

# 科技部補助

## 大專學生研究計畫研究成果報告

\* \*\*\*\*\* \*  
\* 計畫 : 3,4-dimethoxyphenyl bicycle \*  
\* 名稱 : heptane-2-carboxamide 對抗小鼠癲癇作用之評估 \*  
\* \*\*\*\*\* \*

執行計畫學生： 葉耀駿

學生計畫編號： MOST 105-2815-C-040-031-B

研究期間： 105年07月01日至106年02月28日止，計8個月

指導教授： 黃相碩

處理方式： 本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

執行單位： 中山醫學大學醫學系藥理學科

中華民國

106年03月27日

## 二、研究計畫內容：

### (一)摘要

癲癇(epilepsy)，一種中樞神經異常放電的疾病，其典型的症狀為抽蓄，還會影響患者的生心理健康，截至目前尚未有完全根治的方法，僅能透過手術或藥物控制來減緩症狀的發作。以往癲癇的藥物治療機制以阻斷鈉離子通道為主，目前臨床或市售的藥物都有一定的副作用如胃腸不適、過敏性肝衰竭、頭痛、眼球震顫等，安全性並不高，因此我們希望可以找出一種副作用較小的新型化合物來治療癲癇的患者。近期研究發現，鉀離子通道活化劑在膜電位的維持上扮演一個重要的角色，近期鉀離子通道活化劑的開發提供了一項新的選擇。retigabine是已知鉀離子通道開啟劑，本計畫欲探討本實驗室以retigabine結構衍生合成的結構相似化合物 methyl {4-[(1-adamantylcarbonyl)amino]phenyl} carbamate (編號8692)、diethyl 1,4-phenylenebiscarbamate (編號5540)、ethyl {4-[(3-chlorobenzoyl)-amino]phenyl} carbamate (編號6696)、ethyl (2-methoxy-4-nitrophenyl)carbamate (編號5584)，透過幼鼠腦薄片突觸後電流實驗觀察是否具有相同開啟鉀離子通道的作用。研究結果顯示編號8692的藥物在海馬迴CA1神經元具有促進鉀離子電流的作用，值得進一步應用在抗癲癇動物實驗作探討，並釐清其相關作用機制。

### (二)研究動機與問題

生物體中帶電離子的不均勻分布於細胞內外，在生理學上有著非常重要的意義。由於極性與非極性的限制，離子欲通過細胞膜引發動作電位(action potential)必須透過離子通道蛋白(ion channel protein)的輔助進行(1)。離子通道蛋白根據其開關的調控可分為以下兩類：

- (A) 電位依賴型離子通道 (voltage-gated ion channel)：接受動作電位的變化週期而開關。
- (B) 配體依賴型離子通道 (ligand-gated ion channel)：與特定的分子 (GABA、glutamate etc.)結合調控開關。

在中樞神經系統(central nervous system)中，電位型與配體依賴型離子通道扮演一個很重要的角色(2)，突觸可塑性、記憶生成、感覺傳遞等都與其有密切的關聯。電位型離子通道需要電位的改變誘發開關；配體依賴型離子通道則需要配體的誘導開啟並透過移除酶的作用或配體自發性降解來關閉通道形成一個正常的訊號傳遞，兩者間的增進或抑制的作用形成一個平衡。一旦此平衡受到改變進而導致訊號異常持續或抑制，將形成一些生理上的疾病。

癲癇(epilepsy)，即為一種神經活性異常的疾病，包括局部性的單純性部分發作(simple partial seizure)或複雜性部分發作 (complex partial seizure)；全身性的強直-陣攣性發作 (tonic-clonic seizure，俗稱大發作)或失神性發作 (absence

seizure，俗稱小發作)。其典型的症狀為抽蓄、大小便失控、咬舌、意識障礙、言語困難、局部性麻痺、併發精神病等(3)，發作時雖然較少直接危及病患的生命安全，但嚴重時會影響病患的意識、四肢活動，甚至是智能發展，對社會福祉及個人心理上造成諸多負面的影響。

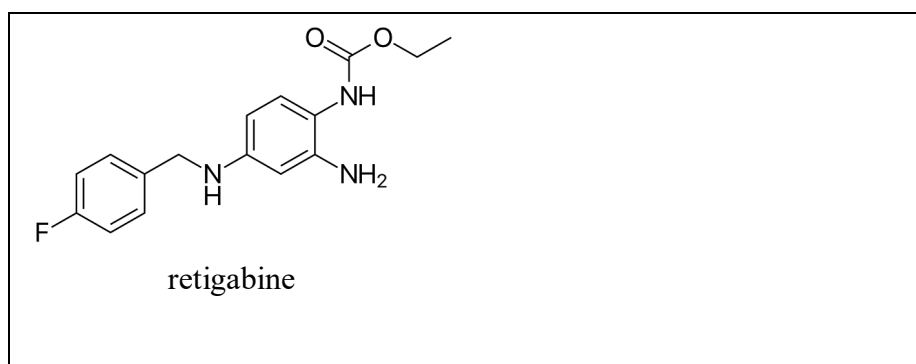
癲癇非單一症狀，可能是由很多不同種外在因素或自發性所引起的，儘管近期推斷癲癇的病理成因可能為遺傳、創傷或代謝上的問題，但大部分的病例成因仍未知，因此當前尚未找出完全根治的方法(4)，主要的治療方式僅針對減緩症狀為主。目前針對癲癇的治療藥物主要是鈉離子通道抑制劑，藉此來抑制癲癇的現象。用於治療強直-陣攣性發作(大發作)的常見藥物有 carbamazepine、dilatant、phenytoin、phenobarbital 等。但是這些藥大部分都有一定的副作用如：胃腸不適、過敏性肝衰竭、頭痛、複視、運動失調、眼球震顫、心律不整、昏睡、產生耐藥性等。上述的藥物，都不可避免的產生影響患者生活的副作用，說明了這些藥物在臨床上並非最理想的處方，因此找出新型的藥物便是我們致力的方向。

近 10 年來，電位依賴型鉀離子通道活化劑的開發提供了我們新的選擇。研究發現鉀離子通道對肌肉收縮和膜電位的維持相當重要(5)，而 ML213 和 retigabine 為目前已知的鉀離子通道的活化劑 (6)，其中 retigabine 更是被認定可以達到抗攣和止痛的效果(7)。我們利用 retigabine 的分子結構中的特定結構苯胺甲酸酯 (phenyl carbamate) 作為模板，開發出 4 種具有相似結構的化合物，試圖尋找對於中樞神經系統中的海馬迴 CA1 神經元鉀離子通道有促進作用的官能基。

實驗初步以 10  $\mu$ M 的濃度測試以下 4 種新型化合物(Fig 1.)

- (A) methyl {4-[(1-adamantylcarbonyl)amino]phenyl} carbamate (編號 8692)
- (B) diethyl 1,4-phenylenebiscarbamate (編號 5540)
- (C) ethyl {4-[(3-chlorobenzoyl)amino]phenyl} carbamate (編號 6696)
- (D) ethyl (2-methoxy-4-nitrophenyl)carbamate (編號 5584)

以有統計上顯著差異的增加鉀離子通道電流為篩選目標，使用腦薄片全細胞鉗定技術(brain slice whole cell patch clamp)給予電壓刺激測定對應電流來探討上述 4 種藥物，同時也希望釐清當中的作用機制和有效劑量。



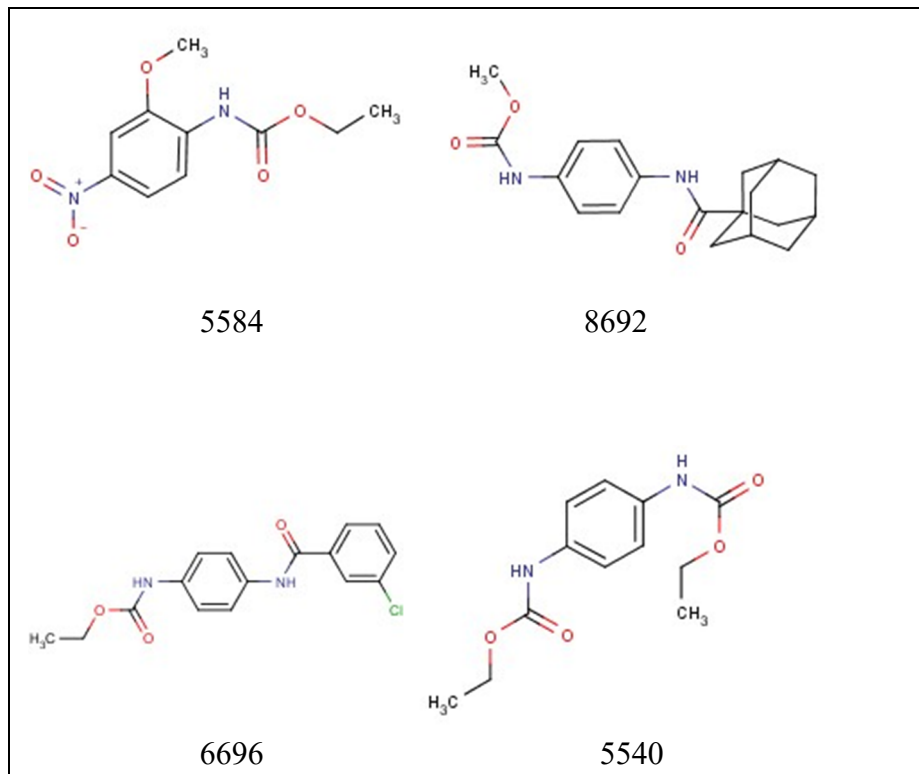
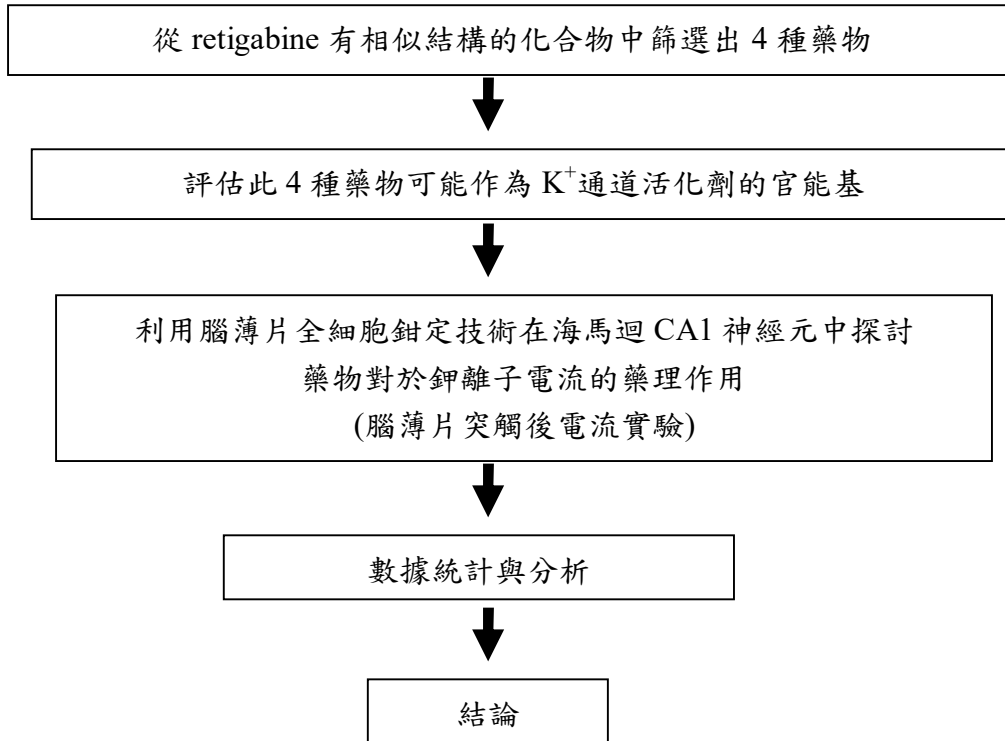


Figure 1. retigabine 及其結構衍生物

### 研究流程大綱



### (三)文獻回顧與探討

在藥物設計邏輯上，以往治療神經異常放電所引發的疾病，如癲癇、神經性疼痛(neuropathic pain)，都是使用電位依賴型鈉離子通道的抑制劑(8)、電位依賴型鈣離子通道調控劑(9)及神經傳導物質 GABA 的抑制劑(10)。其中，已知藥物 lidocaine 是以鈉離子通道抑制做為治療神經性疼痛的藥物(11)。鈉離子通道的作用在控制細胞興奮性及幾項異常的病理，像是心律不整、癲癇、痙攣等，因此已找出它對治療慢性神經痛的潛力。而 lidocaine 的發現，已被廣泛運用在抗心律不整、局部麻醉等，藉由使鈉離子通道失去活性為治療方針。又特定的鈉離子次型通道是痛覺和神經性疼痛的關鍵因素，這表明未來很有可能以鈉通道抑制劑具有較低的毒性和較強的功效來治療神經性疼痛(12)。

而最近的研究指出 KCNQ 鉀離子通道蛋白家族活化劑在治療神經興奮性疾病是有效果的，且 Kv channel(電位依賴型鉀離子通道)對調節細胞膜的興奮，有相當重要的影響(13)。鉀離子通道在肌肉的收縮放鬆及維持靜止膜電位有一定的相關性(14)。目前已被發現的鉀離子通道活化劑 flupirtine 和 retigabine，確認可達到抗痙攣及止痛的成效(13,15,16)。而 ML213 則發現是屬於電位依賴型鉀離子通道 KCNQ2 和 KCNQ4 的活化劑(6)。且在使用了 ML213 後，小鼠的胸主動脈、腎動脈及腸繫膜動脈皆會有舒張的表現(17)。由以上研究出的藥物的作用性，我們可以試著去尋找對於中樞神經鉀離子通道有作用的鉀離子通道活化劑。因此利用 retigabine 的分子結構中的特定結構苯胺甲酸酯 (phenyl carbamate)作為模板，尋找結構相似物，利用幼鼠腦薄片電流實驗篩選設計出的化合物，研究化合物及其相關官能基的活性。

實驗技術方面，本實驗室對腦薄片全細胞鉗定技術實驗已有一年半經驗累積可供參考，本計畫所選擇的腦區為海馬迴 CA1 神經元，是目前研究最為詳盡的腦區之一且易於建立，因此本計畫便選擇該腦區進行初步探討，近年來也有許多相關的研究文獻可觀摩學習再精進(18)，成功篩選的藥物將會進一步測試抗癲癇動物實驗(19)，透過藥物 Pentylentetrazole 誘導癲癇發作的小鼠模組進行更多相關的藥理活性分析，與神經電生理實驗的數據相輔相成，期望探索能對抗癲癇的重要官能基。無論是開發新型藥物或是舊藥新用我們都將會加以詳細且謹慎的探討，秉持著以研究最合適臨床第一線用藥為宗旨的精神。

### (四)研究方法及步驟

#### 幼鼠腦薄片突觸後電流實驗

##### 實驗動物飼養：

研究中照顧及使用實驗動物皆遵照1996年美國實驗動物學會發表的實驗飼養標準(Guide for The Care and Use of Laboratory Animals, National Academies

Press, 1996)。實驗動物由樂斯科生技股份有限公司所購得，品種為遠交系SD幼鼠，取P(postnatal day)7~20做為研究材料，飼養動物的場所溫度控制在 $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ ，溼度為 $60\pm 10\%$ ，並維持各十二小時之日夜光照週期，實驗動物允許自由的進食及飲水。

腦薄片製備：

取出幼鼠一隻保定後用斷頭台在未麻醉的狀況斷頸犧牲取其頭部，完畢後迅速剪開頭皮並將腦殼挑開，再用鑷子將腦殼完全清除，接著使用手術刀將小腦以後與大腦額葉前 $1/3$ 切掉將大腦鏟出。

鏟出的大腦迅速用快乾膠垂直固定在切片機(D.S.K/DTK-1000)的載物台上，然後將冰沙狀態的切片用溶液(cutting solution):NaCl 87, KCl 2.5,  $\text{NaHCO}_3$  25,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  1.25,  $\text{CaCl}_2$  0.5,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  7, D-glucose 25, sucrose 75(mM)倒入切片機的chamber中並充著含 $95\%\text{O}_2$ 與 $5\%\text{CO}_2$ 的混合氣進行切片，切片的速度與頻率分別約 $0.16\text{mm/s}$ 與 $40\text{Hz}$ ，厚度 $200\mu\text{m}$ 。切片切下後移至含濾網的燒杯中，杯內裝有人工腦脊液(artificial CSF) :NaCl 125, KCl 2.5,  $\text{NaHCO}_3$  25,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  1.25,  $\text{CaCl}_2$  2,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  1, D-glucose 25(mM)，燒杯持續充氧並讓薄片在 $35^{\circ}\text{C}$ 下靜置1個小時讓受損的細胞修復。

腦薄片藥物投予與電生理記錄：

將靜置好的切片放入 recording chamber (體積 $< 0.5\text{ml}$ )中，並且持續灌流 aCSF，放入薄片固定器將其固定在 chamber 中央且持續充氧，使用顯微鏡(Nikon Eclipse FN1)DIC 鏡頭觀察操作，架設地線消除背景值，並選用玻璃微管(WPI, OD 2.0 mm, World Precision Instruments, Inc., Sarasota, FL)透過水平拉針器(P-97, Sutter Instrument)製備微小玻璃針，選定下針位置後，將填充著內液: KCl 140,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  4, HEPS 10,  $\text{Na}_2$  phosphocreatine 10, Mg-ATP 4,  $\text{Na}_2$ -GTP 0.3, EGTA 10 (mM)的微小玻璃電極(電阻約 $4\sim 7\text{M}\Omega$ )吸破突觸後神經細胞進行記錄。

藥物投予為神經元穩定後以胞外給予藥物的方式15分鐘在灌流系統中的 aCSF，wash則是灌流新鮮的aCSF將藥物洗掉。記錄過程利用clampex軟體設定 protocol 給予對應電壓刺激神經記錄其電流值，經由高阻抗放大器(Axon instruments MultiClamp 700B)將訊號放大，再通過類比數位訊號轉換器(Axon instruments digidata 1440A)轉換，最後搭配Clampfit 10.0軟體觀察記錄及儲存至電腦中。

數據分析：

使用Clampfit 10.0軟體觀察記錄並將其量化轉用Sigma Plot 10.0繪製圖型，學生t檢定(Student's t-test)與配對t檢定(paired t-test)用以計算投予藥物前後的電流值在統計上的顯著差異，data以平均 $\pm$ S.E.M表示，n代表樣本數， $P < 0.05$ 表示有統計上顯著差異。

## (五)實驗結果

本計畫所應用的電生理 Protocol 為 Total current 如 Fig 1, 起初將神經元鉗定在-70mV 的電位, 爾後在 70ms 內從-80mV 開始以 10mV 為間隔刺激一次, 最高至 20 mV, 後在將神經元鉗定回-70mV。

### 1. Control 組

實驗首先觀察 Control 組, 由於藥物的溶劑為 0.06%(v/v)的 DMSO, 因此 Control 組投予 0.06%(v/v)的 DMSO, 觀察溶劑是否會對神經元有所影響, 結果如 Fig 2, 將其電流值量化可得 Fig 3, 可以發現投予溶劑十五分鐘對於海馬迴 CA1 神經元的鉀離子通道並無統計上的顯著差異(n=3)。

### 2. 投予藥物組(10 $\mu$ M)

實驗接著依序觀察本實驗室開發編號 5584、5540、6696、8692 的 4 種藥物對於海馬迴 CA1 神經元的鉀離子通道之作用。實驗首先是投予 5584 (10  $\mu$ M), 結果如 Fig 4, 將其電流值量化可得 Fig 5, 可以發現投予 5584 (10  $\mu$ M)十五分鐘對於海馬迴 CA1 神經元的鉀離子通道雖無統計上的顯著差異, 但可看出有抑制的趨勢(n=3)。

實驗其次是投予 5540 (10  $\mu$ M), 結果如 Fig 6, 將其電流值量化可得 Fig 7, 可以發現投予 5540 (10  $\mu$ M)十五分鐘對於海馬迴 CA1 神經元的鉀離子通道亦無統計上的顯著差異, 但可看出有抑制的趨勢(n=3)。

實驗接著是投予 6696 (10  $\mu$ M), 結果如 Fig 8, 將其電流值量化可得 Fig 9, 可以發現投予 6696 (10  $\mu$ M)十五分鐘對於海馬迴 CA1 神經元的鉀離子通道亦無統計上的顯著差異, 但可看出有抑制的趨勢(n=4)。

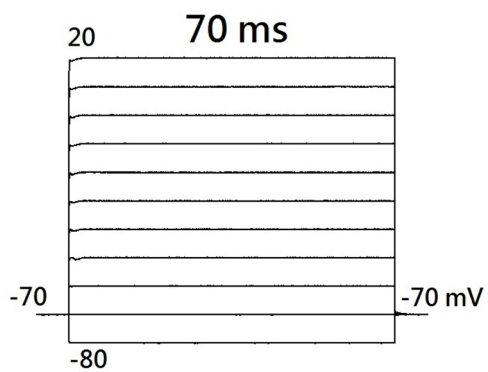
實驗最後投予 8692 (10  $\mu$ M), 結果如 Fig 10, 將其電流值量化可得 Fig 11, 可以發現投予 8692 (10  $\mu$ M)十五分鐘對於海馬迴 CA1 神經元的鉀離子通道出現統計上的顯著差異, 更可從 Fig 13.的重疊圖觀察電流有微幅的上升(Protocol 如 Fig 12.), 我們可以研判有促進鉀電流的趨勢(n=3)。

### 3. 投予藥物 8692 高濃度(30 $\mu$ M)

由上述的實驗結果可以發現, 5584、5540、6696此3種藥物對於幼鼠海馬迴 CA1神經元的鉀電流均有抑制的作用; 然而8692對於鉀電流有達到統計上顯著差異的促進, 因此我們針對8692提高濃度到30  $\mu$ M再作測試, 如Fig 14, 將其電流值量化可得Fig 15.(n=3), 重疊圖如Fig 17. (Protocol如Fig 16.), 我們可以確定8692在海馬迴CA1神經元中是有促進鉀離子電流的藥理作用, 值得進一步探討其相關

機轉，並且應用在抗癲癇動物實驗上。

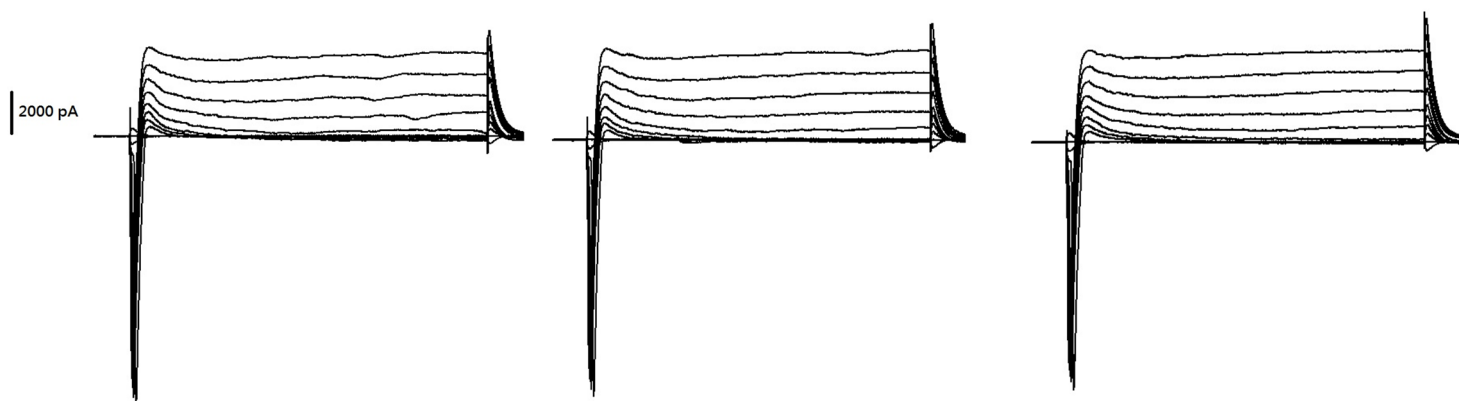
(六)實驗結果圖



A  
Control

B  
DMSO (0.06%)

C  
Wash





### Control -- DMSO (0.06%)

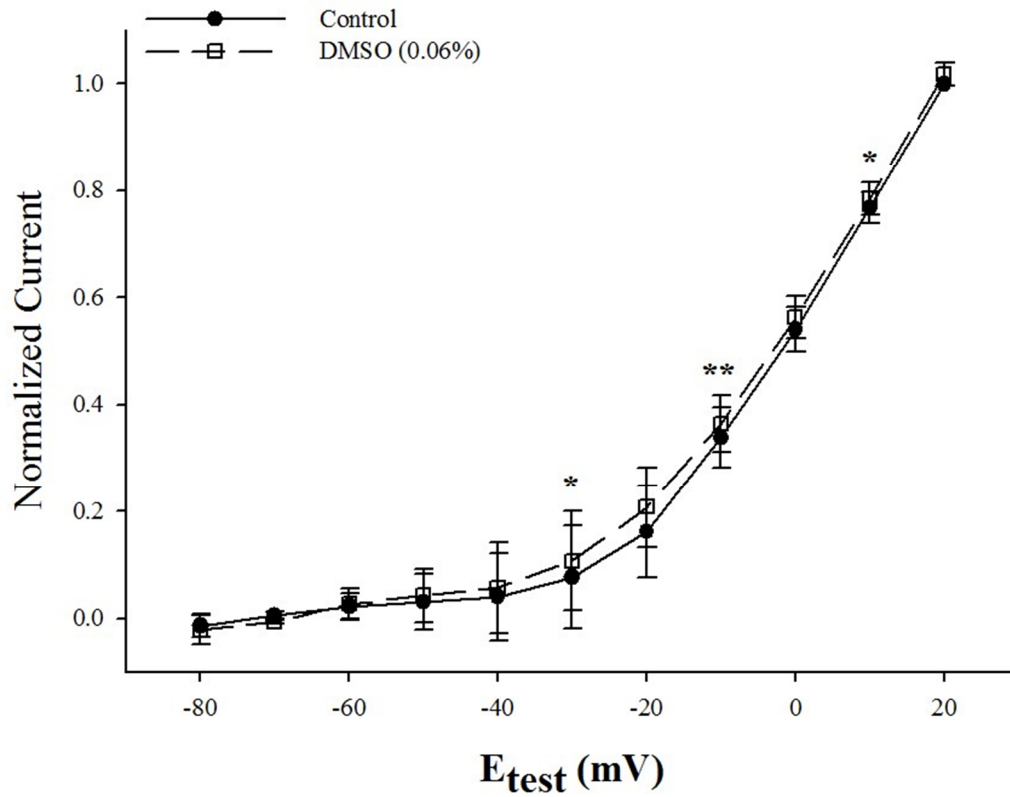


Figure 3. 電流電壓標準化統計圖，投予DMSO (0.06%)十五分鐘與加藥前(Control)相比並無太大顯著差異(\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs. Control)。

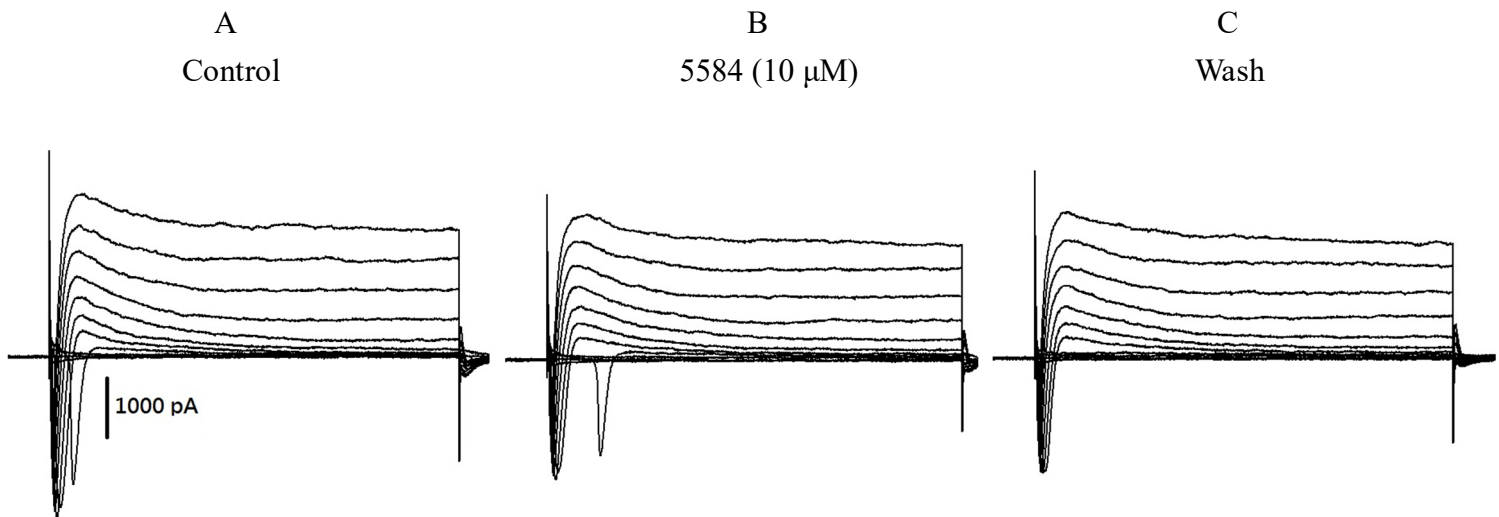


Figure 4. 5584 (10  $\mu$ M)對幼鼠海馬迴 CA1 神經元的鉀離子通道之作用。

## Control -- 5584 (10 $\mu$ M)

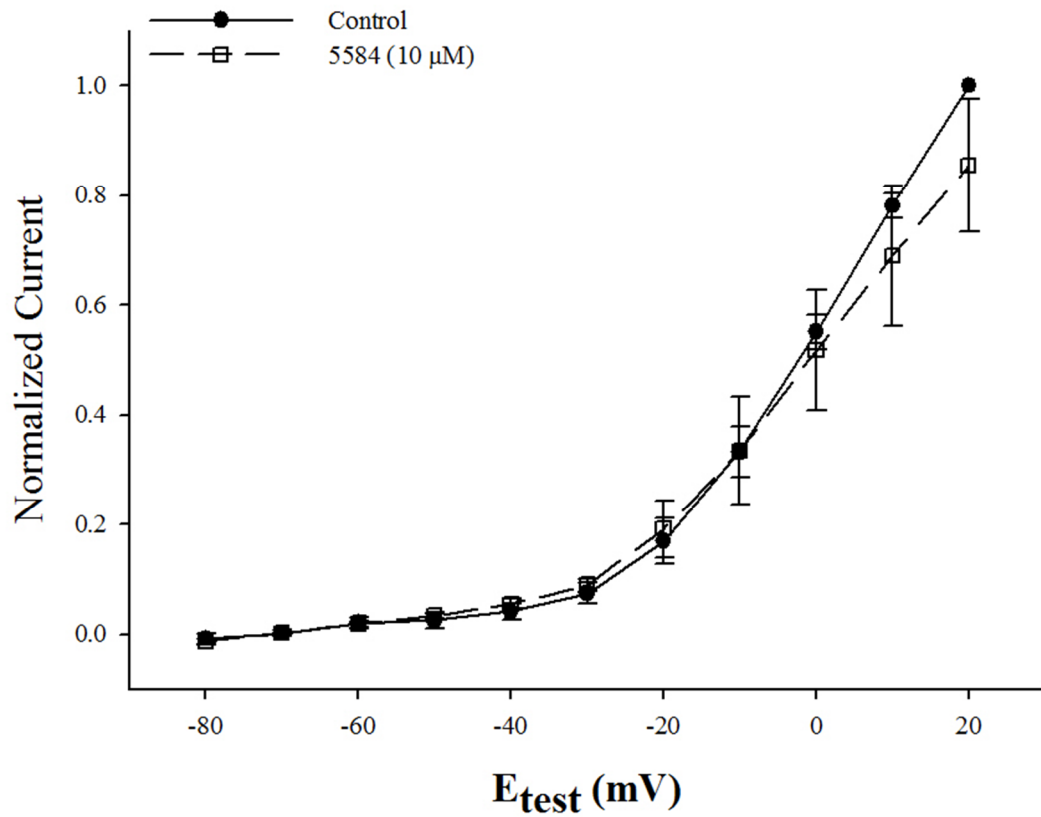


Figure 5. 電流電壓標準化統計圖，投予 5584 (10  $\mu$ M)十五分鐘與加藥前(Control)相比雖無顯著差異，但其趨勢是抑制鉀電流的(\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs. Control)。

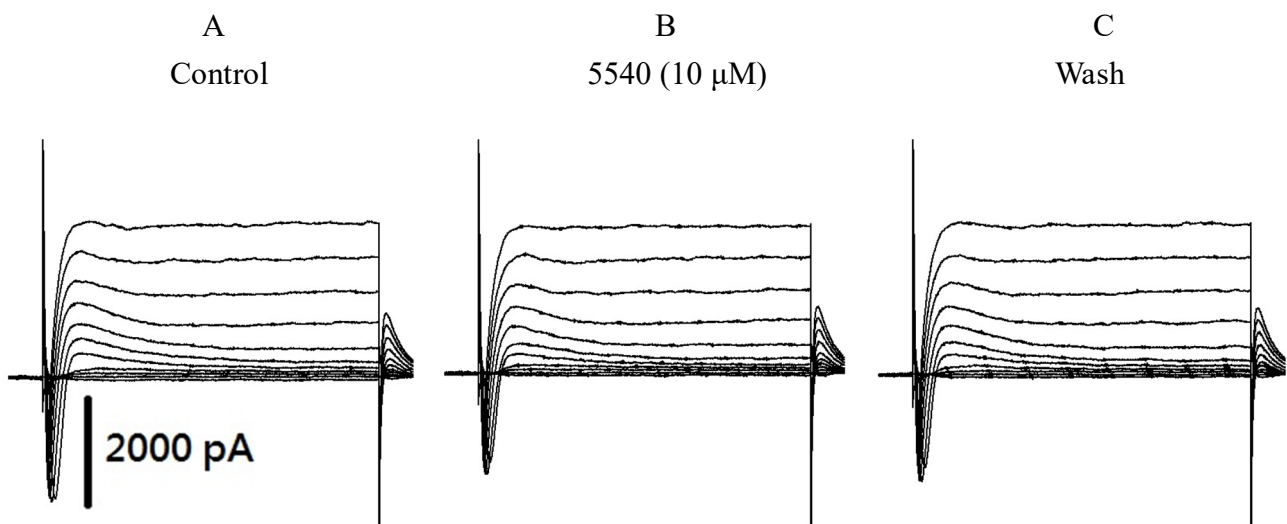


Figure 6. 5540 (10  $\mu$ M)對幼鼠海馬迴 CA1 神經元的鉀離子通道之作用。

## Control -- 5540 (10 $\mu$ M)

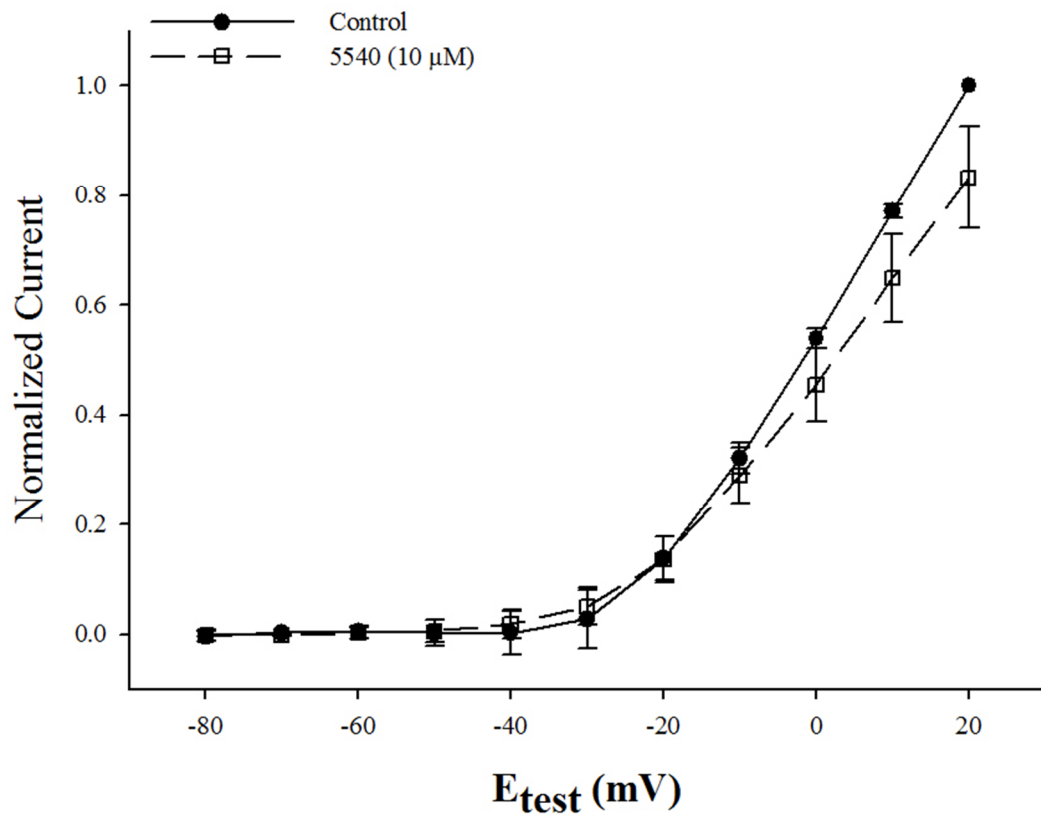


Figure 7. 電流電壓標準化統計圖，投予 5540 (10  $\mu$ M)十五分鐘與加藥前(Control)相比亦無顯著差異，但其趨勢是抑制鉀電流的(\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs. Control)。

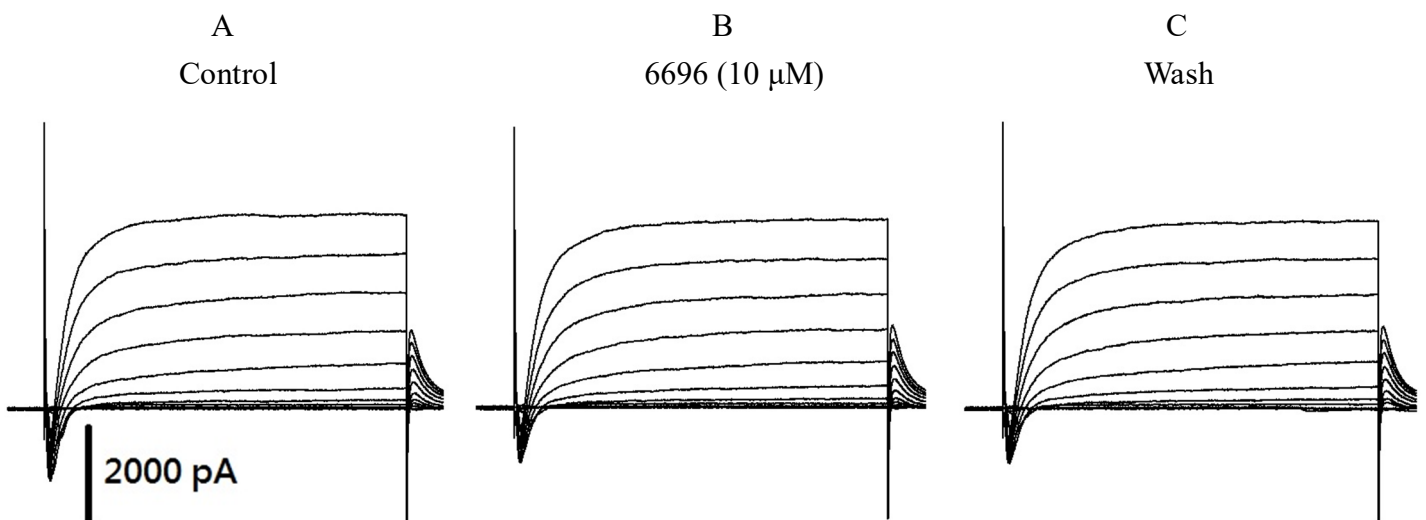


Figure 8. 6696 (10  $\mu$ M)對幼鼠海馬迴 CA1 神經元的鉀離子通道之作用。

## Control -- 6696 (10 $\mu$ M)

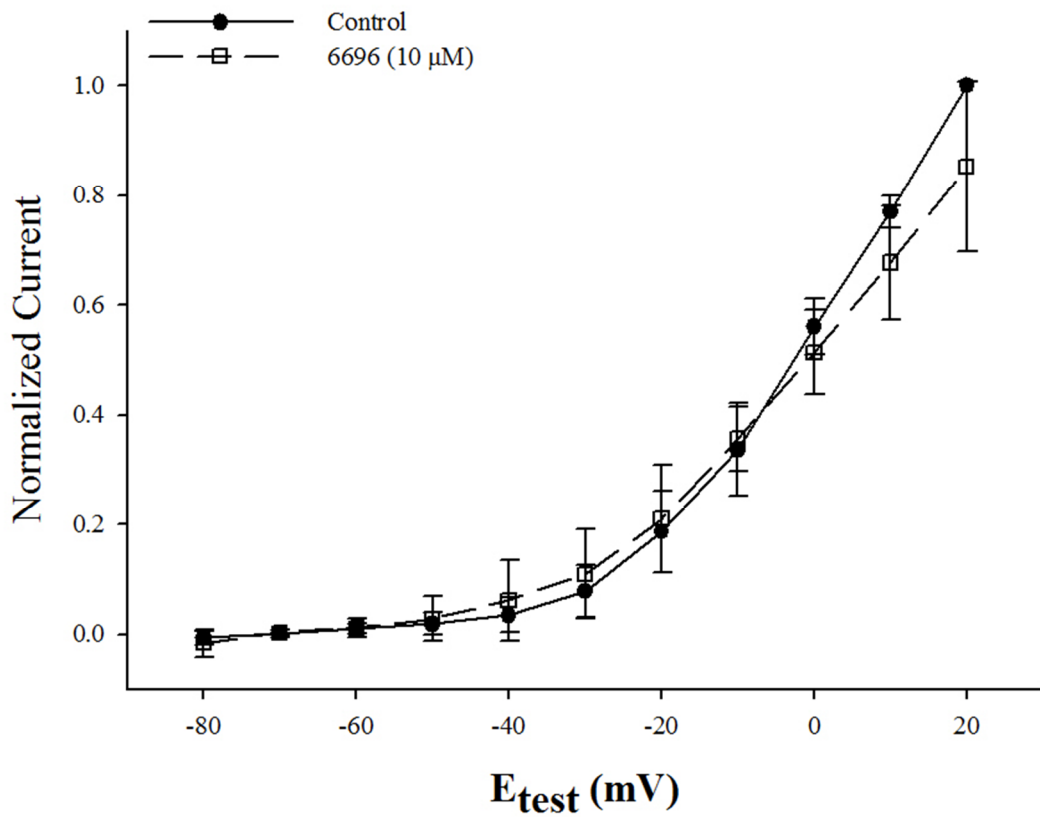


Figure 9. 電流電壓標準化統計圖，投予 6696 (10  $\mu$ M)十五分鐘與加藥前(Control)相比亦無顯著差異，但其趨勢是抑制鉀電流的(\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs. Control)。

A  
Control

B  
8692 (10  $\mu$ M)

C  
Wash

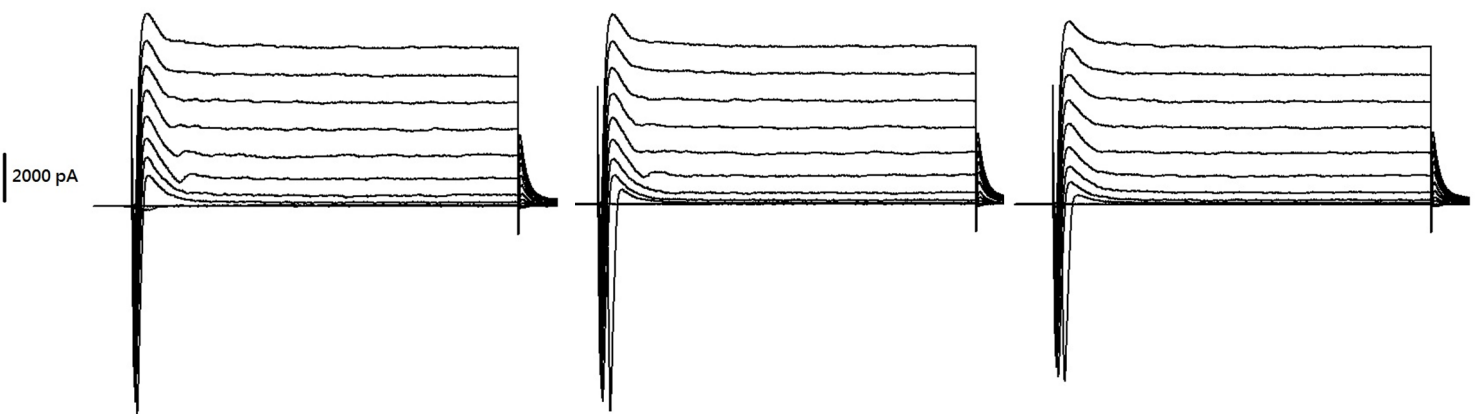


Figure 10. 8692 (10  $\mu$ M)對幼鼠海馬迴 CA1 神經元的鉀離子通道之作用。

## Control -- 8692 (10 $\mu$ M)

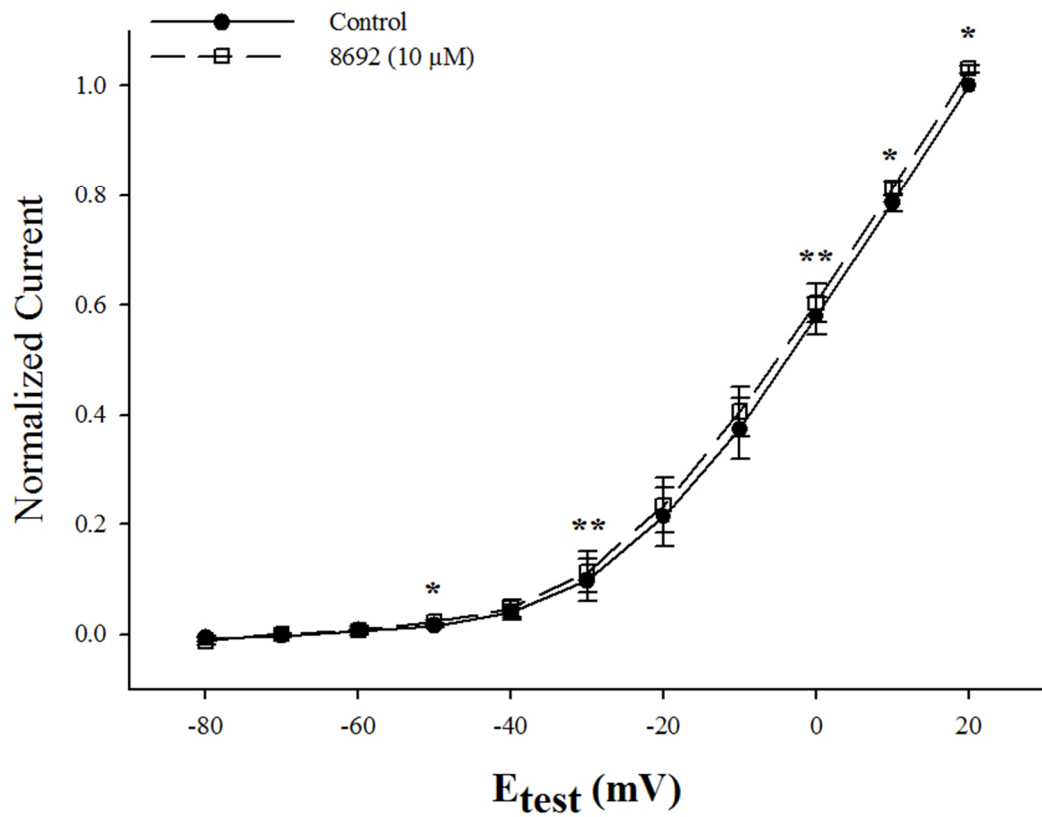


Figure 11. 電流電壓標準化統計圖，投予 8692 (10  $\mu$ M)十五分鐘與加藥前(Control)相比達到統計上的顯著差異，其趨勢是促進鉀電流的(\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs. Control)。

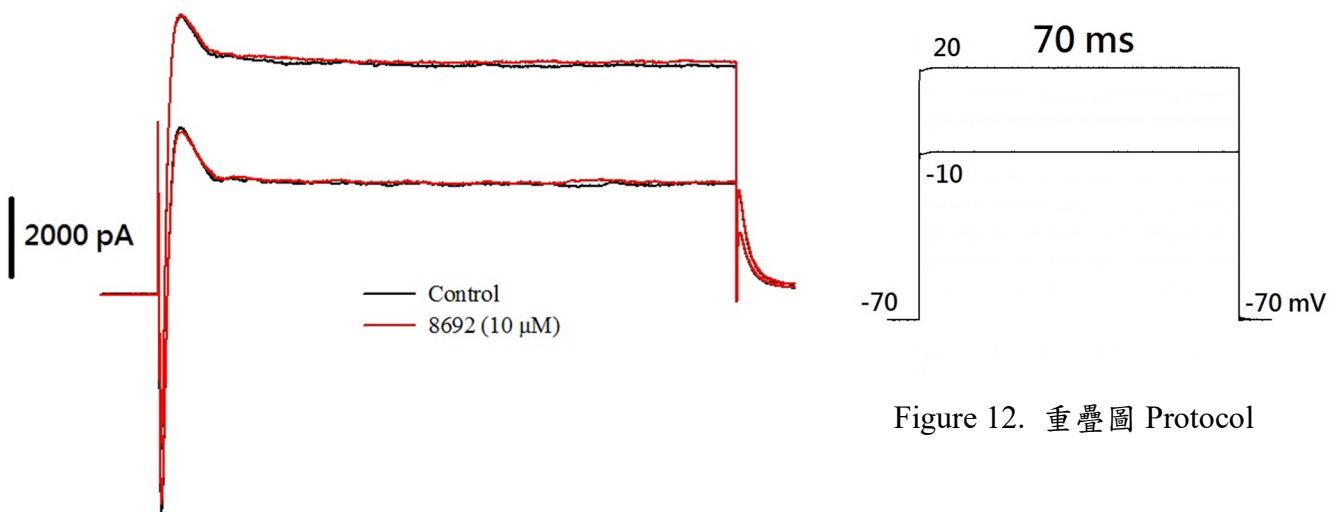


Figure 12. 重疊圖 Protocol

Figure 13. 投予 8692 (10  $\mu$ M)十五分鐘與 Control 相比之電流重疊圖。

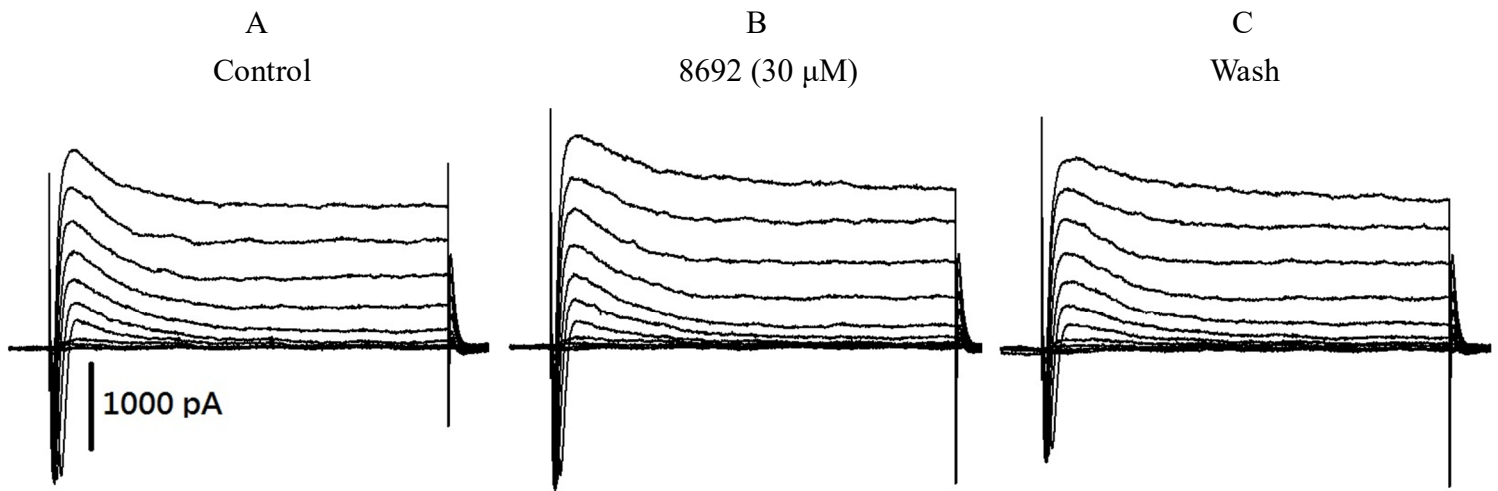


Figure 14. 8692 (30  $\mu\text{M}$ )對幼鼠海馬迴 CA1 神經元的鉀離子通道之作用。

### Control -- 8692 (30 $\mu\text{M}$ )

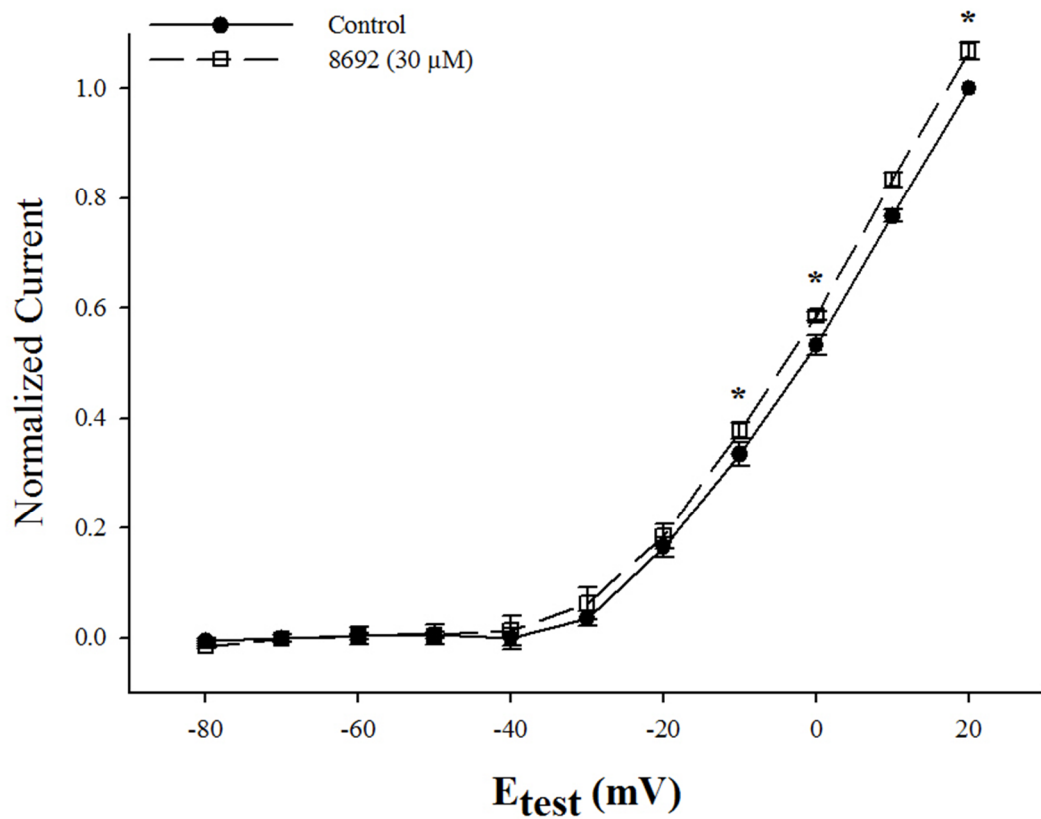


Figure 15. 電流電壓標準化統計圖，投予 8692 (30  $\mu\text{M}$ )十五分鐘與加藥前(Control)相比達到統計上的顯著差異，其趨勢明顯促進鉀電流的(\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs. Control)。

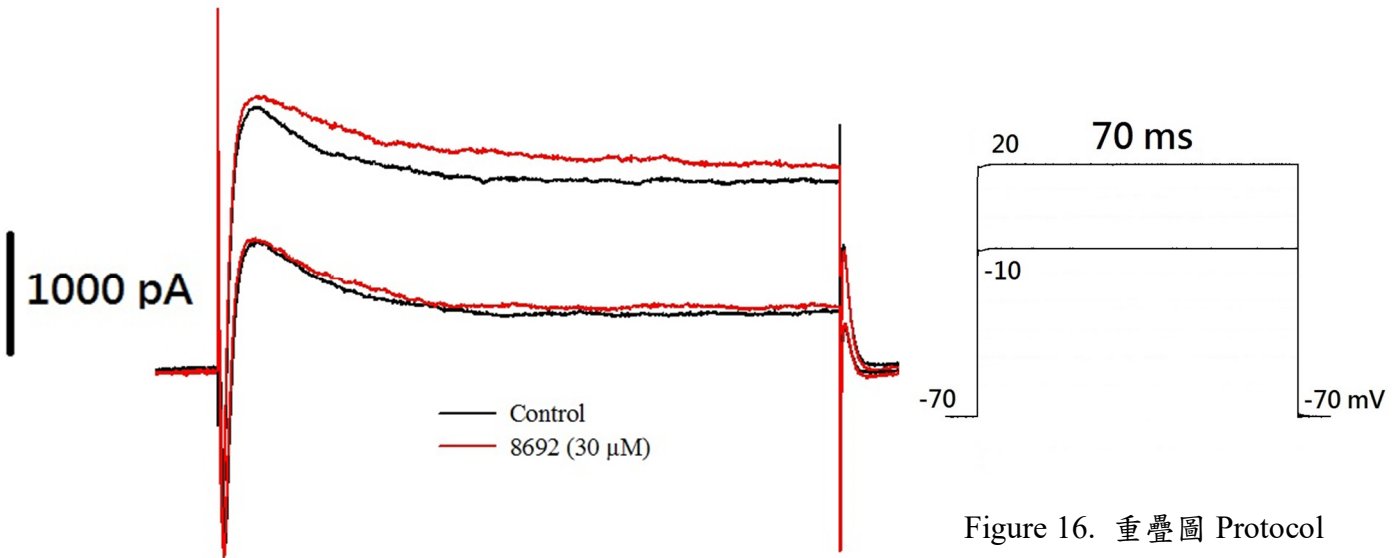


Figure 17. 投予 8692 (30  $\mu$ M)十五分鐘與 Control 相比之電流重疊圖。

### (七)討論

回顧過去的文獻，KCNQ(kv7)蛋白家族對於中樞神經的膜興奮性調節扮演非常重要的角色(20)，可以穩定膜電位，retigabine 為已知的 KCNQ 激活劑(21)，臨床上用來治療癲癇。綜合本研究計畫的實驗結果，我們成功篩選出能促進鉀離子電流的藥物 8692，因此我們從 8692 中初步了解可以促進鉀離子通道開啟的相關活性官能基，爾後將會透過藥物誘導癲癇的動物實驗模式(19)進行更多藥理活性的分析，期望探索能對抗癲癇的活性官能基。

而實驗近期將會持續補足 retigabine 對於幼鼠海馬迴 CA1 神經元的鉀離子通道之作用，作為本實驗室開發藥物的 positive control。海馬迴為目前研究最為詳盡的腦區之一，對於學習與記憶扮演了重要的角色(22)，透過本計畫可以初步了解實驗室開發藥物 8692 的電生理作用，未來實驗會在初級運動皮質區(Primary motor cortex) 測試，該區的神經元過度興奮是造成癲癇的主因之一，且 KCNQ 蛋白家族在該區具有調節膜電位的功能(23,24)，因此我們欲觀察藥物 8692 在該腦區是否與海馬迴有相同的藥理作用。探討完 retigabine 及其結構相似物之系列後，遠程實驗規劃將會探討 ML213 的相關官能基修飾化合物，期許能夠探索出新型藥物作為臨床的第一線用藥來對抗癲癇。

### (八)致謝

對於本研究計畫的支持與幫助，首先要感謝已故指導教授 林明忠老師的幫忙，沒有您我不可能有今天的成就，老師謝謝您。接著我要向協助指導我完成計畫的指導教授 黃相碩與 陳易宏老師獻上我最高的謝意，謝謝您們在我最需要幫助的時候伸出援手，為我指點迷津，老師謝謝您們。

實驗的方面，幼鼠腦薄片突觸後電流實驗，截至目前為止已有1年半的經驗累積了，爾後我會繼續加強此實驗的操作技術。任何的問題與盲點我都將積極地與指導教授們討論。結果分析的方面我也會多加訓練自我，包括培養閱讀期刊、詳細歸納問題的關聯性、自我獨立思考與邏輯推斷的能力。

#### (七)參考文獻

1. Hille B , Armstrong CM , MacKinnon R.(1999)Ion channels: From idea to reality.Nat Med. 5:1105-9.
2. Waszkielewicz AM , Gunia A, Szkaradek N, Słoczyńska K, Krupińska S, Marona H.(2013) Ion channels as drug targets in central nervous system disorders.Curr Med Chem. 20:1241-85
3. St Louis EK , Cascino GD.(2016) Diagnosis of Epilepsy and Related Episodic Disorders. Continuum. 22:15-37.
4. Linehan C , Tellez-Zenteno JF , Burneo JG , Berg AT.(2011) Future directions for epidemiology in epilepsy. Epilepsy & Behavior. 22:112-117
5. Pongs, O.(1999)Voltage-Gatedpotassium channels: from hyperexcitability to excitement. FFBS Lett.452:31-35.
6. Yu H, Wu M, Townsend SD, Zou B, Long S, Daniels JS, McManus OB, Li M, Lindsley CW, Hopkins CR.(2011) Discovery, Synthesis, and Structure Activity Relationship of a series of N-Aryl-bicyclo[2.2.1]heptane-2-carboxamides:Characterization of ML213 as a novel KCNQ2 and KCNQ4 Potassium channel opener.ACS Chem Neurosci. ;2(10):572-577.
7. Korsgaard MP, Hartz BP, Brown WD, Ahring PK, Strøbaek D, Mirza NR.(2005)Anxiolytic effects of Maxipost(BMS-204352) and retigabine via activation of neuronal Kv7 channels. J Pharmacol Exp Ther. 314(1):282-92.
8. Priest BT, Kaczorowski GJ.(2007)Blocking sodium channels to treat neuropathic pain. Expert Opin Ther Targets. 11(3):291-306.
9. Todorovic SM, Jevtovic-Todorovic V.(2007) Regulation of T-type calcium channels in the peripheral pain pathway.Channels (Austin). ;1(4):238-45.
10. Lason W, Chlebicka M, Rejdak K.(2013)Research advances in basic mechanisms of seizures and antiepileptic drug action. Pharmacol Rep. ;65(4):787-801.
11. Sheets MF, Hanck DA.(2003)Molecular action of lidocaine on the voltage sensors of sodium channels. J Gen Physiol. 121(2):163-75.
12. Cummins TR, Rush AM.(2007)Voltage-gated sodium channel blockers for the treatment of neuropathic pain. Expert Rev Neurother. 7(11):1597-612.
13. Wieland SJ, Gong QH.(1995)Modulation of a potassium conductance in



- developing in skeletal muscle. *Am J Physiol.* 268(2 Pt 1):C490-5
14. Rostock A, Tober C, Rundfeldt C, Bartsch R, Engel J, Polymeropoulos EE, Kutscher B, Löscher W, Hönack D, White HS, Wolf HH.(1996) D-23129: a new anticonvulsant with a broad spectrum activity in animal models of epileptic seizures. *Epilepsy Res.*23:211-223.
  15. Blackburn-Munro G.(2004) Pain-like behaviours in animals – how human are they?. *Trends Pharmacol Sci.*25:299-305.
  16. Jepps TA, Bentzen BH.(2014) Vasorelaxant effects of novel Kv7.4 channel enhancers ML213 and NS15370. *Br J Pharmacol.* 171(19):4413-24.
  17. Van Lunteren E, Spiegler SE, Moyer M.(2011) Fatigue-inducing stimulation resolves myotonia in a drug-induced model. *BMC Physiol.* 28;11:5.
  18. Yang CT, Leung YM, Hsu SF, MacDonald I, Wang ML, Lin JG, Hung SY, Chen YH.(2016) A comparison of the delayed outward potassium current between the nucleus ambiguus and hippocampus: sensitivity to paeonol. *European J Pharmacol.*784:49–60
  19. Li BJ, Wang L, Sun ZH, Zhou Y, Shao DY, Zhao J, Song YN, Lv JY, Dong X, Liu CH, Wang P, Zhang XY, Cui RJ.(2014) The Anticonvulsant Effects of SR 57227 on Pentylentetrazole-Induced Seizure in Mice. *PLoS ONE* 9(4):e93158.
  20. Yue C and Yaari Y.(2004) KCNQ/M Channels Control Spike Afterdepolarization and Burst Generation in Hippocampal Neurons. *J Neurosci.* 24(19):4614 – 4624
  21. Blackburn-Munro G, Dalby-Brown W, Mirza N.R., Mikkelsen J.D., Blackburn-Munro R.E.(2005) Retigabine: Chemical Synthesis to Clinical Application. *CNS Drug Rev.* 11(1):1-20.
  22. Shu, S.Y., Jiang, G., Zeng, Q.Y., Wang, B., Li, H., Ma, L., Steinbusch, H., Song, C., Chan, W.Y., Chen, X.H., Wu, Y.M., Bao, R., Chen, Y.C., Wu, J.Y. (2014) The marginal division of the striatum and hippocampus has different role and mechanism in learning and memory. *Mol. Neurobiol.*
  23. Guan D, Higgs MH, Horton LR, Spain WJ, Foehring RC.(2011) Contributions of Kv7-mediated potassium current to sub- and suprathreshold responses of rat layer II/III neocortical pyramidal neurons. *J Neurophysiol* 106: 1722–1733
  24. Cooper EC, Jan LY.(2003) M-channels. Neurological diseases, neuromodulation, and drug development. *Arch Neurol* 60: 496–500.