

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫  成果報告  
 期中進度報告

## 鉤藤對 kainic acid 誘發慢性癲癇動物模型療之研究

計畫類別： 個別型計畫  整合型計畫

計畫編號：NSC 97-2320-B-039-011-MY3

執行期間：97 年 08 月 01 日至 100 年 07 月 31 日

計畫主持人：謝慶良

共同主持人：唐娜櫻、羅婉瑜

計畫參與人員：蒲曉韻

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告  完整報告

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

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、  
列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年 二年後可公開查詢

執行單位：中國醫藥大學

中華民國 98 年 05 月 20 日

## 中文摘要

我們的先前研究已知鉤藤能減少kainic acid (KA) 誘發Sprague-Dawley (SD) 大鼠的癲癇發作，鉤藤的這個作用與氧化自由基的抑制或清除有關。又我們發現KA誘發癲癇發作大鼠的大腦皮質之macrophage migration inhibitory factor (MIF) 和Cyclophilin A都減少，以及KA注射6週後在海馬區可以觀察到mossy fiber sprouting。KA治療後會導致癲癇發作閾值降低，出現再發性的癲癇發作，這種癲癇發作類似人類mesial temporal lobe epilepsy，主要的病理變化在海馬區。KA誘發癲癇發作的腦損傷於齒狀核 (dentate nucleus) 會出現sprouting of mossy fiber，而人類頑固性癲癇小孩死後的組織也有相似的組織再生。選擇性海馬區神經細胞的損傷和mossy fiber sprouting可以作為癲癇形成和自發性癲癇發作產生的原因。顛葉性癲癇有海馬硬化 (temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis) 的患者其海馬區有嚴重的神經細胞喪失，astrogliosis 和mossy fiber sprouting，如此推測海馬區域神經細胞的喪失隨後進行性mossy fiber sprouting 可以是提供癲癇形成 (epileptogenesis) 的重要因素。因此，本研究第一年的目的是建立慢性癲癇動物模型，以及探討鉤藤對KA誘發癲癇病灶形成之效用。結果顯示SD大鼠於KA腹腔注射誘發癲癇發作6週後：1)海馬齒狀核區域Tim's stain染色的optic density (OD) 值增加，而鉤藤治療能減少這些增加；2)海馬CA1和CA3c區域NeuN陽性染色細胞減少，而鉤藤治療能減少這些減少；3)海馬stratum oriens (SO)，stratum radiate (SR) 和hilus區域Glial fibrillary acid protein (GFAP) 陽性染色細胞增加，而鉤藤治療能減少這些增加。

我們的結論是KA誘發SD大鼠癲癇發作6週後，可以導致大鼠海馬區域神經細胞的死亡和mossy fiber sprouting形成，而鉤藤能減少神經細胞死亡和預防或減少癲癇病灶的形成。

關鍵詞：鉤藤、慢性癲癇模型、Mossy fiber sprouting、Kainic acid

## Abstract

Our previous studies have known that *Uncaria rhynchophylla* (UR) can reduce epileptic seizures induced by kainic acid (KA), and these effect of UR result from its suppressive and scavenging effect of oxygen free radicals generation. We also find that the reduction of macrophage migration inhibitory factor and cyclophilin A in the cerebral cortex in the KA-induced epileptic seizures rats, and also find that mossy fiber sprouting generates in the hippocampus region 6 weeks after KA administration. The threshold decreases and became to repeat seizures after KA administration, and this seizure is similar to mesial temporal lobe epilepsy in human because the main pathological changes in the hippocampus. KA-induced brain damage results in generation of mossy fiber sprouting in the dentate nucleus of hippocampus, and that is similar to the reorganization in death child with intractable epilepsy. Selective neuronal damage and mossy fiber sprouting of hippocampus may be the etiology of epileptogenesis and spontaneous epileptic seizure. Severe loss of neuronal cells, astrogliosis and mossy fiber sprouting in the hippocampus region in temporal lobe epilepsy patients with hippocampal sclerosis, suggestive that neuronal loss of hippocampus following mossy fiber sprouting may provide an important factor of epileptogenesis. Therefore, the purpose of the present study is to establish a chronic epilepsy animal model, and to investigate effect of UR on the epileptogenesis induced by KA in the first year. Results indicated that the optical density (OD) of Tim's stain in the dentate nucleus of hippocampus increased 6 weeks after KA-induced epileptic seizures in SD, these increase could be decrease by UR treatment; The counts of NeuN immunostaining positive cells decreased in the CA1 and CA3c regions of hippocampus 6 weeks after KA-induced epileptic seizure, and these decrease could be increase by UR treatment; the counts of glial fibrillary acid protein (GFAP) immnuostaining cells increased in the stratum oriens (SO),stratum radiate (SR) and hilus regions of hippocampus 6 weeks after KA-induced epileptic seizure, and these decrease could be reduce by UR treatment.

In conclusion, the neuronal death and formation of mossy fiber sprouting may be induced 6 weeks after KA-induced epileptic seizures, and UR can reduce these neuronal death and can prevent or decrease the formation of epileptogenesis.

**Key words:** *Uncaria rhynchophylla*; Chronic epilepsy animal model; Mossy fiber sprouting; Kainic acid.

## 一、前言

癲癇是因慢性的腦損傷導致一群神經細胞周期性、過度放電、反覆發作的慢性疾病。台灣至少有10萬以上的癲癇患者，至目前為止用抗癲癇藥物或手術治療大約只有75%的癲癇患者可以得到良好控制，其餘的25%則成為困難控制的頑固性癲癇患者（關尚勇，2001），因此尋求更理想的癲癇治療方法是身為醫師的職責。癲癇是發作性疾病的一種，根據傳統中醫理論屬於肝風內動，因此中醫治療癲癇用具有平肝熄風的中藥或方劑，如天麻、鉤藤、石決明，鎮肝熄風湯、天麻鉤藤飲等（孫孝洪，1992）。Kainic acid (KA) 是由 *Digenea simplex* 海藻中分離出來類似麩氨酸鹽 (glutamate) 的物質，具有強的神經興奮毒性作用。大鼠或貓腹腔或腦內注射KA所引起的腦損傷的主要病變部位在海馬區域 (hippocampus region)，行為出現 wet dog shakes, facial myoclonia 和 paw tremor 等類似人類複雜性部分性癲癇發作 (complex partial seizure)，又稱為精神運動性癲癇 (psychomotor seizure) (Ben-Ari, 1985; Nitecka et al., 1984; Schwob et al., 1980; (Tanaka et al., 1990; Tremblay et al., 1984; Wuerthele et al., 1978)，因此KA能誘發類似人類精神運動性癲癇發作的動物模式，也能提供hippocampus 區域正常和病理功能的更好理解 (Ben-Ari, 1985)。我們先前的研究結果已知Sprague-Dawley (SD) 大鼠腹腔注射KA (12 mg/kg) 約20分鐘後，會發展出 wet dog shakes, paw tremor 和 facial myoclonia 等行為，wet dog shakes 於注射後60-80分鐘時達到頂峰，大約維持至注射後3小時 (Hsieh et al., 1999a; Hsieh et al., 1999b; Hsieh et al., 2001a; Hsieh et al., 2001b)。又鉤藤於大鼠能減少KA誘發的癲癇發作，鉤藤的這個作用與氧化自由基的抑制或生成有關 (Hsieh et al., 1999a)。鉤藤和天麻對於抗癲癇，兩者有協同作用 (Hsieh et al., 1999b)。鉤藤於大鼠能抑制hippocampus區域KA誘發的apoptosis、microglia activation，以及inducible nitric oxide synthase (iNOS) 和 neuronal nitric oxide synthase (nNOS) 陽性染色細胞 (unpublished)。有研究發現鉤藤對於N-methyl-D-aspartate (NMDA) 誘發的神經細胞損傷有保護作用 (Lee et al., 2003a)，以及經由抑制NMDA誘發的apoptosis 來保護NMDA 所引起的細胞毒性 (Lee et al., 2003b)。KA治療後會導致癲癇發作閾值 (threshold) 的全體的減少，造成晚期的自發性癲癇活動 (spontaneous seizure activity) (Sperk, 1993)。KA誘發癲癇發作持續狀態後，會出現連續性、再發性的癲癇發作，這種遲發性自發性癲癇發作十分類似人類mesial temporal lobe epilepsy，主要的型態變化在海馬區 (Morimoto et al., 2004)。KA誘發癲癇發作的腦損傷在齒狀核會出現sprouting of mossy fiber，這種現象在人類頑固性癲癇小孩死後的組織也有相似mossy fibre pathway 的組織再生 (reorganization) (Sperk, 1993)。選擇性神經細胞的損傷和mossy fiber sprouting可以作為癲癇形成和自發性癲癇發作產生的原因 (Pitkänen et al., 1999)。雖然有研究指出在電氣刺激杏仁核 (amygdala) 引發癲癇發作大鼠的海馬區域 (hippocampus) 之mossy fiber sprouting 與神經細胞損傷 (neuronal damage) 的嚴重度有相互關係，但mossy fiber sprouting並不需要伴隨自發性癲癇 (spontaneous seizure) 的發生 (Nissinen et al., 2001)，以及在杏仁核和海馬區域電刺激點燃 (kindling) 大鼠的mossy fiber sprouting 不因損傷產生而靠著神經細胞的活化 (neuronal activation) (Adams et al., 1997)。有的研究發現在Ihara 癲癇大鼠的全身性強直性—陣攣性癲癇發作 (generalized tonic and clonic convulsion) 和海馬齒狀回 (dentate gyrus) 分子層 (molecular layer) 的mossy fiber sprouting，兩者之間有正相關的關係 (positive correlation)，因此推論mossy fiber sprouting 是一種由於突觸間組織再生 (synaptic reorganization) 的續發性型態轉變，也就是由於癲癇放電之構造上的神經可塑性 (structural neuroplasticity) (Amano et al., 1999)。在顳葉性癲癇有海馬硬化 (temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis) 的患者發現海馬區有嚴重的神經細胞喪失，astrogliosis 和 mossy fiber

sprouting，這些型態上的轉變是一種新的功能性突觸的形成（the formation of new functional synapses），如此推測海馬區域神經細胞的喪失隨後進行性mossy fiber sprouting 可以是提供癲癇形成（epileptogenesis）的重要因素。又mossy fiber sprouting 伴隨著突觸密度增加，說明mossy fiber terminal 不僅是構造的，而且可能也是功能的，這些功能性glutamatergic mossy fiber terminals與顆粒細胞的樹狀突（dendrites of granule cell）間發生突觸可以作為癲癇發作的開始（Proper et al., 2000）。在癲癇大鼠，Aberrant mossy fiber sprouting 增加了顆粒細胞和增加癲癇發作敏感性之間的興奮性連接（excitatory connection），以及aberrant mossy fiber sprouting的發展和癲癇發作的進展，兩者之間有相互關係，因此mossy fiber sprouting 可以形成一個興奮性環繞（excitatory circuit）而提供顳葉癲癇的慢性狀態（Rao et al., 2006）。在小鼠以pilocarpine誘發癲癇持續狀態（status epilepticus）4-8 weeks 後，可以看到豐富的mossy fiber sprouting進入內分子層（inner molecular layer），而所有小鼠發生自發性癲癇發作。Pilocarpine誘發癲癇持續狀態所引起的行為和組織變化和顳葉性癲癇的發生有密切的一致性。慢性癲癇動物模型（chronic epilepsy animal model）可作為癲癇形成的進行之研究（Shibley and Smith, 2002）。在人類頑固性顳葉性癲癇患者的顳葉皮質的brain-derived neurotrophin factor（BDNF）的蛋白質濃度明顯的比控制組增加2倍，BDNF的增加和neuropeptide Y（NPY）呈現有意義的相互關係，推測BDNF 參與人類癲癇的形成包括NPY 的誘導（induction）在內（Takahashi et al., 1999）。有研究在pilocarpine治療大鼠的杏仁核注入BDNF，結果在海馬齒狀回的顆粒層的mossy fiber axon 可以看到NPY 和BDNF表現增加，以及mossy fiber sprouting 和對pilocarpine發作敏感，因此支持BDNF在海馬可以促進、強化地驅動，癲癇發作活動的假說（Scharfman et al., 2002）。在大鼠的腹腔KA後12到24小時，可以在不同區域的腦組織增加BDNF（Kato-Semba et al., 1999）。又在成人小鼠的dorsal hippocampus注入KA 增大的顆粒細胞（granule cells出現BDNF和TrK B，這個增加從KA注射後的2到16週，維持到達12個月（Inoue et al., 1998）。癲癇發作大鼠的腦組織呈現BDNF 和NPY 兩者之間的動態（dynamic）和時間（temporal）的連結轉變，牽涉到癲癇的形成，推測BDNF和NPY兩種物質之間在神經網路興奮的調節有功能上的連結（Vezzani et al., 1999）。由於BDNF 在海馬內注射，急性期能導致過度興奮（hyperexcitability）和癲癇發作活動而促進癲癇形成，以及誘發自發性癲癇放電和引起glutamate 釋放等，但慢性的連續注射exogenous BDNF 則會減少TrKB 的表現和TrK 磷酸化作用，導致喪失對BDNF的反應而抑制癲癇形成，所以認為BDNF 對癲癇形成的效應不在於mossy fiber sprouting 而在於對excitability（Xu et al., 2004）。延長癲癇發作引發長期間NPY在mossy fiber的表現，NPY 從再發的mossy fiber 末端被自發性的釋放（Nadler et al., 2007）。NPY扮演一個有意義的角色於過度興奮的情況（condition of hyperexcitability）調節海馬的功能（Vezzani et al., 2002）。在KA治療大鼠於癲癇發作的急性期引發細胞外海馬NPY表現增加，NPY濃度的增加有可能是減輕癲癇發作的一個內源性機制（Husum et al., 1998）。當基因體序列開啟生物系統研究新的門後，後基因時代（post-genomic era）必須尋求如何轉譯這個DNA序列的訊息進入活細胞（living cells）、組織、和有機體（organization）的理解，其中最主要的目標是去描繪蛋白質的功能、生物醫學的路徑和網路（Hust and Grant 2001）。蛋白質體（proteomics）與基因體（genomics）相類似，它是蛋白質層次（protein level）大範圍基因表現（gene expression）的研究，特別在蛋白質的功能和構造，它的優點勝過基因表現影像，能夠快速分析蛋白質的標記（protein markers）（Wilkins et al., 1996; Wilkins 2002; Butterfield et al. 2006）。蛋白質體能從單一樣本中包括蛋白質的分離、鑑定和量化（quantification）做分析，它主要由兩個階段所組成：1）蛋白質的分離（separation of proteins），通常用two-dimensional gel electrophoresis（2-DE）來分離蛋白質；2）蛋白質的分析和鑑定（protein

analysis and identification) , 主要是利用質譜分光計檢法 (mass spectrometry) 來分析和鑑定蛋白質 (Lubee et al., 2003; Butterfield et al. 2006) 。蛋白質的決定比RNA 更貼近它的功能, 類似基因體圖譜 (mapping of genome) 一般, 將發展出人類和動物腦的蛋白質圖譜 (Quadroni and James 1999; Celis et al., 1998) 。有研究指出蛋白質體也能用於腦缺血一再灌流損傷時所產生氧化緊迫 (oxidative stress) 之相關抗氧化蛋白及它的同分異構物 (isoforms) 如superoxide dismutase 1 (SOD1) 和SOD2 (Lubee et al., 2003) 之識別。此外, 蛋白質體也能用來識鑑別藥物活性的生物標記 (biomarkers) 作為監測治療和毒性的反應 (Wilkins 2002) 。有研究指出2-DE 配合Matrix-assisted laser desorption ionization time of flight-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF-TOF MS)和Nanoscale capillary LC-MS/MS能夠做完整的蛋白質分析, 提供蛋白質構造的訊息, 鑑定和轉譯後修飾的分析 (analysis of posttranslational modifications) (Liu and Schey, 2005; Lo et al., 2007 a,b) , 其應用於蛋白質分析的範圍甚為包括血漿(plasma)、血液(blood)、血球(blood cells)、腦脊髓液(cerebrospinal fluid)、組織(tissue)包括腦組織、細胞(cells)、尿液(urine)和唾液(saliva)等 (Aldred et al., 2004) 。我們先前的研究, 在大鼠利用腹腔注射KA 誘發癲癇發作後, 其腦組織的proteomic analysis of biomarker 的分析, 結果2-DE和MASS assay都顯示癲癇發作大鼠的大腦皮質macrophage migration inhibitory factor (MIF) 和Cyclophilin A 都減少; Western blot 顯示癲癇發作大鼠大腦皮質的MIF 和Cyclophilin A的蛋白質表現, 以及RT-PCR也顯示MIF 和Cyclophilin A的基因表現減少 (Hsieh et al., 2007) 。另外, 我們的先驅研究 (pilot study) 發現於SD 大鼠腹腔注射KA (12 mg/kg) , 6週後在海馬區顆粒層可以清楚的看到mossy fiber sprouting, 而每週服用5日, 每日口服鉤藤1.0 g/kg, 連續6 週可以明顯的減低mossy fiber sprouting。因此本研究的目的在探討鉤藤對kainic acid 誘發慢性癲癇動物模型之治療效應及機制。研究分為三年期, 如下: 第一年: 慢性癲癇動物模型的建立, 以及鉤藤對kainic acid 誘發癲癇病灶形成效用之研究 (The establishment of chronic epilepsy animal model, and effect of *Uncaria rhynchophylla* on the formation of epileptic focus induced by kainic acid) 。

## 二、材料與方法

### 第一年

**慢性癲癇動物模型的建立, 以及鉤藤對kainic acid 誘發癲癇病灶形成效用之研究 (The establishment of chronic epilepsy animal model, and effect of *Uncaria rhynchophylla* on the formation of epileptic focus induced by kainic acid)**

#### 1、鉤藤的萃取

鉤藤的製作是委託柯達科學中藥有限公司 (桃園、台灣), 將8000克的粗藥材加8倍70%酒精煎煮35分鐘後過濾, 濃縮, 冷凍乾燥後得到566.63克 (7.08%) 鉤藤。將所得的萃取物以 rhynchophylline (Matsuura Yakugyo Co., Ltd) 標準品經 high performance liquid chromatography system (HPLC) 鑑定。

#### 2、動物

本研究使用雄性SD大鼠, 重量介於200-300克之間, 它們購置於樂斯科動物科技股份有限公司, 飼養於中國醫藥學大學動物中心, 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、慢性癲癇動物模型的建立，以及鈎藤對kainic acid 誘發癲癇病灶形成之效用

#### (1)電極的裝置

在SD大鼠的腹腔注射chloral hydrate (400 mg/kg)，待動物麻醉後，將它們的頭部固定於動物立體定位儀上，用剪刀剔除頭上的毛髮，之後用外科手術刀片從大鼠頭部的正中線切開，並剝離使露出頭骨。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。將兩電極線綁在大鼠頸部的肌肉，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鼠的頭部。電極至少裝置4天後才施行實驗，記錄時將電極線從連結器接到腦波肌電圖記錄器 (MP 100WSW Biopac system, Inc., California, USA)。

#### (2)實驗分組

將18隻SD大鼠隨機分三組，每組六隻如下：

- (a)正常組：用PBS (phosphate-buffer saline solution, 1.0 ml/kg) 溶液腹腔注射，6 週後將大鼠犧牲取腦。
- (b)控制組：腹腔注射KA (12 mg/kg)，6週後將大鼠犧牲取腦。
- (c)鈎藤組：KA (12 mg/kg) 腹腔注射後隔日開始，口服鈎藤1.0 g/kg/日，每週5日，連續6週，最後將大鼠犧牲取腦。

#### (3)實驗流程

動物隨機分組後，腹腔注射KA前的15分鐘開始到注射後的3小時為止，觀察SD 大鼠的腦波和肌電圖，以及行為變化確定癲癇發作。KA誘發大鼠癲癇發作的腦波包括散在spike或sharp wave，以及continuous spikes 或continuous sharp activities；行為包括wet dog shakes，paw tremor，facial myoclonia 或tonic posture，generalized tonic-clonic seizure等。KA 腹腔注射後6 weeks用chloral hydrate (400 mg/kg) 腹腔注射將大鼠麻醉後，經心臟灌流 (0.37% sodium sulfide solution) 犧牲取腦，再用4% paraformaldehyde 作後固定。腦組織取出後浸于4% paraformaldehyde 及30%之sucrose中脫水。待脫水完全之後將標本用cryotome製成40  $\mu$ m (Timm's stain) 及16  $\mu$ m (Hematoxylin-eosin 及immunohistochemistry stain) 之切片，貯存於冷凍切片從-80°C冰箱中，用時取出。

#### (4) Hematoxylin-eosin staining (HE, 蘇木素伊紅染色法)

冷凍切片從-80°C冰箱取出後，先在室溫下放置10 分鐘使其乾燥，接著使用4% paraformaldehyde 固定5 分鐘，將切片置於流動自來水中，沖洗5 分鐘，將切片浸泡到蘇木素染缸中1 分鐘，接著將切片取出於流動自來水中沖洗10分鐘，沖洗完將切片浸泡在伊紅素染缸中染色1 min。之後以漸增酒精濃度方式 (75%, 95%, 100%) 脫水，經二甲苯浸潤組織三次後，以封片膠濕潤封片。在光學顯微鏡20倍下，觀察下針處海馬的完整性，並在光學顯微鏡400倍下觀察同側及對側海馬區的神經細胞。

#### (5) Immunohistochemistry stain (IHC, 免疫組織化學染色)

##### (i) Glial fibrillary acid protein (GFAP) 染色

本實驗中所使用的初級抗體為抗GFAP 初級抗體 (1:200; Oncogene, Cambridge, MA)。將組織以PBS 稍微清洗後，於室溫下與3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/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，封片於光學顯微鏡下觀察。

#### (ii) NeuN Immunocytochemistry staining

先將覆載於玻片上之標本，於0.1M 的Tris buffer 中清洗兩次，每次五分鐘。接著用1%的雙氧水浸泡，30分鐘之後用Tris buffer 清洗。配製Tris A (0.1% tritonX-100 溶於0.1M 之Tris 中) 及Tris B (0.1% tritonX-100 及0.005% BSA 溶於0.1M 之Tris 中)，將標本置入清洗各10分鐘。加入normal goat serum (ABC kit, Vector Labs.) 靜置45分鐘後用Tris A 及B 清洗標本各10分鐘。加入抗體 (antiserum NeuN 稀釋5000倍) 於4°C 反應48小時後用Tris A 及B 清洗標本各10分鐘。接著加入二抗 (biotinylated secondary antibody against rabbit IgG made in goat, ABC kit, Vector Labs.) 靜置45分鐘後用Tris A 及B 清洗標本各10分鐘。微瀝乾之後，加入avidin-biotin horseradish peroxidase complex (ABC kit, Vector Labs.) 反應1小時，最後用0.1 M 之Tris buffer 清洗三次，每次5分鐘。玻片微瀝乾後，使用DAB (diaminobenzidine tetrahydrochloride) 法呈色，並用蘇木紫-伊紅染色 (H-E Stain) 作counter stain 觀察抗體之表現，呈現棕色之細胞，即為NeuN 表現陽性的細胞。

#### (6) Timm's stain

標本於120 ml的50% gum arabic、20 ml 的citrate 緩衝液、60 ml 的hydroquinone 及1 ml的19% silver nitrate 中呈色約60分鐘。染色須時時觀察其呈情形，適當呈色後，將玻片於流動的自來水中終止反應。灌流液配方Rat Distilled water NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(g) Na<sub>2</sub>S(g) 400g 400ml 4.76 4.68在40倍的顯微鏡下觀察呈色完畢之標本並用數位像機將影像輸出於電腦中，用圖像分析軟體(Image-Pro Plus 5.1, Media Cybernetics, Inc.)分析光密度。

#### 4、統計分析

計算海馬區域GFAP、NeuN陽性染色細胞數目，所得之數據，用one-wayANOVA 分析，比較組間之差異是否達到顯著差異( $p < 0.05$ )。Mossy fiber sprouting 的分析是根據Timm's stain如下：於海馬齒狀回 (dentate gyrus) 顆粒層內側 (inner molecular layer, IML) 繪製一線測量IML光密度 (optic density, OD) 之平均值，於顆粒層外側 (outer molecular layer, OML) 繪製另一線，其OD即為背景值 (background)。再將OML 之OD 與IML之OD相減，除以其OD之平均值所得到之百分比，即為呈色之嚴重度，越濃之呈色會得到越大的百分比。得到之數據，用one-way ANOVA分析，比較組間之差異是否達到顯著差異 ( $p < 0.05$ )

### 三、結果

#### 1. 鉤藤對KA誘發慢性癲癇大鼠mossy fiber sprouting的效用

SD大鼠腹腔注射KA誘發癲癇發作6週後，控制組海馬dentate nucleus區域mossy fiber sprouting的OD值比正常組和鉤藤組的OD值增加 (both  $p < 0.0001$ )，而鉤藤組和正常組間mossy fiber sprouting的OD值相似，兩者間沒有意義統計差 ( $p > 0.05$ )。

## 2. 鈎藤對KA誘發慢性癲癇大鼠海馬區域NeuN染色陽性細胞之的效用

SD大鼠腹腔注射KA誘發癲癇發作6週後，控制組海馬CA1區域NeuN染色陽性細胞的數目比正常組和鈎藤組少 ( $p < 0.0001$ ,  $p < 0.05$ , respectively)。正常組海馬CA1區域NeuN染色陽性細胞的數目比鈎藤組多 ( $p < 0.01$ )。

SD大鼠腹腔注射KA誘發癲癇發作6週後，控制組海馬CA3c區域NeuN染色陽性細胞的數目比正常組和鈎藤組少 (both  $p < 0.001$ )。

## 3. 鈎藤對KA誘發慢性癲癇大鼠海馬區域GFAP染色陽性細胞之的效用

SD大鼠腹腔注射KA誘發癲癇發作6週後，控制組海馬stratum oriens (SO) 區域GFAP染色陽性細胞的數目比正常組和鈎藤組多 ( $p < 0.0001$ ,  $p < 0.001$ , respectively)。正常組海馬SO區域GFAP染色陽性細胞的數目比鈎藤組少 ( $p < 0.05$ )。

SD大鼠腹腔注射KA誘發癲癇發作6週後，控制組海馬stratum radiate (SR) 區域GFAP染色陽性細胞的數目比正常組和鈎藤組多 ( $p < 0.0001$ ,  $p < 0.001$ , respectively)。正常組海馬SR區域GFAP染色陽性細胞的數目和鈎藤組相似沒有意義的統計差 ( $p > 0.05$ )。

SD大鼠腹腔注射KA誘發癲癇發作6週後，控制組海馬hilus區域GFAP染色陽性細胞的數目比正常組和鈎藤組多 (both  $p < 0.0001$ )。正常組海馬SR區域GFAP染色陽性細胞的數目和鈎藤組相似沒有意義的統計差 ( $p > 0.05$ )。

## 四、討論與結論

我們的研究結果顯示SD大鼠於腹腔注射KA誘發癲癇發作6週後，大鼠海馬區域Timm's stain的OD值增加，由於Timm's stain的OD值代表mossy fiber sprouting的濃度，如此，說明大鼠海馬區域的mossy fiber sprouting增加，而鈎藤治療能減少這個增加。因為mossy fiber sprouting與癲癇病灶形成 (epileptogenesis) 有密切關連，因此推論鈎藤治療能預防或減少KA治療大鼠癲癇病灶的形成。我們的結果也顯示SD大鼠於腹腔注射KA誘發癲癇發作6週後，海馬區CA1和CA3c區域的NeuN染色陽性細胞數目減少，但鈎藤治療能減少這些減少，由於NeuN染色陽性細胞代表神經細胞，因此推論鈎藤能增加KA誘發癲癇發作大鼠海馬區域的神經細胞的存活。另外，SD大鼠於腹腔注射KA誘發癲癇發作6週後，海馬SO，SR和hilus區域之GFAP染色陽性細胞數目增加，而鈎藤治療能減少這些增加，由於GFAP染色陽性代表星狀細胞 (astrocyte)，因此推論鈎藤能減少KA誘發癲癇發作大鼠海馬區域的神經細胞的死亡。綜合上述的結果推論鈎藤對於KA誘發慢性癲癇大鼠有神經細胞保護及預防癲癇病灶形成之作用。

我們的結論是KA誘發SD大鼠癲癇發作6週後，可以導致大鼠海馬區域神經細胞的死亡和mossy fiber sprouting的形成，而鈎藤能減少神經細胞死亡和預防或減少癲癇病灶的形成。

## 參考文獻

1. Adams, B., M. Lee, M. Fahnestock, R.J. Racine. 1997. Long-term potentiation trains induce mossy fiber sprouting. *Brian Res.* 775: 193-197.
2. Aldred S, M.M. Gran, H. R. Griffiths. 2004. The use of proteomics for the assessment of

- clinical samples in research. *Clinical Biochemistry* 37: 943-952.
3. Amano, S., M. Ikeda, S. Uemura, J. Fukuoka, A. Tsuji, M. Sasahara, Y. Hayase, F. Hazama. 1999. Mossy fiber sprouting in the dentate gyrus in a newly developed epileptic mutant, Ihara epileptic rat. *Brain Res.* 834: 214-218.
  4. 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.
  5. Butterfield, D. A., M. Perluigi, R. Sultana. 2006. Oxidative stress in Alzheimer's disease brain: New insights from redox proteomics. *European Journal of Pharmacology* 545: 39-50.
  6. Celis J. E., M. Ostergaard, N. A. Jensen, I. Gromova, H. H. Rasmussen, P. Gromov. 1998. Human and mouse proteomic databases: novel resource in the protein universe. *FEBS Lett.* 430: 64-72.
  7. 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.
  8. 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.
  9. 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.
  10. 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.
  11. Hsieh, C. L., F. J. Tsai, W. Y. Lo. 2007. Proteomic analysis of biomarker in the brain tissues of kainic acid-induced epileptic seizure rats. *Taiwan proteomics society international conference 2007.* pp. 18
  12. Hust, H. and S. G. N.Grant. 2000. Proteomics of the nervous system. *TRENDS in Neurosciences* 24: 259-266.
  13. Husum, H., J. D. Mikkelsen, A. Mørk. 1998. Extracellular levels of neuropeptide Y are markedly increased in the dorsal hippocampus of freely moving rats during kainic acid-induced seizure. *Brain Res.* 781: 351-354.
  14. Inoue, T., H. Hirai, B. Onteniente, F. Suzuki. 1998. Correlated long term increase of brain derived neurotrophic factor and TrK B proteins in enlarged granule cells of mouse hippocampus after kainic acid injection. *Neuroscience* 86: 723-728.
  15. Katoh-Semba, R., I. K. Takeuchi, Y. Inaguma, H. Ito, K. Kato. 1999. Brain-derived neurotrophic factor, nerve growth factor and neurotrophin-3 in selected regions of the rat brain following kainic acid-induced seizure activity. *Neurosci. Res.* 35: 19-29.
  16. Lee, J., D. Son, P. Lee, D. K. Kim, M. C. Shim, M. H. Jang, C. J. Kim, Y. S. Kim, S. Y. Kim, H. Kim. 2003a. Protective effect of methanol extract of *Uncaria rhynchophylla* against excitotoxicity induced by N-methyl-D-aspartate in rat hippocampus. *J. Pharmacol. Sci.* 92: 70-73.
  17. Lee, J., D. Son, P. Lee, S. Y. Kim, H. Kim, C. J. Kim, E. Lim. 2003b. Alkaloid fraction of *Uncaria rhynchophylla* protects against N-methyl-D-aspartate-induced apoptosis in rat

- hippocampal slices. *Neurosci. Letters* 348: 51-55.
18. Liu Z. and K. Schey. 2005. Optimization of a MALDI TOF-TOF mass spectrometer for intact protein analysis. *J. Am. Soc. Mass Spectrom* 16: 482-490.
  19. Lo, W. Y., M. H. Tsai, Y. Tsai, C. H. Hua, F. J. Tsai, S. Y. Huang, C. H. Tsai, C. C. Lai. 2007a. Identification of over-expressed proteins in oral squamous cell carcinoma (OSCC) patients by clinical proteomic analysis. *Chinica Chimica Acta* 376: 101-107.
  20. Lo, W. Y., C. C. Lai, C. H. Hua, M. H. Tsai, S. Y. Huang, C. H. Tsai, F. J. Tsai. 2007b. S100A8 is identified as a Biomarker of HPV18-infected oral squamous cell carcinoma by suppression subtraction hybridization, clinical proteomics analysis, and immunohistochemistry staining. *J. Proteome Res.* 6: 2143-2151.
  21. Lube G, K. Krapfenbauer, M. Fountoulakis. 2003. Proteomics in brain research: potentials and limitations. *Progress in Neurobiology* 69: 193-211, 2003.
  22. Morimoto, K., M. Fahnstock, R. J. Racine. 2004. Kindling and status epilepticus of epilepsy:rewiring the brain. *Progress in Neurobiology* 73: 1-60.
  23. Nadler, J. V., B. Tu, O. Timofeeva, Y. Jiao, H. Herzog. 2007. Neuropeptide Y in the recurrent mossy fiber pathway. *Peptides* 28: 357-364.
  24. Nissinen, J., K. Lukasiuk, A. Pitkänen. 2001. Is mossy fiber sprouting present at the time of the first spontaneous seizures in rat experimental temporal lobe epilepsy? *Hippocampus* 11: 299-310.
  25. 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.
  26. Proper, E. A., A. B. Oestreicher, G. H. Jansen, C. W. M. v. Veelen, P. C. van Rijen, W. H. Gispen, P. N. E. de Graan. 2000. Immunohistochemical characterization of mossy fibre sprouting in the hippocampus of patient with pharmaco-resistant temporal lobe epilepsy. *Brain* 123: 19-30.
  27. Quadroni M and P. Lames. 1999. Proteomics and automation. *Electrophoresis* 20: 664-677.
  28. Rao, M. S., B. Hattiangady, D. S. Reddy, A. K. Shetty. 2006. Hippocampal neurodegeneration, spontaneous seizures, and mossy fiber sprouting in the F344 rat model of temporal lobe epilepsy. *J. Neurosci. Res.* 83: 1088-1105.
  29. 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.
  30. Scharfman, H. E., J. H. Goodman, A. L. Sollas, S. D. Croll. 2002. Spontaneous limbic seizures after intrahippocampal infusion of brain-derived neurotrophic factor. *Exp. Neurol.* 174: 201-214.
  31. Shibley, H. and B. N. Smith. 2002. Pilocarpine-induced status epilepticus results in mossy fiber sprouting and spontaneous seizure in C57BL/6 and CD-1. *Epilepsy Res.* 49: 109-120.
  32. Sperk, G. 1993. Kainic acid seizure in the rat. *Progress in Neurobiology* 42: 1-32.
  33. Takahashi, M., S. Hayashi, A. Kakita, K. Wakabayashi, M. Fukuda, S. Kameyama, R. Tanaka, H. Takahashi, H. Nawa. 1999. Patients with temporal lobe epilepsy show an increase in brain-derived neurotrophin factor protein and its correlation with neuropeptide Y. *Brain Res.* 818: 379-382.

34. 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.
35. 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.
36. Vezzani, A., T. Ravizza, D. Moneta, M. Conti, A. Borroni, M. Rizzi, R. Samanin, R. Maj. 1999. Brain-derived neurotrophic factor immunoreactivity in the limbic system of rats after acute seizures and during spontaneous convulsions temporal evolution of changes as compared to neuropeptide Y. *Neuroscience* 90: 1445-1461.
37. Vezzani, A., M. Michalkiewicz, T. Michalkiewicz, D. Montea, T. Ravizza, C. Richichi, M. Apiprand, F. Mulé, L. Piprona, M. Gobbi, C. Schwarzer, G. Sperk. 2002. Seizure susceptibility and epileptogenesis are decreased in transgenic rats overexpressing neuropeptide Y. *Neuroscience* 110: 237-243.
38. Wilkins, M. R., K. Ou, R. D. Appel, J. C. Sanchez, J. X. Yan, O. Golaz, V. Farnworth, P. Cartier, D. F. Hochstrasser, K. L. Williams, A. A. Gooley. 1996 Rapid protein identification using N-terminal sequence tag and amino acid analysis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 221: 609-613.
39. Wilkins, M. R. 2002. What do we want from proteomics in the detection and avoidance of adverse reactions. *Toxicology letters.* 127: 245-249.
40. 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.
41. Xu, B., B. Michalski, R. J. Racine, M. Fahnstock. 2004. The effect of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) administration on kindling induction, Trk expression and seizure-related morphological changes. *Neuroscience* 126: 521-531.
42. 關尚勇，2001 年，最新癲癇病人手冊；醫軒圖書出版射。
43. 孫孝洪，1992 年，中醫治療學原理；知音出版社。