

第一章 前言

第一節 研究背景

針灸是傳統的中醫治療體系裏重要之一環，自從一九七〇年代傳入歐美以後，西醫界便展開許多的研究。至今針灸的治療效果雖有爭議，但針刺止痛(Acupuncture analgesia)的效果已被大家廣為接受^{1, 2, 3, 4, 5}。除了傳統上將鋼針以捻轉插入穴位之機械性刺激方式外，利用鋼針通電(即所謂的 Electroacupuncture，以下簡稱 EA)刺激穴位，也可獲得同樣或更有效的止痛效果。

然而，在西方醫學研究針刺止痛的試驗過程中，穴位的刺激方式和強弱，一直是研究者極大的困擾。其中，針灸師所特別強調的“得氣”現象(De Qi)^{6, 7}，更是在操作過程中扮演者極為重要的角色。臨床經驗顯示：針刺“得氣”感愈強，止痛效果愈明顯；反之，針刺“得氣”感不明確，則針刺鎮痛往往失敗。甚至，許多研究學者認為：針刺穴位所引發的“酸麻脹重”之所謂“得氣感”，其實就是一種深部組織的痛覺。不過雖然臨床上觀察到此種眾所週知的現象，然而對於電針刺激強度是否需要達到傷害性反應(nociceptive response)方能達到止痛效果，大部份看法仍是不明確且存疑的。

第二節 目前電針動物模型研究方向

在動物模型中顯示電針止痛效果來自於去極化(depolarizing)週圍神經的傳入性受体並活化脊髓內或高於脊髓層次(supra spinal level)的內源性疼痛抑制系統⁸。在此種動物模型的基礎上，許多的研究利用不同的電針刺激參數探討“得氣”現象。目前已發現電針刺激頻率與止痛效果的關聯性，那就是低頻刺激(少於 10Hz)，引發類嗎啡止痛系統⁹。而高頻刺激則導致非類嗎啡止痛系統的活化^{10, 11, 12, 13, 14, 15}。相對於刺激頻率對於電針止痛的定論。究竟如何方是電針止痛的最低刺激強度仍是充滿爭議。到目前為止，只有少數的實驗探討刺激強度的止痛效果^{16, 17}。另

外，究竟是傳導非傷害性知覺的較粗之傳入性神經，亦或是傳導痛覺的較細之傳入性神經，在電針刺激下引發中樞神經之止痛作用？一般雖較偏向前者，然而亦有研究者主張後者是電針止痛的必要條件。在電針止痛的領域，這些都需要再作更深入研究，以獲得更進一步的瞭解。

第三節 c-fos 細胞致癌基因與疼痛研究之背景介紹

世界疼痛醫學會(IASP)於 1986 年對”疼痛”下了一定義，那就是”疼痛是種在感覺及情緒上令人不愉快的經驗，伴隨有實際的或潛在的組織傷害，或以此類言詞所描述的傷害”，就此定義來看，如何在疼痛的研究裏，忠實且客觀地反映出造成不愉快經驗的組織傷害之程度，以期能顯示出疼痛之指數強度，就成為許多研究者探索之目標，因此尋找此種疼痛指標(pain marker)即成為熱門的課題。幸運的是，由於分子生物學研究的進步，進一步瞭解疼痛現象是一連串訊號傳遞的綜合結果。而 c-fos 細胞致癌基因(proto-oncogene)的表現則是當時研究早發性迅速基因(immediate early gene, IEG)的熱門話題，於 1987 年 Hunt 等人首先將這兩件事情連接起來，從此開啟了疼痛研究的嶄新紀元。他們利用不同種類的刺激(疼痛/非疼痛)來誘發大白鼠脊髓背角區 Fos 蛋白的形成，以免疫染色法將含有 Fos 蛋白的細胞核標示出來。結果證實有 Fos 標記的神經細胞對於疼痛刺激是有選擇性的¹⁸。不久之後，Bullitt 和 Basbaum 也分別使用不同的方式驗證了相同的結論。在麻醉及清醒狀態下，老鼠脊髓背角的 Fos 活動度因傷害刺激(noxious stimulation)而大幅增加¹⁹。²⁰。而在清醒狀態下，注射嗎啡不但減輕老鼠的疼痛反應，更降低 Fos-like 免疫染色度^{21, 22}。

第四節 c-fos 細胞致癌基因於疼痛訊號傳遞所扮演之角色

分子生物學的研究證據顯示，疼痛刺激從初級神經去極化開始，透過突觸間傳遞及自由擴散的方式，將訊號送入中樞神經系統之神經細胞核內，必須經過三級制訊號傳遞系統。其中初級訊號傳遞者負責訊號

的產生，次級訊號傳遞者誘導訊號放大，而三級訊號傳遞者則完成訊號的維持與執行。最近的研究指出持續而強烈的疼痛刺激(特別是 c 型纖維興奮)，釋放多種興奮性介質(如: substance P, CGRP, glutamate, aspartate)---此即初級疼痛訊號傳遞者。開啟脊髓背角 NMDA 受器，湧入大量鈣離子，並誘導 PKC 活化-----典型的次級訊號傳遞者，它不僅啟動許多本來沈息中的細胞質內酵素，製造一氧化氮和前列腺素等擴散性介質，影響鄰近的神經元，提供興奮性修飾造成疼痛受區擴大(expansion of receptive field);更可經由一連串的調節因子，進入細胞核內誘導 c-fos 細胞致癌基因，轉錄為所屬的 Fos 蛋白(圖 1.1)。

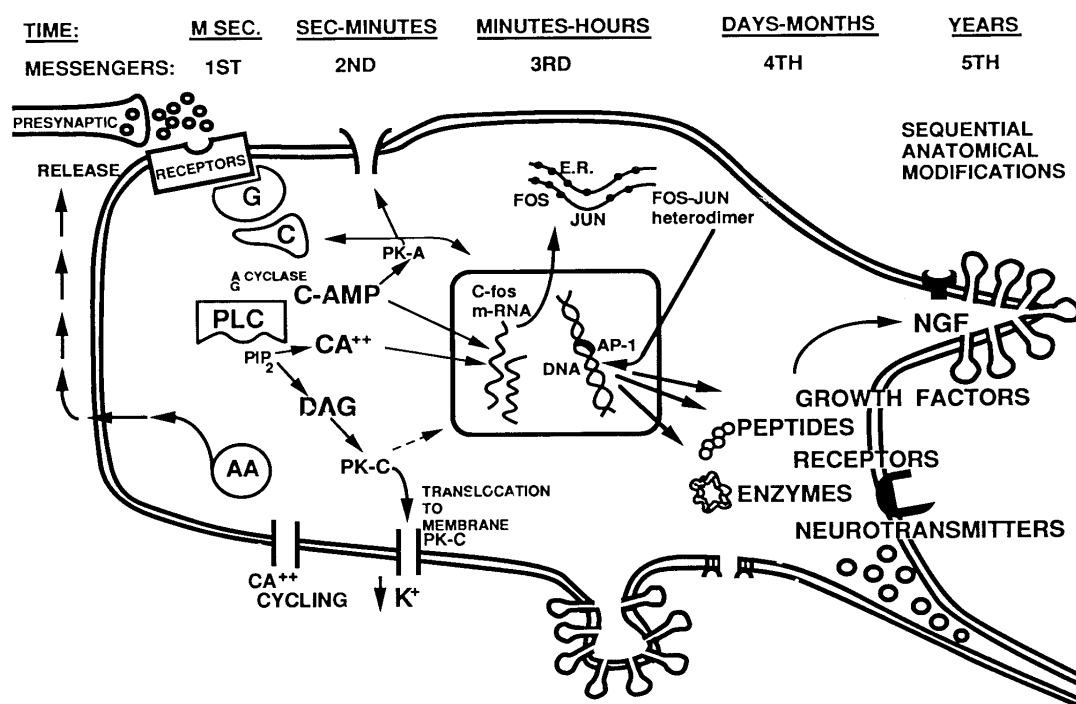


圖 1.1 Fos 蛋白之誘導圖示

Fos 蛋白和另一種早已存在的 Jun 蛋白結合形成 AP-1-like 的物質(圖 1.2)，AP-1 在功能上是屬於誘發性轉錄因子，作用在 DNA 的特定區域 (AP-1 site)，AP-1 site 是啟動一些常用基因的必備基因(promoter gene)，平常處於靜止狀態，一旦和 AP-1 結合後，可以很輕易地啟動轉錄後繼

基因(如 proenkephalin, prodynorphin gene)。在此疼痛訊號傳遞過程中, Fos 蛋白和其他同類型的早發性迅速基因, 一起被稱為三級訊號傳遞者^{23, 24, 25}。因而 Fos 蛋白是正常細胞核內的轉錄因子(transcriptional factor), 在胞內訊號傳遞(signal transduction)中扮演著極為重要的角色, 藉著 c-fos 致癌基因的激活, 神經細胞核可以啟發一連串之蛋白質合成及細胞膜電位改變的反應。

C-fos Cascade

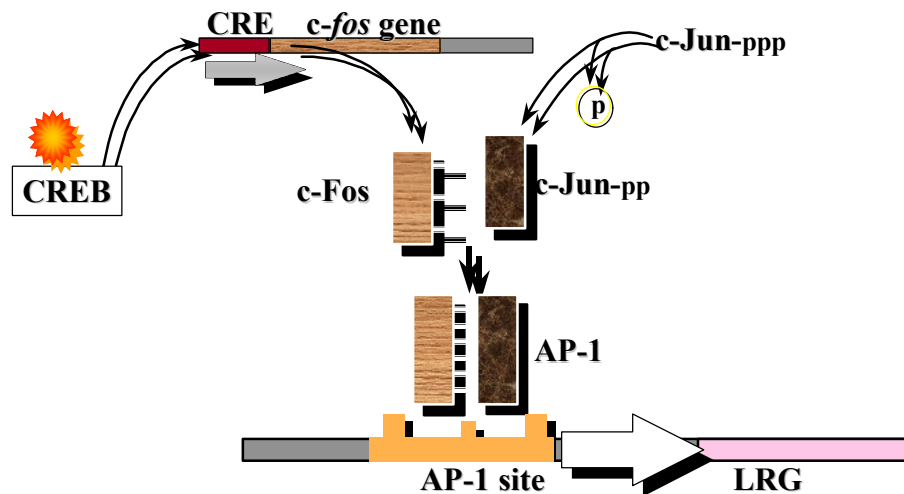


圖 1.2 Fos 蛋白作用於 AP-1 site 圖示

第五節 c-fos 細胞致癌基因何以是理想的疼痛指標

c-fos 細胞致癌基因在疼痛刺激出現 5 分鐘就開始轉錄作用, 30 分鐘後在細胞核內便可出現其活化後產物 Fos 蛋白, 約兩小時達到最高峰, 四小時後逐漸消失。而以 c-fos 細胞致癌基因的活動度來做為實驗動物疼痛的指標, 是近年來疼痛學研究中嶄新的方向²⁶, 和傳統的疼痛測驗最大的不同點: Fos 蛋白在神經核中的活動度可以用型態學的方法固定, 量化和比較, 其精確性, 可重覆程度及穩定性遠比傳統的行為觀察法更為優異。以 c-fos 做為實驗動物疼痛指標有下列好處: (1) 沒有接受疼痛刺激的情況下, 正常活動的清醒大白鼠其背角區幾乎完全沒有 c-fos

的表現，給予疼痛刺激後，在刺激同側背角負責痛覺的區域: lamina I/II/V，會出現大量的 Fos 蛋白，而在未受疼痛刺激的對側背角區則完全沒有出現。顯示 Fos 對痛覺具有高度專一性^{27, 28, 29}。(2) Fos 蛋白平時含量甚低幾乎無法測得，然而一旦經誘導出現後，含量大增，毋需再經過其它強化程序，用標準的免疫染色法就可以染出，操作簡便，可信度極高³⁰。(3)計算染有 Fos 標記的細胞核數目可以反應出刺激的強弱，具有半定量的效果²⁹。(4)可以參考其分佈情形具有極佳的定位性(somatopical presentation)³¹。(5)Fos 是核蛋白，所得到染色反應全部發生在細胞核內。利用雙重染色法 (double labeling technique)，可以同時染出細胞質內其它蛋白的活動，提供強烈的神經細胞 Fos 轉譯後訊息³²。(6)更重要的是，Fos 的轉譯與調節機制已經在分子生物學的研究中得到強烈的佐証，與細胞內訊息傳遞息息相關³³。因此，最近的研究一致推崇 Fos 免疫染色法，是用來探索疼痛的神經活動方法中。極為理想的工具³⁴。

第六節 研究目的

綜合以上研究背景的認識，本實驗採用大白鼠動物模型。希望以電針穴位止痛的方式探討”得氣”現象對止痛效果之影響。正如臨床上觀察到氣感愈強，止痛效果愈明顯。我們將此”氣感之強弱”類推為刺激強度參數，以不同之刺激強度，觀察大白鼠對傷害性傳入性訊號(疼痛訊號)之行為反應，及脊髓背角神經核中 c-fos 活性表現之分子生物學上之証據，以期探討刺激強度(氣感強度)與止痛效果之關連性。

第二章 文獻探討

- 一、 1993 林昭庚 新針灸大成 “針灸止痛機轉之探討”¹ p991
林教授在本文中提及，在幾千年的發展過程中，針灸在疼痛性疾病的應用，一直是相當重要的一環。像「內經」、「素問」裏面就有「刺腰痛篇」專論各種腰痛的針灸療法。自從近三十年來的研究結果可以發現，所有的證據都顯示針刺鎮痛主要藉由內在抗痛系統之活化，進而調節體內痛覺之傳導與反應，消除痛的感受與不適反應。這種神經系統內的活化和調節過程，必須靠中樞神經系統不同層次的構造和許多傳導物質的整體統合作用來完成。
- 二、 1979 Richards 等人在”Electroacupuncture analgesia could be mediated by at least two pain-relieving mechanisms;endorphine and non-endorphine systems”¹¹ 一文中，以 0.2，4 及 200Hz 不同之頻率操作電針，並以 opioid antagonist(naloxone)及 serotonin antagonist(parachlorophenylaline)作用，結果發現 Naloxone 能抑制低頻電針作用，對高頻電針卻無作用。反之 parachlorophenylaline 作用於高頻電針，對低頻電針則無作用。因此推斷電針針灸作用，可能至少有兩種疼痛緩解系統。
- 三、 1997 V.V. Romita 等人在”Parametric studies on electroacupuncture-like stimulation in a rat model; effects of intensity, frequency, and duration of stimulation on evoked antinociception”¹⁷ 一文中，提到不同的電刺激參數(譬如頻率，強度，時間)對是否達到合適的止痛效果是相當重要的。
- 四、 1987 Stephen P.Hunt 等人在“Induction of c-fos-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation”¹⁸ 一文中，提到傷害性熱源或化學刺激可造成較細的傳入性感覺神經纖維活化，並使大白鼠脊髓背角淺層快速出現蛋白質免疫反應，他推論

經由突觸訊號的傳輸，也許可以快速誘導突觸後神經元之 gene 表現。

- 五、 1990 R.W. Presley 等人在“Systemic morphine suppresses noxious stimulus-evoked fos protein-like immunoreactivity in the rat spinal cord”²¹ 一文中，他們的研究顯示，morphine 可同時抑制大白鼠福馬林注射疼痛反應及脊髓背角 Fos 蛋白質免疫反應度。
- 六、 1991 James I. Morgan 及 Tom Curran 等人在“Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible pro-oncogenes fos and jun”²⁴ 一文中，詳細介紹 immediate early gene-fos 之發現背景，如何誘導 c-fos gene 之表現，其產物 Fos protein 如何在神經訊號傳遞中扮演 transcription factor 之角色，以及 Fos protein 在神經系統中之定位和其在神經生理上之功能。
- 七、 1990 Morgan Sheng 等人在 “The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system”²⁵ 一文中，review 許多文獻，整理出清晰的架構，詳細介紹何謂 immediate early gene。在神經細胞中，如何誘導出 IEG 之作用，IEG 的調節作用，在分子生物學上如何由 neurotransmitters 及 membrane depolarization 調節轉譯作用之機轉，以及 IEG 在神經系統上之作用。
- 八、 1998 Justin A. Harris 在“Using c-fos as a neural marker of pain”²⁶ 一文中 review 85 篇文獻，詳細介紹 c-fos 成為 pain maker 之經過，並且提出 c-fos 在研究應用上可能的限制，而這種限制容易被忽略，影響研究的成果。
- 九、 1990 Elizabeth Bullitt 在“Expression of c-fos-like protein as a marker for neuronal activity following noxious stimulation in the rat”³¹ 一文中，提到 c-fos protein 雖然是很好的 noxious stimulation maker。然而，少數神經元在沒有傷害性刺激狀況

下，亦會有 Fos protein 免疫反應，譬如麻醉深度或沒有麻醉而被束縛的老鼠。因此，為避免這些干擾因子，實驗設計必須十分小心。

- 十、 1996 W.Z. Sun 等人在 “Nitrous oxide or halothane , or both , fail to suppress c-fos expression in rat spinal dorsal horn neurons after subcutaneous formalin”⁴⁰ 一文中，其研究結果顯示全身麻醉沒有前瞻止痛作用 (pre-emptive analgesia), 其無法改變福馬林注射之大白鼠脊髓背角 c-fos 表現。此與 fentanyl 所得之降低結果是有不同的，這個結果顯示大白鼠福馬林注射行為反應之抑制作用，可能有止痛及非止痛雙重作用存在，因此利用全身麻醉之動物模型，觀察其對疼痛之行為反應，無論在麻醉中或是麻醉結束不久，都必須小心地評估。而 c-fos 活性表現是相當有用的相佐方法。
- 十一、 1996 W.D. McCall 等人在 “Formalin induces biphasic activity in c-fibers in the rat”⁴² 一文中，顯示其研究大白鼠單獨分離之 c-fiber，利用 formalin 予以刺激，記錄其電位變化，其結果呈現與行為反應相似之雙相反應，這種結果與” c-fiber 活性增加導致行為反應之雙相性”之假說是相符合。
- 十二、 1992 Odd-Geir Berge 等人在 “The formalin test: an evaluation of the method”⁴⁴ 一文中，詳細介紹福馬林注射實驗雙相性之機轉，其早期反應 (early phase) 主要由 c-fiber 活化造成，其晚期反應 (late phase) 則是因為週邊組織之發炎反應及脊髓背角，由於一連串 c-fiber 訊號之刺激形成功能性改變之聯合效果所致。
- 十三、 1992 S.L. Jones 在 “Noradrenergic modulation of noxious heat-evoked fos-like immunoreactivity in the dorsal horn of the rat sacral spinal cord”⁴⁶ 之研究，其結果顯示，由熱刺激引起之 Fos 免疫染色度上升可被椎內給予 norepinephine(NE) 所抑制，且與施予劑量大小有關，其抑制效果可被 phentolamine—an nonselective alpha adrenoceptor antagonist , yohimbine—an

alpha-2 adrenoceptor antagonist 及 prazosin—an alpha-1 adrenoceptor antagonist 所減弱，因此 NE 之抑制效果是透過脊椎內 alpha-1 及 alpha-2 adrenoceptor 運作。

- 十四、1994 M.M. Morgam 等人在 “Diffuse noxious inhibitory controls reduce the expression of noxious stimulus-evoked Fos-like immunoreactivity in the superficial and deep laminae of the rat spinal cord”⁴⁷ 之研究，以夾子重覆夾大白鼠之後肢，可使腰椎脊髓內 Fos 免疫染色度上升，但若之前將其尾巴放置在 50° C 熱水中其 Fos 免疫染色度會明顯降低，顯示遠處傷害性制約刺激可抑制神經元傷害性反應。
- 十五、1986 Bruce Pomeranz 於 “Relation of stress-induced analgesia to acupuncture analgesia”⁵² 一文中，詳細列舉六大理由證明壓力性止痛作用與針灸作用是兩種不同現象。然而在針灸研究時，壓力性止痛作用卻是必需考慮的干擾因子。
- 十六、1997 Vito V. Romita 等人在 “Intense peripheral electrical stimulation evokes brief and persistent inhibition of the nociceptive tail withdrawal reflex in the rat”⁵⁴ 之研究，其結果顯示以低頻電針強刺激穴位方式，大白鼠閃尾實驗，可觀察到兩種抗傷害性反應。一種是電刺激中的短暫反應(20 分鐘)，此種反應由連續性突觸活化所致。另一種效果則可持續超過一小時，其作用為透過脊髓上位及脊髓內中樞神經可塑性變化所致。

第三章 材料與方法

第一節 動物準備及動物麻醉

在前導實驗(pilot study)中，我們比較四種麻醉濃度對閃尾時間之影響，發現 1% 的 Halothane 濃度及 30 分鐘的誘導期可以達到穩定的閃尾時間曲線。(圖 3-1)

Effect of Anesthetic Concentration on Tail-flick Latency

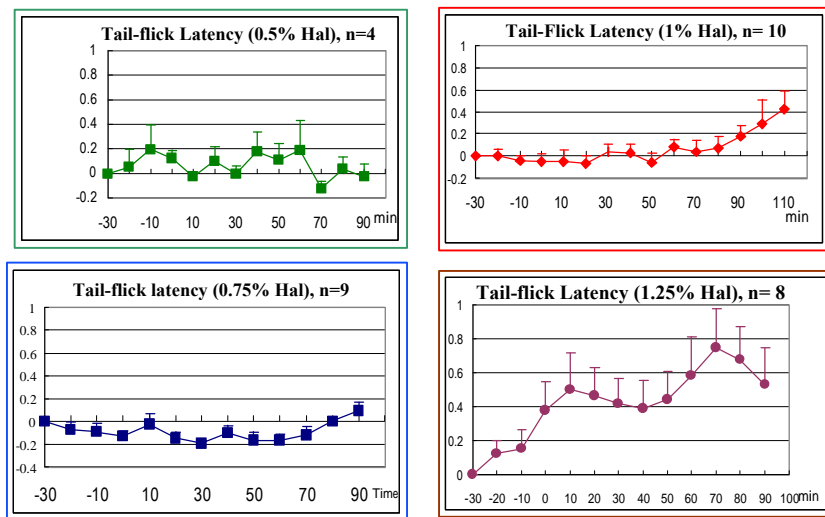


圖 3.1 四種 Halothane 濃度對大白鼠閃尾時間影響之曲線

1-1 動物準備

雄性 Sprague-Dawley 大白鼠，每隻體重約 250~300 克。每三至五隻一組飼養於籠內，光照與熄燈各 12 小時，自由進食。光照與熄燈各 12 小時，保持在安靜環境及最小的外界壓力刺激。實驗室溫度維持恆溫 25℃，無噪音干擾，操作均由固定人員並選擇上午 10:00 至下午 4:00 進行實驗。

1-2 動物麻醉

大白鼠先在透明壓克力箱內，以 2% 高濃度麻醉氣體 Halothane 昏迷後，改由面罩繼續吸入 1% Halothane 30min 以達到穩定麻醉深度。在後肢足三里穴插針作電針刺激。麻醉時間共 60 min (Time 60)，包括前面 30 分鐘的「誘導期」(使麻醉深度穩定)，及後 30 分鐘的電針或無電針「實驗期」。大白鼠呼氣端以氣體偵測器監視，維持恆定麻醉深度在 1% Halothane。尾巴及後腳可自然露出管外。

第二節 電針模型(Electroacupuncture Model)

直徑 0.25 毫米的不銹鋼針，，插入大白鼠右側後肢足三里穴 (S36) 的位置(圖 3.2)。

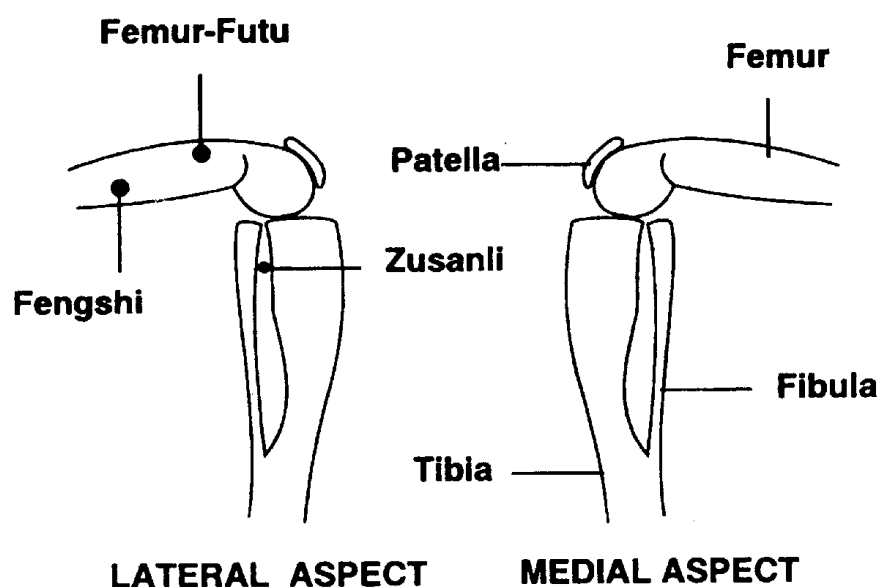


圖 3.2 大白鼠足三里穴位圖

傳統上許多電針研究利用此穴位來探討止痛機轉^{35, 36, 37, 38}。定位方法為一對不銹鋼針，一根插入脛骨粗隆 (tibial anterior tuberosity) 和腓骨頭 (fibular head) 間，距脛骨粗隆外下方約 5mm 處，另一根針插入穴位下方約 5mm 處。電針刺激器(Grass model S88 dual channel stimulator) 連接在針頭裸露出皮膚的部份，輸出波寬 0.5mS，方形波，刺激頻率低

頻 (4Hz) ; 強度調整由零驗起增加至局部肌肉收縮(大約為 0.5V) , 定義此刻強度為電針閾值(Electroacupuncture analgesia threshold; EAT)。電針刺激開始強度由電針閾值起, 在大白鼠可忍受的範圍內(不因刺激而扭動身體) , 緩慢遞增至 10 倍或 20 倍 EAT 值 , 並維持此強度刺激 30 分鐘。

第三節 大白鼠閃尾實驗

3-1 實驗設計 (圖 3.3)

Tail Flick Test

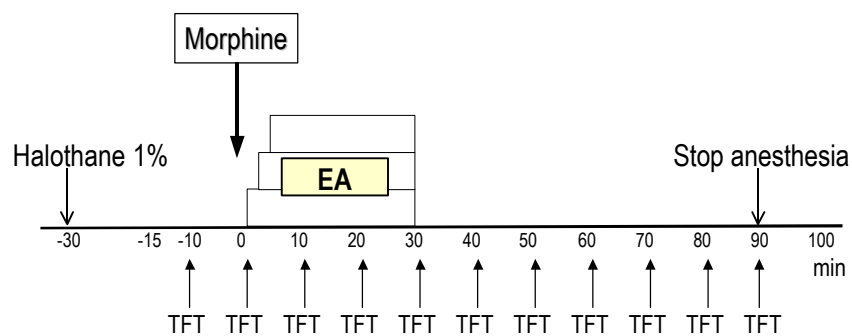


圖 3.3 大白鼠閃尾實驗步驟簡圖

120 分鐘的吸入性全身麻醉分成三段時期。(1)誘導期(0~30 分鐘)。(2)電針(EA)處理期(30 ~60 分鐘)。(3)電針結束後期(60 ~120 分鐘)。

將 25 隻大白鼠隨意分成四組(1)控制組(n=7), 僅麻醉 120 分鐘, 沒有電針處理。(2)弱刺激組(10xEAT, n=6), 電針處理期以 10 倍基礎疼痛閾值(basal latency)之強度刺激大白鼠。(3)強刺激組(20xEAT, n=6), 以 20 倍基礎疼痛閾值之強度刺激大白鼠。(4)Morphine 組(n=6), 電針處理期前大白鼠先以 2.5mg/kg 劑量之 Morphine 皮下注射。

3-2 閃尾實驗施行方式

熱源來自一紅外線發射器（功率可調整）照射於尾部尖端 1/3 一固定處。尾巴受熱刺激後因疼痛而移開的時間記錄為閃尾時間(tail flick latency; TFL)，可由自動計時器記錄下來（自動計時器為利用光的反射原理，所以不能將鼠尾完全塗黑）。實驗期前 10 分鐘先記錄三次 TFL，每次間隔 3 分鐘，平均三次時間，定義為基礎疼痛閾值(basal latency)，調整功率使其約在 3~5 秒間。經電針刺激開始後每隔 10 分鐘做三次，每次間隔 3 分鐘，求三次的平均 TFL 作為此時段的 test latency，整個過程室溫維持 $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ 。另定義 BL 的 2 倍為最長照射極限(cut-off limit)，約為 10 秒，超過這個時間則移開鼠尾，以避免不必要的組織傷害。以下列公式求出最大可能效果(Maximal possible effect, MPE)。

$$(\text{MPE})\% = \frac{\text{test latency} - \text{basal latency}}{\text{cutoff limit} - \text{basal latency}} \times 100\%$$

第四節 大白鼠福馬林注射實驗及 c-fos 免疫生物化學分析

4-1 實驗設計 (圖 3.4)

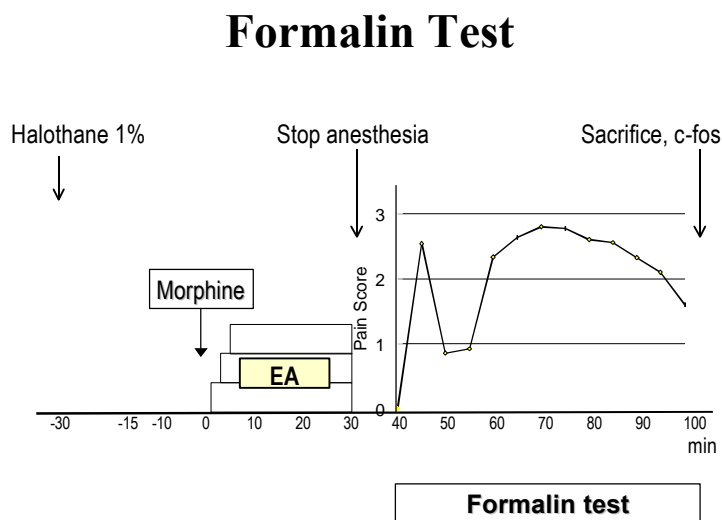


圖 3.4 大白鼠福馬林注射實驗步驟簡圖

所有實驗組別之大白鼠麻醉 60 分鐘，保持 1%Halothane 濃度。前 30 分鐘為誘導期，接著 30 分鐘處理期。麻醉結束後 5 分鐘，以福馬林注射有些組別之大白鼠左後腳底。所有大白鼠於麻醉結束後 65 分鐘，予以犧牲(sacrificed)供作 c-fos 免疫細胞化學分析(Immunocytochemical study)。41 隻大白鼠隨意分成六組(表 3.1)。

表 3.1 大白鼠福馬林注射實驗及脊髓背角 c-fos 活性表現實驗分組表

No.	Group	Halothane	EA	Formalin	c-fos
1	C (Control) n=6	+	-	-	+
2	EC (EA 20×EAT control) n=7	+	+	-	+
3	FC (Formalin 1%) n=7	+	-	+	+
4	E ₁ F (EA 10×EAT) n=7	+	+	+	+
5	E ₂ F (EA 20×EAT) n=7	+	+	+	+
6	Msc(Morphine 2.5mg/kg sc.) n=7	+	-	+	+

(1)控制組(C 組), n=6。 (2)電針刺激-控制組(EC 組), n=7。 (3)福馬林-控制組(FC 組), n=7。 (4)電針刺激-福馬林組(E₁F 10×EAT 組), n=7。 (5)電針刺激-福馬林組(E₂F 20×EAT 組), n=7。 (6)Morphine 組(MF 組), 2.5mg/kg 劑量之 Morphine 於處理期皮下注射, n=7。

4-2 電針刺激對大白鼠福馬林注射後行為變化及脊髓背角的 c-fos 表現之實驗步驟：

I. 福馬林腳底注射方法(Subcutaneous Formalin Injection in the Plantar Surface of the Hindfoot)

準備 1.

濃度	1% 福馬林	5% 福馬林
飽和福馬林 (37%)	10 ìl	50 ìl
蒸餾水	990 ìl	950 ìl
總量	1000 ìl	1000 ìl

2. 使用前配製，裝盛於4 × 6反應槽內

3. 1 ml注射空針

4. 布袋

劑量 50 ìl (=0.05 ml)

(注意！需將空氣排除乾淨)

- 注射**
1. 將老鼠自尾部提起，以頭低腳高的方式讓老鼠自行爬入布袋內。靜置一分鐘後，以左手手掌握住鼠體，輕微壓制在桌面上，同手之食指及拇指握住小腿。
 2. 針面朝上，以30度斜角(和足掌的夾角)由足底墊肉之間刺入。
 3. 自皮下往腳跟方向前進，在腳跟和墊肉間1/2處將藥水緩緩推入，可看到水泡鼓起。

II. 福馬林疼痛行為加權評分法(由 Dubuisson 及 Dennis 提出³⁹，經 Sun 等人修飾⁴⁰。)

在注射後一小時內觀察老鼠的行為，不同的動作有不同的分數。(表 3.2)將老鼠的分數乘上時間，每一分鐘統計一次，可得老鼠的疼痛指數對時間關係圖。(圖 3.5)

表 3.2 福馬林疼痛行為加權評分法

加權分數	肢體	靜止時	行動中 (探索、直立、爬行)
0	無痛	→ fanning: 腳趾完全張開, 從下方可看到腳趾露出於網外。	
1	半抬	→ 腳掌碰觸地面但小腿並未抬起。 → 腳掌捲起用外緣觸地, 由下方看不到腳趾露出, 但是腳跟仍有觸地。	→ 不敢施力 → 不敢將重量置於該足 → 跛行
2	全抬	→ 腳掌懸空。 → 腳趾雖有接觸, 但是膝關節彎曲抬起, 腳跟完全不觸地。	→ 完全抬起
3	舔、咬	→ licking: 舔舐該足 → biting: 咬 → (flinch: 該腳不斷顫抖)	→ irritable: 極端不安, 反覆移動軀體

Pain Behavior in Formalin Test

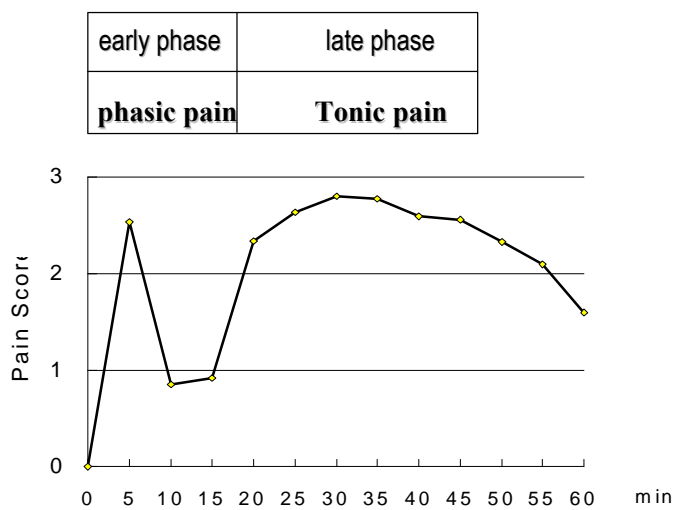


圖 3.5 大白鼠福馬林注射疼痛指數對時間關係圖

III. 固定液之灌流程序(Transcardial Perfusion)

麻醉 準備 rat 並稱其重量。

Pentobarbital(50mg/ml)之量(ml)=BW(gm) × 0.001

用 1ml 注射針抽取 pentobarbital 之量注入腹腔，如果沒有昏迷，可再追加一次劑量。

準備器械 等待 rat 在昏迷狀態時，準備 perfuse 時所需的用具如：

- (1)大剪、小剪各一支
- (2)大中止血鉗各一支
- (3)perfuse 用針頭一支(18G 鈍面注射針)
- (4)0.9% saline 以 1L 燒杯裝盛
- (5)3.8% paraformaldehyde 500ml 以 1L 燒杯裝盛
- (6)大鋁盤二個
- (7)調整 pump：速度調整為 999 ml/hr，檢查兩條灌流管路是否已沖滿液體，空氣是否已排除

步驟 陷入昏迷狀態後，仰臥姿態下使用大剪從腹部剪開，露出胸骨下端之劍突軟骨，用大止血鉗來固定，沿著胸骨兩側向腋窩方向剪開至看得到心臟為止。再用小剪將覆蓋於心臟上的胸腺從中間剪開，便可看到 ascending aorta。先啟動 pump 確定輸液有進入後，保持輸液流動狀態，將 18G 鈍面注射針從左心室插入至 aorta 內 0.5cm，而後用中止血鉗夾住左心室心肌和針，以便固定針頭在 aorta 內，再將右心房剪個洞以便構成一個循環。開胸後鼠心很快產生心室震顫(ventricular fasciculation)，血循停止，灌流必須在兩、三分鐘內完成，否則易形成小血管的血栓及微血管滯留。然後將 0.9% NS 500ml 完成沖血，再將 pump 管路轉換至 3.8% paraformaldehyde 以 500ml 半小時的速完成 fixation。

觀察 開始 perfuse 生理食鹽水及 paraformaldehyde 時都可以看到四肢抽搐，手舞足蹈(fasciculation)的現象。沖血完全的鼠肝呈淺土黃色，perfuse 完全的鼠肝質地堅硬。四肢及鼠尾僵硬完全沒有彈性，右心房流出的液體清澈不帶血色。

IV. 取出大白鼠脊髓之程序(Spinal Cord Dissection)

準備器械

- (1) 中小骨剪各一支
- (2) 圓頭解剖刀及尖頭小解剖刀各一支
- (3) 小尖剪一支
- (4) 平頭小鑷一支
- (5) 30% sucrose 50ml
- (6) 3.8% paraformaldehyde 50ml
- (7) 5 ml 密閉玻璃罐

解剖 將 rat 腹部朝下，用圓頭解剖刀沿著背部脊柱中間將皮劃開，再將脊柱兩旁肌肉劃開，而後用中骨剪將脊柱邊的肉處理乾淨，而露出 T10-L6 的 transverse process。先從 L6 起，將兩側 spinous process，transverse process 和 pars interarticularis 部份剪斷，再用小骨剪小心剪開 lamina，覆蓋在 spinal cord 上方的 lamina 及兩旁的 pedicle 剪斷，在此過程中應保留 dura matter 之完整。待全部的脊椎完全打開後再剪開 dura，取出 spinal cord cauda equina 部份用平頭小鑷夾住上翻，spinal nerves 及 T10 spinal cord 用小尖剪剪斷，用小尖刀在其腹部(實驗側的對側)劃一道淺溝做記號以便認左右。

固定 所取出來的 spinal cord 置於 3.8% formaldehyde 約 4 小時，而後置於 30% sucrose overnight。

V. 免疫組織染色操作法(Fos-Like Immunoreactivity)

- 綱要 -

- 一、冷凍切片：-20 ， 40µm
- 二、洗淨：
- 三、消除內源性過氧化氫酵素
- 四、洗淨：
- 五、前阻斷反應
- 六、初級抗體反應：1:600 rabbit anti-c-Fos polyclonal antibody ， 室
溫下2小時
- 七、洗淨：
- 八、次級抗體反應：1:200 ， biotinylated goat anti-rabbit IgG
- 九、洗淨
- 十、聚鏈反應：1:50 ， ABC polymerization¹
- 十一、洗淨：
- 十二、呈色反應：0.1%DAB + 0.01%H₂O₂ + 0.2% nickel reaction
- 十三、洗淨：
- 十四、展片：0.4% gelatin + alcohol
- 十五、脫水、乾燥：

<p>一、<u>冷凍切片</u></p> <p>(1)準備用具:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1.戴玻片一片 2.切片刀 3.雙面刮鬚刀 4.紗布 5.PBS約100ml 6.鑷子一把 7.毛筆一枝 8.快速冷媒劑 9.冷媒(Frozen specimen embedding medium , Cryomatrix™ , Shandon) <p style="text-align: right;">(非常重要!!)</p>	<p>(1)步驟:</p> <p>(使用前)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1.先調溫度至攝氏-20 降低廂內溫度，約一小時。 2.切片刀用Acetone將油退掉 3.冷刀子 4.先用雙面刮鬚刀將spinal cord切成二段約各0.5公分 5.切片台先鋪上冷媒讓其底部隆起，置入冷凍，待其完全硬透。 6.各小段用快速冷媒劑豎立於切片台上，冷凍至Tissue變硬，約半小時。 7.拉上捍子保護刀鋒 8.將台子放置固定台，台子放置lock要先壓下調整 9.motor調整 *按至紅燈亮表示已到盡頭，需再往前一些 10.盛片之盒子放入box裏面 11.培養皿分別label A、 B、 C、 D分別加入PBS約20ml 12.**將厚度設定為40 μ m ! 13.切時可用毛筆取出Tissue放入PBS中
--	---

<p>注意事項！！</p> <p>→ 將厚度設為40µm</p> <p>→ motor退至底部會亮起紅燈，需再往前移一點</p>	<p>(使用後)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1.退刀(放置於擦手紙上等退溫至室溫，保持乾燥，噴上機油，放置於盒內) 2.將motor退至後面 3.清理台子和box用清水清洗乾淨 4.調回溫度：box(-10)object(-10) 				
<p>二、洗淨</p> <p>(1)準備用具:</p> <p>Wash Buffer</p>	<p>過程:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 用玻璃吸管將tube中Wash Buffer吸乾，再加入新的W. B。如此重覆三次，每次5mins 2. shaking(+) 				
<p>三、消除內源性過氧化氫酵素：</p> <p>(1)準備用具</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Wash Buffer 2. 30% H₂O₂ 	<p>(1)配製方法</p> <table border="0"> <tr> <td>W.B.</td> <td>2.97 ml</td> </tr> <tr> <td>30% H₂O₂</td> <td>0.03 ml</td> </tr> </table> <p>(30µl)</p> <p>(2)時間：10分鐘</p> <p>(3)shaking：(+)</p> <p>(4)溫度：室溫</p>	W.B.	2.97 ml	30% H ₂ O ₂	0.03 ml
W.B.	2.97 ml				
30% H ₂ O ₂	0.03 ml				
<p>四、洗淨</p>	<p>(如步驟二)</p>				
<p>五、前阻斷反應 (Blocking)</p> <p>(1)準備用具</p> <ol style="list-style-type: none"> 1.NGS 2.Wash Buffer 	<p>(1)配製方法</p> <table border="0"> <tr> <td>Wash Buffer</td> <td>2.7 ml</td> </tr> <tr> <td>NGS</td> <td>0.3ml (6滴)</td> </tr> </table> <p>(2)時間:20分鐘</p> <p>(3)shaking:(+)</p> <p>(4)溫度:室溫</p>	Wash Buffer	2.7 ml	NGS	0.3ml (6滴)
Wash Buffer	2.7 ml				
NGS	0.3ml (6滴)				

<p>六、<u>初級抗體反應</u>：</p> <p>(1)準備用具：</p> <p>1. rabbit anti-c-Fos antibody (1:600)</p> <p>2. NGS</p> <p>3. Wash Buffer</p>	<p>(1)配製方法：</p> <table border="0"> <tr> <td>W.B.</td> <td>2.95 ml</td> </tr> <tr> <td>NGS</td> <td>1滴</td> </tr> <tr> <td>c-Fos Antibody</td> <td>5 μl</td> </tr> </table> <p>(2)時間:2小時</p> <p>(3)溫度:室溫</p> <p>(4)Shaking:(+)</p>	W.B.	2.95 ml	NGS	1滴	c-Fos Antibody	5 μ l
W.B.	2.95 ml						
NGS	1滴						
c-Fos Antibody	5 μ l						
<p>七、<u>洗淨</u></p>	<p>(如步驟二)</p>						
<p>八、<u>次級抗體反應</u>:</p> <p>(1)準備用具:</p> <p>1. goat anti-rabbit (1:200)</p> <p>2. NGS</p> <p>3. W.B。</p>	<p>(1)配製方法:</p> <table border="0"> <tr> <td>NGS</td> <td>2滴</td> </tr> <tr> <td>secondary</td> <td>1滴</td> </tr> <tr> <td>W.B。</td> <td>10 ml</td> </tr> </table> <p>(2)時間: 1小時</p> <p>(3)溫度: 室溫</p> <p>(4)shaking:(+)</p>	NGS	2滴	secondary	1滴	W.B。	10 ml
NGS	2滴						
secondary	1滴						
W.B。	10 ml						
<p>九、<u>洗淨</u></p>	<p>(如步驟二)</p>						
<p>十、<u>聚鏈反應</u></p> <p>(1)準備用具：</p> <p>1. elite ABC complex (1:50 , Vectastain)</p> <p>2. W。 B。</p> <p><u>注意！請30分鐘前mix均勻！</u></p>	<p>(1)配製方法：</p> <table border="0"> <tr> <td>W.B.</td> <td>10ml</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>4滴</td> </tr> <tr> <td>B</td> <td>4滴</td> </tr> </table> <p>(2)時間:1小時</p> <p>(3)溫度:室溫</p> <p>(4)shaking:(+)</p>	W.B.	10ml	A	4滴	B	4滴
W.B.	10ml						
A	4滴						
B	4滴						
<p>十一、<u>洗淨</u>:</p>	<p>(如步驟二)</p>						
<p>十二、<u>呈色反應</u></p>	<p>(1)配製方法</p>						

<p>(1)準備用具:</p> <p>1.0.1% DAB</p> <p>2.0.01% H₂O₂</p> <p>3.nickel 6 mg/ml (0.2%)</p> <p>4.Tris buffer</p> <p>30mins前泡好</p> <p>(6)注意事項</p> <p>2. DAB需放置冷凍庫冷藏，且因致癌度甚高，故取用時需帶口罩及手套。反應完之反應液及容器均需加入漂白水浸泡並放置一天，之後將此溶液倒入毒液收集瓶中。</p>	<p>見Appendix I-9</p> <p>(2)時間：6-10分鐘</p> <p>(3)溫度：室溫</p> <p>(4)shaking：(+)</p> <p>A.試片</p> <p>1.為防止組織染壞，先挑數片於(4-6)反應槽進行先前之反應。</p> <p>2.請先取用13 μl 30% H₂O₂加入1ml Tris中，再抽其中50μl加入已製備妥之 2 ml (DAB +Tris)溶液。</p> <p>3.若呈色正常： 10×10倍數顯微鏡下可以清晰看出深黑色顆粒的Fos-L4細胞核背景可以清晰分辨出灰質和白質的界限</p> <p>B.正式反應。</p>
<p>十三、<u>洗淨</u>：</p>	<p>十次以上!!!</p> <p>千萬不可置入 4% Paraformaldehyde !</p>
<p>十四、<u>展片</u>:</p> <p>(1)準備用具：</p> <p>1.slides</p> <p>2.gelatin</p> <p>3.毛筆</p>	<p>(1)配製方法：</p> <p>1.gelatin 0.8 g加入112 c.c.之水 最後加入95%酒精100ml綜合</p> <p>3.以1:1or1:2對水稀釋使用(因為不對水使用則太黏稠)</p> <p>(2)注意事項:</p> <p>1.挑選無破損之組織</p>

	2. 挑選L4之組織
<p>十五、<u>脫水、乾燥</u>：</p> <p>(1)準備用具：</p> <ol style="list-style-type: none"> 1.組織放入乾燥箱一天即可 2.準備alcohol 50%、75%、95%、100% xylene I , xylene II 3.mounting medium (Entellen™ , Merck or Permout™ ,) 4.蓋玻片 (30 40) 5.針頭一支 	<p>(2)過程：</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 50% 酒精 3 分鐘 75% 酒精 3 分鐘 95% 酒精 3 分鐘 100% 酒精 6 分鐘 xylene I 6 分鐘 <p>*注意此過程之溶液需2~3星期換新的 溶液使用過之xylene溶液請勿倒入 水槽中需收回入空玻璃瓶內</p> <ol style="list-style-type: none"> 2.滴入mounting medium於戴玻片上 3.趁xylene未乾時蓋入蓋玻片，注意勿 讓氣泡存留於標本上 4.用指甲油塗抹於蓋玻片邊緣，防止 mounting medium之溶劑流失

VI. 切片觀察及記錄。(Inspection and Counting)

(一) 準備工作(Preparation)

封片：將透明指甲油塗在蓋玻片與載玻片交接的邊緣以避免空氣進入。

(二) 選取適當的切片(Identification)

(1) 辨識節片(identification of segment)：

在 5×10 之低倍率下，

逐一看過玻片上之切片並記錄出L4節片之位置

(2) 篩選數量(screening for Fos-LI)：

10×10 + 前聚焦鏡

逐一觀察切片中L4之節片之c-fos數量

記錄其約略數量為 - - 多、中等、少等三類

(3) 挑選數量(maximal Fos-LI)：

依(2)記錄結果選擇出最多量之Fos-L4(10片)

(4) 坐標的記錄(location)：

將切片的中央放置於顯微鏡中" + "

記錄顯微鏡平台上縱軸及橫軸刻度 (縱軸 \times 橫軸)。

(三) 攝影(Photocopy)

(1) 坐標(Location)：

依坐標找出所需之切片

在 5×10 之低倍率下找出記錄中c-fos量最多的切片，按print一次。

(2) 調整(Adjustment)：

10×10之中倍率，帶上前聚焦鏡

光度調至適當且調好焦距

若segment有傾斜則調整CCD，以利圖形之美觀度

找到segment之S + NP部位

按print二次(暗，亮)

(3) 螢幕上之影像往下移至下方D部位。

按print二次(暗，亮)

(四) 分層計數法

(1) 坐標(Location)：

在系列5張照片標明segment之坐標。

(2) 分層(Lamination)：

根據2)S + NP區(暗)和5)D區(暗)分界

用紅筆標出S及NP之界線。

(3) 計數(Countings)：

以紅筆點出全部之深色細胞核

依照S區、NP區、D區記錄在照片上

(五) 輸入電腦

(1) 程式(Program)：

執行excel

開啟c-fos檔中間啟c-fos data (如圖所附)

SP no.	L	S	NP	D	Total	Page

(2) 鍵入(Key in) :

將各組數據鍵入電腦中，若為12則存檔為 12.xls，依此類推並依序編上頁數於表格及照片上。

(3) 排列(Sort) :

總和依降冪排列

(4) 列印出報表。

(六) 建檔

(1) 抄錄(Booking) :

在記錄本之前頁抄錄已計算出的數據及頁數，如圖所示：

Sp.No	座標位置	L4	S	NP	D	Page	其他
data	125×15	IV					
data	90×10	IV					

(3) 黏貼(Attachment) :

照片依記載頁數在工作記錄本中。

第五節 統計分析

所有數據用 ANOVA(one way analysis of variance)分析，若有比較意義，接著利用 Dunnett's post-hoc test 比較閃尾時間，Fos-LI 標示神經元數目，福馬林注疼痛加權評分等數據。p 值若小於 0.05 視為有統計上的差異。

第四章 結果

第一節行為反應

所有大白鼠在麻醉中及麻醉結束後，都被仔細地觀察及評估其對電針刺激之行為反應。在 1% 濃度 Halothane 吸入性麻醉藥物作用下，大部份大白鼠的角膜反射(corneal reflex)及耳翼反射(ear pinna reflex)並未消失，而且在電針刺激過程中，沒有躁動及軀體移動的狀況發生，鋼針插入處亦沒有血腫或局部組織水腫的現象，麻醉結束五分鐘內，老鼠行動即恢復正常，沒有行走困難或舔後肢的情形。

第二節閃尾實驗

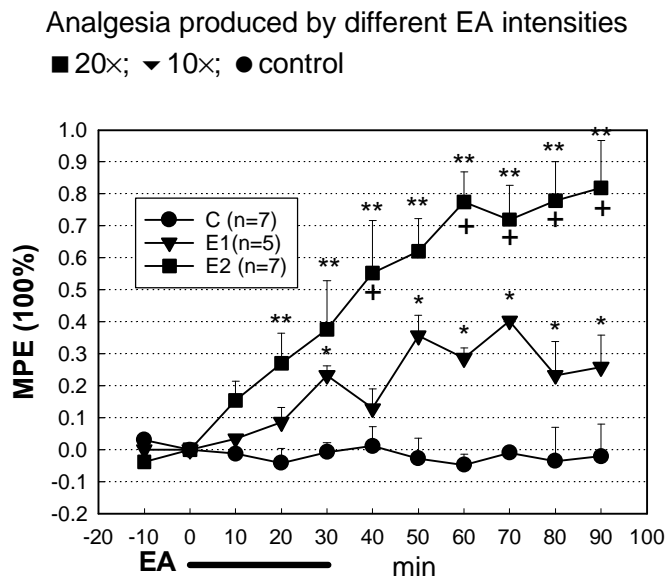


圖 4.1 大白鼠閃尾實驗結果曲線圖(一)

如圖 4.1 及圖 4.2 所顯示，控制組大白鼠的閃尾時間保持相當穩定，不受 2 小時吸入性全身麻醉的影響。電針刺激不論弱刺激或強刺激相對於控制組皆明顯地增加閃尾時間。兩組的止痛效果逐漸增加，在電針刺激 20 分鐘後呈現較明顯的變化($P < 0.05$)。在 10xEAT 那組，兩個 MPE 高峰出現在電針刺激後 50 分鐘($31.74 \pm 8.4\%$)及 70 鐘($28.58 \pm 2.55\%$)，

然而 20xEAT 組則出現在電針刺激後 60 鐘($72.50 \pm 16.87\%$)及 90 鐘($71.04 \pm 15.25\%$)，這種止痛效果遠遠超過電針刺激期間，而兩組皆可觀察到 MPE 值在個體間呈現頗大之差異。

將電針強弱刺激組予以比較，20xEAT 組相較於 10xEAT 組於電針刺激停止後 30 分鐘，產生更強之止痛效果($P < 0.05$)，值得注意的是 20xEAT 組，在觀察期間(電針刺激停止後 60 分鐘)其止痛效果並沒減退，相反地卻呈現穩定地上升。

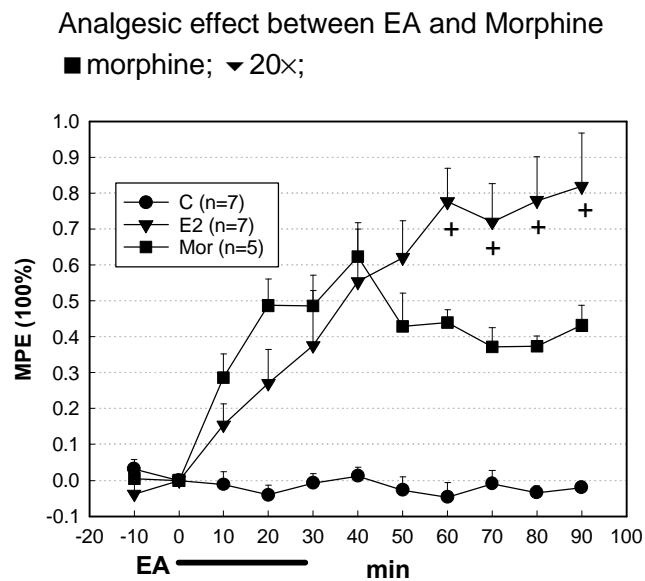


圖 4.2 大白鼠閃尾實驗結果曲線圖(二)

第三節 福馬林疼痛反應實驗

EF, MF 及控制組皆呈現典型的雙相反應(biphasic response)(圖 4.3)。首先，強烈的機械性刺激，造成一連串初級傳入性神經纖維之活動性提高，持續大約 5 分鐘(早期 early phase)，之後大約 10 分鐘短暫的靜止間期，接著 40 分鐘，由於持續性的傷害受體(nociceptors)發炎性刺激，導致初級傳入性神經纖維活動性上升(晚期 late phase)，這與許多報告相似^{41, 42, 43, 44}。無論 EF 或 MF 組相較於控制組於雙相反應晚期，皆呈現較低的福馬林疼痛行為加權評分($P < 0.05$)，不過 EF 及 MF 組間沒有統計學上的差異($P > 0.05$)。由於兩組於福馬林注射疼痛實驗中皆能表現

明顯的抗痛性效果(antinociceptive effect)，我們推論 EF 組其止痛效果相當於 2.5mg/kg 劑量 morphine 的效力。除此之外，早期疼痛行為加權評分沒有明顯下降，顯示出 EA 無法抑制短暫而強烈的機械性疼痛。(圖 4.3)由於在閃尾實驗中，我們觀察到於電針刺激結束後，EA 展現出超過 60 分鐘的後止痛效果(after-effect)。因此我們相信 EF 於晚期疼痛加權評分明顯降低是由於電針刺激的影響。

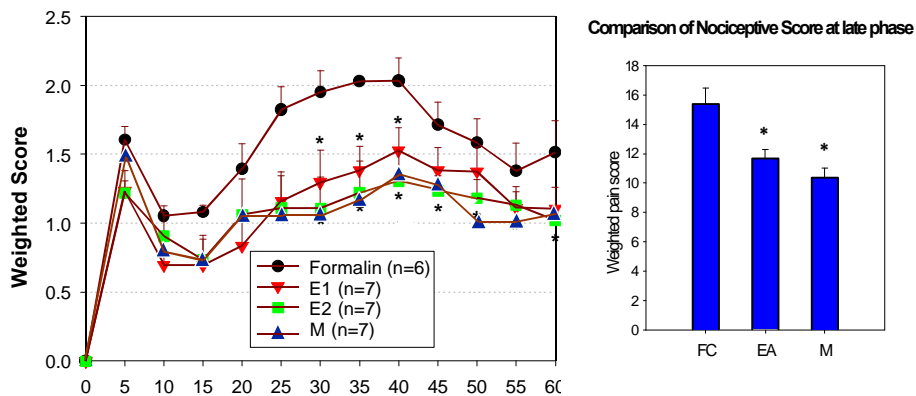


圖 4.3 大白鼠福馬林注射實驗結果曲線圖

第四節 Fos 免疫染色度(Fos-like immunoreactivity)

無論 control 組及 EA-control 組在脊髓背角都僅呈現稀疏的免疫染色反應(圖 4.4)。

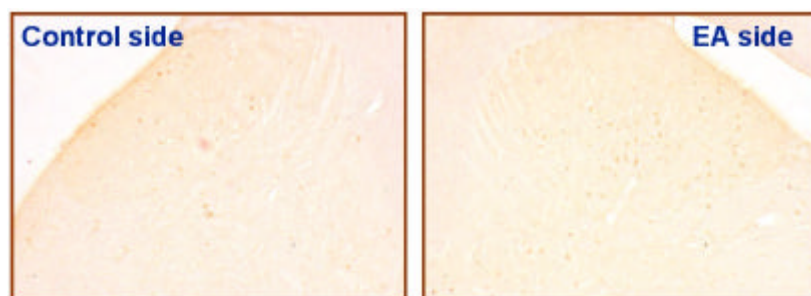


圖 4.4 大白鼠 EC 組脊髓背角免疫染色反應圖

右側的背角神經元，也就是 EA 刺激同側，Fos-LI 細胞沒有呈現統計上明顯的增加($P>0.05$)(圖 4.5)。

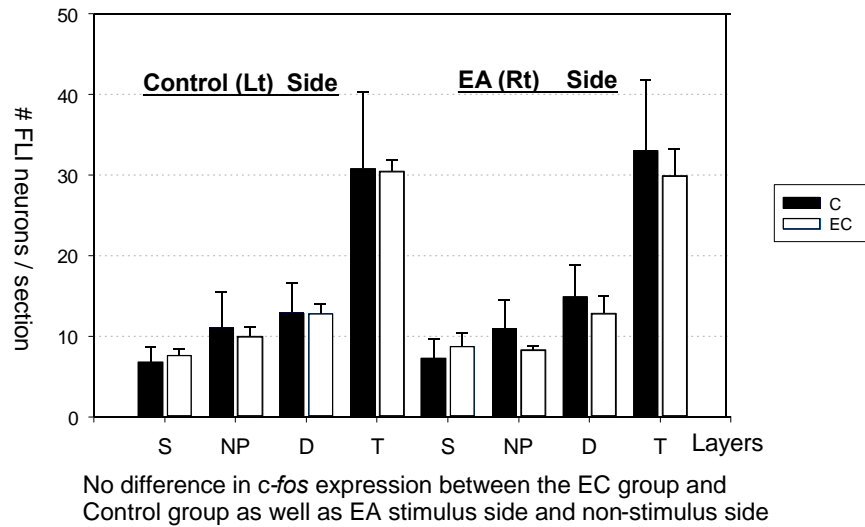


圖 4.5 大白鼠 C 組及 EC 組脊髓背角 *c-fos* 活性表現柱狀圖

雖然過去推測 EA 強度若要獲致止痛效應，就要達到傷害性刺激的程度。我們的結果顯示沒有活化背角中傷害接受神經元(nociceptive neurons)的表現。至於在 FC 組，於 1%formalin 注射左後肢後，同側背角神經元明顯表現出 *c-fos* 的典型反應(圖 4.6)，

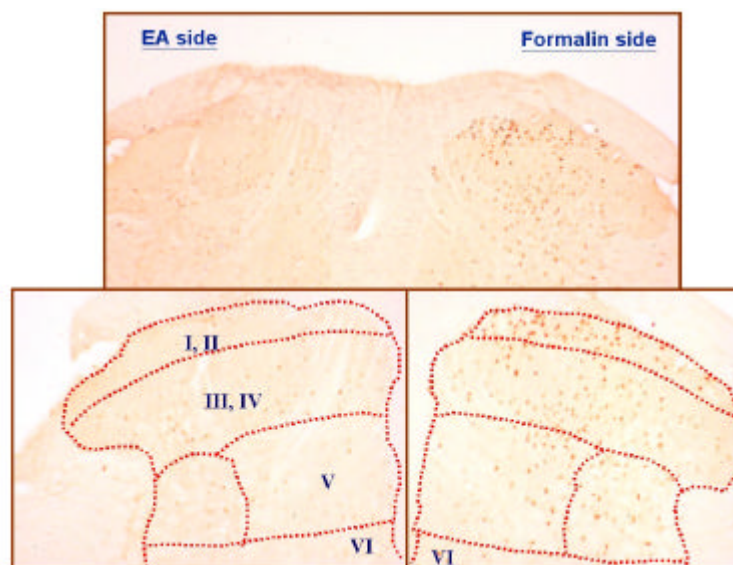


圖 4.6 大白鼠 EF 組脊髓背角免疫染色反應圖

尤其是在淺層(superficial layer)及深層(deep layer)，右側背角則少很多。若 EA 或 2.5mg/kg 劑量 morphine 先前處理過，與 FC 組比較，則由福馬林刺激造成的傷害性反應，呈現在 Fos-LI 細胞分別減少 25% 及 20%，均較控制組有明顯差異($P < 0.05$)。若以解剖位置檢視，其降低主要表現在深層(deep layer)(圖 4.7)。

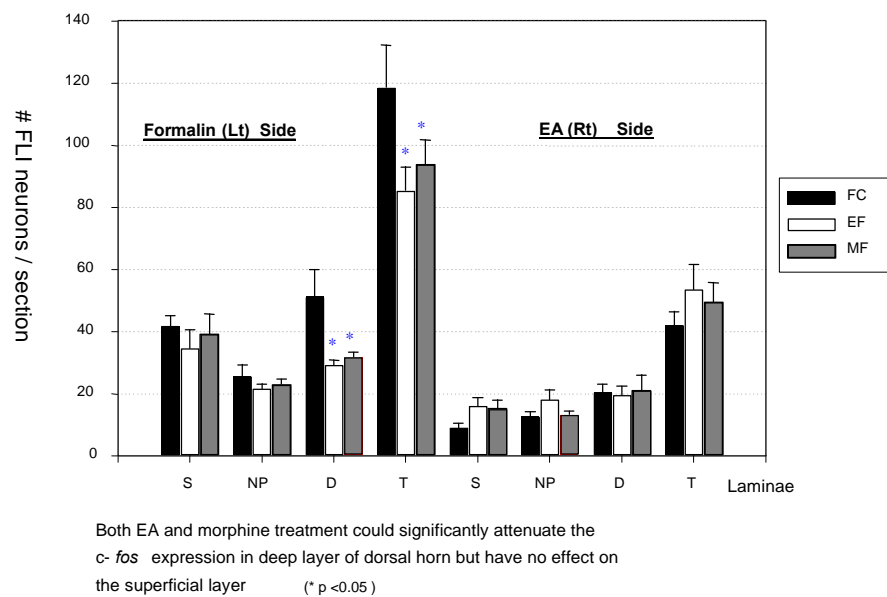


圖 4.7 大白鼠 FC 組 EF 組及 MF 組 c-fos 活性表現柱狀圖

EA 及 MF 組間其降低程度，在統計學上則無差異($P > 0.05$)。而在右側背角 EF 組及 MF 組與 FC 組比較其 Fos-LI 細胞之表現則均無明顯差異($P > 0.05$)。EC 組，左右兩側背角之 Fos-LI 細胞表現則亦無差異($P > 0.05$)。

第五章 討論

第一節 電針刺激強度與止痛效果

我們的數據顯示，低頻電針穴位刺激在大白鼠閃尾實驗，可延長閃尾時間，並且延長程度與刺激強度呈現正向關連性，亦就是說較強之電針刺激對大白鼠之閃尾反射有較強之抑制作用。另外，我們的數據亦顯示電針之強刺激亦可降低福馬林疼痛行為加權評分及減少脊髓中之 Fos-LI 神經元。然而，背角神經元之 Fos 免疫染色亦顯示，這些強刺激並不致引起感覺接受區神經元 c-fos 表現的明顯上升。這些數據似乎暗喻電針之止痛效果，在刺激強度沒有超過週圍神經傷害受體活化閾值，其止痛效果是與其刺激強度成正向關係。

第二節 止痛機轉之探討

最近的研究已經証實脊髓背角神經元在接受傷害性刺激 (nociceptive stimulation) 後，其 Fos 活性表現在與刺激區同皮節 (dermatome) 之 脊髓神經 lamina I, II, V。並且其表現活性，可被一些止痛效果所抑制，例如給予 morphine⁴⁵，noradrenalin⁴⁶，甚至不同皮節區的傷害刺激⁴⁷。一般來說，在發炎組織(例如大白鼠後腳之福馬林注射)，周邊的傷害性神經訊號首先主要經由非髓鞘性 C 纖維 (non-myelinated C fiber) 傳遞至脊髓神經之 lamina I-II⁴⁸，接著經由一連串的疼痛輸入訊號或是藉由中間神經元(interneuron)之活化，將深部神經元敏感化(sensitization)⁴⁹，藉由此種中樞致敏化作用(central sensitization)，可激化許多原本在脊髓傷害接受區沈息(silence)之神經元，造成疼痛訊號時間上的延長及疼痛感覺區的擴大⁵⁰。而我們的發現顯示電針刺激可以抑制大白鼠脊髓背角深部(lamina V, VI)的 Fos 活性表現，但是在淺層部位(lamina I, II)則沒有此種抑制作用。這些結果，我們認為可能是福馬林注射肢對側之電針刺激經由下行性抑制調節 (descending inhibitory modulation) 起了對中樞致敏化作用之抑制。造成注

射邊深部神經元超極化(hyperpolarization)之間接止痛效果。當然，這僅是推論而已，我們需要更深入的研究來証實我們的推論。

第三節 吸入性全身麻醉優點之探討

為了避免強烈的電針刺激或清醒時的束縛感使大白鼠產生壓力性止痛(stress analgesia)作用⁵¹，以致強化了針灸止痛效果^{52, 53}。我們對大白鼠施行全身麻醉以避免這些干擾因素，而且這是目前就我們所知第一例以吸入性全身麻醉之動物模型閃尾實驗。在我們的前置研究(pilot study)中，我們發現 1%的 Halothane 濃度，在長達 120 分鐘的麻醉過程中閃尾時間沒有改變而呈現穩定的線型。0.5%及 0.75%的 Halothane 濃度則呈現不穩定的波動線型，可能是淺麻醉狀態下，仍無法避免壓力性止痛效應。至於 1.25%的 Halothane 濃度則呈現強烈的閃尾時間延長效果，表示其麻醉止痛作用明顯，這會形成干擾因子。所以我們認為 1%的 Halothane 濃度對此動物模型是合宜的，而吸入性全身麻醉更具有穩定的麻醉深度(避免壓力性止痛效應)，及容易恢復清醒(較不易干擾福馬林注射行為反應的觀察結果)的優點。相反，無論靜脈，腹腔或皮下注射，均無法保持穩定的麻醉深度(無法保持穩定的藥物血中濃度)，更由於藥物容易累積在脂肪組織不易代謝，造成較長的麻醉後恢復時間(吸入性麻醉藥物，易 wash in 及 wash out)。綜觀之，由於具有較佳的麻醉深度控制，及較易麻醉恢復的優點，因此我們推荐在電針止痛的動物模型中，採用吸入性全身麻醉方式代替注射性全身麻醉。

第四節 止痛高峰延遲效應之探討

止痛高峰延遲效應(delay peak analgesic effect)是另一個明顯的發現。我們注意到無論 20xEAT 或 10xEAT 組的止痛高峰皆出現在電針刺激期外，甚至 20xEAT 組出現持續性疼痛閾值昇高效應。大部份以往的電針研究顯示閃尾實驗最大的抑制作用出現在電針刺激時間終點，或是靠近電針刺激時間終點，通常刺激停止後其抑制作用會隨著時間逐漸消退^{54, 55, 56, 57}。為什麼有如此的差異性呢?可能是不同的實驗設計所致，

吸入性麻醉藥物可能改變了針灸止痛機轉的中樞神經整合作用，以致延遲了對傷害性刺激的抑制反應高峰。另外，我們僅電針刺激單側後肢，相對於雙側後肢刺激，也許較少的能量總量導致電針刺激期的最大止痛效果被降低及延長，不過這僅是推測，我們需要更多的研究來証實或解釋我們的觀察結果。

第五節 電針刺激強度是否類同藥物學上之劑量

強刺激的電針止痛效果無論在閃尾實驗或福馬林注射實驗均與 morphine 為 2.5mg/kg 劑量皮下注射效果相當。(弱到中等強度的止痛效果)。另外，電針刺激或 2.5mg/kg 劑量的 morphine 均無法抑制福馬林注射實驗中由於機械性刺激造成的第一陣疼痛(phasic pain)，而其後由於發炎反應造成的隱痛(tonic pain)，則有明顯的止痛效果，這個結果與 Ren 及 Han⁵⁸(3mg/kg)的發現差不多，但是比 Takeshige(0.5mg/kg)等人⁵⁹的發現明顯較強。原因大概是 Takeshige 的研究使用僅足以使老鼠後肢肌肉收縮之弱刺激電針，從我們的觀察結果及他人的研究報告，我們可以合理的推論，電針刺激的強度(劑量與止痛效果)，和藥物學上劑量與藥效的關連性大致是相當的。

第六節 實驗之條件控制是否合宜

在活體(in vivo)的動物實驗中，強光⁶⁰，噪音⁶¹，驚嚇⁶²等非疼痛刺激都可以誘導腦幹及大腦皮質區 Fos 蛋白的形成。在細胞培養皿(in vitro)中，它對多種藥物都有反應，差別只是反應強弱不同而已⁶³。因此，需要克服這些可能干擾實驗品質的因素。克服的方法就是控制環境變數。利用良好的對照組設計，內在的也好(非刺激的對側)，外在的也好(其他條件完全相同的對照組)，就可擺脫這個問題的糾纏。C 組及 FC 組顯示，大白鼠脊髓背角 Fos 活性無論左側或右側皆沒有明顯改變。顯示我們的實驗條件控制是合宜的，並沒有產生干擾因素。

第六章 結論

我們的研究結果顯示低頻電針刺激在閃尾實驗的止痛效果是與刺激強度成正向關係，也就是說較強的刺激可產生較強及較長的止痛效果。c-fos 染色觀察顯示 20xEAT 的電刺激大約與 2.5 mg/kg morphine 的止痛效果相當。另外，我們也推荐吸入性全身麻醉，其優點具有較佳的麻醉深度及迅速的麻醉後恢復，可減少大白鼠電針止痛模型的干擾因素。

參考文獻

- 1 林昭庚 新針灸大成 中國醫葯學院針灸研究中心 82.1 p991
- 2 黃維三 針灸科學 正中書局 84.7 p6
- 3 WHO Interregional Seminal
- 4 US Food and Drug Administration (FDA) entitled “Workshop on Acupuncture” , 1994
- 5 NIH Consensus Development Panal Program and Abstract , 1997
- 6 林昭庚 新針灸大全 中國醫葯學院針灸研究中心 82.1 p136
- 7 黃維三 針灸科學 正中書局 84.7 p57 , p170
- 8 Asbram SE: 1992 Bonica Lecture. Advances in chronic pain management since gate control. Regional Anesthesia. 18:66-81;1993.
9. Takeshige C , Zhao WH , Guo SY: Convergence from the preoptic area and arcuate nucleus to the median eminence in acupuncture and nonacupuncture point stimulation analgesia. Brain Res Bull , 1991 , 26:771-78
- 10 Takeshige C , Sato T , Mera T , Hisamitsu T , and Fang J: Descending pain inhibitory system involved in acupuncture analgesia. Brain Res Bull. 1992 , 29:617-634
- 11 Richard S. S. Cheng , Bruce Pomeranz: Electroacupuncture analgesia could be mediated by at least two pain-relieving mechanisms: endorphin and non-endorphin systems. Life Sci 1979;25:1957-1962.
- 12 Han JS: Neurochemical basis of acupuncture analgesia Ann Rev. Pharmacol Toxicol 1982;22:193-220.
- 13 Chen XH, Han JS: All three types of opioid receptors in the spinal cord are important for 2/15 Hz electroacupuncture antinociception. Eur J Pharmacol. 1992;211:203-10.
- 14 Fei H , Xie GX , Han JS: Differential release of meta-enkephalin and dynorphin in spinal cord by electroacupuncture of different frequencies. Chin Sci Bull. 1987;32:1496-1501.
- 15 Xie GX , Han JS: Antinociception produced by electroacupuncture of

- different frequencies are mediated by different varieties of opioids in the spinal cord. *Chin Sci Bull.* 1985;30:385-391.
- 16 Kazuo Toda , Masamichi Ichioka: Electroacupuncture: Relations between forelimb afferent impulses and suppression of jaw-opening reflex in the rat. *Experimental neurology* 1978;61:465-470.
 - 17 Romita VV , Suk A , Henry JL: Parametric studies on electroacupuncture-like stimulation in a rat model: Effects of intensity , frequency , and duration of simulation on evoked antinociception. *Brain Research Buletin* 1997;42:289-296.
 - 18 Hunt SP , Pini A , Evan G: Induction of c-fos-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation. *Nature* 1987;328:632-634.
 - 19 Bullitt E: Induction of c-fos-like within the lumbar spinal cord and thalamus of the rat following peripheral stimulation. *Brain Res* 1989; 493:391-397.
 - 20 Menetrey D , Gannon A , Levine JD , AI Basbaum: Expression of c-Fos protein in interneurons and projection neurons of the rat spinal cord in response to noxious somatic , articular , and visceral stimulation. *J Comp Neurol* 1989; 285:177-95.
 - 21 Presley RW , Menetrey D , Levine JD , Bausbaum AI: Systemic mmorphine suppress noxious stimulus-evoked fos protein-like immunoreactivity in the rat spinal cord. *J Neurosci* 1990;10:323-335.
 - 22 Hammond DL , Presley R , Gogas KR , Basbaum AI: Morphine or U-50 , 488 suppresses Fos protein-like immunoreactivity in the spinal cord and nucleus tractus solitarii evoked by a noxious visceral stimulus in the rat. *J Comp Neurol* 1992;315:244-253.
 - 23 Curran T , Morgan JI: Superinduction of neuronal acetylcholine receptors induces rapid gene transcription. *Science* 229:1265-1268;1985
 - 24 Morgan JI , Curran T: Stimulation-transcription coupling in the nervous system: Involvement of inducible proto-oncogenes fos and jun. *Annual Review of Neuroscience* , 14:421-451;1991
 - 25 Shen M , Greenberg ME: The regulation and function of c-fos and other

- immediate early gene in the nervous system. *Neuron* , 4:477-485;1990
- 26 Harris JA: Using c-fos as a neural marker of pain. *Brain Research Bulletin* 1998;45:1-8.
- 27 Willis WD , Coggeshall RE: Sensory mechanisms of the spinal cord. Plenum Press , New York. 1991.
- 28 Presley RW , Menetrey D , Levine JD , Bausbaum AI: Systemic morphine suppress noxious stimulus-evoked fos protein-like immunoreactivity in the rat spinal cord. *J Neurosci* 1990;10:323-335
- 29 Gogas KR , Presley RW , Levine JD , Bausbaum AI: The antinociceptive action of supraspinal opioids results from an increase in descending inhibitory control: correlation of nociceptive behavior and c-fos expression. *Neuroscience* 1991;42:617-628.
- 30 Williams S , Evan GI , Hunt SP: Changing patterns of c-Fos in spinal neurons following thermal cutaneous stimulation in the rat. *Neurosci* 1990;36:73-81.
- 31 Bullitt E: Expression of c-fos-like protein as a maker for neuronal activity following noxious stimulation in the rat. *J Comp Neurol* 1990;296:517-530.
- 32 Pretel S , Piekut DT: Enkephalin , substance P , serotonin axonal input to c-Fos-like immunoreactive neurons of the rat spinal cord. *Peptides* 1991;12:1243-1250.
- 33 Karin M , Smeal T: Control of transcription factors by signal transduction pathways: the beginning of the end. *TIBS* 1992;17:418-422.
- 34 孫維仁, 陳大樑, 范守仁, 黃芳彥: 止痛機轉與細胞致癌基因的關係, *中華民國疼痛醫學雜誌* 1991;1:101-103.
- 35 Hamba M. and Toda K: Rat hypothalamic arcuate neuron response in electroacupuncture-induced analgesia. *Brain Res Bull* 1988;21:31-35.
- 36 Han JS , Chou PH , Lu ZC , Yang TH , Lu LH and Ren MF: The role of central 5-hydroxytryptamine in acupuncture analgesia. *Sci Sin.* 1979;22:91-104.

- 37 Pomeranz BH , Cheng R , and Law P: Acupuncture reduces electrophysiological and behavioral responses to noxious stimulation: pituitary is implicated. *Exp Neurol* 1977;54:172-8.
- 38 Wang Q , Mao L , Han JS: The arcuate nucleus of hypothalamus mediates low but not high frequency electroacupuncture analgesia in rats. *Brain Res* 1990;513:60-6.
- 39 Dubuisson D , Dennis SG: The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine , meperidine , and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain* 1997;4:161-174.
- 40 Sun WZ , Shyu BC , Shieh JY: Nitrous oxide or halothane , or both , fail to suppress c-fos expression in rat spinal cord dorsal horn neurons after subcutaneous formalin. *British J Anesth* 1996;76:99-105.
- 41 Dubuisson D , Dennis SG: The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine , meperidine , and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain* 1997;4:161-174.
- 42 McCall WD , Tanner KD , Levine JD: Formalin induces biphasic activity in C-fiber in the rat. *Neurosci. Lett* 1996;208:45-58.
- 43 Iversen MA , Basbaum AI , Abbadie C , Rohde DS , McKay WR , Taylor BK: The differential contribution of capsaicin-sensitive afferents to behavioral and cardiovascular measures of brief and persistent nociception and to Fos expression in the formalin test. *Brain Research* 1997;755:9-16.
- 44 Arne Tjolsen , Odd-Geir Berge , Steinar Hunskaar , Jan Henrik , and Kjell Hole: Review article The formalin test: an evaluation of the method.
- 45 Presley RW , Menetrey D , Levine JD , Basbaum AI: Systemic morphine suppresses noxious stimulus-evoked Fos protein-like immunoreactivity in the rat spinal cord. *Journal of Neuroscience* , 10:323-335;1990.
- 46 Jones SL: Noradrenergic modulation of noxious heat-evoked Fos-like immunoreactivity in the dorsal horn of the rat spinal cord. *Journal of Comparative Neurology* , 325:435-445;1992
- 47 Morgan MM , Gogas KR , Basbaum AI: Diffuse noxious inhibitory

- controls reduce the expression of noxious stimulus-evoked Fos-like immunoreactivity in the superficial and deep laminae of the rat spinal cord. *Pain* 56:347-352;1994.
- 48 Besson JM , Chaouch A: Peripheral and spinal mechanisms of nociception. *Physiol Rev* 1987;67:67-154.
- 49 孫維仁 , 侯文詠 , 郭青齡 , 郭柏齡: 疼痛訊號傳遞過程之分子生物學機轉. *疼痛醫學雜誌* 1995;5:81~92
- 50 Cook AJ, Woolf CJ, Wall PD, McMahon SB: Dynamic receptive field plasticity in rat spinal cord dorsal horn following c-primary afferent input. *Nature* 1987;325:151-153.
- 51 The Management of Pain John J.Bonica 2nd Edition p117~11912.
Bullitt E: Induction of c-fos-like within the lumbar spinal cord and thalamus of the rat following peripheral stimulation. *Brain Res* 1989; 493:391-397.
- 52 Bruce Pomeranz.: Relation of stress-induced analgesia to acupuncture analgesia. *Annals of the New York academy of Science.* 1986;467:444-447.
- 53 alman anit , Z. Harry Galina: Stress-induced analgesia: adaptive pain suppression. *Physiological reviews* 1986;66:1091-1120.
- 54 Romita VV , Yashpal K , Hui-Chan CWY , Henry JL: Intense peripheral electrical stimulation evokes brief and persistent inhibition of nociceptive tail withdrawal reflex in the rat. *Brain research* 1997;761:192-202.
- 55 Romita VV , Suk A , Henry JL: Parametric studies on electroacupuncture-like stimulation in a rat model: Effects of intensity , frequency , and duration of stimulation on evoked antinociception. *Brain Res Bull.* 1997;42:289-296.
- 56 Takeshige C , Kobori M , Hishida F , Luo CP , Usami S: Analgesia inhibitory system involvement in nonacupuncture point-stimulation-produced analgesia. *Brain Research Bulletin* 1992;28:379-391.

- 57 Chen XH, , Geller EB, Adler MW: Electrical stimulation at traditional acupuncture sites in periphery produces brain opioid-receptor-mediated antinociception in rats. *Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 1996;277:654-660.
- 58 Ren MF, Han JS: Rat tail flick acupuncture analgesia model. *Chin Med J* 1979;92:576-582.
- 59 Chifuyu Takeshige, Masao Kobori, Fumi Hishida, Chan-pin Luo, Shino Usami: Anaesthesia inhibitory system involvement in nonacupuncture point-stimulation-produced analgesia. *Brain Res Bul* 1992;28:379-391.
- 60 Sagar SM, Sharp FR: Light induces a Fos-like nuclear antigen in retinal neurons. *Mol. Brain Res* 1990;7:17-21.
- 61 Sato K, Houtani T, Ueyama T, Ikeda M et al.: Mapping of the cochlear nucleus subregions in the rat with neuronal Fos protein induced by acoustic stimulation with low tones. *Neurosci Lett* 1992;142:48-52.
- 62 Ceccatelli S, Villar MJ, Goldstein M, Hokfelt T: Expression of c-Fos immunoreactivity in transmitter-characterized neurons after stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:9569-9573.
- 63 Smeyne RJ, Vendrell M, Hayward M, Baker SJ et al.: Continuous c-fos expression precedes programmed cell death. *Nature* 1993;363:166-169.

<p>附錄一：</p> <p>working solution配製</p>

一般 Buffer 之配法:

1. 3.8% Paraformaldehyde in PBS

1D-H2O	2000 ml	1000 ml
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	6.35g	3.18g
Na ₂ HPO ₄	22.72g	11.36g
Paraformaldehyde	80.00g	40.00g
NaCl	18.00g	9.00g

注意事項：1. pH需調整為7.3~7.4之間

2. 泡好之溶液以深棕色廣口玻璃瓶裝，以貼紙做好標示日期
冷藏之

2. 0.1M PBS

1D-H2O	2000 ml	1000 ml	3000 ml
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	6.35 g	3.18 g	9.54 g
Na ₂ HPO ₄	22.72 g	11.36 g	34.08 g
NaCl	18.00 g	9.00 g	27.06 g

注意事項：1. pH需調整為7.3~7.4之間

2. 泡好之溶液以透明玻璃瓶裝，以貼紙做好標示不必冷藏

3. Wash Buffer

Triton-100	10 ml	20 ml
PBS	490 ml	980 ml
Total	500 ml	1000 ml

4. 30% SUCROSE

PBS	100 ml
SUCROSE	30 g

5. 前阻斷反應:Blocking

NGS	0.3 ml(6滴)
Wash Buffer	2.7 ml
Total	3 ml

6. 初級抗體反應 (1:600 rabbit anti-c-fos)

c-fos	5 μ l
NGS	0.05 ml
W.B.	2.95 ml
Total	3 ml

7. 次級抗體反應:

	藥品顏色	配製	注意
次級抗體	藍色	1 滴/10 ml(1:200)	

1% NGS	2滴
次級抗體	1滴
W.B.	10 ml
Total	10 ml

8. 聚鏈反應：

= ABC polymerization (1:50 ABC complex)

A	灰色	4 滴	於用前30分鐘配好
B	灰色	4 滴	於用前30分鐘配好
W.B.		10 ml	

9. 呈色反應

= 0.1% DAB+0.01% H₂O₂+ 0.2% nickel reaction

DAB	7 mg	15 mg	40 mg
H ₂ O ₂	5 µl	10 µl	13 µl
nickel (3 mg/ml)	1.2 ml	2.4 ml	1.0 ml
Tris buffer	13.8 ml	27.6 ml	38.8 ml
Total	15 ml	30 ml	40 ml

- * 注意事項：
1. 0.01% H₂O₂ 要等其它溶質完全溶解後,於使用前才加入
 2. 使用前30分鐘製備
 3. DAB溶解時請勿加熱

附錄二：
stock solution配製

1. Tris Buffer

Tris Buffer	80 ml	160 ml	240 ml	360 ml	400 ml
Tris	0.04 (g)	0.08 (g)	0.12 (g)	0.16 (g)	0.2 (g)
	80 (ml)	160 (ml)	240 (ml)	360 (ml)	400 (ml)

- 注意事項： 1. pH需調整為7.3~7.4之間
2. 泡好之溶液以透明玻璃瓶裝，以貼紙做好標示冷藏之

2. Nickel (50 mg/ml)

總量	25 ml	50 ml	75 ml	100 ml
Nickel	1250 mg	2500 mg	3750 mg	5000 mg
Tris	25 ml	50 ml	75 ml	100 ml

- 注意事項： 1. pH需調整為7.3~7.4之間
2. 泡好之shock溶液以透明玻璃瓶裝，以貼紙做好標示冷藏之

3. gelatin

0.8g 加入 112 ml 之水隔水加熱至溶解，再加入 95%酒精 100ml

英文摘要

Clinical experience has observed that analgesic effect of electroacupuncture (EA) depends largely on the presence of “De-Qi”, a deep aching sensation evoked by acu-point stimulation. Despite the well-known phenomenon of De-Qi in clinical practice, it remains unclear whether stimulation-evoked nociceptive response is required for EA-induced analgesia. In this animal study, we hypothesized that stronger EA intensity could result in higher analgesic effect, i.e. more De Qi. We also tried to examine the analgesic mechanism of EA by formalin-induced c-fos expression in rat spinal cord dorsal neurons.

Animal in this study were anesthetized by halothane inhalation to eliminate the bias from stress-induced analgesia. Maximal possible effect (MPE) of tail flick test was used to compare the analgesic effect between high intensity [20xEAT(electroacupuncture threshold)], low intensity (10xEAT) and morphine (2.5mg/kg s.c., the positive control group). In addition, we also evaluated EA-induced analgesic effect using behavioral parameters (weighted pain score) and neuronal activity marker (Fos-like immunoreactivity (Fos-LI) labeled neurons of spinal dorsal horn of rat) after intraplantar formalin injection. All data were compared by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnetts` post-hoc test performed to compare the mean of tail flick latencies, number of Fos-LI labelled neurons, pain scores at the late phase of formalin test, and pain scores in the whole period between

groups. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Our results demonstrated that the low frequency EA prolonged the tail flick latency in an intensity-dependent manner, i.e., the higher stimulation intensity the more inhibitory effect on tail withdrawal reflex is produced. We also showed that the equipotent analgesic effect on formalin-induced pain between high intensity EA and morphine group with evidence of decreased pain scores and reduced Fos-LI neurons in spinal level more than control group. However, these strong peripheral electrostimulations did not incur detectable increase in c-fos expression of neurons at sensory receptive field than baseline level. These results implied that the efficacy of EA analgesia could be generated in proportional to its stimulation intensity within the strength not exceeding the threshold of recruiting nociceptor activation.

Keywords: Electroacupuncture, c-fos protein, Tail-flick test, Halothane, Immunohistochemistry, Formalin test

