



計畫編號：CCMP88-RD-020

行政院衛生署八十八年度科技研究發展計畫

口服大黃、天麻、鉤藤對 Kainic acid 誘發癲癇發作  
老鼠效用之研究

委託研究報告

計畫委託機關：中國醫藥學院

計畫主持人：謝慶良

研究人員：李世滄 魏素敏

執行期間：87年7月至88年6月

\*\*本研究報告僅供參考，不但表本署意見\*\*

## 目錄

摘要.....	1
ABSTRACT.....	3
壹、前言.....	5
貳、材料與方法.....	6
參、結果.....	9
肆、討論.....	10
伍、結論與建議.....	13
陸、參考文獻.....	14
柒、附錄.....	17

編號：CCMP88-RD-020

# 口服大黃、天麻、鉤藤對 Kainic acid 誘發 癲癇發作老鼠效用之研究

計畫主持人：謝慶良

執行機構：中國醫藥學院

## 摘要

鉤藤和天麻是傳統的中藥，自古以來它們經常合併用來治療痙攣性疾病，如癲癇。本研究的目的是探討天麻、鉤藤的抗癲癇作用及自由基的清除作用並和大黃及 carbamazepine 做對照比較。研究分為 A 和 B 兩部份：實驗 A) 體外研究方面，將六隻雄性 Sprague-Dawley (SD) 老鼠的腦組織加入 Kainic acid (KA, 120 µg/ml) 後附加不同濃度的鉤藤或鉤藤加天麻，然後使用 TBAR 法測定腦組織的脂質過氧化物濃度。體內研究方面，將 24 隻雄性的 SD 老鼠分成四組，每組六隻如下：1) 正常組：不施行任何藥物，或腦波、肌電圖記錄；2) 控制組：使用 KA (12 mg/kg) 腹腔注射；3) 鉤藤組：KA 注射前的 30 分鐘口服鉤藤 1.0 g/kg；4) 鉤藤加天麻組：KA 注射前 30 分鐘口服鉤藤和天麻各 1.0 g/kg。實驗 B) 體外研究方面，將六隻雄性 SD 老鼠的腦組織加入 KA 120µg/ml 後附加不同濃度的天麻，然後使用 TBAR 法測量腦組織的脂質過氧化物濃度。體內研究方面，將 30 隻雄性的 SD 老鼠分成五組，每組六隻如下：1) 控制組：腹腔注射 KA (12 mg/kg)；2) 天麻 1.0 組：KA 注射前 30 分鐘口服天麻 1.0 g/kg；3) 天麻 0.5 組：KA 注射前 30 分鐘口服天麻 0.5 g/kg；4) 大黃組：KA 注射前 30 分鐘口服大黃 1.0 g/kg；5) 對照組：KA 注射前 30 分鐘口服 carbamazepine 20 mg/kg。行為觀察和腦波、肌電圖的記錄是從藥物服用前的 30 分鐘到 KA 注射後的 3 小時為止，然後我們測定腦組織的脂質過氧化物濃度和血液中的氧化自由基濃度。結果顯示鉤藤、天麻在體外對可以抑制 KA 誘發的脂質過氧化作用，但天麻不能增強鉤藤的這些作用。鉤藤能減少 KA 誘發的 wet dog

shakes, facial myoclonia 和 paw tremor 的次數，但天麻不能增強鉤藤的這些作用。鉤藤能延長 wet dog shakes 第一次發作時間從 27 分鐘到 40 分鐘，而鉤藤加天麻能延長到 63 分鐘。天麻 1.0 g/kg, 0.5 g/kg 和 carbamazepine 20 mg/kg 可以減少 KA 誘發的 wet dog shakes 的次數，而對 paw tremor 則沒有抑制的作用。天麻 1.0 g/kg 可以延遲第一次 wet dog shakes 的發作時間。鉤藤 1.0 g/kg, 天麻 1.0 g/kg, 0.5 g/kg, 大黃 1.0 g/kg 和 carbamazepine 20 mg/kg 可以減少腦組織的脂質過氧化物濃度以及血液中的 lucigenin chemiluminescence (CL) 的數目，另外鉤藤 1.0 g/kg, 天麻 1.0 g/kg 也可以減少血液中的 luminol-CL 的數目，但天麻不能增強鉤藤的那些作用。

我們的結論是鉤藤和天麻都有抗癲癇的作用，而且兩者互相配合有協同的作用。它們的抗癲癇作用至少部份來自於對脂質過氧化作用的抑制和對氧化自由基的清除作用。另外大黃和傳統中醫藥的典籍所記錄的一致，不具有抗癲癇的作用。

關鍵詞：鉤藤，天麻，癲癇發作，脂質過氧化作用，Luminol chemiluminescence, Lucigenin chemiluminescence

CCMP88-RD-020

**A study in the effect of Ta-Huang (大黃)、天麻 (Tien-Ma)  
and Kou-Teng (鉤藤)**

**Ching-Liang Hsieh  
China Medical College**

**Abstract**

*Uncaria rhynchophylla* (Miq.) Jack (UR) and *Gastrodia elata* Bl. (GE) are traditional Chinese herbs that are usually used in combination to treat convulsive disorders, such as epilepsy. The aim of this study was to investigate the anticonvulsive and free radical scavenging activities of UR and GE, and contrast to *Rheum officinale* Baill (RO) and carbamazepine in Sprague-Dawley (SD) rats. The study divided into two parts of experiment A and B. Experiment A) For the in vitro studies, brain tissue from 6 male SD rats were treated with 120 µg/ml kainic acid (KA), with or without additional varies concentrations of UR or UR plus GE. For the in vivo studies, 24 SD male adult rats were divided into 4 groups of 6 rats as follows: 1) Normal groups: no drug administration, and electroencephalographic (EEG) and electromyographic (EMG) recordings; 2) Control group: received intraperitoneal injection of KA (12 mg/kg); 3) UR group: received oral administration of UR 1.0 g/kg 30 min prior to KA administration; 4) UR plus GE group: received oral administration of UR 1.0 g/Kg and GE 1.0 g/kg 30 min prior to KA administration. Experiment B) For the in vitro studies, brain tissue from 6 male SD rats were treated with 120µg/ml KA, with or without varies concentrations of GE. For the in vivo studies, 30 male rats were divided into 5 groups of 6 rats as follows: 1) Control group: KA 12 mg i.p.; 2) GE 1.0 group: oral administration of GE 1.0 g/kg 30 min prior to KA administration; 3) GE 0.5 group: oral administration of GE 0.5 g/kg 30 prior to KA administration; 4) RO group: oral administration of RO 1.0 g/kg 30 min prior to KA administration; 5) Contrast group: oral administration of carbamazepine 20 mg/kg 30 min prior to KA administration. Epileptic seizures were verified by behavioral observations, and EEG and EMG recordings, and lipid peroxide levels in brain and Luminol chemiluminescence (CL) and Lucigenin counts in peripheral blood were measured simultaneously. The results of experiment A showed that UR alone decreased KA-induced lipid peroxide levels in vitro, whereas UR plus GE did not produce a greater effect than UR

alone. UR significantly reduced counts of wet dog shaking (WDS), paw tremor (PT) and facial myoclonia (FM) in KA-treated rats and significantly delayed the onset of WDS, from 27 min in the control group to 40 min in the UR group. UR plus GE did not inhibit seizures more effectively than UR alone, but did further prolong the onset time of WDS, to 63 min. UR alone reduced the levels of free radicals in vivo, as measured by lipid peroxidation in the brain and luminol-CL counts and lucigenin-CL counts in peripheral whole blood, but the combination of GE and UR did not reduce free radical levels more than UR alone. The results of experiment B showed that GE decreased KA-induced lipid peroxide levels in vitro. GE 1.0 g/kg, 0.5 g/kg and carbamazepine 20 mg/kg significantly reduced counts of WDS, but no similar effect on PT. GE 1.0 g/kg significantly delayed the onset of WDS. GE 1.0 g/kg, 0.5 g/kg, RO 1.0 g/kg and carbamazepine 20 mg/kg reduced the levels of free radicals in vivo, as measured by lipid peroxidation in the brain and lucigenin-CL counts in peripheral blood. GE 1.0 g/kg also reduced luminol-CL counts in peripheral blood.

Our conclusion is that both UR and GE have anticonvulsive effect, and have synergic action in the anticonvulsion. anticonvulsive action of UR or GE, at least in part results from their suppression of lipid peroxidation and free radical scavenging activities. In addition, RO has no anticonvulsive action which is the same as Chinese writings recordings.

**Keywords:** *Uncaris rhynchophylla*, *Gastrodia elata Bl.*, Epileptic seizure, Lipid peroxidation, Luminol-chemiluminescence, Lucigenin-chemiluminescence.

## 壹、前言

鉤藤和天麻是傳統的中藥，兩者常被結合使用來治療癲癇發作。先前研究已知鉤藤和天麻在老鼠可以減少 FeCl<sub>3</sub> 誘發的脂質過氧化物濃度的增加 (Liu and Mori 1992)。我們先前的研究已知腹腔注射 KA 可以誘發自由基的產生，而且 KA 誘發 wet dog shakes (WDS) 和自由基兩者之間變化的時間經過有密切關係，鉤藤的抗癲癇作用和它的自由基清除作用有關 (Hsieh et al. 1999)。一些研究指出天麻對於自由基的清除作用主要來自於它的活性成份，如 vanillin、p-Hydroxybenzyl alcohol (Liu and Mori 1992, 1993)。

KA 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。我們和一些先前的研究已知腹腔注射或腦內注射 KA 可以誘發老鼠發生 WDS, paw tremor (PT) 和 facial myoclonia (FM) 的現象，這些行為很類似人類的複雜性部份性癲癇發作 (Ben-Ari 1985, Tanaka et al. 1988, Nitecka et al. 1984, Schwob et al. 1980, Tanaka et al. 1990, Tremblay et al. 1984, Wuerthele et al. 1978, Hsieh et al. 1999)。

雖然鉤藤和天麻使用來治療癲癇發作有很長的一段時期，而且它們具有自由基的清除作用已被知道，但它們的抗癲癇作用機轉及兩者間的交互作用如何至今仍然不清楚。因此本研究為了更進一步的了解它們的抗癲癇機轉以及兩者間的交互關係，首先在體外測量鉤藤和天麻的抗脂質氧化作用；其次使用 KA 誘發老鼠產生癲癇發作以及自由基的產生，以 WDS, PT, FM 以及第一次 WDS 發作時間為指標來評估鉤藤和天麻的抗癲癇效果以及兩者間的相互關係，同時我們測量腦中的脂質過氧化物濃度和末梢血液中 luminol-CL 和 lucigenin-CL 的數目，並和無抗癲癇作用的中藥大黃以及西藥 carbamazepine 做對照。

## 貳、材料與方法

### 一、中藥的萃取

本實驗所用的鈎藤、天麻和大黃都是來自中國大陸的四川省，而購自於台灣市面並經過中藥專家鑑定。2 公斤的粗鈎藤用 2 公升的 methanol 萃取三次，2 公斤的粗天麻以 3 公升 50% 的酒精萃取四次，以及 3 公斤大黃的根部以 8 公升 50% 酒精萃取四次後將這些萃取物過濾、冷凍乾燥，然後將它們分別貯存在乾燥箱中。鈎藤的總產量是 110 克 (5.5%)，天麻的總產物是 147 克 (7.35%)，而大黃的總產量是 217 克 (7.23%)。

### 二、實驗過程

#### 1. 動物

雄性成熟的 SD 老鼠，它們的體重是 200-250 克，每 3 隻為一群飼養於鐵籠中，在 25 度 C 的環境下維持一個 12 小時的光—暗循環。本研究分為 A 和 B 兩個實驗，每個實驗都分為兩個步驟如下：1) 體外研究是測量脂質過氧化物濃度；2) 體內研究包括行為觀察，腦波和肌電圖記錄，以及自由基的測定。

#### 2. 體外脂質過氧化物濃度的測定

六隻 SD 雄性老鼠在 pentobarbital (50 mg/kg) 的麻醉狀態下，分別使用 10cc 的冰食鹽水從心臟灌流後取出它們的腦，然後將它們的大腦皮質剝離。大腦皮質在 pH 7.4, Tris-Cl 的溶液中磨成均質液，並且將這些均質液在 3000 rpm 下離心 15 分鐘，然後取出浮上液測量脂質过氧化物的濃度。脂質過氧化物濃度是藉著 malondialhyde (MDA) 的濃度。大腦皮質的浮上液在加入 KA 120  $\mu\text{g/ml}$  後在實驗 A) 部份是分別加入不同濃度的鈎藤 (0.01 mg/ml, 0.1 mg/ml, 1 mg/ml, 10 mg/ml) 或鈎藤加天麻 (各 0.01 mg/ml, 0.1 mg/ml, 1 mg/ml, 10 mg/ml) 和 vitamin E 10 mM；實驗 B) 部份是分別加入天麻 10 mg/ml, 1 mg/ml, 0.1 mg/ml 和 0.01 mg/ml 和 vitamin E 10 mM，然後放置於攝氏 37 度的保溫箱中 2 小時，隨後又附加 8.1% SDS (sodium dodecyl sulfate, sigma Co., USA) 和 TBAR (2-thiobarbituric acid + 20% acetic



acid) 之後它們又被放置於攝氏 95 度的保溫箱中 1 小時，然後將它們冷卻至室溫。附加 5 cc 的 n-butanol 放入懸浮液中並在 3000 rpm 下離心 15 分鐘，最後在 532 nm 的光譜下讀出 MDA 的濃度 (Spectrophotometer, Beckman Instruments Inc., California, USA)，並利用已知等量的 MDA 建立一個標準曲線，結果的計算是以每克組織 n mol 來表示。

### 3. 行為觀察和腦波、肌電圖的記錄

行為觀察和腦波、肌電圖的記錄是在老鼠清醒且自由活動的情況下施行。實驗 A) 是將 24 隻雄性的 SD 老鼠分成四組，每組六隻如下：1) 正常組：不施行任何藥物，或腦波、肌電圖記錄；2) 控制組：使用 KA (12 mg/kg) 腹腔注射；3) 鉤藤組：KA 注射前的 30 分口服鉤藤 1.0 g/kg；4) 鉤藤加天麻組：KA 注射前的 30 分鐘口服鉤藤和天麻各 1.0 g/kg；實驗 B) 是將 30 雄性 SD 老鼠分成 5 組，每組六隻如下：1) 控制組：施行腹腔注射 KA (12 mg/kg)；2) 天麻 1.0 組：KA 注射前的 30 分鐘口服天麻 1.0 g/kg；3) 天麻 0.5 組：KA 注射前的 30 分鐘口服天麻 0.5 g/kg；4) 大黃組：KA 注射前的 30 分鐘口服大黃 1.0 g/kg；5) 對照組：KA 注射前的 30 分鐘口服 carbamazepine 20 mg/kg。實驗前的一星期，這些老鼠在 pentobarbital (50 mg/kg) 的麻醉下將電極安置。那些 SD 老鼠的頭顱被暴露後，使用不鏽鋼的螺絲釘電極安置在兩側感覺運動皮質區的硬腦膜上做為記錄電極，而參考電極則安置在前額竇上。肌電圖的記錄是使用雙極的電線穿過皮下安置在頸部的肌肉上。這些電極被插入一個連接器上，然後連接到腦波和肌電圖記錄器 (MP100WSW, BIOPAC System, Inc., California, USA)。行為觀察和腦波記錄是從藥物施予前的 30 分鐘到 KA 注射後的 3 小時為止。抗癲癇效用的評估是以 KA 誘發的 WDS, PT, FM 和第一次 WDS 的發作時間為指標。我們藉著行為的觀察和腦波呈現癲癇發作活動及肌電圖來證實癲癇發作。

### 4. 活體內自由基的測量

行為觀察和腦波、肌電圖記錄完成後，我們同時測定老鼠腦中脂質過氧化物的濃度和末梢血液中 luminol-CL 和 Lucigenin-CL 的數目。每一隻老鼠在 pentobarbital 的麻醉下，使用含有 heparin 的管從心臟取得 2cc 的血液。

這些血液樣本的外圍是使用鋁箔紙包著以防止瀑光並保存在冰塊中一直到測定 CL 為止，一般而言都在 2 小時之內完成測量。將另外 1cc 的血液放入含有 EDTA 的管中被用來測量白血球 (WBC) 的數目。在使用 10cc 冰食鹽水從心臟灌流之後，分別剝離前額葉皮質 (frontal cortex)，杏仁核 (amygdala) 和海馬 (hippocampus) 區域的腦組織並放入 pH 7.4 的 Tris-HCl 溶液中磨萃成均質液。這些均質液在 3000 rpm 下離心 15 min，然後取出懸浮液用 MDA 的方法來決定脂質過氧物的濃度，方法如同上述。

測量 luminol-CL 的方法是和先前研究的方法相似 (Sun et al. 1998)。簡單的說就是將 0.2 cc 的全血和 0.1 cc 的緩衝溶液 (PBS, pH 7.4) 混合後放入一個特製的腔室中 (Model CLD-110, Tohoku Electronic Indust. Co.)。化學發光是使用化學發光分析系統 (Tohoku Electronic Industrial Co., Sendai, Japan) 在暗室中測量。這個系統包含一個 photon detector (Model CLD-110)，一個 chemiluminescence counter (Model CLC-10)，一個 water circulator (Model CH-201) 和一個 32-bit IBM 個人電腦。200 秒之後，1.0 ml 25 mM luminol 的 PBS 溶液被注射進入不鏽鋼的密室中，而這些血液樣本的發光仍繼續被測量。600 秒之後，加入 0.2 ml 的 Zymosa-A，而這些血液樣本的發光連續測量至 1020 秒為止。總發光值的計算是曲線下的總面積減去底部而成的。CL 值除去血液中白血球數目，最後表示是以 1000 WBC 的發光值來表示。

測量 lucigenin-CL 的方法是和先前的方法相似 (Sun et al. 1996, 1998; Chen et al. 1997)。簡單的說就是將 0.2 cc 的全血和 0.1 cc 的緩衝溶液 (PBS, pH 7.4) 混合後放入一個特製的腔室中 (Model CLD-110, Tohoku Electronic Indust. Co.)，如上所述。200 秒之後，1.0 ml 0.01 mM lucigenin 的 PBS 溶液被注射進入不鏽鋼的密室中，而這些血液樣本的發光仍繼續被測量。600 秒之後，加入 0.2 ml 的 Zymosa-A，而這些血液樣本的發光連續測量至 1020 秒為止。總發光值的計算如上所述。

### 三、統計分析

資料是以 Mean $\pm$ SD 來表示。我們使用 one way of variance (ANOVA) 的 Scheffe's test 來檢定各組間的差異。P 值小於 0.05 被定為有意義差。

## 參、結果

### 實驗 A

#### 一、鉤藤和鉤藤加天麻在體外對 KA 誘發脂質過氧化作用的效應

在體外 SD 老鼠的腦組織在加入 KA 後，腦組織的脂質過氧化物的濃度增加( $P < 0.001$ ，圖一)；這些增加能被鉤藤或鉤藤加天麻抑制( $P < 0.001$ ，圖一)，但天麻不能增強鉤藤的這些抑制作用( $P > 0.05$ ，圖一)。

#### 二、鉤藤和鉤藤加天麻對 KA 誘發癲癇發作的抗癲癇效應

18 隻 SD 老鼠在 KA (12 mg/kg) 注射後都發生癲癇發作。發作的類型包括 WDS, PT 和 FM, 每一種類型的發作都有它們特徵性的腦波活動 (圖二)。

口服鉤藤 1.0 g/kg, 和鉤藤 1.0 g/kg 加天麻 1.0 g/kg 能減少 WDS ( $P < 0.001$ ，圖三), PT ( $P < 0.001$ ，圖三) 和 FM ( $P < 0.001$ ，圖三) 的次數。但鉤藤和鉤藤加天麻的抗癲癇作用兩者之間沒有差別 ( $P > 0.05$ ，圖三)。鉤藤能使 KA 誘發第一次 WDS 的發作時間從對照組的 27 分鐘延長到 40 分鐘，而鉤藤加天麻則延長到 63 分鐘 ( $P < 0.05$ ，圖三)。

#### 三、鉤藤和鉤藤加天麻在老鼠體內對 KA 誘發自由基的清除作用

在 KA 注射後老鼠大腦皮質的 frontal cortex, amygdala, and hippocampus 區域的脂質過氧化物濃度增加 ( $P < 0.001$ ，圖四)，這些增加能被口服鉤藤或鉤藤加天麻抑制 ( $P < 0.001$ ，圖四)。但對於脂質過氧化作用的抑制，鉤藤和鉤藤加天麻兩者之間沒有差別 ( $P > 0.05$ ，圖四)。全血的 luminol-CL counts 在 KA 注射後增加 ( $P < 0.001$ ，圖五)，這些增加能被口服鉤藤或鉤藤加天麻所抑制 ( $P < 0.001$ ，圖五)，但鉤藤和鉤藤加天麻兩組之間的 luminol-CL counts 沒有差別 ( $P > 0.05$ ，圖五)。同樣的 KA 注射後末梢血液中 lucigenin-CL counts 也增加 ( $P < 0.05$ ，圖五)，而這些增加能被鉤藤 ( $P < 0.001$ ，圖五) 或鉤藤加天麻 ( $P < 0.05$ ，圖五) 所抑制，但鉤藤和鉤藤加天麻兩組之間的 lucigenin-CL counts 沒有差別 ( $P > 0.05$ ，圖五)。

## 實驗 B

### 一、天麻在體外對 KA 誘發脂質過氧化的作用

KA 投予後老鼠腦的脂質過氧化物濃度增加 ( $P < 0.001$ , 圖六), 而這些增加能被不同濃度的天麻所抑制 (10 mg/ml, 1 mg/kg, 0.1 mg/ml, 0.01 mg/ml;  $P < 0.001$ , 圖六), 天麻抑制脂質過氧化作用的強度與劑量有關。

### 二、天麻對於 KA 誘發癲癇發作老鼠的抗癲癇效用

口服天麻 1.0 g/kg, 0.5 g/kg 和 carbamazepine 20 mg/kg 能減少 KA 誘發的 WDS 的次數, 天麻 1.0 g/kg, 0.5 g/kg 也能減少 FM 的次數 ( $P < 0.001$ , 圖七), 但對 PT 沒有作用 ( $P < 0.05$ , 圖七)。口服天麻 1.0 g/kg 能延長 WDS 第一次發作的時間 ( $P < 0.001$ , 圖七), 但天麻 0.5 g/kg, 大黃 1.0 g/kg 和 carbamazepine 20 mg/kg 則沒有相似的作用 ( $P > 0.001$ , 圖七)。

### 三、天麻在活體對 KA 誘發大腦皮質脂質過氧化作用的效用

口服天麻 1.0 g/kg, 0.5 g/kg, 大黃 1.0 g/kg 和 carbamazepine 20 mg/kg 能減少 KA 誘發 frontal cortex, amygdala 和 hippocampus 區域的脂質過氧化物的濃度 ( $P < 0.001$ , 圖八)。

### 四、天麻在活體對於 KA 誘發末梢血液 luminol-CL 和 lucigenin-CL 的效用

口服天麻 1.0 g/kg 能減少 KA 誘發末梢血液 luminol-CL 的數目 ( $P < 0.001$ , 圖九), 而天麻 0.5 g/kg, 大黃 1.0 g/kg 和 carbamazepine 20 mg/kg 則沒有這個作用 ( $P > 0.05$ , 圖九)。口服天麻 1.0 g/kg, 0.5 g/kg 大黃 1.0 g/kg 和 carbamazepine 20 mg/kg 能減少 KA 誘發末梢血液 lucigenin-CL 的數目 ( $P < 0.05$ , 圖九)。

## 肆、討論

在體外我們發現老鼠腦的組織在加入 KA 後它們的脂質過氧化物的濃度增加, 這些結果和先前的一個研究報告 KA 對老鼠腦的不同區域會造成氧化傷害一致 (Melchiorri et al. 1995)。脂質過氧化作用的增加能被鉤藤抑制, 而且和鉤藤的濃度有關, 這些結果和先前的研究相似 (Lin et al. 1995), 他們的結論是鉤藤是一個強的抗氧化劑和對超氧自由基及氫氧自由基有清

除的作用。我們的結果顯示鉤藤加天麻抑制 KA 誘發的脂質過氧化作用沒有比單獨使用鉤藤強。一些研究已指出在體內和體外天麻和的活性成份如 p-hydroxybenzyl alcohol、vanillin 的作用有如抗氧化劑和自由基清除劑 (Liu and Mori 1992, 1993)。因此有一個可能的解釋是鉤藤和天麻對於抗脂質過氧化作用的機轉不同。

我們的結果顯示老鼠在 KA 腹腔注射後發展癲癇發作，它的行為包括 WDS, PT 和 FM。這些發現和我們及先前的一些研究一致 (Hsieh et al. 1999, Schwob et al. 1980, Tremblay et al. 1984, Nitecka et al. 1984)，他們結論這些行為的產生是由於 KA 造成大腦 hippocampus 和 amygdala 區域損傷所引起。我們發現每一類型的癲癇發作都有它們自己特徵性的電生理活動，這是和我們先前的結果一致 (Hsieh et al. 1999)。在 KA 注射前 30 分鐘口服鉤藤 1.0 g/Kg 可以減少 WDS, PT 和 FM 的發作頻率及延長 WDS 的第一次發作時間，如此我們推測鉤藤在老鼠對於 KA 所誘發的癲癇發作有抗癲癇的作用。雖然附加天麻不能促進鉤藤對 WDS, PT 和 FM 的減少，但能延長第一次 WDS 的發作時間，因此推測鉤藤和天麻對於抗癲癇是有協同的作用，這些協同作用可能來自至兩種中藥有不同的抗癲癇機轉。我們的假設被先前的研究說明天麻的水提取物可以抑制 KA 和 glutamate receptor 相結合 (Andersson et al. 1995)，而鉤藤的抗癲癇作用是來自於它對脂質過氧化作用的抑制 (Hsieh et al. 1999)。

在正常的老鼠 frontal lobe, amygdala 和 hippocampus 區域的過氧化脂質的濃度非常的相似，同時在 KA 投予後它們的增加也是非常的相似，這些結果和先前的研究非常的吻合 (Bruce and Baudry 1995, Melchiorri et al. 1995)，對於結果的解釋他們認為是因為 KA 對神經細胞的傷害主要是經由自由基的形成所導致 (Bruce and Baudry 1995, Kim et al. 1997)。另外，我們的結果顯示在老鼠口服鉤藤 1.0 g/Kg 能抑制 KA 所誘發的脂質過氧化物濃度，這些和我們先前及一個較早期研究說明鉤藤能抑制脂質過氧化作用，而且鉤藤的這個作用與它的劑量有關一致 (Hsieh et al. in press, Liu and Mori 1992)。我們的結果發現附加天麻不能增強鉤藤對 KA 誘發對脂質過氧化作用的抑制，這些和我們的體外研究一致。

末梢血液中的 Luminol-CL counts and lucigenin counts 在 KA 投予後增加，而這些增加能被鉤藤 1.0 g/kg 抑制。因為 luminol-CL 的程度是反應著 myeloperoxidase 的活動 (Takahashi et al. 1991, Sun et al. 1996, Kaeffer et al. 1992)，可從白血球產生 (Moslen 1994)，所以我們推測鉤藤有自由基的清除作用。luminol-CL 是氧化自由基產生速率的敏感指標 (Sun et al. 1998)。Lucigenin-CL 能從 NADP(H) oxidase 產生，它特殊的反應著 superoxide anion (Chen et al. 1997, Moslen 1994, Lu et al. 1996)。一些研究報告氧化自由基可以引起細胞膜的脂質過氧化作用而導致組織細胞的死亡 (Moslen 1994, Halliwell and Gutteridge 1984, Reiter et al. 1997)。我們的發現和先前研究的結果說明鉤藤對 superoxide radicals 和 hydroxyl radicals 有清除的作用相似 (Liu and Mori 1992, Lin et al. 1995)。附加天麻不能增強鉤藤對這些自由基的清除作用，這些結果在體內和在體外是一致的。

我們的結果顯示天麻在體外可以減少 KA 所誘發老鼠大腦的脂質過氧化濃度，這些結果和較早期的研究說明天麻的活性成份 vanillin 和 p-hydroxybenzyl 在體外及活體內具有抗氧化和自由基清除作用一致 (Liu and Mori 1992, 1993)。

我們的結果顯示天麻 1.0 g/kg 和 0.5 g/kg 可以減少 WDS 和 FM 的次數，以及天麻 1.0 g/kg 可以延長 WDS 第一次發作的時間，這些結果說明了天麻具有抗癲癇的效用，而大黃則沒有相似的作用。我們的結果與較早期的研究已知天麻的水萃取物可以抑制 KA 和 glutamate receptor 的結合一致 (Anderson et al. 1995)。

我們的結果發現老鼠注射 KA 後在大腦皮質的 frontal cortex, amygdala 和 hippocampus 區域的脂質過氧化物濃度增加，這些結果與先前的研究的結論認為 KA 導致神經元的損傷是經由自由基的形成一致 (Bruce and Baudry 1995; Kim et al. 1997)。天麻能降低這些 KA 所誘發的脂質过氧化物的濃度，天麻的這些結果和體外的一致。

我們的結果顯示口服天麻 1.0 g/kg 可以降低 KA 所誘發末梢血液的 luminol-CL 和 lucigenin-CL 的數目，如此說明了天麻具有清除自由基的作用，這些和先前的研究一致 (Liu and Mori 1992, 1993)。另外大黃可以減

少 Kainic acid 所誘發的 Luminol-CL 數目，這些可能與大黃含有少量的 catechin 有關。

## 伍、結論與建議

我們的結論是鉤藤和天麻都有抗癲癇的作用，而且兩者互相配合有協同的作用。它們的抗癲癇作用至少部份來自於對脂質過氧化作用的抑制和對氧化自由基的清除作用。另外大黃和傳統中醫藥的典籍所記錄的一致，不具有抗癲癇的作用。今後應進一步探討鉤藤和天麻抗氧化及自由基清除作用的時間經過，及對頑固性癲癇患者做臨床療效評估。

## 陸、參考文獻

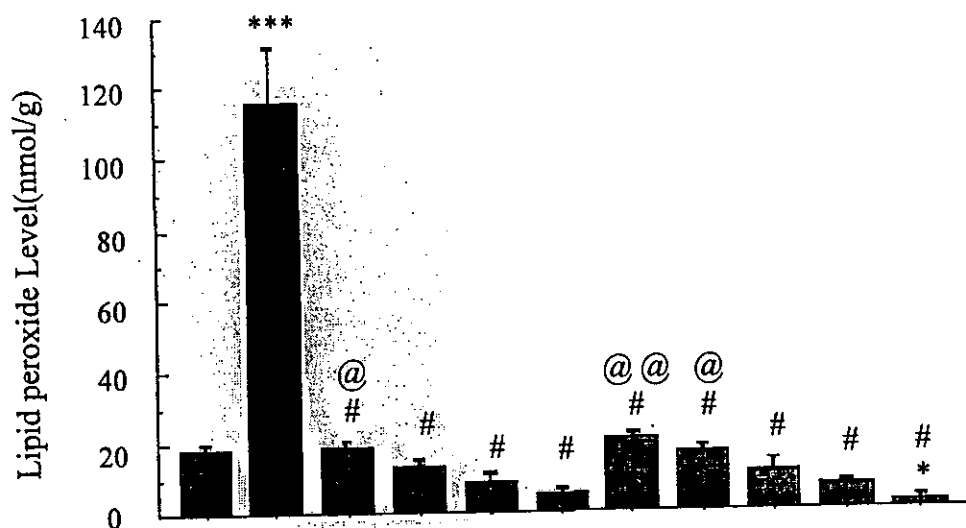
1. Anderson, M., O. Bergendorff, M. Nielsen, O. Sterner, R. Witt, J. Al., A. Lu and A. M. Wang. *Phytochem.* 38(4): 835-836, 1995.
2. Ben-Ari, Y. Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid: mechanisms and relevance to human temporal lobe epilepsy. *Neuroscience.* 14(2): 375-403, 1985.
3. Bruce, A. J. and M. Baudry. Oxygen free radicals in rat limbic structure after kainate-induced seizures. *Free Rad. Biol. Med.* 18(6): 993-1002, 1995.
4. Chen, M. F., L. R. Mo, R. C. Lin, J. Y. Kuo, K. K. Chang, C. Liao and F. J. Lu. Increase of resting levels of superoxide anion in the whole blood of patients with decompensated liver cirrhosis. *Free rad. Biol. & Med.* 23(4): 672-679, 1997.
5. Halliwell, B. and J. M. C. Gutteridge. Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage, and antioxidant therapy. *Lancet.* 23: 1396-1397, 1984.
6. Hsieh, C. L., M. F. Chen, T. C. Li, S. C. Li, N.Y. Tang and C. T. Hsieh. Anticonvulsant effect of *uncaria rhynchophylla* (Miq) Jack in rats with kainic acid-induced epileptic seizure. *Amer. J. Chin. Med.* XXVII(2): 257-264, 1999.
7. Kaefer, V., J. T. Robitzsch, W. Stangel, L. Schleinkofer and K. Resch. Simultaneous detection of whole blood chemiluminescence in microtitre plates. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 30: 209-216, 1992.
8. Kim, H. C., D. Y. Choi, W. K. Jhoo, D. W. Lee, C. H. Koo and C. Kim. Aspalatone, a new antiplatelet agent, attenuates the neurotoxicity induced by kainic acid in the rat. *Life Sci.* 61(24): 373-381, 1997.
9. Lin, J. M., C. C. Lin, M. F. Chen, T. UJie and A. Takada. Studies on Taiwan folk medicine, Thank-Kau-tin (II): measurement of active oxygen scavenging activity using an ESR technique. *Amer. J. Chin.* 23(1): 43-51, 1995.
10. Liu, J. and A. Mori. Antioxidant and free radical scavenging activities of *Gastrodia Elata* Bl. and *Uncaria Rhynchophylla* (Miq) Jack.



- Neuropharmacology. 31(12): 1287-1298, 1992.
11. Liu, J. and A. Mori. Antioxidant and pro-oxidant activities of p-hydroxybenzyl alcohol and vanillin: effects on free radicals, brain peroxidation and degradation of benzoate, deoxyribose, amino acids and DNA. *Neuropharmacology*. 32 (7): 659-669, 1993.
  12. Lu, F. J., J. T. Lin, H. P. Wang and W. C. Huang. A simple, sensitive, non-stimulated photon counting system for detection of superoxide anion in whole blood. *Experientia*. 52: 141-144. 1996.
  13. Melchiorri, D., R. J. Reiter, E. Sewerynek, L. D. Chen, and G. Nistico. Melatonin reduces kainate-induced lipid peroxidation in homogenates of different brain regions. *FASEB*. 9: 1205-1210, 1995.
  14. Moslen, M. T. Reactive oxygen species in normal physiology, cell injury and phagocytosis. *Free radicals in diagnostic medicine*. New York: D. Armstrong, Plenum press, 1994, PP: 17-27.
  15. Nitecka, L., E. Tremblay, G. Charton, J. P. Bouillot, M. L. Berger and Y. Ben-Ari. Maturation of kainic acid seizure-brain damage syndrome in the rat. II. Histopathological sequelae, *Neurosci*. 13(4): 1073-1094, 1984.
  16. Reiter, R., L. Tang, J. J. Garcia and A. Muñoz-Hoyos. Pharmacological actions of melatonin in oxygen radical pathophysiology. *Life Science*. 60(25) 2255-2271, 1997.
  17. Schwob, J. E., T. Fuller, J. L. Price and J. W. Olney. Widespread patterns of neuronal damage following systemic or intracerebral injections of kainic acid: A histological study. *Neurosci*. 5: 991-1014, 1980.
  18. Sun, J. S., Y. S. Hang, I. H. Huang and F. J. Lu. A simple chemiluminescence assay for detecting oxidative stress in ischemic limb injury. *Free Rad. Biol. & Med*. 20(1): 107-112, 1996.
  19. Sun, J. S., Y. H. Tsuang, I. J. Chen, W. C. Huang, Y. S. Hang and F. J. Lu. An ultra-weak chemiluminescence study on oxidative stress in rabbit following acute thermal injury. *Burns*. 2: 225-231, 1998.
  20. Tanaka, S., S. Kondo, T. Tanaka and Y. Yonemasu. Long term observation

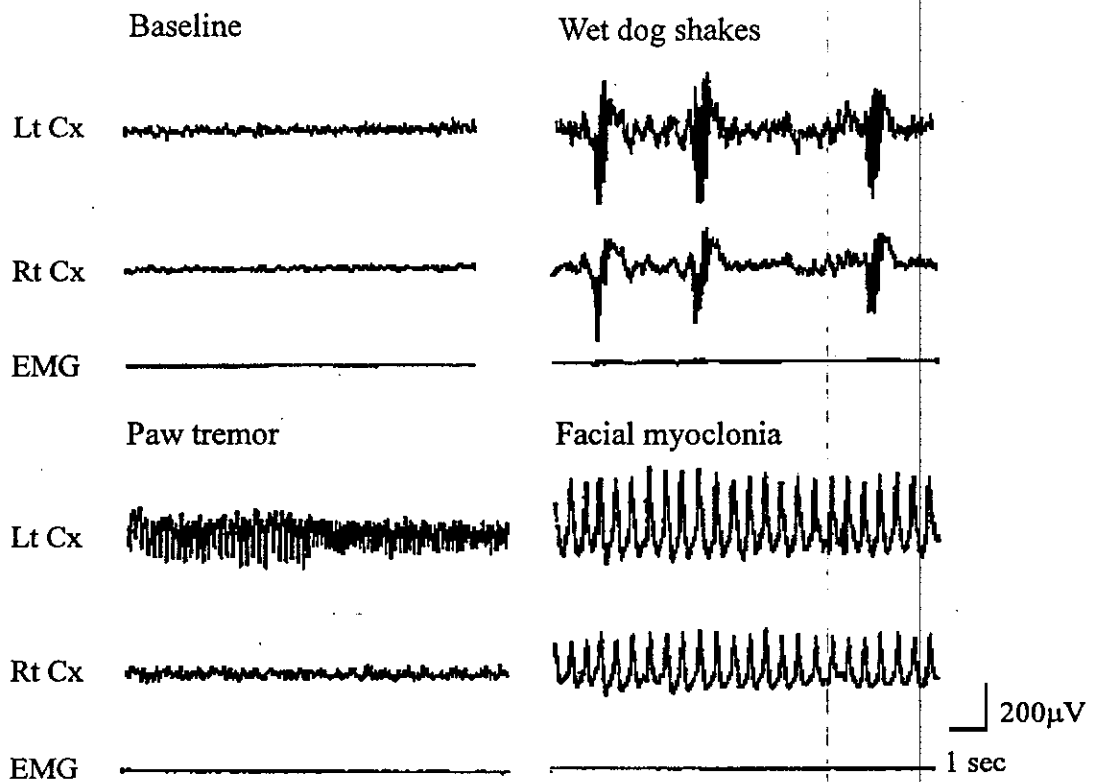
- of rats after unilateral intra-amygdaloid injection of kainic acid. *Brain Res.* 463: 163-167, 1988.
21. Tanaka, S., K. Sako, T. Tanaka, I. Nishihara and Y. Yonemasu. Uncoupling of local blood flow and metabolism in the hippocampal CA3 in kainic acid-induced limbic seizure status. *Neuroscience.* 36(2): 339-348, 1990.
  22. Takahashi, R. K. Edashige, E. F. Sato, M. Inoue, T. Matsuno and K. Utsumi. Luminol chemiluminescence and active oxygen generation by activated neutrophils. *Arch. Biochem. & Biophysics.* 285(2): 325-330, 1991.
  23. Tremblay, E., L. Nitecka, L. Berger and Y. Ben-Ari. Maturation of kainic acid seizure-brain damage syndrome in the rat. I. Clinical, electrographic and metabolic observations. *Neurosci.* 13(4): 1051-1072, 1984.
  24. Wuerthele, S. M., Lovell, K. L., M. Z. Jones and K. E. Moore. A histological study of kainic acid-induced lesions in the rat brain. *Brain Res.* 149: 489-497, 1978.

柒、附錄



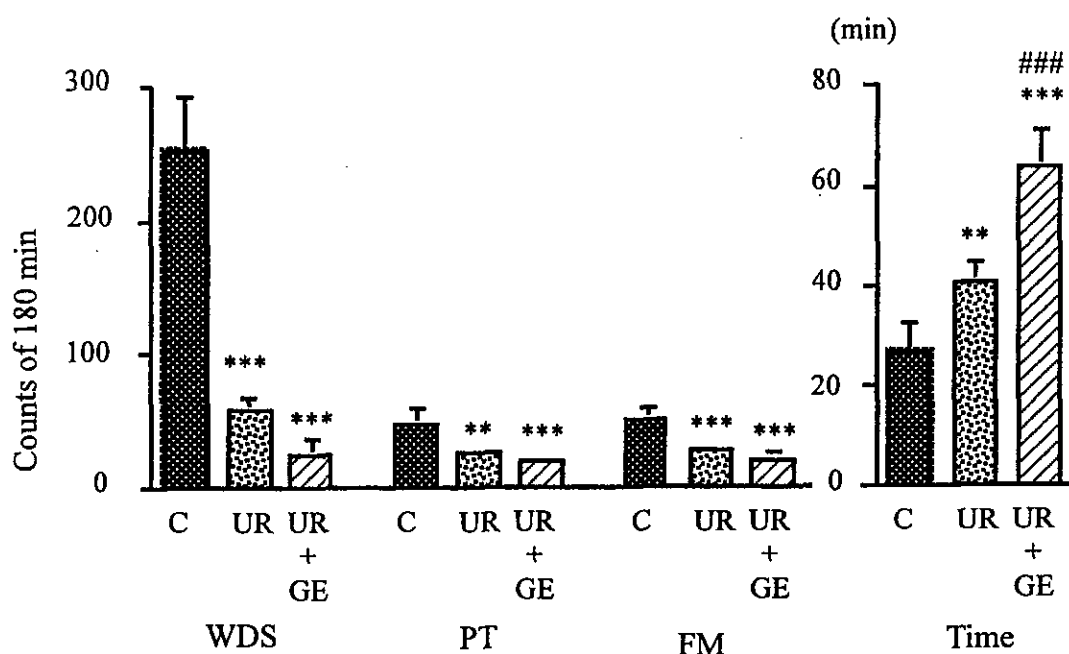
UR (mg/ml)	-	-	0.01	0.1	1	10	0.01	0.1	1	10	-
GE (mg/ml)	-	-	-	-	-	-	0.01	0.1	1	10	-
KA	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Vit E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

圖一 Effects of *Uncaria rhynchophylla* (UR) and UR plus *Gastrodia elata* (GE) on kainic acid (KA)-induced lipid peroxidation in the rat brain in vitro. (鉤藤和鉤藤加天麻在體外對 kainic acid 誘發老鼠腦脂質過氧化作用的效應)  
 Supernatants of the homogenized cerebral cortex were incubated for 2 hr with (+) or without (-) drugs. The concentration of UR and GE are listed under the figure. KA: 120 µg/ml; vitamin E: 10mM. Lipid peroxidation was determined by measuring the formation of MDA. Data are expressed as mean ± SD. \* P < 0.05, \*\*\* P < 0.001 compared with the values of no drug treatment; # P < 0.001 compared with the values of KA only; @ P < 0.05, @@ P < 0.01 compared with the values of KA plus vitamin E.



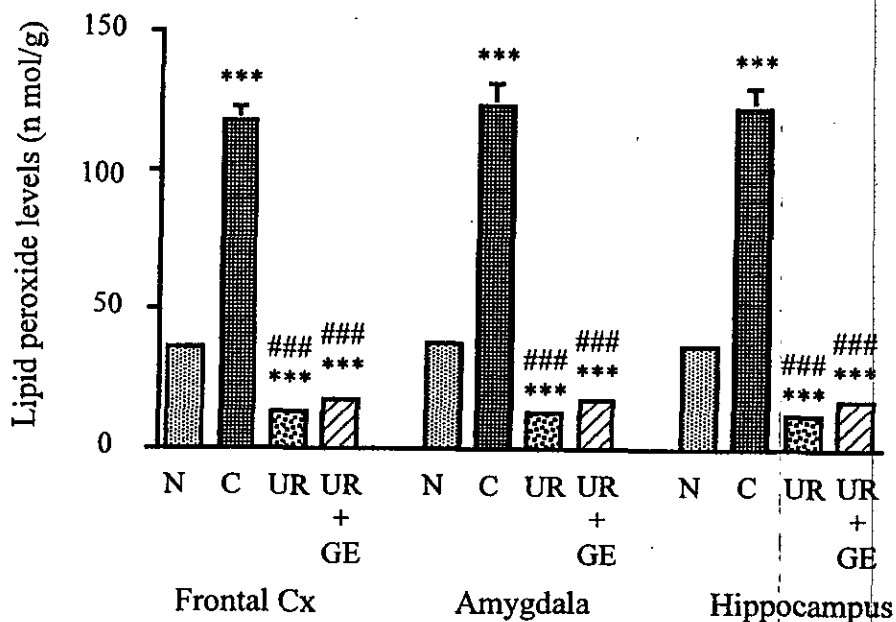
圖二. KA-induced electroencephalograph (EEG) changes. (kainic acid (KA) 誘發腦波的變化)

Baseline EEG activity in the sensorimotor cortex was characterized by 6-8 Hz activity in rats while awake (left upper). KA-induced limbic lobe seizure, including wet dog shakes with intermittent polyspike-like activity (right upper), paw tremor with continuous spike activity (left lower) and facial myoclonia with continuous sharp wave (right lower). Each type of seizure had a characteristic EEG activity. Lt Cx= EEG recording of the left sensorimotor cortex; Rt Cx= EEG recording of the right sensorimotor cortex; EMG= EMG recording of the neck muscle.



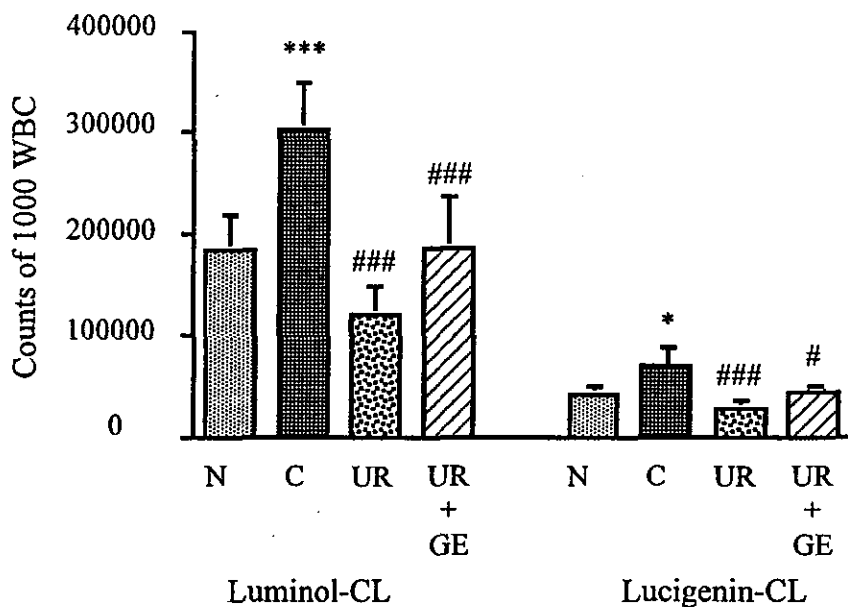
圖三. Anticonvulsant effect of UR alone and in combination with GE on KA-induced seizures. (鈎藤和鈎藤加天麻對KA誘發癲癇發作的抗癲癇效應)

Oral administration of both UR 1.0 g/kg alone and UR 1.0 g/kg+GE 1.0 g/kg reduced the counts of WDS, paw tremor, and facial myoclonia 30 min prior to administration of KA (12 mg/kg), but these anticonvulsant effects showed no difference between the UR alone group and UR+GE group. The time of onset of WDS after KA administration was greatest in the UR+GE group, followed by the UR alone and the normal control (N) groups. Data are expressed as mean \* SD. WDS= wet dog shakes; PT= paw tremor, FM= facial myoclonia; Time= onset time of wet dog shakes. \* P < 0.05, \*\* P < 0.01, \*\*\* P < 0.001 compared with the values of C; ### P < 0.001 compared with the values of UR.



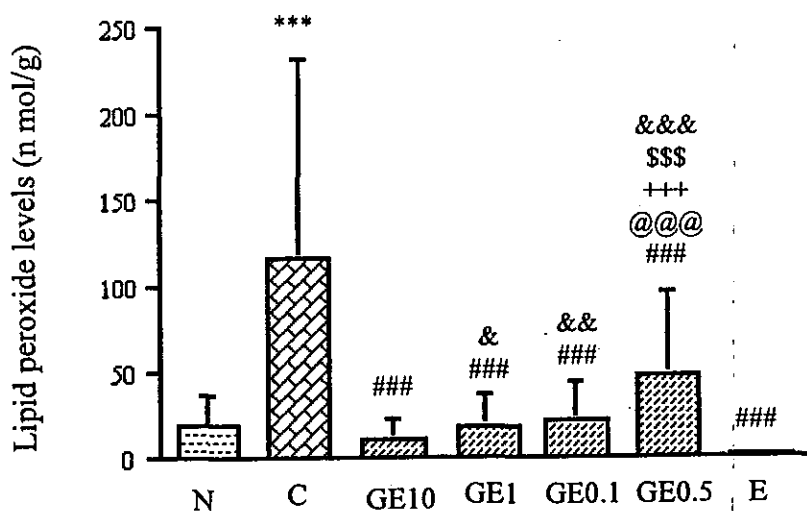
圖四. Effects of UR alone and in combination with GE on KA-induced lipid peroxidation in vivo. (在體外鉤藤和鉤藤加天麻對KA誘發脂質過氧化作用的效應)

The lipid peroxide levels in the frontal cortex, amygdala, and hippocampus regions of rat brain increased after KA (12 mg/kg) administration in vivo. These increases were inhibited by oral administration of UR 1.0 g/kg alone and UR 1.0 g/kg + GE 1.0 g/kg. The lipid peroxide levels did not differ significantly between the UR and UR+GE groups. Frontal cortex= frontal cortex region of rat brain; Amygdala= amygdala region of rat brain; Hippocampus= hippocampus region of rat brain. \*\*\* P < 0.001 compared with the values of N; ### P < 0.001 compared with the values of C.



圖五. Effects of UR alone and in combination with GE on free radical scavenging activities in KA-treated rats. (鈎藤和鈎藤加天麻在老鼠對KA 誘發自由基的清除作用)

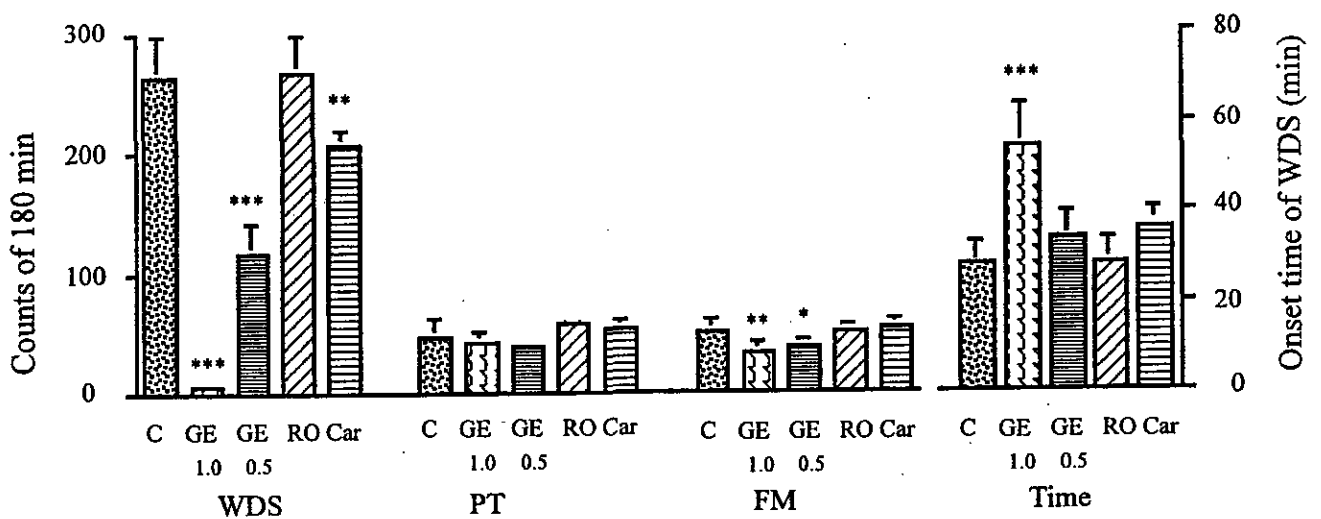
Luminol-CL counts in the whole blood increased after KA (12 mg/kg) administration. This increase was inhibited by oral administration of both UR 1.0 g/kg alone and UR 1.0 g/kg + GE 1.0 g/kg. The luminol-CL counts did not differ significantly between the UR alone and UR+GE groups. Lucigenin-CL counts in the whole blood also increased after KA administration, and this increase was inhibited by oral administration of both UR 1.0 g/kg alone and UR 1.0 g/kg + GE 1.0 g/kg. The lucigenin-CL counts did not differ significantly between the UR alone and UR+GE groups. Luminol-CL= luminol chemiluminescence; Lucigenin-CL= lucigenin chemiluminescence. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  compared with the values of N; #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ , ###  $P < 0.001$  compared with the values of C.



圖六 Effects of *Gastrodia elata* Bl. (GE) on kainic acid (KA)-induced lipid peroxidation in rat brain in vitro. (在體外天麻對KA誘發老鼠脂質過氧化作用的效應)

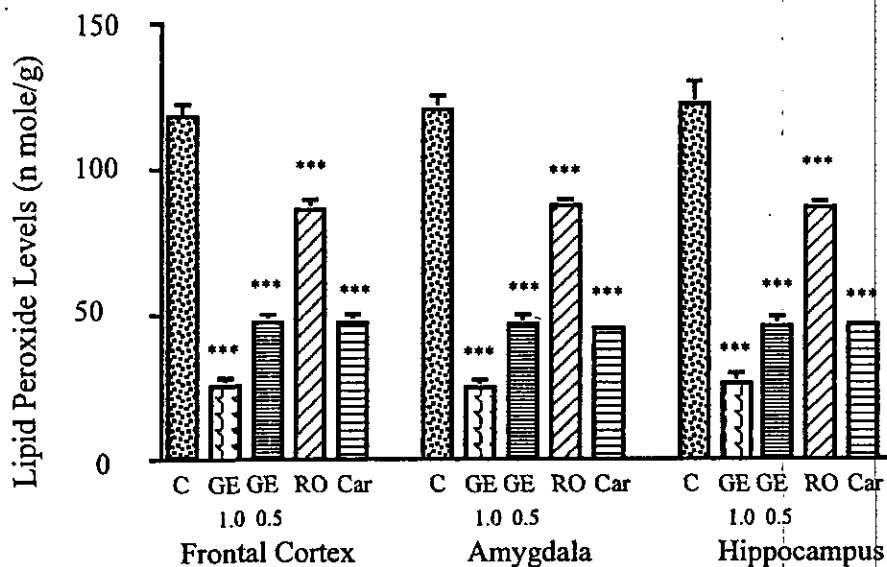
Supernatants of homogenized tissue samples were incubated for 2 hr without drugs (N, normal control), KA 120  $\mu\text{g/ml}$  alone (C, KA control), KA and GE 10  $\text{mg/ml}$  (GE 10), KA and GE 1  $\text{mg/ml}$  (GE 1), KA and GE 100  $\mu\text{g/ml}$  (GE 0.1), KA and GE 10  $\mu\text{g/ml}$  (GE 0.01), and KA and vitamin E 10  $\text{mM}$  (E). Lipid peroxidation was determined by measuring the formation of MDA from TBAR. The level of lipid peroxides increased after KA administration in vitro. GE and vitamin E inhibited this increase. Vitamin E suppressed lipid peroxidation more strongly than GE 1  $\text{mg/ml}$ , GE 100  $\mu\text{g/ml}$ , and GE 10  $\mu\text{g/ml}$ . \*\*\*  $P < 0.001$  compared with the values of N; ###  $P < 0.001$  compared with the values of C; @@@  $P < 0.001$  compared with the values of GE 10; +++  $P < 0.001$  compared with the values of GE 1; \$\$\$  $P < 0.001$  compared with the values of GE 0.1; &  $P < 0.05$ , &&  $P < 0.01$ , &&&  $P < 0.001$  compared with the values of E.





圖七. Anticonvulsant effect of GE and *Rheum officinale Baill* (RO) on KA-induced seizures. (天麻和大黃對KA誘發癲癇發作的抗癲癇效應)

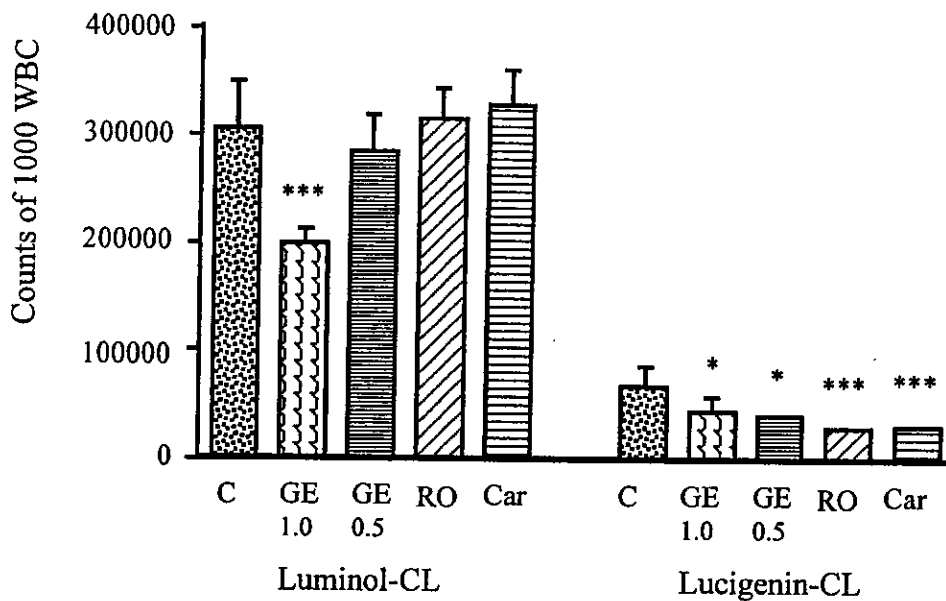
Oral administration of both GE 1.0 g/kg (GE 1.0) and 0.5 g/kg (GE 0.5) reduced the counts of WDS and facial myoclonia 30 min prior to administration of KA (12 mg/kg), but RO showed no anticonvulsant effect. The time of onset of WDS after KA administration showed significantly delay in the GE 1.0 g/kg group. WDS= wet dog shakes; PT= paw tremor, FM= facial myoclonia; Time= onset time of wet dog shakes. \* P < 0.05, \*\* P < 0.01, \*\*\* P < 0.001 compared with the values of C.



圖八 Effects of GE and RO on KA-induced lipid peroxidation in vivo.

(在活體內天麻和大黃對KA誘發脂質過氧化作用的效應)

The lipid peroxide levels in the frontal cortex, amygdala, and hippocampus regions of rat brain increased after KA (12 mg/kg) administration in vivo. These increases were inhibited by oral administration of GE 1.0 g/kg (GE 1.0), 0.5 g/kg (GE 0.5) and RO 1.0 g/kg (RO). Frontal cortex= frontal cortex region of rat brain; Amygdala= amygdala region of rat brain; Hippocampus= hippocampus region of rat brain. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  compared with the values of C.



圖九 Effects of GE and RO on free radical scavenging activities in KA-treated rats. (天麻和大黃在老鼠對 KA 誘發自由基的清除作用) Luminol-CL counts in the whole blood increased after KA (12 mg/kg) administration. This increase was inhibited by oral administration of GE 1.0 g/kg (GE 1.0). Lucigenin-CL counts in the whole blood also increased after KA administration, and this increase was inhibited by oral administration of GE 1.0 g/kg, 0.5 g/kg (GE 0.5), RO 1.0 g/kg and carbamazepine. Luminol-CL= luminol chemiluminescence; Lucigenin-CL= lucigenin chemiluminescence. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  compared with the values of C.