

天麻的抗癲癇作用與Interleukin-1 β 、Tumor Necrosis Factor- α 及一氧化氮之關係

黃昱翰 張永明^{2,3} 沈建忠¹ 謝慶良^{2,4}

長庚大學 傳統中國醫學研究所 中醫學系¹

中國醫藥大學附設醫院 中醫部²

中國醫藥大學中醫學院 中醫學系³ 中西醫結合研究所⁴

目的 我們先前的研究已知天麻能減少kainic acid (KA)誘發大鼠的癲癇發作和抑制microglia的活化，因此本研究的目的是探討天麻的抗癲癇作用與interleukin-1 β (IL-1 β)、tumor necrosis factor- α (TNF- α)，及一氧化氮(nitric oxide ; NO) 的關係。

方法 使用KA 12 mg 於Sprague-Dawley (SD)大鼠腹腔注射誘發癲癇發作，觀察天麻 1.0 g/kg、0.5 g/kg，以及 valproic acid (VA) 250 mg/kg 前治療四天對濕狗甩頭 (wet dog shakes)，血液中IL-1 β 、TNF- α 和NO的濃度，以及前額葉與海馬區IL-1 β 、TNF- α 濃度的影響。

結果 天麻 1.0 g/kg 和VA 250 mg/kg 能減少KA 誘發濕狗甩頭次數和周邊血液IL-1 β 和一氧化氮的濃度，以及鼠腦前額葉IL-1 β 、TNF- α 和海馬區TNF- α 的濃度。

結論 天麻的抗癲癇作用與抑制細胞因子IL-1 β 、TNF- α ，以及一氧化氮的產生有關。(中台灣醫誌 2005;10 Supplement: S1-8)

關鍵詞

天麻，interleukin-1 β ，kainic acid，一氧化氮，tumor necrosis factor- α ，濕狗甩頭

前言

大腦皮質的神經細胞反覆性、陣發性、過度同期性的放電，引起行為和身體功能改變的現象，稱為癲癇[1]。有研究指出，神經細胞過度同期性放電的傳出與放電和周圍神經細胞的抑制有密切關係[2]。根據統計，美國約有200萬的癲癇患者[1]，導致癲癇發作的因素很多，如中樞神經系統感染、頭部外傷、毒性物質、代謝問題、缺氧、腦血管中風以及腦瘤等[3]。中醫典籍從黃帝內經開始就有癲癇的記載，中醫認為癲癇發作是由於肝系之陰陽間的不平衡，導致肝風內動的結果，所以用平肝息風的方藥來治療，如天麻鉤藤飲、天麻、鉤藤等[4]。中醫典籍記載天麻能治療

小兒驚癇，現代研究證實天麻有鎮靜和抗驚厥的作用[5]。我們先前的研究發現天麻粗萃取物在大白鼠對於kainic acid (KA)所誘發的癲癇發作有抑制作用，天麻的抗癲癇作用和它對自由基生成的抑制或清除有密切關係[6]。天麻中的成分香草醇(vanillyl alcohol)對氯化鐵所誘發的癲癇發作，也有抗癲癇和清除氧自由基的作用[7]。另外，我們發現天麻能減少KA所誘發大白鼠microglia的活化和apoptosis現象。

KA是興奮性神經傳導物質羧胺酸鹽(glutamate)的類似物質，在大鼠的腦內或腹腔內注射KA會導致海馬區和杏仁核區神經元的損傷，而誘發邊緣性癲癇發作，這種癲癇發作與人類的精神運動性癲癇(psychomotor seizure)非常類似[8,9]。我們先前的研究已知在大鼠的腹腔注射KA會誘發濕狗甩頭(wet dog shakes)，paw tremor和facial myoclonia行為的發生，而每一種行為都有他們的特徵性腦波[6]。有研究認為腦內注射

聯絡作者：謝慶良

地址：404 台中市北區育德路2號

中國醫藥大學附設醫院 中醫部

收文日期：2004年6月24日 修改日期：2004年8月9日

接受日期：2004年8月16日

KA 所引起的病理及分子變化與腦缺血所造成的相類似 [10,11]，同時也會導致過氧化脂質濃度的升高，因此認為 KA 所誘發的初期腦部病理變化與氧自由基的侵襲有密切關係 [12,13]。一些研究發現大鼠用 KA 治療，在杏仁核/顳葉皮質區一氧化氮(nitric oxide ; NO) 產生增加，而這些一氧化氮的作用究竟扮演一個 proconvulsant 或是 anticonvulsant 的角色一直被討論 [14,15]。另外，一氧化氮仲介 glutamate 的神經毒性 [16]，以及扮演一個調節癲癇發作誘導和傳播的重要角色 [17]。有研究發現細胞因子 interleukin-1 β (IL-1 β) 能促進 glutamatergic neurotransmission，而延長 KA 誘發海馬區電氣生理性的癲癇發作 [18]。在患有熱性痙攣的兒童，當發燒時會增加 pro-inflammatory 如 IL-1 的反應，而這些 pro-inflammatory 細胞因子對於這些兒童將來發展癲癇扮演一個重要的角色 [19]。一些研究說明細胞因子 tumor necrosis factor- α (TNF- α) 會延長 kindling 動物模型的癲癇放電 [20]。另外，在大鼠用 KA 治療，TNF- α 的釋放和海馬區神經細胞損傷的程度有關，而這些細胞因子的產生來自於具有吞噬作用的 microglia [21]。

本研究的目的是在探討天麻的抗癲癇作用與細胞因子 IL-1 β 和 TNF- α ，以及一氧化氮的關係。首先觀察 KA 治療 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 IL-1 β 和 TNF- α ，以及一氧化氮的時間關係，然後觀察天麻對於 KA 誘發癲癇發作 SD 大白鼠周邊血液 IL-1 β 、TNF- α 和一氧化氮，以及鼠腦前額葉皮質和海馬區 IL-1 β 和 TNF- α 的效用。我們使用 KA 12 mg/kg 於 SD 大鼠的腹腔注射，觀察 SD 大鼠的行為，並施行腦波、肌電圖記錄，以及測定周邊血液和鼠腦前額葉和海馬區的 IL-1 β 及 TNF- α ，或一氧化氮。另外，有研究指出 valproic acid (VA) 如同 diazepam 能調節 GABA 抑制 KA 誘發的癲癇發作，所以本研究用 VA 來做為陽性對照 [22,23]。

材料與方法

天麻的製作和劑量

天麻的製作是委託科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 (HPLC) 鑑定。天麻的劑量是參考中藥藥理研究方法學 [24]，實驗動物和人類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 = $9/70 \times 0.71/0.11 = 0.83$ g/kg，所以本實驗劑量是每公斤大鼠 1.0 及 0.5 g。

實驗動物

本研究所採用動物皆購自財團法人國家科學研究院國家實驗動物，飼養於中國醫藥大學動物中心，採十二小時明暗控制及中央空調。動物選用 SD 雄性大白鼠，體重約 200 至 300 g。充分供應動物飲水和食物，並保持環境安靜舒適，整個實驗過程合乎實驗動物倫理原則。

實驗流程

電極的裝置

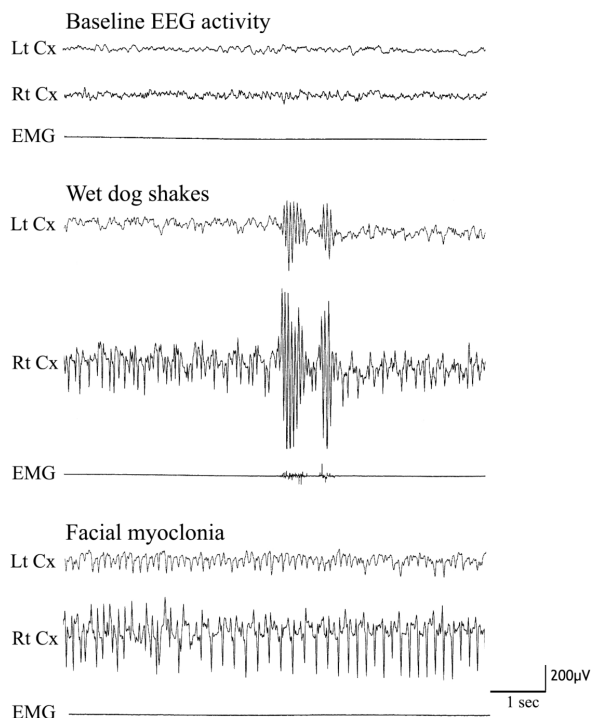
將雄性 SD 大白鼠，使用水合三氯乙醛 (chloral hydrate) (Merck Co., Germany) 400 mg/kg 腹腔注射 (i.p.) 將動物麻醉後，大白鼠的頭被固定在動物立體定位儀上，剃除頭部毛髮後，由頭部正中線皮膚切開並剝離至露出頭骨，使用不鏽鋼之螺絲釘電極穿過頭骨固定於硬腦膜上，置於兩感覺運動皮質上做為記錄電極，另一螺絲釘放置於前額竇上做為參考電極。另外，將兩個電極線分開綁在頸部肌肉處，記錄表面肌電圖。所有電極線連接到一個連結器上，並用牙粉固定於老鼠頭部。電極裝置後至少四天才進行實驗，以避免麻醉劑的影響，進行實驗時，將電極線從連結器連接到腦波、肌電圖紀錄器上，記錄腦波與肌電圖。

Pilot study

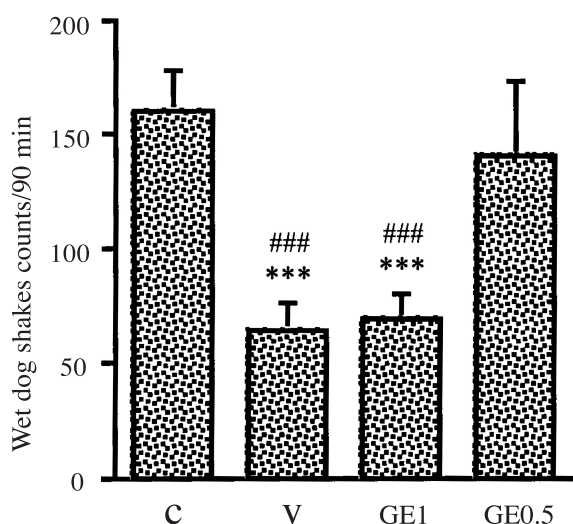
觀察 KA 誘發癲癇發作時間與細胞因子分泌時間的關係將六隻 SD 大白鼠分為三組如下：第一組接受 phosphate buffer saline (PBS) 1.0 mL/kg 腹腔注射後，觀察大鼠行為 90 分鐘，從心臟採血 3.0 mL 後取腦，測定血液和腦部組織的細胞因子 IL-1 β 和 TNF- α 濃度；第二組接受 KA (King Dom Co., Taoyuan, Taiwan) 12 mg/kg 腹腔注射後，觀察大鼠行為 90 分鐘後，從心臟採血 3.0 mL 後取腦，測定血液和腦部組織的細胞因子 IL-1 β 和 TNF- α 濃度；第三組接受 KA 12 mg/kg 腹腔注射後，觀察大鼠行為 180 分鐘後，從心臟採血 3.0 mL 後取腦，測定血液和腦部組織的細胞因子 IL-1 β 和 TNF- α 濃度。

實驗分組

將 30 隻 SD 大白鼠每六隻一組，以隨機分為五組，N 組給予腹腔注射 PBS 1.0 mL/kg，不施打任何藥物；C 組給予腹腔注射 KA (12 mg/kg)，不施打任何藥物；V 組給予口服 VA (Sigma Chem. St. Louis, MO, USA) 250 mg/kg 三天後，於第四天注射 KA 前 30 分鐘再口服一次；



圖一 Kainic acid 誘發癲癇發作大白鼠行為和腦波、肌電圖的變化。KA 注射後，腦波從基礎活動(上)慢慢出現變化，大白鼠表現wet dog shakes (中)，facial myoclonia (下)時的腦波。Lt Cx = 左側感覺運動皮質；Rt Cx = 右側感覺運動皮質；EMG = 頸部肌電圖。



圖二 天麻對於KA 誘發癲癇發作大白鼠的抗癲癇作用。*** $p < 0.001$ (與C 組相比較)；### $p < 0.05$ (與GE0.5 組相比較)。

GE1 組給予口服餵食天麻 (1 g/kg) 三天，並於第四天注射 KA 前 30 分鐘再口服一次；GE0.5 組給

予口服餵食天麻 (0.5 g/kg) 三天，並於第四天注射 KA 前 30 分鐘再口服一次。

行為觀察與腦波紀錄

將大白鼠頭部之電極裝置與腦波肌電圖紀錄器 (MP100 WSW Biopac system) 連結後，觀察動物行為及記錄腦波與肌電圖 15 分鐘，然後分別腹腔注射 PBS 1.0 mL/kg 或 KA 12 mg/kg 引發癲癇發作，行為觀察和腦波肌電圖紀錄是從腹腔注射 KA 前 15 分鐘至注射後的 90 分鐘，並每十分鐘計算其濕狗甩頭的次數。行為觀察和腦波肌電圖紀錄完成後，從心臟採取 3.0 mL 的血液後取腦。

腦組織的萃取 (preparation of brain tissue extract)

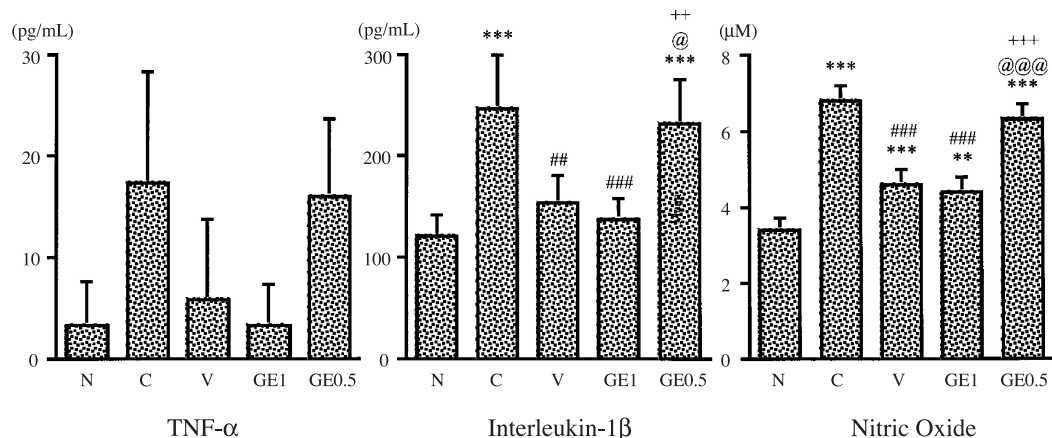
將腦組織分離出 frontal cortex (左、右前額葉，編號 F) 和 hippocampus (左、右海馬迴，編號 H)。將 1.5 mL 緩衝液加入玻璃瓶中 (紅色蓋)，並將腦部組織 (編號 F 及編號 H) 放入，以攪拌機攪拌 (每隔 5 秒一次，共計三次)，所有操作皆保持在 0°C 下進行，當不同組織攪拌時，攪拌機要用生理食鹽水洗乾淨，最後一次則用緩衝液洗。將攪拌均勻的腦部萃取物，移至 2.0 mL 小塑膠瓶中。以 13 kg，30 分鐘離心。取出上清液，放入乾淨的 1.5 mL 小塑膠瓶中，貯存在 -85°C。

血液中細胞因子 IL-1 β 、TNF- α 以及一氧化氮的測定

將從心臟取得的 3.0 mL 血液，分成 2.5 mL (A) 與 0.5 mL (B)，分別放入含有 heparin 的玻璃管中。

IL-1 β 和 TNF- α 的測定，將 A 管直接以 5000 rpm，離心 3 分鐘，取出上清液，貯存在 -85°C，測定血清中細胞因子 IL-1 β 和 TNF- α 時取出。測量腦組織或周邊血液的 IL-1 或 TNF- α 時，將 IL-1 β ELISA kit (Pierce Endogen, USA) 或 TNF- α ELISA kit (Pierce Endogen, USA) 放入不同濃度的懸浮液中做為蛋白質的標示後使用 colorimetric method (optical density)，經 ELISA reader (Dynex MRX, Virginia, USA) 來決定 IL-1 β 和 TNF- α 的量。

一氧化氮的測定，使用一個氣相化學發光一氧化氮分析儀 (gas-phase chemiluminescent nitric oxide analyzer, NOATM 280i, Sievers Inc., USA) 來定量 NO 和 ozone 兩者之間反應的最後產物。它的原理主要是利用化學冷光法，將檢品所產生的 NO₃⁻ 經由三氯化鈮 (還原劑) 還原為 NO 狀態： $2NO_3^- + 3V^{+3} + H_2O \rightarrow 2NO + 3VO^{3+} + 4H^+$ 。打入純氧 (O₂) 會經由臭氧製造器產生臭氧 (O₃)，此時 NO 會與 O₃ 結合： $NO + O_3 \rightarrow NO_2^*$ (激態) +



圖三 天麻對kainic acid 誘發癲癇發作大鼠周邊血液IL-1 β 、TNF- α 以及一氧化氮的影響。** $p < 0.001$ (與N組相比較)；[#] $p < 0.01$ ，^{###} $p < 0.001$ (與C組相比較)；[@] $p < 0.05$ ，^{@@@} $p < 0.001$ (與V組相比較)；⁺⁺ $p < 0.01$ ，⁺⁺⁺ $p < 0.001$ (與GE1組相比較)。

表 天麻對kainic acid 誘發癲癇大白鼠的濕狗甩頭次數之影響 (n = 6)

Group	WDS 次數 (平均值 ± 標準差)
C 組	159.2 ± 18.0
V 組	63.3 ± 12.3
GE1 組	68.7 ± 11.2
GE0.5 組	139.2 ± 32.9
N 組	0 ± 0

WDS：kainic acid 注射後 90 分鐘濕狗甩頭的發作次數；C 組 (控制組)：接受腹腔注射 kainic acid 12 mg/kg；V 組：口服 valproic acid 250 mg/kg 前治療四天；GE1 組：口服天麻 1.0 g/kg 前治療四天；GE0.5 組：口服天麻 0.5 g/kg 前治療四天；N 組：PBS 1.0 mL/kg 腹腔注射。

O₂，NO₂ 經由 PMT 管 (發光器) 上的濾光片產生波長，由電路板再轉變成電量單位，以電量來表示 NO₂ 的量：NO₂* → NO₂ + h ν ，機台與電腦連接，經數據處理 (積分) 後，即成為濃度單位。簡單的說，將 B 管 0.5 mL 的全血放入 1.5 mL 的管中，然後再加入 1.0 mL 的 cold ethanol (0°C)，並用震盪器均勻混合 1 分鐘後放置 30 分鐘，再經 14,000 rpm，5 分鐘的離心，所得的懸浮液用來測定一氧化氮的濃度。一氧化氮濃度的決定是根據已知硝酸鈉 (sodium nitrate) 的濃度曲線。

統計分析

我們使用 one way of variance (ANOVA) 的分析，隨後 Scheffe's 檢定各組間的差異， $p < 0.05$ 為有意義。

結果

KA 誘發 SD 大鼠行為和腦波的變化

SD 大鼠腹腔注射 KA 12 mg/kg，大約經 20 至 30 分鐘後，腦波從每秒大約 6 至 8 Hz 的背景腦波活動，開始出現棘波 (spike wave) 或連續性的銳波 (sharp wave)，同時行為出現濕狗甩頭伴隨多相性樣的腦波活動或 facial myoclonia 伴隨連續性的銳波。每一種行為都有它們的特徵性腦波 (圖一)。

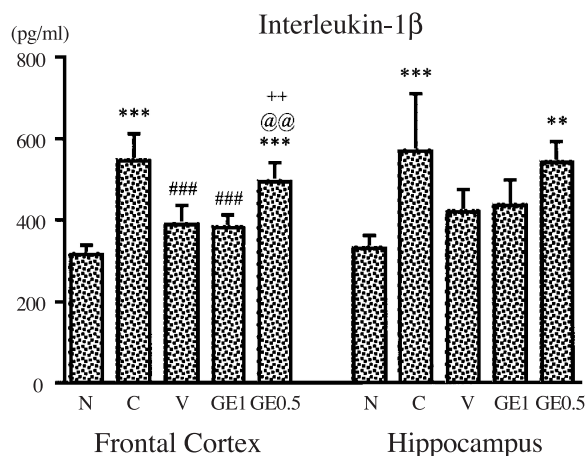
天麻對 KA 誘發癲癇發作大白鼠的抗癲癇作用

包括 pilot study 在內共有 28 隻接受 KA 12 mg/kg 腹腔注射的 SD 大白鼠都發生癲癇發作，前治療口服天麻 1.0 g/kg 和 VA 250 mg/kg 四天，兩者都能減少濕狗甩頭的發作次數 ($p < 0.001$)，但口服天麻 0.5 g/kg，則沒有相似的結果 ($p > 0.05$) (表、圖二)。

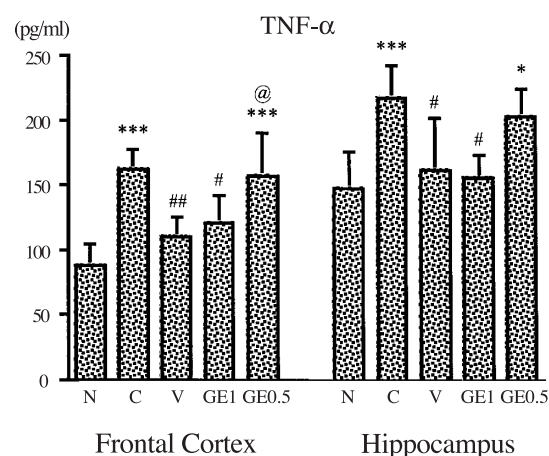
天麻對 KA 誘發癲癇發作大白鼠周邊血液 IL-1 β 、TNF- α 以及一氧化氮的影響

Pilot study 的結果顯示周邊血液和腦組織 IL-1 β 、TNF- α 和一氧化氮在 KA 注射後 90 分鐘時的濃度大於 180 分鐘時，因此本研究於 KA 注射後 90 分鐘測定 IL-1 β 、TNF- α 以及一氧化氮的濃度。

周邊血液 IL-1 β 和一氧化氮濃度於 KA 腹腔注射後的 90 分鐘上升 ($p < 0.001$)；而天麻 1.0 g/kg 及 VA 250 mg/kg 能使這些上升下降 ($p < 0.01$)；但天麻 0.5 g/kg，則沒有相似的作用 ($p > 0.05$)；天麻 1.0 g/kg 及 VA 250 mg/kg 對周邊血液的 IL-1 β 和一氧化氮的抑制作用大於 GE 0.5 g/kg



圖四 天麻對kainic acid 誘發癲癇發作大白鼠前額葉及海馬區域IL-1 β 的影響。** $p < 0.01$ ，*** $p < 0.001$ (與N組相比較)；### $p < 0.001$ (與C組相比較)；@@ $p < 0.01$ (與V組相比較)；@ $p < 0.01$ (與GE1組相比較)。



圖五 天麻對kainic acid 誘發癲癇發作大白鼠前額葉及海馬區域TNF- α 的影響。* $p < 0.05$ ，*** $p < 0.001$ (與N組相比較)；# $p < 0.05$ ，## $p < 0.01$ (與C組相比較)；@ $p < 0.05$ (與V組相比較)。

($p < 0.05$)；周邊血液的TNF- α 濃度於KA注射後的90分鐘沒有上升($p > 0.05$) (圖三)。

天麻對KA 誘發癲癇發作大白鼠前額葉及海馬區IL-1 β 和TNF- α 的影響

KA於SD大白鼠腹腔注射後90分鐘，大腦皮質的前額葉和海馬區的IL-1 β 的濃度增加($p < 0.001$)；天麻1.0 g/kg及VA 250 mg/kg前治療四天能使前額葉的增加減少($p < 0.001$)；但對海馬區的增加，則沒有作用($p > 0.05$)；天麻0.5 g/kg前治療四天，對前額葉及海馬區的IL-1 β 增加都沒有抑制的作用($p > 0.05$)；另外，天麻1.0 g/kg和VA 250 mg/kg對於KA誘發前額葉IL-1 β 的增加的抑制作用大於天麻0.5 g/kg ($p < 0.01$) (圖四)。

KA於SD大白鼠腹腔注射後90分鐘，大腦皮質的前額葉和海馬區TNF- α 的濃度增加($p < 0.001$)；天麻1.0 g/kg及VA 250 mg/kg前治療四天能使前額葉和海馬區的增加減少($p < 0.05$)；天麻0.5 g/kg前治療四天，對前額葉及海馬區TNF- α 的增加都沒有抑制的作用($p > 0.05$)；另外，VA 250 mg/kg對於KA誘發前額葉TNF- α 的增加的抑制作用大於天麻0.5 g/kg ($p < 0.05$) (圖五)。

討論

本研究的結果顯示SD大白鼠腹腔注射KA後，它們的行為表現濕狗甩頭，facial myoclonia等，而且每種行為都有它們的腦波特徵。又前治療天麻1.0 g/kg四天能減少KA所誘發的濕狗甩頭，這些結果和我們先前研究的結果一致[6]。另外，我

們發現KA能誘發一氧化氮濃度的增加，但這些增加以及wet dog shakes兩者都能被天麻1.0 g/kg或VA 250 mg/kg前治療四天所抑制，因此推測天麻的抗癲癇作用至少部分與一氧化氮有關。有研究指出一氧化氮伸介glutamate的神經毒性[16]，在癲癇發作的神經細胞損傷會造成glutamate接合器的過度刺激，導致Ca⁺⁺-dependent nitric oxide synthase (NOS)的產生而增加一氧化氮的濃度。一氧化氮和superoxide anion作用或形成peroxynitrite，扮演神經毒性的角色[25]。這個結果和我們先前研究認為天麻的抗癲癇作用至少部分來自於對反應氧種(reactive oxygen species)包括超氧陰離子(superoxide anion)、氫氧自由基(hydroxyl radicals)、過氧化氫(hydrogen peroxide)以及hypochlorous acid生成的抑制或清除的結論一致[6]。Inducible NOS (iNOS)的產生主要來自於microglia [26]。Activated microglia是一氧化氮的主要來源，而且它經由一氧化氮和自由基的產生伸介神經細胞的損傷[27]。我們先前的研究已知天麻在KA治療的大白鼠，能抑制microglia的活化。

本研究的結果顯示KA腹腔注射90分鐘後，大白鼠週邊血液和大腦皮質前額葉區域的IL-1 β 濃度增加，這個結果和一個較早期的報告說明KA可以誘發腦中不同區域包括大腦皮質、海馬區等IL-1 β mRNA的表現一致[28]。一些研究已說明KA誘發IL-1 β mRNA表現主要在glial cells包括astrocyte和microglia [27,28]。Proinflammatory

cytokine 如 IL-1 β 是 iNOS 強有力的活化劑，在 microglia 和 astrocyte 中的 iNOS 藉著 IL-1 β 的活化而增強 N-methyl-D-aspartate (NMDA) 所仲介的神經毒性，導致氧化自由基的產生。當癲癇發作時所產生過多的氧化自由在神經細胞的損傷扮演一個重要的角色 [29,30]。本研究的結果顯示天麻能抑制 KA 所誘發週邊血液和大腦皮質前額葉區域的 IL-1 β 濃度增加，因此我們推測天麻的這個作用可能來自抑制 microglia 的活化，而間接減少 IL-1 β 濃度和氧化自由基的產生。這個說明和我們先前研究的結果不謀而合 [6]。

本研究的結果顯示於 SD 大白鼠腹腔注射 KA 90 分鐘後，鼠腦前額葉和海馬區的 TNF- α 濃度增加，這個結果與一個較早期的研究報告相似 [21]。有研究指出 TNF- α 會延長杏仁核 kindling 癲癇動物模型的癲癇放電 [31]，以及 TNF- α 會增加癲癇發作的啟動、行為的加劇和電氣生理的表現 [32]。TNF- α 和 IL-1 β 兩者都屬於 pro-inflammatory cytokine [21,33]，TNF- α 對於 microglia 的作用、iNOS 和氧化自由基的產生 IL-1 β 相類似，因此我們認為天麻對於 KA 誘發 TNF- α 產生的抑制作用，與天麻抑制 microglia 的活化有關。本研究遺留一些尚待解決的問題：1) 週邊血液的 TNF- α 和 IL-1 β 來自於 mononuclear phagocytes (單核吞噬細胞)、T-lymphocytes、natural killer cells，和 polymorphonuclear leukocytes [34]，而一氧化氮來自於 neutrophils 或 macrophages [35]，為何 KA 能誘發週邊血液 IL-1 β 和 NO 濃度的增加，天麻和 VA 能抑制這個增加，但 TNF- α 則沒有相似作用；2) 為何天麻和 VA 只對前額葉區 KA 所誘發的 IL-1 β 增加有作用，但對海馬區 IL-1 β 的增加，則沒有作用。

結論是天麻的抗癲癇作用與天麻抑制細胞因子中 IL-1 β 、TNF- α ，以及一氧化氮的產生有相關。

參考文獻

- Ozuna J. Seizure disorders and epilepsy. [Review] *Lippincotts Prim Care Pract* 2000;4:608-18.
- Annegers JF. The epidemiology of epilepsy. In: Wyllie E, ed. *The Treatment of Epilepsy: Principles and Practices*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993:157-64.
- Armstrong DD, Mizrahi EM. Pathologic basis of the symptomatic epilepsies in childhood. [Review] *J Child Neurol* 1998;13:361-71.
- 孫孝洪。中醫治療學原理。台北：知音出版社，1992:319-33。
- 馬子密，傅延齡。歷代本草藥性匯解。北京：中國醫藥科技出版社，2002:645-7。
- Hsieh CL, Chiang SY, Cheng KS, et al. Anticonvulsive and free radical scavenging activities of *Gastrodia elata* Bl. in kainic acid-treated rats. *Am J Chin Med* 2001; 29:331-41.
- Hsieh CL, Chang CH, Chiang SY, et al. Anticonvulsive and free radical scavenging activities of vanillyl alcohol in ferric chloride-induced epileptic seizures in Sprague-Dawley rats. *Life Sci* 2000;67:1185-95.
- Ben-Ari Y. Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid: mechanisms and relevance to human temporal lobe epilepsy. [Review] *Neuroscience* 1985; 14:375-403.
- Schwor JE, Fuller T, Price JL, et al. Widespread patterns of neuronal damage following systemic or intracerebral injections of kainic acid: a histological study. *Neuroscience* 1980;5:991-1014.
- Liu HM, Lei DL, Yang DL. Kainate-induced brain lesion: similar local and remote histopathological and molecular changes as in ischemic brain infarct. *J Neuropathol Exp Neurol* 1996;55:787-94.
- Seitelberger F, Lassmann H, Hornykiewicz O. Some mechanisms of brain edema studied in a kainic acid model. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 1990;50:263-7.
- Liang LP, Ho YS, Patel M. Mitochondrial superoxide production in kainate-induced hippocampal damage. *Neuroscience* 2000;101:563-70.
- Sun AY, Cheng Y, Bu Q, et al. The biochemical mechanisms of the excitotoxicity of kainic acid. Free radical formation. *Mol Chem Neuropathol* 1992;17:51-63.
- Kashihara K, Sakai K, Marui K, et al. Kainic acid may enhance hippocampal NO generation of awake rats in a seizure stage-related fashion. *Neurosci Res* 1998;32: 189-94.
- Mulsch A, Busse R, Mordvintcev PI, et al. Nitric oxide promotes seizure activity in kainite-treated rats. *Neuroreport* 1994;5:2325-8.
- Dawson VL, Dawson TM, London ED, et al. Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88: 6368-71.
- Maggio R, Fumagalli F, Donati E, et al. Inhibition of nitric oxide synthase dramatically potentiates seizures induced by kainic acid and pilocarpine in rats. *Brain Res* 1995;679:184-7.
- Vezzani A, Conti M, De Luigi A, et al. Interleukin-1beta immunoreactivity and microglia are enhanced in the rat hippocampus by focal kainate application: functional evidence for enhancement of electrographic seizures. *J Neurosci* 1999;19:5054-65.
- Virta M, Hurme M, Helminen M. Increased frequency

- of interleukin-1beta (-511) allele 2 in febrile seizures. *Pediatr Neurol* 2002;26:192-5.
20. Shandra AA, Godlevsky LS, Vastyanov RS, et al. The role of TNF-alpha in amygdala kindled rats. *Neurosci Res* 2002;42:147-53.
21. de Bock F, Dornand J, Rondouin G. Release of TNF-alpha in the rat hippocampus following epileptic seizures and excitotoxic neuronal damage. *Neuroreport* 1996;7:1125-9.
22. Turski L, Niemann W, Stephens DN. Different effects of antiepileptic drugs and beta-carbolines on seizures induced by excitatory amino acids. *Neuroscience* 1990;39:799-807.
23. Steppuhn KG, Turski L. Modulation of the seizure threshold for excitatory amino acids in mice by antiepileptic drugs and chemoconvulsants. *J Pharmacol Exp Ther* 1993;265:1063-70.
24. 陳奇。中藥藥理研究方法學。北京：人民衛生出版社，1996:29-36。
25. Lipton SA, Choi YB, Pan ZH, et al. A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature* 1993;364:626-32.
26. Samdani AF, Dawson TM, Dawson VL. Nitric oxide synthase in models of focal ischemia. [Review] *Stroke* 1997;28:1283-8.
27. Chao CC, Hu S, Molitor TW, et al. Activated microglia mediate neuronal cell injury via a nitric oxide mechanism. *J Immunology* 1992;149:2736-41.
28. Yabuuchi K, Minami M, Katsumata S, et al. In situ hybridization study of interleukin-1beta mRNA induced by kainic acid in the rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 1993;20:153-61.
29. Rizzi M, Perego C, Aliprandi M, et al. Glia activation and cytokine increase in rat hippocampus by kainic acid-induced status epilepticus during postnatal development. *Neurobiol Dis* 2003;14:494-503.
30. Donnelly S, Loscher C, Mills KH, et al. Glycerol-induced seizure: involvement of IL-1beta and glutamate. *Neuroreport* 1999;10:1821-5.
31. Shandra AA, Godlevsky LS, Vastyanov RS, et al. The role of TNF-alpha in amygdala kindled rats. *Neurosci Res* 2002;42:147-53.
32. Jankowsky JL, Patterson PH. The role of cytokines and growth factors in seizures and their sequelae. [Review] *Prog Neurobiol* 2001;63:125-49.
33. Benveniste EN. Inflammatory cytokines within the central nervous system: sources, function, and mechanism of action. [Review] *Am J Physiol* 1992; 263:C1-16.
34. Barone FC, Feuerstein GZ. Inflammatory mediators and stroke: new opportunities for novel therapeutics. [Review] *J Cereb Blood Flow Metab* 1999;19:819-34.
35. Sharp FR, Lu A, Tang Y, et al. Multiple molecular penumbras after focal cerebral ischemia. [Review] *J Cereb Blood Flow Metab* 2000;20:1011-32.

Relationship Between the Anticonvulsion Effect of *Gastrodia elata* and Interleukin-1 β , Tumor Necrosis Factor- α and Nitric Oxide

Yu-Han Huang, Yung-Ming Chang^{2,3}, Jiann-Jong Shen¹, Ching-Liang Hsieh^{2,4}

Graduate institute of Traditional Chinese Medicine, ¹School of Chinese Medicine, Chang Gung University; ²Department of Chinese Medicine, China Medical University Hospital; ³School of Chinese Medicine, ⁴Graduate institute of Integration of Chinese and Western Medicine, College of Chinese Medicine, China Medical University, Taichung, Taiwan, R.O.C.

Purpose. Our previous studies have shown that *Gastrodia elata* (GE) reduces kainic acid (KA)-induced epileptic seizures and inhibits activation of microglia in rats. The present study investigated the relationship between the anticonvulsion effects of GE and interleukin-1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor- α (TNF- α), as well as nitric oxide (NO).

Methods. Rats were administered KA (12 mg/kg) to induce epileptic seizure. After oral administration of GE 1.0 g/kg, 0.5 g/kg and valproic acid (VA) 250 mg/kg for 4 days prior to KA injection the number of KA-induced wet dog shakes was calculated, and the changes in IL-1 β , TNF- α and NO levels in the peripheral blood, and IL-1 β and TNF- α levels in the frontal cortex and hippocampus regions of the rat brain were measured.

Results. Both pretreatment of GE 1.0 g/kg and VA 250 mg/kg reduced the number of wet dog shakes. GE also reduced the levels of IL-1 β and NO in the peripheral blood, and the levels of IL-1 β and TNF- α in the frontal cortex, and TNF- α in the hippocampus.

Conclusions. GE inhibits the generation of cytokine IL-1 β , TNF- α , and NO in rats with KA-induced seizures. (*Mid Taiwan J Med* 2005;10 Supplement:S1-8)

Key words

Gastrodia elata, interleukin-1 β , kainic acid, nitric oxide, tumor necrosis factor- α , wet dog shakes

Received : 24 June 2004.

Revised : 9 August 2004.

Accepted : 16 August 2004.

Address reprint requests to : Ching-Liang Hsieh, Department of Chinese Medicine, China Medical University Hospital, 2 Yuh-Der Road, Taichung 404, Taiwan, R.O.C.