

第一章 前言

癲癇是由許多先天性或後天性的因素所引起的慢性腦疾病，它的特徵是由於腦細胞的同期性、過渡的放電所引起的反覆發作。伴隨著多彩多姿的陣發性臨床表現⁽¹⁾。癲癇是自古以來就存在的疾病，黃帝內經中就有癲癇的記載⁽²⁾，根據日本的統計癲癇的有病率大約每千人有八位，年間發生率是每十萬人口中有 145 人⁽³⁾，由此推算台灣至少有十七萬人患有此病。現代醫學用抗癲癇的藥物如 phenytoin , valproate , carbamazepine , Gabapentin 等，以及外科手術的方法來治療，但仍有約 20% 的癲癇病人無法得到良好的控制⁽⁴⁾，因此對癲癇的發病機轉以及治療的研究是刻不容緩的事。

中醫認為癲癇發作是由於肝系統陰陽間的不平衡導致肝風內動的結果，因此用平肝息風的方法來治療癲癇發作，常用的方劑或藥物有天麻鉤藤飲、天麻、鉤藤等⁽⁵⁾。KA 是一種 glutamate 的類似物，腹腔或腦內注射 KA 可以引起邊緣系統的腦損傷⁽⁶⁻⁹⁾，一般認為 KA 所誘發的癲癇發作很類似人類的精神運動性癲癇發作。先前我們實驗室的研究發現在 Sprague-Dawley(SD)大鼠，天麻和鉤藤兩者都能減少 Kainic acid(KA)所誘發的癲癇發作和氧化自由基，而推論天麻或鉤藤的抗癲癇作用至少部分來自對自由基產生的抑制或清除有關⁽¹⁰⁾⁽¹¹⁾。另外，我們發現天麻

和鉤藤兩者對 KA 誘發鼠腦中 microglia cell 的增殖和活化, 以及 apoptosis 有抑制的作用 (尚未出版)。c-fos 和 c-jun 兩者都被歸屬於即發性 早期基因 (immediately-early gene), 而 c-fos 能經由基因表現的調節, 可以促成細胞功能的長期改變⁽¹²⁾⁽¹³⁾。一些研究報告指出 KA 誘發癲癇發作鼠腦的邊緣系統會出現 c-fos-like 蛋白質, 這些 c-fos-like 的表現和 KA 所誘發的發作性活動的產生和傳播有關, 它可提供作為神經細胞活動的標記⁽¹³⁻¹⁵⁾。Activator protein-1 (AP-1) 是由 Jun 和 Fos 蛋白質所組成的 dimer, 它能掌控細胞增值及分化之即發性早期蛋白, 參與多種基因轉錄調節過程。又 AP-1 能藉著 mitogen-activated protein kinase (MAPK) 訊息傳導路徑來活化, 而 MAPK 的訊息傳導路徑可分為 extracellular signal-regulated kinase (ERKs)、Jun N-terminal kinase (JNKs) 和 p38 kinase 等三種訊息傳導路徑⁽¹⁶⁾。一些研究發現 KA 能誘導 AP-1 轉錄因子長時間的表現⁽¹⁷⁻¹⁹⁾。又 Activator-protein-1 (AP-1) 被認為和 apoptosis 和長期神經細胞可塑性的調節有關⁽¹⁹⁻²²⁾。

本研究的目的是在探討 AP-1 在天麻的抗癲癇機轉中所扮演的角色, 進一步來瞭解天麻的抗癲癇機轉, 將 SD 大鼠分別用口服施予 PBS 溶液、天麻 1.0 克/公斤、0.5 克/公斤和 Valproic acid (VA) 250 毫克/公斤一星期, 然後從它們的腹腔分別注射 12 毫克/公斤的 KA, 經三小時

的腦波和肌電圖紀錄，以及行為觀察後，將它們的腦取出，並分離出前額葉皮質和海馬區域的腦組織。最後利用 Western blotting 分析 AP-1 上游的 ERK、JNK 和 p38 kinase 訊息傳導路徑。

第二章文獻探討

2-1 癲癇及其傳統名稱

癲證，又名“癲癇”、“羊癲風”，是一種反覆發作的神志異常疾病。癲癇大發作的特徵是突然昏仆不知人，口吐涎沫，兩目上視，四肢抽搐，常在昏倒時喊叫一聲，一般而言會自行甦醒。

本證名稱頗多，《內經》稱為“癲疾”，後世醫家根據其發作時鳴叫聲的不同而有馬癲、羊癲、豬癲、牛癲、雞癲等不同的名稱。⁽²³⁾現將歷代對有關癲癇的記載敘述如下：

- 1.內經時代：《素問，奇病論》說：“人生而有病顛疾者，病名曰何？安所得之？歧伯曰：病名為胎病，此得之在母腹中時，其母有所大驚，氣上而不下，精氣並居，故令子發為顛疾也。”⁽²⁾
內經時代已知癲癇和懷孕的關係密切。
- 2.隋唐時代：巢元方指出：“癲者，卒發仆地，吐涎沫，口緊目急，手足繚戾，無所覺之，良久乃甦。”⁽²⁴⁾這是描述癲癇大發作時的臨床表現。
- 3.宋元時代：肝風、痰、熱、驚對癲證的發生發展有密切的關係。
朱丹溪透以“痰迷孔竅”為癲癇的病機，他認為將癲癇分為馬癲、牛癲、雞癲、豬癲、羊癲臨床上無實用價值。癲癇專主在痰，

所以主張用吐法⁽²⁵⁾⁽²⁶⁾。“大法行痰為主，用黃蓮、南星、括簍、半夏、導火行痰，分多少治之無不癒者”⁽²⁶⁾。張子和則主張汗吐下三法並用。⁽²⁷⁾

4.明清時代：明代虞搏指出“癰病主乎痰，因火動之所作也。治法，癰宜乎吐……”⁽²⁸⁾。清代名醫葉天士則用補本證虛的治法來治療癰癩，如用人參、白朮扶正，配蜈蚣、全蠍、南星熄風化痰治療癰證之虛者。⁽²⁹⁾王清任提出腦為元神之府的論點，認為癰癩與元氣、腦髓瘀血有關。陳士鐸將癰癩分為六則，以平胃卻痰，溫脾建脾，安神定志為治則⁽³⁰⁾。但仍不脫離癰癩多生於痰，治痰非補虛不能奏功的說法。

2-2 天麻及其歷史沿革

天麻為蘭科多年寄生草本植物天麻 *Gastrodia elata* B1. 的塊莖。天麻，始載於〈神農本草經〉，名赤箭，列為上品。由新修本草描述天麻為：莖似箭杆，赤色，端有花，葉赤色，遠看如箭有羽。到了宋朝〈開寶本草〉才開始有天麻之名⁽³¹⁾。

漢代對天麻的功效已有所識，但應用尚少。言天麻具有“殺鬼精物，蠱毒惡氣久服益氣力，長陰肥建”的功用。《名醫別錄》則謂天麻有“消癰腫，下之滿疝，下血”，初步紀錄本品的功效。

但到了宋朝，才對天麻的功用有較全面的認識和更廣泛的應用。金元時期，張元素言天麻能“治風虛眩暈頭痛”。明代應用天麻仍以肝風、痺證為多，明朝李時珍《本草綱目》謂：“天麻，乃肝經氣分之藥”。《素問》中說，“諸風掉眩，皆屬於肝”。天麻入厥陰之經而治諸病。”⁽³¹⁾

性能：甘，平。

功效：息風止癱，平抑肝陽，祛風通絡。

臨床應用：

一、驚癇抽搐

肝為風木之臟，肝風內動則發為驚癇抽搐。天麻對各種原因引起之肝風內動，無論寒熱虛實，均可配伍應用。主要應用於：⁽³²⁾

1. 熱盛動風：溫熱病邪熱內陷，灼傷營陰，引動肝風，發為驚癇抽搐。天麻素有“治風神藥”之譽，有“定風草”之名。謂天麻可治“一切中風，風痰”。對於肝陽暴亢，陽升風動，可用天麻來平息肝風。
2. 破傷風：破傷而復受邪，風邪毒氣入裏，角弓反張，天麻長於息風止癱。
3. 癲癇：天麻可治“癲癇強癱”之證。自古以來今常用天麻來治

療癲癇發作之手足抽搐，肌肉痙攣，牙關緊閉，口吐涎沫等。

二、眩暈、頭痛

張元素言天麻“治風虛眩頭痛”，“主痛風，頭痛，頭暈虛眩。”肝陽上亢或風痰上擾，常同時發生眩暈、頭痛等症。天麻既息肝風，又平肝陽，故為治眩暈、頭痛之要藥。

三、肢麻癱瘓

天麻“通血脈，治“癱瘓不遂”。臨床用於中風癱瘓，手足不遂，肢體麻木等症，可與牛膝、杜仲、當歸等同用。

四、風濕痹痛

天麻“主諸風濕痹，四肢拘攣利腰膝，強筋力”，可“療風去濕”，“治冷氣頑痹”。用治風濕痹痛，關節屈伸不利者，多與秦艽、羌活、桑枝等祛風濕，除痹痛之品配伍。現代臨床常用天麻治療腰膝關節肌肉疼痛諸症。⁽³²⁾

2-3 天麻現代相關藥理研究

一、化學成份

天麻塊莖中含香莢蘭醇、香莢蘭醛、粘液質、甾類、結晶性的中性物質、微量生物。從天麻中分離的天麻素是天麻的重要有效成分，化學名稱為對羥基甲苯 -D-吡喃葡萄糖甙。尚含有

檸檬酸、琥珀酸、棕櫚酸、 谷醇、維生素 A 類物質。此外，還含有抗真菌蛋白以及微量元素(以鐵含量最高，氟、錳、鋅、碘次之)。(31)

二、藥理作用

其藥理作用可能是通過水解形成天麻素，透過血腦屏障進入腦組織，進而發揮中樞抑制效應。天麻素主要經腎臟排泄，消除較快，在體內不易蓄積。(33)

1. 鎮靜作用：

天麻能使小鼠睡眠時間延長。正常成人服用天麻素會出現嗜睡感，同時腦波圖的 α -波指數減低，出現睡眠波型。天麻素可以抑制自發活動。(34)

2. 抗驚厥作用：

天麻浸膏能對抗戊四氮所引起的陣發性驚厥的作用。進一步實驗表明，天麻素能延長戊四氮引起陣攣性驚厥的潛伏期，與戊巴比妥鈉有協同作用，能提高戊四氮在小鼠的半數驚厥量，並能降低小鼠自主活動。天麻素、香莢蘭醇兩者作用相似。天麻素能對抗咖啡因引起的興奮。(34)

3. 抗炎作用：

于龍順等透過天麻對各種炎症滲出和腫脹的藥理研究表明：天麻對各種炎症和腫脹都有抑制作用，能抑制醋酸所致小鼠腹腔毛細血管通透性增加，天麻能抑制 5-HT, PGE₂ 所致大鼠皮膚毛細血管通透性增加，說明天麻對炎症早期的滲出有抑制作用，並能明顯抑制多種炎症的腫脹。天麻對腎上腺重量無影響，顯示其抗炎效應可能與垂體-腎上腺皮質系統無關⁽³⁴⁻³⁷⁾。天麻對慢性毛囊炎有療效。⁽³⁷⁾⁽³⁸⁾

4. 鎮痛作用：

天麻能治療高血壓、腦震盪後遺症的頭痛。顯示它有鎮痛作用。馬朝俊觀察天麻丸的臨床療效時發現天麻對風濕性關節疼痛有療效。皮下注射天麻制劑 5g/kg 能對抗小鼠腹腔注射醋酸引起的扭體反應。小鼠熱板法試驗也表明天麻制劑能提高痛閾。⁽³⁴⁾⁽³⁷⁾

5. 抗衰老、改善學習記憶作用：

小鼠球後注射 D-半乳糖 80 mg/kg, 50 天後可製造成亞急性衰老模型，口服天麻 4.8 g/kg 能恢復 D-半乳糖衰老模型小鼠被動迴避反應能力的下降，明顯提高紅血球中 superoxide dismutase (SOD) 活力，腦衰老和老化的重要

表現之一就是腦功能減退，記憶功能下降。天麻萃取物能改善記憶與其具有抗缺氧、增加腦血流量、改善腦血循環有關。天麻萃取物 10~40 g/kg 能增加旋轉後小鼠的進食量，提高旋轉後小鼠在方型迷宮中的學習分數及到達安全區小鼠的百分率；天麻萃取物 10~20 g/kg 能抑制正常小鼠的自主活動，並能對抗旋轉後小鼠自主活動度的降低。自由基損害引起生物膜脂質發生過氧化，造成細胞老化導致記憶衰退，動脈硬化等衰老現象。若連續口服天麻能降低老年鼠血清脂質過氧化物含量。⁽³⁴⁾⁽³⁹⁾⁽⁴⁰⁾

6. 對心血管作用：

天麻注射液能使血管阻力降低，增加血流。用家兔在不麻醉狀態下，天麻素不影響心率。天麻注射液可使血壓下降、心率減慢、心輸出量增加、心肌耗氧量下降，使小鼠心肌血流量增加 73.3%，同時也能提高小鼠抗缺氧能力。天麻素可使心肌胞搏動加快，收縮加強，指出心輸出量增加的原因是天麻素使心肌細胞收縮力增強的結果。天麻素有拮抗高 K^+ 的作用，也能通過拮抗 5-HT 對腦動脈的收縮發揮類似 methysergide 等 5-HT 拮抗劑的作用。⁽³⁴⁾⁽³⁷⁾

7. 免疫功能：

天麻注射液能增強 T 細胞的免疫反應功能。可促進特異性體液抗體生成作用，對小鼠機體的非特異性免疫有增強作用，能促進特異性抗原結合細胞的能力。⁽³⁴⁾

8. 毒性副作用：

小鼠口服或尾靜脈注射天麻素 500 mg/kg 觀察 3 天，未見中毒或死亡，說明天麻毒性很低。天麻素給小鼠灌胃 14-60 天對造血系統、心、肝、腎等器官均無不良影響。亞急性毒性實驗顯示，天麻素對血液紅血球及血小板、轉氨酶、膽固醇等均無影響，心、肝、腎、胃、脾及腸切片未見細胞變性。受孕 6-15 天的小鼠給藥 373 mg/d 結果對胎盤、鼠體重、性別、外觀、內臟及骨骼發育無明顯影響。⁽³⁴⁾

2-4 Activator protein 1 的定義

AP-1 最早被描述來自 HeLa cell 的抽取物，有 DNA 鍵結活性，能辨認 human metallothionein 和 SV40 enhancer element 的轉錄調節因子，⁽⁴¹⁾ 可調控 SV40 的轉錄活性，細胞遇到 TPA 時，藉由 TPA-responsive element 將胞外訊息傳導入胞內在目標基因上的啟動子 誘發下游基因的表現。⁽⁴²⁾

基因研究進展之一是原致癌基因 (proto-oncogene), 即發性早期蛋白 (immediate-early gene) 例如 c-fos , c-jun 的發現 , 其蛋白產物如 c-Fos , c-Jun 可作為神經元興奮的標誌和細胞內訊息傳遞的信使⁽⁴³⁾。fos 在神經細胞是一個核蛋白 , 一旦細胞表面受到刺激 , 引起 c-fos , c-jun 的轉錄活化。Fos 和 Jun 快速合成並且轉移至細胞核 , 形成 dimer protein complex , 這和 AP-1 結合位有關。一些研究認為 Fos 在本身的啟動子當作一個負向的調節因子 , 然而在腦內和 c-fos 表達有關的是 Fra 而非 Fos。⁽⁴¹⁾

AP-1 是由 Jun 和 Fos 蛋白質所組成的 dimer , 有四組 Fos 基因和三組 Jun 基因 其中 Jun family 包含 c-Jun, Jun B 及 JunD, 而 Fos family 則包含 c-Fos、FosB、Fra-1、Fra-2。AP-1 complex 的形成有 Jun-Jun 所形成的 homodimer, 與 Jun-Fos 形成的 heterodimer, 而以 heterodimer 形式存在的 AP-1 對 DNA 的親和性較高 , AP-1 以 TGAG/CTCA 的序列在目標基因的啟動子結合。In vitro , Fos B 和 JunD complex 有較高的親和性。⁽⁴⁴⁾⁽⁴⁶⁾

2-4-1 Activator protein 1 的活化因子

AP-1 可以被許多因子活化 , 神經元細胞有絲分裂後進行了相似的壓力反應 , 如腦缺血、神經纖維受損、感染發炎、自由基、紫

外線照射等，如腦缺血再灌流損傷等外界刺激，可活化真核細胞 c-jun 和 c-fos 等即發性早期基因的轉錄，自細胞核到細胞質轉錄生成 m-RNA，轉譯成 Jun 和 Fos 等核蛋白，之後會形成 AP-1 作為轉錄調節蛋白，和目標基因的 DNA 調控區結合，來活化目標基因。⁽⁴⁸⁾In vivo, JNK1 的活化, c-Jun 的磷酸化, 和藉由活化 activating transcription factor 2 (ATF-2) 和 c-Jun promoter 結合，被認為是神經細胞凋亡的機轉。⁽⁴⁸⁾在 fos 和 jun 分子磷酸化，protein kinase C (PKC) 和 protein tyrosine kinase (PTK) 可調節 AP-1 鍵結活性。如 SLE 患者 T 細胞中 PKC 活性明顯低於正常人。所以 AP-1 上游活化, PKC 和 PTK 扮演一個關鍵角色。⁽⁴²⁾不同的 AP-1 活化因子所產生的反應也有所不同，例如長期服用 Cocaine 導致 AP-1 持續活化且蛋白質組成有異於單次服用 Cocaine。光刺激引發大鼠視皮質的 AP-1 活性，其組成由 C-Fos, JunB 和 C-Jun 的磷酸化所組成。⁽⁴⁶⁾AP-1 蛋白質組成的可變性產生不同的基因序列，與發作有關的 AP-1 由 c-Fos, FosB, Fra-2 和 JunB 組成。而和神經退化有關的 AP-1 由 FosB, Fra-2, 和 JunD 所組成。⁽⁴⁶⁾糖皮質固醇可由 Fos protein 的 N-端調節 AP-1 的活性。糖皮質固醇可降低 KA-induced AP-1 binding activity，但會降低 AP-1 complex 的防護和適應功能而增強

神經毒性。⁽⁴⁷⁾

至於紫外線照射，發炎、自由基形成、腦缺血，形成壓力反應和細胞死亡。則是透過 MAPK 之 JNKs 訊息傳導路徑來活化 AP-1。JNK 又稱 Stress-activated protein kinase，當紫外線照射活化 JNKs 之後，JNKs 會透過此機制來調控 AP-1 的活性藉由 Jun 蛋白質 Ser-63 和 Ser-73 的磷酸化 JNKs 催化 c-Jun 的轉錄活性，進而使 AP-1 的活性上升⁽⁴⁸⁾。P38 家族控制細胞有絲分裂和細胞退化的加強有關，而 P38 的活化歸因於細胞的 JNK-mediated cell death。ERK 的訊號路徑對細胞的分化和穿透是必須的，因可促進細胞的存活。⁽⁴⁸⁾

2-4-2 Activator protein 1 的活化方式

AP-1 是由 Jun family 和 Fos family 組成，Jun 及 Fos 的活化可透獨立的訊息傳導路徑來達成。在 Jun 的活化方面，為細胞受到環境中壓力刺激或發炎物質的影響，而透過屬於 Ser/Thr kinase 的 JNKs 及 p38 kinases 來活化 AP-1，其中 JNKs 藉由將 c-jun N 端 activating domain 上之 Ser-63、Ser-73 磷酸化，而使 Jun 的活性上升。所以 JNK 是重要的轉譯後修飾劑。在 in vivo 實驗中，KA 誘發大鼠癲癇發作和海馬迴的神經元退化有關，特別是在錐形細胞中的 CA1 和 CA3 區⁽⁴⁹⁾。外界環境中的熱休克、

滲透壓失調、氧化壓力及 KA 誘發癲癇，皆可引起 JNK-1 的活化。如果抑制細胞中 JNKs，則會失去所有 stress-activated c-jun kinases，因此 Jun 主要是透過 JNKs 訊息傳導路徑來活化。而 Fos 之活化，Fos family 中的 ATF2，activating transcription factor-2，則是透過 JNKs 及 p38 kinases 等訊息傳導路徑來磷酸化，藉由 AP-1 遠端位結合來控制 c-jun 的快速轉譯，和 c-jun 形成一個活性異相聚合體，使 ATF2 活化上升，進而使 Fos 的活性上升。⁽⁴⁸⁾

2-4-3 Activator protein 1 對神經生長分化及記憶產生的活化方式

即發性早期基因，c-fos，c-jun 存在於真核細胞基因組中，參與細胞生長，分化，神經功能可塑性變化，學習和記憶乃至細胞凋亡等過程。⁽⁴³⁾ c-fos，c-jun 作為基因轉錄調節因子，通過細胞內外反應表現調控神經元永久性變化過程，如記憶和適應性改變。所有 AP-1 蛋白質中，c-jun 蛋白質是神經退化及神經保護最好的研究成員。在癲癇發作動物模型中，c-jun 先活化 proenkephalin 的轉錄作用，與 Jun D 作為 enhancer，來活化 proenkephalin c-AMP-dependent activation。⁽⁵⁰⁾

Proenkephalin 在海馬迴區貯存和合成，由 mossy fiber 釋放。報導

指出，原致癌基因 c-fos/c-jun 蛋白產物 c-Fos，c-Jun，可形成 heterodimer，與 DNA 片段 AP-1 點結合，調控目標基因的表達。海馬迴是調控大腦邊緣皮層活動的整合部位，也是癲癇敏感區，在接受一次 KA 刺激後，對整個興奮傳遞過程產生記憶。因此當再次給予 KA，c-fos/c-jun 蛋白產物加速形成 AP-1 複合物，與 proenkephalin 及 AP-1 點結合並調控其快速表現，從而使 m-RNA 合成增加，而使動物對癲癇敏感性增加長期存在。⁽⁴³⁾ 另外，海馬迴區 AP-1 的活化可由透過對目標基因的調節，如神經生長因子（NGF）、腦源性神經營養因子（BDNF）等，而對神經元在缺血後又灌流引起的細胞興奮性毒性損傷中有一定的保護作用。⁽⁵¹⁾

2-4-4 Activator protein 1 對腦部炎症反應

IL-1 是在免疫和炎症反應中的細胞因子，其生物學效應主要由轉錄因子 NF- κ B 和 AP-1 所調控。⁽⁵²⁾ 甚至是 c-jun 本身，因 c-jun 和細胞壓力與隨之而來的細胞凋亡有關。所以假如一特定藥物可抑制 AP-1 的活性，則所藉助之訊息傳導路徑應該主要為 ERKs、JNK 及 p38 kinases 三條路徑。文獻指出，如 Malatonin 經由清除氧化自由基，可降低 AP-1 和 opioid gene 的表現，它是抗癲癇發作劑，機轉是清除自由基和氧化物的生成及 AP-1 的活化。⁽⁵³⁾

第三章材料與方法

3-1 實驗動物

本研究使用雄性 SD 大鼠，重量介於 200~250 克之間，它們皆購自國家科學委員會實驗動物中心，飼養於中國醫藥學院動物中心，採十二小時明暗控制及中央空調系統調節溫度和溼度。整個實驗過程都依據實驗動物倫理規範來進行。

3-2 實驗試劑及儀器 (Reagents and Instruments)

1. 試劑藥品：

Kainic acid-----King Dom Co.,Taiwin

Chloral hydrate-----Merck Germany

Valproic acid-----Sigma Chem. St.louis, MO, USA

SDS sample buffer

62.5 mM Tris-HCl, pH6.8

2% SDS

10% Glycerol

50 mM DTT

0.1 % Bromophenol blue

DDW

Transfer buffer

25 mM Tris-base

0.2M Glycine

20 % Methanol

Adjust the pH to 8.5.

10x TBS

0.2 M Tris-base

1.4M NaCl

Adjust the pH to 7.6.

Blocking buffer

1x TBS

0.1 % Tween-20

5 % Nonfat dry milk

DDW

2.天麻的製作和劑量

天麻的製作是委託柯達科學中藥有限公司(桃園、台灣), 並以 vanillyl alcohol 為標準品經 high performance liquid chromatography system (HPLC) 鑑定。

天麻的劑量是參考中藥藥理研究方法學, 實驗動物和人體臨床用藥劑量估算公式如下: $Db=Da \times Kb/Ka$ (Db 表示大鼠的公斤體重劑量 ; Da 表示成人的公斤體重劑量 Kb 表示大鼠的折算係數 0.71 ; Ka 表示人的折算係數 0.11), 即大鼠的劑量 = $9/70 \text{ kg} \times 0.71/0.11=0.83$ 克/公斤 , 所以本實驗劑量是每公斤

大鼠 1.0 及 0.5 g。⁽⁵⁴⁾

3.儀器：

老鼠頭部立體定位儀

腦波及肌電圖記錄器 (MP 100 WSW Biopac systems, Inc,
California,USA)

3-3 電極的裝置

使用 chloral hydrate (400 mg/kg) 在雄性 SD 大鼠腹腔注射，待動物麻醉後，將它固定在頭部立體定位儀上，用剪刀剃除頭部毛髮後，由頭部中線皮膚切開並剝離至頭骨，然後使用不鏽鋼之螺絲釘電極穿入頭骨置於兩側感覺運動皮質上之硬腦膜上方，另一螺絲釘放置於前額竇上作為參考電極。另外，將雙極電極線綁在頸部肌肉處記錄表面肌電圖。所有電極連接到一個連結器上，然後用牙粉固定於老鼠頭部，電極裝置 7 天後才施行實驗，實驗時將電極線從連結器接到腦波記錄器上，記錄腦波與肌電圖。

3-4 實驗分組

將 15 隻 SD 大鼠隨機分成 5 組，每組 3 隻如下：

1. 正常組：僅用 PBS (1.0 ml/kg) 溶液腹腔注射,而不使用 KA。
2. 控制組：連續每天口服 PBS 溶液 1 ml/kg 七天，即於 KA

(12 ml/kg) 腹腔注射前的六天和前 15 分鐘各口服一次。

3.實驗一組：方法同控制組 (2) , 但口服天麻 1.0 g/kg。

4.實驗二組：方法同控制組 (2) , 但口服天麻 0.5 g/kg。

5.對 照 組：方法同控制組 (2) , 但口服 valproic acid 250 mg/kg。

3-5 實驗流程

3-5-1 行為觀察與腦波記錄

動物隨機分組後，於服用藥物前的 15 分鐘，開始施行腦波和肌電圖記錄，並觀察動物的行為變化，然後分別口服注射 PBS 1 ml/kg GE1.0 g/kg 以及 GE0.5 g/kg 和 valproic acid 250 mg/kg，經 15 分鐘後除正常組外，使用 KA 12 mg/kg 於大鼠腹腔注射引發癲癇發作，行為與腦波的觀察是從藥物服用前的 15 分鐘到 KA 注射後的 3 小時。癲癇發作是根據動物的行為和腦波肌電圖的變化，最後將大鼠犧牲取腦，測量 frontal cortex 和 hippocampus 區域的 AP-1。

3-5-2 腦組織的製備

行為與腦波觀察結束後，以 choral hydrate 麻醉，再沿老鼠肋骨下緣朝上 45 度剪開以露出心臟。取生理食鹽水於左心室注入並剪開右心房，進行灌流，待血流較清澈後，挖取鼠腦，將之

分為左、右皮質及左、右海馬迴，冰凍保存在-80 冰箱中待測。

取 brain 稱重

↓

加入 2.5x 組織重量 lysis buffer solution

↓

超音波振盪器 10 秒

↓

transfer 上清液至 new tube

↓

取 5 μ l 測 protein concentration

↓

加入等量 2x SDS sample buffer solution , 10 % SDS PAGE

↓

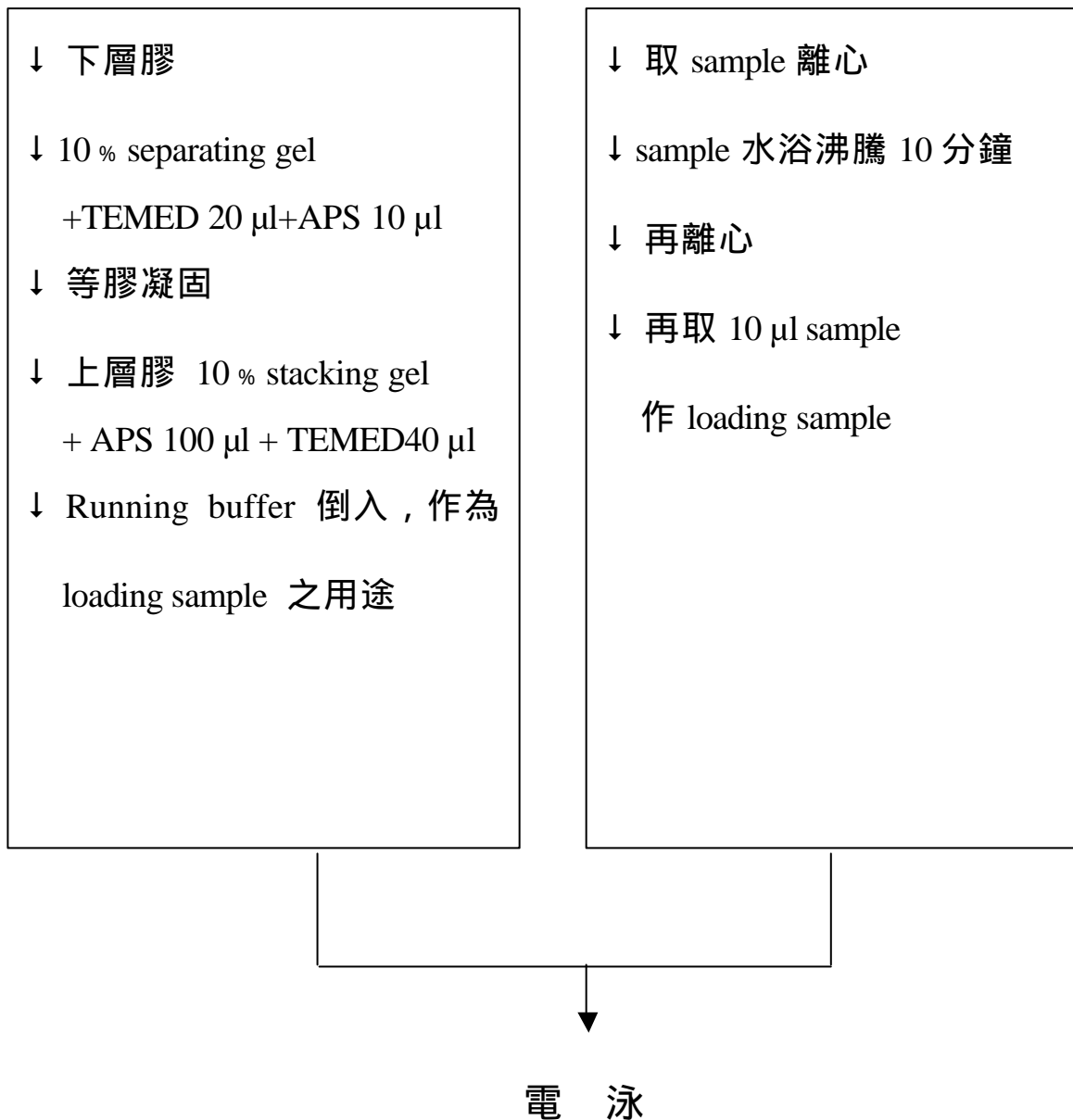
儲存於-70

3-5-3 Western blotting (西方點墨法)

為了偵測 AP-1 上游 ERKs、 p38 kinase 及 JNKs 磷酸化的比例，我們利用購自 NEB 的抗體，利用 SDS sample buffer(62.5mM Tris-HCl pH 6.8 , 2 % SDS , 10 % glycerol , 50mM DTT , 0.1 % bromophenol blue) 取得腦組織細胞萃取物，取 20 μ g 蛋白質進行 10 % SDS-PAGE 電泳分析，再將蛋白質分析。未磷酸化的抗體 (1 : 1000) -ERKs、 p38 kinase 及 JNKs (NEB) 偵測其蛋白

質總量；磷酸化抗體（1：1000）-phospho-ERKs、p38 kinase 及 JNKs（NEB）則偵測蛋白質磷酸化的情形。最後藉由 ECL 呈色系統（Amersham）進行呈色，並用 X 光片曝光顯影。

3-5-4 西方點墨法實驗步驟



↓ transfer 將膠片的蛋白質轉到膜上，通電 3 小時

↓ 以 TBS 25 ml 入袋內，膜以袋子內裝浸泡

↓ 加 200 ml DDW 入奶粉，振盪

↓ 加入 25 ml blocking buffer 入袋內振盪

- ↓ 將牛奶倒掉，以 washing buffer 25 ml 沖洗
- ↓ 將 washing buffer 倒掉
- ↓ 取 20 μ l 1 級抗體滴入袋內，振盪 1 小時
- ↓ 將袋打開，以 washing buffer 25 ml 沖洗，振盪 5 分鐘 3 次
- ↓ 加 2 級抗體，振盪 1 小時
- ↓ 每一片膜浸 washing buffer 振盪 5 分鐘 3 次
- ↓ 呈色壓片

3-6 統計分析

我們使用 one way of variance (ANOVA), 單因子變異數分析來檢定各組間的差異，P 值小於 0.05 定為有意義差。

第四章 結果

4-1 KA 誘發 SD 大鼠行為和腦波的變化

12 隻 SD 大鼠在 KA12 mg/kg 腹腔注射後都發生癲癇發作，牠們發作型式包括 wet dog shakes，Paw tremor 和 facial myoclonia，每種發作型式都有它們的特徵性腦波（圖一）

4-2 天麻在 KA 誘發癲癇發作大鼠的抗癲癇效用

12 隻 SD 大鼠腹腔注射 KA12 mg/kg 後，都發生癲癇發作，前治療口服天麻 1.0 g/kg、0.5 g/kg 和 VA 250 mg/kg 一星期，都能減少 wet dog shakes 發作（ $p < 0.001$ ，圖二），但對 paw tremor 和 facial myoclonia 則沒有作用（ $p < 0.05$ ，圖二）。

4-3 天麻對 KA 誘發癲癇發作大鼠前額葉皮質 AP-1 的影響

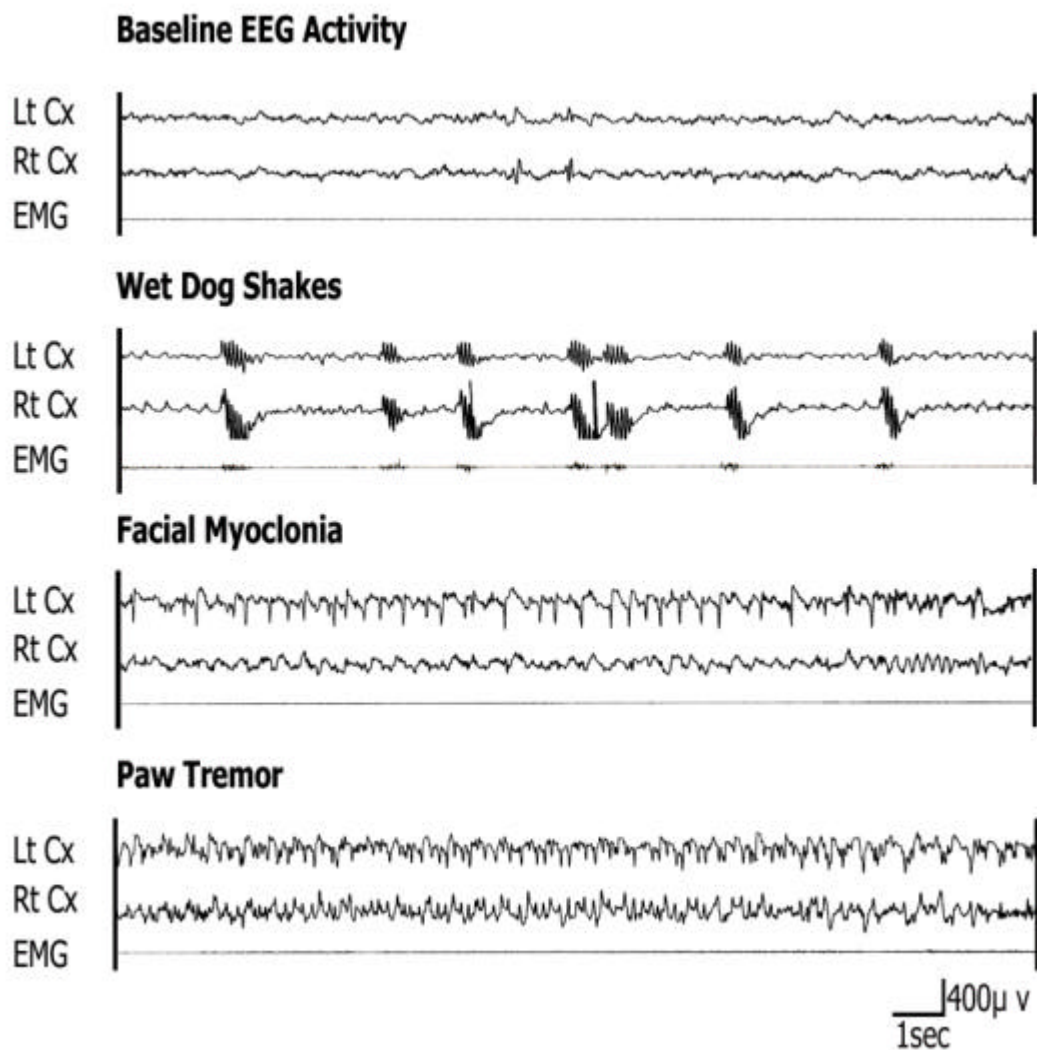
天麻 1.0 g/kg、0.5 g/kg 和 VA 250 mg/kg 前治療一星期，都能經由 JNK-P 訊息傳導路徑來活化 KA 誘發癲癇發作大鼠前額葉皮質的 AP-1（圖三）。

天麻 1.0 g/kg、0.5 g/kg 和 VA 250 mg/kg 前治療一星期對 P38，P38-P，ERK，ERK-P，JNK 的訊息傳導路徑沒有作用（圖三）。

4-4 天麻對 KA 誘發癲癇發作大鼠 hippocampus 區域 AP-1 的影響

天麻 1.0 g/kg、0.5 g/kg 和 VA 250 mg/kg 前治療一星期，都能經由 JNK-P 訊息傳導路徑來活化 KA 誘發癲癇發作大鼠 hippocampus 區域 AP-1 (圖四)。

天麻 1.0 g/kg 0.5 g/kg 和 VA 250 mg/kg 前治療一星期對 P38, P38-P, ERK, ERK-P, JNK 的訊息傳導路徑沒有作用 (圖四)。

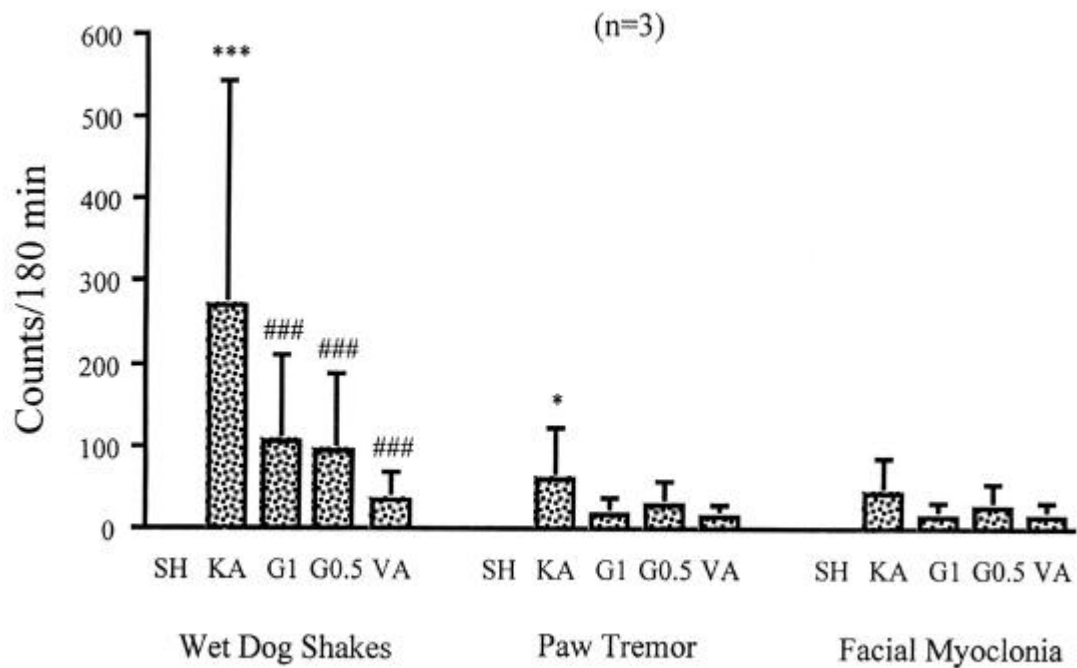


圖一、Kainic acid 腹腔注射誘發癲癇發作腦波和肌電圖的變化
Kainic acid 12 mg/kg 腹腔注射後，大鼠癲癇發作，牠的發作形式包括
Wet dog shakes 用間歇性多相性腦波活動，Facial myoclonia 用連續性銳
波，Paw tremor 用連續性棘波，每種行為都有牠們的特徵腦波。

Lt cx：左側感覺運動皮質腦波記錄

Rt cx：右側感覺運動皮質腦波記錄

EMG：頸部肌肉肌電圖記錄圖



圖二、天麻在 KA 誘發癲癇發作大鼠的抗癲癇作用

SD 大鼠在腹腔注射 Kainic acid 12 mg/kg 後，都發生癲癇發作，天麻 1.0 g/kg，0.5 g/kg 和 VA 250 mg/kg 前治療一星期能減少 wet dog shakes 的發作，但對 paw tremor 和 facial myoclonia 則沒有作用。

SH: 沒有使用 Kainic acid 腹腔注射，也沒有服用任何藥物，但使用 PBS 1 ml/kg 腹腔注射。

KA: 口服 PBS 1mg/kg 前治療一星期，然後用 Kainic acid 12 mg/kg 腹腔注射。

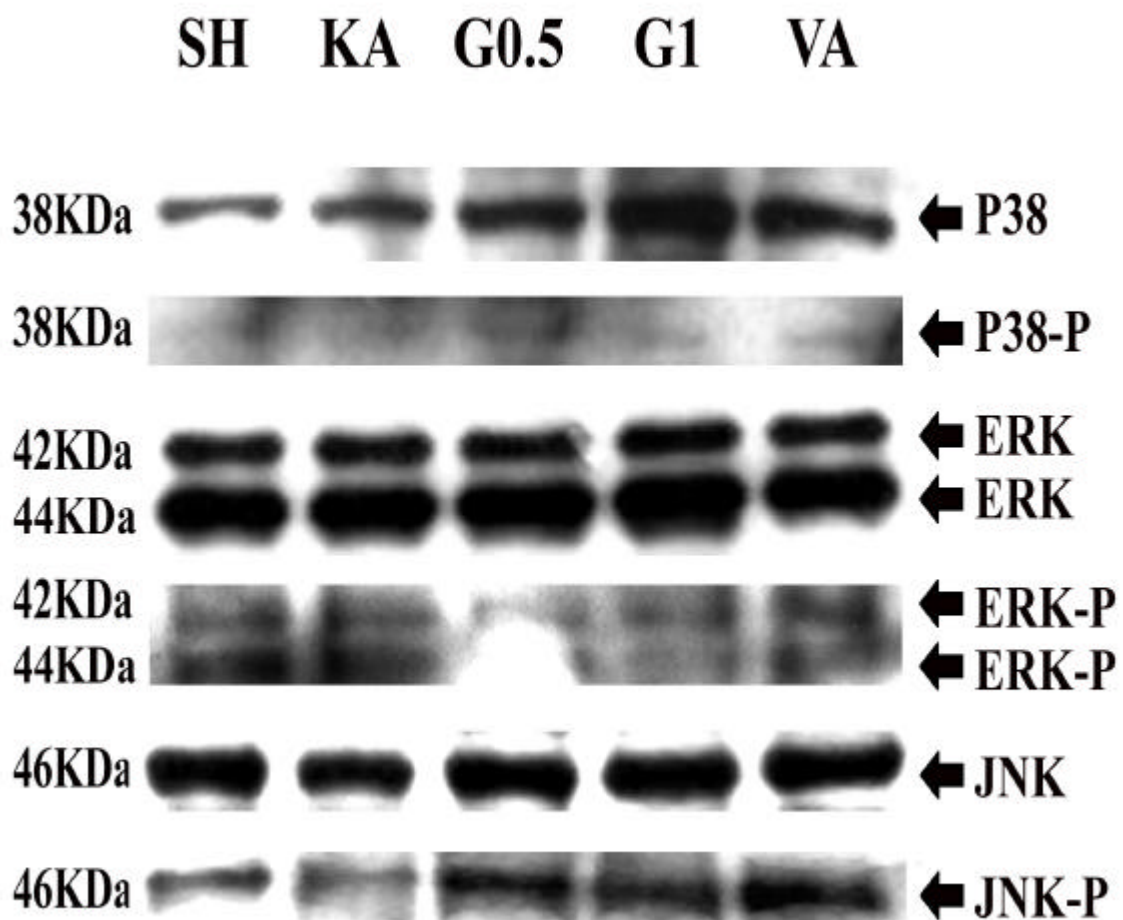
G 1: 與 KA 相同，但口服天麻 1.0 g/kg 前治療一星期。

G 0.5: 與 KA 相同，但口服天麻 0.5 g/kg 前治療一星期。

VA: 與 KA 相同，但口服 valproic acid 250 mg/kg 前治療一星期。

* $P < 0.05$, * * * $P < 0.001$ 與 SH 值相比較

$P < 0.001$ 與 KA 值相比較



圖三、天麻對 Kainic acid 誘發癲癇發作大腦前額葉皮質的 AP-1 的影響。天麻 1.0 g/kg , 0.5 g/kg 和 valproic acid 250 mg 前治療一星期，能經由 JNK-P 訊息傳導路徑來活化 Kainic acid 誘發癲癇發作大腦前額葉皮質的 AP-1，但對 P38 , P38-P , ERK , ERK-P , JNK 的訊息傳導路徑則沒有作用。

本圖及以下各圖

P38 : P38 kinase 訊息傳導路徑

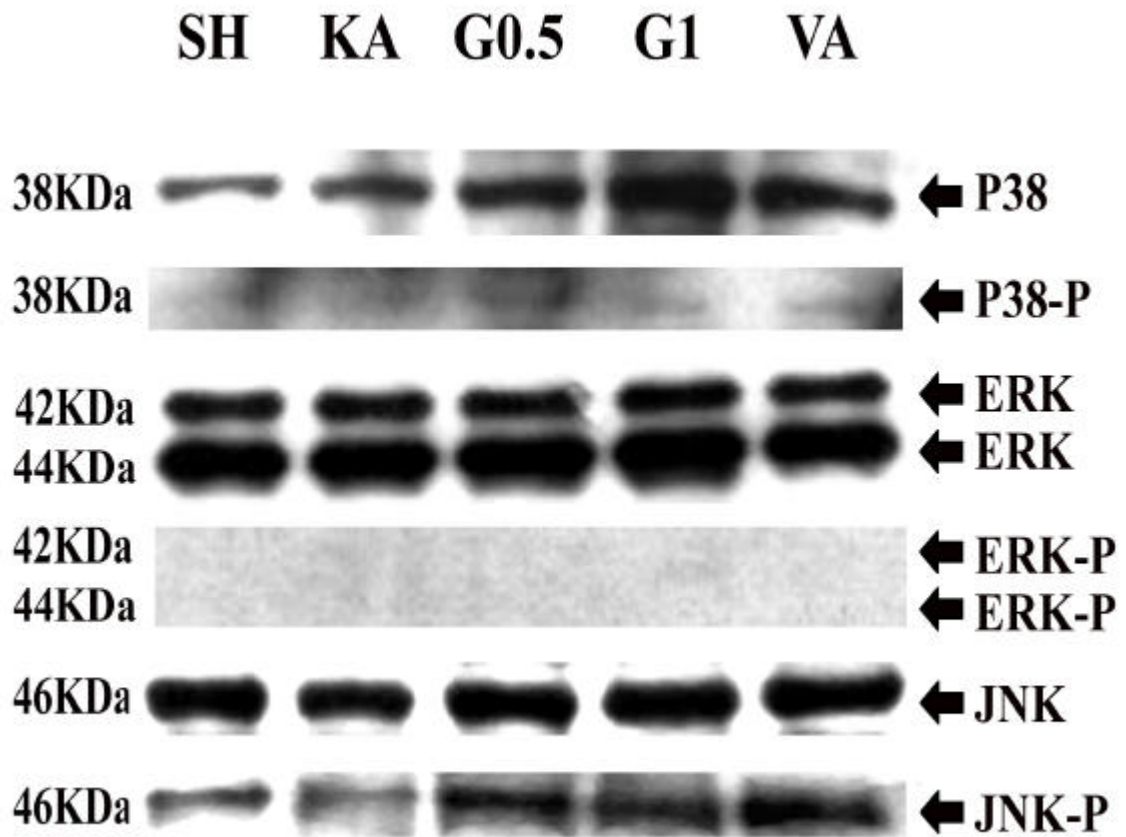
P38-P : P38-P kinase 磷酸化訊息傳導路徑

ERK : Extracellular signal-regulated kinase 訊息傳導路徑

ERK-P : Extracellular signal-regulated kinase 磷酸化訊息傳導路徑

JNK : Jun-N-terminal kinase 訊息傳導路徑

JNK-P : Jun-N-terminal kinase 磷酸化訊息傳導路徑



圖四、天麻對 Kainic acid 誘發癲癇發作大腦的 Hippocampus 區域 AP-1 的影響。

天麻 1.0 g/kg , 0.5 g/kg 和 valproic acid 250 mg 前治療一星期，都能經由 JNK-P 訊息傳導路徑來活化 Kainic acid 誘發癲癇發作大腦 Hippocampus 區域的 AP-1，但對 P38，P38-P，ERK，ERK-P，JNK 的訊息傳導路徑則沒有影響。

第五章 討 論

我們的結果顯示天麻能減少 KA 誘發 SD 大鼠的 wet dog shakes，這些結果和我們先前研究的結果一致⁽¹¹⁾。我們先前的研究發現 KA 於 SD 大鼠的腹腔注射會誘發 wet dog shakes，paw tremor 和 facial myoclonia 現象，以及每一種行為都有它們特徵性的腦波⁽¹⁰⁾⁽¹¹⁾。因此說明本研究的癲癇發作動物模型是成功。另外，我們的先前研究已知天麻在大鼠也能減少 KA 誘發的氧化自由機，因此我們推論天麻的抗癲癇機轉與抑制氧化自由機的生成或清除又關⁽¹¹⁾。

c-fos 和 c-jun 是屬於即發性 早期基因，它們在神經系統如同細胞核的原始致癌基因 (nuclear proto-oncogene)，能夠通過基因表現的調節而促成細胞功能長期的改變⁽¹³⁾。一些研究說明 KA 或 Metrazole 能誘導 c-fos 蛋白的表現，這種 c-fos 的表現可以提供作為神經細胞活動的標記和癲癇發作有關⁽¹²⁾⁽¹⁵⁾。AP-1 是由 Jun 和 fos 蛋白質組成的 dimer⁽¹⁹⁾，它能經由 mitogen-activated protein kinase (MAPK) 訊息傳導路徑來活化，而 MAPK 的三種訊息傳導路徑分別為 ERKs、JNK 和 p38 kinase⁽⁵⁵⁾。我們的結果顯示 KA 能活化 SD 大鼠前額葉皮質和 hippocampus 區域腦組織的 AP-1，這些結果和一些較早期的研究報告一致⁽¹⁷⁻¹⁹⁾⁽⁵⁶⁾，他們認為 AP-1 在 hippocampus 區域長期的活化對 hippocampus 細胞基因表現

的長期改變是重要的⁽¹⁷⁾。長期的 AP-1 伴隨著神經細胞可塑性的改變⁽¹⁹⁾。另外，我們的結果顯示預防性給藥用天麻或 valproic acid 會減少癲癇發作，但增強 KA 所誘導的 Ap-1 活化，這個結果似乎和一些報告認為 valproic acid 會阻斷 Metrazole 癲癇發作和 c-fos 誘導相抵觸⁽⁴⁵⁾。事實上，持續的提高 AP-1 會導致一個競爭的發生，也就是說 AP-1 活性的增加會產生 AP-1 基因負的調節⁽⁵⁶⁾⁽⁴⁵⁾。又慢性長期的電刺激痙攣發作會抑制 c-fos 的表現⁽¹³⁾。因此我們推測天麻和 valproic acid 兩者減少 KA 誘發的癲癇發作，但增加 KA 誘發的 AP-1，是否是一種加速 negative feedback 來達到自我保護作用，有待進一步的研究。我們的結果顯示 KA 所誘發 AP-1 的產生在前額葉皮質和 hippocampus 區域的腦組織兩者都經由 JNK-P 的訊息傳導路徑，這些結果和較早期的一些研究一致⁽⁵⁶⁾⁽⁴⁸⁾。

第六章 結 論

結論是天麻預防性給藥能減少 KA 治療大鼠的癲癇發作，但增加 AP-1 的活性，因此推測天麻可能是利用加速競爭來達到自我保護的作用。另外，天麻活化 AP-1 是經由 MAPK 的 JNK-P 訊息傳導路徑。

參考文獻

1. 洪祖培 臨床癲癇學 橘井文化事業股份有限公司 , 1983
2. 程士德 內經 知音出版社 , 1994
3. 清野昌一 八木和一 癲癇課本 南江堂 , 1991
4. H. O. Lüders , S. Noachtar , Epileptic seizures pathophysiology and clinical semiology Churchill Livingstone , New York , 2000
5. 孫季洪 中醫治療學原理 知音出版社 , 1992
6. S. M. Wuerthele , K. L. Lovell , M. Z. Jones, A histological study of kainic acid-induced lesions in rat brain, Brain Research , 149 : 489-497, 1978
7. Y. Ben-Ari , Epilepsy changes in local glucose consumption and brain pathology produced by kainic acid, Biochemical Psychopharmacology , 27 : 385-394 , 1981
8. Y. Ben-Ari , Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid : mechanism and relevance to human temporal lobe epilepsy, Neuroscience, 14(2) : 375-403 , 1985
9. J. E. Schowob , T. Fuller , J. L. Price, Widespread patterns of neuronal damage following systemic or intracerebral injection of kainic acid : a histological study, Neuroscience , 5 : 991-1014 , 1980
10. C. L. Hsieh , N. Y. Tang , S. Y. Chiang , C. T. Hsieh , J. G. Lin , Anticonvulsive and free radical scavenging actions of two herbs , Uncaria rhyngophylla (Miq) Jack and Gastrodia elata BL. in kainic acid-treated rats , Life Sciences , 65(20) : 2071-2082 , 1999
11. C. L. Hsieh, S. Y. Chiang , K. S. Cheng , Y. H. Lin, N. Y. Tang , C. J. Lee , C. Z. Pon, C. T. Hsieh, Anticonvulsive and free radical scavenging activities of Gastrodia elata BL. in kainic acid-treated rats, American Journal of Chinese Medicine, 29(2) : 331-341, 2001

12. J. I. Morgan, D. R. Cohen, J. L. Hempstead, T. Curran, Mapping pattern of c-fos expression in the central nervous system after seizure, *Science*, 237: 192-197, 1987
13. S. M. Winston, M. D. Hayward, E. J. Nestler, R. S. Duman, Chronic electroconvulsive seizures down-regulate expression of the immediate-early genes c-fos and c-jun in rat cerebral cortex, *Journal of Neurochemistry*, 54: 1920-1925, 1990
14. R. J. Smeyne, S. J. Baker, G. G. Miao, L. M. Robertson, T. Curran, J. I. Morgan, Continuous c-fos expression precedes programmed cell death in vivo, *Nature*, 363:166-169, 1993
15. T. Popovici, A. Represa, V. Crépel, G. Barbin, M. Beaudoin, A. Yehezkel, Effects of kainic acid-induced seizures and ischemia on c-fos-like protein in rat brain, *Brain Research*, 536:183-194, 1990
16. 賴羿如 肝細胞轉形之分子機制及分子療程之探討 中國醫藥學院醫學研究所碩士論文, 2001
17. K. R. Pennypacker, D. Walczak, L. Thai, R. Fannin, E. Mason, J. Douglas, J. S. Hong, Kainate-induced changes in opioid peptide genes and AP-1 protein expression in the rat hippocampus, *Journal of Neurochemistry*, 60: 204-211, 1993
18. K. R. Pennypacker, L. Thai, J. S. Hong, M. K. McMillian, Prolonged expression of AP-1 transcription factors in the rat hippocampus after systemic kainite treatment, *Journal of Neuroscience*, 14(7): 3998-4006, 1994
19. Z. Feng, W. Zhang, P. Hudson, G. Bing, W. Feng, J. S. Hong, Characterization of the long-lasting activator protein-1 complex induced by kainic acid treatment, *Brain Research*, 770: 53-59, 1997
20. R. J. Smeyne, M. Vendrell, M. Hayward, S. J. Baker, Continuous c-fos expression precedes programmed cell death in vivo, *Nature*, 363:166-169, 1993
21. G. E. Hoffman, N. S. Smith, J. G. Verbalis, c-fos and related immediate early gene products as markers of activity in neuroendocrine systems, *Frontal*

- Neuroendocrinology , 14 : 173-213 , 1993
22. K. S. Yao , S. Xanthoudakis, T. Curran , P. J. Odwyer , Activation of AP-1 and of a nuclear redox factor , Ref.-1 , in the response of HT29 colon cancer cells to hypoxia , Molecular and Cell Biology , 14 : 5997-6003 , 1994
 - 23.張伯臾 中醫內科學 高等中醫參考叢書 6 知音出版社 253-261,1997
 - 24.丁光迪 諸病源侯論校注 人民衛生出版社 第 37 卷 , 1991
 - 25.黃自立 中醫百家醫論薈萃 重慶出版社 509-521 , 1988
 - 26.元.朱震亨 丹溪醫集 人民衛生出版社 146 , 1993
 - 27.金張從正 子和醫集 人民衛生出版社 132 , 1994
 - 28.明虞搏 醫學正傳 新文豐出版社 681 , 1981
 - 29.清葉天士 臨證指南醫案 上海科學技術出版社 789 , 1993
 - 30.陳士鐸 辨證錄 人民衛生出版社 237 , 1989
 - 31.雷截權 張廷模 中國臨床中藥學 人民衛生出版社 1475-1482,1998
 - 32.顏正華 中藥學 知音出版社 696-698 , 1991
 - 33.程剛 郝秀華 天麻素在大鼠體內的藥動學研究 中國藥學雜誌 38 (2) : 127-128 , 2003
 - 34.楊世林 蘭進 徐錦堂 天麻的研究進展 中草藥 31(1) : 66-69 , 2000
 - 35.于龍順 中草藥 20(5): 19-21 , 1989
 - 36.黃俊華 中國醫學科學院學報 11(2) : 147 , 1989
 - 37.楊世海 天麻的研究進展 人參研究 (4) : 11-13 , 1995

- 38.王心東 江西中醫藥 22 (3): 8 , 1991
- 39.周本宏 天麻提取物對小鼠學習記憶能力的影響 中藥藥理與臨床 (3) : 32-33 , 1996
- 40.于樹仁 天麻對老齡大鼠學習記憶的改善作用 中國中藥雜誌 20(9): 562 , 1995
- 41.L. June, P. F Sonnenberg, M. Leon, Dynamic alterations occur in the levels and compositions of transcription factor AP-1 complexes after seizure , Neuron, 3 : 359-365 , 1989
- 42.X. Chen, H. E. Qingnan, AP-1 mediated signal transduction in thrombin induced regulation of pal-1 expression in human mesangial cells, Chinese medical journal, 113(6): 14-519 , 2000
- 43.高溪 張方琴 一次給予紅藻氨酸對大鼠腦內細胞信息通路及癲癇敏感性的作用 生理學報 47(6) : 589-596 , 1995
- 44.P. Gass, R. Herdegen, M. Kiessling, Induction of immediate early gene encoded proteins in the rat hippocampus after bicuculline-induced seizures : differential expression of krox-24, fos and jun proteins, Neuroscience, 48(2): 315-324 , 1992
- 45.J. L. Sonnenberg, C. Mitchelmer, M. Leon, Glutamate receptor Agonists increase the expression of fos, fra, and AP-1 DNA binding activity in the mammalian brain, Journal of Neuroscience Research, 24:72-80, 1989
- 46.K. Lukasiuk, A. Savonenko, Defensive conditioning-related increase in AP-1 transcription factor in the cortex, Molecular brain research , 67 : 64-73 , 1999
- 47.M. C. Lee, J. L. Rho, M. K. Kim, c-JUN expression and apoptotic cell death in kainite-induced temporal lobe epilepsy , Journal of Korean Medical Science, 16:649-56 , 2001
- 48.K. Mielke, S Brecht, A. Dorst, Activity and expression of JNK1 , p38 and ERK kinases , c-Jun N-terminal phosphorylation , and c-jun promotor binding in the adult rat brain following kainate -induced Seizure,

- Neuroscience , 91(2) : 471-483 , 1999
- 49.P. Elyse Schauwecker, Seizure-induced neuronal death is associated with induction of c-Jun N-terminal kinase and is dependent on genetic background, Brain Research 884:116-128, 2000
- 50.Y. H. Kim, S. S. Choi, J. K. Lee, Possible roles of JNK pathway in the regulation of hippocampal proenkephalin and immediate early gene expression induced by kainic acid, Molecular and Cells , 11(2):144-150 , 2001
- 51.張璐 降鈣素基因對大鼠全腦缺血再灌流後海馬迴 CA1 區 AP-1 和 DNA 結合活性的影響 徐州醫學院學報 23 (1) , 2003
- 52.郭甫坤 吳署光 IL-1,IL-2 協同調控 IL-1 誘導的 AP-1 活化 免疫學誌 16(4) : 250-253 , 2000
- 53.J. S. Won, S. O. Huh, Y. H. kim, Effect of melatonin on the regulation of proenkephalin and prodynorphin mRNA levels induced by kainic acid in the rat hippocampus, Hippocampus , 10 : 236-243 , 2000
- 54.陳奇 中藥藥理研究方法學 人民衛生出版社 , 1996
- 55.M. H. Cobb, MAP kinase pathways , Biophysics Molecular Biology, 71: 479-500 , 1999
- 56.D. D. Li, Z. H. Feng, W. Q. Zhang, J. S. Hong, The changes of AP-1 DNA binding activity and component in hippocampus of seizure-sensitive rat induced by kainite, Acta Physiologica Sinica , 50(4) : 385-391, 1998

**Study in the role of activator protein-1
in the antiepileptic mechanism of *Gastrodia elata* BL. in
kainic acid-induced epileptic seizures rats.**

Chih-Chien Lin

Major professor : Ching-Liang Hsieh

Institute of Chinese Medical Science, China Medical College

Our previous study has known that *Gastrodia elata* Bl. (GE) can decrease epileptic seizures and oxygen free radicals in Kainic acid (KA)-induced epileptic seizures Sprague-Dawley (SD) rats, suggesting antiepileptic mechanisms of GE results from the suppressive or scavenging effect of free radicals partly. In addition, GE also can inhibit proliferation and activation of microglia, and apoptosis in the rat brain of KA-treated rats.

Several studies finding that activator protein-1 (AP-1) involves neuronal apoptosis and plays a regulatory role in long-term neuronal plasticity. Therefore, the aim of the present study is to investigate the role of AP-1 in antiepileptic mechanism of GE. A total of 15 male SD rats were studied, they were treated with oral administration of PBS solution, GE 1.0g/kg, GE 0.5 g/kg, and valproic acid (VA) 250 mg/kg for one week, respectively, prior to KA 12 mg/kg intra-peritoneal injection. Electroencephalogram (EEG) and electromyogram (EMG) recordings, and behavior were observed for 3 hrs after KA administration, then the rats brain were removed, and cerebral cortex and hippocampus regions of the brain tissue were separated, respectively. Finally, the activating pathways of AP-1, including extracellular signal regulated kinase (ERK), Jun-N-terminal kinase (JNK) and p38 kinase were analyzed by Western blotting. The results indicated that Both GE and VA can decrease wet dog shakes, and AP-1 was activated via mediated a JNK-phosphate (JNK-P) pathway was observed in the frontal cortex and hippocampus region.

In conclusion, GE can decrease epileptic seizures in KA-treated rats, but enhanced AP-1 activity, suggesting that GE possibly accelerated generation of AP-1 to induce a negative feedback for self-protection. In addition, GE is via mediated JNK-P pathway to activate AP-1.

Keywords: Kainic acid , Activator protein-1 , Western blotting , Valproic acid , Jun-N-terminal kinase

謝 辭

讀研究所，參與研究計劃對我而言是一個全新截然不同的經驗，無論是研究方法的學習及待人接物，都令驚鈍的我能有一嶄新的學習機會。感謝指導教授謝慶良博士、侯庭鏞老師及江素瑛老師不斷的指導和勉勵，方使實驗、論文得以完成，在此衷心感謝，永誌難忘。

忙碌的實驗室生活有甘有苦，從實驗過程中的挫折，乃至漸入佳境，承蒙研究助理曉韻小姐、瑛宜小姐的大力協助，使得研究有初步成果。學長姥芝瑞醫師、程錦宜醫師對於實驗過程的指教，及所有幫助我的師長及朋友們，致上最高的謝意。

與鼠為伍的日子告一段落，由於牠們的奉獻，使醫學研究成果造福人群，願一束馨香，感謝動物的大愛。

最後，感謝父母多年的支持與栽培。多年的校園生涯，暫時告一段落，而更令人難忘的是在冬日的夜裏，我與新婚妻子齊至實驗室餵鼠的日子，她的鼓勵，更是我前進的動力。

『生也有涯，知也無涯』，實驗有結束的時候，而知識的學習卻是不斷的，願存謝天之心。