

附件：封面格式

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

以 Dextromethorphan 治療嬰幼兒癲癇的可能性- 動物實驗及臨床試驗評估

計畫類別：x 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC89 - 2314 - B - 038 - 011 -

執行期間：88 年 08 月 01 至 89 年 07 月 31 日

計畫主持人：葉健全

共同主持人：

計畫參與人員：

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：台北醫學大學醫學研究所

中 華 民 國 89 年 01 月 29 日

中文摘要

Dextromethorphan(DM) 為臨床上使用 40 年以上的非麻醉性止咳劑。在先前的研究發現 DM 是一種 NMDA(N-methyl-D-aspartate)接受體的離子通道阻斷劑。NMDA 接受體是 voltage-gated 離子通道，當它被活化時，引起細胞膜去極化，引發鈣離子內流，導致細胞興奮性增加，而細胞內鈣離子濃度增加會進一步活化細胞的重要酵素，而引發一連串的生理或病理反應。因此 DM 具有拮抗 NMDA 接受體所引發的腦神經生理或病理的變化。過去的報告發現，DM 可以在成鼠抑制由化學物質引發抽搐的作用。因此本實驗欲了解 DM 在發育時期的幼鼠腦中是否有同樣的抗抽搐作用。我們以幼鼠為實驗動物，利用 kainic acid(KA)、pentylentetrazol (PTZ)及 γ -hydroxybutyric acid (GHB)誘發癲癇抽搐發作的產生，再投予 DM 來了解是否有抑制或減緩的效果。此外，為進一步探討持續或過劇烈的抽搐是否會影響腦部促細胞計劃性死亡基因表現的影響，我們利用反轉錄聚合酶鏈鎖反應 (Reverse transcription-polymerase chain reaction; RT-PCR)的方法偵測 PTZ 對大腦皮質中 c-fos、c-jun、bcl-2 及 bax mRNA 的表現之影響，並且了解 DM 是否也具有減少因抽搐引起的腦神經細胞死亡的功用。而由實驗結果發現：(1) DM 可抑制第 14、30 及 60 天大的老鼠，經 PTZ 所誘發的 generalized clonic-tonic seizure，但對其餘的抽搐行為並無明顯的抑制作用。(2) DM 可以藉由降低 bcl-2/bax ratio 來抑制 apoptosis 的產生。因此在臨床治療的使用上，我們預期 DM 可為一安全、易取得並且副作用小的抗抽搐藥物，可用在較大歲數幼童之 generalized clonic-tonic seizure。

Abstract

Dextromethorphan (DM) is an effectively and widely used nonnarcotic antitussive agent for 40 years. Recent investigations have indicated that DM is an N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist. In particular, DM could prevent or inhibit the NMDA receptor-mediated neuropathology including hypoxia-ischemia neurotoxicity and seizure activity. However, most of the studies were conducted on adult animals or adult patients. The anticonvulsant effect of DM on the seizure activity in the developing age is not yet well determined. We, therefore, determined whether DM could effectively attenuate the chemical-induced seizure and brain damage in developing rats. The chemical materials used to induce seizure are pentylenetetrazol (PTZ) and γ -hydroxybutyric acid (GHB), which induce absence-like seizure and generalized clonic-tonic seizure. We also used reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) to determine the effect of DM on the gene expression associated with apoptosis, including c-jun, c-fos, bcl-2 and bax mRNA in the developing brain after PTZ and GHB-induced seizure. Our results showed that (1) DM could attenuate the PTZ induced- generalized clonic-tonic seizure on developing rats with age of 14, 30 or 60 days, but could not affect the GHB-induced seizure; (2) DM could reverse the PTZ-induced decrease in the bcl-2/bax ratio in the cortex of rats with age of 7 days but not in other ages. This result suggests that DM has an anticonvulsant effect in treating generalized clonic-tonic seizure of PND 30 and 60 rats. And we can use DM to cure generalized clonic-tonic seizure in older children.

癲癇(Epilepsy)是常見的神經系統疾病。根據統計，大概有 0.5% (0.3%至 0.7%) 人口罹患癲癇。以此值來估計台灣現有的癲癇病人，其人數可能有 10 萬人左右，可知治療癲癇及其用藥是刻不容緩的重要課題。由於癲癇發作的症狀是非常多元化的，國際抗癲癇分類將癲癇分成局部性發作(partial seizures)或泛發性發作(generalized seizures)。局部發作，主要是因大腦皮質某一局部區域之癲癇神經元異常放電所致。異常放電的位置與發作症狀有關連。當異常放電的位置是在大腦專司基本且單純的身體功能部位時，則發作的症狀會比較單純，稱之為單純性發作(simple partial seizures)。若放電的部位是在大腦專司比較複雜的精神功能或波及與此功能有關的部位時，就會產生較複雜且以各種精神症狀為主的發作，稱之為複雜性發作(partial with complex symptomatology)。若以上所述之兩種發作性放電波及整個大腦時，則會引起次發性泛發發作(partial with secondary generalization)。另外，泛發性發作(generalized seizures)主要是導源於整個大腦半球同時放電所表現的症狀。依其型態的不同，又可分成：失神發作(Absence seizures)、肌抽躍發作(Myoclonic seizures)、陣攣發作(Clonic seizures)、強直發作 (Tonic seizures)、強直陣攣發作(Tonic-clonic seizures)及失張力發作(Atonic seizure)。在罹患癲癇的人口中，約有 75%的人第一次發作是在 18 歲以前。如果常常反覆發作，將會影響到病人的日常生活；因此癲癇之治療及預後應先從嬰幼兒著手。造成嬰幼兒癲癇的原因很多，但大部份原因不明，推測兒童癲癇之造因與發作型態及發病年齡有關，例如嬰兒點頭性痙攣好發於嬰兒期，其造因為腦器官病變，失神發作好發於學齡兒童，其造因與遺傳有關。泛發性強直—陣攣發作好發於大小孩及青少年，其造因不明，但也許與遺傳或腦器官病變有關。光源性發作好發於青少年時期，造因與遺傳有關。Lennox—Gastaut 症後群好發於 2~7 歲，其造因亦為嚴重的腦器官病變。歸納以上各點，其造因大致可歸納為(一)先天性腦發育異常，(二)遺傳因素，(三)顱內感染，(四)頭部受傷(包括生產受傷)，(五)缺氧，(六)退化性腦疾病，(七)腦血管疾病...等。對嬰幼兒所產生的癲癇發作，一般是利用抗抽搐藥物(antiepileptic drug, AED)來治療。因為之前的研究報告曾提及癲癇抽搐的發作，可能起源於上述造因而導致兩個重要的神經生理因素變化，即抑制性神經傳導 GABA 的異常表現(Cherubini et al., 1991；Snead, 1995)或興奮性胺基酸接受器被活化(Ferkany et al., 1988；Kim et al., 1996；Meldrum et al., 1990)。所以目前用來治療癲癇發作的藥物，其藥理作用理論上是以促進 GABA 抑制性傳導作用、使用離子通道阻斷劑以及抑制興奮性胺基酸接受器的表現。但由於大部份的 AED 副作用太強，對患者可能造成毒性，並不適於長期使用。例如，ethosuximide 可用來治療失神性發作，但會引起皮膚疹、頭痛、暈眩及腸胃不適等症狀。因此尋找一安全的 AED 是刻不容緩的。

DM 在臨床上已使用了 40 年以上，經實驗證實 DM 為一相當有效、安全且被廣泛使用之非麻

醉性止咳劑。其止咳藥理強度與 codeine 相當；但卻因為更安全，所以早就取代 codeine 成為臨床上最常使用之止咳藥。由於 DM 的化學結構和 codeine 類似，故其也具有和 codeine 相類似之止咳藥理機轉，為抑制咳嗽反射中樞及末梢之非麻醉性止咳劑；但因其立體化學結構之旋光性不同，故並不具有成癮、止痛、抑制呼吸、噁心、便秘與嗜睡等效用。

DM 已被證實是 NMDA (N-methyl-D-aspartate) 接受體的非競爭型拮抗劑。NMDA 接受體是興奮性羧胺酸接受體 (glutamate receptor) 的一種，目前已知競爭型拮抗劑包括 pencyclidine (PCP)、3-(2-carboxypiperazine-4-yl) propyl-1-phosphonate (CPP)、MK-801、2-amino-5-phosphonopentanoic acid (AP5)、...等 (Collingridge et al, 1989、Lodge et al, 1990、Folbergrova, 1997、Greenamyre et al, 1994)。由於 NMDA 接受體是一種 voltage-gated 的離子通道，當它被活化時，細胞膜會去極化，而引發鈣離子內流，導致細胞興奮性增加，而細胞內鈣離子濃度增加會進一步活化細胞的重要酵素，而引發一連串的生理或病理反應 (Pumain et al, 1992)。在 NMDA 接受體的離子通道中有 DM 的結合位置，而 DM 是作用在這個位置來阻斷 NMDA 的離子通道，減少 NMDA 離子通道的開啟頻率 (Church et al., 1994; Takahama et al., 1997)。在動物實驗發現，DM 可以用來抑制 NMDA 接受體過度活化所產生的腦神經生理或病理變化。例如痙攣 (Ferkany et al., 1988)，在腦部缺氧或缺血腦神經壞死 (Goldberg et al, 1987 ; Prince et al., 1988 ; Tortella et al., 1989, Choi et al., 1987 ; Haberecht et al., 1997)。因此，有關 DM 用來做為臨床疾病使用的試驗已有相當多的報告特別是對抽搐或癲癇方面。先前動物實驗顯示，DM 可以抑制或減緩 kainic acid 所引起成年動物的抽搐作用 (Church et al, 1985 ; Feeser, 1988 ; Kim et al, 1996 ; Loscher et al, 1993)。另外，也有許多的臨床試驗使用 DM 來治療嬰幼兒重度抽搐但其結果並無一致性。此研究計劃便是想進一步確定 DM 是否可以減緩幼年動物因藥物所引發的抽搐，我們採用三種不同的藥物來引發幼年不同年齡的動物來產生抽搐即 kainic acid (KA), Pentylentetrazol (PTZ) 及 gamma-hydroxybutyric acid (GHB)。KA 可以產生 complex partial seizure with secondary generalized seizure。而 PTZ 以及 GHB 可以在低劑量下產生失神性癲癇或 myoclonic seizures，當給予高劑量時，可引發 generalized tonic-clonic seizure (Loscher et al, 1991)。

PTZ 是 GABA 接受體的拮抗劑 (antagonist)，它主要是作用在 GABA_A 接受體 (GABA_A receptor) 上。位於突觸後細胞膜的 GABA 接受體會與從神經突觸末端釋放出來的 GABA 結合，則氯離子通道會打開而導致氯離子的通透性 (conductance) 增加，於是細胞膜會因大量氯離子進入而導致神經細胞興奮性下降。一旦 PTZ 作用在 GABA 接受體上，則會阻斷氯離子的通透性而使神經細胞異常興奮，導致抽搐陣發性電位而引發抽搐行為的產生。依 PTZ 劑量高低所表現出來的行為模式並不相同 (Loscher et al, 1996, 1991 ; Ruethrich et al, 1996)。在低劑量主要會產生全身發抖、翹尾、後肢抽筋、

咀嚼...等動物行為，在此組括為 minimal seizure (輕微發作)；在高劑量主要是產生四肢無力、四肢划船、全身抽筋伴隨著陣攣發作...等，在此組括為 major seizure (重度或全部發作)。在之前的文獻顯示，低劑量的 PTZ 所產生的 minimal seizure 會有類似 absence 的行為產生，且經由 EEG 所測出的腦電波變化是類似 absence seizure，因此 minimal seizure 所代表的是 absence seizure 的模式；而 major seizure 因為包括了 generalized tonic-clonic seizure 及 myoclonic seizure，所以有可能是種 generalized motor seizure 的模式。理論上，這兩種不同型態的 seizure 其發生的機制有很大的不同。大致上，absence seizure 已認為是發生在丘腦 (thalamus) 及大腦皮質(cortex)之間，而 generalized seizure 之發生主要是位在大腦皮質(Coulter et al, 1990 ; Ebert et al, 1995 ; Prevett et al, 1995 ; Richards et al, 1995 ; Snead et al, 1995 ; Sutor et al, 1995)。之前的報告顯示，PTZ 的抽搐可以被一般的抗抽搐藥物及 NMDA 接受體的拮抗劑 MK-801、CPP 所抑制(Fisher, 1989, Mares and Haugvicova, 1997, Velisek et al, 1992 ; Loscher et al, 1988, Velisek et al, 1991, Xie et al, 1991)，因此推測 PTZ 可能會造成 NMDA 接受體過度活化(Chimirri et al, 1997 ; Pumain et al, 1992 ; Velisek et al, 1997、1995)。本實驗所用的另一種藥物 GHB 主要是 GABA 的代謝產物 succinic semialdehyde 經 dehydrogenation 作用而產生。GHB 是 GABAB 接受體的致效劑 (agonist)，它可以抑制 GABA 的釋放，並會作用在 GABA 接受體上，但其結合力的非常弱。GHB 的作用可以被 GABA 接受體的拮抗劑 (CGP35348) 所拮抗 (Banerjee et al, 1995a ; Bernasconi et al, 1992)。之前有文獻指出，在某些缺乏 succinic semialdehyde dehydrogenase (可將 succinic semialdehyde 氧化成 succinic acid)的幼童中，其 GHB 的濃度會增加並會產生一些臨床上的症狀 (Cooper et al, 1996)。例如，心智或運動行為會遲緩 (motor and mental retardation)、肌張力不足 (hypotonia)、運動失調 (ataxia)...等。另有研究指出：它利用 GHB 所引發之抽搐，主要是屬於泛發性非抽搐發作 (Generalized-nonconvulsion)的一種癲癇型態；在動物實驗發現 GHB 會引發長時間成靜止及失神的狀態以及由 EEG 所測出的腦電波圖類似失神性癲癇 (absence seizure) (Aizawa et al, 1997 ; Banerjee et al, 1992、1995b ; Marescaux et al, 1992 ; Snead et al, 1993、1990 ; Zhang et al, 1991)；而在人類的臨床研究中發現，這種典型失神發作雖不會直接造成生命危險，但因其發作頻繁，會影響學習能力 (Penry et al, 1975 ; Sato et al, 1976)，因此在臨床上多使用副作用少之 ethosuximide、valproate...等藥物來治療。從上述而言，我們希望利用這兩種藥物，在不同劑量下，來引發幼年動物產生 absence-like seizure 及 generalized seizure，來看 DM 對這兩種抽搐型態有何作用。

關於抽搐發作會對腦神經細胞產生傷害而導致細胞死亡(McDonald et al, 1993 ; Schmid et al, 1999 ; Moshe, 1998)。過去認為是缺氧缺血所導致神經壞死，但是最近有人發現，它是經過細胞計劃性死亡(apoptosis) (Johnson, 1995)；例如 kainic acid 注射所引起的腦細胞死亡，有顯著部分是以

apoptosis 的方式進行 (Pollard et al, 1994)。甚麼是 apoptosis ? 在脊髓動物組織中，細胞的死亡方式可略分為兩種：細胞壞死(necrosis)與 apoptosis (Duvall & Wyllie, 1986 ; Ellis *et al.*, 1991)。壞死為一種被動的死亡方式，會對細胞造成物理性傷害；apoptosis 則是生理調節現象，為細胞在發展過程中以及環境刺激下主動自我毀滅的死亡方式(McConkey *et al.*, 1990)。Apoptosis 在生物學的重要性是排除多餘的、有害的細胞，例如在胚胎時期，脊椎生物的神經系統，包括神經元細胞與神經膠細胞，在發育的過程中細胞會自然地進行 apoptosis，而神經系統的形成便是透過此一方式；另外，apoptosis 也可調控免疫系統的發展、老化或成熟的過程以及腫瘤退化期間體內的平衡(Ferrer et al,1992,1994; Koike et al, 1994; Oppenheim et al, 1991)。Apoptosis 是由基因所控制的反應。目前已知的調控因子有許多，例如當作存活促進(proto-oncogene)或死亡促進因子 (oncogene) 的 Bcl-2 家族 (Bcl-2 family) 或是 immediate early gene 中之 c-fos、c-jun，其主要的功能是作為 transcription factor。在 Bcl-2 家族中，可以促進細胞存活的成員包括了：bcl-2、bcl-xl、bcl-w...等；而促進細胞死亡的成員則包括了：bax、bad、bak 及 bik。上述基因所表現的蛋白被合成出來，會利用 C 端 (-COOH terminal) 附著於粒腺體膜上、細胞核膜上及內質網 (Newmeyer, 1994 ; Reed et al, 1994)，當 Bcl-2 family 這些蛋白要執行其功能時，會先形成二元體 (homodimer 或 heterodimer)，再依這些二元體的比例多寡來決定是要誘導或阻止細胞走向計劃性的死亡。舉例來說，當 Bcl-2 (可抑制死亡)的蛋白大量表現時，Bcl-2/Bcl-2 二元體的比例會增加，相對的會促使細胞死亡的二元體 (例如，Bad/Bad) 比例減少。由於這些蛋白比例的變化，會使得 apoptosis 的機制被抑制住。另外，fos 也為死亡促進因子 (oncogene) 的一種，它可以受許多刺激物的活化而造成基因大量表現，包括細胞生長因子、血清、鈣離子濃度的變化...等；但其大量表現的基因卻因為自我的抑制作用使得 fos 以短暫的方式出現在細胞中。經 fos 基因轉譯出來的蛋白，其結構上包含許多的 leucine zipper (Landschulz et al, 1988)，此區域可和 Jun 的 leucine zipper 形成二元體 (heterodimer 或 homodimer) (Rauscher et al, 1988)，以促進 transcription 的速率(Chiu et al, 1988)。曾有報告指出，剛出生還在哺乳的老鼠，有比較強的 fos 表現 (Wintrip et al, 1997)；而壓力 (stress) 也會造成 fos 的表現 (Senba et al, 1994 ; Umemoto, 1994)。另外，KA 所誘發的抽搐，在成年動物的 hippocampus 中會引起 *bax* (apoptosis gene) 的表現量增加 (Liu et al, 1999)。其造因可能是因為神經細胞過度興奮而導致這種 apoptosis gene 大量表現，而導致細胞死亡。在過去有人拿 PTZ 及 GHB 來實驗，發現 c-fos、c-jun 會增加 (Andre et al, 1998 ; Zhang et al, 1991)，但是沒有人發現這兩個基因的活化和 apoptosis 有關。為進一步探討持續或過劇烈的抽搐是否會影響腦部 apoptosis gene 表現的影響。我們以 PTZ 及 GHB 所產生的作用，特別是用高劑量產生持續、嚴重的抽搐行為，來看是否會影響大腦皮質中 c-fos、c-jun、bcl-2 及 bax 基因的表現。以及 DM 是否可以

影響因抽搐引起的腦神經細胞死亡的功用。

研究材料與實驗方法

一、實驗材料

(一)、實驗動物及來源

在本實驗所使用之 Sprague-Dawley 鼠是購買國科會動物中心之 200 到 250 公克懷孕母鼠，待其生產後培養至適當天數，大部份幼鼠於實驗中犧牲，少部份則留下供作配種之用。

(二)、實驗方法

1. PTZ 引發老鼠之抽搐行為模式及觀察

在本實驗對皮下注射 PTZ 後的老鼠之行為模式觀察分級，主要是依據 Wolfgang L.(1996, 1991) 及 Hilmi U. (1996)文章之描述。PTZ 注射至出生天數不同(第 7、14、30、60 天)之老鼠先後會呈現下列症狀，依其嚴重程度可將其行為模式分為 5 級：

第零級i 無變化(no pentylenetetrazol-induced phenomena)

第 1 級i 異常行為表徵(= automatisms)

例如：搔癢、洗臉、抖、甩毛，在此等級是以觀察抖為準

第 2 級i 非典型發作(atypical minimal seizures)

例如：翹尾、後肢抽筋、咀嚼，在此等級是以觀察翹尾、
後肢抽筋為準

第 3 級i 輕微發作(minimal seizures)

例如：前肢划船(能站立)

第 4 級i 重度發作(major seizures)

例如：衝(亂跑)、游泳狀(<14d)、划船(不能站立)、
、站立無力(把老鼠抓起來再放下,看是否有力量移動)

第 5 級i 全部發作(complete major seizures)

例如：全身抽筋(四肢抽筋)伴隨著陣攣發作(不能站立)

由於施打高劑量會引起較強烈的抽搐行為(其癲癇動物行為模式將可達到第四或第五級，此

種抽搐可視為 major seizure or motor seizure)；而低劑量所引起的抽搐較和緩(其行為模式最高可達到第三級)，此結果會因出生天數的不同而有些微差異，故在本實驗中施打 PTZ 的劑量會依天數而有所調整：

7 天：高劑量為 90mg/kg

14 天：高劑量為 90mg/kg，低劑量為 40mg/kg

30 天：高劑量為 90mg/kg，低劑量為 60mg/kg

60 天：高劑量為 90mg/kg，低劑量為 60mg/kg

2 GHB 引發老鼠之抽搐行為模式及觀察

在本實驗對皮下注射 GHB 後的老鼠之行為模式觀察分級，主要是依據 Wolfgang L.(1996)文章之描述。GHB 注射至出生天數不同(第 7、14、30、60 天)之幼鼠先後會呈現下列症狀，即靜止不動(immobility)、豎毛(staring)、面部抽搐(facial myoclonus)及不停的洗臉、搔癢(vibrissal twitching)等動作。由於施打 GHB 所誘發的動物行為(即長時間成靜止及失神的狀態)以及由 EEG 所測出的腦電波圖類似失神性癲癇(absence seizure)(Marescaux et al, 1992; Snead et al, 1993, 1990; Zhang et al, 1991)，因此本實驗除了選擇用經 PTZ 所誘發抽搐的動物模式，所給予的劑量是 100mg/kg(所有測試天數又鼠均同)。

3.我們分別給予出生後第 7、14、30 及 60 天之正常老鼠皮下注射生理食鹽水(normal saline)(控制組)、DM 10mg/kg、30mg/kg 或 50mg/kg(實驗組)，30 分鐘後，再皮下給予 KA、PTZ 或 GHB (依天數不同，所用的劑量不同；且同一天數之幼鼠分別施打高劑量及低劑量；約 760 隻)以誘導癲癇症狀之產生。紀錄觀察 1 小時，並統計出現各種抽搐行為幼鼠之隻數比例(ratio)、潛伏期(latency)及出現次數(frequency)。

外，也選擇利用 GHB 來誘發失神性發作的產生來了解 DM 是否可以減緩或抑制此種型態的抽搐。

(三) 動物犧牲：

本實驗所使用之 Sprague-Dawley 鼠於施打 PTZ 或 GHB 2 小時後將其斷頭犧牲取腦，再依不同腦區(cortex、hippocampus...)分管裝在 eppendorff 中，貯存於-70 冰箱。

(五)偵測各個基因在 7、14、30 及 60 天老鼠之大腦皮質的表現：

為明瞭使用高劑量 PTZ(90mg/kg)引發老鼠產生抽搐行為,是否會對大腦皮質中 bcl-2 bax、c-fos、c-jun 等基因產生影響;以及 DM 的給予是否會抑制或減緩 apoptosis 的產生。因此我們使用之前高劑量 PTZ 引起抽搐之動物所犧牲的鼠腦,依實驗設計不同可分成 3 組:即 time course 組、2 小時 sample 組及 24 小時 sample 組。其施打方式、藥物並不相同。在 time course 組中,可分成 6 種情形,即 A 控制組 (未打任何藥物;control;C);B 是分別施打 normal saline (NS ; N) 1 小時、2 小時及 24 小時後犧牲取腦;C 是分別施打 PTZ (PTZ ; P) 1 小時、2 小時及 24 小時後犧牲取腦。另外,依施打藥物之不同,在 2 小時及 24 小時 sample 組尚可分成施打 A NS ; B PTZ ; C DM10 mg/kg ; D DM 30 mg/kg ; E DM 50 mg/kg , 並分別於第 2 小時及第 24 小時犧牲取腦。之後抽取大腦皮質細胞的 mRNA , 並利用 RT-PCR 來分析,以了解施打 PTZ 所引發之抽搐行為,是否會影響其腦部的神經細胞之基因表現。

1. RNA 的萃取

- a. 將所需 tissue samples (依劑量或藥物不同而分管, 每管約 50~100mg) 置於 eppendorff 中。
- b. 加入 1ml TRIzol。
- c. 以研磨棒研磨至看不到 tissue 為止。
- d. 放在室溫(15~30)靜置 5 分鐘。
- e. 再加入 0.2ml chloroform。
- f. 用手輕搖 15 秒。
- g. 放在室溫中靜置 2-3 分鐘。
- h. 以 12000rpm 離心 15 分鐘, 4 。
- i. 將上清液移至新的 eppendorff 中。
- j. 加入 500 λ (1 λ =1 μ l) isopropyl alcohol。
- k. 放在室溫中靜置 10 分鐘。
- l. 以 12000rpm 離心 10 分鐘, 4 。
- m. 移去上清液 (丟棄)。
- n. 以 75 % alcohol 1ml wash
(TRIzol : Alc = 1 : 1)
- o. 以 < 7500rpm 離心 10 分鐘, 4 。
- p. 移去上清液 (丟棄), 用 Vacuum 真空乾燥。

- q. 將 20 μ l 之 TE 加入乾燥之 sample 中 , pipeting。
- r. 取一些 (1 μ l) 測 O.D.值。

2. 測 O.D.

- a. 取 1 μ l RNA 加入 69 μ l TE 中
(1 μ l RNA+ 69 μ l Q 水 \Rightarrow 70 μ l 【稀釋 70 倍】)
- b. 以 TE 當作標準液測 O.D.值。

2. RNA 反轉錄作用

- a. 在 200 ml 的 eppendorff 中加入

RNA	2 μ g
oligo dT ¹²⁻¹⁸ primer (500 μ g/ml)	1 μ l
Milli-Q water	補足至 12 μ l

- b. 放入 GeneAmp PCR system 9600 (Perkin Elmer) , 70 。

- c. 再加入 5X First Strand buffer 4 μ l

0.1 M DTT	2 μ l
10 mM dNTP	1 μ l

- d. 混合均勻。
- e. 再加入 1 μ l Super Script II。
- f. 混合均勻並低速離心以除去附著再管壁上的溶液。
- g. 放入 Perkin Elmer GeneAmp PCR system(9600)中
42 、 50 分鐘 \rightarrow 再以 70 、 15 分鐘去除酵素活性。

3. 聚合酶連鎖反應

- a. 在 200 ml 的 eppendorff 中加入

Reagent	Stock conc.	Final conc.
MgCl ₂	50mM	2 μ g
PCR buffer	10X	1X
dNTP	25mM	0.25mM
primer (sence)	20 μ M	0.4 μ M
primer (anti-sence)	20 μ M	0.4 μ M
Taq polymerase	5U/ μ l	0.025U/ μ l
DNA		2 μ l

Milli-Q water

Total 25 μ l

b. 以 GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer) 進行 PCR。

4. 瓊脂凝膠電泳

- a. 取 2g agarose 放於三角錐瓶中。
- b. 加入 0.5X TBE 150ml(此 gel conc.為 2%)。
- c. 微波加熱使其完全溶解成透明狀。
- d. 以 stir bar 攪拌使其冷卻至 50~60 。
- e. 加入 EtBr (10 mg/ml) 15 μ l。
- f. 倒入製備瓊脂凝膠的 tray 中，插上 comb，待其凝固。
- g. 把凝固之瓊脂凝膠放入電泳槽中，再加入 buffer。
- h. 將 DNA marker 及 PCR product 分別和 loading dye 均勻混合，再 load 至凝膠之 well 中。
 - i. 以柯達數位照相系統將結果記錄下來。

數據統計方法

在動物實驗是利用 one-way ANOVA with Newman-Keuls test 來比較 PTZ 和 DM 各組(P TZ vs. DM10、PTZ vs. DM30、PTZ vs. DM50)發生抽搐的潛伏期(latency)是否有統計意義；另外，使用 one-way ANOVA with Chi-square test 去比較 PTZ 和 DM 各組有發生抽搐的隻數比例(ratio)是否有統計上的意義。

實驗結果與分析

一、施打 PTZ 之實驗動物組

(1) 出生後第 7 天老鼠的行為模式觀察

在 PTZ 高劑量(90mg/kg)下，大部分的老鼠會產生全身抽筋(四肢抽筋)伴隨著陣攣發作(不能站立)的情形。在最初會先發生抖、翹尾的現象；接下來很快就會有後肢抽筋的產生之後會開始交替的出現全身抽筋(四肢抽筋)伴隨著陣攣發作(不能站立)及四肢划船，此種現象嚴重時會一直持續到斷頭犧牲。若先皮下施打 DM 10mg/kg、30mg/kg、或 50mg/kg，等到 30 分鐘後再注射 PTZ 來誘導抽搐症狀之產生。記錄觀察 1 小時，發現抽搐的情形並沒有獲得改善，仍會交替

的出現全身抽筋(四肢抽筋)伴隨著陣攣發作(不能站立)及四肢划船,此種現象嚴重時也會持續到斷頭犧牲。

(2) 出生後第 14 天老鼠的行為模式觀察

在 PTZ 低劑量(40mg/kg)下,大部分的老鼠會先產生翹尾,之後在再出現後肢抽筋等現象。若是皮下先施打 DM 10mg/kg、30mg/kg、或 50mg/kg,等到 30 分鐘後再注射 PTZ 來誘導抽搐症狀之產生。記錄觀察 1 小時,由實驗結果發現抽搐的情形並沒有獲得改善,且由統計結果得知:後肢抽筋的隻數有明顯的增加(Table 12) (ratio 由 1/6 增加至 6/6),可能對 14 天的老鼠而言,DM 的給予會有毒性的傾向;施打 PTZ 高劑量(90mg/kg)後,大部分的老鼠皆會產生全身抽筋(四肢抽筋)伴隨著陣攣發作(不能站立)的情形。在剛開始施打時,會先發生抖、翹尾的現象;接下來很快就會有後肢抽筋的產生,之後開始交替的出現全身抽筋(四肢抽筋)伴隨著陣攣發作(不能站立)及四肢划船,此種現象嚴重時會一直持續到斷頭犧牲。若先皮下施打 DM 10mg/kg、30mg/kg、或 50mg/kg,等到 30 分鐘後再注射 PTZ 來誘導抽搐症狀之產生。記錄觀察 1 小時,發現 DM 可延緩全身抽筋伴隨著陣攣發作的時間(Table 25)

(3) 出生後第 30 天老鼠的行為模式觀察

在施打 PTZ 低劑量(60mg/kg)後,大部分老鼠在施打藥劑不久,即會產生翹尾、後肢抽筋等現象。若是皮下先施打拮抗劑 DM 10mg/kg、30mg/kg、或 50mg/kg,等到 30 分鐘後再注射 PTZ 來誘導抽搐症狀之產生。記錄觀察 1 小時,由實驗結果發現 DM 可延緩翹尾發作的時間(Table 7);施打高劑量 PTZ (90mg/kg)後,大部分的老鼠會產生全身抽筋(四肢抽筋)伴隨著陣攣發作(不能站立)的情形。在施打藥物不久,會先有翹尾的現象;接下來很快就會有抖的產生,之後會有斷斷續續的全身抽筋(四肢抽筋)伴隨著陣攣發作(不能站立)及四肢划船,此種現象嚴重時會一直持續到斷頭犧牲。若先皮下施打 DM 10mg/kg、30mg/kg、或 50mg/kg,等到 30 分鐘後再注射 PTZ 來誘導抽搐症狀之產生。記錄觀察 1 小時,發現 DM 可減少發生在無力、四肢划船及全身抽筋(四肢抽筋)伴隨著陣攣發作(不能站立)之隻數(Table 18、22、26)。但對抖、翹尾及後肢抽筋的表現情形並沒有獲得改善。且較少老鼠發作抽搐的行為能一直持續到時間終止。比較施打 PTZ 及 DM 組老鼠的發作級數(score),發現 DM 可降低高劑量老鼠抽搐的產生。

(4) 出生後第 60 天老鼠的行為模式觀察

在 PTZ 低劑量(60mg/kg)後。在最初施打藥物不久，大部分老鼠即會產生翹尾，之後開始出現全身發抖，接下來很快就有後肢抽筋的現象。若是皮下先施打 DM 10mg/kg、30mg/kg、或 50mg/kg，等到 30 分鐘後再注射 PTZ 來誘導抽搐症狀之產生。記錄觀察 1 小時，由實驗結果發現 DM 可延緩翹尾發作的時間(Table 7)；施打高劑量 PTZ(90mg/kg)後觀察一個小時，大部分的老鼠會產生全身抽筋(四肢抽筋)伴隨著陣攣發作(不能站立)的情形。在最初施打藥物不久，會先有抖及翹尾的現象，之後會陸陸續續地出現全身抽筋(四肢抽筋)伴隨著陣攣發作(不能站立)及四肢划船(Table 1& 22 26)，此種現象嚴重時會一直持續到斷頭犧牲。若先皮下施打 DM 10mg/kg、30mg/kg、或 50mg/kg，等到 30 分鐘後再注射 PTZ 來誘導癲癇症狀之產生。記錄觀察 1 小時，發現 DM 可減少發生在無力、四肢划船及全身抽筋(四肢抽筋)伴隨著陣攣發作(不能站立)之隻數。但對抖、翹尾及後肢抽筋的表現情形並沒有獲得改善。且較少老鼠抽搐的行為能一直持續到時間終止。

(5) 控制組老鼠的行為模式觀察

在施打 PTZ 及 DM 組的同時，注射生理食鹽水於一批相同年齡、飼養在同樣生長環境的老鼠。記錄觀察 1 小時。由觀察結果發現：其行為和正常老鼠並無不同。

二、施打 GHB 之實驗動物組

(1) 出生後第 7 天老鼠的行為模式觀察

在本實驗中，施打 GHB (100mg/kg)後觀察一個小時，老鼠皆會出現靜止不動的情形。首先老鼠會不停的抓癢；接下來很快就會產生靜止不動的現象。經持續一段時間之後，老鼠會稍為活動一下，之後又很快地進入靜止不動的狀態。此種現象有時會交替的出現一直持續到斷頭犧牲。若先皮下施打 DM 10mg/kg、30mg/kg、或 50mg/kg，等到 30 分鐘後再注射 GHB 來誘導抽搐症狀之產生。記錄觀察 1 小時，發現抽搐的情形並沒有獲得改善，仍會先發生靜止不動的現象；持續一段時間之後，老鼠稍為活動一下，很快地又會產生靜止不動。此種現象有時會交替的出現一直持續到斷頭犧牲。

(2) 出生後第 14 天老鼠的行為模式觀察

在本實驗中，施打 GHB (100mg/kg)後觀察一個小時，老鼠皆會出現靜止不動的情形。在最

初，會先發生不停的抓癢，之後會產生靜止不動，有時會伴隨著面部抽搐的現象。持續一段時間之後，老鼠稍為活動一下(在這段期間仍會交互偶發其他的抽搐行為，例如：抓癢 甩毛)，很快地又會產生靜止不動。此種現象有時會交替的出現一直持續到斷頭犧牲。若先皮下施打 DM 10mg/kg、30mg/kg、或 50mg/kg，等到 30 分鐘後再注射 GHB 來誘導抽搐症狀之產生。記錄觀察 1 小時，發現抽搐的情形並沒有獲得改善，仍會先發生靜止不動的現象；持續一段時間之後，老鼠會稍為活動一下(在這段期間仍會交互偶發其他的抽搐行為，例如：抓癢、甩毛)，很快地又會產生靜止不動。此種現象有時會交替的出現一直持續到斷頭犧牲。

(3) 出生後第 30 天老鼠的行為模式觀察

在本實驗中，施打 GHB (200mg/kg)後觀察一個小時，老鼠皆會出現靜止不動的情形。在最初，會先發生不停的抓癢；等到一段時間之後會產生靜止不動，之後再伴隨著面部抽搐的現象(在這段期間仍會交互偶發其他的癩癩行為，例如：抓癢、甩毛)。此種現象有時會交替的出現一直持續到斷頭犧牲。若先皮下施打 DM 10mg/kg、30mg/kg、或 50mg/kg，等到 30 分鐘後再注射 GHB 來誘導抽搐症狀之產生。記錄觀察 1 小時，發現 DM 的給予可以減少老鼠面部抽搐所發生的頻率(Table 12)。其餘抽搐的情形並沒有獲得改善。

(4) 出生後第 60 天老鼠的行為模式觀察

在本實驗中，施打 GHB (200mg/kg)後觀察一個小時，老鼠皆會出現靜止不動的情形。在最初，會先發生不停的抓癢；等到一段時間之後會產生靜止不動，有時會伴隨著面部抽搐的現象(在這段期間仍會交互偶發其他的抽搐行為，例如：抓癢、甩毛)。此種現象有時會交替的出現一直持續到斷頭犧牲。若先皮下施打 DM 10mg/kg、30mg/kg、或 50mg/kg，等到 30 分鐘後再注射 GHB 來誘導抽搐症狀之產生。記錄觀察 1 小時，發現 DM 的給予會加速靜止動作的產生。其餘抽搐的情形並沒有獲得改善。

(5) 控制組老鼠的行為模式觀察

在施打 GHB 及 DM 組的同時，注射生理食鹽水於一批相同年齡、飼養在同樣生長環境的老鼠。記錄觀察 1 小時。由觀察結果發現：其行為和正常老鼠並無不同。

三 比較各個 bax、bcl-2、c-fos、c-jun、NSE mRNA 在 7、14、30 及 60 天老鼠之大腦皮質的表現情形：

在本實驗中，為了明瞭使用高劑量 PTZ 所引發老鼠產生的抽搐行為，是否會影響大腦皮質中 bax、bcl-2、c-fos、c-jun、NSE mRNA 的表現，故利用 RT-PCR 的方法去分析各個天數老鼠之大腦皮質。依出生後犧牲天數的不同(PND)可分成 7、14、30、60 天。依實驗設計的不同可分成 3 組：即 time course 組、2 小時 sample 組及 24 小時 sample 組(其施打方式請參照第 22 頁之實驗方法(五)，共 13 隻。由於每組實驗皆重覆 3 次，且其 3 次的實驗結果皆具有一致性，因此就其中的 1 組結果來分析：

(1) NSE mRNA 的表現：

在各個天數下，施打 NS、PTZ 及 DM，發現 NSE mRNA 的表現量並沒有明顯的變化 (圖未附上)。

(2) Bax mRNA 的表現：

在各個天數下，施打 NS、PTZ 及 DM，發現 bax mRNA 的表現量並沒有明顯的變化 (圖未附上)。

(3) Bcl-2 mRNA 的表現：

在第 7 天的幼鼠身上，發現施打 NS 會增加 bcl-2 mRNA 的表現 (Fig. 1)；bcl-2 mRNA 在第 2 小時會有明顯的上升，之後會呈現下降的情況。另外，施打 PTZ 也會誘發 bcl-2 mRNA 的表現，但與 NS 比較起來，則沒有明顯的變化。由實驗結果發現，在第 2 小時及第 24 小時施打 DM+PTZ 所誘發 bcl-2 mRNA 的表現量會比單獨施打 PTZ 來的高 (Fig. 2)。似乎 DM 的給予會 reverse 單獨施打 PTZ 所造成 bcl-2 的下降。由上述結果顯示，無論是施打 NS、PTZ 及 DM 皆使 bcl-2 mRNA 有上升的趨勢，尤其是 NS 2 小時這一組之 bcl-2 mRNA 所上升的量明顯的大於控制組及 PTZ 2 小時組；而 DM 的給予似乎可以抑制 PTZ 對 bcl-2 mRNA 的減緩。除此之外，我們在 14、30 及 60 天的老鼠身上無法偵測到 bcl-2 mRNA 的表現。

(3) c-fos mRNA 的表現：

在 7 天的幼鼠身上，發現施打 PTZ 1 小時所誘發 c-fos mRNA 的表現量會明顯的高於 NS 1 小時組 (Fig. 3)。此表示 PTZ 較易誘發 c-fos mRNA 的產生。而 DM 並不會減少 PTZ 所誘發之 c-fos 表現量 (Fig. 4)。另外，在第 14 天、第 30 天及第 60 天的老鼠身上，發現施打 NS 會引發 c-fos mRNA 在第 1 小時有顯著的上升 (Fig. 5 8)。另外，施打 PTZ 也會誘發 c-fos mRNA

在第 1 小時有顯著的上升，之後在第 2~24 小時會呈現明顯的下降。同樣的，DM 的給予也會誘使 c-fos mRNA 在第 2 及第 24 小時呈現一上升的情形 (Fig. 6、7、9)。綜合上述結果，發現無論是施打 NS、PTZ 或 DM 皆會誘發 c-fos mRNA 的表現量增加，且 DM 誘發 c-fos mRNA 的表現量會明顯的高於 PTZ 2 小時組。第 2 小時及第 24 小時施打 DM+PTZ 所誘發 c-fos mRNA 的表現量會比單獨施打 PTZ 來的高。因此推論，DM 對 PTZ 及 NS 所誘發之 c-fos mRNA 表現量並無明顯的抑制效果，還會促使 c-fos mRNA 的表現量增加。

(4) c-jun mRNA 的表現：

在第 7 天的幼鼠身上，發現打 PTZ、NS 及 DM 並不會影響 c-jun mRNA 的表現量 (圖未附上)。第 14 天的老鼠，發現施打 PTZ 及 NS 並不會影響 c-jun mRNA 的表現量 (圖未附上)，但施打 DM 2 小時組所誘發 c-jun mRNA 的表現量會明顯高於 PTZ 2 小時組 (Fig. 10)。另外，在第 30 天的老鼠身上，發現施打 NS 並不會引發 c-jun mRNA 的表現量增加 (Fig. 11)，但施打 PTZ 2 小時組所誘發 c-jun mRNA 的表現量會明顯低於 NS 2 小時組及控制組 (Fig. 11)。此外，施打 DM 2 小時組及 24 小時組所誘發 c-jun 基因的表現量會明顯高於 PTZ 2 小時組及 24 小時組 (Fig. 12)。在第 60 天的老鼠身上，發現施打 NS 及 PTZ 皆會引發 c-jun mRNA 的表現 (Fig. 13)，但施打 PTZ 組之 c-jun 的表現量會在 24 小時之後呈現顯著的下降，施打 NS 組卻呈現持續上升的情況。在同時，施打 DM 會誘發 c-jun 的產生，且其表現量會明顯的高於 PTZ 2 小時組及 24 小時組 (Fig. 14)。綜合上述結果，施打 NS 於第 7 天、第 14 天及第 30 天的老鼠，並不會影響 c-jun 基因的表現；但給予 PTZ 時，會抑制第 30 天老鼠 c-jun mRNA 的表現。另外，在各個天數下給予 DM 10、30、50 mg/kg 可明顯促進 c-jun mRNA 的表現量增加。此結果意味著 DM (特別是高劑量) 可能具有活化 c-jun mRNA 表現量增加的效果。

Table 1. The effect of dextromethorphan on PTZ-induced lost in righting ability on the developing rats.

PND	PTZ (high dose)	DM10	DM30	DM50
7	2/6	0/6	0/6	1/6
14	3/7	0/7	0/7	0/7
30	11/12	4/12 ^a	2/12 ^a	2/12 ^a
60	11/11	11/11	5/11 ^a	3/11 ^a

Data were ratio of rats with PTZ-induced seizure behaviors

PTZ : means single injection of PTZ

DM10 : means pre-injection of DX10 mg/kg

DM30 : means pre-injection of DX 30 mg/kg

DM50 : means pre-injection of DX 50 mg/kg

^a means significantly different to PTZ group (Chi-square test. $p < 0.05$)

Table 2. The effect of dextromethorphan on PTZ-induced generalized clonic seizures on developing rats.

PND	PTZ (high dose)	DM10	DM30	DM50
7	3/6	4/6	4/6	3/6
14	6/7	6/7	7/7	6/7
30	8/12	2/12 ^a	12/12 ^a	2/12 ^a
60	9/11	8/11	6/11 ^a	3/11 ^a

Data were ratio of rats with PTZ-induced seizure behaviors

PTZ : means single injection of PTZ

DM10 : means pre-injection of DX10 mg/kg

DM30 : means pre-injection of DX 30 mg/kg

DM50 : means pre-injection of DX 50 mg/kg

^a means significantly different to PTZ group (Chi-square test. $p < 0.05$)

Table 3. The effect of dextromethorphan on PTZ-induced generalized tonic- clonic seizures on the developing rats.

PND	PTZ (high dose)	DM10	DM30	DM50
7	5/6	4/6	5/6	5/6
14	7/7	6/7	6/7	7/7
30	10/12	7/12	2/12 ^a	4/12 ^a
60	11/11	8/11	8/11	5/11 ^a

Data were ratio of rats with PTZ-induced seizure behaviors

PTZ : means single injection of PTZ

DM10 : means pre-injection of DX10 mg/kg

DM30 : means pre-injection of DX 30 mg/kg

DM50 : means pre-injection of DX 50 mg/kg

^a means significantly different to PTZ group (Chi-square test. $p < 0.05$).

Table 4. The effect of dextromethorphan on PTZ-induced unilateral clonus on developing rats

PND	PTZ (high dose)	DM10	DM30	DM50
7	6/6	6/6	6/6	4/6
14	2/7	0/7	0/7	0/7
30	6/12	5/12	2/12	4/12
60	10/11	7/11	7/11	1/11 ^a

Data were ratio of rats with PTZ-induced seizure behaviors

PTZ : means single injection of PTZ

DM10 : means pre-injection of DX10 mg/kg

DM30 : means pre-injection of DX 30 mg/kg

DM50 : means pre-injection of DX 50 mg/kg

^a means significantly different to PTZ group (Chi-square test. $p < 0.05$).

Table 5. The effect of dextromethorphan on PTZ-induced tremor on the developing rats.

PND	PTZ (high dose)	DM10	DM30	DM50
7	6/6	4/6	6/6	5/6
14	7/7	7/7	7/7	7/7
30	5/12	11/12 ^a	6/12	1/12
60	11/11	7/11	7/11	8/11

Data were ratio of rats with PTZ-induced seizure behaviors

PTZ : means single injection of PTZ

DM10 : means pre-injection of DX10 mg/kg

DM30 : means pre-injection of DX 30 mg/kg

DM50 : means pre-injection of DX 50 mg/kg

^a means significantly different to PTZ group (Chi-square test. $p < 0.05$).

Table 6. The effect of dextromethorphan on PTZ-induced unilateral clonus on developing rat

PND	PTZ (low dose)	DM10	DM30	DM50
14	1/6	6/6 ^a	6/6 ^a	6/6 ^a
30	0/10	0/10	0/10	1/10
60	2/7	0/7	0/7	2/7

Data were ratio of rats with PTZ-induced seizure behaviors

PTZ : means single injection of PTZ

DM10 : means pre-injection of DX10 mg/kg

DM30 : means pre-injection of DX 30 mg/kg

DM50 : means pre-injection of DX 50 mg/kg

^a means significantly different to PTZ group (Chi-square test. $p < 0.05$).

Table 7. The effect of dextromethorphan on the latency of wet dog shake-induced by GHB in the developing rat

PND	GHB (sec)	GHB+DM10 (sec)	GHB+DM30 (sec)	GHB+DM50 (sec)
7	-	-	-	-
14	1911 ± 524 (n=5)	1113 ± 883 (n=2)	1433 ± 568 (n=3)	2213 ± 138 (n=2)
30	2012 ± 784 (n=5)	3223 ± 457 (n=2)	1517 ± 500 (n=5)	257 ± 9 (n=2)
60	497 ± 36 (n=2)	1835 ± 703 (n=2)	202	144

Data were ratio of rats with PTZ-induced seizure behaviors

PTZ : means single injection of PTZ

DM10 : means pre-injection of DX10 mg/kg

DM30 : means pre-injection of DX 30 mg/kg

DM50 : means pre-injection of DX 50 mg/kg

^a means significantly different to PTZ group (Chi-square test. $p < 0.05$).

Table 8. The effect of dextromethorphan on the ratio of wet dog shake-induced by GHB in the developing rat

PND	GHB	GHB+DM10	GHB+DM30	GHB+DM50
7	0/6	0/6	0/6	0/6
14	5/6	2/6	3/6	2/6
30	5/6	2/6	5/6	2/6
60	2/6	2/6	1/6	1/6

Data were ratio of rats with PTZ-induced seizure behaviors

PTZ : means single injection of GHB

DM10 : means pre-injection of DX10 mg/kg

DM30 : means pre-injection of DX 30 mg/kg

DM50 : means pre-injection of DX 50 mg/kg

^a means significantly different to GHB group (Chi-square test. $p < 0.05$).

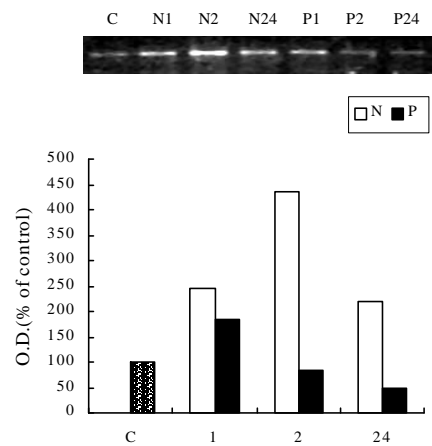


Figure1. The effect of PTZ on bcl-2 mRNA level in the cortex of PND 7 rat.

The cortical samples were taken at 1, 2 or 24 hour after injection of PTZ. Each data is normalized to the value of control (C). C: the control rats without injection. N: the rats injected with normal saline alone. P: the rats injected with PTZ .

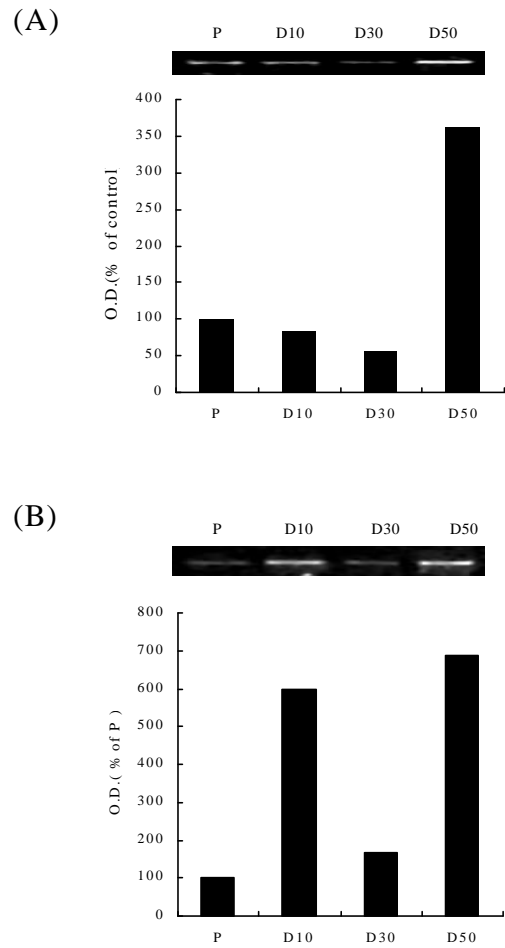


Figure2. The effect of DM on bcl-2 mRNA level in the cortex of PTZ-injected PND 7 rat.

(A) 2 hr after injection of PTZ. (B) 24hr after injection of PTZ. Each value is normalized to the value of P. P: the rats injected with PTZ. D10: the rats injected with PTZ and 10 mg/kg of DM. D30: the rats injected with PTZ and 30 mg/kg of DM. D50: the rats injected with PTZ and 50 mg/kg of DM.

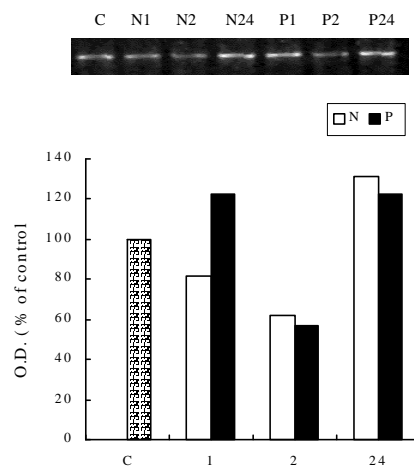
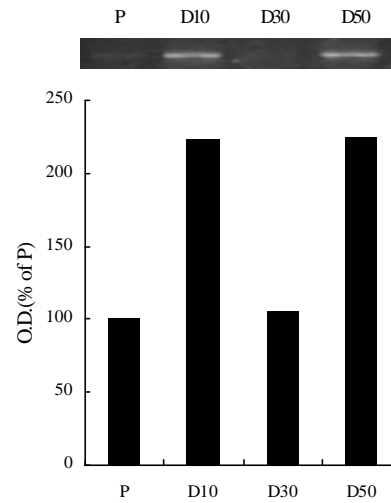


Figure 3. The effect of PTZ on c-fos mRNA level in the cortex of PND 7 rat.

The cortical samples were taken at 1, 2 or 24 hour post injection of PTZ. Each data is normalized to the value of control (C). C: the rats without injection. N: the rats injected with normal saline alone. P: the rats injected with PTZ.

(A)



(B)

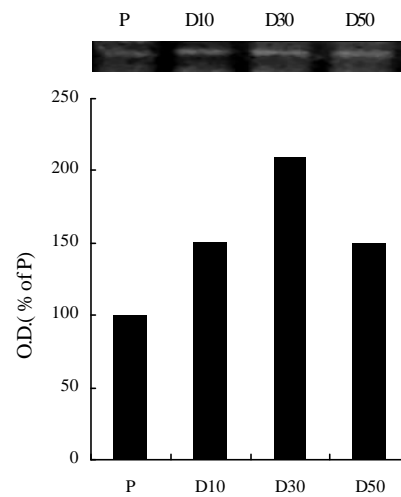


Figure 4. The effect of DM on c-fos mRNA level in the cortex of PTZ-injected PND 7 rat.

(A) 2 hr after injection of PTZ. (B) 24hr after injection with PTZ. Each value is normalized to the value of P. P: the rats injected PTZ alone. D10: the rats injected with PTZ and 10 mg/kg of DM. D30: the rats injected with PTZ and 30 mg/kg of DM. D50: the rats injected with PTZ and 50 mg/kg of DM.

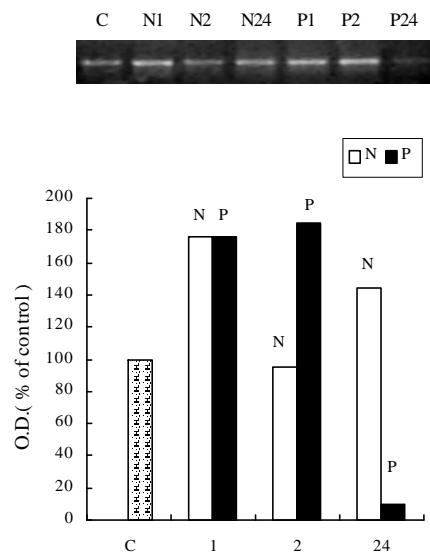


Figure 5. The effect of PTZ on c-fos mRNA level in the cortex of PND 14 rat.

The cortical samples were taken at 1, 2 or 24 hour post injection of PTZ. Each data is normalized to the value of control (C). C: the rats without injection. N: the rats injected with normal saline alone. P: the rats injected with PTZ.

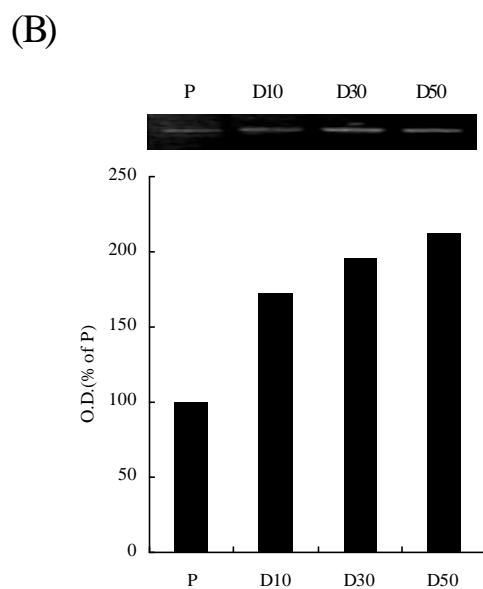
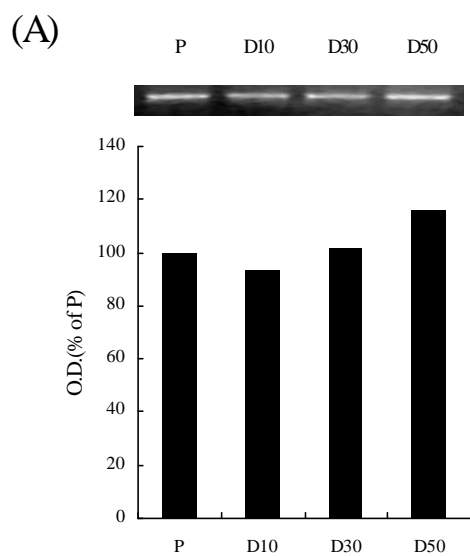
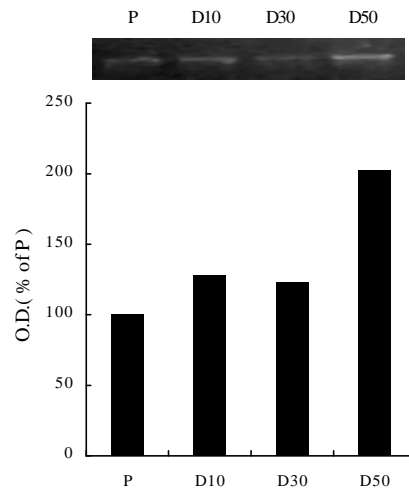


Figure 6. The effect of DM on c-fos mRNA level in cortex of PTZ-injected PND 14 rat.

(A) 2 hr after injection of PTZ. (B) 24hr after injection of PTZ. Each value is normalized to the value of P. P: the rats injected with PTZ. D10: the rats injected with PTZ and 10 mg/kg of DM. D30: the rats injected with PTZ and 30 mg/kg of DM. D50: the rats injected with PTZ and 50 mg/kg of DM.

(A)



(B)

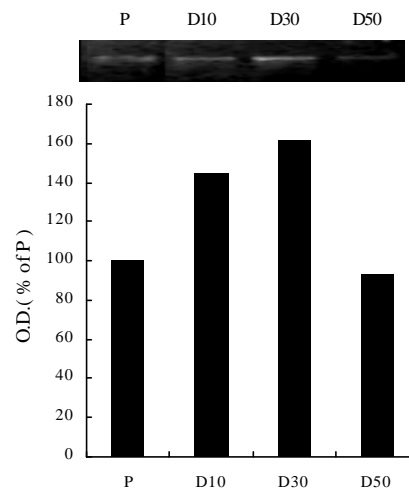


Figure 7. The effect of DM on c-fos mRNA level in the cortex of PTZ-injected PND 30 rat.

(A) 2 hr after injection of PTZ. (B) 24hr after injection of PTZ.

Each value is normalized to the value of P. P: the rats injected with PTZ. D10: the rats injected with PTZ and 10 mg/kg of DM. D30: the rats injected with PTZ and 30 mg/kg of DM. D50: the rats injected with PTZ and 50 mg/kg of DM.

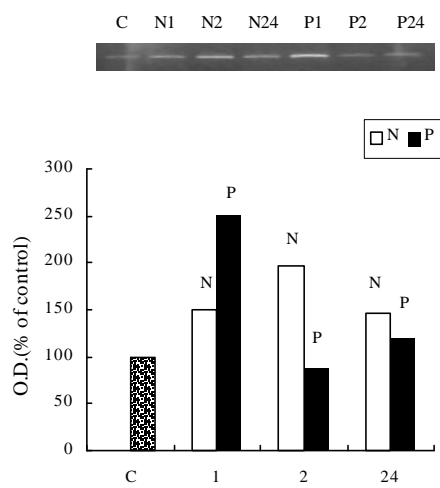


Figure 8. The effect of PTZ on c-fos mRNA level in the cortex of PND 60 rat.

The cortical samples were taken at 1, 2 or 24 hour post injection of PTZ. Each data is normalized to the value of control (C). C: the rats without injection. N: the rats injected with normal saline alone. P: the rats injected with PTZ .

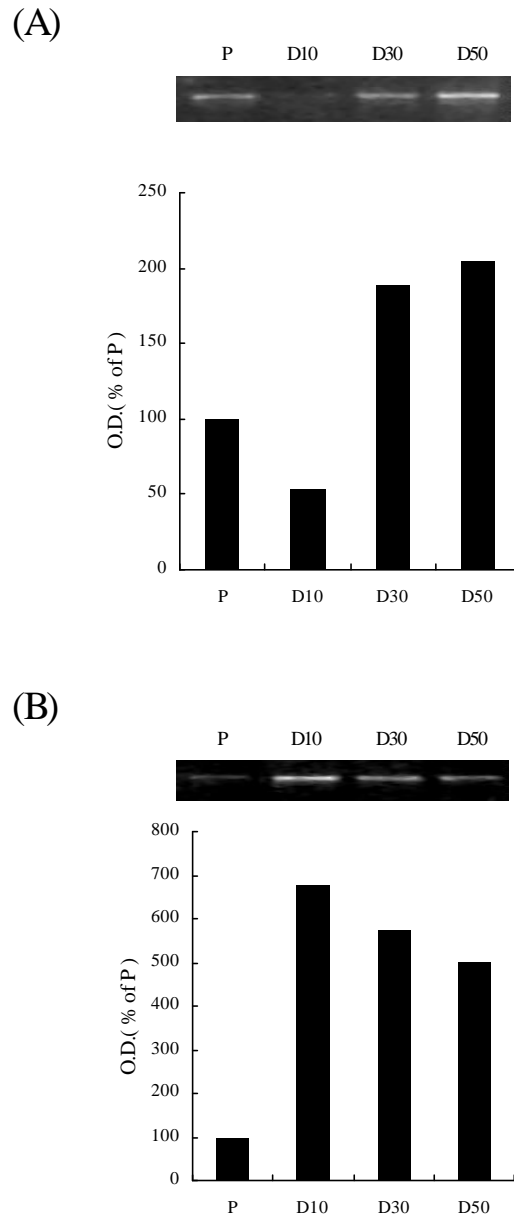


Figure 9. The effect of DM on c-fos mRNA level in the cortex of PTZ-injected PND 60 rat.

(A) 2 hr after injection of PTZ. (B) 24hr after injection of PTZ.

Each value is normalized to the value of P. P: the rats injected PTZ
 D10: the rats injected with PTZ and 10 mg/kg of DM. D30: the rats injected with PTZ and 30 mg/kg of DM. D50: the rats injected with PTZ and 50 mg/kg of DM.

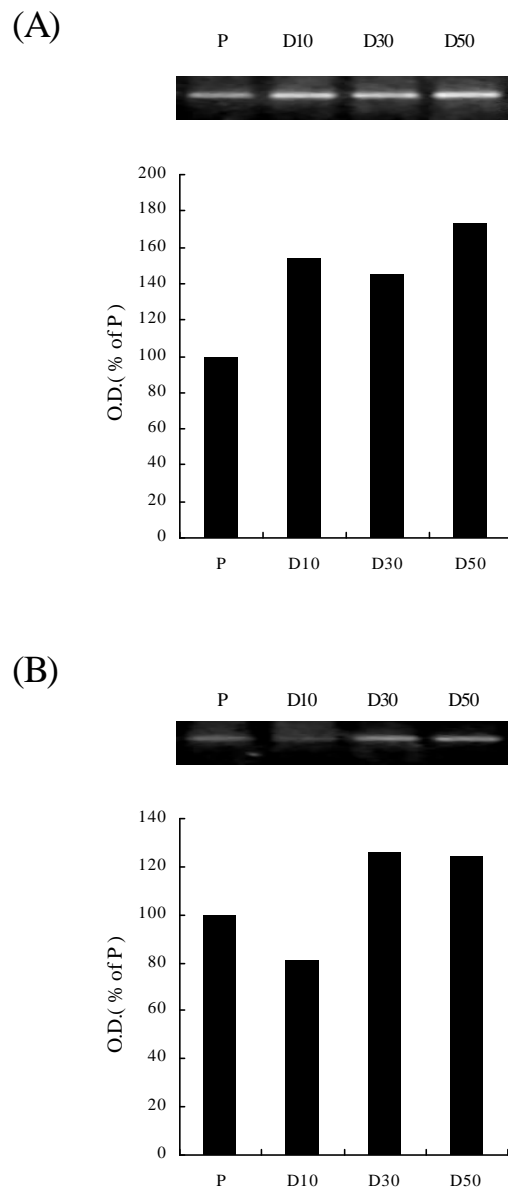


Figure 10. The effect of DM on c-jun mRNA level in the cortex of PTZ-injected PND 14 rat.

(A) 2 hr after injection of PTZ. (B) 24hr after injection of PTZ. Each value is normalized to the value of P. P: the rats injected PTZ. D10: the rats injected with PTZ and 10 mg/kg of DM. D30: the rats injected with 30 mg/kg of DM. D50: the rats injected with PTZ and 50 mg/kg of DM.

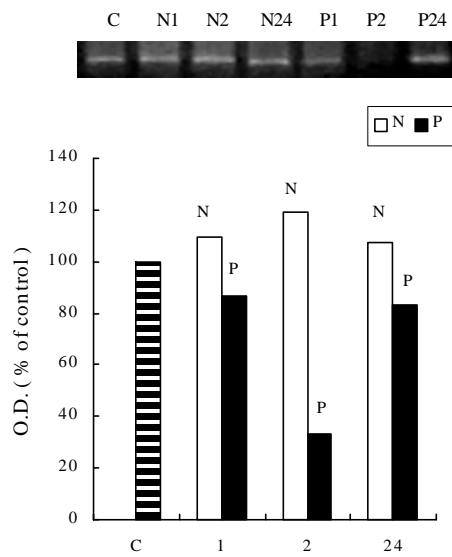
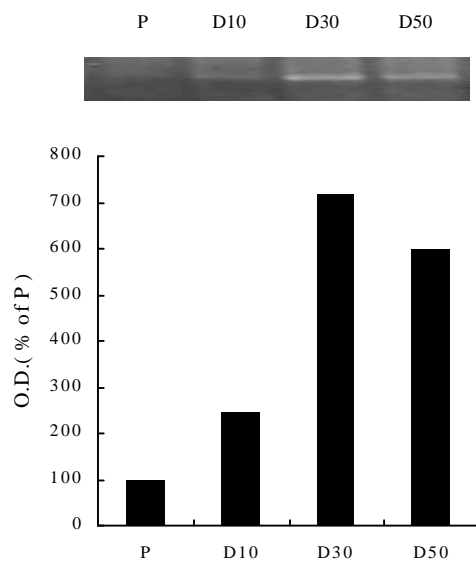


Figure 11. The effect of PTZ on c-jun mRNA level in cortex of PND 30 rat.

The cortical samples were taken at 1, 2 or 24 hour post injection of PTZ. Each data is normalized to the value of control (C). C: the rats without injection. N: the rats injected normal saline alone. P: the rats injected pentylene tetrazol.

(A)



(B)

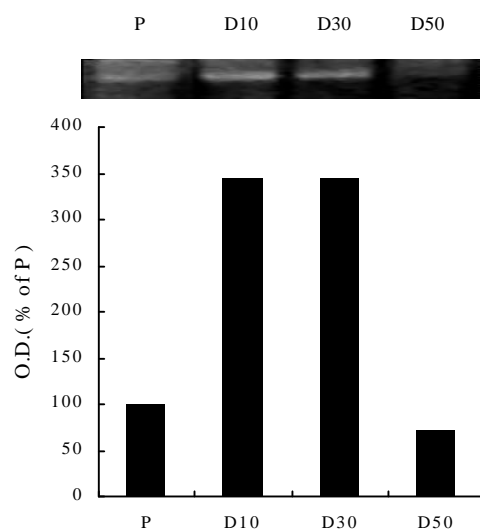


Figure 12. The effect of DM on c-jun mRNA level in cortex of PTZ-injected PND 30 rat.

(A) 2 hr after injection of PTZ. (B) 24hr after injection of PTZ. Each value is normalized to the value of P. P: the rats injected pentylenetetrazol. D10: the rats injected with 10 mg/kg of DM. D30: the rats injected with 30 mg/kg of DM. D50: the rats injected with 50 mg/kg of DM.

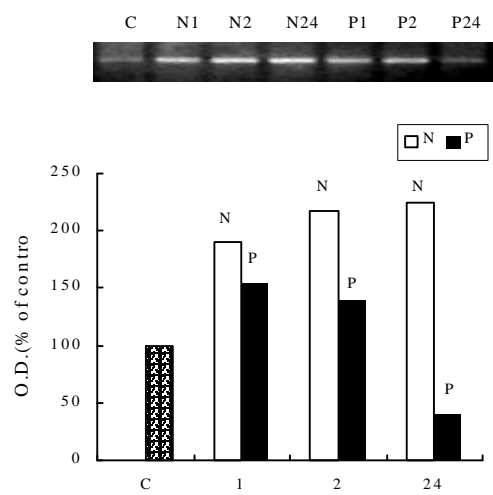


Figure 13. The effect of PTZ on c-jun mRNA level in the cortex of PND 60 rat.

The cortical samples were taken at 1, 2 or 24 hour post injection of PTZ. Each data is normalized to the value of control (C). C: the rats without injection. N: the rats injected normal saline alone. P: the rats injected PTZ.

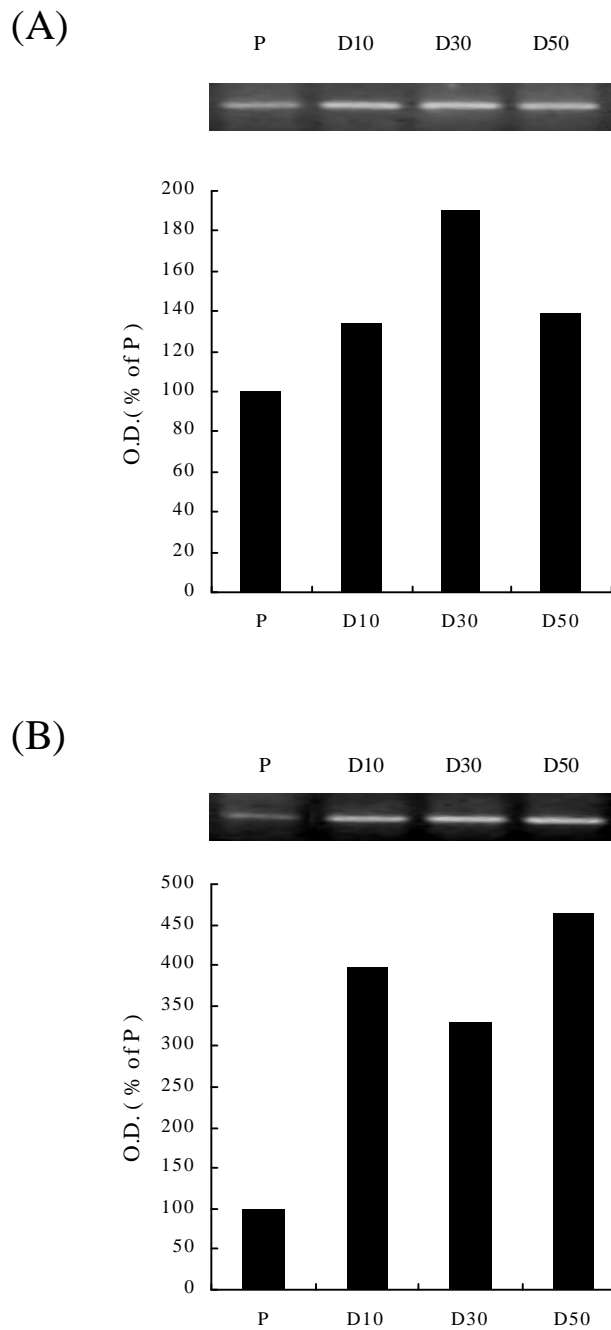


Figure 14. The effect of DM on c-jun mRNA level in the cortex of PTZ-injected PND 60 rat.

(A) 2 hr after injection of PTZ. (B) 24hr after injection of PTZ.

Each value is normalized to the value of P. P: the rats injected PTZ D10: the rats injected with PTZ and 10 mg/kg of DM. D30: the rats injected with PTZ and 30 mg/kg of DM. D50: the rats injected with PTZ and 50 mg/kg of DM.

參考資料

- Andre V, Pineau N, Motte JE, Marescaux C, Nehlig A (1998) Mapping of neuronal networks underlying generalized seizures induced by increasing doses of pentylentetrazol in the immature and adult rat: a c-Fos immunohistochemical study. *European Journal of Neuroscience* 10:2094-2106.
- Bar-Peled O, Knudson M, Korsmeyer SJ, Rothstein JD (1999) Motor neuron degeneration is attenuated in bax-deficient neurons in vitro. *Journal of Neuroscience Research* 55:542-556.
- Beart PM, Lodge D (1990) Chronic administration of MK-801 and the NMDA receptor: further evidence for reduced sensitivity of the primary acceptor site from studies with the cortical wedge preparation. *J Pharm Pharmacol* 42:354-355.
- Becker AJ, Gillardon F, Blumcke I, Langendorfer D, Beck H, Wiestler OD (1999) Differential regulation of apoptosis-related genes in resistant and vulnerable subfields of the rat epileptic hippocampus. *Brain Research. Molecular Brain Research* 67:172-176.
- Behrens A, Sibilio M, Wagner EF (1999) Amino-terminal phosphorylation of c-Jun regulates stress-induced apoptosis and cellular proliferation. *Nature Genetics* 21:326-329.
- Bernasconi R, Lauber J, Marescaux C, Vergnes M, Martin P, Rubio V, Leonhardt T, Reymann N, Bittiger H (1992) Experimental absence seizures: potential role of gamma-hydroxybutyric acid and GABAB receptors. *Journal of Neural Transmission. Supplementum* 35:155-177.
- Blake JF, Yates RG, Brown MW, Collingridge GL (1989) 6-Cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione as an excitatory amino acid antagonist in area CA1 of rat hippocampus. *Br J Pharmacol* 97:71-76.
- Britton P, Lu XC, Laskosky MS, Tortella FC (1997) Dextromethorphan protects against cerebral injury following transient, but not permanent, focal ischemia in rats. *Life Sci* 60:1729-1740.
- Cherubini E, Gaiarsa JL, Ben-Ari Y (1991) GABA: an excitatory transmitter in early postnatal life. *Trends Neurosci* 14:515-519.
- Chiu R, Boyle WJ, Meek J, Smeal T, Hunter T, Karin M (1988) The c-Fos protein interacts with c-Jun/AP-1 to stimulate transcription of AP-1 responsive genes. *Cell* 54:541-552.
- Choi DW (1987) Dextrophan and dextromethorphan attenuate glutamate neurotoxicity. *Brain Res* 403:333-336.
- Church J, Lodge D, Berry SC (1985) Differential effects of dextrophan and levorphanol on the excitation of rat spinal neurons by amino acids. *Eur J Pharmacol* 111:185-190.
- Church J, Sawyer D, McLarnon JG (1994) Interactions of dextromethorphan with the N-methyl-D-aspartate receptor- channel complex: single channel recordings. *Brain Res* 666:189-194.
- Coulter DA, Huguenard JR, Prince DA (1990) Differential effects of petit mal anticonvulsants and convulsants on thalamic neurones: calcium current reduction. *Br J Pharmacol* 100:800-806.
- Davies SN, Collingridge GL (1989) Role of excitatory amino acid receptors in synaptic transmission in area CA1 of rat hippocampus. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 236:373-384.
- de Jong D, Prins FA, Mason DY, Reed JC, van Ommen GB, Kluin PM (1994) Subcellular localization of the bcl-2 protein in malignant and normal lymphoid cells. *Cancer Research* 54:256-260.
- Ebert U, Rundfeldt C, Loscher W (1995) Development and pharmacological suppression of secondary afterdischarges in the hippocampus of amygdala-kindled rats. *Eur J Neurosci* 7:732-741.
- Feeser HR, Kadis JL, Prince DA (1988) Dextromethorphan, a common antitussive, reduces kindled amygdala seizures in the rat. *Neurosci Lett* 86:340-345.
- Ferkany JW, Borosky SA, Clissold DB, Pontecorvo MJ (1988) Dextromethorphan inhibits NMDA-induced convulsions. *Eur J Pharmacol* 151:151-154.
- Folbergrova J (1997) Anticonvulsant action of both NMDA and non-NMDA receptor antagonists against seizures induced by homocysteine in immature rats. *Exp Neurol* 145:442-450.
- Goldberg MP, Pham PC, Choi DW (1987) Dextrophan and dextromethorphan attenuate hypoxic injury in neuronal culture. *Neurosci Lett* 80:11-15.

- Greenamyre JT, Garcia-Osuna M, Greene JG (1994) The endogenous cofactors, thioctic acid and dihydrolipoic acid, are neuroprotective against NMDA and malonic acid lesions of striatum. *Neurosci Lett* 171:17-20.
- Haberecht MF, Mitchell CK, Lo GJ, Redburn DA (1997) N-methyl-D-aspartate-mediated glutamate toxicity in the developing rabbit retina. *J Neurosci Res* 47:416-426.
- Johnson EJ, Greenlund LJ, Akins PT, Hsu CY (1995) Neuronal apoptosis: current understanding of molecular mechanisms and potential role in ischemic brain injury. *Journal of Neurotrauma* 12:843-852.
- Kim HC, Pennypacker KR, Bing G, Bronstein D, McMillian MK, Hong JS (1996a) The effects of dextromethorphan on kainic acid-induced seizures in the rat. *Neurotoxicology* 17:375-385.
- Kim HS, Jang CG, Park WK (1996b) Inhibition by MK-801 of morphine-induced conditioned place preference and postsynaptic dopamine receptor supersensitivity in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 55:11-17.
- Kim HS, Rhee GS, Jung JY, Lee JH, Jang CG, Park WK (1996c) Inhibition by noncompetitive NMDA receptor antagonists of apomorphine-induced climbing behavior in mice. *Life Sci* 58:1397-1402.
- Kim JJ, Foy MR, Thompson RF (1996d) Behavioral stress modifies hippocampal plasticity through N-methyl-D-aspartate receptor activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:4750-4753.
- Kitayama T, Ogita K, Yoneda Y (1999) Sustained potentiation of AP1 DNA binding is not always associated with neuronal death following systemic administration of kainic acid in murine hippocampus. *Neurochemistry International* 35:453-462.
- Landschulz WH, Johnson PF, McKnight SL (1988) The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* 240:1759-1764.
- Lodge D, Johnson KM (1990) Noncompetitive excitatory amino acid receptor antagonists. *Trends Pharmacol Sci* 11:81-86.
- Lopez E, Pozas E, Rivera R, Ferrer I (1999) Bcl-2, Bax and Bcl-x expression following kainic acid administration at convulsant doses in the rat. *Neuroscience* 91:1461-1470.
- Loscher W, Fassbender CP, Nolting B (1991) The role of technical, biological and pharmacological factors in the laboratory evaluation of anticonvulsant drugs. II. Maximal electroshock seizure models. *Epilepsy Res* 8:79-94.
- Loscher W, Fiedler M (1996) The role of technical, biological and pharmacological factors in the laboratory evaluation of anticonvulsant drugs. VI. Seasonal influences on maximal electroshock and pentylenetetrazol seizure thresholds. *Epilepsy Res* 25:3-10.
- Loscher W, Honack D (1993) Differences in anticonvulsant potency and adverse effects between dextromethorphan and dextrorphan in amygdala-kindled and non-kindled rats. *Eur J Pharmacol* 238:191-200.
- Loscher W, Nolting B (1991) The role of technical, biological and pharmacological factors in the laboratory evaluation of anticonvulsant drugs. IV. Protective indices. *Epilepsy Res* 9:1-10.
- Matsuoka Y, Okazaki M, Takata K, Kitamura Y, Ohta S, Sekino Y, Taniguchi T (1999) Endogenous adenosine protects CA1 neurons from kainic acid-induced neuronal cell loss in the rat hippocampus. *European Journal of Neuroscience* 11:3617-3625.
- Meldrum B (1990) Protection against ischaemic neuronal damage by drugs acting on excitatory neurotransmission. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 2:27-57.
- Nehlig A, Pereira de Vasconcelos A (1996) The model of pentylenetetrazol-induced status epilepticus in the immature rat: short- and long-term effects. *Epilepsy Res* 26:93-103.
- Newmeyer DD, Farschon DM, Reed JC (1994) Cell-free apoptosis in *Xenopus* egg extracts: inhibition by Bcl-2 and requirement for an organelle fraction enriched in mitochondria [see comments]. *Cell* 79:353-364.
- Ornstein PL, Schoepp DD, Leander JD, Wong T, Zimmerman DM, Lodge D (1990) LY233053: a structurally novel, potent and selective competitive N-methyl-D-aspartate receptor antagonist. *Prog*

Clin Biol Res 361:429-433.

- Prevett MC, Duncan JS, Jones T, Fish DR, Brooks DJ (1995) Demonstration of thalamic activation during typical absence seizures using H₂(15)O and PET. *Neurology* 45:1396-1402.
- Prince DA, Feuser HR (1988) Dextromethorphan protects against cerebral infarction in a rat model of hypoxia-ischemia. *Neurosci Lett* 85:291-296.
- Pumain R, Louvel J, Gastard M, Kurcewicz I, Vergnes M (1992) Responses to N-methyl-D-aspartate are enhanced in rats with petit mal-like seizures. *J Neural Transm Suppl* 35:97-108.
- Rauscher FJd, Voulalas PJ, Franza BR, Jr., Curran T (1988) Fos and Jun bind cooperatively to the AP-1 site: reconstitution in vitro. *Genes & Development* 2:1687-1699.
- Richards DA, Lemos T, Whitton PS, Bowery NG (1995) Extracellular GABA in the ventrolateral thalamus of rats exhibiting spontaneous absence epilepsy: a microdialysis study. *J Neurochem* 65:1674-1680.
- Ruethrich H, Grecksch G, Becker A, Krug M (1996) Potentiation effects in the dentate gyrus of pentylenetetrazol-kindled rats. *Physiol Behav* 60:455-462.
- Schoepp DD, Ornstein PL, Leander JD, Lodge D, Salhoff CR, Zeman S, Zimmerman DM (1990) Pharmacological characterization of LY233053: a structurally novel tetrazole-substituted competitive N-methyl-D-aspartic acid antagonist with a short duration of action. *J Pharmacol Exp Ther* 255:1301-1308.
- Senba E, Umemoto S, Kawai Y, Noguchi K (1994) Differential expression of fos family and jun family mRNAs in the rat hypothalamo-pituitary-adrenal axis after immobilization stress. *Brain Research. Molecular Brain Research* 24:283-294.
- Snead OC, 3rd (1995) Basic mechanisms of generalized absence seizures. *Ann Neurol* 37:146-157.
- Sutor B, Luhmann HJ (1995) Development of excitatory and inhibitory postsynaptic potentials in the rat neocortex. *Perspect Dev Neurobiol* 2:409-419.
- Takahama K, Fukushima H, Isohama Y, Kai H, Miyata T (1997) Inhibition of glycine currents by dextromethorphan in neurones dissociated from the guinea-pig nucleus tractus solitarii. *Br J Pharmacol* 120:690-694.
- Tortella FC, Ferkany JW, Pontecorvo MJ (1988) Anticonvulsant effects of dextrophan in rats: possible involvement in dextromethorphan-induced seizure protection. *Life Sci* 42:2509-2514.
- Tortella FC, Martin DA, Allot CP, Steel JA, Blackburn TP, Loveday BE, Russell NJ (1989a) Dextromethorphan attenuates post-ischemic hypoperfusion following incomplete global ischemia in the anesthetized rat. *Brain Res* 482:179-183.
- Tortella FC, Pellicano M, Bowery NG (1989b) Dextromethorphan and neuromodulation: old drug coughs up new activities [see comments]. *Trends Pharmacol Sci* 10:501-507.
- Tuunanen J, Lukasiuk K, Halonen T, Pitkanen A (1999) Status epilepticus-induced neuronal damage in the rat amygdaloid complex: distribution, time-course and mechanisms. *Neuroscience* 94:473-495.
- Umemoto S, Noguchi K, Kawai Y, Senba E (1994) Repeated stress reduces the subsequent stress-induced expression of Fos in rat brain. *Neuroscience Letters* 167:101-104.
- Uysal H, Kuli P, Caglar S, Inan LE, Akarsu ES, Palaoglu O, Ayhan IH (1996) Antiseizure activity of insulin: insulin inhibits pentylenetetrazole, penicillin and kainic acid-induced seizures in rats. *Epilepsy Res* 25:185-190.
- Wintrip N, Nance DM, Wilkinson M (1997) The effect of lactation on induced Fos-like immunoreactivity in the rat hypothalamic paraventricular nucleus. *Brain Research* 754:113-120.
- Wong BY, Coulter DA, Choi DW, Prince DA (1988) Dextrophan and dextromethorphan, common antitussives, are antiepileptic and antagonize N-methyl-D-aspartate in brain slices. *Neurosci Lett* 85:261-266.
- Young D, Lawlor PA, Leone P, Dragunow M, During MJ (1999) Environmental enrichment inhibits spontaneous apoptosis, prevents seizures and is neuroprotective. *Nature Medicine* 5:448-453.
- Zhang X, Ju G, Le Gal La Salle G (1991) Fos expression in GHB-induced generalized absence epilepsy in the thalamus of the rat. *Neuroreport* 2:469-472.

