

中藥有效成份 catechin 對 kainic acid 誘發 癲癇發作老鼠的抗癲癇作用機轉之研究

The anticonvulsant mechanisms of catechin component of Chinese Herbs in rats with kainic acid-induced epileptic seizure

中國醫藥學院

謝 慶 良

摘 要

Catechin 存在於多種中藥中，如綠茶、檳榔，它被認為具有清除自由基的作用。另外，我們前導性的研究已知 catechin 可以減少 kainic acid (KA) 誘發老鼠的癲癇發作，因此本研究的目的是在於探討 catechin 的抗癲癇機轉是否和氧化自由基有關。我們的研究分成實驗 A 和 B 兩部份：實驗 A 是將 30 隻 SD 老鼠分成五組、每組六隻，分別於 KA 注射前，注射後 30 分鐘、60 分鐘 120 分鐘和 180 分鐘測定 cerebral cortex, hippocampus 和 amygdala 區域的脂質過氧化物濃度，和末梢血液中的 luminol-chemiluminescence (CL) 和 lucigenin-CL 的數目。實驗 B 分為：1) 體外研究是將六隻 SD 雄性老鼠的大腦皮質剝離並做成磨成均質液加入 KA (120 μ g/ml) 後分別加入不同的 catechin (Sigma, USA) 濃度 (1mg/

ml, 100 μ g/ml, 10 μ g/ml), 及 carbamazepine (20 μ g/ml), 和 Vitamin E (10 mM), 然後使用 TBAR 法測定 MDA 的濃度; 2) 體內研究是將 24 隻 SD 老鼠分成四組, 每組六隻如下: 1) 控制組: 使用 12 mg/kg KA 於老鼠的腹腔注射; 2) catechin 100 組: 使用 100 mg/kg 的 catechin 於 KA 投予前的 30 分鐘施行腹腔注射; 3) catechin 50 組: 方法同 catechin 100 組, 但使用 catechin 50 mg/kg; 4) carbamazepine 組: 方法同 catechin 100 組, 但使用 carbamazepine 20 mg/kg。我們觀察老鼠的行為, 腦波和肌電圖紀錄是從藥物投予前的 30 分鐘到 KA 注射後的 3 小時。最後測定大腦皮質的過氧化脂質濃度和末梢血液中 Luminol-CL 和 lucigenin-CL 的數目。結果實驗 A) 顯示老鼠腹腔注射 KA 後它們大腦皮質的 frontal cortex, amygdala 和 hippocampus 區域的脂質過氧化物的濃度, 末梢血液 luminol-CL 和 lucigenin-CL 數目都增加, 在 KA 注射後的 1 小時達到頂峰, 然後下降。另外, 大腦皮質的這三個區域的脂質過氧化物的濃度增加是平行。實驗 B) 在體外 SD 老鼠的腦組織在加入 KA 後, 腦組織的過氧化脂質濃度增加, 這些增加能被 catechin 抑制。Catechin 100 mg/kg 和 50 mg/kg 都能減少 WDS 的發作次數。老鼠在 KA 腹腔注射後它們的大腦皮質的脂質過氧化物的濃度增加, 但這些增加能被 catechin 100 mg/kg, 50 mg/kg 及 carbamazepine 20 mg/kg 所抑制。另外, KA 也能使末梢血液中的 luminol-CL 和 lucigenin-CL 的數目增加, catechin 100 mg/kg 和 50 mg/kg 能降低 luminol-CL 數目, 但對 lucigenin-CL 則沒有作用。

我們的結論是 catechin 有抗癲癇的作用, 它的抗癲癇機轉可能部分來自於它對自由基的清除作用, 至於如綠茶等含有 catechin 的中藥是否可以用來做為抗癲癇的輔助劑有待進一步的探討。

關鍵詞: Catechin, 癲癇發作, 氧化自由基, 脂質過氧化作用, Luminol-chemiluminescence (CL), Lucigenin-CL, Kainic acid

China Medical College

Ching-Liang Hsieh

ABSTRACT

Catechin, is used as a free radical scavenger, which is a component in many Chinese herbs, such as the green tea and the betel nut. In our previous study, we found that the catechin also can decrease the kainic acid (KA) -induced epileptic seizure. Therefore, in the present study we continued to investigate whether the anti-epileptic mechanism of the catechin correlated with the scavenging capability of free radical. This study was divided into two parts, experiments A and B. In experiment A, 30 Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into 5 groups (6 rats for each group). The lipid peroxide levels in the frontal cortex, hippocampus and amygdala and the luminol-chemiluminescence (CL) and lucigenin-CL counts in the peripheral blood were measured before and 30, 60, 120 and 180 minutes after the injection of KA. In experiment B, the cerebral cortex was separated from each of the six male SD rats, and these samples were ground homogenously. Then, the samples mixed with the KA (120 µg/ml) and subsequently the catechin (Sigma, USA) with different concentrations (1 mg/ml, 100 µg/ml or 10 µg/ml), the carbamazepine (20 µg/ml) and the Vitamin E (10 mM), respectively. The lipid peroxide levels were determined by using TBAR method to measure the concentration of MDA. In addition, in the in-vivo study, a total of 24 SD rats randomly were divided into 4 groups (6 rats for each group) as follows: 1) control - rats received an intraperitoneal injection of KA (12 mg/Kg); 2) catechin 100 - rats received an intraperitoneal injection of 100 mg/kg of catechin 30 minutes before the injection of KA; 3) catechin 50 - rats received an intraperitoneal injection of 50 mg/kg of catechin 30 minutes before the injection of KA; 4) carbamazepine - rats received an intraperitoneal injection of 20 mg/kg of carbamazepine 30 minutes before the injection of KA. The behavioral observation, and electroencephalogram (EEG) and electromyogram (EMG) recordings were from 30 mi-

minutes before and 3 hours after the injection of KA. Finally, we measured the lipid peroxide levels in the cerebral cortex and the luminol-CL and lucigenin-CL counts in the peripheral blood of the rats. Results in experiment A revealed that the lipid peroxide levels in the cerebral cortex, hippocampus and amygdala and the luminol-CL and lucigenin-CL counts in the peripheral blood increased and reached the peak at 60 minutes after the injection of KA. Results in experiment B showed that the increasing lipid peroxide levels in the cerebral cortex, hippocampus and amygdala induced by the KA was depressed by the catechin. Both the catechin concentrations of 100 mg/kg and 50 mg/kg could decrease the WDS. In addition, injection of KA could increase the lipid peroxide levels in the cerebral cortex, hippocampus and amygdala. However, this increasing could be depressed by 100 mg/kg and 50 mg/kg of catechin as well as 20 mg/kg of carbamazepine. The KA also could increase the counts of the luminol-CL and lucigenin-CL, and the increase of luminol-CL counts could be decreased by the catechin of 100 mg/kg and 50 mg/kg. We concluded that the catechin has anti-epileptic effect, and these effect of catechin possibly results from its scavenging effect of free radical. In addition, in future research, we will study to see whether the catechin extracting from the green tea could be also used to a adjuvant agent for treatment of epilepsy.

Keywords : Catechin, Epileptic seizure, Oxygen free radicals, Lipid peroxidation, Luminol-chemiluminescence (CL) , Lucigenin-CL, kainic acid

壹、前言

我們先前的研究已知腹腔注射 Kainic acid (KA) 可以誘發老鼠產生類似人類 psychomotor seizure、它的主要行為包括 wet dog shakes, paw tremor 和 facial myoclonia, 同時這三種行為都有它們特徵性的腦波。另外, KA 也可誘發自由基的產生。中藥如鉤藤、天麻可以減少 KA 所誘發的癲癇發作, 同時我們發現鉤藤和天麻的抗癲癇作用與它們的抗脂質過氧化作用及對自由基的清除作用有關 (Hsieh et al. 1999a, b)。一些研究發

現在老鼠抗氧化劑 vitamin E 前治療可預防鐵劑所誘發的癲癇放電 (Rubin and Willmore 1980; Willmore and Rubin 1981, 1984)。另外, Vitamin E 可做為小孩頑固性癲癇發作的輔助治療劑 (Ogunmekan and Hwang 1989)。

多種中藥如綠茶、檳榔中多含有 catechin 的成分 (Ma et al. 1996; Zhang et al. 1997), 一些研究發現 catechin 具有抗氧化的作用, 因此本研究的目的是探討 catechin 是否它的抗癲癇機轉是來自於它的抗氧化作用或它的清除自由基的作用。我們使用 KA 於老鼠的腹腔注射誘發老鼠產生癲癇發作, 並記錄它的行為、腦波和肌電圖。抗癲癇的效用是以 wet dog shakes 的發作次數為指標。

貳、材料與方法

一、動物

本研究是使用雄性的 Sprague-Dawley (SD) 老鼠, 它們的重量是 200-250 克, 每三隻為一群被飼養於鐵籠中, 在 25°的環境下維持一個 12 小時的光一暗循環。

本研究分為 A 和 B 兩個實驗

實驗 A:

將 30 隻 SD 老鼠分成 5 組、每組六隻, 分別於 KA 注射前, 注射後 30 分鐘、60 分鐘 120 分鐘和 180 分鐘測定 cerebral cortex, hippocampus 和 amygdala 區域的脂質過氧化物濃度, 和末梢血液中的 luminol-chemiluminescence (CL) 和 lucigenin-CL 的 counts。

實驗 B:

分為 1) 體外研究: 測量 catechin 在體外的抗脂質過氧化作用; 2) 體內研究: 包括行為觀察, 腦波和肌電圖的記錄, 以及自由基的測定。

二、體外脂質過氧化物濃度的測定

六隻 SD 雄性老鼠在 pentobarbital (50 mg/kg) 的麻醉狀態下, 分

別使用 10cc 的冰食鹽水從心臟灌流後取出它們的腦，然後將它們的大腦皮質剝離。在 pH 7.4，Tris-Cl 的溶液中將大腦皮質磨成均質液，然後將這些均質液在 3000 rpm 下離心 15 分鐘，最後取出浮上液測量脂質過氧化物的濃度。脂質過氧化物的濃度是藉著 malondialdehyde (MDA) 的濃度。大腦皮質的浮上液在加入 KA (120 μ g/ml) 後分別加入不同的 catechin (sigma, USA) 濃度 (1 mg, 100 μ g, 10 μ g)，carbamazepine (20 μ g) 的濃度，和 Vitamin E (10 mM) 的濃度，然後放置於 37°C 的保溫箱中 2 小時，隨後又附加 8.1% SDS (Sodium Dodecyl Sulfate, Sigma Co. USA) 和 TBAR (2-tiobarbituric acid + 20% acetic acid) 之後，它們又被放置於 95°C 的保溫箱中 1 小時，然後將它們冷卻至室溫後，附加 5 cc 的 n-butanol 放入懸浮液中，並在 3000 rpm 下離心 15 分鐘，最後在 532 nm 的光譜下讀出 MDA 的濃度 (Spectrophotometer, Beckman Instruments Inc., California, USA)，並利用已知等量的 MDA 建立一個標準曲線，結果的計算是以每克組織 nmol 來表示。

三、行為觀察和腦波、肌電圖的記錄

行為觀察和腦波、肌電圖的記錄是在老鼠清醒且自由活動的情況下施行。我們將 24 隻 SD 老鼠分成四組，每組六隻如下：1) 控制組：使用 KA (12 mg/kg) 於老鼠的腹腔注射；2) catechin 100 組：使用 100 mg/kg 的 catechin 於 KA 投予前的 30 分鐘施行腹腔注射；3) catechin 50 組：方法同 catechin 100 組，但使用 catechin 50 mg/kg；4) carbamazepine 組：方法同 catechin 100 組，但使用 carbamazepine 20 mg/kg。實驗前的一星期，我們使用 pentobarbital (50 mg/kg) 在老鼠的腹腔注射，待它們麻醉之後將頭顱暴露，然後使用不鏽鋼的螺絲釘電極安置在兩側的感覺運動皮質區的硬腦膜上做為記錄電極，而參考電極則安置於前額竇上。肌電圖的記錄是使用雙極的電線穿過皮下安置在頸部肌肉上。這些電極被插入一個連接器上，然後連接到腦波

和肌電圖記錄器（MP100WSW，BIOPAC System，Inc.，California，USA）。行為觀察和腦波記錄是從藥物投予前的 30 分鐘到 KA 注射後的 3 小時。抗癲癇效用的評估是以 KA 誘發的 wet dog shakes（WDS）為指標。我們藉著行為觀察和腦波活動及肌電圖來證實癲癇發作。

四、活體內自由基的測定

行為觀察和腦波、肌電圖記錄完成後，我們同時測定老鼠腦中脂質過氧化物的濃度和末梢血液中 Luminol-CL 和 lucigenin-CL 的數目。每一隻老鼠在 pentobarbital（50 mg/kg）的麻醉下，使用含有 heparin 的管從心臟採取 2 cc 的血液。這些血液樣本的外圍是使用鋁箔紙包著以防止曝光並保存在冰塊中一直到測定 CL 為止，一般而言都在 2 小時之內完成測量。又另外 1 cc 的血液放入含有 EDTA 的管中用來測量白血球（WBC）的數目。在使用 10 cc 冰食鹽水從心臟灌流之後，分別剝離前額葉皮質（frontal cortex），杏仁核（amygdala）和海馬（hippocampus）區域腦組織並放入 pH 7.4 的 Tri-HCl 溶液紙中磨成均質液，這些均質液在 3000 rpm 下離心 15 分鐘，然後取出懸浮液用 MDA 的方法來決定脂質過氧化物的濃度，方法如同上述。

測量 luminol-CL 的方法是和先前研究的方法相似（Sun et al. 1998）。簡單的說就是將 0.2 cc 的全血和 0.1 cc 的緩衝溶液（PBS，pH 7.4）混合後放入一個特製的腔室中（Model CLD-110，Tohoku Electronic Indust. Co.）。化學發光是使用化學發光系統（Tohoku Electronic Industrial Co.，Sendai，Japan）在暗室中測量。這個系統包含一個 photon detector（Model CLD-110），一個 chemiluminescence counter（Model CLC-10），一個 water circulation（Model CH-201）和一個 32-bit IBM 個人電腦。200 秒之後，1.0 ml 25 mM luminol 的 PBS 溶液被注射入不鏽鋼的密室中，而這些血液樣本的仍繼續被測量。600 秒之後，加入 0.2 ml 的 Zymosan-A，而這些血液樣本的發光

連續測量至 1020 秒為止。總發光值的計算是曲線下的總面積減去底部而成的。CL 值除去血液中白血球數目，最後表示是以 1000 WBC 的發光值表示。

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

五、統計分析

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

參、結 果

實驗 A

一、KA 誘發老鼠大腦皮質脂質過氧化物濃度變化的時間經過

我們的結果顯示於老鼠腹腔注射 KA 後它們大腦皮質的 frontal cortex，amygdala 和 hippoampus 區域的脂質过氧化物的濃度都增加，而這些增加是在 KA 注射後的 1 小時達到頂峰，然後下降。另外，大腦皮質的這三個區域的增加是平行（圖一）。

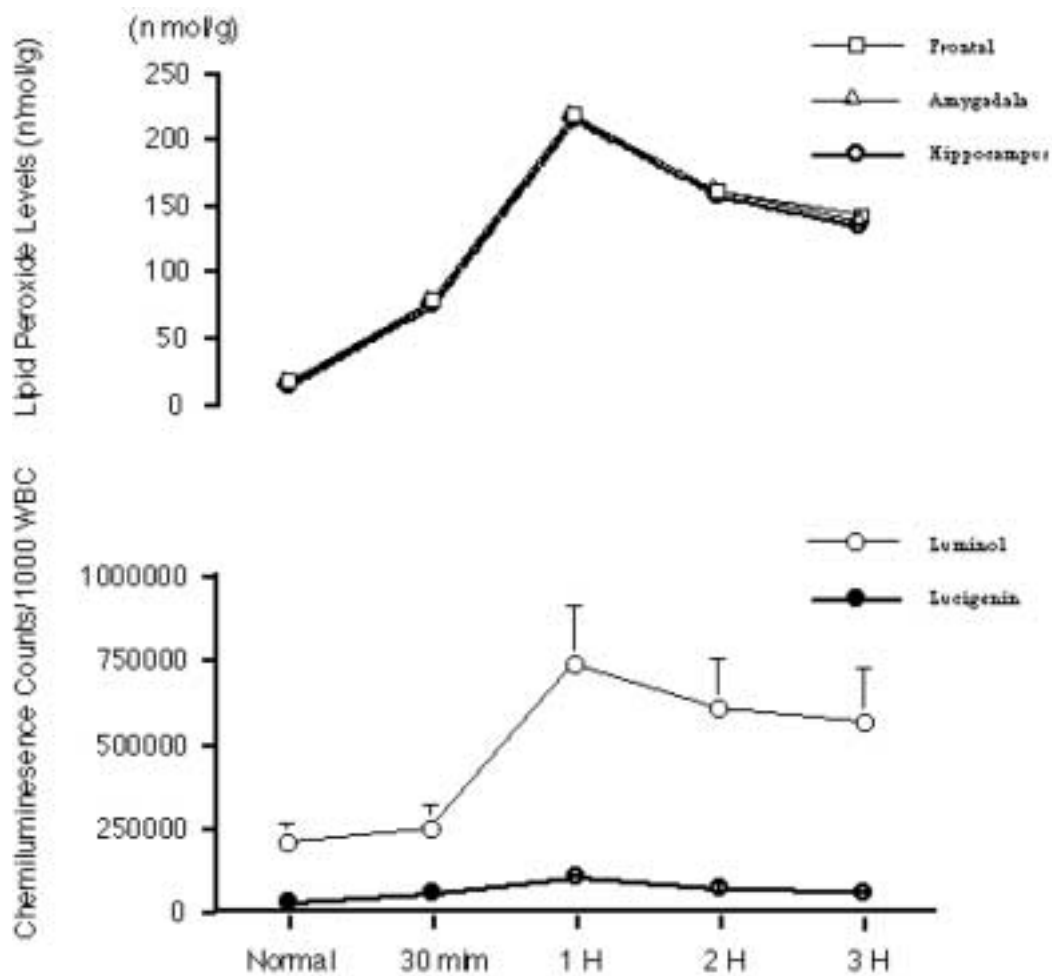
二、KA 誘發老鼠末梢血液 luminol-CL 和 lucigenin-C 數目的時間經過

我們的結果顯示於老鼠腹腔注射 KA 後它們末梢血液的 luminol-CL 和 lucigenin-C 數目都增加，而這些數目的增加是在 KA 注射後的

1 小時達到頂峰，然後下降。另外，luminol-CL 和 lucigenin-C 數目的增加，兩者是平行（圖一）。

三、KA 誘發老鼠大腦皮質脂質過氧化作用和末梢血液 luminol-CL 和 lucigenin-C 數目的關係

我們的結果顯示 KA 誘發老鼠大腦皮質脂質過氧化濃度變化和末梢血液 luminol-CL 和 lucigenin-C 數目的變化是呈現正的關係（圖一）。



圖一、Kainic acid 誘發老鼠自由基變化的時間經過

老鼠於腹腔注射 Kainic acid (12mg/Kg) 後，它們大腦 frontal cortex, Amygdala 和 Hippocampus 區域的脂質過氧化物濃度，和末梢血液中的 Luminol chemiluminescence 和 lucigenin chemiluminescence counts 增加。三者都在 Kainic acid 注射後的 1 小時達到頂峰，然後下降，而且三者呈現正的關係。

Normal: 正常腦組織

Frontal: Frontal cortex

30 min: Kainic acid 注射後的 30 分鐘

Amygdala: Amygdala region

1H: Kainic acid 注射後的 1 小時

Hippocampus: Hippocampus region

2H: Kainic acid 注射後的 2 小時

Luminol: Luminol chemiluminescence

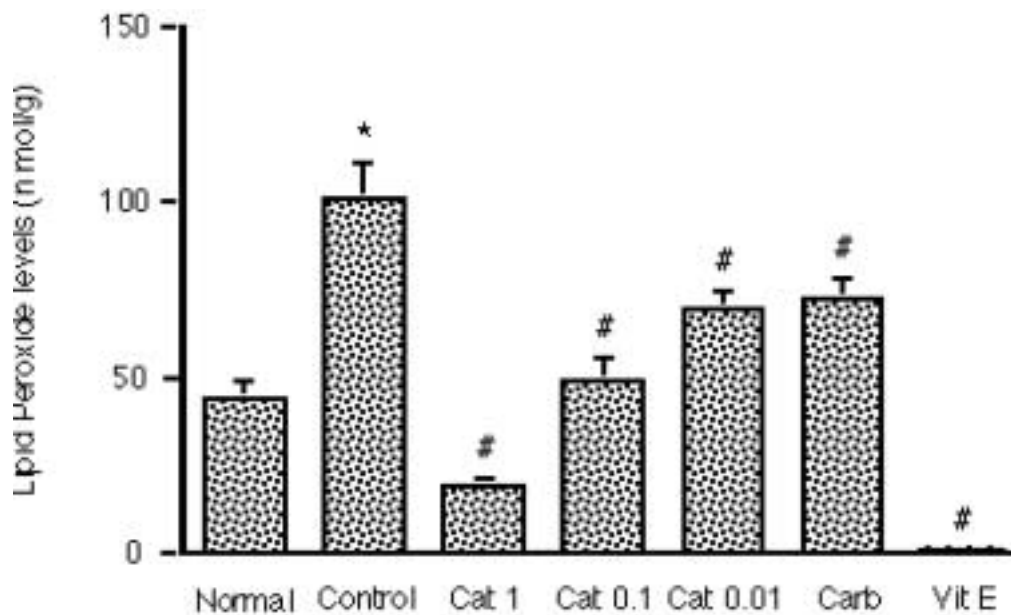
3H: Kainic acid 注射後的 3 小時

Lucigenin: lucigenin chemiluminescence

實驗 B

一、Catechin 在體外對 KA 誘發脂質過氧化作用的效應

在體外 SD 老鼠的腦組織在加入 KA 後，腦組織的過氧化脂質濃度增加，這些增加能被 catechin 抑制 ($P < 0.001$ ，圖二)。



圖二、在體外 catechin 抗脂質過氧化作用。Kainic acid 增加老鼠大腦皮質脂質過氧化物濃度，但這些增加能被 catechin 所抑制。

Normal：正常腦組織

Control：大腦皮質加 kainic acid 120 μ g/ml

Cat 1：catechin 1mg/ml

Cat 0.1：catechin 100 μ g/ml

Cat 0.01：catechin 10 μ g/ml

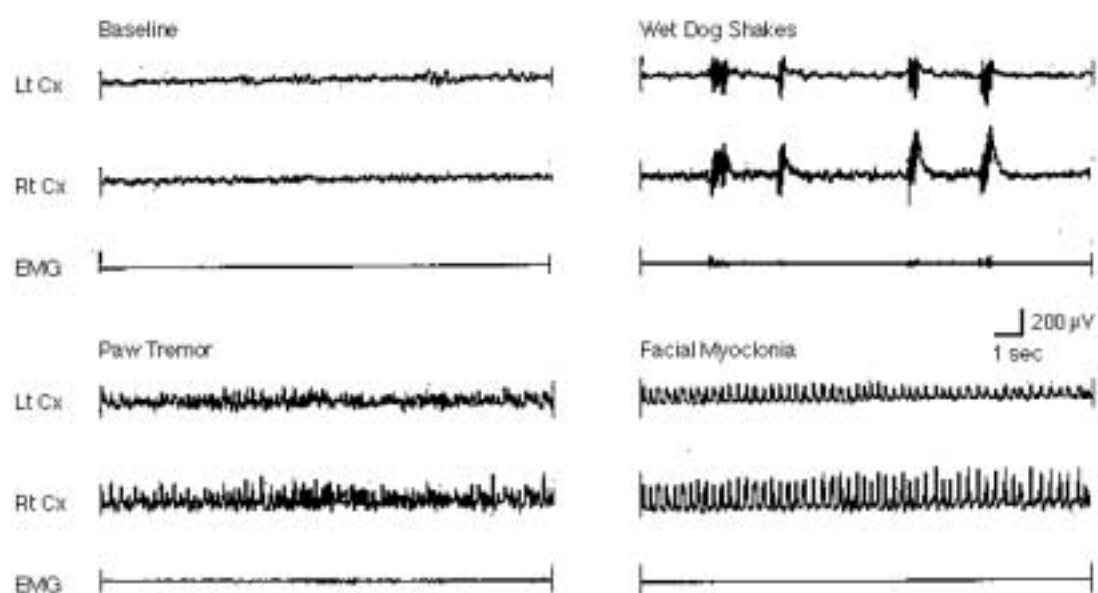
Carb：carbamazepine 20 μ g/ml

* $P < 0.001$ ，值與 normal 相比較

$P < 0.001$ ，值與 control 相比較

二、Catechin 對 KA 誘發癲癇發作老鼠的抗癲癇效應

18 隻 SD 老鼠在 KA (12 mg/kg) 腹腔注射後都誘發癲癇發作、它們的行為包括 wet dog shakes (WDS)，paw tremor 和 facial myoclonia，而且每一種行為都有它們特徵性的腦波活動（圖三）。我們的結果顯示 catechin 100 mg/kg 和 50 mg/kg 都能減少 WDS 的發作次數 ($P < 0.05$ ，圖四)。



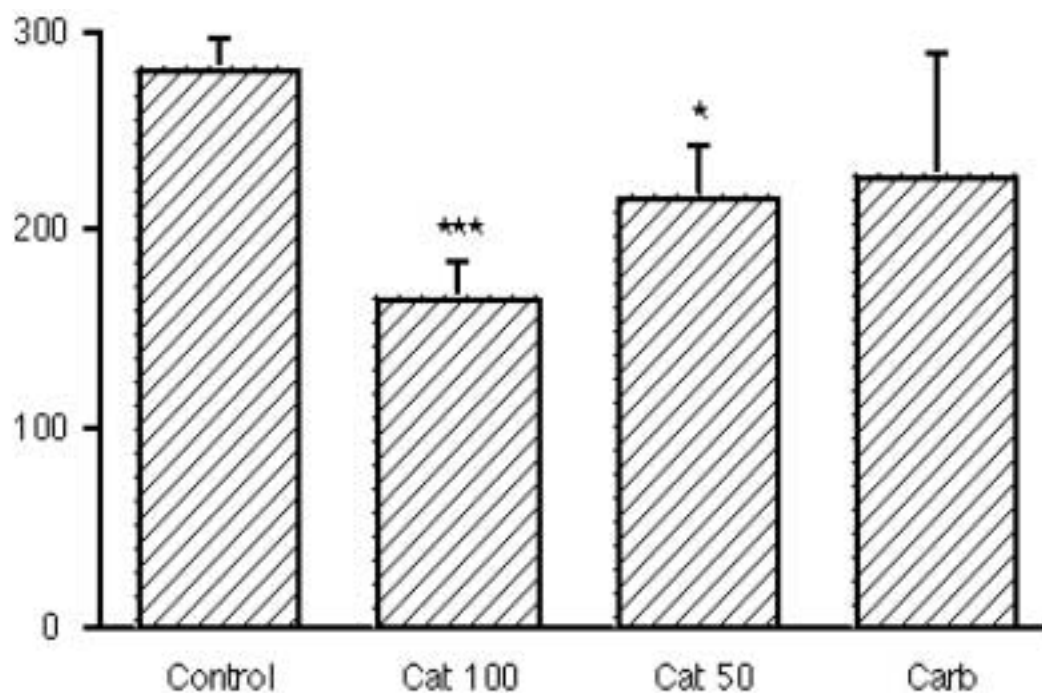
圖三、Kainic acid 誘發老鼠腦波和行為的變化。

Kainic acid 誘發老鼠發生癲癇發作，它的行為包括 Wet dog shakes，Paw Tremor 和 Facial Myoclonia，三種行為都有它們特徵性的腦波。

Lt Cx：左側大腦皮質

Rt Cx：右側大腦皮質

EMG：頸部肌肉肌電圖



圖四、Catechin 的抗癲癇作用。

Catechin 100mg/Kg, 50mg/Kg 腹腔注射能減少 Kainic acid 誘發的 wet dog shakes, 但 carbamazepine 則沒有相似的作用。

Control : Kainic acid 誘發 wet dog shakes

Cat 100 : Catechin 100mg/Kg

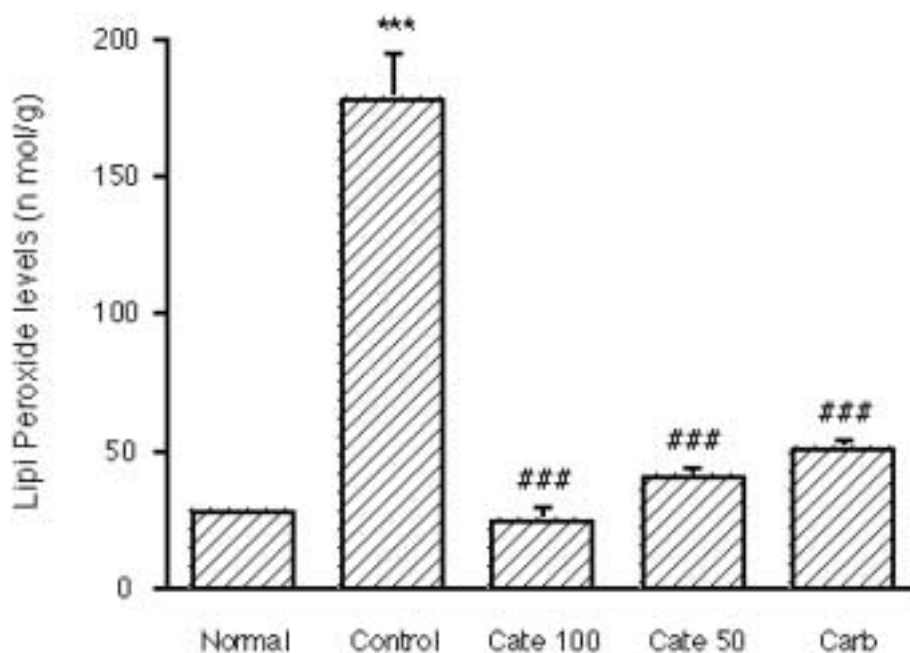
Cat 50 : Catechin 50mg/Kg

Carb : carbamazepine 20mg/Kg

* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ compared with the values of control

三、Catechin 在老鼠體內對 KA 誘發自由基的清除作用

我們的結果顯示老鼠在 KA 腹腔注射後，它們的大腦皮質的脂質過氧化物濃度增加，但這些增加能被 catechin 100 mg/kg，50 mg/kg 和 carbamazepine 20mg/kg 所抑制 ($P < 0.001$ ，圖五)。另外，KA 也能增加末梢血液中的 luminol-CL 和 lucigenin-CL 的數目，而 catechin 100 mg/kg 和 50 mg/kg 能降低 luminol-CL 的數目 ($P < 0.05$ ，圖六)，但對 lucigenin-CL 則沒有作用。



圖五、Catechin 的抗脂質過氧化作用

Catechin 100mg/Kg，50mg/Kg 和 carbamepine 20mg/Kg 則減少 Kainic acid 誘發大腦皮質過氧脂質濃度的增加。

Normal：正常腦組織

Control：Kainic acid 誘發脂質過氧化物濃度的增加

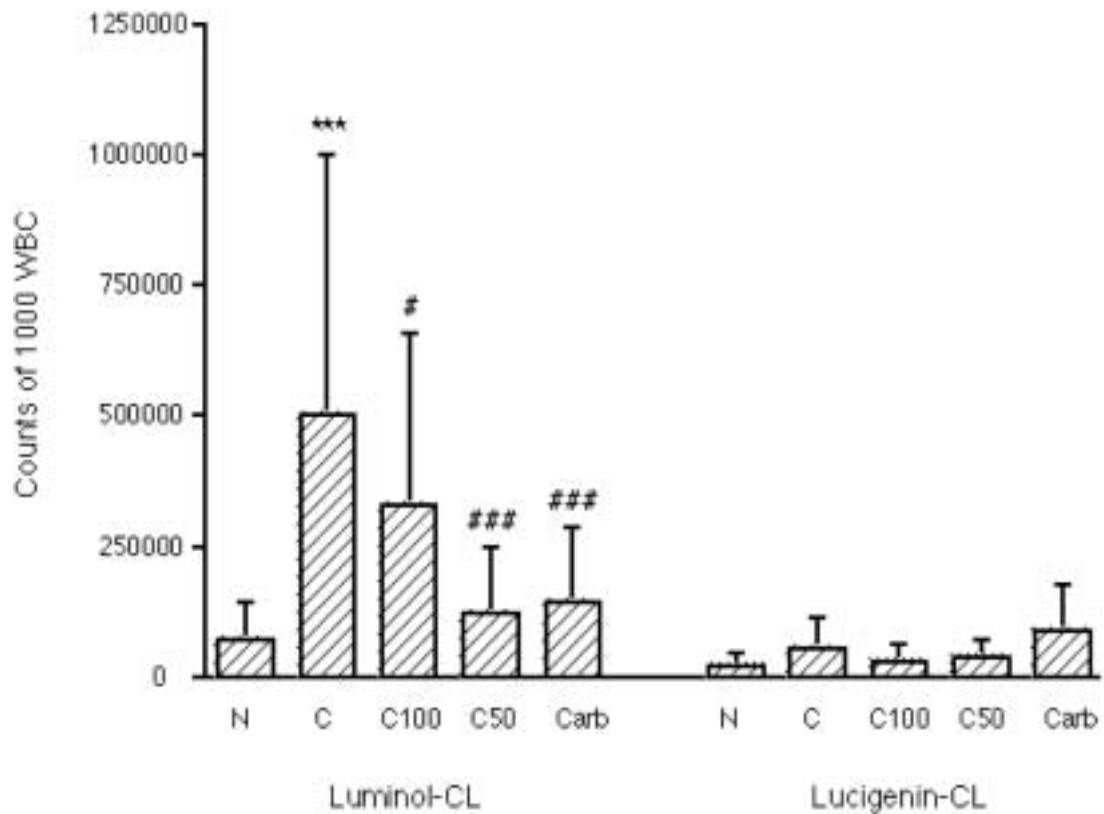
Cate 100：catechin 100mg/Kg

Cate 50：catechin 50mg/Kg

Carb：carbamepine 20mg/Kg

*** $P < 0.001$ compared with the values of normal

$P < 0.001$ compared with the values of normal



圖六、Catechin 對氧化自由基的清除作用

Kainic acid 能誘發老鼠末稍血液 Luminol-chemiluminensce counts 的增加，但這些增加能被 Catechin 100mg/Kg，50mg/Kg 和 carbamepinen 所抑制。

N：正常老鼠的末稍血液

C：Kainic acid (12mg/Kg)

C100：Catechin 100mg/Kg

C50：Catechin 50mg/Kg

Carb：carbamepinen 20mg/Kg

***P<0.001 compared with the values of N

P<0.05，### P<0.001 compared with the values of C

肆、討 論

我們的結果顯示 KA (12 mg/kg) 於老鼠的腹腔注射誘發大腦皮質的 frontal cortex, amygdala 和 hippocampus 三區域的過氧化脂質的濃度, 及末梢血液中的 luminol-CL 和 lucigenin-CL 的數目都在 KA 注射後的一小時達到頂峰。我們先前的觀察發現動物的行為 wet dog shakes 的發作頻率是在 KA 投予後的一小時達到頂峰 (Hsieh et al. 1999), 因此 KA 誘發 wet dog shakes, 脂質過氧化物濃度和氧化自由基的變化, 三者之間是呈現正的關係。

Catechin 能減少 KA 所誘發的 wet dog shakes, 這些說明 catechin 有抗癲癇的作用, 而它的這些作用是否和抗氧化劑 vitamin E 一般有待更進一步的探討。Catechin 無論是在體內或是在體外都能降低 KA 所誘發的脂質過氧化作用, 這些結果和先前的一些研究發現一致 (Morel et al. 1993; Yoneda et al. 1995)。另外, 我們的結果顯示 catechin 能降低 KA 所誘發的 luminol-CL 和 lucigenin-CL 數目, 這些結果說明 catechin 有清除自由基的作用, 由於 luminol-CL counts 代表反映著氧種的一個敏感性的指標, 包括 superoxide anion, hydroxyl radicals, hydrogen peroxide 和 hypochlorous acid (Sun et al. 1996; Kaever et al. 1992)。Lucigenin-CL counts 代表著 superoxide anion, 它能被白血球的 NADP (H) oxidase 所產生 (Lu et al. 1996; Chen et al. 1997)。

伍、結 論

我們的結論是 catechin 有抗癲癇的作用, 它的抗癲癇機轉可能部分來自於它對自由基的清除作用, 至於如綠茶等含有 catechin 的中藥是否可以用來做為抗癲癇的輔助劑有待進一步的探討。

陸、參考資料

1. Ching-Liang Hsieh, Ming-Fen Chen, Tsai-Chung Li, Shih-Chang Li, Nou-Yin Tang, Ching-Tou Hsieh, Chu-Zong Pon, Jaung-Geng Li. Anticonvulsant effect of *Uncaria rhynchophylla* (Miq) Jack. In rats with kainic acid-induced epileptic seizure. *Amer. J. Chin. Med.* 27(2): 257-264, 1999.
2. Ching-Liang Hsieh, Nou-Yin Tang, Su-Yin Chiang, Ching-Tou Hsieh, Jaung-Geng Lin. Anticonvulsive and free radical scavenging actions of two herbs, *Uncaria Rhynchophylla* (Miq) Jack and *Gastrodia Elata* BL., in kainic acid-treated rats. *Life Sci.* 65(20): 2071-2082, 1999.
3. Jay J. Rubin and L. James Willmore. Prevention of iron-induced epileptiform discharge in rats by treatment with antiperoxidants. *Exp. Neurol.* 67: 472-480, 1980.
4. L. James Willmore and Jay J. Rubin. Antiperoxidant pretreatment and iron-induced epileptiform discharges in the rat: EEG and histopathologic studies. *Neurology* 31: 63-69, 1981.
5. L. James Willmore and Jay J. Rubin. The effect of tocopherol and dimethyl sulfoxide on focal edema and lipid peroxidation induced by isocortical injection of ferrous chloride. *Brain Res.* 296: 389-392, 1984.
6. A.O. Ogunmekan and P. A. Hwang. A randomized, double-blind, placebo-controlled, clinical trial of D- α -tocopheryl acetate (Vitamin E), as add-on therapy, for epilepsy in children. *Epilepsy* 30(1): 84-89, 1989.
7. Ying-Tsun Ma, Feng-Lin Hsu, Shu-Jan J. Lan, Chieh-Fu Chen. *J. Chin. Chem. Society* 43: 77-81, 1996.
8. Anqi Zhang, Qin Yan Zhu, Yan Shun Luk, Ka yan Ho, Kwork Pui Fung, Zhen-Yu Chen. Inhibitory effects of Jasmine green tea epicatechin isomers on free radical-induced lysis of red blood cells. *Life Sci.* 61(4): 383-394, 1997.

9. Jui-Sheng Sun, Yang-Hwei Tsuang, I-Jen Chen, Wan-Ching Huang, Yi-Shiong Hang, Fung-Jou Lu. An ultra-weak chemiluminescence study on oxidative stress in rabbits following thermal injury. *Burns* 24: 225-231, 1998.
10. Ju-Sheng Sun, Yi-Shiong Hang, Iung-Huey Huang, Fung-Jou Lu. A simple chemiluminescence assay for detecting oxidative stress in ischemic limb injury. *Free Rad. Biol. & Med.* 20(1): 107-112, 1996.
11. Ming-Feng Chen, Lein-Ray Mo, Ruey-Chang Lin, Jenn-Yuan Kuo, Kuo-Kuan Chang, Chen Liao, Fung-Jou Lu. Increase of resting levels of superoxide anion in the whole blood of patients with decompensated liver cirrhosis. *Free Rad. Biol. & Med.* 23(4): 672-679, 1997.
12. Isabelle Morel, Gerard Lescoat, Pascale Cogrel, Odile Sergent, Nicole Padeloup, Pierre Brisot, Pierre Ciclard, Josiane Cillard. Antioxidant and iron-chelating activities of the flavonoids catechin, quercetin and diosmetin on iron-loaded rat hepatocyte culture. *Biochem. Pharmacol.* 45(1): 13-19, 1993.
13. Tadashi Yoneda, Midori Hiramatsu, Michiko Sakamoto, Keiichi Togasaki, Makiko Komatsu, Kiyomichi Yamaguchi. Antioxidant effects of β Catechin. *Biochem. & Molecular Biol. Intern.* 35(5): 995-1008, 1995.
14. V. Kaefer, J. T. Robitzsch, W. Stangel, L. Schleinkofer, K. Resch. Simultaneous detection of whole blood chemiluminescence in microtitre plates. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 30: 209-216, 1992.
15. F. J. Lu, J. T. Lin, H. P. Wang, W. C. Huang. A simple, sensitive, non-stimulated photon counting system for detection of superoxide anion in whole blood. *Experientia* 52: 141-144, 1996.