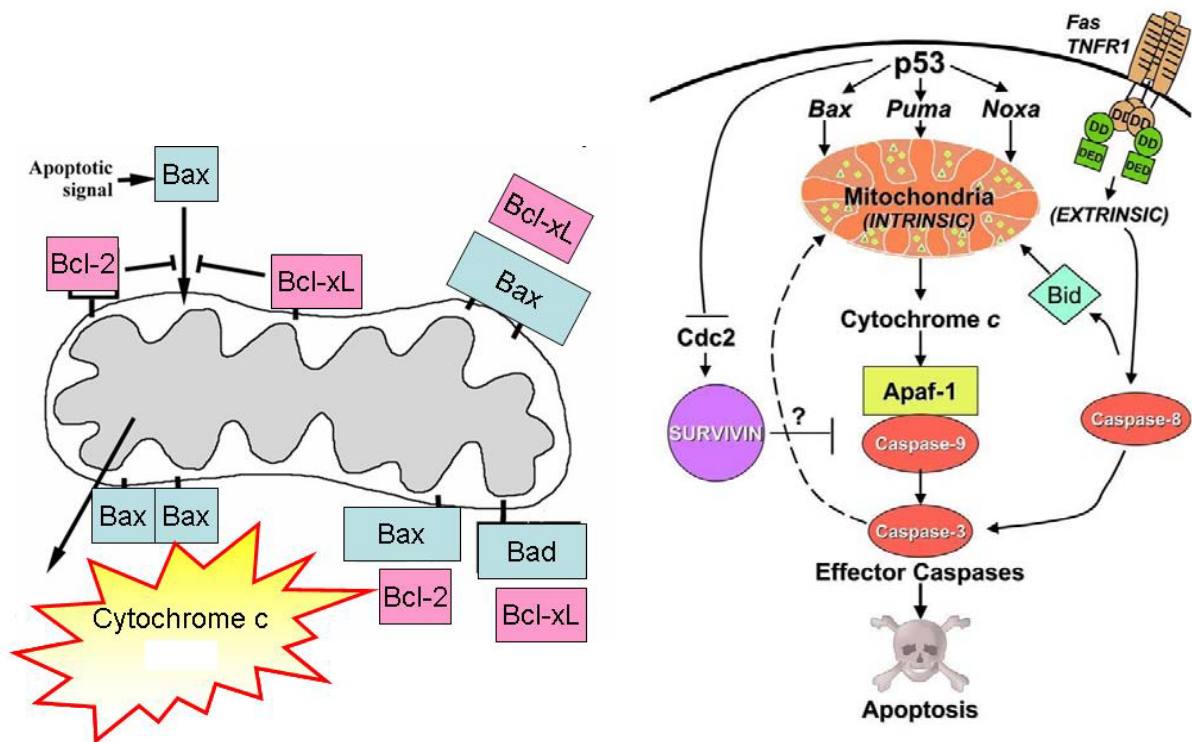
(1) 粒線體調控之途徑(Mitochondrial regulation pathway)

經由粒線體之途徑啟動半胱胺酸蛋白酶的活化，主要由 Bcl-2 家族蛋白主導(Gross et al., 1999)。而 Bcl-2 家族蛋白可細分成三個族群，第一家族為抗細胞凋亡之蛋白分子(anti-apoptotic protein)所構成，包括 Bcl-2、Bcl-xL；第二、三家族為細胞凋亡蛋白原(pro-apoptotic protein)，包括 Bax、Bid、Bad、Noxa、PUMA 等。其調控模式與受體類似，當細胞內分子 Bid 被切割後成為 tBid，tBid 轉移到粒線體上，使粒線體內的細胞色素 c 被釋放，同時，Bax 也會引起細胞色素 c 釋放於細胞質中(Luo et al., 1998)。而被釋放的細胞色素 c 可以與 Apaf-1 蛋白及 pro-caspase 9 連接，最後引起三者進行寡聚合作用(oligomerization)集成具輪狀結構之凋亡體(apoptosome)，活化 caspase 9 (Acehan, 2002)，引發下游效應型的半胱胺酸蛋白酶，例如 caspase-3, -6, -7 被活化，造成細胞死亡(Slee, 1999)。相較之下，於 Bcl-2 家族蛋白中，Bcl-2、Bcl-xL 也扮演了很重要的角色，主要功能是維持平衡和保護細胞，在缺血性腦損傷小鼠研究中，發現過度表達 Bcl-2 可以減少神經元細胞凋亡(Kitagawa et al., 1998)，抑制大腦海馬迴 CA1 區神經元細胞的凋亡(Wang et al., 1999)。而在永久性的大腦動脈梗塞之動物實驗中發現 Bcl-2 的過度表達，但卻發現 Bcl-xL 表現減少(Wiessner et al., 1999)。由此得知，Bcl-2 和 Bcl-xL，對於細胞凋亡具有一定的敏感性，但是會受到大腦損傷的模式不同或者是缺血時間、程度，都會有所影響。此外，這些抗細胞凋亡的蛋白，在組織或細胞損傷時會過量表現，但若損傷太嚴重，Bcl-2 和 Bcl-xL 則無能抵抗，最後細胞還是會走向凋亡的劣況。

(2) p53 轉錄因子調節細胞凋亡

p53 為腫瘤抑制基因蛋白，當致癌基因活化、缺氧和 DNA 損傷都會激發 p53 轉錄因子使 cell cycle 停止反應和引起細胞凋亡。而 p53 也可刺激包括 Bax、Puma、Noxa、Apaf-1、Fas 等因子的表現(Vousden, 2002)或是抑制抗細胞凋亡因子，如 Bcl-2、Bcl-xL、survivin 的

表現。據目前文獻指出 p53 調節之細胞凋亡途徑下，p53 可轉移至粒線體與 Bcl-xL 作用，引發粒線體過度滲透及刺激細胞色素 c 釋放(Mihara, 2003)。而在細胞凋亡調節中，亦可增加 Bax、Bid、Puma 的表現(Jeffers et al., 2003)。而 p53 除了在癌症的研究被重視外，於神經衰退疾病中，如缺血性腦損傷，也發現在體外(in vitro)與體內(in vivo)的模式下，顯示有增加且對於神經元細胞有損害性(Morrison et al., 2003)(圖二)。



圖二、內源性細胞凋亡途徑之粒線體和轉錄因子相關調節

二、半胱胺酸蛋白酶非依賴性途徑(caspase-independent)

細胞凋亡廣大路徑的調控下，有一群分子是不需要依賴半胱胺酸蛋白酶的活化，自行可發起凋亡訊息，快速而且造成大規模的傷害，如細胞凋亡誘導因子(apoptosis inducing factor, AIF)。細胞凋亡誘導因子位於粒線體膜間隙中的一種氧化還原酶，具有很強的促凋亡活性，在胚胎早期分化過程中具有重要作用。在死亡信號或細胞受迫的刺激下，粒線體通透性轉變孔開放，釋放出細胞凋亡誘導因子及細胞色素 c 至細胞質中，而細胞凋亡誘導因子途徑特殊，它可進入細胞核內，引起染色體的濃縮和 DNA 大規模斷裂(Susin et al., 1999)。

伍、 實驗目的

腦中風是國人常見且在臨床上極為重視的疾病之一，目前仍缺乏有效的治療方法。當腦中風後腦組織傷害中，最嚴重的傷害變化位於梗塞核心區，透過一連串的組織發炎、離子失衡、氧化壓力、自由基的釋放以及血腦障壁的破壞，導致神經細胞延遲性死亡，使得細胞變性和壞死。腦中風後梗塞核心區內的神經元細胞壞死已無法修補，為不可逆性傷害。但是核心區域周邊腦組織-缺血半月區，即正常腦組織及壞死腦組織交界的進行性神經元細胞凋亡卻是可以挽救的。因此希望能藉由腦中風傷害後的組織病理及細胞變化特性分析，從中找尋並發展更多的治療策略及改善方式。本研究的目的主要藉由腦缺血/再灌流的腦中風動物實驗模式，探討腦損傷後細胞凋亡的原因和機制，期望深入了解腦中風細胞凋亡的機制後，能提供藥物治療或神經保護的思考模式及治療標的，來降低腦梗塞範圍，防止病灶擴大，進而改善腦中風所導致的神經損傷。

材料與方法

壹、材料

一、試藥

| 藥品名 | 廠商 |
|--|---------------|
| 2,3,5-Triphenyl-2H-tetrazolium chloride, 98% | Alfa Aesar |
| AERRANE (isoflurane) | Daxter |
| Chloral hydrate | Riedel-dehaen |
| Eosin Y solution | Sigma |
| Gill's Hematoxylin solution | Merck |
| Paraformaldehyde | Merck |
| Proteinase inhibitor | Sigma |
| Tetramethylbenzidine | R & D systems |
| T-PER Tissue Protein Extraction Reagent | Thermo |
| In situ cell death detection kit | Roche |

二、抗體

| 抗體名稱 | 廠商 |
|---------------|-----------------|
| AIF | Santa Cruz |
| Bcl-2 | Santa Cruz |
| Bcl-xL | Santa Cruz |
| Bad | Santa Cruz |
| Bax | Santa Cruz |
| Bid | Santa Cruz |
| B cell | Santa Cruz |
| CD68 | BD Pharmingen |
| COX-2 | Cayman |
| Fas | Santa Cruz |
| FADD | Santa Cruz |
| FLIP S/L | Santa Cruz |
| GFAP | BD Transduction |
| NeuN | Millpore |
| NF-L | Santa Cruz |
| NF-M | Zymed |
| PUMA | eBioscience |
| TNF-R1 | Santa Cruz |
| TNF- α | Peprotech |

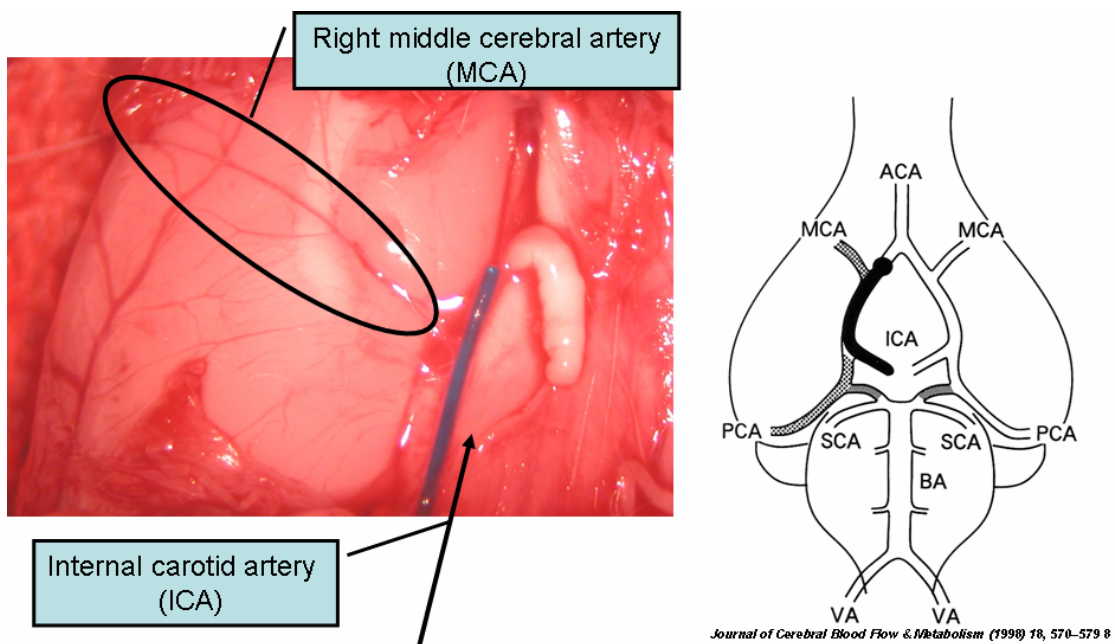
貳、實驗方法

一、實驗動物

本實驗所使用的實驗動物為購自台灣樂斯科生技公司Sprague-Dawley rat並自行繁殖之大鼠。飼養於動物籠中並維持 $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ ，60-80%之相對濕度的環境中。其光照週期為12小時，通風良好，並給予足量的飼料及飲水。

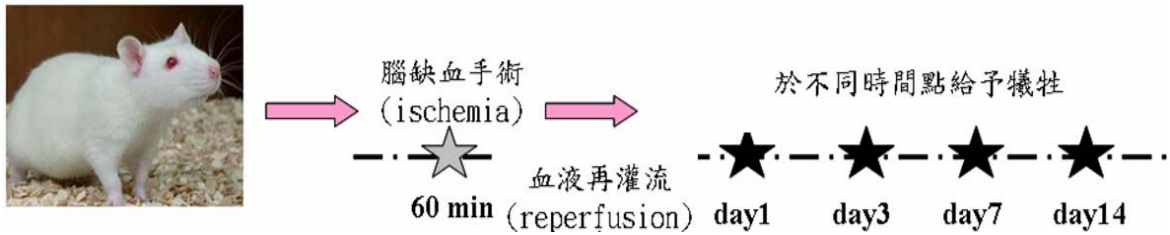
二、腦缺血/再灌流(ischemia/reperfusion)之動物模型

使用成年雄性250-300 g之Sprague-Dawley品系之大鼠，以2% Isoflorane氣體麻醉劑進行麻醉。剪開大鼠頸部腹正中線，用直鑷剝開肌肉層，露出左右兩側總頸動脈，沿著右側總頸動脈找出內頸動脈及外頸動脈位置，先將外頸動脈中段剪斷並以自製之4-0 Nylon suture末端突起縫線，長度約25 mm，由外頸動脈中段切口經內頸動脈放入至18.5-19.5 mm 達到中央大腦動脈之位置，同時將兩側總頸動脈結紮，進行大鼠腦部缺血60分鐘。於60分鐘後，用動脈夾固定內頸動脈，抽出Nylon suture，將外頸動脈中段切口結紮，鬆開動脈夾及兩側總頸動脈，使其血液得以再回流至腦部。



圖甲、大鼠腦缺血/再灌流手術

動物實驗



圖乙、動物實驗之處理程序

三、動物行為評估

以Open Field行為測試(Katsumata et al., 2006)。將大鼠放置於自製行為箱長0.6 m寬0.6 m高0.3 m之空間中，並模擬夜間之形式，關閉燈光，將周圍用方塊巾遮閉起來，利用camera紀錄其行為20分鐘。利用分析軟體(Ethro Vison 3.1)分析大鼠腦缺血前後之肌肉協調性(Locomotor activity)，此測試包括大鼠總移動距離(Total moving distance)、平均速率(Means of velocity)、瞬間最大移動距離(Maximum distance moved)、總旋轉角度(Total of turning angle)及運動時間佔所有觀測時間之百分比(Total moving duration)。

四、組織處理

注射過量之麻醉藥(520-600 mg/kg Chloral hydrate, IP)使老鼠安樂死，並待其四肢反射消失後沿著劍突將兩側腹腔及橫隔膜剪開，隨後平行剪開兩側胸骨露出心臟。插入 perfusion needle (18-G hypodermi needle)經大鼠左心室進入升主動脈 7-8 mm，以止血鉗固定鈍針尾端後，剪開右心房。準備 4°C 生理食鹽水利用蠕動幫浦帶動灌流並至流出之液體為澄清透明為止。

五、梗塞區域評估

大鼠犧牲後，取出腦組織並以大鼠專用切腦器(Slicer)切片。之後浸泡於2 % 2,3,5-Triphenyl-2H-tetrazolium chloride (TTC)，於37°C下作用30分鐘。再以影像分析系統軟體(Image Pro-Plus 6.0)計算其中風梗塞區域。當大鼠大腦切片經TTC作用時，梗塞部位呈白色，正常組織呈桃紅色，紀錄其正反面梗塞面積及總面積，先將正反面梗塞面積加總後再除以總面積之方法，計算出大腦梗塞部位佔整個腦部之百分比。

六、組織病理學染色

1、石臘切片前處理

大鼠注射過量麻醉藥後，先以 4°C 生理食鹽水利用蠕動幫浦帶動灌流至液體為澄清，在置換 4% Paraformaldehyde/ 0.1 M Phosphate buffer (PB buffer)使組織固定，取出腦組織用 Slicer 切片。將腦組織切片浸泡於 4% PB buffer，24 小時後，依序進行脫水、包埋、切片之步驟。

2、H&E 染色步驟

石臘切片溶劑二甲苯(Xylene)分別放入 65°C 烘箱進行 15 分鐘預熱，預熱完後將石臘切片浸泡 65°C Xylene 作用 5 分鐘，然後再置換於 25°C Xylene，5 分鐘，進行脫臘。用以 100%、95% 的連續酒精分別各浸泡 3 分鐘，2 次，進行復水。再以流水清洗 1 分鐘，以 Hematoxylin 染色 3 分鐘後用流水清洗 30 秒。接著以 95% 酒精浸泡 30 秒，用 Eosin 染色 3 分鐘後用流水清洗 30 秒。之後再以 95%酒精浸泡 1 分鐘，2 次。之後用 100%酒精浸泡 30 秒鐘，2 次，進行脫水。再浸泡 Xylene 3 分鐘，2 次。其後以阿拉伯膠進行封片用正立光學顯微鏡(Carl Zeiss-JENAMED2)鏡檢並觀察其組織病理學。

七、免疫螢光染色

1、冷凍切片前處理

大鼠注射過量麻醉藥後，先以 4°C 生理食鹽水利用蠕動幫浦帶動灌流至液體為澄清，再置換 4% PB buffer 灌流至肢體完全僵硬，取出腦組織並以 Slicer 切片。接著將腦組織切片浸泡於 4°C 之 4% PB buffer，4 小時。再以 4°C 之 30% sucrose/0.1M Phosphate buffer，靜置 24 小時(至少 16 小時，待腦組織沉降到底部；過程中需更換新鮮 30% sucrose/0.1 M PB)，進行脫水。當脫水完全後將腦組織移至自製鋁箔盒加入 Optimal Cutting Temperature (OCT) 浸泡，靜置 24 小時。再用液態氮快速冷凍約 30 秒(勿使組織塊完全冷凍，僅 2/3 部分即可，避免組織塊碎裂)，之後於 -70°C 保存，放入冷凍切片機(LEICA CM 3050S)降溫至 -20°C 約 2 小時，再調整冷凍操作室溫度(CT): -20°C，標本夾頭溫度(OT): -18°C 條件下進行切片，切片厚度約 10 μm。

2、染色步驟

(1) 一般染色

將冷凍切片放置室溫風乾 2 小時後，用以 PBS-T (含 0.5% Tween 20) 清洗 5 分鐘，2 次。利

用 PAP pen 將組織圈選起來，之後加入 0.5% Triton X-100 作用 10 分鐘。再用 PBS-T 清洗 5 分鐘，2 次。洗淨後加入 5% BSA blocking 30 分鐘，之後加入一級抗體，放置 4°C 作用 24 小時，然後用 PBS-T 清洗 5 分鐘，3 次。接著加入含有 FITC 標記之二級抗體，避光進行 1 小時之反應。用以 PBS-T 清洗 5 分鐘，2 次。其後加入 Hoechst 33342 避光進行 3 分鐘之反應，用 PBS-T 清洗 5 分鐘，2 次。最後用冷凍切片專用封片膠進行封片，利用螢光顯微鏡 (Nikon ECLIPSE TE2000-U) 鏡檢並觀察。

(2) TUNEL 染色

將冷凍切片放置室溫風乾 2 小時後，用以 PBS 清洗 5 分鐘，3 次。利用 PAP pen 將組織圈選起來，之後加入 20 μ g Proteinase K/10 mM Tris/HCl，作用 30 分鐘。作用完直接倒掉加入 Permeabilisation solution (含 0.1% 檸檬酸鹽、0.1% Triton X-100/50 ml ddH₂O) 反應 8 分鐘，再用 PBS-T 清洗 5 分鐘，3 次。洗淨後加入 5% 脫脂奶粉 blocking 30 分鐘，以 PBS 清洗 2 分鐘，1 次。之後加入 50 μ l TUNEL reaction buffer 及 50 μ l Label solution 放置於 60°C 烘箱中反應 60 分鐘。反應後以 PBS 清洗 5 分鐘，3 次。加入 DAPI 染劑，進行染色 10 分鐘，再以 PBS 清洗 5 分鐘，3 次。最後用冷凍切片專用封片膠進行封片，利用螢光顯微鏡 (Nikon ECLIPSE TE2000-U) 鏡檢並觀察。

八、西方轉漬法分析蛋白質表現量

1、組織前處理

大腦組織加入適量的 Tissue Protein Extraction Reagent (T-PER) 及 Proteinase、Serine-Threonine、Tyrosine phosphatase 之 inhibitor，之後置於冰上用小剪剪碎，再用搗棒搗至均勻。待組織無顆粒後，將蛋白萃取液靜置冰上反應 30~60 分鐘。反應完後，利用超音波震盪 2 次，隨後靜置 30 分鐘，達到完全萃取。再來用 12000 rpm 之轉速於 4°C 下進行離心 10 分鐘。隨後取出上清液，以相同條件再離心 1 次。而萃取出之蛋白液用以 Bio-Red Protein Assay 方法定量，先將蛋白萃取液適當稀釋後，取 1 μ l 加入 799 μ l ddH₂O 及 200 μ l Proteion dye 充分混合，以 595 nm 吸光下，偵測 OD 值，隨後再將 OD 值換算成實際濃度。

2、SDS-PAGE 分離不同蛋白質及其表現

取 50~150 μ g 之蛋白萃取液，用不同濃度之 SDS-PAGE 進行電泳加以分離。隨後將膠體上之蛋白質轉漬 PVDF 膜上，而 PVDF 膜用以 5% 脫脂奶粉 blocking 30 分鐘，再加入一級抗體作用 2 小時，後以 PBS-T 清洗 5 分鐘，3 次。充分清洗後，加入含有 Horseradish

peroxidase(HRP)標記之二級抗體，作用 1 小時，再以 PBS-T 清洗 5 分鐘，3 次。之後加入 Enhanced Chemiluminescent Substrate(ECL)之反應基質，進行壓片。

結果

腦缺血再灌流前後大鼠體重的變化

在正常情況下，大鼠隨著飼養的天數增加，體重會逐漸的上升。為了探討腦缺血再灌流傷害是否影響動物體重變化，腦缺血再灌流動物將在不同時間紀錄稱重。結果顯示：control 組和 sham 組動物隨著時間的增加體重逐漸的上升，在各個時間點比較下均有明顯的差異，且趨勢相同。在腦缺血再灌流後第 1 天，大鼠體重明顯下降至原先的 $90.3 \pm 1.5\%$ ；腦缺血再灌流後第 3 天大鼠體重為 $98.3 \pm 2.5\%$ ；腦缺血再灌流後第 7 天大鼠體重回升至 102.7% ，腦缺血後第 14 天體重則上升至 $116 \pm 4.4\%$ ，趨近於 control 組和 sham 組(圖三)。結果說明，腦缺血再灌流傷害後，大鼠體重均有下降的情形，但經由一段時間後，體重可慢慢回升。

評估腦缺血再灌流後梗塞面積

為了觀測腦缺血再灌流後大腦組織損傷的情形，腦缺血再灌流動物將在不同時間分離大腦組織，經由腦模將大腦切片，藉由 TTC 染色評估大腦梗塞面積。在腦缺血再灌流後，大腦無受損區為正常側，均呈現紅色染色情況(圖四 a)。於大腦受損區為梗塞側，顯示於腦缺血再灌流後第 1 天大腦皮質部及紋狀體都有明顯白色之梗塞現象，與其他時間比較後，腦缺血後第 1 天有最大的梗塞範圍及受損面積，估算高達 $39.5 \pm 9.4\%$ 。圖中顯示腦缺血再灌流後第 3 天發現白色梗塞範圍為 $35.1 \pm 9.2\%$ 。然而腦缺血再灌流後第 7 天梗塞面積下降為 $26.2 \pm 10.3\%$ 。腦缺血再灌流後第 14 天其梗塞面積降低為 $7.3 \pm 1.5\%$ (圖四 b)。由結果得知，在腦缺血再灌流傷害後，各個組別中大腦組織均有梗塞之現象。

腦缺血再灌流前後的行為變化

當大鼠腦部受損後神經細胞缺損嚴重，會造成許多機能失調，如語言障礙、四肢協調性降低等。實驗藉由 Open Field 方法分析大鼠行為活動力、瞬間移動能力及腦部受損後向對側偏轉的程度，來初步評估大鼠腦損傷程度。

1. 大鼠活動能力

1-1 總移動距離

腦缺血再灌流後第 1 天及第 3 天，大鼠活動能力低於對照於 control 組和 sham 組，分別為 3176.9 和 3957.6 cm。在腦缺血再灌流後第 7 天，大鼠活動能力增加，甚至在腦缺血再

灌流後第 14 天活動能力較 control 組和 sham 組高(圖五 a)。

1-2 瞬間最大移動距離

Control 組和 sham 組比較下，顯示 control 組瞬間移動的能力較 sham 組高，但無明顯的差異。而腦缺血再灌流後第 1 天、第 3 天、第 7 天、第 14 天，顯示出大鼠瞬間移動的能力皆明顯下降，移動的能力較 control 組和 sham 組差(圖五 b)。

1-3 平均速率

Control 組和 sham 組平均速率達 3.53 ± 0.1 cm/s 及 3.33 ± 0.3 cm/s，腦缺血再灌流後第 1 天，大鼠平均每秒移動的距離顯著低於 control 組和 sham 組，為 2.6 ± 0.3 cm/s。腦缺血再灌流後第 3 天大鼠平均速率增加。隨著天數增加大鼠的平均速率亦增加(圖五 c)。

1-4 運動時間佔所有觀測時間百分比

Control 組和 sham 組測試運動時間達 50 %左右。腦缺血再灌流後第 1 天及第 3 天，大鼠的運動時間顯著低於 control 組和 sham 組，分別為 47.6 ± 3.5 和 49.5 ± 4.0 %。然而腦缺血再灌流後第 7 天大鼠運動時間增加，腦缺血再灌流後第 14 天時運動時間較 control 組和 sham 組高(圖五 d)。

2. 大鼠行動過程中其旋轉的程度

大鼠在腦缺血後，於受損部位的對側立即會出現前肢萎縮、向對側旋轉之表徵。腦缺血再灌流後於第 1 天表現最為明顯，其總旋轉的角度大於 control 組和 sham 組。而在腦缺血再灌流後第 7 天及第 14 天後大鼠旋轉角度也有增加的現象(圖五 e)。在行為分析的結果顯示，大鼠在腦缺血再灌流傷害後，其活動能力均有下降的情形以及旋轉的角度異常的增加。

腦缺血後組織病理學之變化

在腦缺血時，因腦部的缺氧狀態，造成大多數的神經元細胞型態上會呈現皺縮和多角形的改變。為了觀測腦缺血再灌流後大腦皮質部、海馬迴與紋狀體神經元細胞的型態改變，腦缺血再灌流動物將在不同時間分離大腦組織，收取石臘切片，藉由 H&E 染色觀察細胞型態上的變化。在腦缺血再灌流後可發現大腦正常側神經元細胞，型態呈圓形，細胞核清晰可見，屬於腦部型態最大的細胞。於腦缺血再灌流後第 1 天大腦皮質部與紋狀體梗塞側神經細胞嚴重變形且多數神經膠細胞已萎縮(圖六 a)，隨著天數的增加，大腦皮質部與紋狀體梗塞側腦組織呈現空腔型態，許多細胞已死亡。然而在腦缺血再灌流後大腦海馬迴梗塞側於型態上變化幅度較腦皮質部與紋狀體梗塞側小，其在腦缺血再灌流後第 3 天及第 7 天大

腦海馬迴梗塞側 CA1、CA2、CA3、DG 之結構中，發現神經元細胞有部份萎縮及呈現多角形態(圖六 b~c)。結果顯示，腦缺血再灌流傷害後可造成大腦皮質部、海馬迴與紋狀體組織細胞的損傷。

腦缺血再灌流傷害後星狀神經膠細胞及免疫細胞之變化

在神經損傷的情況下，星狀神經膠細胞會被活化，進行再生且大量增殖(Nedelcu et al., 1999)以及發炎反應後免疫細胞的浸潤。為了觀測腦缺血再灌流後大腦皮質部、海馬迴與紋狀體星狀神經膠細胞的活化及大腦皮質部與紋狀體內部免疫細胞之變化，腦缺血再灌流動物將在不同時間分離大腦組織，收取冷凍切片，藉由免疫螢光染色法，分別利用 GFAP、Neutrophil、CD68、CD19 抗體觀察星狀神經膠細胞、嗜中性白血球、巨噬細胞及 B 細胞分布的情形。於圖中可見，腦缺血再灌流後大腦皮質部、海馬迴及紋狀體正常側星狀神經膠細胞，型態呈現短突觸，細胞核及細胞構體小。相對的，在腦缺血再灌流後第 1 天大腦皮質部、海馬迴及紋狀體梗塞側星狀神經膠細胞明顯的消失，隨著腦缺血天數的增加可發現大腦皮質部梗塞交界處和海馬迴及紋狀體區域星狀神經膠細胞變得腫脹、突觸變長變粗且細胞變大變多，呈現出活化增生的現象(圖七 a~c)。

由於腦缺血再灌流後，腦組織會有發炎反應的產生，因而造成免疫細胞的浸潤，如嗜中性白血球及巨噬細胞。在腦缺血再灌流後大腦皮質部與紋狀體正常側在各個組別並無觀察到嗜中性白血球。但於腦缺血再灌流後大腦皮質部與紋狀體梗塞側第 1 天與第 3 天觀察到有嗜中性白血球浸潤的現象，且於腦缺血再灌流後第 7 天及第 14 天，嗜中性白血球數目明顯降低(圖八)。然後於腦缺血再灌流後第 3 天才發現有巨噬細胞的浸潤，且在腦缺血再灌流後第 14 天巨噬細胞數目最多(圖九)。另一方面，因 B 細胞在免疫反應扮演重要之角色，可調控體液與細胞性免疫防護，所以藉由腦缺血再灌流的動物模式下觀測其腦組織中的變化。在腦缺血再灌流後第 1 天大腦皮質部與紋狀體梗塞側已有發現 B 細胞出現在腦組織。然而在腦缺血再灌流後第 3 天及第 7 天大腦皮質部梗塞側可觀察到 B 細胞的數目有逐漸增多的現象，而大腦紋狀體則是在腦缺血再灌流後第 7 天及第 14 天 B 細胞的數目較多(圖十)。於結果中得知，腦缺血再灌流傷害後於大腦皮質部、海馬迴與紋狀體均有觀測到星狀神經膠細胞於腦組織間活化表現的情形以及免疫細胞的浸潤。

腦缺血再灌流後利用 TUNEL 染色觀察細胞凋亡情形

當細胞凋亡發生時，特定酵素會將 DNA 切成片段，造成細胞死亡。利用含螢光標記 terminal transferase 去辨認被切割的缺口確認及觀察細胞凋亡的發生。腦缺血再灌流動物將在不同時間分離大腦組織，收取冷凍切片，藉由 TUNEL 染色法觀測腦組織細胞凋亡的情形。圖中顯示，於腦缺血再灌流後大腦皮質部、海馬迴與紋狀體梗塞側均有細胞凋亡的現象。於大腦皮質部梗塞側發現腦缺血後第 7 天有多數的細胞凋亡，且於腦缺血再灌流後第 14 天時細胞凋亡數目最多。而大腦海馬迴與紋狀體梗塞側的結果和大脑皮質部相同，隨著腦缺血再灌流後的天數增加，呈現 TUNEL 之陽性反應細胞數目越來越多(圖十一 a~c)。結果顯示，腦缺血再灌流傷害後於大腦皮質部、海馬迴與紋狀體都有觀測到細胞凋亡的情形。

腦缺血再灌流後偵測大腦皮質部 NeuN、GFAP、NF-L 與 NF-M 的表現

腦組織中分佈許多的神經元細胞、星狀神經膠細胞及神經纖維絲。為了觀測腦缺血再灌流後大腦皮質部梗塞側神經細胞受損情形、星狀神經膠細胞的活化以及細胞架構的崩解，腦缺血再灌流動物將在不同時間分離大腦皮質組織，萃取蛋白質，藉由西方轉漬法量以及分別用 NeuN、GFAP 抗體偵測其神經元細胞、星狀神經膠細胞和利用 NF-L、NF-M 抗體分析神經纖維絲不同 isoform 的蛋白質表現。結果顯示，在腦缺血再灌流後大腦皮質部正常側神經元細胞表現無明顯變化。但於大腦皮質部梗塞側，隨著天數增加，神經元細胞的表現顯著性降低。另外，在腦缺血再灌流後第 3 天發現大腦皮質部梗塞側星狀神經膠細胞表現有增加的情形，且於腦缺血再灌流後第 14 天表現量最高。另一方面，於腦缺血再灌流後大腦皮質部正常側中，神經纖維絲不同 isoform 的蛋白質表現維持正常之表現各組別間無差異。然而腦缺血再灌流後第 1 天大腦皮質部梗塞側發現，神經纖維絲 S form 和 L form 蛋白質表現均顯著降低，依據時間的增加亦相同之情況，且具有顯著性的差異(圖十二)。結果指出，腦缺血再灌流傷害後會影響神經元細胞、星狀神經膠細胞及神經纖維絲 S form 和 L form 等蛋白質表現。

腦缺血後發炎相關因子 COX-2 的蛋白質表現

COX-2 為誘導型環氧酵素，當 COX-2 大量表現時會催化前列腺素 PGE2 的產生，引起嚴重的發炎反應。實驗中，以 COX-2 的表現為腦缺血再灌流後發炎程度的指標。腦缺血再灌流動物將在不同時間分離大腦皮質組織，萃取蛋白質，藉由西方轉漬法量利用 COX-2 專一性抗體偵測其表現的表現。結果發現腦缺血再灌流後大腦皮質部正常側與梗塞側均有測

出 COX-2 表現上升，其量化後大腦皮質部正常側於腦缺血後變化幅度不大，且無增加的趨勢。在對比下結果顯示，大腦皮質部梗塞側於腦缺血後第 1 天大幅的增加，直到第 3 天仍有較大腦皮質部正常側高的趨勢。但腦缺血再灌流後第 7 天及第 14 天 COX-2 表現量降低(圖十三)。結果可知，腦缺血再灌流傷害後會增加 COX-2 的表現。

腦缺血再灌流傷害後分析細胞凋亡相關因子的表現

在腦缺血後，所引發的細胞凋亡，其發生之過程可能循多種途徑，如獨立的進行或是不同途徑之間相互的影響等(Liou et al., 2003)。由大鼠之中央大腦動脈梗塞動物模式下，模擬局部性腦缺血，分析大腦皮質部梗塞側細胞凋亡情形，並探討由半胱氨酸蛋白酶依賴性及半胱氨酸蛋白酶非依賴性兩個途徑之調節。藉由偵測途徑中所參與之分子的蛋白質表現，探討這些分子對於大腦缺血後所造成的影響。

1-1 外源性細胞凋亡相關因子之表現

外源性細胞凋亡主要是死亡受體傳遞細胞凋亡的訊息，與配體、接受器結合半胱氨酸蛋白酶激酶的活化，促使細胞凋亡。為探討外源性細胞凋亡因子是否會影響腦缺血再灌流所誘發的細胞凋亡，腦缺血再灌流動物將在不同時間分離大腦皮質組織，萃取蛋白質，藉由西方轉漬法量 TNF- α receptor 1、Fas、TNF- α 、FADD、Bid 等蛋白質表現。在腦缺血再灌流傷害後，結果顯示大腦皮質部正常側，TNF- α 與 Fas 於各個組別之分析下無明顯的變化。但在腦缺血再灌流後大腦皮質部梗塞側發現隨著時間的增加 TNF- α receptor 1、Fas 以及 TNF- α 表現量均有顯著性的差異。另外，於 FADD 的分析中，於腦缺血再灌流後第 1 天大腦皮質部梗塞側有增加的趨勢，且與其他組別比較有較高的表現量。相對的，於腦缺血再灌流後大腦皮質部梗塞側 Bid 表現在各個組別也具有顯著性的差異(圖十四 a~d)。其結果表示，腦缺血再灌流傷害後可發現 TNF- α receptor 1、Fas、TNF- α 、FADD、Bid 等外源性細胞凋亡相關因子表現的情形。

1-2 抗細胞凋亡蛋白之表現

於細胞凋亡發生過程中，某些分子則是有利於細胞的生存，如抗細胞凋亡之蛋白分子 FLIP。為了解 FLIP 是否會影響腦缺血再灌流所誘發的細胞凋亡，腦缺血再灌流動物將在不同時間分離大腦皮質組織，萃取蛋白質，藉由西方轉漬法量測 FLIP-S 與 FLIP-L 之不同

isoform 蛋白質表現。在結果中發現，在腦缺血再灌流後大腦皮質部正常側變化程度不大。然而腦缺血再灌流後第 1 天和第 3 天，大腦皮質部梗塞側可發現 FLIP-S 及 FLIP-L 表現量均有顯著性增加。但於腦缺血再灌流後第 7 天與第 14 天大腦皮質部梗塞側與正常測之間差異並不顯著(圖十五 a~b)。結果顯示，腦缺血再灌流傷害後可發現 FLIP-S 及 FLIP-L 表現。

1-3 內源性細胞凋亡相關因子的表現

此途徑細胞凋亡不受死亡受體調控，其本身就具有能力並足夠來執行細胞死亡。為探討內源性細胞凋亡相關因子是否參與腦缺血再灌流所誘發的細胞凋亡，腦缺血再灌流動物將在不同時間分離大腦皮質組織，萃取蛋白質，藉由西方轉漬法量測內源性細胞凋亡相關因子 Bcl-2、Bcl-xL、Bad、Bax 等蛋白質表現。在分析中顯示抗細胞凋亡因子 Bcl-2、Bcl-xL 在腦缺血再灌流後大腦皮質部正常側表現無明顯變化，但在腦缺血再灌流後第 3 天可發現大腦皮質部梗塞側 Bcl-2 表現量明顯降低。而 Bcl-xL 的部分，發現腦缺血再灌流第 1 天大腦皮質部梗塞側表現量增加，但於腦缺血再灌流後第 3 天、第 7 天、第 14 天對照大腦皮質部正常側下並無明顯差異。此外，在細胞凋亡因子 Bad、Bax 方面，可發現腦缺血再灌流後大腦皮質部正常側 Bad、Bax 差異性不大，相對於腦缺血再灌流後大腦皮質部梗塞側在各個組別表現量皆有上升的趨勢(圖十六)。由結果可知，腦缺血再灌流傷害後可促進抗細胞凋亡因子 Bcl-2、Bcl-xL 以及細胞凋亡因子 Bad、Bax 的表現。

1-4 轉錄因子調控之表現

當致癌基因活化、缺氧和 DNA 損傷都會激發 p53 轉錄因子使 cell cycle 停止和引起細胞凋亡。為探討 p53 是否參與腦缺血再灌流所誘發的細胞凋亡及影響下游分子 PUMA 的表現，腦缺血再灌流動物將在不同時間分離大腦皮質組織，萃取蛋白質，藉由西方轉漬法量測 p53 及 PUMA 表現情形。當大鼠經腦缺血再灌流傷害後，不同組別動物大腦皮質部梗塞側 p53 表現量增加，且在腦缺血再灌流後第 1 天大腦正常側與梗塞側差異性最大。在於腦缺血後第 3 天有下降的情況但表現仍較於大腦皮質部正常側高。另一方面，PUMA 在腦缺血再灌流後於各個組別大腦皮質部正常側表現量並不明顯。但在腦缺血再灌流後可發現大腦皮質部梗塞側 PUMA 的表現量會隨著腦缺血再灌流後時間的增加，有顯著性上升的情形。而在腦缺血再灌流後第 14 天則無明顯變化(圖十七)。由結果顯示，腦缺血再灌流傷害後細胞凋亡之轉錄因子的調控 p53 和 PUMA 皆有所表現。

1-5 細胞凋亡誘導因子 AIF 的蛋白質表現

細胞凋亡廣大路徑的調控下，有一群分子是不需要依賴半胱胺酸蛋白酶的活化，自行可發起凋亡訊息，快速而且造成大規模的傷害，如細胞凋亡誘導因子(apoptosis inducing factor, AIF)。為探討 AIF 是否參與腦缺血再灌流所誘發的細胞凋亡，腦缺血再灌流動物將在不同時間分離大腦皮質組織，萃取蛋白質，藉由西方轉漬法量測 AIF 表現情形。當大鼠經腦缺血再灌流傷害後，不同組別動物大腦皮質部正常側 AIF 表現量沒有明顯變化。然而大腦皮質部梗塞側可發現 AIF 表現量皆有增加的現象，並且在腦缺血再灌流後第 3 天與第 14 天 AIF 上升趨勢差異最大(圖十八)。由此可知，在腦缺血再灌流傷害後會增加 AIF 蛋白質表現。

腦缺血再灌流傷害後大腦皮質部 Caspase 3、Caspase 8 及 Caspase 9 的活性分析

Caspase 為半胱胺酸蛋白激酶，在細胞凋亡路徑中 Caspase 3、Caspase 8 及 Caspase 9 扮演調控之重要角色。為了探討 Caspase 3、Caspase 8 及 Caspase 9 是否參與腦缺血再灌流所誘發的細胞凋亡，腦缺血再灌流動物將在不同時間分離大腦皮質組織，萃取蛋白質，藉由免疫螢光法量測 Caspase 3、Caspase 8 及 Caspase 9 的活化情況。在結果中，腦缺血再灌流傷害後第 1 天，大腦皮質部梗塞側 Caspase 3 活化情況明顯上升。於腦缺血再灌流後第 7 天表現最高。在腦缺血再灌流後第 14 天，Caspase 3 則呈現下降趨勢。另外，Caspase 8 與 Caspase 9 的活化表現中，顯示腦缺血再灌流後第 1 天，大腦皮質部梗塞側明顯的上升，且為最高峰，但隨著處理的時間拉長，Caspase 8 與 Caspase 9 的活化表現有降低的情況(圖十九)。在數據中顯示，腦缺血再灌流傷害後，可發現 Caspase 3、Caspase 8 及 Caspase 9 等半胱胺酸蛋白激酶的活化表現。

討論

腦缺血俗稱為腦中風(stroke)是國人常見的疾病之一，本論文利用大鼠模擬缺血性腦損傷，探討腦缺血後大鼠大腦內部細胞型態改變及細胞凋亡的情形。在動物實驗中，將體重之觀測視為一個基礎的指標，藉由體重的變化推測動物生理代謝及組織損傷的情形。腦缺血再灌流後，正常大鼠隨著飼養天數增加及適應度提升下，可有正常的飲食、生理代謝且具有活力及精神。僅麻醉和切開頸部無腦缺血處理之假手術組，體重增加的情況較正常大鼠慢，顯示出僅麻醉和切開頸部仍會影響大鼠對於環境的適應性，可能需要一段時間修復，才可像正常大鼠一樣，有較大的體重變化。而腦缺血後第 1 天體重急速下降(圖三)。在實驗過程中也發現，大鼠於腦缺血後第 1 天體重下降程度似乎與梗塞面積有正相關。尤其當大鼠體重下降為原體重百分之五時手術成功率非常的高。據文獻指出，腦中風之患者以體重下降程度作為中風之預後評估，當體重下降的程度越大，代表患者在預後的狀況不佳(Jonsson et al., 2008)。雖然有此依據，但腦缺血後體重急速下降的原因尚未明瞭，此現象推測可能是因手術過程造成大鼠極度的疼痛以及不舒服影響大鼠腦缺血後的體重。

大鼠在術後藉由 TTC 染色評估大腦梗塞面積情形。其原理為正常細胞呼吸作用下，粒線體內膜氧化酵素可與 TTC 染劑作用，經還原形成脂溶性紅色 formazan。另外，觀察組織細胞死亡程度時，除了 TTC 染色外，同時會利用 H&E 染色組織病理學觀察，透過組織外部及內部細胞型態，觀測腦缺血再灌流後，腦組織損傷的情況。在腦缺血再灌流的處理下，正常的腦組織呈現出鮮豔的紅色；受損的腦組織呈現出白色，代表組織內的細胞已受到破壞，粒線體無完整的膜和氧化系統，導致呼吸作用無法正常運作，故 TTC 染劑無法反應(Altman, 1976)。於大鼠在腦缺血再灌流後第 1 天，大腦皮質部及紋狀體都有明顯梗塞的現象，經由估算後其梗塞面積最大，隨著腦缺血再灌流後的時間增加，梗塞面積逐漸縮小，類似損傷後腦組織漸漸回復之現象(圖四)。對照於 H&E 染色，發現在大腦皮質部及紋狀體神經元細胞有變性萎縮的情況，隨著腦缺血再灌流後的時間增加，病灶區因液化性壞死嚴重，大量巨噬細胞浸潤，吞噬受損及死亡之細胞，造成腦組織呈現多處空腔現象(圖六)。於實驗中發現 TTC 染色與 H&E 染色內部細胞型態表現不同，據文獻指出，在腦部損傷後巨噬細胞的浸潤時，會將完整的粒線體聚集腦部受損區域，導致 TTC 染色結果有粉紅色類似組織修復情形(Liszcak et al., 1984)。實際上，腦缺血再灌流後第 1 天內部細胞型態已經發生變化，其腦缺血再灌流後的時間增加組織受損更嚴重。

腦缺血再灌流後因腦組織神經元細胞的嚴重缺損，導致動物的活動能力下降。利用 Open Field 測試大鼠的行為表現，探討大鼠在腦缺血再灌流後是否因為腦組織某區域內神經元細胞的死亡程度，行為表現上有所變化。研究指出，腦缺血再灌流後動物的活動能力降低、四肢協調性不佳、並有偏單向旋轉的情形。實驗結果顯示，腦缺血再灌流後第 1 天、第 3 天大鼠移動能力以及運動時間均有降低的現象，但隨著時間的增加，大鼠行動能力有明顯的回升(圖五)。以上結果得知，行為的改善並未與組織病理相同，可能因大鼠功能性的代償或復原作用，造成行為恢復的現象(DeVries et al., 2001)。然而大鼠在旋轉角度的測試中，發現長時間的修復期，旋轉角度越來越明顯，可能是大腦某區域的神經元細胞死亡嚴重，導致大鼠在行為中有所異常，且不是短期之內可以進行修復的。

在腦缺血再灌流後，為偵測大腦發炎的程度，利用免疫螢光分析法觀察組織病理切片嗜中性白血球、巨噬細胞、B 細胞浸潤的情形，並以量測發炎因子 COX-2 的蛋白質表現。從結果中顯示，嗜中性白血球會在腦缺血再灌流後前期出現(圖八)；巨噬細胞、B 細胞會在腦缺血再灌流後中後期出現(圖九、圖十)。於發炎反應時，嗜中性白血球為免疫防禦系統中的第一線細胞，能有效的快速到達損傷區抑制外源性感染物質的侵入並吸引更多其他的白血球至缺血區域(Buck et al., 2001)。然而於腦缺血再灌流後中後期，可以發現大量的單核球及遷移至腦組織梗塞部位，慢慢轉化似巨噬細胞的功能及活性，以吞噬及殺菌的方式，來對抗感染物質(Grau et al., 2001)。相對的在 COX-2 的表現，則是在腦缺血再灌流後第 1 天、第 3 天明顯的增加(圖十三)。有文獻指出，常態下 COX-2 表現極少量，透過發炎反應刺激，於 2-4 小時後可發現 COX-2 大量表現，並催化前列腺素 PGE2 的產生，可引起更嚴重的發炎反應(Reddy et al., 1997)。

另一方面，腦組織中，分佈許多的神經細胞、星狀神經膠細胞及神經纖維絲。於腦缺血再灌流後可觀察到大腦皮質部梗塞側，隨著腦缺血再灌流後的天數增加，神經元細胞表現明顯降低，顯示多數神經元細胞已死亡(Benveniste, 1991)。而探討細胞架構損傷以大腦中的神經纖維絲為主，神經纖維絲為神經元細胞的骨架蛋白，扮演維持神經元細胞架構之角色(Morris and Lasek, 1982; Hoffman et al., 1984)。當腦缺血再灌流後，神經纖維絲不同之構體 NF-L 及 NF-M，跟神經元細胞相同都有被破壞的情形。文獻指出，腦組織受到迫害時，神經纖維絲亦會被活化的蛋白酶分解，以致神經元細胞架構的崩解(Hayes et al., 1995; Posmantur et al., 1994) (圖十二)。除了神經元細胞的損傷，星狀神經膠細胞在腦缺血再灌流後大腦梗塞側中心區域也有死亡的現象，但在於梗塞側的周邊，有許多的星狀神經膠

細胞大量聚集，且型態變粗大，突觸變長，型態呈現活化之狀態(圖七)。雖然有研究指出，星狀神經膠細胞對於腦缺血後神經元細胞具有保護及調節離子恆定、調控細胞外麩胺酸濃度的功能(Trendelenburg and Dirnagl, 2005)並釋放促進神經再生的生長因子(Song et al., 2002)。但在腦缺血再灌流後，神經元細胞損傷並無減輕的現象，這可能因星狀神經膠細胞的大量增生所形成的膠質疤有關，當膠質疤形成後可阻斷中樞神經系統內在的修護功能(Ransom, 2003)，使梗塞區域的神經無法再生(Anderson et al., 2003)，才會無法挽救腦缺血損傷後所造成神經元細胞的死亡。

當腦缺血再灌流後，大腦皮質部梗塞側中心區損傷最嚴重，多數神經元細胞因而死亡。於細胞壞死的組織，已無法修補，為不可逆性傷害。因此，希望挽救在梗塞中心區周邊腦組織，即正常腦組織及壞死腦組織交界正在進行細胞凋亡神經元細胞，於腦缺血/再灌流動物實驗模式下，探討腦損傷後其細胞凋亡的原因和機制。細胞凋亡一旦發生，在典型的特徵下可以發現 DNA 斷裂的情形，實驗過程中以 TUNEL 染色法標的細胞凋亡之情形，結果發現腦缺血再灌流後大腦皮質部、海馬迴與紋狀體，許多細胞都具陽性反應(圖十一)。然而於腦缺血損傷中後期細胞凋亡數目最多，且可以看見細胞核凝聚和凋亡小體的產生。證明腦缺血再灌流的處理下，腦組織中確實有細胞凋亡的現象。而細胞凋亡可受到半胱胺酸蛋白酶外源性及內源性路徑及其他因子的調節，首先，在外源性因子調控的路徑中，主要以細胞膜表面的細胞死亡受體 TNF- α receptor 1、Fas 與配體結合，如 TNF- α receptor 與 TNF- α 。接續傳遞細胞凋亡的訊息並與 FADD 形成 DISC 複合體，誘發 caspase 8 的活化，使下游 Bid 被切割，以 tBid 形式轉移至粒線體，促進細胞色素 c 的釋放(Luo et al., 1998)以及 caspase 3 的活化(Scaffidi et al., 1998)，導致細胞凋亡。結果顯示，在腦缺血再灌流傷害後，大腦皮質部梗塞側發現，隨著處理時間的增加 TNF- α receptor 1、Fas 以及 TNF- α 表現量均有顯著性的上升。另外，於 FADD 的分析中，於腦缺血再灌流後第 1 天大腦皮質部梗塞側有增加的趨勢最大。相對的，Bid 表現在各個組別也具有顯著性的差異(圖十四)。於目前已有許多研究及數據證實，腫瘤壞死因子家族死亡受體與腦損傷有密切的關係(Albensi and Mattson, 2000)。在腦缺血後，亦可發現細胞凋亡 TNF- α /TNF- α 、FasL/Fas 的表現(Martin-Villalba et al., 1999)。而 FADD 死亡區域與 caspase 8 的活化有關聯，在腦缺血在灌流後的損傷，FADD 可激活並增加 caspase 8 的表現。(Benchoua et al., 2001; Morita-Fujimura et al., 2001)。當 caspase 8 活化後，使 Bid 被切割轉移至粒線體外膜，引起細胞的凋亡。所以在某些研究中 Bid 被認為是腦缺血後引發神經元細胞死亡的關鍵因素(Xiao-Ming Yin et

al., 2002)。此外，近來的文獻指出，於新生兒缺血窒息腦損傷中發現 FLIP 因子為抗細胞凋亡之重要調解者(Mark et al.2008)，在 Fas/CD95 signal 之細胞凋亡傳導路徑，FLIP 可抑制 Fas/CD95 死亡訊號的傳遞，作用方式為結合 pro-caspase 8，干擾切割，使得接下來一連串的 caspases 都無法被活化，停止細胞凋亡(Bertin et al. 1997)，確定的是 FLIP-S 可以以競爭的方式阻擋 caspase 8 與 FADD 的連結，但 FLIP-L 是否具有抑制或促進細胞凋亡的能力，仍在模糊地帶。在結果中顯示，腦缺血再灌流後第 1 天和第 3 天，大腦皮質部梗塞側可發現 FLIP-S 及 FLIP-L 表現量均有顯著性增加(圖十五)。因目前對於腦缺血再灌流後 FLIP 表現並沒有被證實，所以推測在腦損傷的情況下，FLIP 在死亡受體所調節的凋亡路徑中，亦會增加表現，扮演細胞生與死的平衡者。另外，內源性途徑(intrinsic pathway)也是細胞凋亡重要之調控路徑，此途徑細胞凋亡並不依賴受體，且本身就具有能力並足夠來執行細胞死亡。發生地點通常以粒線體為中心，且分別受到粒線體和細胞核內部轉錄因子 p53 的調控。於粒線體之途徑啟動半胱氨酸蛋白酶的活化，主要由 Bcl-2 家族蛋白主導(Gross et al., 1999)。Bcl-2 是從濾泡性淋巴細胞瘤中分離出來的一種癌基因。它和 Bcl-xL 都可阻斷細胞凋亡而促進細胞的存活。而 Bax、Bad 與 Bcl-2、Bcl-xL 功能相反，為誘導細胞凋亡。然而 Bcl-2 和 Bax 的表達強度決定細胞生死，Bax 過度表現時則促進細胞凋亡，若 Bcl-2、Bcl-xL 表現強於 Bax、Bad 則促進細胞生存。在結果中，抗細胞凋亡因子 Bcl-xL 的部分，在腦缺血再灌流第 1 天其表現量有增加的趨勢。但腦缺血再灌流後第 3 天 Bcl-2、Bcl-xL 表現皆明顯降低。然而細胞凋亡因子 Bax、Bad 於腦缺血再灌流後第 1 天、第 3 天表現量顯著性的增加，為缺血期間中表現量最高，於腦缺血再灌流後第 7 天、第 14 天，仍有明顯的表現(圖十六)。顯示腦缺血再灌流後，Bax、Bad 的表現高於 Bcl-2、Bcl-xL，雖然 Bcl-xL 試圖表現，但仍不敵 Bax、Bad 的過度表現。目前已有研究提出，Bad 可結合 Bcl-2、Bcl-xL 阻擋其作用，且當細胞接收到生長因子的訊息時，會轉移至粒線体外膜促使細胞凋亡(Chen L et al., 2005)。另外，Bax 也可與 Bcl-2 結合抑制其作用(Marsden VS et al., 2003)。在 Bcl-2 家族中，PUMA 之凋亡因子也參與其中，它位於 p53 轉錄因子的下游。p53 與 PUMA 的調控主要會引起 DNA 的損傷(Villunger A et al., 2003)。在結果中，腦缺血再灌流後 p53 與 PUMA 隨著天數增加，表現量也提升，呈現相對的關係(圖十七)。代表著腦缺血再灌流後，細胞核內部受到迫害時轉錄因子也會發起作用引起細胞凋亡。另一方面，細胞凋亡路徑中，自行可發起凋亡訊息，快速而且造成大規模的傷害，如細胞凋亡誘導因子(apoptosis inducing factor, AIF)。於腦缺血再灌流後發現 AIF 表現量皆有增加的現象(圖十八)。當細胞凋亡發生時，

AIF 的表現會讓細胞膜外翻暴露於細胞外、細胞核濃縮、大規模 DNA 斷裂以及促使粒線體釋放細胞色素 c 至細胞質，引發更嚴重的細胞凋亡(Ferri et al., 2000; Susin et al., 1999)。

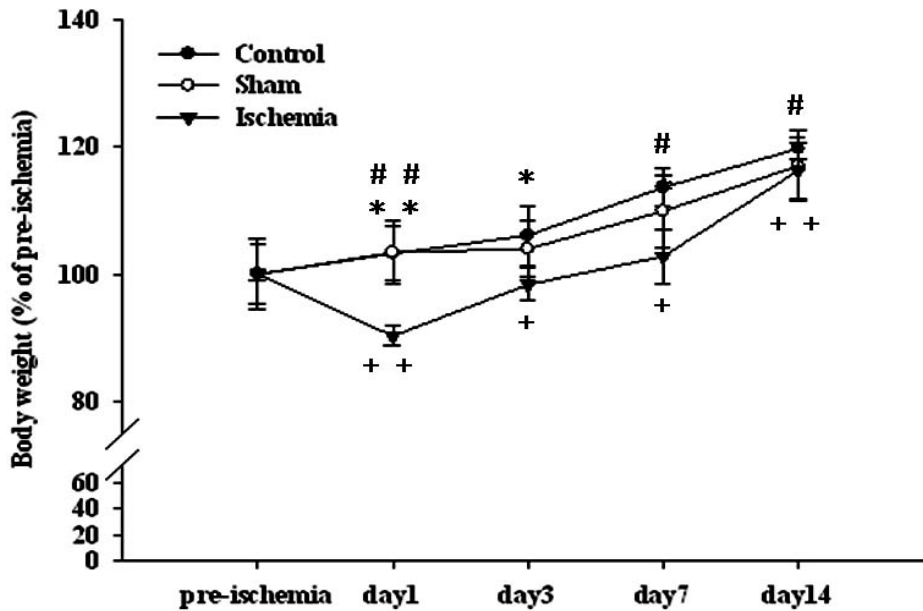
細胞凋亡廣通路徑的調控下，許多分子的表現亦會影響細胞的存活，然而在結果中顯示，促進細胞凋亡的因子皆有顯著的表現，以致於再腦缺血再灌流後神經元細胞及其他的細胞大量死亡的原因之一。在細胞凋亡之時，在半胱胺酸蛋白酶的部分有三個重要的調控者，包含 caspase 3、caspase 8、caspase 9。三者在此細胞凋亡調控中，分別扮演不同的角色，caspase 3 為引起細胞凋亡的最終者，接受許多路徑所傳遞下來的死亡訊息；caspase 8 為引起細胞凋亡的起始者，接受外源性途徑之死亡受體的死亡訊息；caspase 9 為引起細胞凋亡的影響者，接受粒線體途徑所釋放的細胞色素 c，與 Apaf-1 蛋白形成凋亡小體(Acehan, 2002)。在結果發現，caspase 8、caspase 9 的活化表現皆在腦缺血再灌流後第 1 天，有明顯增加的情況。隨後在腦缺血在灌流後第 1 天、第 7 天、第 14 天則顯著下降(圖十九)。在 James J 實驗顯示，確實發現在腦缺血再灌流後，caspase 8 於第 1 天為高峰期，在後期時 caspase 8 的表現皆下降(James J et al., 1999)，與結果相符。caspase 9 的活化目前推測與凋亡小體(Acehan, 2002)有關，其不同時間的表現仍不清楚。在 caspase 3 結果中，活化情況明顯上升。於腦缺血再灌流後第 7 天表現最高。在腦缺血再灌流後第 14 天，Caspase 3 則呈現下降趨勢。再對照 James J 實驗顯示於腦缺血再灌流第 1 天為高峰期，在後期時 caspase 3 的表現皆下降。結果不同推測可能因老鼠品系的不同、手術引起大腦損傷的程度有所不同，造成的差異。

結論

腦中風又稱為腦缺血，是國人常見疾病之一。當腦缺血/再灌流時，炎症細胞及自由基的釋放漸進性刺激造成腦部大規模的傷害，導致神經元細胞延遲性死亡，細胞變性和壞死，大腦功能區的機能喪失。目前得知腦中風後，神經元細胞壞死之組織，已梗塞的區域，大多嚴重毀損，為不可逆性傷害。因此於腦缺血/再灌流動物實驗模式下，透過了解腦損傷後其細胞凋亡的原因和機制，希望拯救在核心區域周邊腦組織-缺血半月區，即正常腦組織及壞死腦組織交界正在進行細胞凋亡神經元細胞。在實驗中，藉由此動物模式觀測大腦缺血再灌流後其體重、行為、梗塞面積、組織病理、發炎因子及細胞凋亡訊號之變化情形。結果發現，腦缺血/血液再灌流後第 1 天其體重下降 5%、活動能力及肌肉協調性明顯降低且大腦梗塞面積高達 35%以上，於第 3~14 天修復期則有明顯回升及恢復之情形。利用組織病理切片中得知大腦皮質部神經細胞細胞核有萎縮之細胞凋亡特徵、神經纖維絲明顯減少，大腦內部調控發炎及保護大腦細胞之星狀神經膠細胞隨著缺血後的天數增加，活化和增生現象亦增加。在發炎反應探討中，嗜中性白血球、巨噬細胞、B 細胞浸潤的情形也分別出現在腦缺血再灌流後前、中後期。其發炎因子 COX-2 則在缺血後 1~3 天表現量上升，於 7~14 天則轉為下降。

為了進一步了解大腦缺血後細胞凋亡路徑，初步以 TUNEL 染色法於大腦損傷區域大腦皮質、海馬迴、紋狀體部位，發現腦缺血/再灌流後隨著天數增加，細胞凋亡數目也增加。然而腦缺血後細胞凋亡路徑調控因子的分析下，外源性路徑之 TNF- α receptor 1、Fas、TNF- α 以及 FADD 明顯的增加，且下游的 Bid 表現也有上升的情形。此時細胞內部的 FLIP 抗細胞凋亡蛋白也有所表現，試圖讓細胞生存。於內源性路徑中，Bax、Bad 細胞凋亡因子與 Bcl-2、Bcl-xL 抗細胞凋亡因子，以 Bax、Bad 表現佔優勢，其 Bcl-2、Bcl-xL 不敵細胞凋亡因子的表現，最終還是會促使大量的細胞凋亡。於轉錄因子之調控下，也發現 p53 與 PUMA 隨著天數增加，表現量也提升，且呈現相對的關係。另一方面，AIF 自行誘發凋亡訊息，造成腦組織大規模的傷害。最後，於細胞內部發現 Caspase 3、Caspase 8、Caspase 9 亦有上升的趨勢。結果雖無法完全將所有的機制透徹分析，未來需進一步探討分子之間的調控及訊息傳遞的完整性，才能有機會藉由此動物模式及細胞凋亡之機轉，應用於藥物、保健食品的測試，進一步作為臨床上治療的標的。

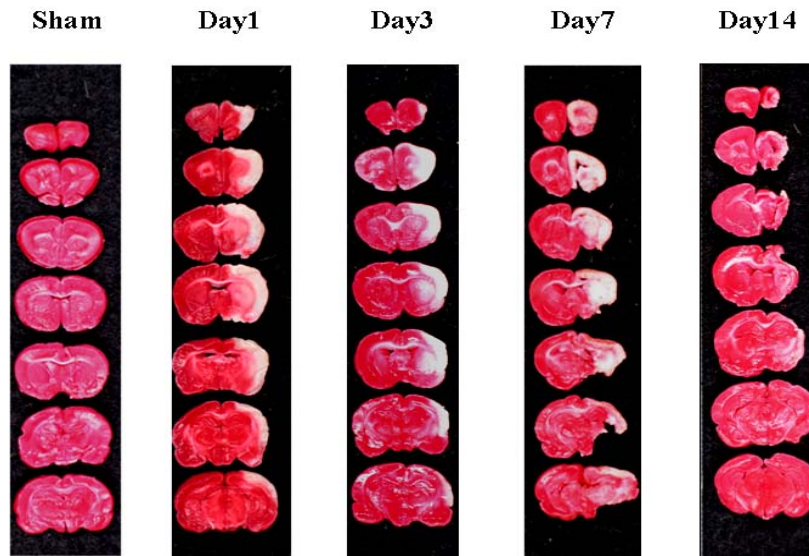
圖表



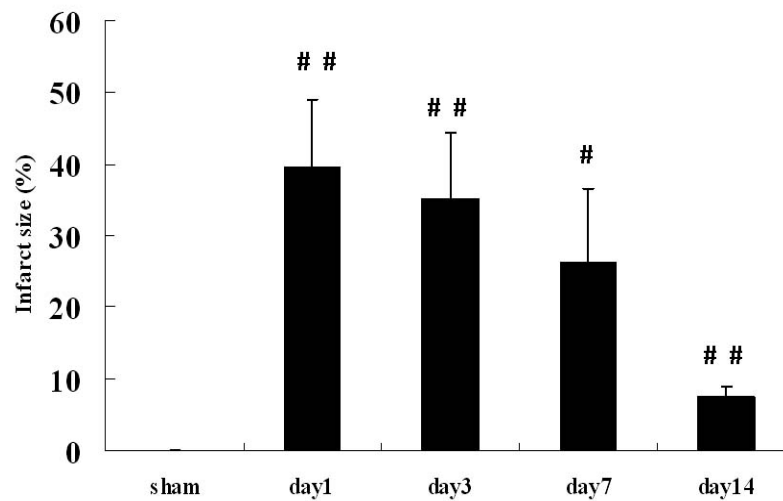
圖三、大鼠腦缺血再灌流前後各個組別的體重變化。

大鼠腦缺血後在不同時間讓血液恢復灌流分別在 day1、day3、day7、day14 給予稱重。以 pre-ischemia 作為對照估算各個組別體重變化之百分比。數據以 mean \pm SEM 值表示。control 即無手術處理組；sham 僅麻醉及皮肉縫合組；ischemia 腦缺血再灌流手術組。* 表示 $P < 0.05$ ，** 表示 $P < 0.01$ ，control 與腦缺血再灌流後各個組別的比較。# 表示 $P < 0.05$ ，## 表示 $P < 0.01$ ，sham 與腦缺血再灌流後各個組別的比較。+ 表示 $P < 0.05$ ，++ 表示 $P < 0.01$ ，pre-ischemia 與腦缺血再灌流後比較(n=5)。

圖四 (a)



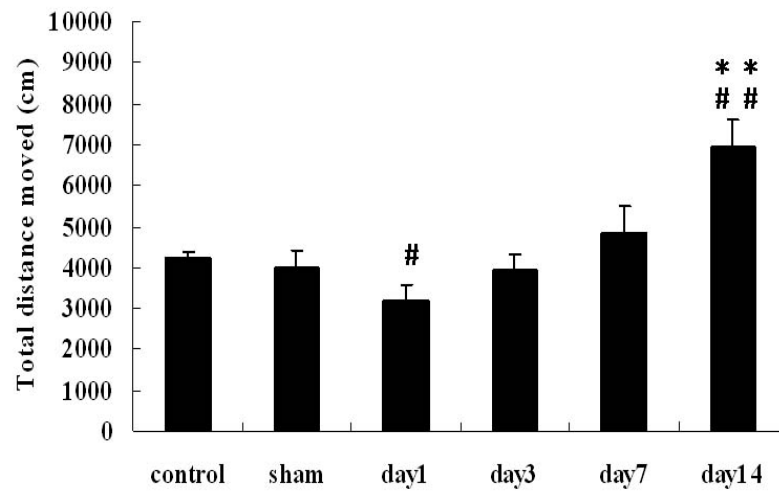
圖四 (b)



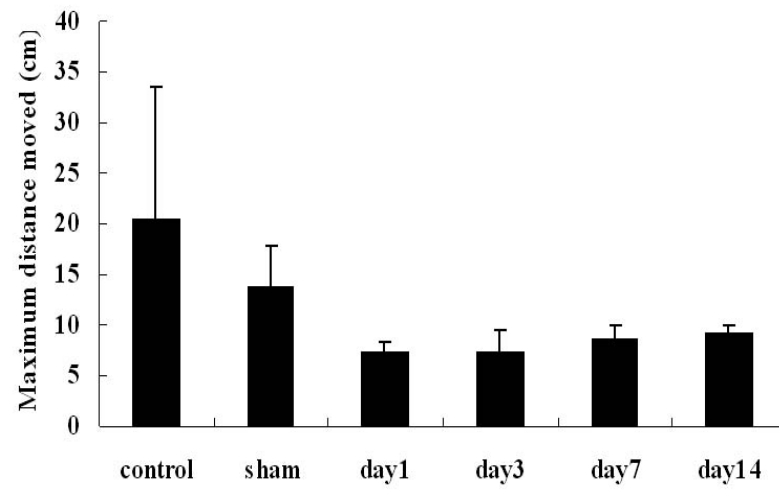
圖四、評估腦缺血再灌流後梗塞面積。

大鼠腦缺血後在不同時間讓血液恢復灌流分別在 day1、day3、day7、day14 給予犧牲，收取大鼠腦組織，以 TTC 染色方法估算梗塞面積之百分比。白色為梗塞區域，紅色為正常組織。數據以 mean \pm SEM 值表示。#表示 $P < 0.05$ ，##表示 $P < 0.01$ ，sham 與腦缺血再灌流後各個時間點之比較 (n=6)。

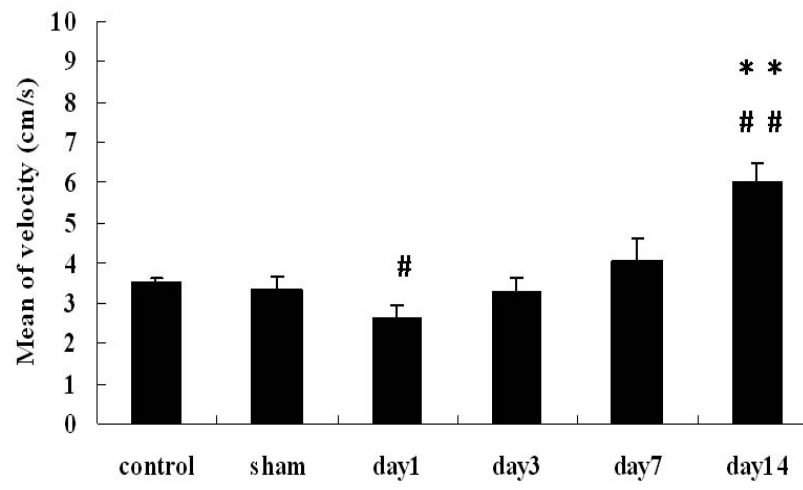
圖五 (a)



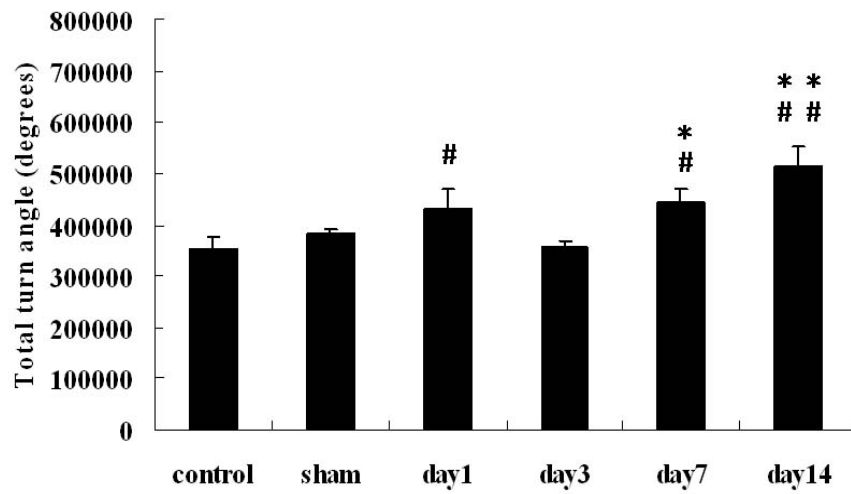
圖五 (b)



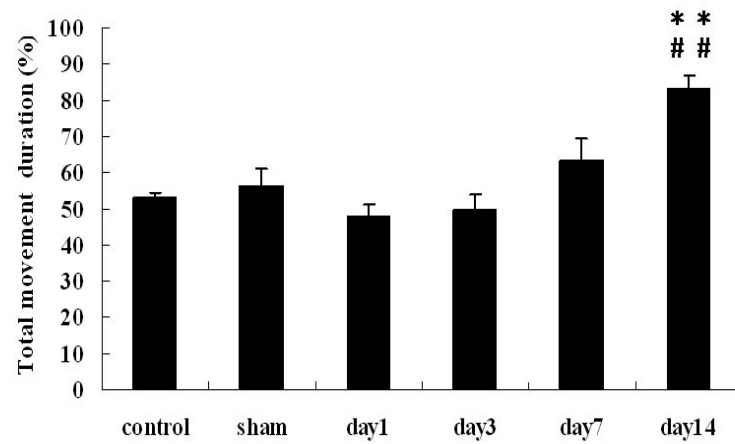
圖五 (c)



圖五 (d)



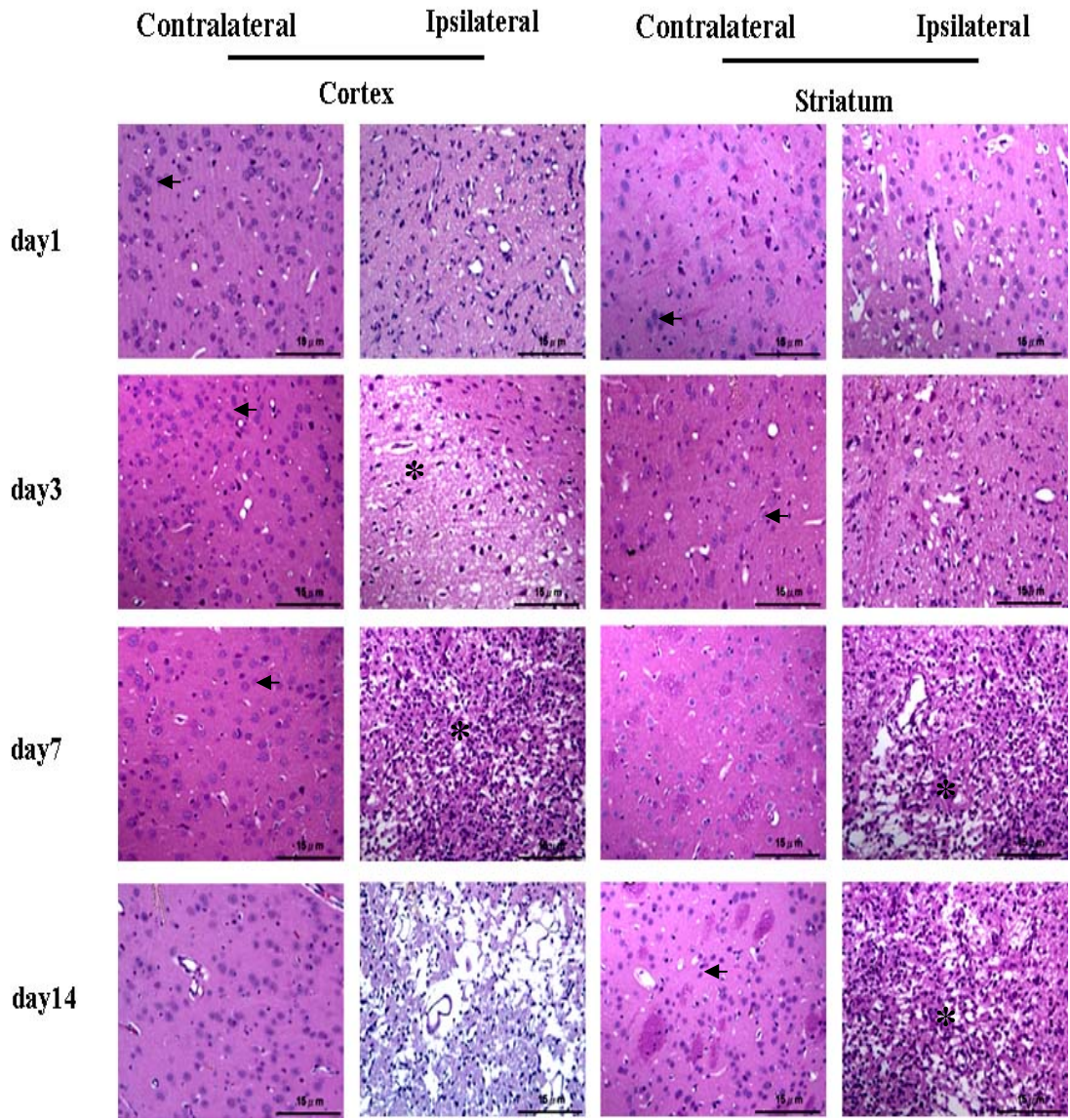
圖五 (e)



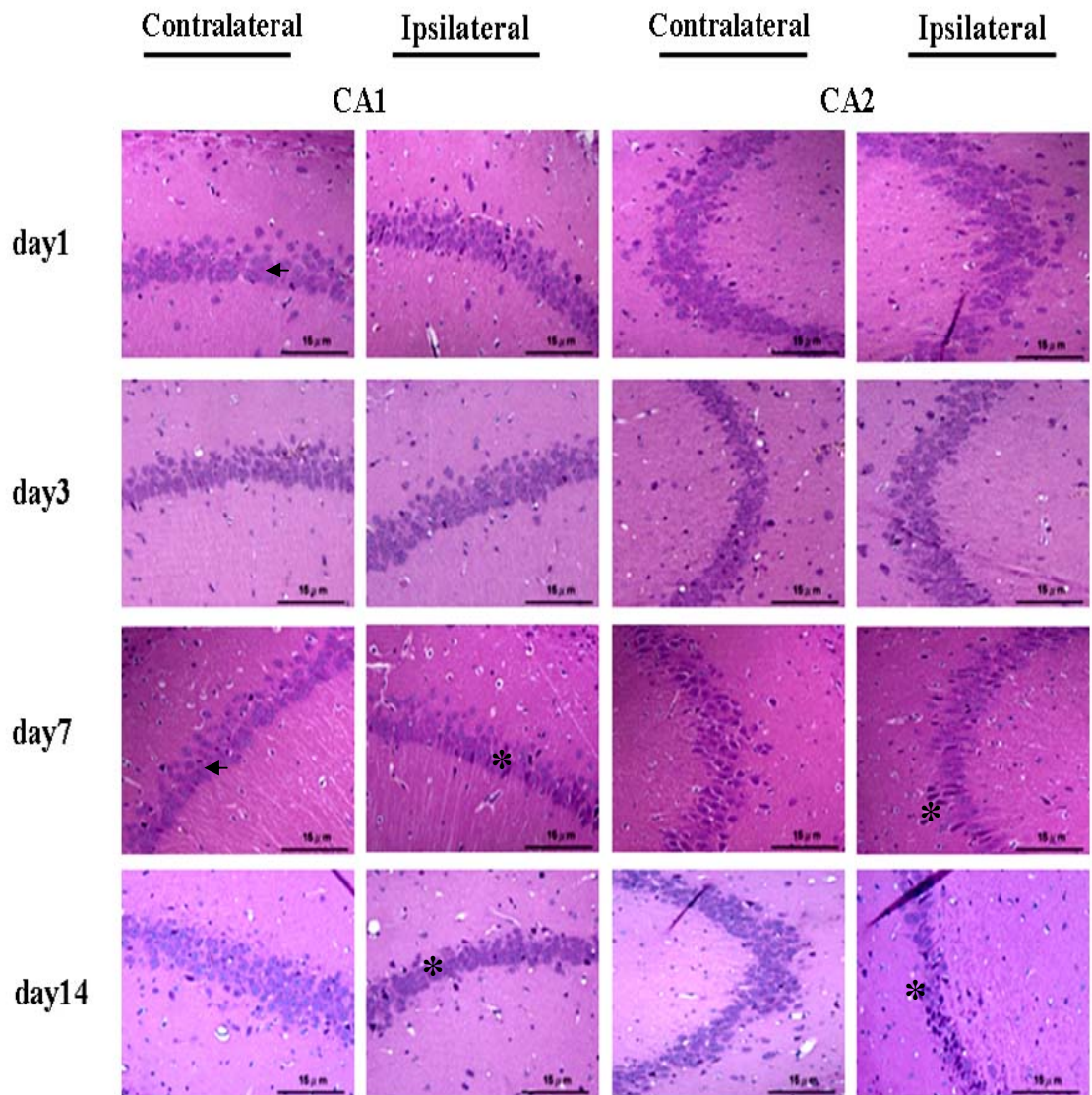
圖五、腦缺血再灌流前後行為變化。

大鼠腦缺血在不同時間血液再灌流後，於犧牲前，以 open field 方法觀測大鼠行為的變化。其行為觀測包括大鼠總移動距離(Total distance moved) (圖三-a)。瞬間最大移動距離(Maximum distance moved) (圖三-b)。平均速率(Means of velocity) (圖三-c)。總旋轉角度(Total turn angle) (圖三-d)。運動時間佔所有觀測時間之百分比(Total moving duration) (圖三-e)。數據以 mean \pm SD 值表示。# 表示 $P < 0.05$ ，## 表示 $P < 0.01$ ，control 與腦缺血再灌流後各組別的比較。*表示 $P < 0.05$ ，** 表示 $P < 0.01$ ，sham 與腦缺血再灌流後各組別的比較(n=3)。

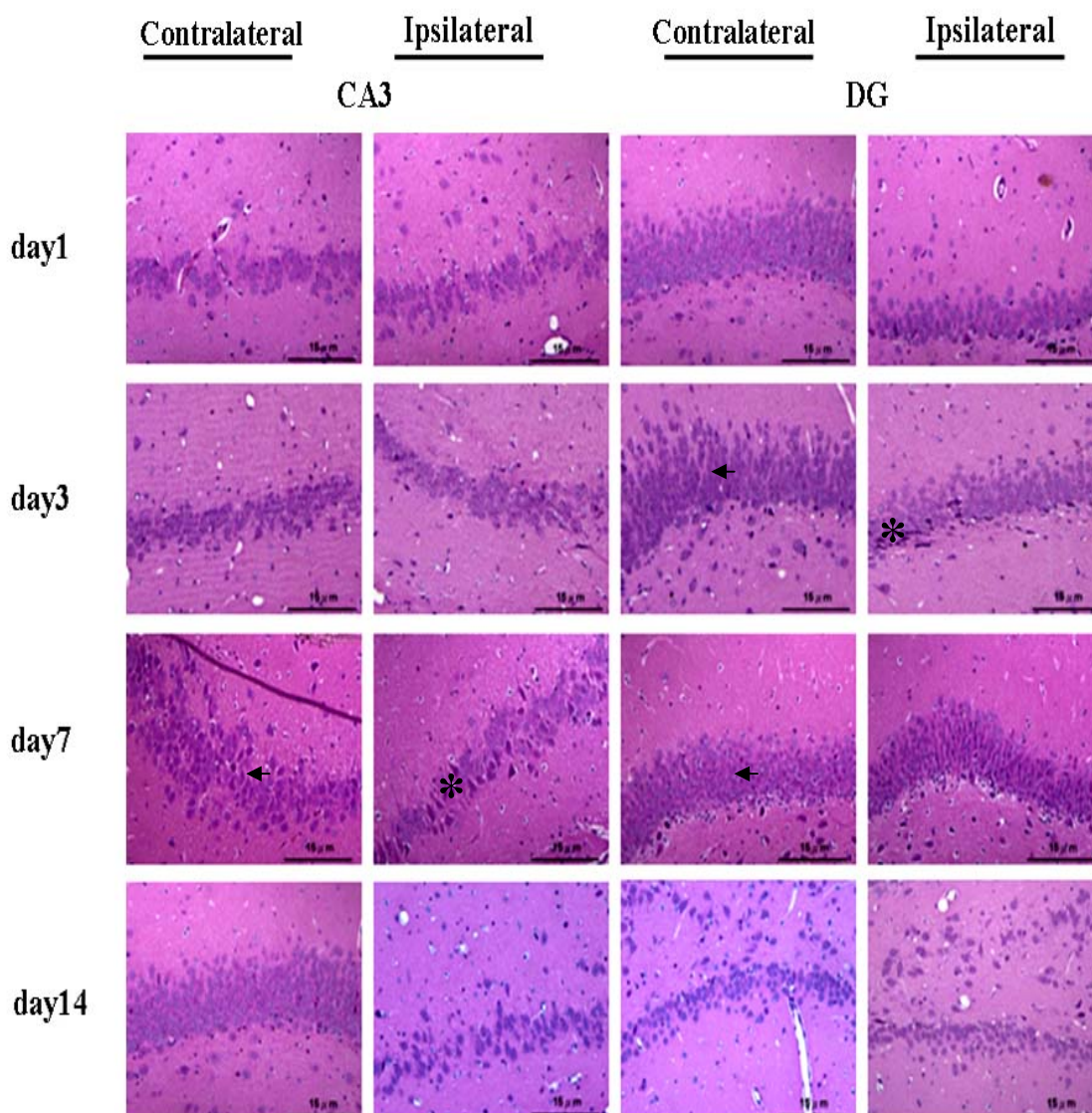
圖六 (a)



圖六 (b)



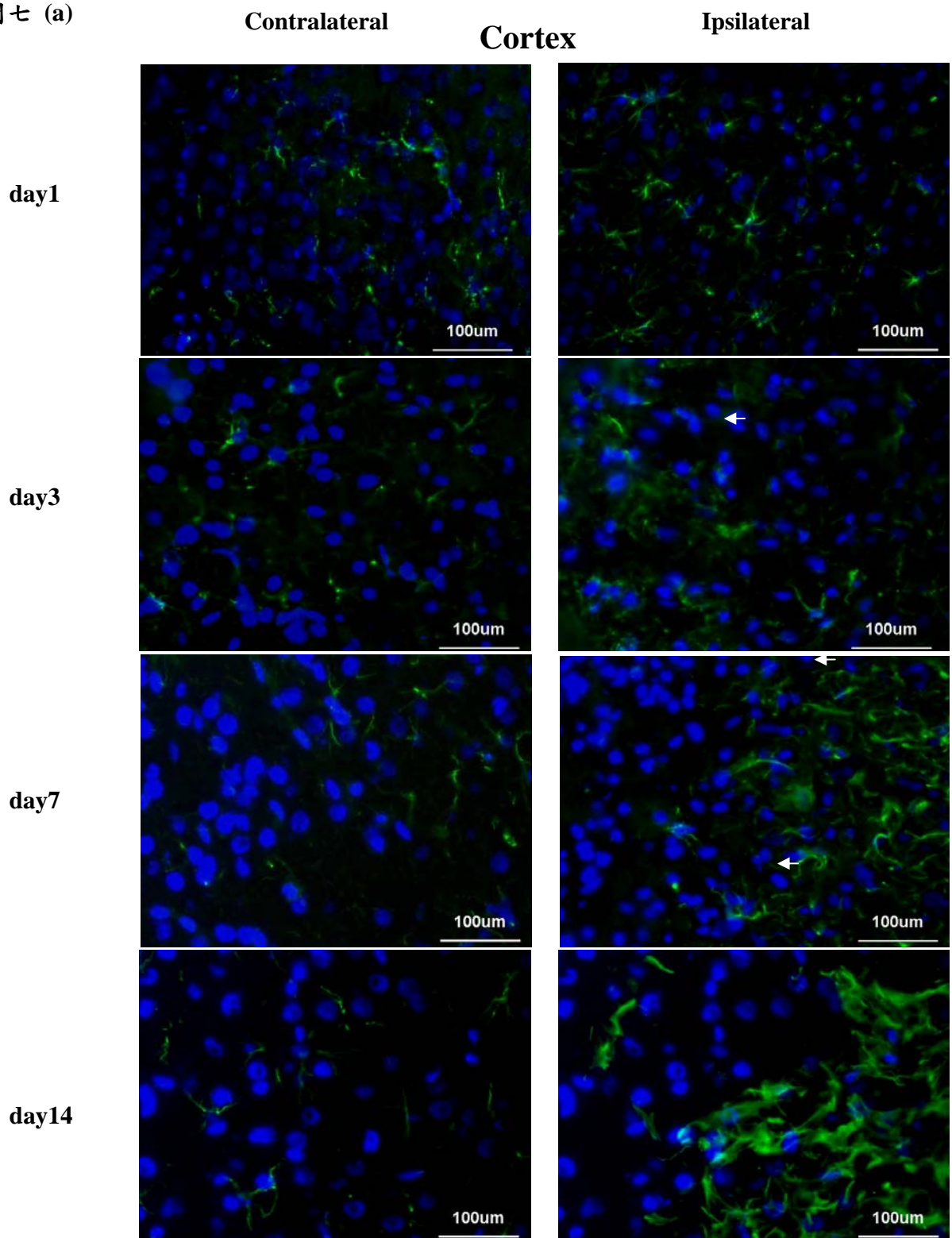
圖六 (c)



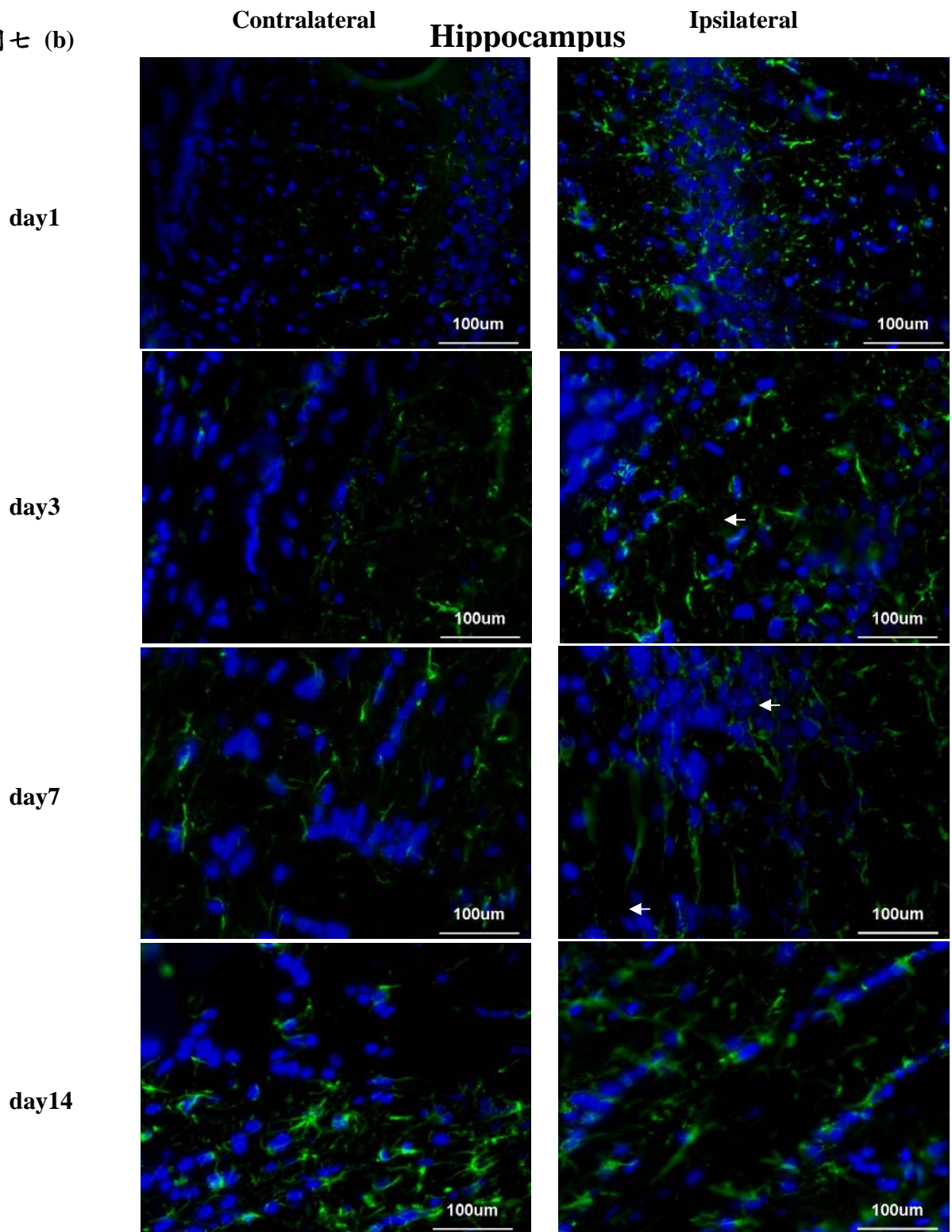
圖六、腦缺血後皮質部、海馬迴與紋狀體之組織病理學變化。

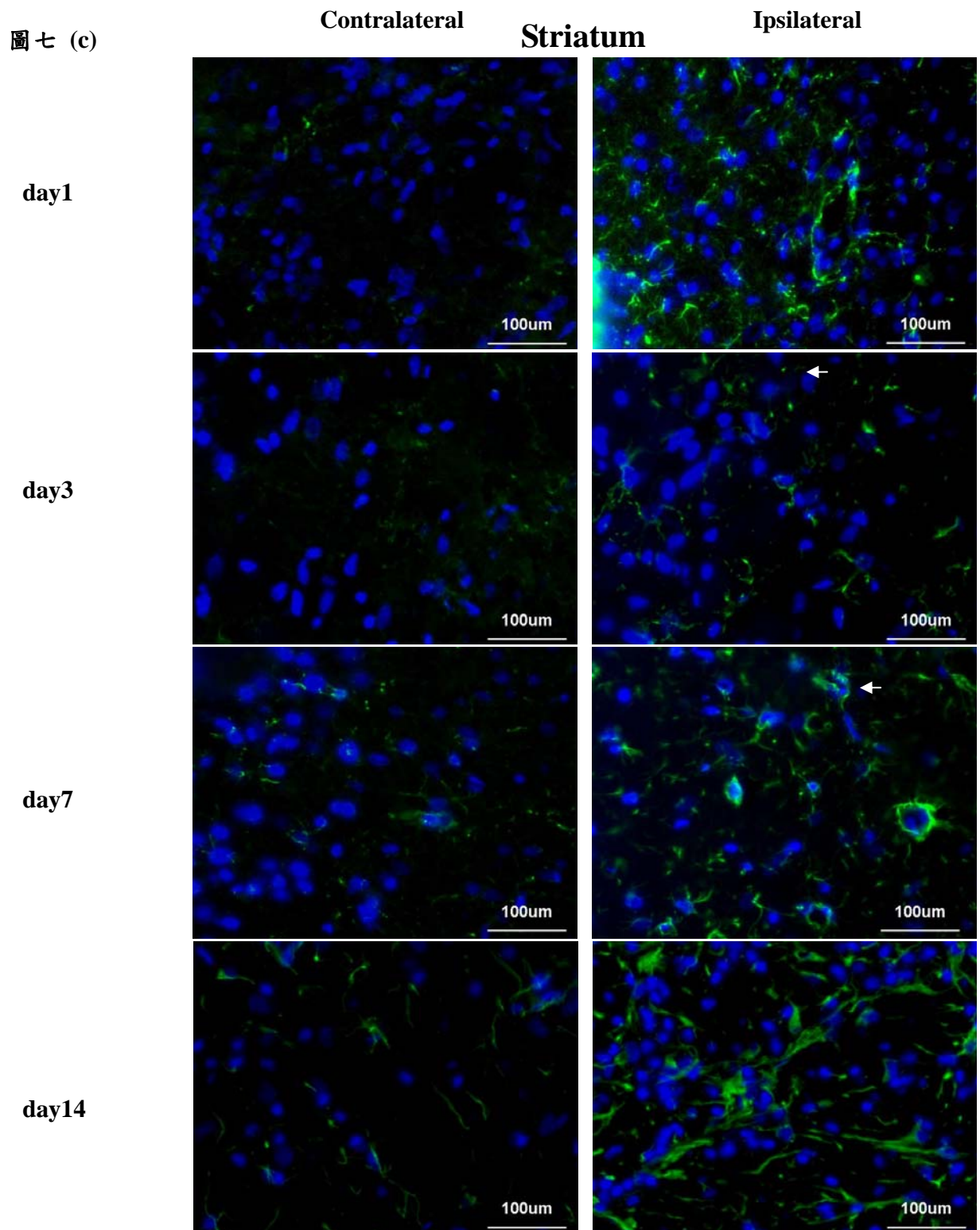
大鼠腦缺血後在不同時間血液再灌流下觀測其腦缺血後大腦皮質部、海馬迴與紋狀體組織病理學變化。大鼠腦缺血後於在不同時間血液再灌流下給犧牲，以 HE 染色觀察腦組織不同區域之病理學變化。箭號代表正常的神經細胞。*代表細胞已萎縮之現象。Scale bar=15 μ m。(n=3)

圖七 (a)



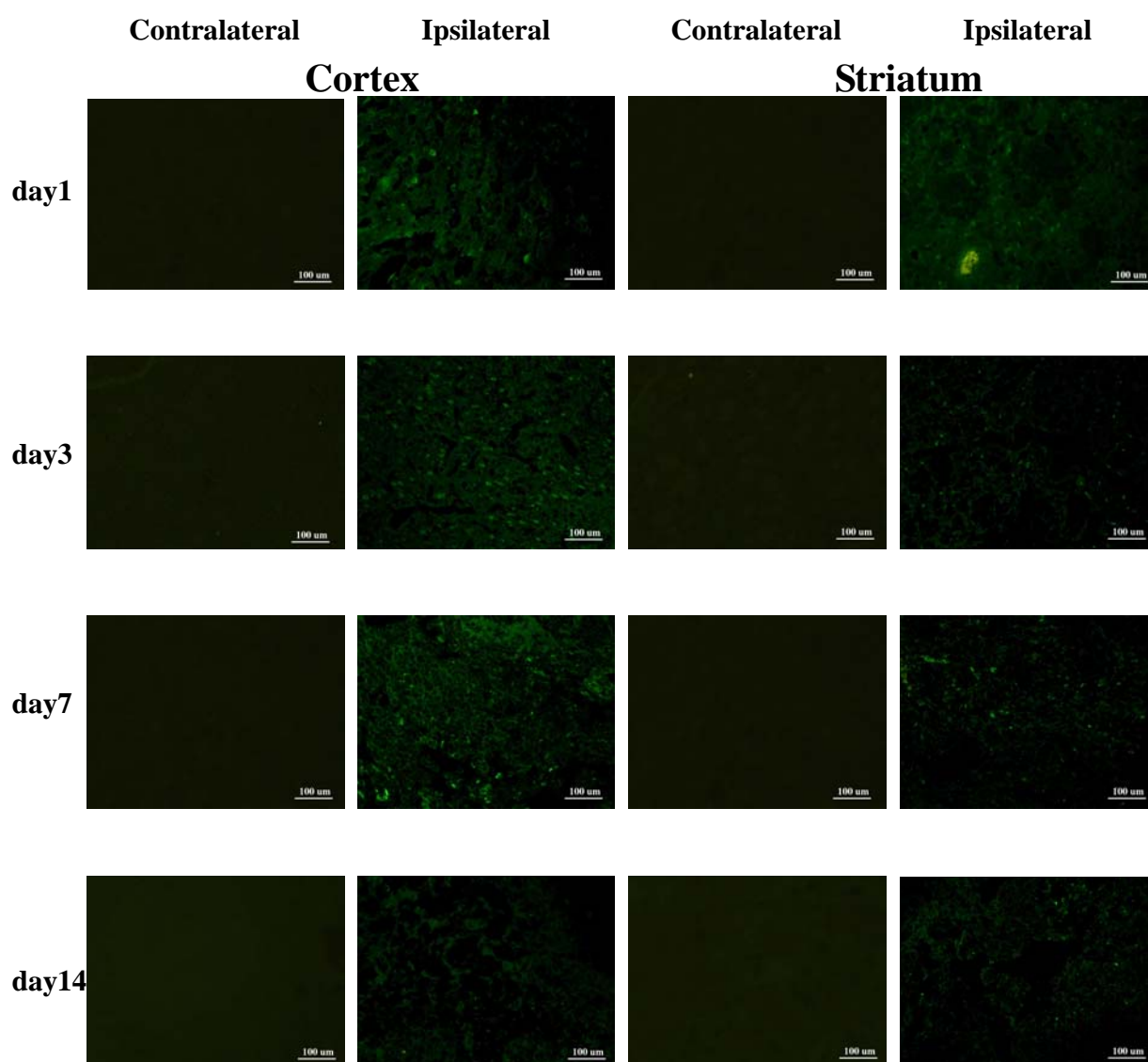
圖七 (b)





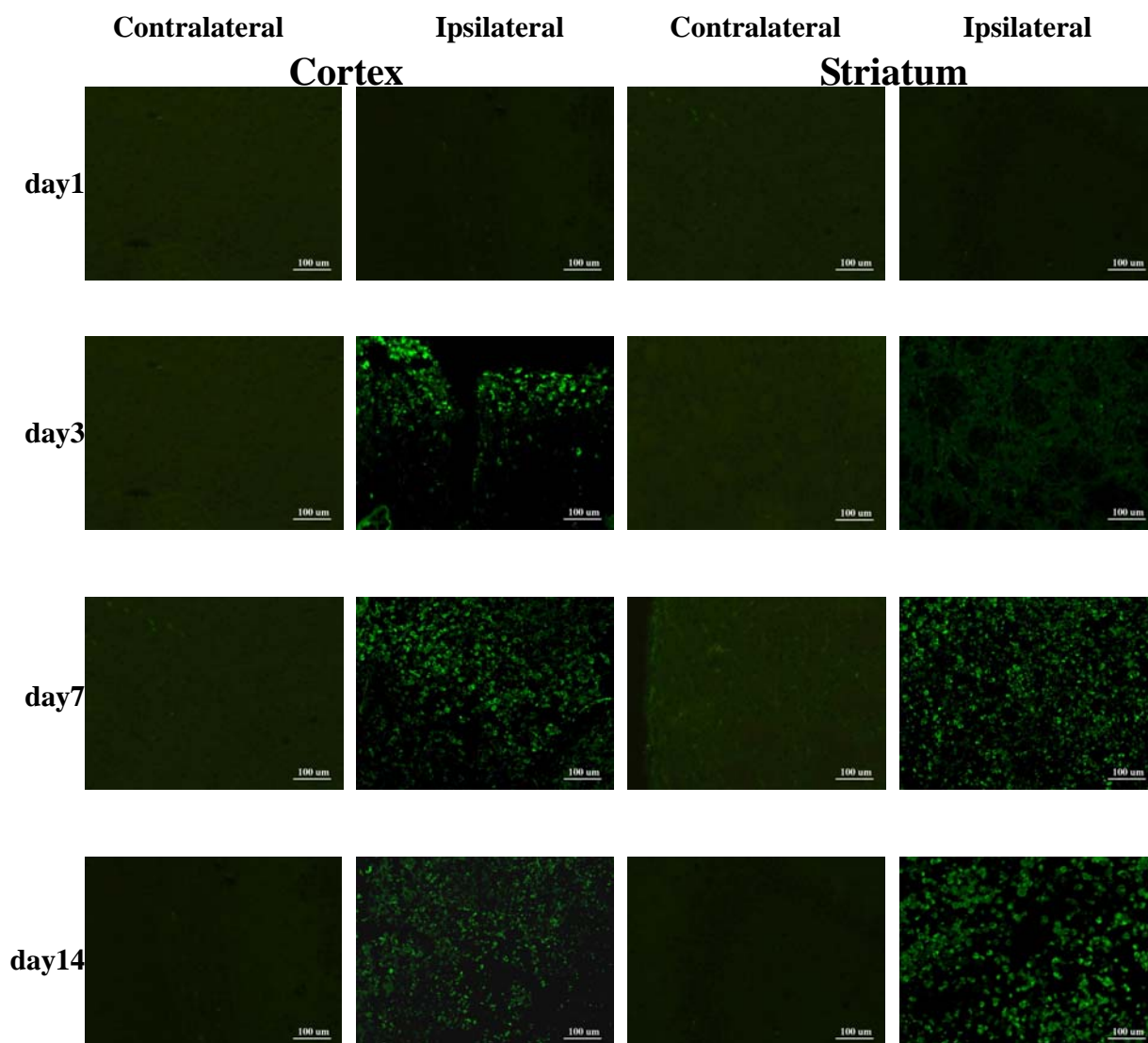
圖七、腦缺血再灌流後星狀神經膠細胞活化情形。

大鼠腦缺血後在不同時間血液再灌流下給予犧牲，收取腦組織冷凍切片，以免疫螢光染色，利用 GFAP 抗體觀察大腦皮質部、海馬迴與紋狀體星狀神經膠細胞的活化情形。藍色為細胞核，綠色為星狀神經膠細胞。箭號代表活化的星狀神經膠細胞。Scale bar=100 μ m。(n=3)



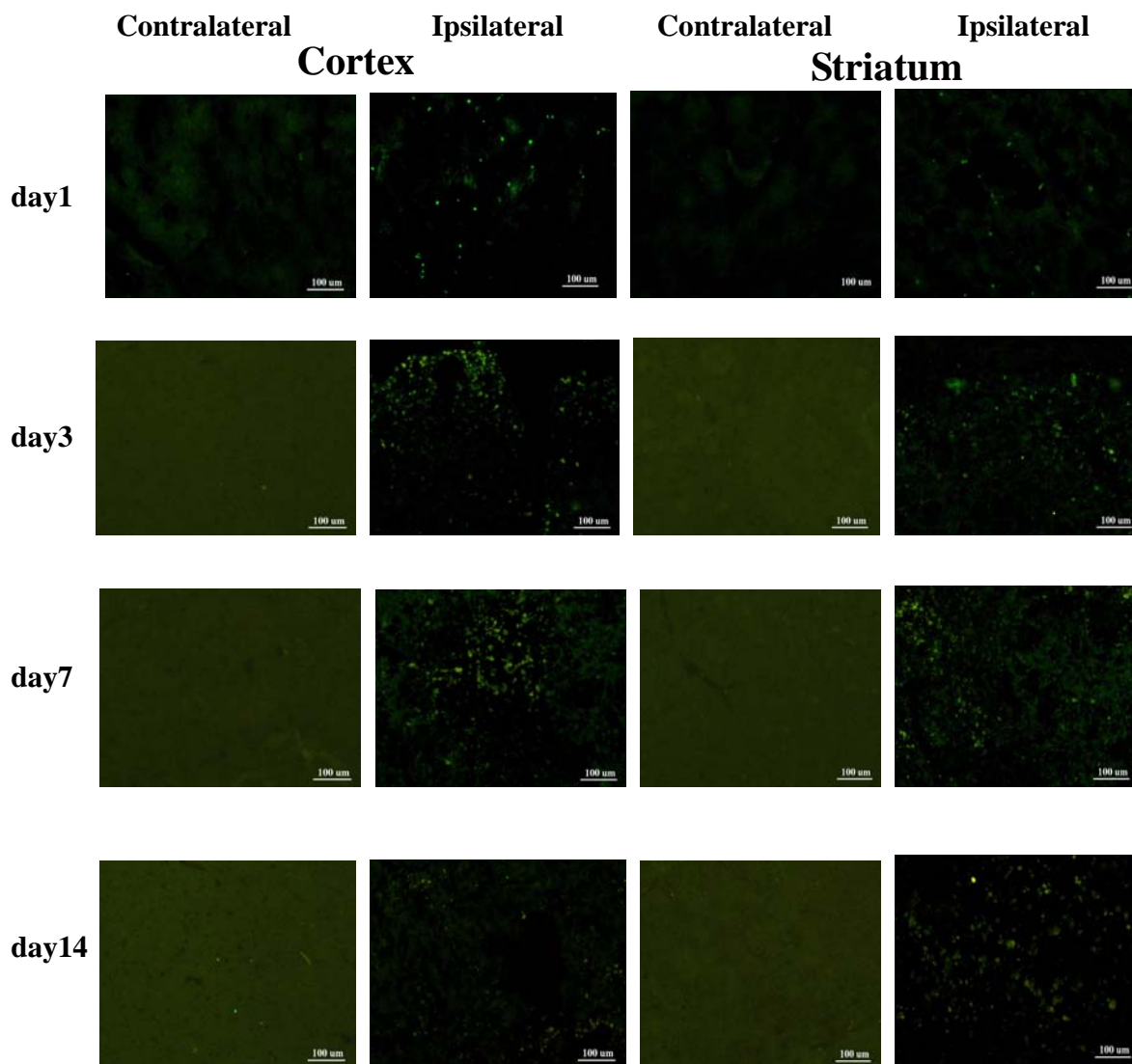
圖八、偵測腦缺血再灌流後嗜中性白血球的變化。

大鼠腦缺血後在不同時間血液再灌流下給予犧牲，收取腦組織冷凍切片，以免疫螢光染色，利用 Neutrophil 抗體觀察大腦皮質部與紋狀體嗜中性白血球的變化。綠色為嗜中性白血球 Scale bar = 100 μm 。(n=3)



圖九、偵測腦缺血再灌流後巨噬細胞的變化。

大鼠腦缺血後在不同時間血液再灌流下給予犧牲，收取腦組織冷凍切片，以免疫螢光染色，利用 CD68 抗體觀察大腦皮質部與紋狀體巨噬細胞的變化。綠色為巨噬細胞。Scale bar = 100 μ m。 (n=3)



圖十、偵測腦缺血再灌流後 B 細胞的變化。

大鼠腦缺血後在不同時間血液再灌流下給予犧牲，收取腦組織冷凍切片，以免疫螢光染色，觀察大腦皮質部與紋狀體 B 細胞的變化。綠色為 B 細胞。Scale bar = 100 μm 。(n=3)

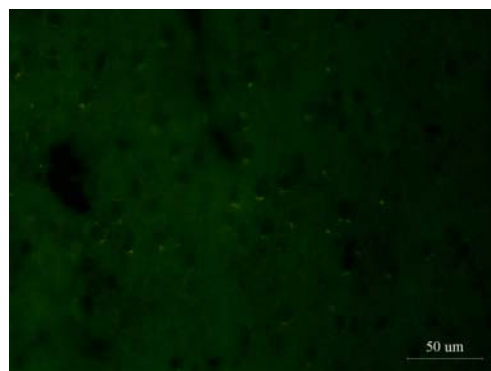
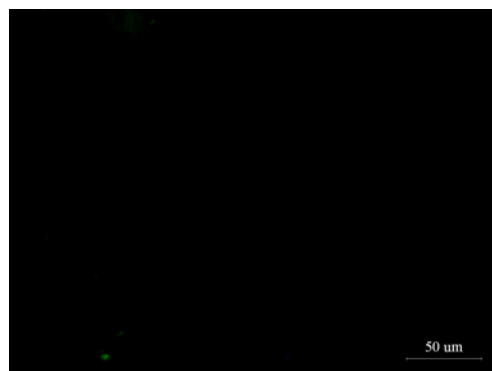
圖十一 (a)

Contralateral

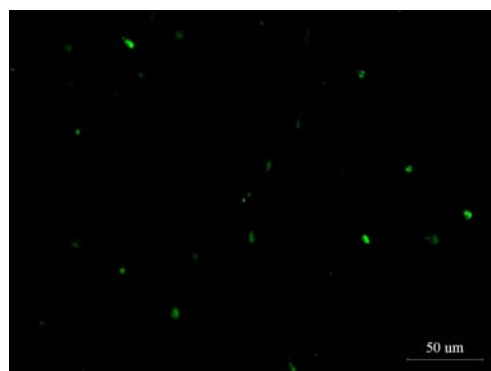
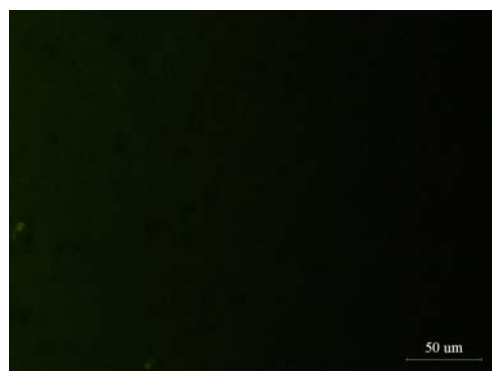
Cortex

Ipsilateral

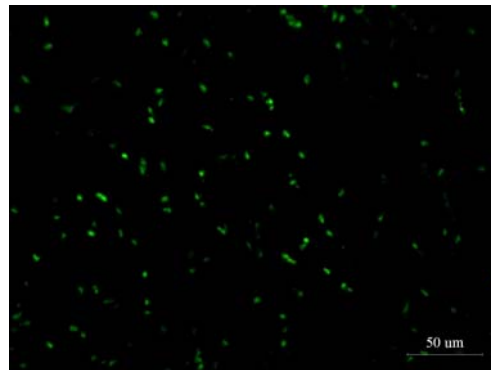
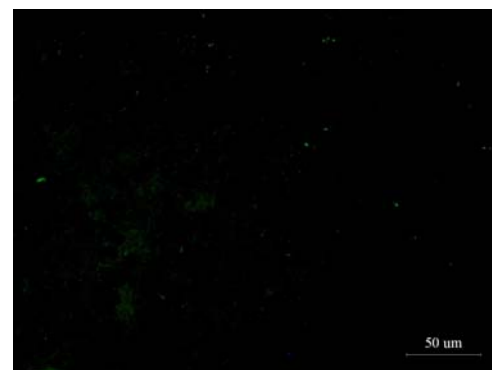
day1



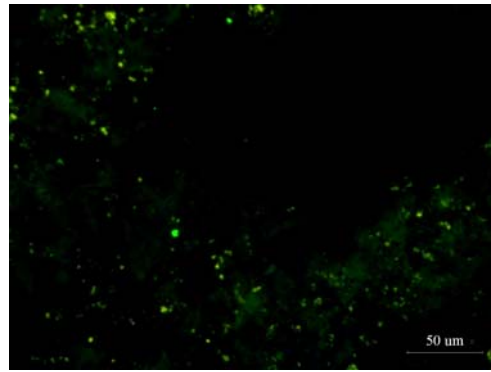
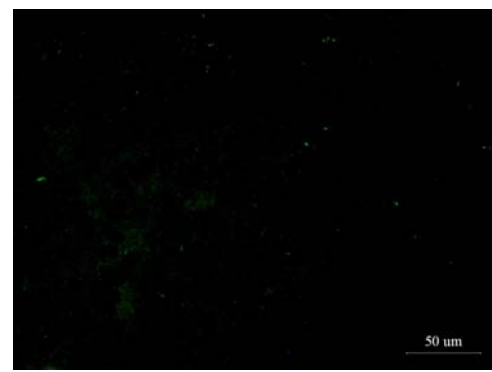
day3



day7



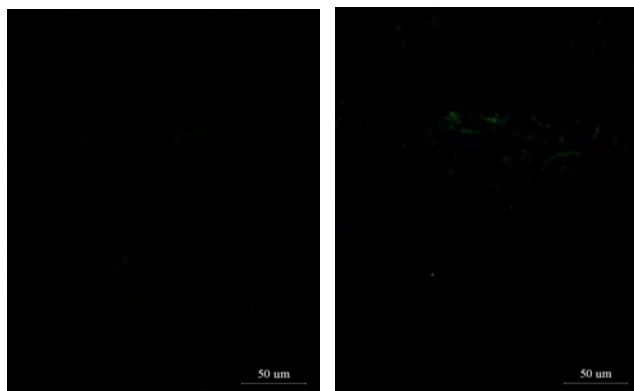
day14



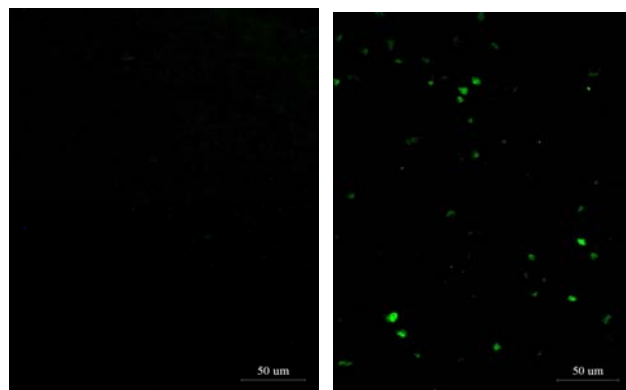
圖十一 (b)

Contralateral Ipsilateral
Hippocampus

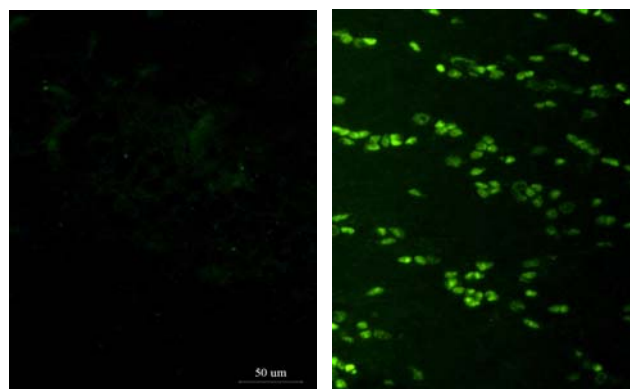
day1



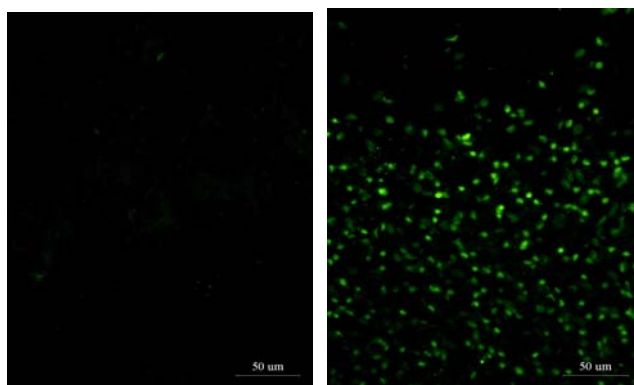
day3



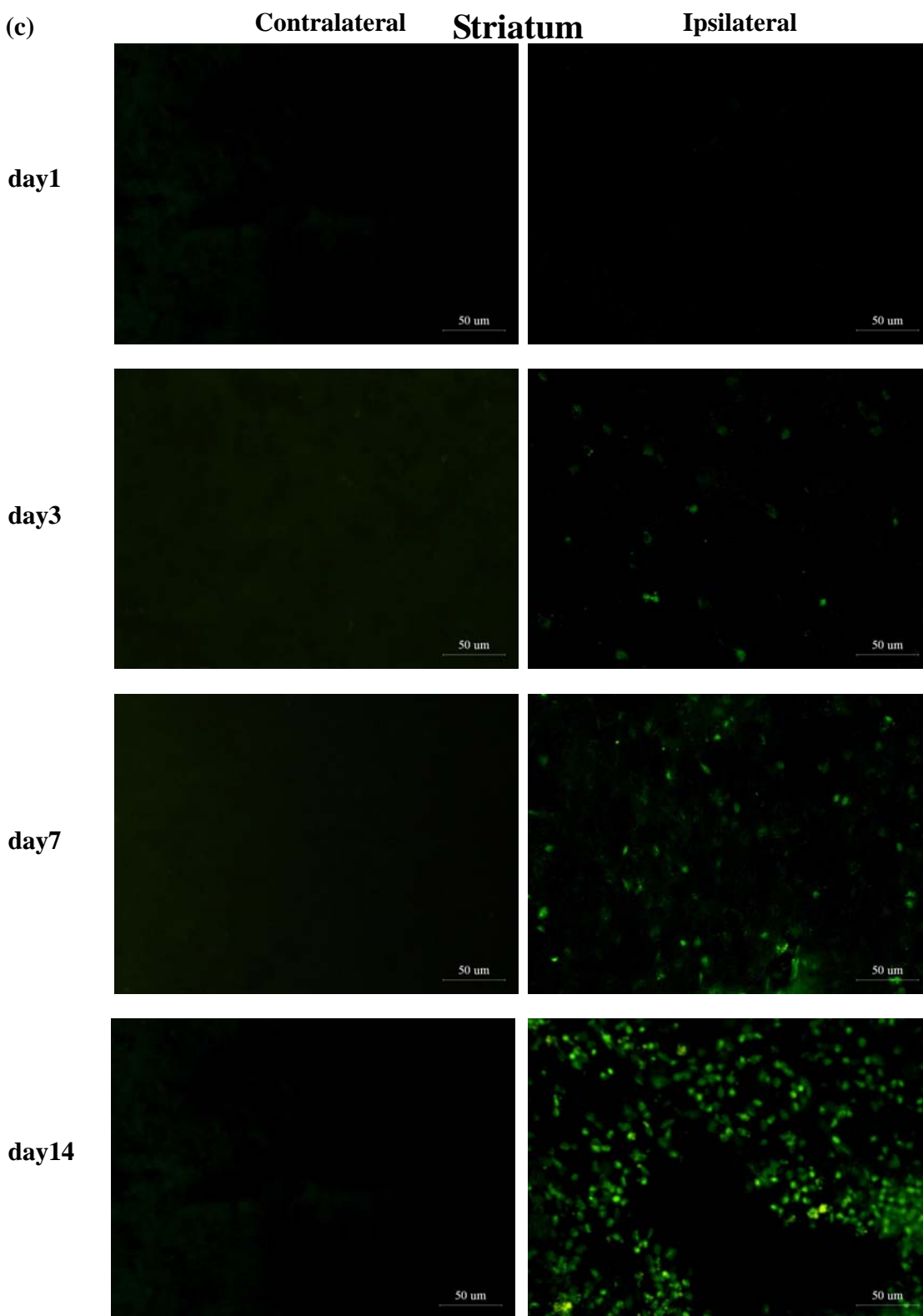
day7



day14

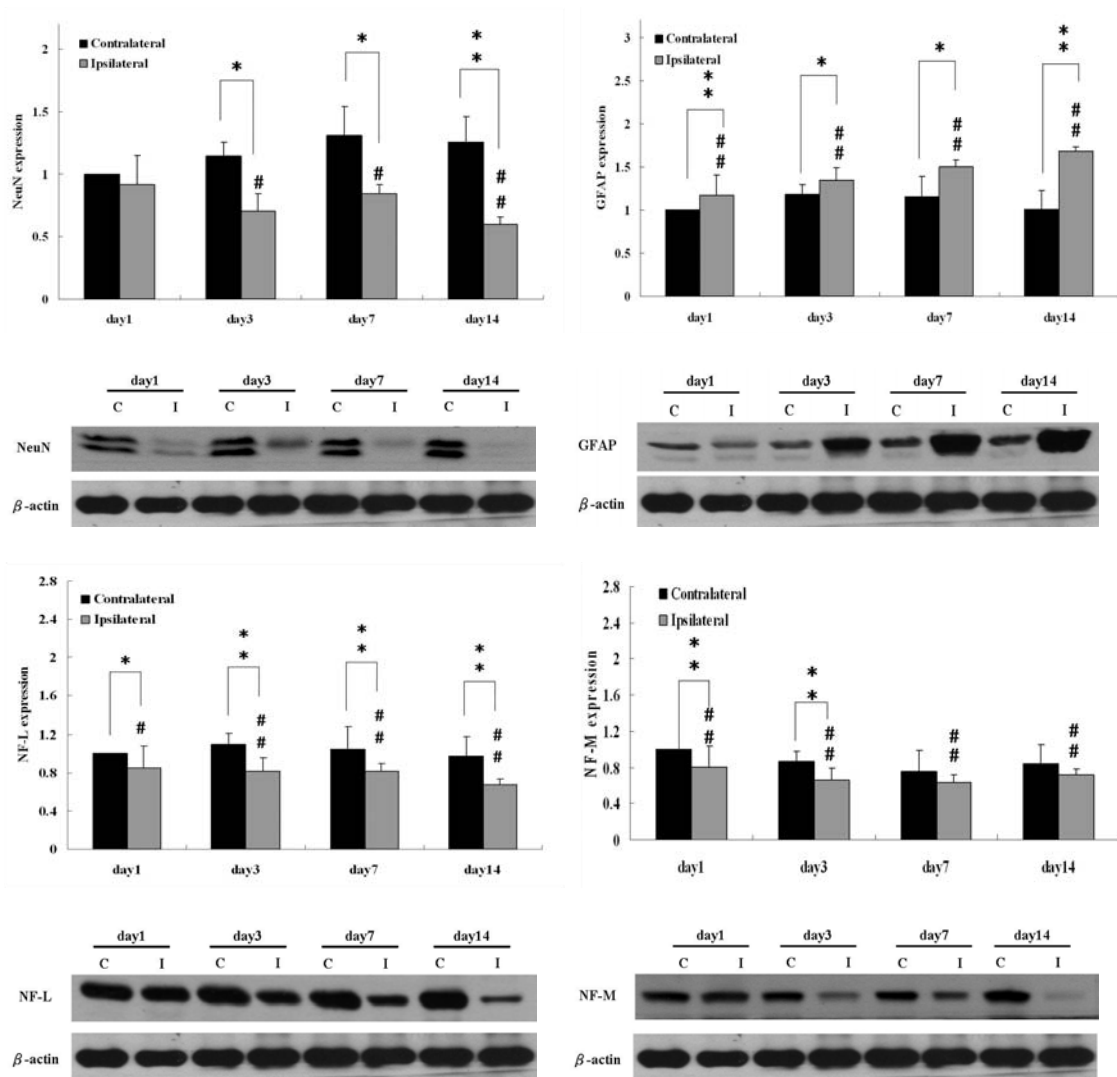


圖十一 (c)



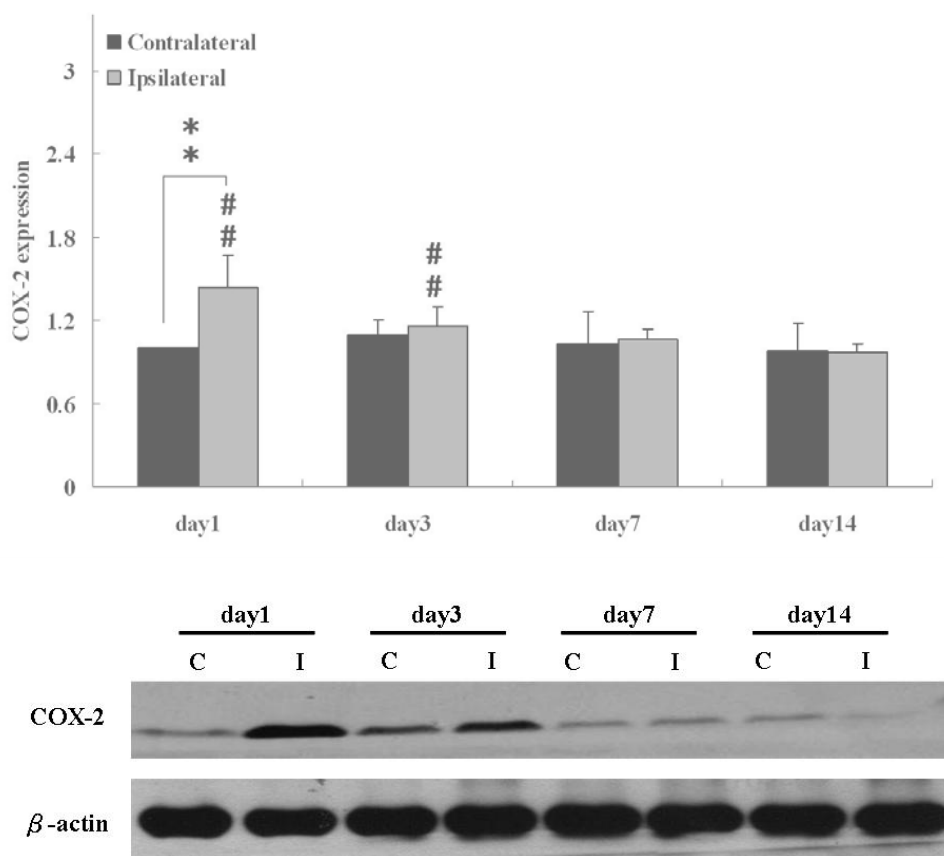
圖十一、觀測大鼠腦缺血再灌流後細胞凋亡的情形。

大鼠腦缺血後在不同時間血液再灌流下給予犧牲，收取腦組織冷凍切片，利用 TUNEL 染色，觀察大腦皮質部、海馬迴與紋狀體細胞凋亡之變化。綠色為凋亡之細胞。Scale bar = 50 μ m。(n=3)



圖十二、腦缺血再灌流後大腦皮質部 NeuN、GFAP、NF-L 與 NF-M 的表現。

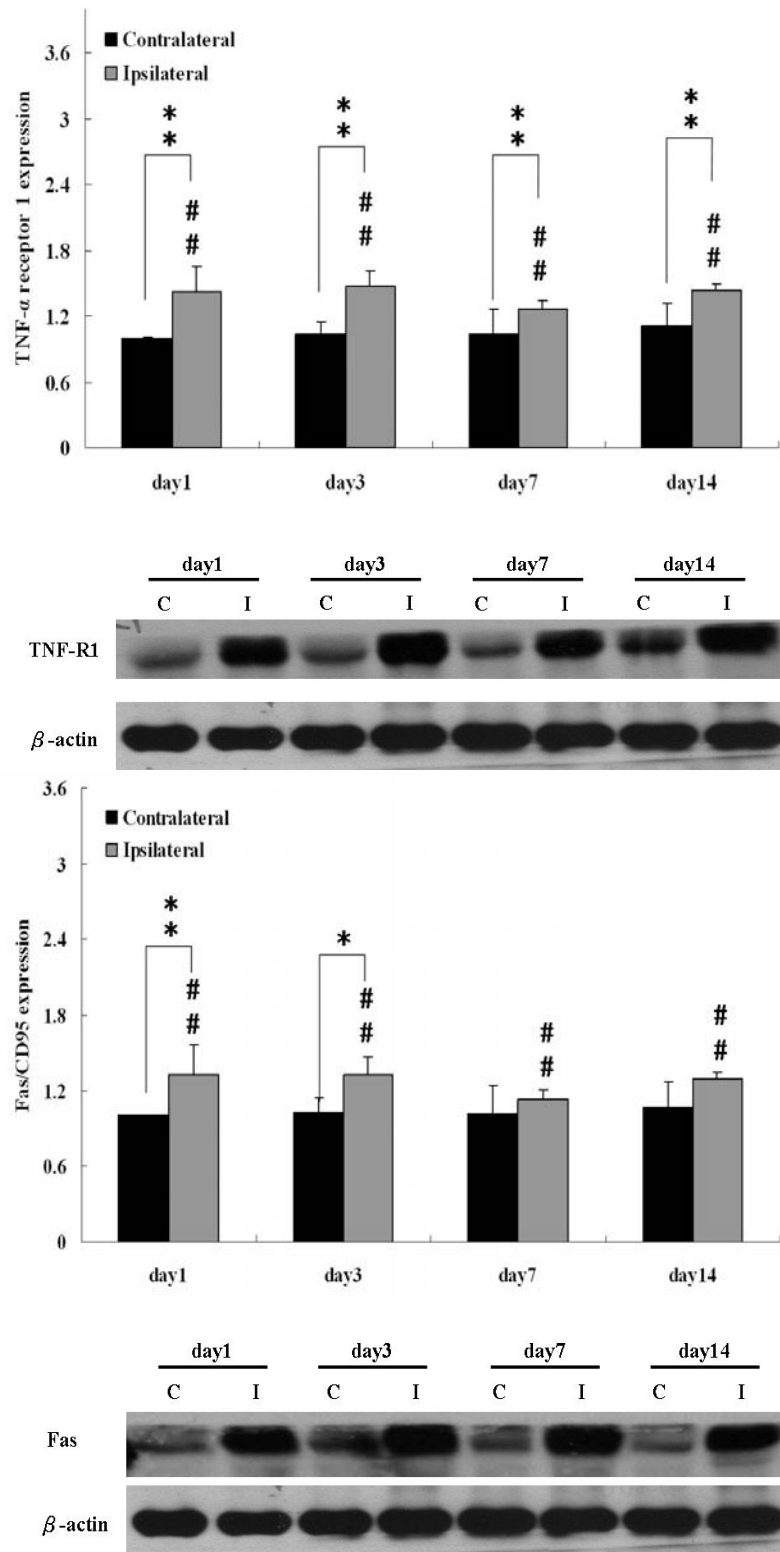
大鼠腦缺血後在不同時間血液再灌流下給予犧牲，收取大腦皮質組織，萃取蛋白質利用西方轉漬法分析 NeuN、GFAP、NF-L 與 NF-M 的表現。其 C 代表正常側 (contralateral); I 代表梗塞側 (ipsilateral)。測量時 β -actin 為 Internal control，並以腦缺血再灌流後第 1 天數值為 1 作為各個組別的對照。數據以 mean \pm SEM 值表示。# 表示 $P < 0.05$, ## 表示 $P < 0.01$ ，腦缺血再灌流後第 1 天 contralateral 與各個時間點的 ipsilateral 的比較。* 表示 $P < 0.05$ ，** 表示 $P < 0.01$ ，腦缺血再灌流後後各個時間點 contralateral 與 ipsilateral 的比較 (n=6)。



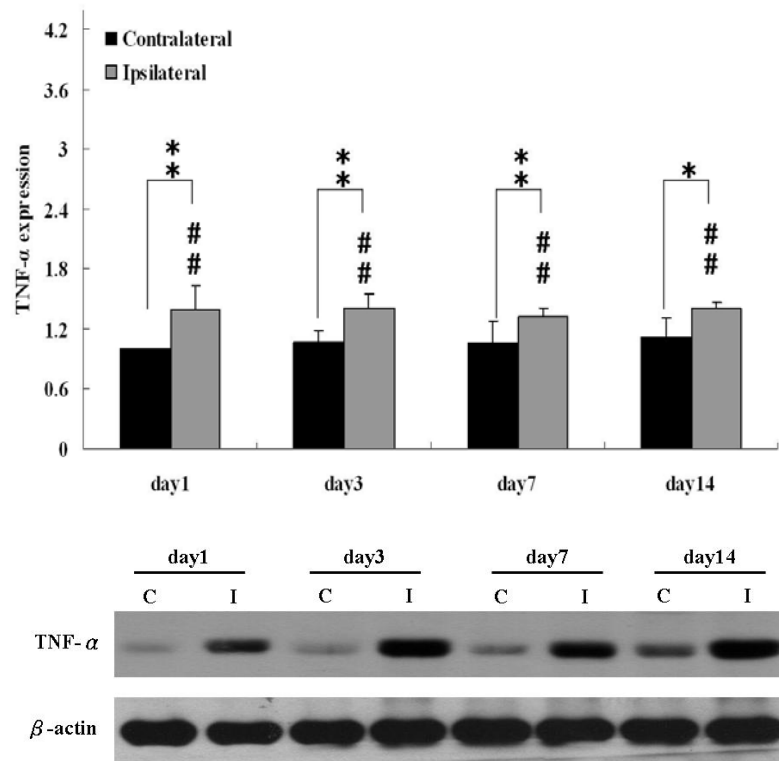
圖十三、分析腦缺血再灌流後大腦皮質部發炎相關因子 COX-2 之表現。

大鼠腦缺血後在不同時間血液再灌流下給予犧牲，收取大腦皮質組織，萃取蛋白質，利用西方轉漬法分析 COX-2 的蛋白質表現，其 C 代表正常側(contralateral)；I 代表梗塞側(ipsilateral)。測量時 β -actin 為 Internal control，並以腦缺血再灌流後第 1 天數值為 1 作為各個組別的對照。數據以 mean \pm SEM 值表示。# 表示 $P < 0.05$ ，## 表示 $P < 0.01$ ，腦缺血再灌流後第 1 天 contralateral 與各個時間點的 ipsilateral 的比較。* 表示 $P < 0.05$ ，** 表示 $P < 0.01$ ，腦缺血再灌流後各個時間點 contralateral 與 ipsilateral 的比較 (n=6)。

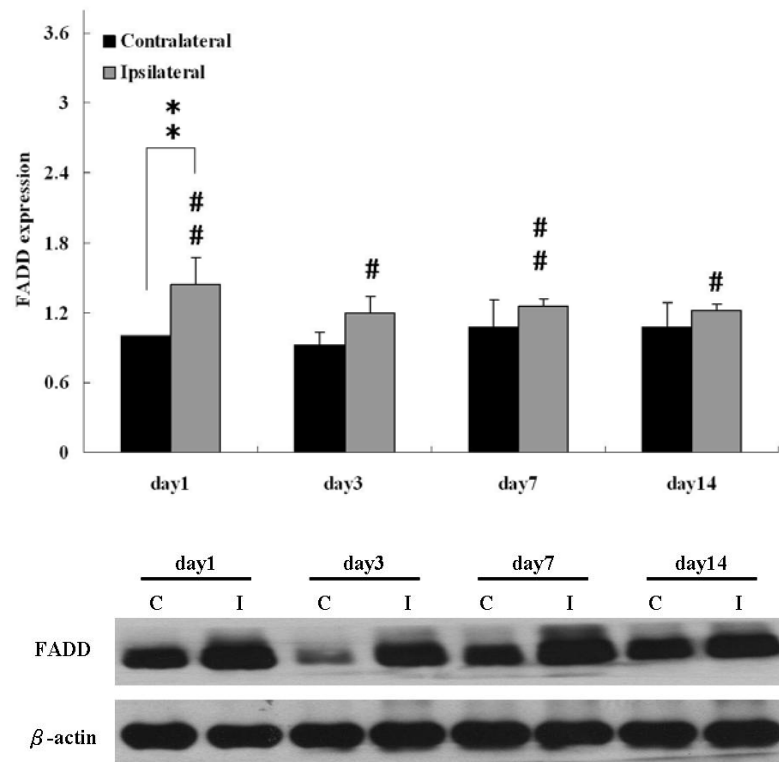
圖十四 (a)



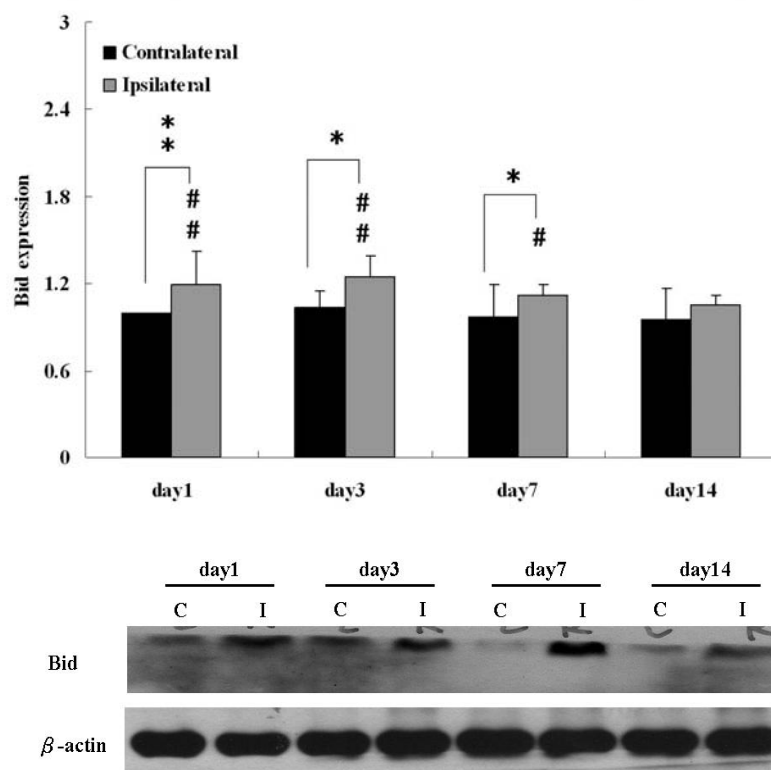
圖十四 (b)



圖十四 (c)



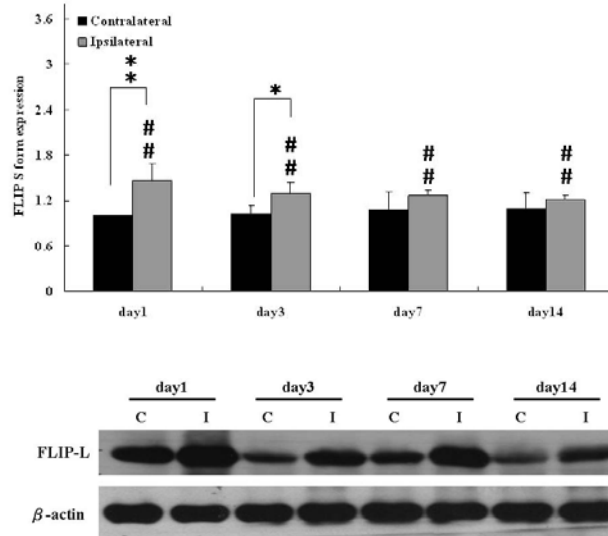
圖十四 (d)



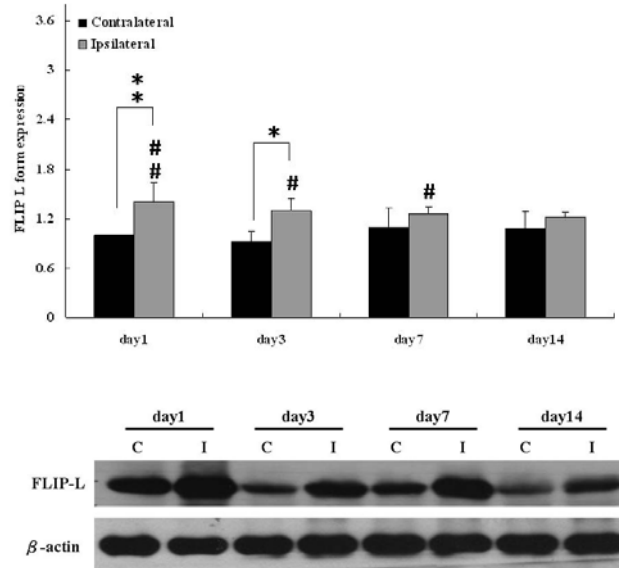
圖十四、腦缺血再灌流後外源性細胞凋亡相關因子之表現。

大鼠腦缺血後在不同時間血液再灌流下給予犧牲，收取大腦皮質組織，萃取蛋白質，利用西方轉漬法分析外源性細胞凋亡相關因子 TNF- α receptor、Fas、TNF- α 、FADD、Bid 的蛋白質表現，其 C 代表正常側(contralateral)；I 代表梗塞側(ipsilateral)。測量時 β -actin 為 Internal control，並以腦缺血再灌流後第 1 天數值為 1 作為各個組別的對照。數據以 mean \pm SEM 值表示。# 表示 $P < 0.05$ ，## 表示 $P < 0.01$ ，腦缺血再灌流後第 1 天 contralateral 與各個時間點的 ipsilateral 的比較。* 表示 $P < 0.05$ ，** 表示 $P < 0.01$ ，腦缺血再灌流後各個時間點 contralateral 與 ipsilateral 的比較 (n=6)。

圖十五 (a)

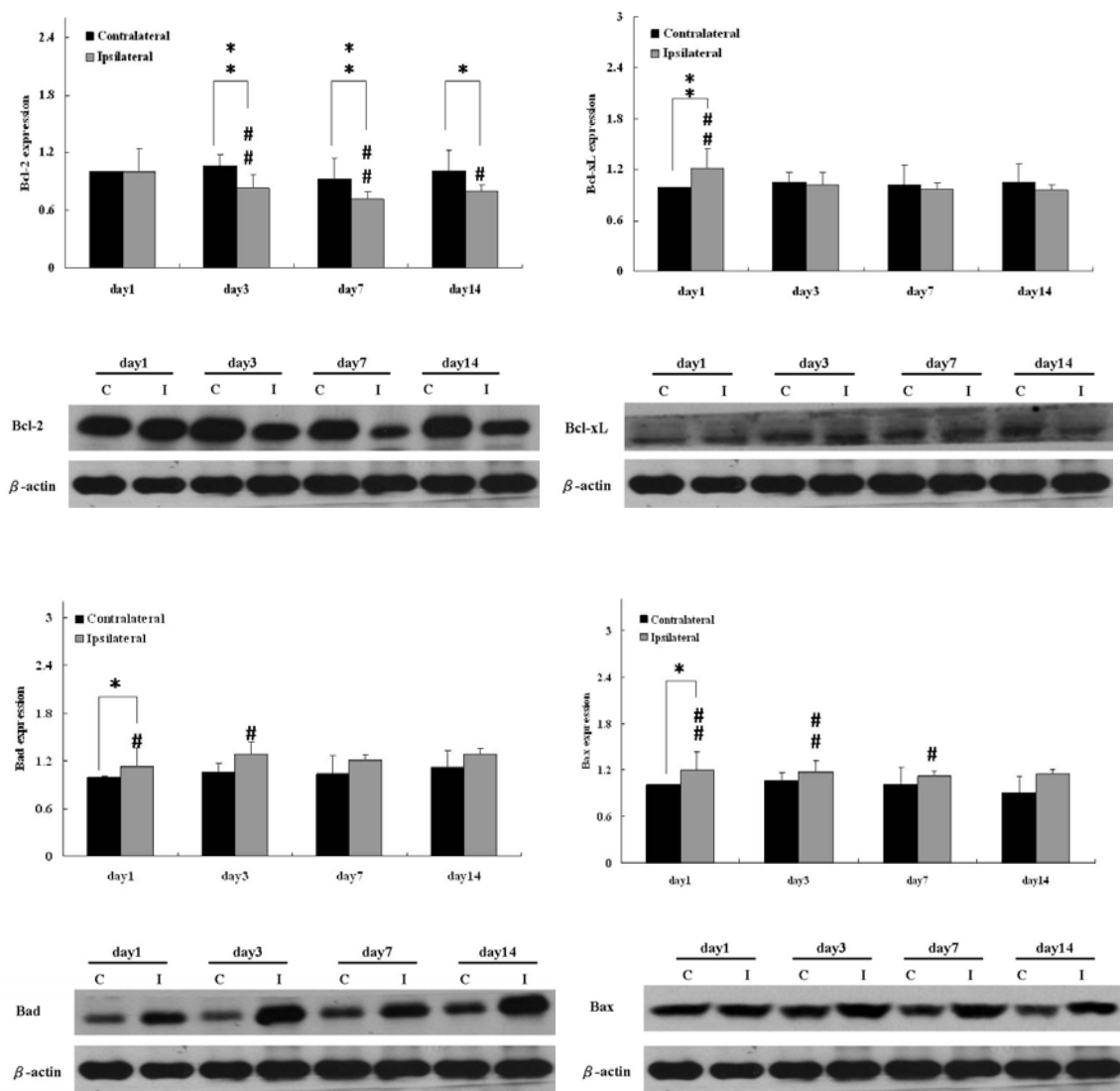


圖十五(b)



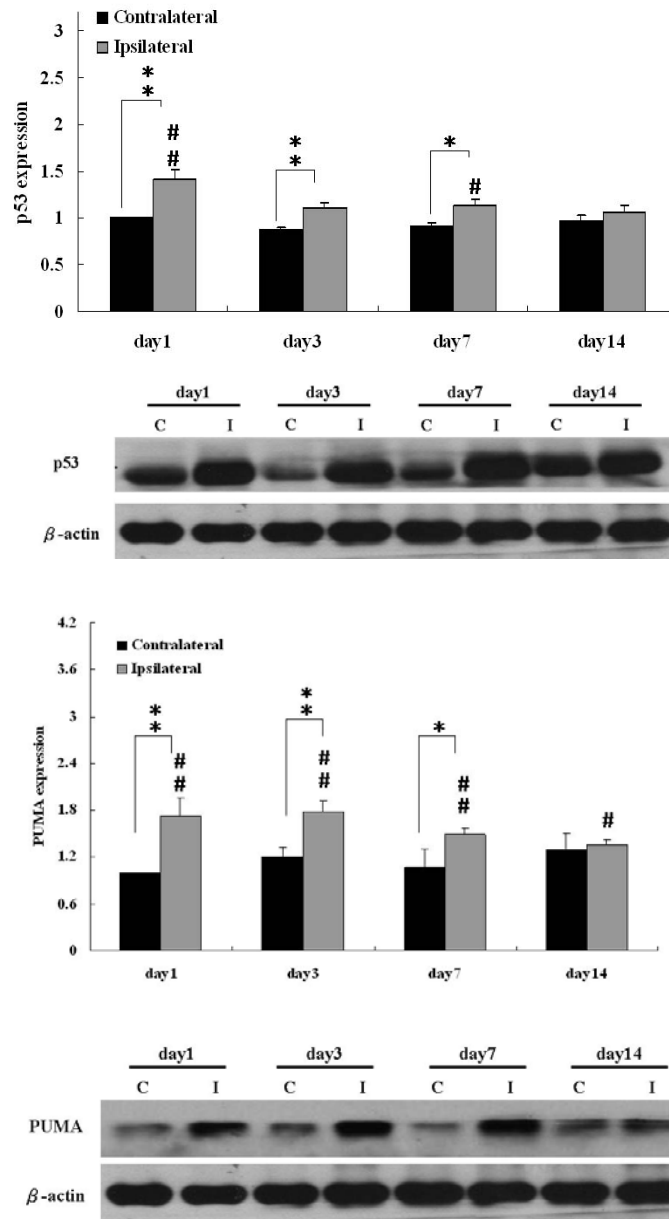
圖十五、腦缺血再灌流後抗細胞凋亡蛋白之表現。

大鼠腦缺血再灌流後在不同時間血液再灌流下給予犧牲，收取大腦皮質組織，利用西方轉漬法分析 FLIP-S 與 FLIP-L 的表現，其 C 代表正常側 (contralateral)；I 代表梗塞側 (ipsilateral)。測量時 β -actin 為 Internal control，並以腦缺血再灌流後第 1 天數值為 1 作為各個組別的對照。數據以 mean \pm SEM 值表示。# 表示 $P < 0.05$ ，## 表示 $P < 0.01$ ，腦缺血再灌流後第 1 天 contralateral 與各個時間點的 ipsilateral 的比較。* 表示 $P < 0.05$ ，** 表示 $P < 0.01$ ，腦缺血再灌流後各個時間點 contralateral 與 ipsilateral 的比較 (n=6)。



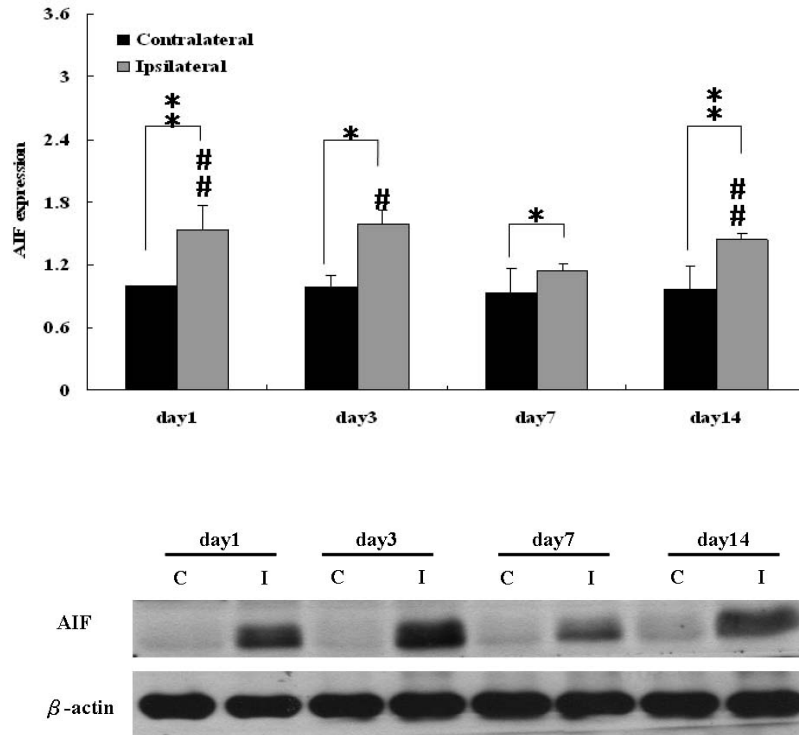
圖十六、腦缺血再灌流後內源性細胞凋亡相關因子的表現。

大鼠腦缺血後在不同時間血液再灌流下給予犧牲，收取大腦皮質組織，萃取蛋白質，利用西方轉漬法分析內源性細胞凋亡相關因子 Bcl-2、Bcl-xL、Bad、Bax 的表現，其 C 代表正常側(contralateral)；I 代表梗塞側(ipsilateral)。測量時 β -actin 為 Internal control，並以腦缺血再灌流後第 1 天數值為 1 作為各個組別的對照。數據以 mean \pm SEM 值表示。# 表示 $P < 0.05$ ，## 表示 $P < 0.01$ ，腦缺血再灌流後第 1 天 contralateral 與各個時間點的 ipsilateral 的比較。* 表示 $P < 0.05$ ，** 表示 $P < 0.01$ ，腦缺血再灌流後各個時間點 contralateral 與 ipsilateral 的比較 (n=6)。



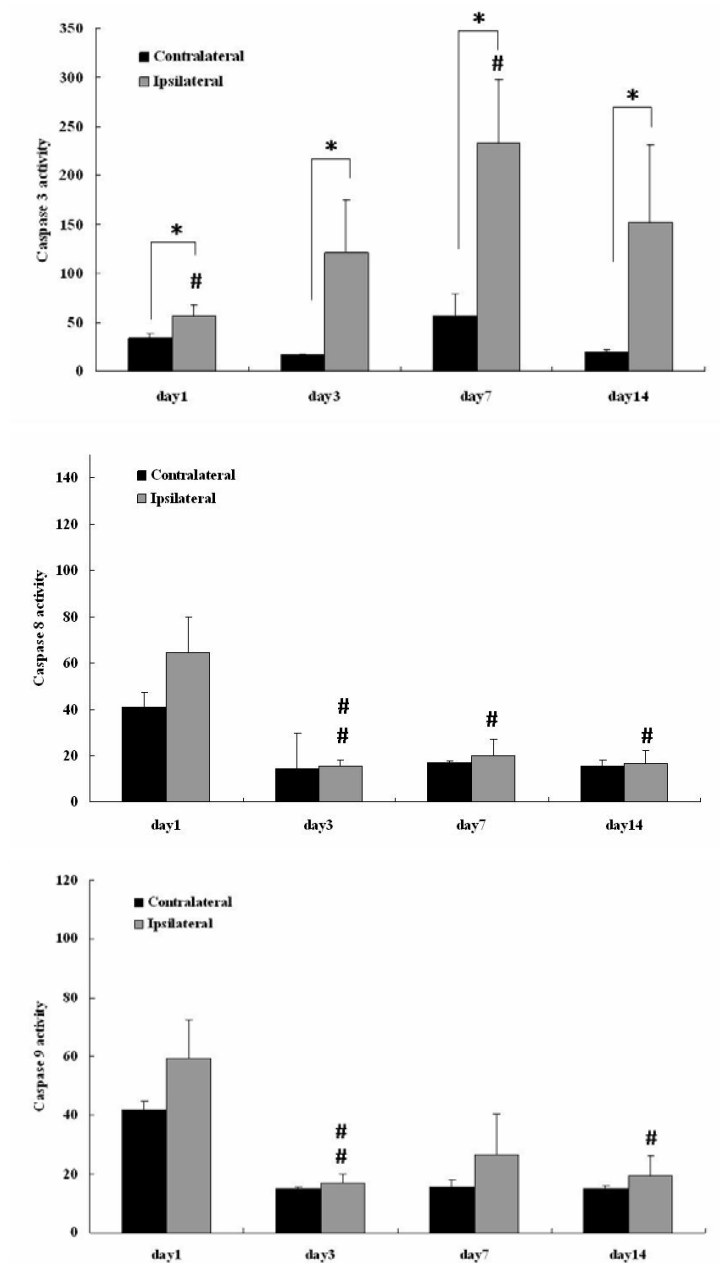
圖十七、腦缺血再灌流後轉錄因子調控之表現。

大鼠腦缺血後在不同時間血液再灌流下給予犧牲，收取大腦皮質組織，萃取蛋白質利用西方轉漬法分析轉錄因子調控相關之 p53 與 PUMA 表現，其 C 代表正常側 (contralateral)；I 代表梗塞側 (ipsilateral)。測量時 β -actin 為 Internal control，並以腦缺血再灌流後第 1 天數值為 1 作為各個組別的對照。數據以 mean \pm SEM 值表示。# 表示 $P < 0.05$ ，## 表示 $P < 0.01$ ，腦缺血再灌流後第 1 天 contralateral 與各個時間點的 ipsilateral 的比較。* 表示 $P < 0.05$ ，** 表示 $P < 0.01$ ，腦缺血再灌流後各個時間點 contralateral 與 ipsilateral 的比較 (n=6)。



圖十八、腦缺血再灌流後細胞凋亡誘導因子 AIF 的蛋白質表現。

大鼠腦缺血後在不同時間血液再灌流下給予犧牲，收取大腦皮質組織，萃取蛋白質，利用西方轉漬法分析 AIF 的蛋白質表現，其 C 代表正常側(contralateral)；I 代表梗塞側(ipsilateral)。測量時 β -actin 為 Internal control，並以腦缺血再灌流後第 1 天數值為 1 作為各個組別的對照。數據以 mean \pm SEM 值表示。# 表示 $P < 0.05$ ，## 表示 $P < 0.01$ ，腦缺血再灌流後第 1 天 contralateral 與各個時間點的 ipsilateral 的比較。* 表示 $P < 0.05$ ，** 表示 $P < 0.01$ ，腦缺血再灌流後各個時間點 contralateral 與 ipsilateral 的比較 (n=6)。



圖十九、腦缺血再灌流後 Caspase 3、Caspase 8 及 Caspase 9 的活性分析。

大鼠腦缺血後在不同時間血液再灌流下給予犧牲，收取大腦皮質組織，萃取蛋白質，利用免疫螢光法分析 Caspase 3、Caspase 8 及 Caspase 9 的活性。數據以 mean ± SEM 值表示。# 表示 P < 0.05，## 表示 P < 0.01，腦缺血再灌流後第 1 天 contralateral 與各個時間點的 ipsilateral 的比較。* 表示 P < 0.05，** 表示 P < 0.01，腦缺血再灌流後各個時間點 contralateral 與 ipsilateral 的比較 (n=6)。

参考文献

- Acehan D., Jiang X., Morgan D.G., Heuser J.E., Wang X. and Akey, C.W. (2002) Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Cell* **9(2)**: 423-32.
- Albensi B.C., Mattson M.P. (2000) Evidence for the involvement of TNF and NF-B in hippocampal synaptic plasticity. *Synapse* **35**: 151-159.
- Altman F.P., (1976) Tetrazolium salts and formazans. *Prog Histochem Cytochem* **9**: 1-56.
- Anderson M, F., Blomstrand, F., Blomstrand, C., Eriksson, P.S., and Nilsson, M. (2003) Astrocytes and stroke: networking for survival? *Neurochem Res* **28**: 293-305.
- Benchoua A., Guegan C., Couriaud C., Hosseini H., Sampaio N., Morin D., Onteniente B., (2001) Specific caspase pathways are activated in the two stages of cerebral infarction. *Neuroscience* **21**: 7127-7134.
- Bertin J. (2002) Death effector domain-containing herpesvirus and poxvirus proteins inhibit both Fas and TNFR1-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci* **94**: 1172-1176.
- Benveniste H. (1991) The excitotoxin hypothesis in relation to cerebral ischemia. *Cerebrovasc Brain Metab Rev.* **3(3)**: 213-45.
- Buck B.H, Liebeskind D.S., Saver J.L., Bang O.Y., Yun S.W., Starkman S. (2008) Early neutrophilia is associated with volume of ischemic tissue in acute stroke. *Stroke* **39**: 355-60.
- Chen L., Willis S.N., Wei A. (2005) Differential Targeting of Prosurvival Bcl-2 Proteins by Their BH3-Only Ligands Allows Complementary Apoptotic Function. *Cell* **17**: 393-403.
- Choi D.W. Calcium: still center-stage in hypoxic-ischemic neuronal death. (1995)*Neuroscience* **18**: 58-60.
- Danton G.H., Dietrich W.D. (2003) Inflammatory mechanisms after ischemia and stroke. *Neuropathol Exp Neurol* **62**: 127-36.
- DeVries A.C., Nelson R.J., Traystman R.J., Hurn P.D. (2001) Cognitive and behavioral assessment in experimental stroke research: will it prove useful? *Neurosci. Biobehav.* **25**: 325-42.
- Dirnagl U. (1999) Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Neuroscience* **22**: 391-7.
- Dirnagl U., Klehmet J., Braun J.S., Harms H., Meisel C., Ziemssen T., Prass K., Meisel A. (2007). Stroke-induced immunodepression: experimental evidence and clinical relevance. *Stroke* **38**: 770-773.
- Dyker A.G., and Lees, K.R. (1996) The rationale for new therapies in acute ischaemic stroke. *J Clin Pharm Ther* **21**: 377-391.
- Earnshaw, W.C., Martins, L.M., Kaufmann, S.H., 1999. Mammalian caspases: structure,

- activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu. Rev Biochem.* **68**, 383- 424.
- Ferri K.F., Jacotot E., Blanco J., Este J.A., Zamzami N., Susin S.A., Xie Z., Brothers G., Reed J.C., Penninger J.M., Kroemer G. (2000) Apoptosis control in syncytia induced by the HIV Type 1-Envelope Glycoprotein Complex. Role of mitochondria and caspases. *Exp Med* **192** :1081-1092.
- Fisher M., and Tatlisumak, T. (2005) Use of animal models has not contributed to development of acute stroke therapies: con. *Stroke* **36**: 2324-2325.
- Grau A.J., Reis A., Buggle F., Al-Khalaf A., Werle E., Valois N. (2001) Monocyte function and plasma levels of interleukin-8 in acute ischemic stroke. *Neuroscience* **192**: 41-7.
- Gross A., McDonnell J.M., Korsmeyer S.J. (1999) BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* **13**: 1899-1911.
- Hamann G.F., Strittmatter M., Hoffmann K.H. (1995) Pattern of elevation of urine catecholamines in intracerebral haemorrhage. *Acta Neurochir* **132**: 42-7.
- Hayes R.L., Whitson J.S., Kampfl A., Zhao X., Dixon C.E. (1995) Brief potassium depolarization decreases levels of neurofilament proteins in CNS culture. *Brain Res.* **694(1-2)**: 213-22.
- Hne N.D., Benot H., Laurent C., Myriam L., Mickael D., Jean J.R., Jacques H.A. (2009) Post-ischemic helium provides neuroprotection in rats subjected to middle cerebral artery occlusion-induced ischemia by producing hypothermia. *Cerebral Blood Flow & Metabolism* **29**: 1159-1165.
- Hoffman P.N., Griffin J.W. & Price D.L. (1984) Control of neurofilament caliber by neurofilament transport. *J Cell Biol* **99**: 705-714.
- Hossmann K.A, and Takagi S. (1976) Osmolality of brain in cerebral ischemia. *Exp Neurol* **51**: 124-131.
- James J.V., Julie A., Ellison K.K., Kikly P.A., Sper F.C. Barone and Giora Z.F. (1999) Caspase 8 and Caspase 3 are expressed by different populations of cortical neurons undergoing delayed cell death after focal stroke in the rat. *Neuroscience* **19(14)**: 5932-5941.
- Jeffers J.R., Parganas E., Lee Y., Yang C., Wang J., Brennan J., MacLean K.H., Han J., Chittenden T., Ihle J.N., McKinnon P.J., Cleveland J.L., Zambetti G.P. (2003) PUMA is an essential mediator of p53-dependent and -independent apoptotic pathways. *Cancer Cell* **4**: 321-328.
- Jonsson A.C., Lindgren I., Norrving B. and Lindgren A. (2008). Weight loss after stroke: a population-based study from the Lund Stroke Register. *Stroke* **39**: 918-923.
- Juhler M., Barry D.I., Offner H., Konat G., Klinden L. and Paulson O.B. (1984) Blood-brain and blood-spinal cord barrier permeability during the course of experimental allergic encephalomyelitis in the rat. *Brain Res* **302**: 347-355.
- Karpiak S.E., Tagliavia A., Wakade C.G. (1989) Animal models for the study of drugs in ischemic stroke. *Annu. Rev* **29**: 403-14.
- Kassner A T., Roberts B L., Moran F L., Silver and Mikulis D J., (2009) Recombinant tissue plasminogen activator increases blood-brain barrier disruption in acute ischemic stroke: an

- MR imaging permeability study. *Neuroradiology* **30**: 1864-1869.
- Kirino T. (2000) Delayed neuronal death. *Neuropathology* **20**: S95-97.
- Kitagawa K., Matsumoto M., Tsujimoto Y., Ohtsuki T., Kuwabara K., Matsushita K., Yang G., Tanabe H., Martinou J.C., Hori M., Yanagihara T., Chan P.H. (1998) Amelioration of hippocampal neuronal damage after global ischemia by neuronal overexpression of BCL-2 in transgenic mice. *Stroke* **29**: 2616-2621.
- Kreutzberg G.W. (1996). Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Neuroscience* **19**: 312-318.
- Liou A.K., Clark R.S., Henshall D.C., Yin X.M., Chen J. (2003) To die or not to die for neurons in ischemia, traumatic brain injury and epilepsy: a review on the stress-activated signaling pathways and apoptotic pathways. *Prog Neurobiol* **69**:103-142
- Liszcak T.M., Hedley-Whyte E.T., Adams J.F., Han D.H., Kolluri V.S., Vacanti F.X, Heros R.c.& Zervas N.T. (1984) Limitations of tetrazolium salts in delineating infarcted brain. *Acta.Neuropathol.***65**: 150-157.
- Locksley R.M., Killeen N., Lenardo M.J. (2001) The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* **104**: 487-501.
- Loh H.H., Liu H.C., Cavalli A., Yang W., Chen Y.F., and Wei L.N. (1998) Opioid receptor knockout in mice: effects on ligand-induced analgesia and morphine lethality. *Brain Res* **54**: 321-326.
- Longa E.Z., Weinstein P.R., Carlson S., Cummins R. (1989) Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* **20**: 84-91.
- Love S. (1999) Oxidative stress in brain ischemia. *Brain Pathol* **9**: 119-31.
- Luo X., Budihardjo I., Zou H., Slaughter C., Wang X. (1998) Bid a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* **94**: 481- 490.
- Maiken N., Nancy A.O., Guo F.T., Xiaoning H., Weiguo P., Takahiro T., Bruce R. (2008) Loss of astrocytic domain organization in the epileptic brain. *Neuroscience* **28**: 3264-3276.
- Mandai K., Matsumoto M., Kitagawa K., Matsushita K., Ohtsuki T., Mabuchi T., Colman D.R., Kamada T., and Yanagihara T. (1997) Ischemic damage and subsequent proliferation of oligodendrocytes in focal cerebral ischemia. *Neuroscience* **77**: 849-861.
- Manuel Zimmer J.M., Gray N.P., Andy J. Chang D.S., Karow M.A., Marletta M.L., Hudson D.B., Morton N.C., Cornelia I.B. (2009) Neurons Detect Increases and Decreases in Oxygen Levels Using Distinct Guanylate Cyclases. *Neuron* **26**: 865-879.
- Mark D., Vinzenz B., Marco S., Oliver P., Bettina G., Kerstin G., Stefanie E., Constanze B., Etienne J., David C., Michael O., Christoph B. and Ursula F.M. (2008) A critical Role for Fas/CD-95 dependent signaling pathways in the pathogenesis of hyperoxia-induced brain injury. *Ann Neurol* **64**:664-673.
- Marsden V.S., Strasser A. (2003) Control of apoptosis in the immune system: Bcl-2, BH3-only

- proteins and more. *Annu Rev Immunol* **21**: 71-105.
- Martin-Villalba A., Herr I., Jeremias I., Hahne M., Brandt R., Vogel J. (1999) CD95 ligand (Fas-L/APO-1) and tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand mediate ischemia-induced apoptosis in neurons. *Neuroscience*. **19**: 3809-3817.
- Martin L.J., Al-Abdulla N.A., Brambrink A.M., Kirsch J.R., Sieber F.E., Portera C. (1998) Neurodegeneration in excitotoxicity, global cerebral ischemia, and target deprivation: A perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. *Brain Res* **46**: 281-309.
- Mihara M., Erster S., Zaika A., Petrenko O., Chittenden T., Pancoska P. and Moll U.M. (2003). p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Cell* **11(3)**: 577-90.
- Morioka T., Kalehua A.N., Streit W.J. (1993) Characterization of microglial reaction after middle cerebral artery occlusion in rat brain. *Comp Neurol* **327**:123–132.
- Morita-Fujimura Y., Fujimura M., Kawase M., Chen S.F., Chan P.H. (1999) Release of mitochondrial cytochrome *c* and DNA fragmentation after cold-injury-induced brain trauma in mice: possible role in neuronal apoptosis. *Neuroscience Lett*. **267**: 20
- Morrison R.S., Kinoshita Y., Johnson M.D., Guo W., Garden G.A. (2003) p53-dependent cell death signaling in neurons. *Neurochem Res* **28**: 15-27.
- Nobuyuki K., Walter S., Steven R.E., Lorris B.A., Richard F.K. (1999) Blood-brain barrier glutamine transport during normoglycemic and hyperglycemic focal cerebral ischemia. *Cerebral Blood Flow & Metabolism* **19**: 79-86.
- Offner H., Subramanian S., Parker S.M., Wang C., Afentoulis M.E., Lewis A., Vandenbark A.A., Hurn P.D. (2006) Splenic atrophy in experimental stroke is accompanied by increased regulatory T cells and circulating macrophages. *Immunol* **176**: 6523-6531.
- Pan J., Konstas A.A., Bateman B., Ortolano G.A., Pile-Spellman J. (2007) Reperfusion injury following cerebral ischemia: pathophysiology, MR imaging, and potential therapies. *Neuroradiology* **49**: 93-102.
- Ransom B. (2003) New roles for astrocytes (stars at last). *Neurosciences* **26**: 520-522.
- Reddy S.T., Herschman H.R. (1997) Prostaglandin synthase-1 and Prostaglandin synthase-2 are coupled to distinct phospholipases for the generation of Prostaglandin D2 in activated mast cells. *Bio Chem* **272**: 3231-3237.
- Ringelstein E.B., Biniek R., Weiller C., (1992) Ammeling B., Nolte P.N., Thron A. Type and extent of hemispheric brain infarctions and clinical outcome in early and delayed middle cerebral artery recanalization. *Neurology* **42**: 289-98.
- Pisani A, Bonsi P, Calabresi P. (2004) Calcium signaling and neuronal vulnerability to ischemia in the striatum. *Cell Calcium* **36**: 277-284.
- Robinson R.G., Shoemaker W.J., Schlumpf M., Valk T., Bloom F.E. (1975) Effect of experimental cerebral infarction in rat brain on catecholamines and behaviour. *Nature* **255**: 332-4.
- Rock R.B., Gekker G., Hu S., Sheng W.S., Cheeran M., Lokensgard J.R., and Peterson P.K. (2004). Role of microglia in central nervous system infections. *Clin Microbiol Rev* **17**:

942-964.

- Roya K.F., Armelle M., Keli S., Octavian B., Zainab J., Alexandra R., Grassian. (2008) Apoptotic pathways in tumor progression and therapy. *Experimental Medicine and Biology* **10**: 978-1007.
- Salvesen G.S., Dixit V.M. (1999) Caspase activation: the induced-proximity model. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**: 10964-10967.
- Scaffidi C., Fuld S., Srinivasan A., Friesen C., Li F., Tomaselli K.J., Debatin K.M., Kramer P.H., Peter M.E., (1998) Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO* **17**: 1675-1687.
- Silver J., Miller J.H. (2004) Regeneration beyond the glial scar. *Neuroscience* **5**: 146-156.
- Slee E.A., Harte M.T., Kluck R.M., Wolf B.B., Casiano C.A., Newmeyer D.D., Wang H.G., Reed J.C., Nicholson D.W., Alnemri E.S., Green D.R. and Martin S.J. (1999) Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *Cell Biol* **144(2)**: 281-92.
- Smith W.S. (2004) Pathophysiology of focal cerebral ischemia: a therapeutic perspective. *J Vasc Interv Radiol* **15**: S3-12.
- Song H., Stevens C.F., Gage F.H. (2002) Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature* **41**: 39-44.
- Susin S.A., Lorenzo H.K., Zamzami N., Marzo I., Snow B.E., Brothers G.M., Mangion J., Jacotot E., Costantini P., Loeffler M., Larochette N., Goodlett D.R., Abersold R., Siderovski D.P., Penninger J.M., Kroemer G. (1999) Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* **397**: 441-446.
- Tamura A., Graham D.I., McCulloch J., Teasdale G.M. (1981) Focal cerebral ischemia in the rat: Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion. *Cereb. Blood Flow Metab* **1**: 53-60.
- Thome M. (1997) Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. *Nature* **386**: 517-521.
- Trendelenburg G., Dirnagl U. (2005) Neuroprotective role of astrocytes in cerebral ischemia: focus on ischemic preconditioning. *Glia* **50**: 307-320.
- Veronica A.A., Ganesh M.S., Brenda L. Bloodgood D. Selkoe J. and Bernardo L. Sabatini. (2008) Multiple levels of synaptic regulation by NMDA-type glutamate receptor in normal and disease states. *Alzheimer's Disease* 75-87.
- Villunger A., Michalak E.M., Coultas L. (2003) p53- and drug-induced apoptotic responses mediated by BH3-only proteins puma and noxa. *Science* **302**:1036-8.
- Vousden K.H. and Lu X. (2002) Live or let die: the cells response to p53. *Nat Rev Cancer* **2(8)**: 594-604.
- Wang H.D., Fukuda T., Suzuki T., Hashimoto K., Liou S.Y., Momoi T., Kosaka T., Yamamoto K., Nakanishi H. (1999) Differential effects of Bcl-2 overexpression on hippocampal CA1

neurons and dentate granule cells following hypoxic ischemia in adult mice. *Neuroscience* **57**: 1-12.

Wiessner C., Allegrini P.R., Rupalla K., Sauer D., Oltersdorf T., McGregor A.L., Bischoff S., Bottiger B.W., Van-der P.H., (1999) Neuron-specific transgene expression of Bcl-X(L) but not Bcl-2 genes reduced lesion size after permanent middle cerebral artery occlusion in mice. *Neuroscience. Lett* **268**: 119-122.

Xiao-Ming Y., Yumin L., Guodong C., Li B., Wei P., Diane K., and Jun C. (2002) Bid mediated Mitochondrial pathway is critical to ischemia neuronal apoptosis and focal cerebral ischemia. *Biological chemistry* **44**: 42074-42081.

Yamagami S., Tamura M., Hayashi M., Endo N., Tanabe H., Katsuura Y. (1999) Differential production of MCP-1 and cytokine-induced neutrophil chemoattractant in the ischemic brain after transient focal ischemia in rats. *Leukoc Biol* **65**: 744-9.

Zeller J.A., Lenz A., Eschenfelder C.C., Zunker P., Deuschl G. (2005) Platelet-leukocyte interaction and platelet activation in acute stroke with and without preceding infection. *Thromb Vasc Biol* **25**: 1519-23.