

# 行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

天麻和它的成份 vanillyl alcohol 對 kainic acid 誘發癲  
發作老鼠抗癲癇機轉之研究

The study in anticonvulsive mechanisms of gastrodia  
elata B1 and its component of vanillyl alcohol on kainic  
acid-induced epileptic seizure in rats

計畫類別： 個別型計畫          整合型計畫  
計畫編號：NSC89 - 2320 - B - 182 - 097 -  
執行期間：89 年 8 月 1 日至 90 年 7 月 31 日

計畫主持人：謝慶良  
共同主持人：江素瑛、唐娜櫻

本成果報告包括以下應繳交之附件：  
赴國外出差或研習心得報告一份  
赴大陸地區出差或研習心得報告一份  
出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份  
國際合作研究計畫國外研究報告書一份

執行單位：長庚大學中醫學系

中 華 民 國 90 年 9 月 10 日

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

## 天麻和它的成份 vanillyl alcohol 對 kainic acid 誘發癲癇發作老鼠 抗癲癇機轉之研究

### The study in anticonvulsive mechanisms of gastrodia elata B1 and its component of vanillyl alcohol on kainic acid-induced epileptic seizure in rats

計畫編號：NSC 89-2320-B-182-097

執行期限：89年8月1日至90年7月31日

主持人：謝慶良 長庚大學中醫學系

共同主持人：江素瑛 中國醫藥學院中國醫學研究所  
唐娜櫻 中國醫藥學院中醫學系

計畫參與人員：王靜佩、浦曉韻 長庚大學中醫學系

E-mail：謝慶良 clhsieh4321@yahoo.com.tw

#### 一、中文摘要

過去的一些研究顯示神經膠質細胞的炎症活化與脂質過氧化作用現象，及 apoptosis 現象皆參與了 kainic acid (KA) 所引發的神經損傷。根據過去本研究室的實驗結果得知，天麻與它的成份 vanillyl alcohol (VA) 兩者都具有抗癲癇的作用，而此作用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，為了更進一步了解天麻與 VA 是否亦具有抑制神經膠質細胞炎症的活化與 nitric oxide 的產生、以及緩和 apoptosis 的作用，因此本研究以 KA 誘發大鼠產生癲癇作用，探討天麻與 VA 和上述現象之間的關係。方法是將 42 隻體重 200-300 克的雄性 Sprague-Dawley 大鼠分成 7 組 (A、B、C、D、E、F、G 組)，動物經麻醉後固定於立體定位儀上，將其頭部皮膚由正中切開以露出頭骨並於適當位置鑽 1 mm 直徑的小孔洞 (coordinates: 中線右側 1.5 mm, bregma 後方 2.3 mm)，將微量注射針置於孔洞正上方，並由腦皮質垂直而下插入 4 mm，靜置 10 分鐘後分別緩緩注射 2 ul PBS 或 2 ul KA (2 ug)，其中 A 組僅注射 PBS，B 組僅注射 KA，C 組與 D 組分別口服天麻 0.5 g/kg 與 1 g/kg 後 30 分鐘注射 KA，而 E 組與 F 組分別於腹腔注射 VA

100mg/kg 或 200 mg/kg 後 30 分鐘注射 KA，G 組於腹腔注射 PBS 後 30 分鐘注射 KA。依據前置實驗結果，於注射後 24 小時，以 0.9 % NaCl 及 4 % paraformaldehyde 由心臟灌流，取出大腦浸泡固定於 4 % paraformaldehyde 中 3 天，然後再浸泡於 30 % sucrose/PBS 中 4 天 (4 )，並作成 20 um 厚的冷凍切片。將玻片分別施行免疫化學染色、in situ apoptotic analysis，評估天麻與 VA 的效果。結果顯示天麻 1 g/kg，0.5 g/kg，及 VA 200 mg/kg 能減少 KA 所誘發 hippocampus 區域 apoptotic cells 的增加，而天麻和 VA 兩者對 KA 所誘發 hippocampus 區域 inducible nitric oxide synthase (iNOS) 的增加則沒有作用。另外，天麻 1 g/kg 能減少 microglial cells 的增加，而對 astrocytes 則沒有作用，相反的 VA 200 mg/kg 能減少 astrocytes 但對 microglial cells 則沒有作用。

本研究的結果發現 KA 腦內注射可以誘發 hippocampus 區域 microglial cell、astrocyte、iNOS 和 apoptosis 的增加，而天麻能減少 KA 所誘發的 microglial cell 和 apoptosis 現象，但對 iNOS 及 astrocyte 則沒有作用。VA 能減少 astrocyte 和 apoptosis 現象，但對 microglial cell 及 iNOS 則沒有作用。Microglial cell、astrocyte、iNOS 和

apoptosis 四者之間的關係如何，又它們和天麻及 VA 的抗癲癇作用之間的關係如何須做進一步的探討。

關鍵詞：癲癇，天麻，kainic acid，vanillyl alcohol

Abstract

Accumulating studies noted that glia cell activation, lipid peroxidation, and apoptosis also contribute to the pathogenesis of kainic acid (KA) neurotoxicosis. According to our previous studies, both *Gastrodia elata* Bl. (GE) and its component of vanillyl alcohol (VA) have anticonvulsive effect, and the action is at least in part due to suppression of lipid peroxidation and free radical scavenging activities. In order to clarify whether these two drugs have the potential to reduce apoptosis and activation of glia cell and nitric oxide synthase induced by KA, 42 male Sprague-Dawley rats (200-300 g) are divided into 7 groups (A, B, C, D, E, F, G, n=6) in the presented study. The rats are anesthetized and placed in a stereotaxic apparatus. An incision is made in the skin to expose the skull and a 1 mm burr hole is made (coordinates: 1.5 mm lateral to the midline and 2.3 mm posterior to bregma). A Hamilton syringe (5 ul) with a 22-gauge needle is positioned above the burr hole and inserted 4 mm into the cortex. The needle is left in the position for 10 min, and then slowly withdrawn. Fluid (2 ul) containing either KA (2 ug) or PBS is slowly injected into the brains. The treatment of each group are as followed: 1) Group A: PBS injection only; 2) Group B: KA injection only; 3) Group C: oral administration of GE (0.5 g/kg) 30 min prior to KA injection; 4) Group D: oral administration of GE (1.0 g/kg) 30min prior to KA injection; 5) Group E: intraperitoneal administration of VA (100 mg/kg) 30 min prior to KA injection; 6) Group F: intraperitoneal administration of VA (200 mg/kg) 30 min prior to KA injection; 7) Group G: intraperitoneal administration of PBS 30 min prior to KA injection;. After injection, the skin is sutured. According to the result of preliminary

experiment, animals are anesthetized at 24 h, followed by perfusion and tissue preparation. Brain blocks containing the lesion center are embedded in OCT and sectioned at 20 um. Slides are dried on a 37 hot plate and stored at -70 . Immunohistochemistry and in situ apoptotic analysis are then performed to evaluate the effect of GE and VA. The results indicated that GE 1 g/kg, 0.5 g/kg and VA 200 mg/kg can decrease the increase of KA-induced apoptotic cells in hippocampal region of rat brain, but both GE and VA can not decrease the increase of inducible nitric oxide synthase (iNOS). In addition, GE 1 g/kg can decrease the increase of KA-induced microglial cells, but no similar effect was noted in astrocytes, whereas VA 200 mg/kg can decrease the increase of astrocytes, but not effect in microglial cells.

In conclusion, intracerebral injection of KA can induced the increase of microglial cells, astrocytes, iNOS and apoptotic cells in the hippocampal region of rat brain. GE can decrease the increase of microglial cells and apoptotic cells, but no similar effect was found on astrocytes and iNOS. VA can decrease the increase of astrocytes and apoptotic cells, but not effect on microglial cells and INOS, therefore, the relationship among microglial cells, astrocytes, iNOS and apoptotic cells needs further study, and the difference between GE and VA in antiepileptic effect will be discuss.

Keywords: Epilepsy, *Gastrodia elata* Bl. , Vanillyl alcohol , Kainic acid

## 二、緣由與目的

先前我們的研究發現天麻和它的成份 vanillyl alcohol ( VA ) 在老鼠可以減少 Kainic acid ( KA ) 所誘發的癲癇發作，而它的這些作用部份源自於天麻對自由基的清除和抑制有關( Hsieh et al. in press a,b )。在大鼠的腦內或腹腔注射 KA 會造成神經元細胞腫脹、胞器破碎或甚至死亡，以及神經膠質細胞反應，例如 astrocyte 與 microglia 的活化與增生( Schwob et al. 1980; Sola et al. 1997 )，而以 microglia 的反應出現得較 astrocyte 反應為早。Taniwaki 等人

(1996) 亦發現大鼠腦內注射 KA 處可觀察到活化的 microglia, 且活化的現象可能導因於神經受損或過度的神經興奮. 將 KA 直接注射於 hippocampus 或 amygdala 時, CA3 所呈現的損傷程度較 CA1 或 CA4 更為嚴重 (Tanaka et al., 1992)。細胞生理性死亡為 “apoptosis”, 而病理性死亡則為 “necrosis”。Apoptosis 與 necrosis 在細胞形態上的表現迥異, 前者的特徵為細胞核染色質皺縮、DNA fragmentation 與 apoptotic body 的形成, 而後者則呈現細胞腫脹、內質網擴張與細胞膜的破裂。Apoptosis 的引發是由於細胞內鈣離子的大量增加而活化了  $Ca^{2+}/Mg^{2+}$ -dependent endonucleases, 導致 DNA fragmentation (Pollard et al., 1994)。近年來 apoptosis 與成熟動物腦部病變之間的關係如缺血、神經退化疾病、癲癇等也已被確認, 並且這些現象被認為是與 glutamate 接合器 (ligand-gated ion channel type of glutamate receptors) 的活化有關。KA 會造成持續性痙攣與不可逆的神經細胞受損, 而此神經細胞的死亡至少有部分是源於 apoptosis (Goodenough et al., 1997)。Pollard 等人 (1994) 將 KA 注射入 amygdaloid, 經數小時後於 amygdaloid 及 CA3 區域皆出現死亡細胞, 而這些細胞具有 apoptosis 特徵如 nuclear chromatin condensation 及 marginalization、cellular DNA fragmentation 與 DNA laddering。

NO 是腦中主要的傳導物質之一, 許多的研究報告顯示出 NO 與實驗誘導的痙攣之間有密切關聯, 有些學者認為實驗誘導痙攣所造成 NO 的大量產生可導致痙攣的抑制 (suppression) 或終止 (termination) (Kashihara et al., 1998; Maggio et al., 1995), 但另外一些學者則認為 NO 的大量產生會導致神經細胞的破壞 (Mulsch et al., 1994)。

本研究的目的是為了更進一步了解天麻與 VA 的抗癲癇機轉, 在 Sprague-Dawley (SD) 大鼠腦內注射 KA 誘發癲癇發作, 分別口服天麻或腹腔注射 VA, 然後檢測 hippocampus 區域 astrocyte 與 microglia、inducible nitric oxide synthase (iNOS)、以及 apoptosis 的變化來探討兩種藥物之抗

癲癇作用機轉。

### 三、材料與方法

#### 1. 動物手術與組織準備:

將 42 隻體重 200-300 克的雄性 SD 大鼠分成 7 組 (A、B、C、D、E、F、G), 麻醉固定於立體定位儀上, 將其皮膚由正中切開以露出頭骨並於適當位置鑽一 1 mm 直徑的小孔洞 (coordinates: 中線右側 1.8 mm, bregma 後方 3.8 mm), 經孔洞將微量注射針 (Hamilton syringe 5 ul, 22-gauge needle) 由腦皮質垂直而下插入 3.8 mm, 靜置 10 分鐘後分別緩緩注射 2 ul PBS 或 2 ul KA (2 ug), 各組施行藥物如下: A 組僅注射 2 ul PBS, 不施行任何藥物; B 組僅注射 2 ul KA (2 ug), 不施行任何藥物; C 組口服天麻 (1.0 g/kg) 後 30 分鐘再注射 2 ul KA (2 ug); D 組口服天麻 (0.5 g/kg) 後 30 分鐘再注射 2 ul KA (2 ug); E 組腹腔注射 VA (200 mg/kg) 後 30 分鐘再注射 2 ul KA (2 ug); F 組腹腔注射 VA (100 mg/kg) 後 30 分鐘再注射 2 ul KA (2 ug); G 組腹腔注射 PBS 後 30 分鐘再注射 2 ul KA. KA 注射 24 小時後, 先後以 0.9% NaCl 及 4% paraformaldehyde 灌流, 並取出腦部浸泡固定於 4% paraformaldehyde 中 3 天, 然後再浸泡於 30% sucrose/PBS 中 4 天 (4 ) 以作 cryoprotection, 將腦下針處修成 300 um 的組織塊包埋於 OCT 中, 並作成 20 um 厚的冷凍切片, 將玻片以 37 加熱板烘乾後保存於 -70 內備用。

#### 2. 免疫組織化學染色:

本實驗中所使用的初級抗體為抗 ED1 初級抗體 (1:500; Serotec Ltd)、抗 GFAP 初級抗體 (1:200; Oncogene, Cambridge, MA) 以及抗 iNOS / NOS Type II 初級抗體 (1:1000; Transduction Laboratories, Lexington, KY)。將組織以 PBS 稍微清洗後, 於室溫下與 3%  $H_2O_2$ /methanol 共同培養 15 分鐘後, 再次以 PBS 清洗一次, 接著與 10% 正常動物血清 (LsAB kit, Zymed, San Francisco, CA) 於室溫下共同培養 20 分鐘。培養時間到後, 小心拭去血清, 並

與初級抗體於室溫下共同培養 30 分鐘。然後以 PBS 清洗 3 次，每次 3 分鐘，再與二次抗體於室溫下共同培養 10 分鐘，之後重複以 PBS 清洗 3 次，再與 Ls-AB-peroxidase complex 共同培養 10 分鐘後，與 DAB (Liquid DAB substrate kit, Zymed, San Francisco, CA) 共同培養 2-10 分鐘，並以 hematoxylin 作對照染色，封片觀察。

### 3. In situ apoptotic analysis

以購自 Oncogene (TdT-FragEL™ kit; Oncogene, Boston, MA) 的 DNA fragmentation detection 實驗套組來檢測細胞發生 apoptotic cell death 的情況。實驗步驟依照套組所附之方法進行：組織切片經回溫烘乾及 PBS 的清洗後，先後分別加入 proteinase K 及 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/methanol，然後再加入 Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)，於 37 °C 下培養 1.5 小時，作用以 stop solution 來終止，將組織切片與 DAB 共同培養以觀察 apoptotic cell，並以 methyl green 作對照染色，封片觀察。

### 4. 統計分析：

組織切片經染色後放置於顯微鏡下計算各組 hippocampus 區域的 ED1+microglia cell、GFAP+astrocytes、iNOS+cells 及 apoptotic cell death 的細胞數目，然後使用 one way of variance (ANOVA) 來檢定各組間的差異，P 值小於 0.05 被定為有意差。

## 四、結果

### 1. 天麻和 VA 對於 KA 誘發 activated microglia 的影響

SD 大鼠於腦內注射 KA 2 ul (2 u g) 24 小時後，注射同側 hippocampus 區域的 activated microglia with ED1 immunostaining (ED1+ cell) 數目增加 (P < 0.001)。口服天麻 1.0 g/kg 可使這些增加減少 (P < 0.05)，而口服天麻 0.5 g/kg 和腹腔注射 VA 200 mg/kg, 100 mg/kg 則沒有這個作用 (P > 0.05)。

### 2. 天麻和 VA 對於 KA 誘發 astrocytes 的影響

SD 大鼠於腦內注射 KA 2 ul (2 u g) 24

小時後，注射同側 hippocampus 區域的 astrocyte with GFAP immunostaining (astrocyte cell markers GFAP) 數目增加 (P < 0.001)，腹腔注射 VA 200 mg/kg 能使至些增加減少 (P < 0.05)，而口服天麻 1.0 g/kg, 0.5 g/kg 腹腔注射 VA 100 mg/kg 則沒有這個作用 (P > 0.05)。

### 3. 天麻和 VA 對於 KA 誘發 iNOS 的影響

SD 大鼠於腦內注射 KA 2 ul (2 u g) 24 小時後，注射同側 hippocampus 區域的 iNOS immunostaining cell 數目增加 (P < 0.001)。口服天麻 1.0 g/kg, 0.5 g/kg, 或腹腔注射 VA 200 mg/kg, 100 mg/kg 都不能使這些增加減少 (P > 0.05)。

### 4. 天麻和 VA 對於 KA 誘發 apoptotic cell death 的影響

SD 大鼠於腦內注射 KA 2 ul (2 u g) 24 小時後，注射同側 hippocampus 區域的 apoptotic cell death 數目增加 (P < 0.001)。口服天麻 1.0 g/kg, 0.5 g/kg, 和腹腔注射 VA 200 mg/kg 能使至些增加減少 (P < 0.05)，而腹腔注射 VA 100 mg/kg 則沒有這個作用 (P > 0.05)。

## 五、討論

### 1. 天麻在 KA 治療的 SD 大鼠能抑制腦部 microglial cell 的活化，但 VA 則沒有這個作用

我們的結果顯示 SD 大鼠於腦內注射 KA 2 ul (2 u g) 24 小時後，注射同側 hippocampus 區域的 activated microglia with ED1 immunostaining (ED1+ cell) 數目增加，這些結果和一些研究的結果相似 (Plantier et al. 1998; Andersson et al. 1991; Chao et al. 1992; Taniwaki et al. 1996; Vezzani et al. 1999)。Taniwaki et al. (1996 年) 發現 microglial cell 被活化是神經元損傷和功能性變化的結果，特別是神經元興奮過度。另外，它們是藉著 seizure activities 的傳播路徑來傳達。一般認為中樞神經系統一旦發生了損傷會使 microglial cell 快速的活化，而 microglia cell 能分泌 transforming growth factor  $\alpha$ 1 (TGF- $\alpha$ 1) 促進損傷組織的修補，同時具有細胞的毒性

效應 ( Kreutzberg 1996 )。我們的結果顯示口服天麻 1.0 g/kg 可減少 KA 治療大鼠的 activated microglial cells, 因此我們推測天麻在 KA 治療的大鼠可有保護神經元的作用, 由於我們先前的研究發現天麻在大鼠能減少 KA 所誘發的癲癇發作 ( Hsieh et al. in press a ), 所以我們認為天麻的這些作用可能部份來自於它能減少神經元的過度興奮。我們先前的結果顯示 VA 能減少 KA 所誘發的癲癇發作, 而它的抗癲癇效用部份來自於它的自由基的清除或抑制作用 ( Hsieh et al. in press b ), 但本研究的結果顯示 VA 對於 KA 誘發的 microglial cell 的活化沒有作用, 有須要做進一步的探討。

## 2. VA 在 KA 治療大鼠能抑制 astrocytes 的增加, 但天麻則沒有這個作用

SD 大鼠於腦內注射 KA 2  $\mu$ l (2  $\mu$ g) 24 小時後, 注射同側 hippocampus 區域的 astrocyte with GFAP immunostaining ( astrocyte cell markers GFAP ) 數目增加, 而這些增加能被腹腔注射 VA 200 mg/kg 所抑制。有報告指出在頑固性癲癇患者的顳葉皮質的外科採樣中發現 astrocyte-derived neurotrophin cytokine S100 $\beta$  增加, 一般認為 S100 $\beta$  可以增加神經元和星狀細胞內的鈣離子, 它可能是星狀細胞直接的參與癲癇 ( Griffin et al. 1995 )。本研究的結果顯示 VA 在 KA 治療的大鼠可以減少 KA 所誘發的 astrocytes 細胞的增加, 但天麻則沒有相似的作用, 有必要做更深入的探討。

## 3. 天麻和 VA 兩者在大鼠對於 KA 所誘發 iNOS 的增加沒有影響

我們的結果顯示 VA 100mg/kg 和 200 mg/kg 腹腔注射, 以及口服天麻每公斤 1.0 g/kg 和 0.5 g/kg 對 KA 所誘發的 iNOS 沒有影響。一些嚴究發現 KA 能促進 hippocampus 區域 NO 的產生 ( Mülsch et al. 1994 ; Kashihara et al. 1998 ), 但 NO 在癲癇發作究竟所扮演的角色如何一直爭論著, 有人認為 NO 的產生是為了抑制癲癇發作 ( Maggio et al. 1995 ; Kashihara et al. 1998 )。另外, 有人認為 NO 在 KA 誘發癲癇發作中扮演有如 proconvulsant mediator ( Mülsch et al. 1994 )。事實上 NO 是

neurotoxicity 或者是 neuroprotective effect 取決於 nitric oxide ( NO $^{\circ}$  ) 和 nitrosoniumion ( NO $^+$  ) 的量而定, 由於前者能於 NMDA ( N-methyl-D-Aspartate ) 接合器活化形成 NO $^{\circ}$  而導致神經毒性 ( neurotoxicity ), 同時它的毒性也部份來自於它和 superoxide anion 反應成為 peroxynitrate ( ONOO $^{\circ}$  )。後者能藉著和 thiol group 的反應而使 NMDA 接合器的活性 downregulation ( Lipton et al. 1993 )。NO 在神經系統中是經由 NO synthase ( NOS ) 所合成, 而 NOS 分成 constructive NOS 由神經元所產生和 inducible NOS 由 macrophage 和 endothelial cell of capillary 所產生 ( Moncada et al. 1991 ), 如此可以解釋為何我們的結果顯示 KA 可以誘發 hippocampus 區域的 microglial cell 和 iNOS 的增加, 而天麻可以減少 KA 所誘發 microglial cell 的增加, 但對 iNOS 及 astrocyte 則沒有影響。Kashihara 等 ( 1998 ) 發現 NO 的產生關係到 KA 誘發的癲癇發作產生可能是由於增加大腦血流而增加神經元的活性。

## 4. 天麻和 VA 兩者在大鼠可以減少 KA 所誘發的 apoptosis

我們的結果顯示於 SD 大鼠的腦內注射 KA 可以使 hippocampus 區域的 apoptotic cell 數目增加, 這些結果和先前的一些研究的結果相似 ( Pollard et al. 1994a,b ; Simonian et al. 1996 )。Simonian et al. (1996) 認為 Kainate 接合器的活化可以誘發神經元轉錄獨立的細胞凋亡 ( transcription-independent apoptosis ), 這些可能牽涉到鈣離子的活化。另外, KA 所誘發的氧化自由基的產生可能與 apoptosis 有密切的關係 ( Simonian et al. 1996a )。我們先前的研究已知 KA 可誘發氧化自由基的產生和腦內組織的脂質過氧化作用, 而天麻和 VA 的抗癲癇作用和抑制脂質過氧化作用的生成, 以及自由基的生成或清除有關 ( Hsieh et al. in press a,b ), 因此我們推測天麻和 VA 減少 KA 誘發 apoptosis 的現象可能與它抑制氧化自由基的生成或清除有關。

## 六、結論

本研究的結果發現 KA 腦內注射可以誘發 hippocampus 區域 microglial cell、astrocyte、iNOS 和 apoptosis 的增加，而天麻能減少 KA 所誘發的 microglial cell 和 apoptosis 現象，但對 iNOS 及 astrocyte 則沒有作用。Vanillyl alcohol 能減少 astrocyte 和 apoptosis 現象，但對 microglial cell 及 iNOS 則沒有作用。Microglial cell、astrocyte、iNOS 和 apoptosis 四者之間的關係如何，又它們和天麻及 vanillyl alcohol 的抗癲癇作用之間的關係如何須做進一步的探討。

## 七、自評

本計畫研究內容與原先計畫一致，而且也在預期進度中完成並達成預期目標，預定撰寫兩篇國際論文 (SCI)。對於中藥的抗癲癇機轉有了更進一步的了解，可做為教學及臨床應用的參考，尚有未完全清楚部份預定下年度計畫中繼續完成。

## 八、參考文獻

1. Andersson, P. B., V. H. Perry and S. Gordon. 1991. The kinetics and morphological macrophage-microglial response to kainic acid-induced neuronal degeneration. *Neuroscience*. 42(1): 201-214.
2. Chao, C. C., S. Hu, T. W. Molitor, E. G. Shaskan and P. K. Peterson. 1992. Activated microglia mediate neuronal cell injury via a nitric oxide mechanism. *The Journal of Immunology*. 149(8): 2736-2741.
3. Griffin, W. S. T., O. Yeralan, J. G. Sheng, F. A. Boop, R. E. Mrak, C. R. Rovnaghi, B. A. Burneu, A. Feoktistova, and L. J. Van Eldik. 1995. Overexpression of the neurotrophic cytokine S100 $\alpha$  in human temporal lobe epilepsy. *Journal of Neurochemistry*. 65(1): 228-233.
4. Goodenough, S., M. Davidson, W. Chen, A. Beckmann, Z. Pujic, M. Otsuki, I. Matsumoto, and P. Wilce. 1997. Immediate early gene expression and delayed cell death in limbic areas of the rat brain after kainic acid treatment and recovery in the cold. *Exper. Neurol.* 145: 451-461.
5. Hsieh, C. L., S. Y. Chiang, K. S. Cheng, N. Y. Tang, C. J. Lee, C. Z. Pon, C. T. Hsieh and J. G. Lin. Anticonvulsive and free radical scavenging activities of *Gastrodia elata* BL. In kainic acid-treated rats. *Amer. J. Chin. Med.* (In press a)
6. 謝慶良, 李佳容, 陳春榮, 江素瑛, 唐娜櫻, 謝慶竇, 林昭庚, Vanillyl alcohol 對 kainic acid 誘發大白鼠癲癇發作的抗癲癇作用和機轉, 台灣中醫醫學雜誌, (in press b)
7. Kashihara, K., K. Sakai, K. Marui, T. Shohmori. 1998. Kainic acid may enhance hippocampal NO generation of awake rats in a seizure stage-related fashion. *Neurosci. Res.* 32: 189-194.
8. Kreutzberg, G. W. 1996. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *TINS*. 19(8): 312-318.
9. Lipton, S. A., Y. B. Choi, Z. H. Pan, S. Z. Lei, H. S. Vincent Chen, N. J. Sucher, J. Loscalzo, D. J. Singel and J. S. Stamler. 1993. A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature*. 364: 626-632.
10. Maggio, R., F. Fumagalli, E. Donati, P. Barbier, G. Racagni, G. U. Corsini, and M. Riva. 1995. Inhibition of nitric oxide synthase dramatically potentiates seizures induced by kainic acid and pilocarpine in rats. *Brain Res.* 679: 184-187.
11. Moncada, S., R. M. J. Palmer and E. A. Higgs. 1991. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacological Reviews*. 43(2): 109-142.
12. Mülsch, A., R. Busse, P. I. Mordvintcev, A. F. Vanin, E. O. Nielsen, J. Scheel-Kruger, and S. -P. Olesen. 1994. Nitric oxide promotes seizure activity in kainate-treated rats. *NeuroReport* 5: 2325-2328.
13. Plantier, M., E. Der Terrossian, and A.

- Represa. 1998. B-actin immunoreactivity in rat microglial cells: developmental pattern and participation in microglial reaction after kainate injury. *Neurosci. Lett.* 247:49-52.
14. Pollard, H., C. Charriaud-Marlangue, S. Cantagrel, A. Represa, O. Robain, J. Moreau, and Y. Ben-Ari. 1994a. Kainate-induced apoptotic cell death in hippocampal neurons. *Neuroscience.* 63: 7-18.
  15. Pollard, H., S. Cantagrel, C. Charriaud-Marlangue, J. Moreau, and Y. Ben-Ari. 1994b. Apoptosis associated DNA fragmentation in epileptic brain damage. *NeuroReport.* 5: 1053-1055.
  16. 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.
  17. Simonian, N. A., R. L. Getz, J. C. Leveque, C. Konradi, and J. T. Coyle. 1996. Kainate induces apoptosis in neurons. *Neuroscience.* 74:675-685.
  18. Sola, C., J. M. Tusell, and J. Serratosa. 1997. Calmodulin is expressed by reactive microglia in the hippocampus of kainic acid-treated mice. *Neuroscience.* 81: 699-705.
  19. 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.
  20. Taniwaki, Y., M. Kato, T. Araki, and T. Kobayashi. 1996. Microglial activation by epileptic activities through the propagation pathway of kainic acid-induced hippocampal seizures in the rat. *Neurosci. Lett.* 217: 29-32.
  21. Vezzani, A., M. Conti, A. D. Luigi, T. Ravizza, D. Moneta, F. M. and M. G. D. Simoni. 1999. Interleukin-1 $\alpha$  immunoreactivity and microglia are enhanced in the rat hippocampus by focal kainite application: functional evidence for enhancement of electrographic seizures. *The Journal of Neuroscience.* 19(12): 5054-5065.