

行政院國家科學委員會專題研究計畫 期中進度報告

當歸食品加工技術之研究(2/3) 期中進度報告(精簡版)

計畫類別：個別型
計畫編號：NSC 95-2221-E-002-082-
執行期間：95年08月01日至96年07月31日
執行單位：國立臺灣大學食品科技研究所

計畫主持人：蔣丙煌

處理方式：期中報告不提供公開查詢

中華民國 96年06月01日

行政院國家科學委員會專題研究計畫執行進度報告

當歸食品加工技術之研究(2/3)

計畫編號：NSC 95-2221-E-002-082-

執行期限：95/08/01 ~ 96/07/31

報告日期：96年5月31日

主持人：蔣丙煌 國立台灣大學食品科技研究所

一、 中文摘要

本研究針對當歸萃取液中不同成分，開發具不同功能(抗氧化、保護神經細胞、補血及調節免疫)的保健食品。由不同萃取條件得到的萃取液，分析機能性成分含量及功能性的表現，嘗試建立各功能性產品的最適萃取條件，並找出各功能性的指標成分。將當歸以水及 20%酒精加熱不同時間所得到的萃取液進行機能性成分分析，同時探討各萃取液之抗氧化及抑制 NO 生成的活性。結果顯示 15 分鐘的酒精萃取條件有最好的效果。有文獻指出當歸具有保護神經細胞及抗記憶損傷的功能。本年度將測試當歸萃取液對於 β 類澱粉蛋白(β -Amyloid peptide; A β)所引起之神經細胞毒性的保護作用，並探討當歸萃取液保護由 A β 所造成之神經細胞毒性的可能機制。結果指出，A β_{25-35} 會造成神經母細胞瘤(mouse neuroblastoma; Neuro 2A)的細胞毒性，A β_{25-35} 降低 Neuro 2A 細胞存活率具劑量關係，其 LC₅₀ 為 14.9 μ M。當歸萃取液的處理可以降低由 A β_{25-35} 作用而上升之活性氧分子(ROS)而提高細胞的存活率。以 A β_{25-35} 作用的神經細胞有脂質過氧化現象(lipid peroxidation)且降低細胞中麩胱甘肽(glutathione)的含量，經加入當歸萃取液後可改善並恢復之。A β_{25-35} 作用的細胞明顯降低粒線體膜電位($\Delta \psi$)經由染劑處理以流式細胞儀觀察到細胞形成自噬空泡(membrane-bound degradative vacuole)且增大細胞質量。這些現象顯示，以 A β_{25-35} 處理細胞所引起的死亡方式是經由細胞自噬(autophagy)的類型。本實驗利用細胞自噬的特異性抑制劑 bafilomycin A1 及 3-methyladenine 作用細胞亦得到此結論的支持。當歸萃取液持有與 bafilomycin A1 及 3-methyladenine 相同的活性，這些結果指出，當歸可以有有效的保護神經細胞免於由 A β_{25-35} 造成之細胞自噬形式的毒性損傷。

關鍵字：當歸，類澱粉蛋白，氧化壓力，粒線體，細胞自噬，麩胱甘肽，細胞凋亡，*Angelica sinensis*, β -Amyloid peptide, ROS, mitochondria, autophagy, glutathione,

apoptosis

二、 緣由與目的

現今社會人口結構逐漸老化之際，有關神經退化或變異的疾病受到重視，神經退化性疾病(neurodegenerative disease)為一漸進式的病理過程，其期間會導致發病部位的神經元萎縮和消失。常見的神經退化性疾病包括有阿茲海默氏症(Alzheimer's disease, 簡稱 AD)、帕金森氏症(Parkinson's disease)、亨廷頓氏症(Huntington's disease)以及腦脊髓多發性硬化症(amyotrophic lateral sclerosis)，其中阿茲海默氏症更是受到許多學者的注意。AD 患者的初期症狀是短期記憶力的明顯衰退，無法記憶新的事物，伴隨有性格、脾氣的異常改變，到了後期連舊的記憶也都會遺忘，運動神經逐漸癱瘓停滯，最後衰弱至死。造成 AD 發生的原因相當多且複雜，包括了遺傳、氧化壓力、年齡、性別、教育及飲食生活習慣等，以下著重於氧化壓力與 AD 之間的關係加以探討。

細胞於能量代謝過程中會產生一些活性氧分子(Reactive oxygen species; ROS)，這些物質會促使細胞內的組成分子發生變異，細胞本身有一些抵禦的機制來防止這些事情的發生，一旦細胞產生的 ROS 與防禦系統失去平衡，即產生所謂的氧化壓力。由 AD 患者的腦中組織發現一些病徵，證明 AD 患者的腦中氧化壓力有增加的現象，如下所示：<1>患者腦中一些促進氧化生成自由基的金屬離子如 Fe、Al、Cu 濃度增加。<2>患者腦細胞的脂質有過氧化增加的情況，脂質過氧化的產物 4-hydroxynonenal (4-HNE)量增加許多，4-HNE 具有很強的細胞毒性，會抑制 DNA、RNA、蛋白質的合成、酵素的降解、及造成細胞內 Ca^{2+} 離子平衡失調，使細胞死亡。<3>患者腦細胞亦可發現蛋白質過氧化物(carbonyl compound)及 DNA 氧化產物 8-Hydroxyguanosine(8-OHG)，粒線體的 DNA 也有明顯氧化的情形。<4>粒線體內 Cytochrome c oxidase 活性降低，使粒線體能量代謝過程產生 ROS，並進一步傷害粒線體的細胞膜。<5>AD 患者腦部病理組織切片發現明顯類澱粉斑(amyloid plaques)的沉積及神經纖維糾結，類澱粉斑主要是由 β 類澱粉蛋白(β amyloid plaques; $A\beta$)在細胞外不正常地聚集而形成。 $A\beta$ 在經過聚合反應(aggregation)之後會形成具有 β -sheet 二級結構的纖維狀聚合物而具有

神經細胞毒性(Yankner 1996)。不同 β 類澱粉蛋白的片段， $A\beta_{1-40}$, $A\beta_{1-42}$, 或 $A\beta_{25-35}$ 在體內及體外都顯示具有毒性作用。

細胞程序性死亡包括細胞凋亡(apoptosis)及細胞自噬(autophagy)。細胞凋亡於型態學上的主要特徵是染色質發生早期凝集，產生凋亡小體(apoptotic body)且核膜相鄰的染色體降解形成 200 bp 的 DNA 片段。細胞自噬(autophagy)，被認為是非細胞凋亡或是第二類型的計畫性死亡(Type II Program Cell Death)。細胞自噬會產生細胞收縮(cell shrinkage)及形成大量的自體吞噬泡(Autophagic vacuoles; AVs)。自體吞噬泡是細胞自噬的一個顯著特徵，通過檢測粒線體、核糖體、細胞微粒中是否形成 AVs，可以斷定細胞是否發生細胞自噬(Lockshin and Zakeri 2004)。

細胞凋亡與細胞自噬尚不能明確的區分，因他們並不是完全獨立，毫不相關。Anglade 等(1997)發現帕金森氏病(Parkinson's Disease; PD)中的多巴胺能神經元細胞不僅可以通過凋亡程序死亡，而且還可通過細胞自噬過程發生降解。雖然並無建立細胞自噬及凋亡之間關聯的理論，但粒線體似乎在兩者之間皆扮演重要角色(Bras et al 2005)。Cohen 等(2002)陳述細胞凋亡與自噬死亡是經由粒線體膜滲透作用彼此聯結。學者認為具滲透性的粒線體開啟了細胞自噬作用，損傷的粒線體被囊泡包被，囊泡最後形成雙層膜結構即為自吞噬體(Autophagosome)。一些疾病包括神經性退化疾病觀察到細胞自噬作用，在阿滋海默氏症發現有 AVs 的蓄積，而 AVs 的數目增加為細胞自噬的早期現象。

當歸為繖形科植物 *Angelica sinensis* (Oliver) Diels 的乾燥根。主要產於甘肅省東南部的岷縣(秦州)。當歸具有補血、理血、調經及鎮痛等功能。在性味功能上當歸具有味甘、辛，性溫、補血、活血、調經、止痛、潤腸通便、減少經前症候群的不適、平衡女性荷爾蒙、幫助調經等功能。阿魏酸及蒿本內酯在當歸中的含量高且具有多種藥理作用，常被作為評價當歸藥材之指標活性成分。阿魏酸屬於低毒性的酚酸，在體內能夠被吸收及容易被代謝，阿魏酸曾經被報導具有多種生理功能，包括抗氧化、抗菌、抗發炎及抗癌的功能。有文獻指出阿魏酸具有保護神經細胞及抗記憶功能損傷的功能(Ou and Kwok 2004)。阿魏酸及構造類似阿

阿魏酸的酚類化合物可降低自由基對神經系統的損傷，而化合物本身對神經細胞則為非毒性。將 synaptosomal membrane systems 暴露於羥氧自由基及過氧自由基下，則蛋白質及脂質氧化增加，同時氧化壓力也提高。阿魏酸能夠減緩氧化的作用，而且較其他構造類似的酚類化合物(vanilic acid, cinnamic acid, coumaric acid)好。阿魏酸亦可保護自由基對 synaptosomal membrane systems 所造成的構形上的改變。Yan 等人(2001)在老鼠的內腦室注射 amyloid peptide $A\beta_{1-42}$ ，造成老鼠神經退化及記憶力減退。當在老鼠的飲水中加入 0.006% 的阿魏酸，讓老鼠連續飲用 28 天，明顯改善老鼠之記憶力減退。這個結果證明由 $A\beta$ 所誘發的神經毒性經長時間以阿魏酸處理，可降低 $A\beta$ 對腦部的毒性作用。因此建議阿魏酸可作為 AD 的化學防治藥劑之一。

阿魏酸為當歸非揮性的指標成分之一，具有抗氧化及保護神經細胞的功能，因此當歸萃取液應具有降低 $A\beta$ 對腦部的毒性作用。本年度實驗將測試當歸萃取液對於 $A\beta_{25-35}$ 所引發之神經細胞毒性的保護作用，亦探討當歸萃取液保護由 $A\beta_{25-35}$ 所造成之神經細胞毒性的可能機制為何？

三、 結果與討論

1. $A\beta_{25-35}$ 對神經母細胞瘤 Neuro-2A 的細胞毒性作用

將聚合後的 $A\beta_{25-35}$ 以不同的濃度作用 Neuro-2A，測試 $A\beta_{25-35}$ 對 Neuro-2A 的毒性作用(LD₅₀)。由圖 1 可知：以不同濃度(0.1、1、10、15 及 20 μM)的 $A\beta_{25-35}$ 處理 Neuro-2A，存活率隨 $A\beta_{25-35}$ 濃度的增加而減少，同時以顯微鏡觀察細胞的型態，亦可觀察到受傷型態的細胞隨 $A\beta_{25-35}$ 濃度的增加更加明顯。各濃度之間的毒性作用亦有顯著差異，經迴歸求得對 Neuro-2A 半致死的濃度(LD₅₀)為 14.9 μM ，再經統計分析得知 $A\beta_{25-35}$ 濃度增加為 20 μM 時的致死率與 15 μM 比較，無顯著增加，所以接下來的實驗決定以 15 μM 的 $A\beta_{25-35}$ 進行對細胞毒性作用的濃度。

2. 當歸萃取液對 $A\beta_{25-35}$ 毒殺神經母細胞瘤 Neuro-2A 的保護作用

將不同溶劑及不同時間點得到的當歸萃取液，比較其保護神經細胞抑制

A β ₂₅₋₃₅ 毒性作用的效果如圖 2A 所示。當歸萃取液對 A β ₂₅₋₃₅ 所造成的毒性作用具有保護的效果，單獨以 A β ₂₅₋₃₅ 處理細胞，細胞的存活率只有 55.7%，而各當歸萃取液皆能提升細胞的存活率達到 80%以上，與單獨處理 A β ₂₅₋₃₅ 的組別比較，有顯著的差異(p<0.0001)，各萃取液之間的保護效果則顯示無差異存在(p>0.01)，表示萃取具抗氧化及保護神經細胞之當歸萃取物，萃取 15 分鐘即足夠，此結果與第一年成果報告中建議之萃取條件吻合，因此本實驗以酒萃 15 分鐘之當歸萃取液為本實驗之樣品萃取條件進行保護神經細胞機制之探討。不同劑量的當歸萃取液保護神經細胞的效果如圖 2B 所示，濃度為 200 μ g/mL 有顯著的保護效果。阿魏酸是當歸的主要活性成分，以 A β ₂₅₋₃₅ 作用 Neuro 2A 並給予不同濃度的阿魏酸(0~20 μ g/mL)及相同濃度(20 μ g/mL)不同的有機酸進行保護效果的探討，結果如圖 2C 及圖 2D 所示。阿魏酸在 4 μ g/mL 時顯著提高 Neuro 2A 的存活率(p<0.05)，有機酸的部份則以鄰苯二甲酸(phthalic acid)顯示具有保護效果。

3. 細胞內 ROS 的測定

以 A β ₂₅₋₃₅ 處理 Neuro-2A 不同的時間，加入螢光染劑 DCFH-DA 細胞內 ROS 含量的變化。脂溶性的 DCFH-DA(2',7'-dichlorofluorescein Diacetate)可自由通過細胞膜，並在細胞內被水解成水溶性的 DCFH 並滯留細胞內，如遇有 H₂O₂ 等自由基則會被氧化成為發前綠色螢光的 DCF，所發散的螢光則可反映出細胞內 ROS 的濃度。經 A β ₂₅₋₃₅ 作用不同時間(15, 30, 60, 90 min)之 Neuro-2A，細胞內 ROS 的變化如圖 3A 所示。當加入 A β ₂₅₋₃₅ 15 及 30 分鐘時螢光強度顯著增加，作用時間延長後螢光強度反而下降。若同時加入當歸萃取液(0, 50, 100 及 200 μ g/mL)作用細胞，圖 3B 顯示當歸萃取液可將細胞內的 ROS 清除，使螢光強度下降至與控制組相同。有報告指出抗氧化劑可以降低氧化壓力的病理傷害，但是評估抗氧化劑時最重要的首要條件是該試劑對細胞是無毒性的。本實驗使用的當歸萃取液不但具有抗氧化及保護神經細胞的功能，而且不會造成細胞的毒性。

4. 細胞脂質過氧化的測定

細胞膜的脂質含有多元不飽和脂肪酸，容易受到 ROS 的攻擊而形成大量

的脂質過氧化產物，使細胞損傷導致死亡。由 $A\beta_{25-35}$ 作用細胞導致脂質過氧化作用以 TBARS 值分析之。其原理為不飽和脂肪酸經氧化生成之氧化物，會與加入的硫巴比妥酸(Thiobarbituric acid; TBA)生成紅色色素，此紅色色素為丙二烯(malonaldehyde)和 TBA 的縮合物，在 532 nm 波長下會有極大吸收。Neuro 2A 細胞以 $A\beta_{25-35}$ 處理 24 小時後脂質過氧化現象顯著提高，當加入不同濃度的當歸萃取液(50~200 $\mu\text{g}/\text{mL}$)，顯著降低脂質過氧化的情形($p < 0.05$) (圖 4)。當歸萃取液的劑量高達 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 尚不會造成細胞的毒性反應，因此認為當歸萃取液降低脂質過氧化作用，並不是因為造成細胞數目減少所致，而是當歸萃取液的抗氧化能力抑制脂質過氧化的作用。

5. 細胞麩胱甘肽(glutathione)含量的測定

麩胱甘肽是細胞內主要的非蛋白質含硫成分，具有清除自由基的能力，是細胞內主要的抗氧化劑。當麩胱甘肽平衡失調時，可能造成神經性退化疾病。在帕金森氏症的病理學中指出，麩胱甘肽含量降低，改變了體內抗氧化的防禦能力。本實驗利用 CMF-DA 螢光染劑以流式細胞儀觀察細胞中麩胱甘肽含量的變化。結果顯示，以 $A\beta_{25-35}$ 處理後，細胞中 GSH 含量明顯下降， $A\beta$ 作用 1 小時後，GSH 含量下降至控制組的 79%(圖 5A)，當以 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的當歸萃取液處理後，細胞中的 GSH 含量則可以恢復至正常(圖 5B)。

6. 粒線體膜電位的測定

細胞粒線體膜電位的改變是細胞程序性死亡的關鍵指標。本實驗使用 Rhodamine 123 螢光染劑以流式細胞儀觀察細胞粒線體膜電位的變化。結果顯示，以 $A\beta_{25-35}$ 處理後，細胞粒線體膜電位明顯下降，處理 4 小時後之螢光強度下降至控制組的 66%(圖 6A)。當以當歸萃取液處理後，膜電位提高且與當歸萃取液作用濃度的增加成劑量關係，當歸萃取液作用濃度為 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 時細胞粒線體膜電位可以恢復至正常(105%; 圖 6B)。

7. 自體吞噬泡的觀察

第二類型的計畫性死亡(Type II Program Cell Death)或細胞自噬(autophagy)的特徵是形成大量的自體吞噬泡(Autophagic vacuoles; AVs)及細胞質量變大。Neuro 2A 以 $A\beta_{25-35}$ 處理 48 小時後，以電子顯微鏡進行觀察。如圖 7A 所示，細

胞以 $A\beta_{25-35}$ 處理 48 小時後，自體吞噬泡(Autophagic vacuoles; AVs)增加，當以當歸萃取液處理後，細胞中自吞噬體(Autophagosome)明顯減少。同時利用螢光染料 NAO 與 cardiolipin 反應，用以測定粒線體質量。結果顯示細胞以 $A\beta_{25-35}$ 處理 48 小時後，螢光值增加為控制組的 122%，顯示粒線體質量增加，此現象亦於電子顯微鏡結果觀察到(圖 7A)。bafilomycin A1 及 3-methyladenine 為細胞自噬的特異性抑制劑，利用 bafilomycin A1 及 3-methyladenine 作用 $A\beta_{25-35}$ 處理過的細胞，結果顯示 NAO 螢光值明顯下降，顯示 $A\beta_{25-35}$ 造成的細胞自噬作用(粒線體質量增加)可經由 bafilomycin A1 及 3-methyladenine 作用抑制之(圖 7B)。以當歸萃取液作用 $A\beta_{25-35}$ 處理過的細胞，結果顯示當歸萃取液可降低由 $A\beta_{25-35}$ 作用而增加的 NAO 螢光強度，此結果支持當歸萃取液持有與 bafilomycin A1 及 3-methyladenine 相同的活性，當歸應可以有效的保護神經細胞免於由 $A\beta_{25-35}$ 所造成之細胞自噬的毒性損傷。

四、 結論

當歸有多種成分包括阿魏酸及萜本內酯已被鑑定，阿魏酸是當歸非揮發性區分中的主要活性成分，含有多種藥理功能，包括抗氧化、抗發炎、抗血栓及抗癌活性。文獻中指出阿魏酸及構造類似阿魏酸的酚類化合物可降低自由基對神經系統的損傷，而化合物本身對神經細胞則為非毒性。長時間飲用添加阿魏酸之飲水，可降低 $A\beta$ 對腦部所造成的毒性作用。本實驗以當歸萃取液 200mg/mL 的劑量可顯著改善因 $A\beta$ 作用所造成的神經毒性。若單獨以阿魏酸進行實驗，達到相同保護作用的劑量是 4 $\mu\text{g/mL}$ (圖 2C)。當歸萃取液中含有 nicotinic acid、phthalic acid 及 coumaric acid (表 1)，以相同濃度(20 $\mu\text{g/mL}$)進行實驗，只有 phthalic acid 顯示具有保護功能。換算萃取物中阿魏酸的含量約為 0.326 $\mu\text{g/mL}$ (表 1)，將當歸萃取液測定之阿魏酸及 phthalic acid 濃度相加，濃度遠低 20 $\mu\text{g/mL}$ ，此結果說明阿魏酸及其它成分共同扮演保護神經細胞免於 $A\beta$ 毒性作用的功能。因此我們認為當歸萃取液保護 $A\beta$ 造成 Neuro 2A 之細胞自噬，應是阿魏酸、nicotinic acid、phthalic acid、coumaric acid 及一些未被鑑定之微量成分的協同作用(synergistically)所致。

五、參考文獻

1. Yankner, B. A. Mechanisms of neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *Neuron* **1996**, 16, 921-932.
2. Lockshin, R. A.; Zakeri, Z. Apoptosis, autophagy, and more. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2004**, 36, 2405-2419.
3. Anglade, P.; Vyas, S.; Javoy-Agid, F.; Herrero, M. T.; Michel, P. P.; Marquez, J.; Mouatt-Prigent, A.; Ruberg, M.; Hirsch, E. C.; Agid, Y. Apoptosis and autophagy in nigral neurons of patients with Parkinson's disease. *Histol. Histopathol.* **1997** 12(1) 25-31.
3. Bras, M.; Queenan, B.; Susin, S. A. Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying. *Biochem. (Mosc)* **2005**, 70, 231-239.
4. Cohen, I.; Castedo, M.; Kroemer, G. Tantalizing thanatos: unexpected links in death pathways. *Trends. Cell Biol.* **2002**, 12, 293-295.
5. Ou S, Kwok KC. Review: Ferulic acid: Pharmaceutical functions, preparation and applications in foods. *J. Sci. Food Agric.* **2004**, 84 : 1261-1269.
6. Yan, J. J.; Cho, J. Y.; Kim, H. S.; Kim, K. L.; Jung, J. S.; Huh, S. O.; Suh, H. W.; Kim, Y. H.; Song, D. K. Protection against β -amyloid peptide toxicity in vivo with long-term administration of ferulic acid. *Brit. J. pharmacol.* **2001**, 133, 89-96.
7. 張季平。1996。當歸-現代醫學的研究。藥學雜誌。12(3)：94-102。
8. Schulz, J. B.; Lindenau, J.; Seyfried, J.; Dichgans, J. Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. *Eur J Biochem* **2000**, 267: 4904-4911
9. Marchetti, P.; Castedo, M.; Susin, S.A.; Zamzami, N.; Hirsch, T.; Macho, A.; Haeflner, A. Mitochondrial permeability transition is a central coordinating event of apoptosis. *J. Exp. Med.* **1996**, 184: 1155-1160

Table 1. Phenolic compounds in *Angelica sinensis* ethanol extracts

Phenolics	Content (mg/g)
Total polyphenols GAE ^A	10.990 ± 0.074
Nicotinic acid	0.198 ± 0.017
Phthalic acid	0.041 ± 0.003
Coumaric acid	0.156 ± 0.032
Ferulic acid	1.630 ± 0.037

Mean ± Standard deviation (n=3)

^A GAE represents gallic acid equivalent.

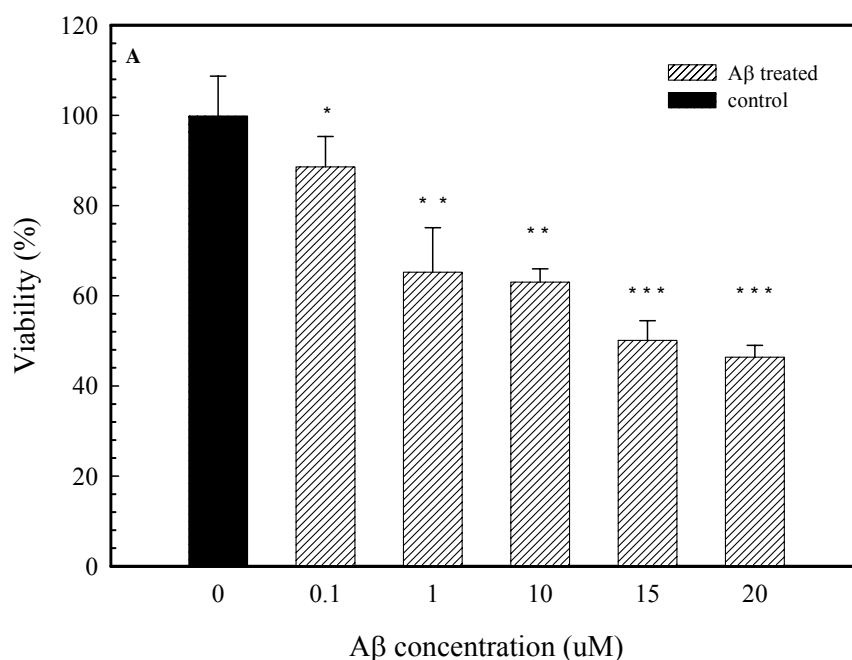


Figure 1. Aβ-induced neurotoxicity on mouse Neuro 2A cells. * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001. (compared with control) (A).

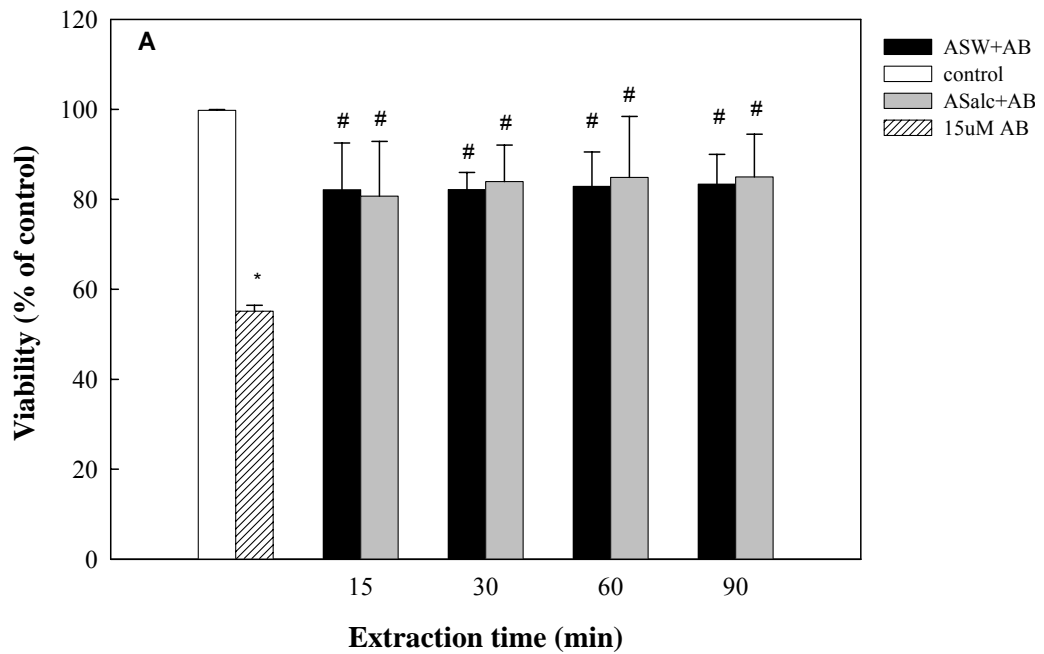


Figure 2A *A. sinensis* extracts protected mouse Neuro2A cells from A β -induced neurotoxicity. Treatment of mouse Neuro-2A cells with the toxic fragment of fibril A β 25-35 for 48 hr decreased cell viability was measured by MTT assay. *A. sinensis* extracts reduced the A β -induced neurotoxicity. * $p < 0.0001$, # $p > 0.01$. (compare with control). ASW: water extraction; ASalc: Alcohol extraction.

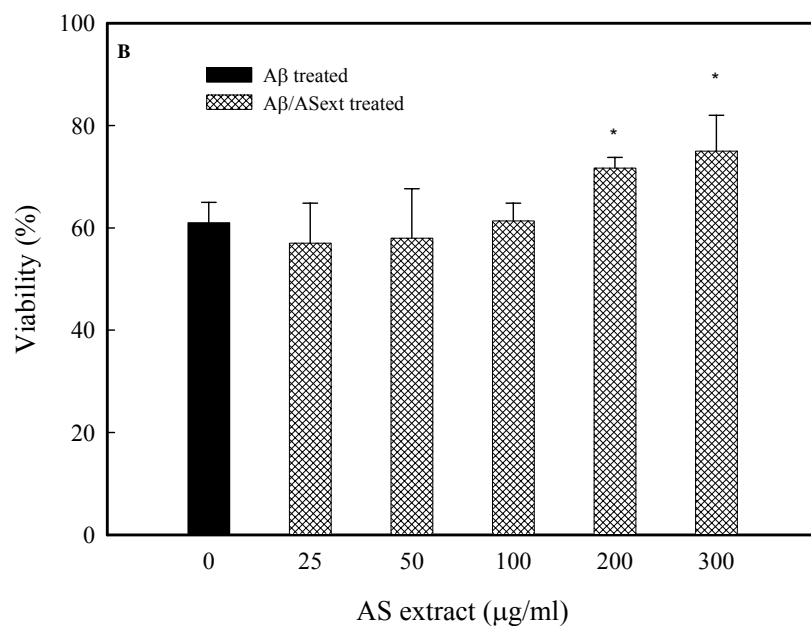


Figure 2B

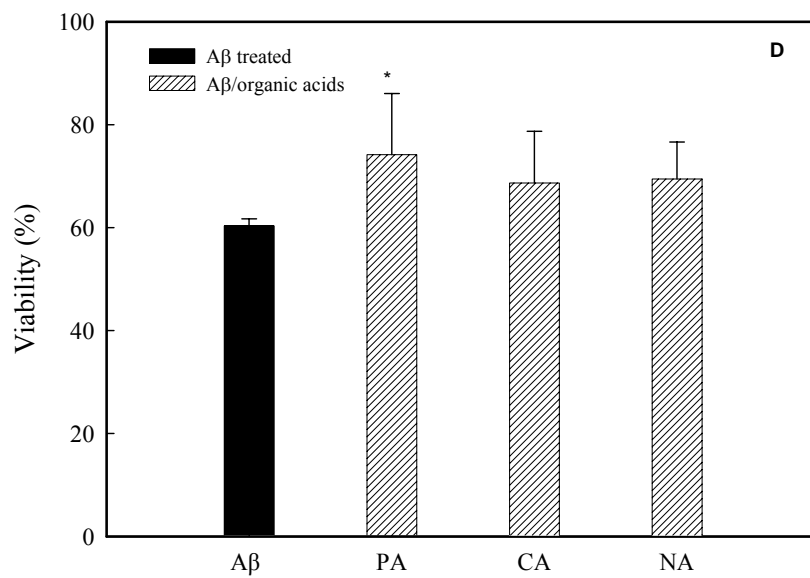
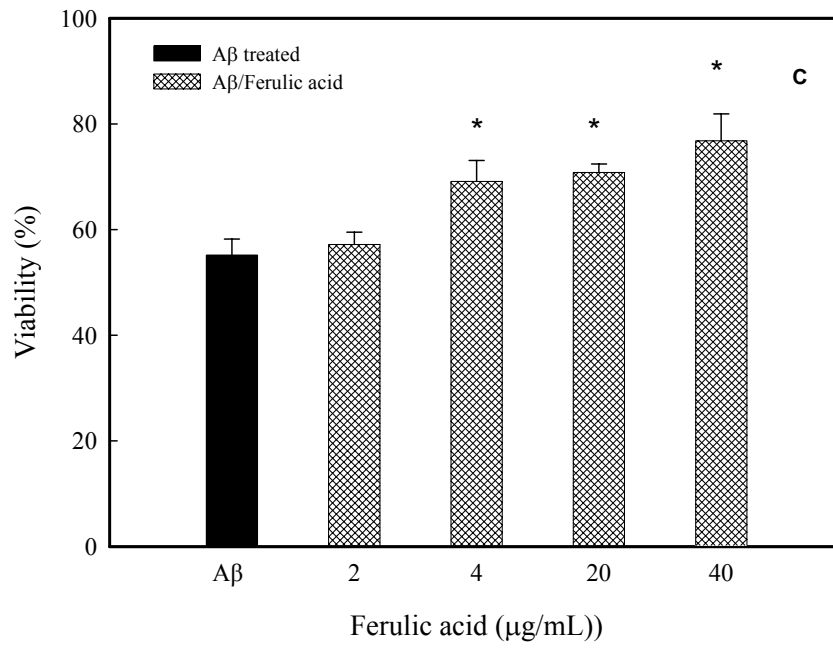


Figure 2. The protective effect of ASext (**B**), ferulic acid (**C**) and phenolic acids (**D**) on A β -induced neurotoxicity. * $p < 0.05$, compared with A β -treated sample. FA: ferulic acid; PA: phthalic acid; CA: coumaric acid; NA: nicotinic acid.

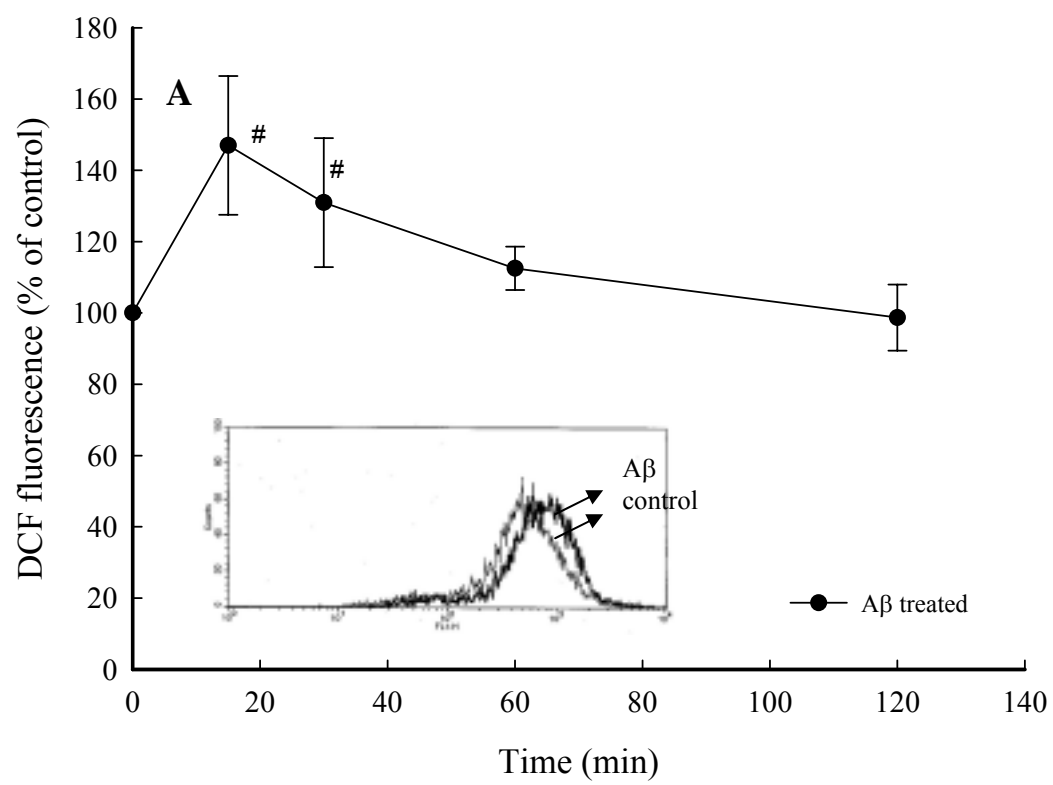


Figure 3A

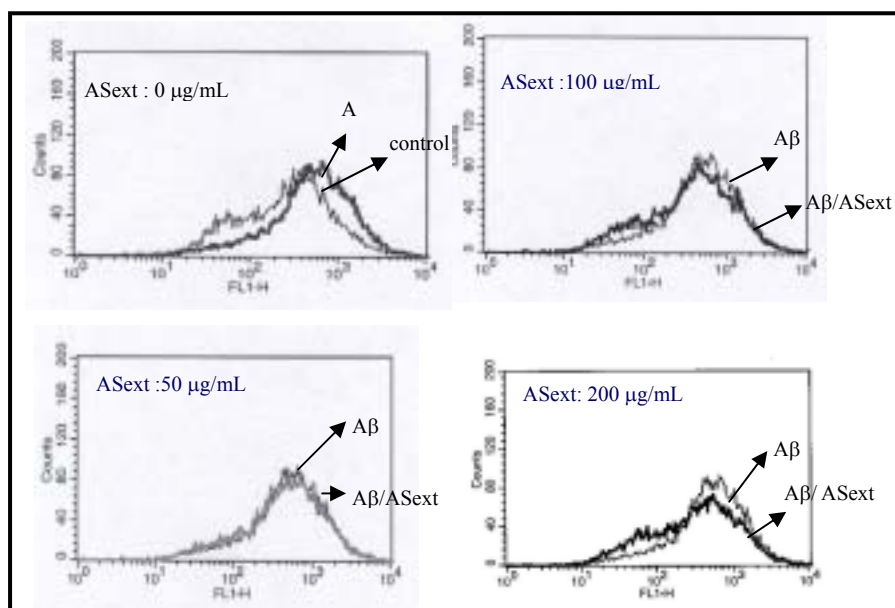
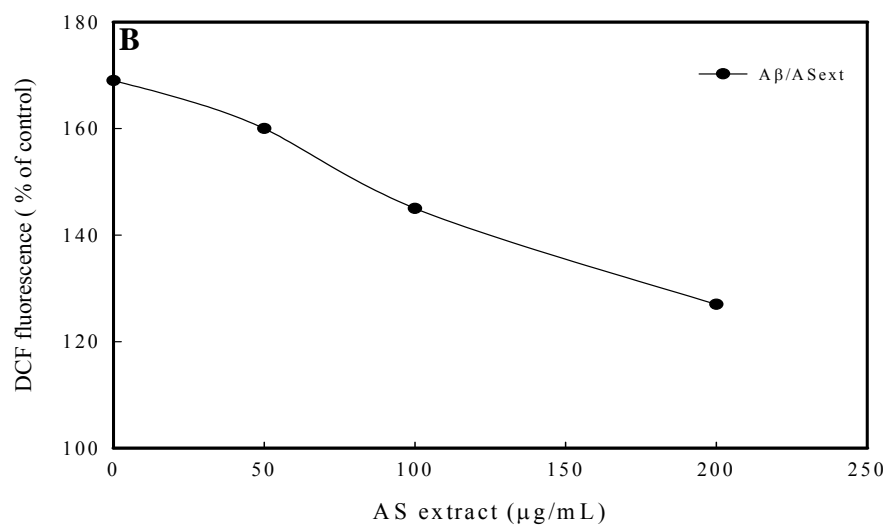


Figure 3. Effect of ASext on A β -induced intracellular accumulation of ROS in Neuro 2A cells. **A:** Cells were treated with A β ₂₅₋₃₅ (15 μ M) for different time periods. **B:** Neuro 2A cells exposed to 15 μ M A β plus 50-200 μ g/mL of ASext for 15 min. # p<0.05.

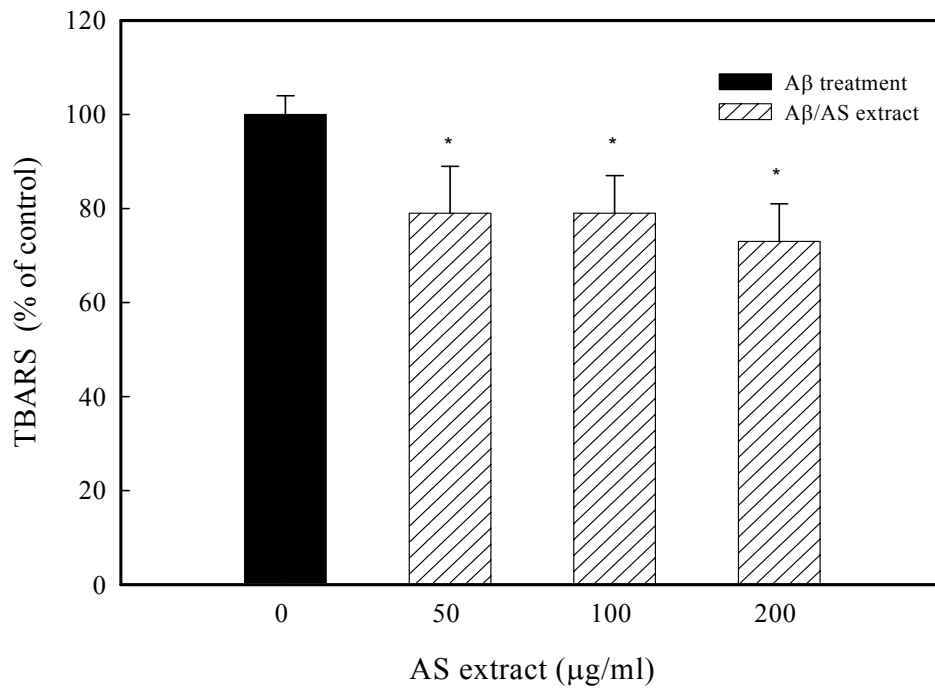


Figure 4. Effect of AS extract against A β -induced TBARS formation. Neuro 2A cells were exposed to A β (15 μ M) in the presence and absence of AS extract (50, 100 and 200 μ g/ml). The values represent mean \pm SD. * p<0.05 compared with control.

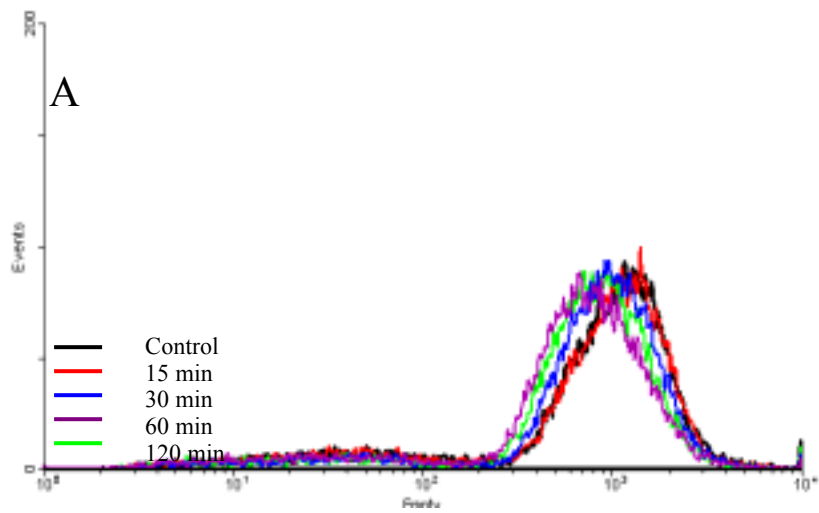


Figure 5A.

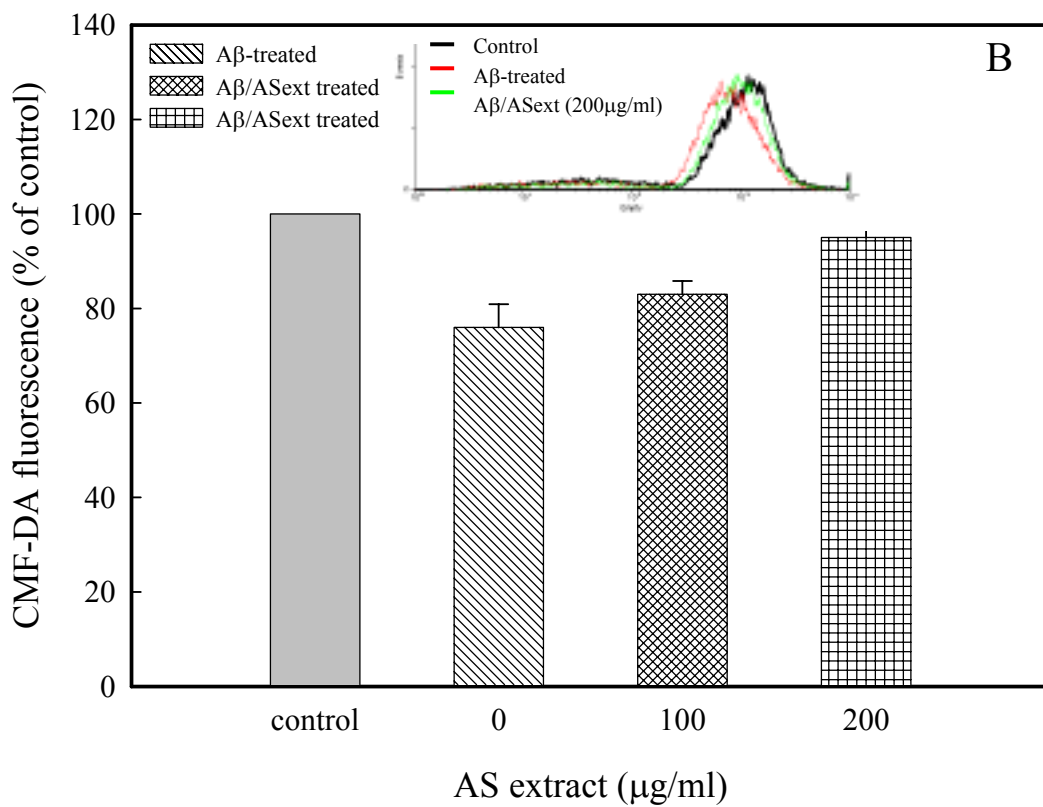


Figure 5. Effect of ASext on A β -induced intracellular GSH content in Neuro 2A cells. **A:** Histograms for CMF-DA fluorescence shown in Neuro 2A cells treated with A β_{25-35} (15 μ M) for different time periods; **B:** Neuro 2A cells were treated with 15 μ M A β_{25-35} and 100, 200 μ g/ml ASext for 60 min.

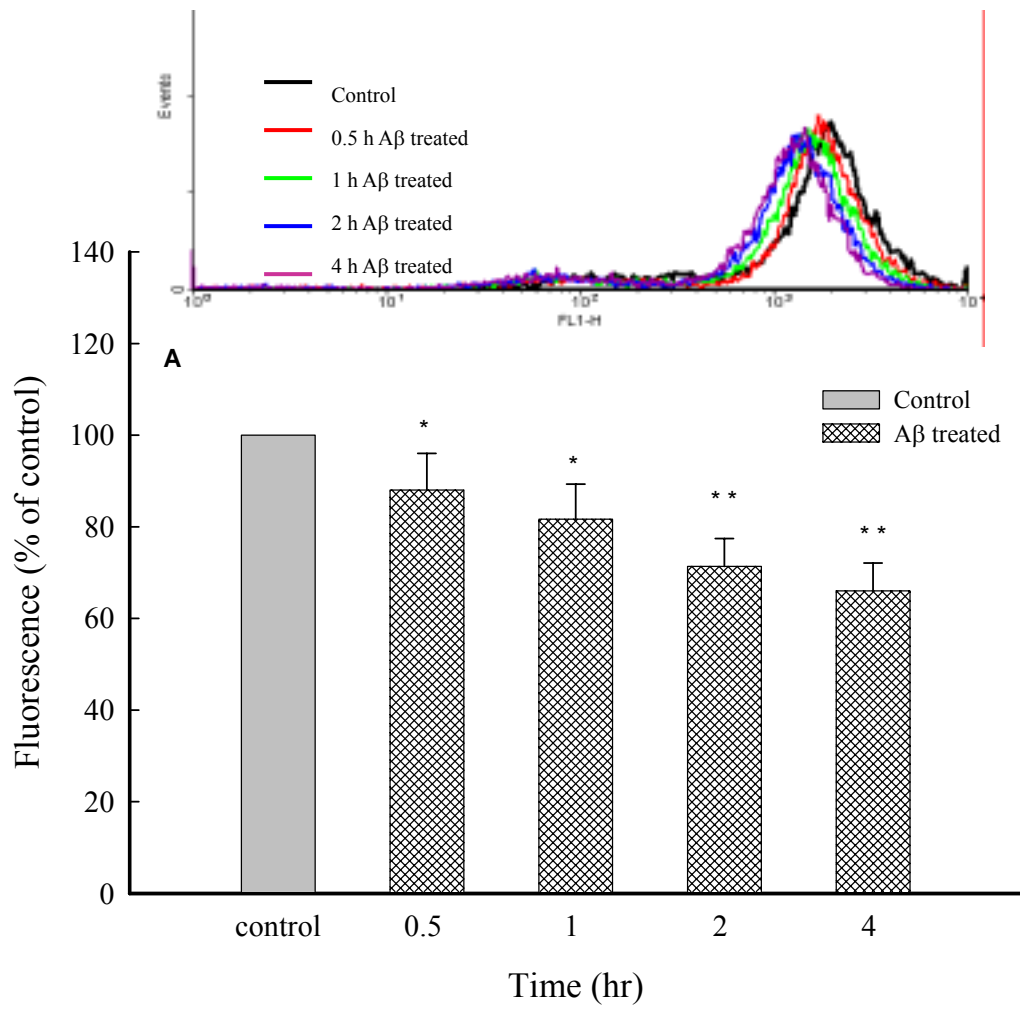


Figure 6A

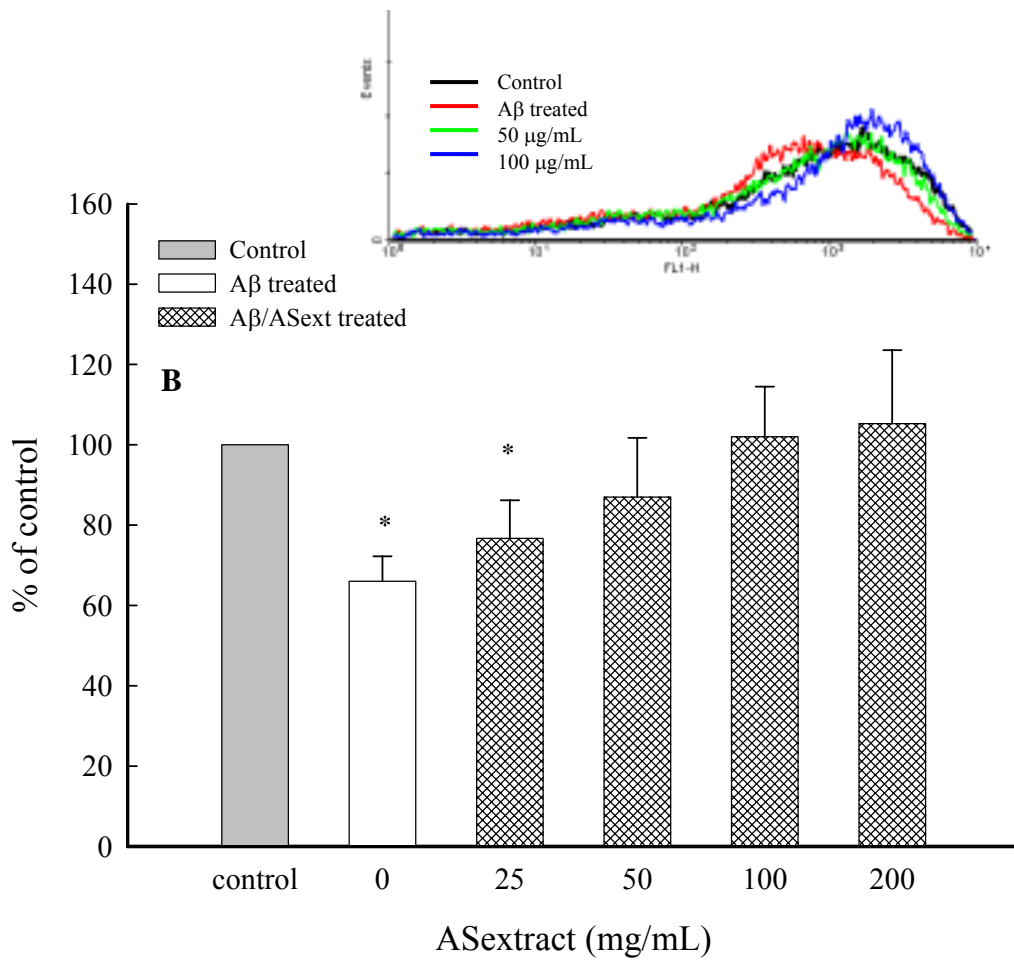


Figure 6. Effect of ASext on loss of Ψ_m induced by A β in Neuro 2A cells.

A: Histograms for Rh123 fluorescence shown in Neuro 2A cells treated with 15 μ M A β_{25-35} for 0.5, 1, 2, 4 h; **B:** Neuro 2A cells were treated with 25-200 μ g/mL ASext and 15 μ M A β_{25-35} for 4 h. * $p < 0.05$ compared with control

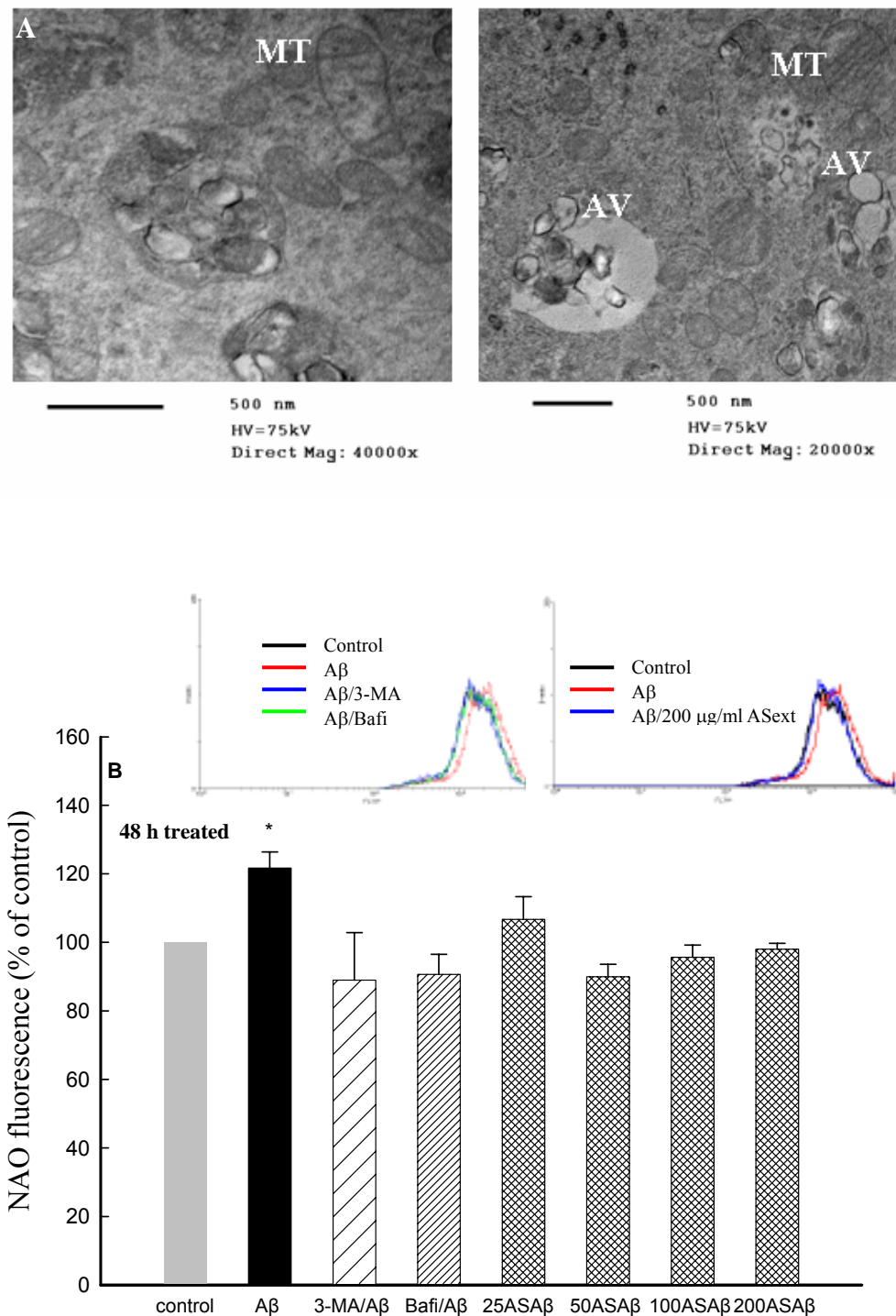


Figure 7 Ultrastructure of Neuro 2A cells after A β ₂₅₋₃₅ treatment. Neuro 2A cells treated with 15 μ M A β for 48 h, and the autophagic vacuoles (AV) (**A, right**) and enlarged mitochondria (MT) (**A, left**) were observed. **B**: Effect of A β ₂₅₋₃₅ on mitochondrial mass in Neuro 2A cells. Representative histograms for NAO fluorescence shown in Neuro-2A cells treated with 15 μ M A β ₂₅₋₃₅ for 48 h along with Bafilomycin A1 (Bafi, 50 nM), 3-methyladenine (3-MA, 2 mM) or ASext (25-200 μ g/ml).