

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

Activator protein-1 在天麻對 kainic acid 誘發癲癇發作大白
鼠抗癲癇機轉所扮演的角色

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC91-2320-B-039-031-

執行期間：91年08月01日至92年07月31日

執行單位：中國醫藥大學醫學研究部

計畫主持人：謝慶良

計畫參與人員：侯庭鏞，江素瑛，林志堅，蒲曉韻

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 92 年 9 月 15 日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告書

Activator protein -1 在天麻對 kainic acid 誘發癲癇發作
大白鼠抗癲癇機轉所扮演的角色

The role of activator protein-1 in anticonvulsive
mechanisms of *Gastrodia elata* Bl on kainic acid-induced
epileptic seizure rats

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC 91-2320-B-039-031-

執行期間：91 年 8 月 1 日至 92 年 7 月 31 日

計畫主持人：謝慶良

共同主持人：侯庭鏞

計畫參與人員：江素瑛、林志堅、蒲曉韻

成果報告類型：精簡報告

執行單位：中國醫藥大學醫學研究部

中 華 民 國 92 年 9 月 10 日

中文摘要

Activator protein-1 在天麻對 kainic acid 誘發癲癇發作大白鼠抗癲癇機轉所扮演的角色

關鍵詞：天麻、Activator protein-1、癲癇發作、抗癲癇機轉

傳統中醫認為癲癇發作是肝臟陰陽間的不平衡造成肝風內動的結果，因此使用具有平肝熄風的中藥如天麻來治療癲癇發作。先前我們研究的結果已知天麻在大鼠能減少 kainic acid (KA) 所誘發的癲癇發作，而天麻的這些作用和它對於氧化自由基的抑制和清除有關。另外，我們發現天麻也能抑制 KA 所誘發的 microglia cell 的增殖和活化，以及 apoptosis 現象。一些研究報告指出 KA 能誘發 cerebral cortex 和 hippocampus 區域的 activator protein-1 (AP-1) 的表現，而 AP-1 的這些表現在急性期和長期兩者不同。長期的 AP-1 對於 neuronal plasticity 扮演一個重要角色，因此本研究目的在探討 AP-1 在天麻抗癲癇作用機轉所扮演的角色。將 60 隻 Sprague-Dawley (SD) 大白鼠分成實驗 A 和實驗 B 兩組，實驗 A 是在 KA 誘發癲癇發作前分別口服天麻 1.0 克/公斤、0.5 克/公斤和 valproic acid (VA) 250 毫克/公斤，而實驗 B 是在 KA 誘發癲癇發作後的隔日分別口服天麻 1.0 克/公斤、0.5 克/公斤和 VA 250 毫克/公斤二星期。最後將大鼠犧牲取腦，使用 Western blotting 法觀察前額葉大腦皮質和 hippocampus 區域 AP-1 的變化。結果顯示天麻 1.0 g/kg、0.5 g/kg 和 VA 250 mg/kg 在 KA 誘發癲癇發作前治療一星期，三者都能經由 Jun N-terminal kinase-phosphate (JNK-P) 訊息傳導路徑促進 KA 誘發癲癇發作大鼠前額葉皮質和 hippocampus 區域的 AP-1 活化，但不能經由 p38, p38-phosphate (p38-P), extracellular sign-regulated kinase (ERK), ERK-phosphate (ERK-P), JNK 的訊息傳導路徑來活化 AP-1。天麻 1.0 g/kg、0.5 g/kg 和 VA 250 mg/kg 在 KA 誘發癲癇發作後治療二星期，三者都能經由 JNK-P 訊息傳導路徑抑制 KA 誘發癲癇發作大鼠前額葉皮質和 hippocampus 區域的 AP-1 活化，但不能經由 p38, p38-P, ERK, ERK-P, JNK 的訊息傳導路徑來抑制 AP-1。

結論是天麻能經由 JNK-P 訊息傳導路徑來調節 KA 誘發癲癇發作大鼠前額葉皮質和 hippocampus 區域的 AP-1 活動。

英文摘要

The role of activator protein-1 in anticonvulsive mechanisms of *Gastrodia elata* Bl on kainic acid-induced epileptic seizure rats

Keywords: *Gastrodia elata* Bl., Activator protein-1, Epileptic seizure, Anticonvulsive mechanisms

According to the theory of Traditional Chinese Medicine (TCM), the main etiology of epileptic seizure is due to liver-wind stirring inside (肝風內動), and liver-wind stirring inside is resulting from the imbalance between Yin and Yang (陰和陽) in liver, therefore, using Chinese herbs or TCM formula that have an action of calm liver to stop wind (平肝熄風) to treat epileptic seizure, such as *Gastrodia elata* (GE). Our previous results have known that GE can decrease epileptic seizures, and this action is resulting from its suppressive and scavenging actions of oxygen free radicals. GE also can inhibit the proliferation and activation of microglia cells, and apoptosis in brain in the kainic acid (KA)-treated rats. Several reports indicate that KA can induce activator protein-1 (AP-1) expression in the cerebral cortex and hippocampus region, and AP-1 expressions are the difference between acute and long-term periods. Long-term AP-1 plays an important role for neuronal plasticity. Therefore, the purpose of the present study was to investigate the role of AP-1 in anticonvulsive mechanisms of GE. A total of 60 Sprague-Dawley (SD) rats were divided into experiment A and experiment B. In the experiment A, the rats were treated with GE 1.0 g/kg, 0.5 g/kg, or valproic acid (VA) 250 mg/kg, respectively, for one week prior to KA administration. In the experiment B, the rats were treated with GE 1.0 g/kg, 0.5 g/kg, or VA 250 mg/kg, respectively, for 2 weeks after KA administration. The rats were sacrificed and the brains were removed, and using Western blotting method to observe the changes of AP-1 in the frontal cortex and hippocampus region of the rat brain. The results indicated that pretreatment with GE 1.0 g/kg, 0.5 g/kg, or VA 250 mg/kg all can mediate via Jun N-terminal kinase-phosphate (JNK-P) pathway to enhance AP-1 activity of frontal cortex and hippocampus region in the KA-treated rats, but can not mediate via p38, p38-P, extracellular sign-regulated kinase (ERK), ERK-P or JNK pathway to activate AP-1. Posttreatment with GE 1.0 g/kg, 0.5 g/kg, or VA 250 mg/kg all can mediate via Jun N-terminal kinase-phosphate (JNK-P) pathway to inhibit AP-1 activity of frontal cortex and hippocampus region in the KA-treated rats, but can not mediate via p38, p38-P, ERK, ERK-P or JNK pathway to inhibit AP-1.

In conclusion, GE can mediate via JNK-P pathway to modulate AP-1 activity of frontal cortex and hippocampus region in KA-treated rats.

一、研究的背景和目的

癲癇是由於腦部慢性的損傷導致一群神經元同期性過度放電、反覆發作的慢性疾病。根據流行病學的推算台灣大約有 10 萬以上人患有癲癇。雖然現代的抗癲癇藥物十分的發達，但也只有大約 75% 的患者得到良好的控制，尚有 25% 的患者屬於頑固性的癲癇無法得到良好的控制³²。中醫認為癲癇發作是由於肝臟陰

陽間的不平衡，而造成肝風內動的結果，因此用平肝熄風的中藥或方劑來治療，中藥如天麻、鉤藤、石決明、羚羊角等，方劑有鎮肝熄風湯、天麻鉤藤飲等³³。Kainic acid (KA) 是由 *Digenea simplex* 海藻中分離出來的物質，它是一種麩氨酸鹽 (glutamate) 的類似物質，具有強的神經興奮毒性作用。腹腔或腦內注射 KA 可使大鼠及貓等動物產生類似人類癲癇發作和組織病理變化。大鼠注射 KA 會產生 wet dog shakes, facial myoclonia 和 paw tremor 等行為，這些現象很類似人類的複雜性部分性癲癇發作^{2,17,22,24,24,26,30}，因此 KA 常被用於癲癇發作動物模式的誘導物質。我們先前的研究已知於大鼠的腹腔注射 KA (12 mg/kg) 約 20 分鐘後，可使大鼠發生 wet dog shakes, paw tremor 和 facial myoclonia 的行為，wet dog shakes 大約於注射後 60-80 分鐘時的發作頻率達到頂峰、可維持至注射後的 3 小時^{8,9,10,11}。天麻和它的成份 vanillyl alcohol 能減少 KA 所誘發的癲癇發作，它們的抗癲癇作用部份來自於它們對於自由基的清除和抑制作用^{10,11}。

Activator protein-1 (AP-1) 是一種掌控細胞增值和分化的即發性早期蛋白，它可能被許多的因素所活化，如外在的壓力、離子或紫外線照射⁵、DNA 受損^{3,12}、氧化緊迫^{21,27}等。當細胞暴露於會造成 DNA 傷害的環境時，即發性早期基因 c-jun 和 c-fos 會立即受到活化，其產物 Jun 和 Fos 會形成 AP-1，來活化目標基因，也可由自我磷酸化來活化 c-jun^{1,28}。一些研究發現由 Metrazole、電擊痙攣、或由 KA 誘發癲癇發作的小鼠或大鼠，它們的 hippocampus 區域的 AP-1 DNA binding activity 增加^{6,7,18,19,23,29}。癲癇發作急性期所表現的 AP-1 DNA binding activity，大約於發作後的 4-5 小時達到巔峰，維持 18 小時，它和長期 (long term) 表現的 AP-1 DNA binding activity 不同^{7,19,29}，長期表現的 AP-1 DNA binding activity 可維持幾天、幾星期，甚至可達到 5 個月⁶。另外，急性和長期表現的 AP-1 complex，它們之間在調節神經功能上所扮演的角色也不同，急性期 AP-1 complex 是由一些基因所誘發，如 proenkephalin gene expression 的調節，它反應在 KA 刺激後的分到時之間，而長期的 AP-1 complex 和 neuronal plasticity 有關連，所以需要更長的時間從天至月⁶。一些研究發現當細胞受到外界壓力時會藉著 mitogen-activated protein kinase (MAPK) 的 Extracellular signal-regulated kinase (ERKs)、p38、和 stress-activated protein kinase (SAPK) / Jun N-terminal Kinase (JNK) 等三種訊息傳導路徑來活化 AP-1¹⁵。又 ERKs、JNKs 和 p38 的表現和活化可以隨著 kainic acid 所引起的興奮性毒性損傷如痙攣發作等^{13,15,31}。

本研究室依照過去的實驗結果，天麻有抗癲癇的作用，而其作用至少部分是來自於對脂質過氧化作用的抑制和對氧化自由基的清除，以及緩和 microglia 活化和 apoptosis 的作用，因此本次實驗以 KA (12 mg/kg) 於 SD 大鼠腹腔施行腹腔注射、觀察腦波和行為變化，然後在 KA 注射後的 3 小時和 2 星期分別將它們犧牲將腦取出，使用 Western blotting 法觀察 frontal cortex 和 hippocampus 區域 AP-1 的變化，藉此更了解 AP-1 在天麻之抗癲癇作用機轉所扮演的角色。

二、材料與方法

1. 天麻的製作

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。

2. 動物

本研究使用雄性 Sprague-Dawley (SD) 大白鼠,重量介於 200-250 克之間,它們購置於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 12 小時明暗控制和中央空調系統調節溫度和溼度。實驗過程依據實驗動物倫理規範來進行。

3. 電極的裝置

使用 chloral hydrate (400 mg/kg) 於 SD 大白鼠的腹腔注射,待動物麻醉後,將它們的頭部固定於動物立體定位儀上,然後剔除頭上的毛髮後,用刀片從頭部的正中線切開並剝離使露出頭骨,然後使用不鏽鋼的螺絲電極穿過頭蓋骨置於兩側感覺運動皮質的硬腦膜上,做為記錄電極。另一不鏽鋼之螺絲電極放置於前額竇上,做為參考電極。另外,將雙極電極線綁在頸部的肌肉處記錄表面肌電圖,最後將所有電極連接到一個連結器上,並用牙粉將連結器固定於大白鼠的頭部。電極至少裝置 7 天後才施行實驗,以電極線從連結器接到腦波肌電圖記錄器 (MP 100WSW Biopac system, Inc., California, USA)。

4. 動物分組

本研究分為實驗 A (急性期) 和 B (長期) 兩部份

4-1 實驗 A

將 30 隻 SD 大白鼠隨機分成五組,每組六隻如下:

- 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 mg/kg) 腹腔注射前的六天和前 15 分鐘各口服一次。
- 3) GE1.0 組: 方法同 2) 控制組,但口服天麻 1.0 g/kg。
- 4) GE0.5 組: 方法同 2) 控制組,但口服天麻 0.5 g/kg。
- 5) 對照組: 方法同 2) 控制組,但口服 valproic acid (VA) 250 mg/kg。

4-2 實驗 B

將 30 隻 SD 大白鼠隨機分成五組,每組六隻如下:

- 1) 正常組: 僅用 PBS (1.0 ml/kg) 溶液腹腔注射,而不使用 KA,除飼料外不另加任何藥物。
- 2) 控制組: 於 KA (12 mg/kg) 腹腔注射後的隔天開始,連續每天口服 PBS 溶液 1.0 ml/kg 14 天,KA 注射後的第 15 天將動物犧牲取腦。
- 3) GE1.0 組: 方法同 2) 控制組,但口服天麻 1.0 g/kg。
- 4) GE0.5 組: 方法同 2) 控制組,但口服天麻 0.5 g/kg。

5) 對照組：方法同 2) 控制組，但口服 VA 250 mg/kg。

5. 實驗流程

5-1 實驗 A

動物隨機分組後，於服用藥物前的 15 分鐘，開始記錄 SD 大白鼠的腦波和肌電圖，並觀察動物行為的變化，然後分別口服 PBS 1.0 ml/kg、天麻 1.0 g/kg、天麻 0.5 g/kg 和 VA 250 mg/kg，經 15 分鐘後除正常組外，腹腔注射 KA (12 mg/kg) 引發癲癇發作，行為和腦波的觀察是從服用藥物前的 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，最後將動物犧牲取腦，測量 frontal cortex 和 hippocampus 區域的 AP-1。

5-2 實驗 B

動物的腦波、肌電圖記錄，以及行為觀察是從 KA 注射前的 15 分鐘開始到 KA 注射後的 3 小時為止，除正常組外，確定有癲癇發作後，隨機分組，隔天開始連續 14 天，每天分口服 PBS (1.0 ml/kg) 溶液、天麻 1.0 g/kg、天麻 0.5 g/kg，或 valproic acid 250 mg/kg，KA 注射後的第 15 天將動物犧牲取腦，測定 frontal cortex 和 hippocampus 區域的 AP-1。

6. 製備 nuclear extract

先配製 10 X buffer H (100 mM HEPES-KOH pH 7.9, 250 mM KCl, 1.5 mM Spermine, 5 mM Spermine, 10 mM EGTA, 10 mM EDTA)、100 X protease inhibition mixture (50 mM PMSE, 0.1 M Benzamidine, 50 μ g/ml leupeptin, 100 μ g/ml pepstatin) 及 100 X phosphatase inhibitor mixture (200 nM okadaic acid, 20 mM sodium orthovanadate, 8 nM cypermethrin) 備用。將腦組織細胞以欲測試藥物處理適當時間之後，以冰冷 PBS 沖洗兩次並吸乾，加入 200 μ l 含有 0.25 X buffer H, 0.5 mM DTT, 1 X protease inhibitor mixture, 1 X phosphatase inhibitor mixture 之溶液，將細胞液轉移至新的離心管，再加入同腦組織細胞體積含 2 X buffer H, 20% glycerol, 0.5 mM DTT, 1 X protease inhibitor mixture, 1 X phosphatase inhibitor mixture 之溶液混合均勻後，於 4° C 中以 2,500 rpm，離心 10 分鐘，以去除上清液。再將細胞 lysate 以同細胞體積的 low salt buffer (1 X Buffer H, 20% glycerol, 1 mM DTT, 1 X protease inhibitor mixture, 1 X phosphatase inhibitor mixture) 混懸之後，加入 0.72 X 細胞體積的 high salt buffer (1 X buffer H, 1 M KCl, 20% glycerol, 1 mM DTT, 1 X protease inhibitor mixture, 1 X phosphatase inhibitor mixture)，於 4° C 進行萃取 45 分鐘，最後以 12,000 rpm，於 4° C 離心 5 分鐘，收集上清液，存放於 -70° C 備用。以 Bradford assay (Bio-Rad) 來測量蛋白質濃度。

7. Western blotting

為了偵測 AP-1 上游 ERKs (Extracellular signal-regulated kinase)、p38 kinase 及 JNKs (Jun N-terminal kinase) 磷酸化的比例，我們利用購自 NEB 的抗體，利用 SDS sample buffer (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 10% glycerol, 50 mM DTT, 0.1% bromophenol blue) 取得腦組織細胞萃取物之後，取 10 μ g 蛋白進行

10% SDS-PAGE 電泳分析，再將蛋白轉印到 NC paper 上。取同一時間進行轉印的 NC paper 來進行未磷酸化及磷酸化同一蛋白質分析。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。本研究取實驗 A 和實驗 B 中每組各三隻進行 Western blotting 法測定 AP-1 活性。

三、結果

實驗 A

1. 天麻前治療對 KA 誘發癲癇發作大鼠前額葉皮質和 hippocampus 區域 AP-1 的影響

天麻 1.0 g/kg、0.5 g/kg 和 VA 250 mg/kg 在 KA 誘發癲癇發作前治療一星期，都能經由 JNK-P 訊息傳導路徑促進 KA 誘發癲癇發作大鼠前額葉皮質和 hippocampus 區域的 AP-1 活化，但不能經由 P38，P38-P，ERK，ERK-P，JNK 的訊息傳導路徑來活化 AP-1。

實驗 B

2. 天麻後對 KA 誘發癲癇發作大鼠前額葉皮質和 hippocampus 區域 AP-1 的影響

天麻 1.0 g/kg、0.5 g/kg 和 VA 250 mg/kg 在 KA 誘發癲癇發作後治療二星期，都能經由 JNK-P 訊息傳導路徑抑制 KA 誘發癲癇發作大鼠前額葉皮質和 hippocampus 區域的 AP-1 活化，但不能經由 P38，P38-P，ERK，ERK-P，JNK 的訊息傳導路徑來抑制 AP-1。

四、討論和結論

我們的結果顯示 SD 大鼠於 KA 誘發癲癇發作前給予天麻或 VA，能經由 JNK-P 路徑增強鼠腦前額葉皮質和 hippocampus 區域 AP-1 的活性，而於 KA 誘發癲癇發作後給予天麻或 VA 能經由 JNK-P 路徑抑制鼠腦前額葉皮質和 hippocampus 區域 AP-1 的活性。這些結果說明天麻和 VA 兩者都能經由 JNK-P 路徑來調節 AP-1 的活性，同時也和一些更早期研究的結果一致^{14,15}。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¹⁸。長期的 AP-1 伴隨著神經細胞可塑性的改變⁶。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^{16,20}。AP-1 是由 Jun 和 fos 蛋白質組成的 dimer⁶，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 kinase⁴。

結論是天麻能經由 JNK-P 訊息傳導路徑來調節 KA 誘發癲癇發作大鼠前額葉皮質和 hippocampus 區域的 AP-1 活動。

五、參考資料

1. Angel, P., K. Hattori, T. Smeal and M. Karin. 1988. The jun proto-oncogene is positively autoregulated by its product, jun/AP-1. *Cell* 55: 875-885.
2. Ben-Ari, Y. 1985. Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid: mechanisms and relevance to human temporal lobe epilepsy. *Neuroscience*. 14: 375-403.
3. Brach, M. A., F. Herrmann and D. W. Kufe. 1992. Activation of the AP-1 transcription factor by arabinofuranosylcytosine in myeloid leukemia cells. *Blood* 79: 728-734.
4. Cobb, M.H. 1999. MAP kinase pathways. *Progress in Biophysics & Molecular Biology* 71: 479-500.
5. Dalton, T. P., H. G. Shertzer and A. Puga. 1999. Regulation of gene expression by reactive oxygen. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39: 67-101.
6. Feng, Z., W. Zhang, P. Hudson, G. Bing, W. Feng and J. S. Hong. 1997. Characterization of the long-lasting activator protein-1 complex induced by kainic acid treatment. *Brain Res.* 770: 53-59.
7. Hope, B. T., M. B. Kelz, R. S. Duman and E. J. Nestler. 1994. Chronic electroconvulsive seizure (ECS) treatment results in expression of a long-lasting AP-1 complex in brain with altered composition and characteristics. *J. Neurosci.* 14: 4318-4328.
8. Hsieh, C. L., M. F. Chen, T. C. Li, S. C. Li, N.Y. Tang, C. T. Hsieh, C. Z. Pon, J. G. Lin. 1999a. Anticonvulsant effect of *Uncaria Rhynchophylla (Miq) Jack*. In rats with kainic acid-induced epileptic seizure. *Amer. J. Chin. Med.* 27(2): 257-264.
9. Hsieh, C. L., N. Y. Tang, S. Y. Chiang, C. T. Hsieh, J. G. Lin. 1999b. Anticonvulsive and free radical scavenging actions of two herbs, *Uncaria Rhynchophylla (Miq) Jack* and *Gastrodia elata Bl.*, in kainic acid-treated rats. 65(20): 2071-2082.
10. Hsieh, C. L., S. Y. Chiang, K. S. Cheng, N. Y. Tang, C. J. Lee, C. Z. Pon, C. T. Hsieh, J. G. Lin. 2001a. Anticonvulsive and free radical scavenging activities of *Gastrodia elata Bl.* in kainic acid-treated rats. *Amer. J. Chin. Med.* 29: 331-341.
11. Hsieh, C. L., C. J. Lee, C. J. Chen, S. Y. Chiang, N. Y. Tang, C. T. Hsieh and J. G. Lin. 2001b. Anticonvulsive effect and mechanisms of vanillyl alcohol on kainic

- acid-induced epileptic seizures in rats. *Taiwan J. Chin. Med.* 1:19-34.
12. Kasibhatla, S., T. Brunner, L. Genestier, F. Echeverri, A. Mahboubi and D. R. Green. 1998. DNA damaging agents induced expression of Fas ligand and subsequent apoptosis in T lymphocytes via the activation of NF-kappa B and AP-1. *Mol. Cell* 1: 543-551.
 13. Kim, I. J., K. W. Lee, B. Y. Park, J. K. Lee, J. Park, I. Y. Choi, S. J. Eom, T. S. Chang, M. J. Kim, Y. I. Yeom, S. K. Chang, Y. D. Lee, E. J. Choi and P. L. Han. 1999. Molecular cloning of multiple splicing variants of JIP-1 preferentially expression in brain. *J. Neurochem.* 72(4): 1335-1343.
 14. Li, D., D., Z.H. Feng, W.Q. Zhang, J.S. Hong. 1998. 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.
 15. Mielke, K., S. Brecht, A. Dorst and T. Herdegen. 1999. Activity and expression of JNK1, P38, and ERK kinases, c-Jun N terminal phosphorylation, and c-jun promoter binding in the adult rat brain following kainate-induced seizures. *Neurosci.* 91(2): 471-483.
 16. Morgan, J.I., D.R. Cohen, J.L. Hempstead, T. Curran. 1987. Mapping patterns of c-fos expression in the central nervous system after seizure. *Science.* 237:192-197.
 17. Nitecka, L., E. Tremblay, G. Charton, J. P. Bouillot, M. L. Berger, Y. Ben-Ari. 1984. Maturation of kainic acid seizure-brain damage syndrome in the rat. II. Histopathological sequelae. *Neurosci.* 13(4): 1073-1094.
 18. Pennypacker, K. R., D. Walczak, L. Thai, R. Fannin, E. Mason, J. Douglass and J. S. Hong. 1993. Kainate-induced changes in opioid peptide genes and AP-1 protein expression in the rat hippocampus. *J. Neurochem.* 60: 204-211.
 19. Pennypacker, K. R., L. Thai, J. S. Hong and M. K. McMillian. 1994. Prolonged expression of AP-1 transcription factors in the rat hippocampus after systemic kainite treatment. *J. Neurosci.* 14: 3998-4006.
 20. Popovici, T., A. Represa, V. Crépel, G. Barbin, M. Beaudoin and Y. Ben-Ari. 1990. Effects of kainic acid -induced seizures and ischemia on c-fos-like protein in rat brain. *Brain Res.* 536: 183-194.
 21. Pyatt, D. W., W. S. Stillman and R. D. Irons. 1996. Reactive oxygen species mediate stem cell factor synergy with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor in a subpopulation of primitive murine hematopoietic progenitor cells. *Mol. Pharmacol.* 49: 1097-1103.
 22. Schwob, J. E., T. Fuller, J. L. Price, and J. W. Olney. 1980. Widespread patterns of neuronal damage following systemic or intracerebral injections of kainic acid: A histological study. *Neuroscience.* 5: 991-1014.
 23. Sonnenberg, J. L., C. Mitchelmore, P. F. Macgregor-Leon, J. Hempstead, J. I.

- Morgan and T. Curran. 1989. Glutamate receptor agonists increase the expression of Fos, Fra, and AP-1 DNA binding activity in the mammalian brain. *J. Neurosci. Res.* 24: 72-80.
24. Tanaka, S., K. Sako, T. Tanaka, I Nishihara and Y. Yonemasu. 1990. Uncoupling of local blood flow and metabolism in the hippocampal CA3 in kainic acid-induced limbic seizure status. *Neurosci.* 36: 339-348.
25. Tanaka, T., S. Tanaka, T. Fujita, K. Takano, H. Fukkuda, K. Sako, and Y. Yonemasu. 1992. Experimental complex partial seizures induced by a microinjection of kainic acid into limbic structures. *Prog. Neurobiol.* 38: 317-334.
26. Tremblay, E., L. Nitecka, M. L. Berger, and Y. Ben-Ari. 1984. Maturation of kainic acid seizure-brain damage syndrome in the rat. I. Clinical, electrographic and metabolic observations. *Neuroscience.* 13: 1051-1072.
27. Tong, L. and J. R. Perez-Polo. 1995. Transcription factor DNA binding activity in PC12 cells undergoing apoptosis after glucose deprivation. *Neurosci. Lett.* 191: 137-140.
28. Van Dam, H., D. Wilhelm, I. Herr, A. Steffen, P. Herrlich and P. Angel. 1995. ATF-2 is preferably activated by stress-activated protein kinase to mediate c-jun induction in response to genotoxic agents. *EMBO J.* 14: 1798-1811.
29. Winston, S. M., M. D. Hayward, E. J. Nestler and R. S. Duman. 1990. Chronic electroconvulsive seizures down-regulate expression of the immediate-early genes c-fos and c-jun in rat cerebral cortex. *J. Neurochem.* 54: 1920-1925.
30. Wuerthele, S. M., K. L. Lovell, M. Z. Jones and K. E. Moore. 1978. A histological study of kainic acid-induced lesions in rat brain. *Brain Res.* 149: 489-497.
31. Yang, D. D., C. Y. kuan, A. J. Whitmarsh, M. Rincon, T. S. Zheng, R. J. Davis, P. Rakic and R. A. Flavell. 1997. Absence of excitotoxicity-induced apoptosis in the hippocampus of mice lacking the *Jnks* gene. *Nature* 389: 865-870.
32. 關尚勇 2001 年 最新癲癇病人手冊 翳軒圖書出版射
33. 孫孝洪 1992 年 中醫治療學原理 知音出版社
34. 林志堅 2003 年 Activator protein-1 在天麻抗 kainic acid 誘發癲癇發作機轉所扮演角色之研究 中國醫藥學院中國醫學研究所碩士論文

六、計畫成果自評

1. 研究內容與原計畫相符，達成預期目標。
2. 研究成果可作為教學內容的一部份。
3. 研究結果對天麻的抗癲癇機轉有更進一步的瞭，對於臨床應用有很大的助益。

