

中國醫藥學院中國醫學研究所 博士論文

指導教授：林昭庚 教授 (Jaung-Geng Lin)

共同指導教授：孫維仁 副教授 (Wei-Zen Sun)

論 文 題 目

**電針刺激與一氧化氮合成酵素抑制劑結合的鎮痛研究
- 以福馬林疼痛測試與 Fos 蛋白測量之大白鼠模式**

THE STUDY OF ELECTROACUPUNCTURE AND NOS INHIBITOR ON ANALGESIA
-BY THE MODE OF FORMALIN STIMULATION AND MEASUREMENT OF FOS
PROTEIN IN WISTAR RATS

研究生：曹永昌 (Yun-Tson Tsao)

中華民國九十二年七月三日

目 錄

| | |
|------------------------------------|----|
| 第一章 前言..... | 1 |
| 第二章 文獻探討..... | 3 |
| 一、痛覺..... | 3 |
| 二、痛覺之傳導及神經調制..... | 3 |
| A. 損傷性刺激引起傷害性感受器興奮..... | 3 |
| B. A 和 C 傷害性感受器分別傳導刺痛和灼痛..... | 4 |
| C. 激活傷害性感受器的致痛物質..... | 5 |
| D. 脊髓背角是痛覺的初級中樞..... | 7 |
| E. P 物質和興奮性氨基酸介導傷害性初級傳入向背角的傳遞..... | 9 |
| 三、針刺鎮痛..... | 10 |
| A. 針刺鎮痛有關之神經傳導..... | 10 |
| B. 針刺鎮痛與鴉片樣物質之關係..... | 10 |
| C. 針刺耐受與抗鴉片樣物質之關係..... | 11 |
| D. 針刺鎮痛與單胺類物質之關係..... | 11 |
| E. 不同頻率電針鎮痛之研究..... | 12 |
| 四、疼痛的分子生物學研究..... | 14 |
| A. 初級訊息傳遞者—疼痛訊號的產生和製造..... | 15 |
| B. 次級訊息傳遞者—疼痛訊號的放大..... | 17 |
| C. 三級訊息傳遞者—訊號的維持與執行..... | 21 |
| 五、過敏性疼痛的評估與實驗方法..... | 26 |
| A. Fos 蛋白質在疼痛訊號傳遞過程中扮演的角色..... | 26 |
| B. Fos 作為疼痛指標的限制..... | 27 |
| C. 從 Fos 到過敏性疼痛的發生..... | 29 |
| 六、以福馬林皮下注射作為過敏性疼痛的研究模式..... | 30 |
| 七、足三里穴的解剖位置及功用..... | 32 |
| 八、動物實驗之髓鞘內給藥法..... | 33 |

| | |
|---|-----|
| 第三章 材料與方法..... | 36 |
| 一、實驗動物..... | 36 |
| 二、髓鞘內插管之手術方法..... | 36 |
| 三、L-NAME 的製備..... | 36 |
| 四、電針刺激..... | 37 |
| 五、固定液之灌流程序..... | 38 |
| 六、取出大白鼠脊髓之手術..... | 38 |
| 七、免疫組織染色操作法..... | 39 |
| 八、型態分析..... | 43 |
| 九、研究設計與實驗流程..... | 45 |
| 十、統計分析..... | 47 |
| 第四章 結果..... | 49 |
| 一、對照組在第一至第五腰椎左、右兩側背角的 Fos 神經細胞數..... | 49 |
| 二、不同劑量的 L-NAME 之 c-fos 表現以及疼痛行為反應..... | 49 |
| 三、不同強度電針之 c-fos 表現以及疼痛行為反應..... | 50 |
| 四、不同強度電針刺激與 L-NAME 結合的鎮痛研究..... | 51 |
| 五、10 L 電針與 L-NAME 結合的鎮痛研究..... | 52 |
| 六、20 L 電針與 L-NAME 結合的鎮痛研究..... | 53 |
| 七、不同劑量的 L-NAME 及不同強度電針之 c-fos 表現以及疼痛反應..... | 54 |
| 八、左側電針組在第一至第五腰椎左側背角的 Fos 神經細胞數..... | 54 |
| 第五章 討論..... | 75 |
| 第六章 結論..... | 85 |
| 參考文獻..... | 87 |
| 英文摘要..... | 100 |
| 誌謝..... | 102 |

圖 目 錄

| | |
|--|----|
| 圖一、脊髓腰段背角 Rexed 分層及傳入示意圖 | 9 |
| 圖二、NMDA Receptor 圖..... | 17 |
| 圖三、細胞核內 c-fos 相關疼痛訊號傳遞過程圖..... | 22 |
| 圖四、插管平台及作業情形圖..... | 35 |
| 圖五、大白鼠脊髓皮節的區分圖 | 44 |
| 圖六、大白鼠脊髓背角的分層圖 | 45 |
| 圖七、生理食鹽水對照組 L1-L5 左側背角 Fos 神經細胞數比較..... | 56 |
| 圖八、生理食鹽水對照組 L1-L5 右側背角 Fos 神經細胞數比較..... | 57 |
| 圖九、L-NAME 各組相對於對照組背角各區 Fos 神經細胞數百分比..... | 58 |
| 圖十、 L-NAME 各組福馬林注射後之疼痛加權分數..... | 59 |
| 圖十一、 L-NAME 各組福馬林注射後之注射腳顫動次數..... | 60 |
| 圖十二、 L-NAME 各組福馬林注射後大鼠之舔腳秒數..... | 60 |
| 圖十三、電針各組相對於對照組背角各區 Fos 神經細胞數百分比..... | 61 |
| 圖十四、電針各組福馬林注射後之疼痛加權分數..... | 62 |
| 圖十五、電針各組福馬林注射後之注射腳顫動次數..... | 63 |
| 圖十六、電針各組福馬林注射後大鼠之舔腳秒數..... | 63 |
| 圖十七、電針與 L-NAME 結合相對於對照組背角各區 Fos 神經細胞百分比..... | 64 |
| 圖十八、電針與 L-NAME 結合各組福馬林注射後之疼痛加權分數..... | 65 |
| 圖十九、電針與 L-NAME 結合各組福馬林注射後之注射腳顫動次數..... | 66 |
| 圖二十、電針與 L-NAME 結合各組福馬林注射後大鼠之舔腳秒數..... | 66 |
| 圖二十一、10 L 電針加 L-NAME 相對於對照組背角各區 Fos 神經細胞百分比..... | 67 |
| 圖二十二、10 L 電針與 L-NAME 結合各組福馬林注射後之疼痛加權分數..... | 68 |
| 圖二十三、20 L 電針與 L-NAME 相對於對照組背角各區 Fos 神經細胞百分比..... | 69 |
| 圖二十四、20 L 電針與 L-NAME 結合各組福馬林注射後之疼痛加權分數..... | 70 |
| 圖二十五、各實驗組相對於對照組背角各區 Fos 神經細胞數百分比..... | 71 |
| 圖二十六、各實驗組福馬林注射後之疼痛加權分數..... | 72 |
| 圖二十七、左側十倍電針組 L1-L5 左側背角 Fos 神經細胞數比較..... | 73 |
| 圖二十八、左側二十倍電針組 L1-L5 左側背角 Fos 神經細胞數比較..... | 74 |

表 目 錄

| | |
|---|----|
| 表一、傷害性感受器的分類及特性表..... | 4 |
| 表二、外周損傷部位釋放的致痛物質及作用表..... | 7 |
| 表三、3.8% Paraformaldehyde in PBS 溶劑配製法..... | 39 |
| 表四、30 % Surcose 溶劑配製法..... | 39 |
| 表五、免疫組織染色操作詳細步驟表..... | 40 |
| 表六、0.1 M PBS 溶劑配製法..... | 42 |
| 表七、Wash Buffer 溶劑配製法..... | 43 |
| 表八、Nickel (50 mg/ml) 溶劑配製法..... | 43 |
| 表九、Tris Buffer 溶劑配製法..... | 43 |
| 表十、生理食鹽水對照組 L1-L5 左側背角 Fos 神經細胞數比較..... | 56 |
| 表十一、生理食鹽水對照組 L1-L5 右側背角 Fos 神經細胞數比較..... | 57 |
| 表十二、L-NAME 各組及對照組背角各區 Fos 神經細胞數及百分比..... | 58 |
| 表十三、L-NAME 各組及對照組福馬林注射後之疼痛加權分數..... | 59 |
| 表十四、電針各組及對照組背角各區 Fos 神經細胞數及百分比..... | 61 |
| 表十五、電針各組及對照組福馬林注射後之疼痛加權分數..... | 62 |
| 表十六、電針與 L-NAME 結合及對照組背角各區 Fos 神經細胞數及百分比..... | 64 |
| 表十七、電針與 L-NAME 結合及對照組福馬林注射後之疼痛加權分數..... | 65 |
| 表十八、10 L 電針與 L-NAME 及對照組背角各區 Fos 神經細胞數及百分比..... | 67 |
| 表十九、10 L 電針與 L-NAME 及對照組福馬林注射後之疼痛加權分數..... | 68 |
| 表二十、20 L 電針與 L-NAME 及對照組背角各區 Fos 神經細胞數及百分比..... | 69 |
| 表二十一、20 L 電針與 L-NAME 及對照組福馬林注射後之疼痛加權分數..... | 70 |
| 表二十二、各實驗組及對照組 L4 背角各區 Fos 神經細胞數百分比..... | 71 |
| 表二十三、各實驗組及對照組福馬林注射後之疼痛加權分數..... | 72 |
| 表二十四、左側十倍電針組 L1-L5 左側背角 Fos 神經細胞數比較..... | 73 |
| 表二十五、左側二十倍電針組 L1-L5 左側背角 Fos 神經細胞數比較..... | 74 |

電針刺激與一氧化氮合成酵素抑制劑結合的鎮痛研究

- 以福馬林疼痛測試與 Fos 蛋白測量之大白鼠模式

中國醫藥學院中國醫學研究所

研究生：曹永昌

指導教授：林昭庚

摘要

疼痛是每個人必定都有的經驗，各種疼痛無時不在困擾著人類，雖然多年來許多學者從臨床和基礎等各種不同的角度對痛和鎮痛的問題進行研究，不斷地研究出新的止痛藥物及止痛方法。然而在中國數千年的傳統醫學裡，針灸一直是獨具一格地延用至今，連世界衛生組織也廣泛承認其療效，並不遺餘力地推廣其臨床應用。我們經過了針灸安全性、舒適性及甩尾鎮痛等一系列的研究後，確定電針在良好的參數控制下是一項安全又可靠的治療工具，而其療效評估更是能否在鎮痛領域中獨顯風騷的關鍵；因此我們設計一系列電針刺激與一氧化氮合成酵素抑制劑（L-NAME）脊髓給藥之鎮痛研究。

全身性給予 NOS 抑制劑（L-NAME）包括了周邊消炎以及中樞神經的效果，因此必須從脊髓腔給予藥物才能排除 NOS 抑制劑的周邊消炎作用，並進一步了解周邊刺激之後，脊髓內的被活化的 NO 對於神經活動以及相關的疼痛行為的影響。結果顯示：（一）L-NAME 脊髓注射（300、1000、3000 nM）不僅可以降低早期及晚期階段福馬林疼痛反應，亦呈現以劑量依賴的方式降低福馬林刺激後脊髓 Fos 標記神經細胞的總量；而電針足三里穴（10R、10L、20R、20L）亦能有效降低早、晚期福馬林疼痛反應，對於降低福馬林刺激後脊髓 Fos 標記神經細胞總量的表現亦佳。（二）結合電針刺激與脊髓腔注射

NOS 抑制劑(L-NAME 300、1000 nM 加同側電針刺激足三里穴 10L、20L) 均可以降低早期及晚期階段福馬林疼痛反應。對福馬林皮下注射有良好的止痛效果，就分子生物領域 Fos 蛋白質的表現也取得全面的抑制效果。(三)比較(10L、10L300、10L1000)和(20L、20L300、20L1000) 兩種治療模式，L-NAME (300、1000 nM)部分有劑量依賴上之趨勢，而電針部分(10L、20L)則無此傾向；而且增加 L-NAME 脊髓注射的效果優於單純電針。在 Fos 蛋白部分，電針強度增強(10L、20L)並不會增加第四腰椎(L4)的 Fos 量，反而有減少之趨勢，因此若以 Fos 為疼痛之指標，則較強的電針刺激亦能夠較有效的抑制福馬林疼痛刺激所引發的 Fos 量。

本研究證實了結合電針刺激與脊髓腔注射 NOS 抑制劑對福馬林刺激所引起的頑固性疼痛上取得了良好的鎮痛成效，不僅可以抑制第二階段的週邊發炎性疼痛反應，對第一階段的中樞反射性疼痛亦可以達到良好的鎮痛效果，就分子生物領域 Fos 蛋白質的表現也取得全面的抑制效果；而(20L、20L300、20L1000) 這一部份不論是在疼痛行為反應或是 Fos 蛋白的表現上抑制的趨勢均較(10L、10L300、10L1000)一致，因此在疼痛控制上(20L、20L300、20L1000)這樣的模式會是較好的選擇，可作為臨床止痛的指引。

傷害性刺激誘導的中樞內 c-fos 基因的蛋白表達可被一些鎮痛物質如嗎啡、內源性阿片[?]、5-HT、生長抑素、NMDA 受體的拮抗劑及電針針刺等所抑制，提示 c-fos 不僅是一個"標誌物"，而且也參與了疼痛的調制。而這些疼痛分子訊息的傳遞，造成了臨床上包括疼痛過敏、觸物感痛以及疼痛時間延長等慢性疼痛的主要症狀(如手術後疼痛及幻肢痛等)，也可以藉由本研究為其臨床止痛開啟一道曙光。

關鍵詞：電針，L-NAME，Fos，鎮痛

第一章 前言

疼痛是每一個人必定都有的經驗，不論是外傷、手術後等外科問題，或是內科各種器官的疼痛，甚至是癌症末期的 cancer pain 等，無時不在困擾著人類，雖然"疼痛"不是一種愉快的經驗，但卻是保護我們健康的一種警訊，它包含了許多複雜的生理、心理反應，因此多年來許多學者從臨床和基礎等各種不同的角度對痛和鎮痛的問題進行研究，不斷地研究出新的止痛藥物及止痛方法。然而在中國數千年的傳統醫學裡，針灸一直是獨具一格地延用至今，連世界衛生組織也不得不承認針灸的療效，其適應症更從早先（1980）的四十三種擴增至現今（1996）六十三種之多，其中不乏許多痛症的問題；因此，近二十年來，大量的針刺鎮痛及針刺麻醉研究持續的進行著，而隨著疼痛機轉的不斷瞭解，針刺鎮痛的模式更亟需建立，裨能推廣針灸在臨床上的應用，造福更多的病人。

動物疼痛刺激從初級傳入神經去極化開始，透過介質的釋出在突觸間傳送，並藉助擴散性介質採自由擴散的方式，將訊號送達中樞神經系統之神經元。若進一步欲進入細胞核內，必須經過細胞之三級制訊號傳遞系統。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 P 物質，降鈣素基因相關？，谷氨酸）--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，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--次級訊息傳遞，去影響鄰近的神經元，提供興奮性修飾造成疼痛受區擴大；這些疼痛訊息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。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 AP-1 在功能上是屬於誘發型轉錄因子，作用在 DNA 的特定區域(AP-1site)，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 pro-enkephalin, pro-dynorphin gene)。因此在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--三級訊息傳遞者。這三級制訊號傳遞系統各有不同的角色，其中初級訊息傳遞者負責訊號的產生，次級訊息傳遞者誘導訊號放大，三級訊息傳遞者完成訊號的維持與執行，進而造成神經細胞群屬性長時間的改變。這些疼痛分子訊息傳遞，造成了臨床上包括疼痛過敏、觸物感痛以及疼痛時間延長等臨床上慢性疼痛的主要症狀。臨床上，包括手術後疼痛(post operative pain)、幻肢痛(phantom pain)等。

本研究使用化學性的福馬林疼痛試驗，再透過不同形式的電針及脊髓腔給予一氧化氮合成酵素抑制劑(L-NAME)等的鎮痛方式與以抑制，並以 Fos 蛋白和疼痛行為反應作為評估工具，希望藉由早期福馬林疼痛反應了解電針及 L-NAME 對中樞神經的影響，及晚期福馬林疼痛反應了解電針及 L-NAME 對周邊鎮痛的影響外，並評估不同強度電針刺激及左右兩側之電針對腰椎各脊髓 Fos 蛋白和疼痛行為反應的影響，除了證實針刺的鎮痛作用及了解針刺鎮痛的機轉外，並試圖尋找最好的臨床鎮痛模式，作為治療頑固敏感性疼痛的參考。

第二章 文獻探討

一、 痛覺

疼痛是人類共有而個體差異很大的一種不愉快的主觀感覺。它提供軀體受到威脅的警報信號，是生命不可缺少的一種特殊保護功能。另一方面，嚴重的慢性疼痛困擾著數以百萬計的人們，是臨床一大難題。傷害性刺激誘發的痛覺，是包括性質，強度和對程度各不相同的令人討厭的多種感覺的複合，並往往與自主神經活動、運動反應，心理和情緒反應交織在一起，它不是簡單地與軀體某一部分的變化有關，也不是由神經系統某個單一的傳導束、神經核和神經遞質進行傳遞，疼痛很易受過去經驗的影響，有極大的變異性，所以它比其他感覺更難研究。

傷害性感受(nociception)和痛覺(pain)是兩個有密切關係但又不相同的概念。前者是指中樞神經系統對傷害性感受器激活而引起的傳入信息的加工和反應，以提供組織損傷的信息，它可以發生在中樞神經系統的各個水平，從低等動物到人均共有。痛覺是指發生在軀體某一部分的厭惡和不愉快的感覺，發生在腦的高級部位尤其是大腦皮層，是人所特有的。¹所以，疼痛是一種主觀的、複雜的感覺傳導，國際疼痛協會對人類疼痛的定義為：「不愉快的感覺及情緒的變化伴隨著實際上或潛在的組織傷害」。然而，動物並不能主觀地描述其痛覺之感受，因此必須藉觀察生理上或行為上的變化來表示。

二、痛覺之傳導及神經調制

A. 損傷性刺激引起傷害性感受器興奮

背根神經節和三叉神經節中感受和傳遞傷害性衝動的初級感覺神經元的外周末梢部分，稱為傷害性感受器。形態學上是無特化的游離神經末梢，廣泛分佈於皮膚、肌肉、關節和內臟器官。不同組織中

的傷害性感受器在結構上沒有明顯不同，但反應特性迥異，如皮膚機械傷害性感受器僅對強烈的機械刺激發生反應，而多覺傷害性感受器則對多種不同性質的傷害性刺激均產生反應。傷害性感受器興奮產生的衝動傳入到中樞神經系統引起傷害性感受和痛覺。但是，由神經系統損傷引起的疼痛(如中樞性痛和去傳入痛過敏)，不依賴傷害性感受器的活動，而是神經系統可塑性變化的結果。

B. A 和 C 傷害性感受器分別傳導刺痛和灼痛

傷害性信息由不同的初級傳入纖維傳導。根據傳入纖維的直徑，一般可將傷害性感受器分為兩大類：由細的有髓鞘 A 傳入纖維傳導的 "A 傷害性感受器"，和由無髓鞘傳入纖維傳導的 "C 傷害性感受器"(如表一)。根據對傷害性刺激反應的性質，兩類感受器又可分為不同的亞型，對高閾值機械刺激產生反應的 "A 機械傷害性感受器"和對傷害性機械和熱刺激均產生反應的 "A 多覺傷害性感受器"。動物的大多數 C 傷害性感受器屬於多覺性的，也有只對強機械刺激起反應的 "C 機械傷害性感受器"，而在人類皮膚只有 "C 多覺傷害性感受器"。這些感受器的共同特點是，重複性刺激使感受器敏感性增加，並引起 C 傷害性感受器產生持久的發放。

表一：傷害性感受器的分類及特性表

| 分佈 | 傷害性感受器類型 | 有效刺激 |
|----|------------|----------------|
| 皮膚 | A 機械性 | 機械損傷 |
| | A 多覺性 | 機械性損傷和傷害性灼熱 |
| | C 機械性 | 機械損傷 |
| | C 多覺性 | 傷害性機械、熱、冷和化學刺激 |
| 肌肉 | III(A)機械性 | 傷害性擠壓 |
| | IV(C)機械性 | 傷害性擠壓 |

表一：續

| | | |
|----|--------------|-----------------|
| | IV(C)化學性 | 有害化學物質 |
| | III 和 IV 多覺性 | 重壓和傷害性熱 |
| 關節 | A 機械性 | 極度扭轉 |
| | C 機械性 | 極度扭轉 |
| 內臟 | A 內臟傷害性 | 依器官不同，對強烈的機械膨脹， |
| | C 內臟傷害性 | 牽拉、灼熱、有害化學刺激 |

疼痛分為兩大類：定位明確的淺表痛是由強刺激皮膚引起的，定位模糊的深部痛源於肌肉、肌腱，骨膜和關節。來自內臟的疼痛具有深部痛的特徵。淺表痛又分為刺痛和灼痛，根據它們出現的先後，又叫做第 1 痛(快痛)和第 2 痛(慢痛)，分別由 A 和 C 傷害性感受器激活引起。在人體的 A 或 C 單纖維記錄的電生理實驗表明，一個感受器的單一衝動甚至低頻發放並不引起痛覺，只有同時激活許多 A 或 C 傷害性感受器才產生疼痛。比較心理物理方法測定的人體刺激感覺曲線和單個 C 多覺傷害性感受器的刺激-反應曲線的關係表明，感受器衝動低於 0.3 次/秒，沒有疼痛感覺，在 0.4 次/秒的衝動發放水平時到達痛閾，當感受器衝動達到 1.5 次/秒時，產生持久的疼痛。

C. 激活傷害性感受器的致痛物質

傷害性刺激引起初級傳入末梢去極化使感受器興奮，這是一個換能的過程。目前尚無可能在感受器水平直接研究感受器如何將刺激轉換成電能。A 傷害性感受器外周末梢被許旺氏細胞包圍，並無特化的細胞和結構，因此，傷害性感受器的末梢本身很可能具有機械敏感性。此外，傷害性刺激也可能通過作用於其他中繼細胞繼發性地激活傷害性感受器。從已有的資料看，換能機制不止一種，如 C 多覺傷害性感受器的機械刺激和熱刺激的反應閾之間並無關聯性。A 機械傷害性感受器對熱和化學刺激相對不敏感，但是當熱刺激引起感受器活動時，它們對機械刺激的敏感性並不變化。這些觀察說明在同一感受器上兩種刺激的換能機制是不同的。

換能機制中最有吸引力的假說是傷害性感受器具有化學敏感性，大量的臨床觀察和實驗研究提供了有力的證據。傷害性刺激使受損傷的細胞釋放致痛的化學物質(如表二)，刺激傷害性感受器產生去極化。這些化學物質有三個來源：1.直接從損傷細胞中溢出的，如 K^+ 、組織胺、ACh、5-HT 和 ATP 等。外源性施加這些物質可使傷害性感受器發放增加，注射到人體皮膚中可產生疼痛。2.由損傷細胞釋放物中的 $?$ 的作用下在局部合成的物質，或是通過血漿蛋白及白細胞遊走帶入到損傷區的物質。緩激 $?$ 是由損傷部位的 $?$ 降解血漿蛋白而形成的 $?$ ，是一種最強的致痛物質。在損傷區特別是發炎的部分其濃度高達 $8 \mu \text{mol/L}$ 以上，事實上外源性施加 $10 \mu \text{mol/L}$ 就可引起疼痛。緩激 $?$ 不僅引起多覺傷害性感受器的激活，而且使其過敏，因此它在痛的產生和痛覺過敏中均起作用。在損傷區合成的另一類致痛物質是花生四烯酸的代謝產物，如前列腺素和白細胞三烯(leukotrienes)，其濃度隨炎症發展而增加。前列腺素 E_2 在這類化合物中致痛作用最強，使傷害性感受器敏感產生痛覺過敏。阿司匹林(aspirin)和其他的非甾體抗炎藥物的鎮痛作用，就是由於抑制了環氧 $?$ (cyclooxygenase)使前列腺素合成減少所致。3.另一類致痛物質是由傷害性感受器本身釋放，如 P 物質。傷害性感受器的激活引起 P 物質從 C 纖維末梢釋放到組織液中，直接刺激肥大細胞釋放組織胺，後者作用於傷害性感受器進一步增強其活動。同時，P 物質和組織胺刺激血管舒張，產生局部水腫，在血管壁上含 P 物質的神經叢的激活也可產生同樣的效應。因此，一般認為皮膚損傷引起的神經性血管舒張和痛過敏是由於 P 物質和肥大細胞釋放組織胺激活傷害性感受器的結果。

表二：外周損傷部位釋放的致痛物質及作用表

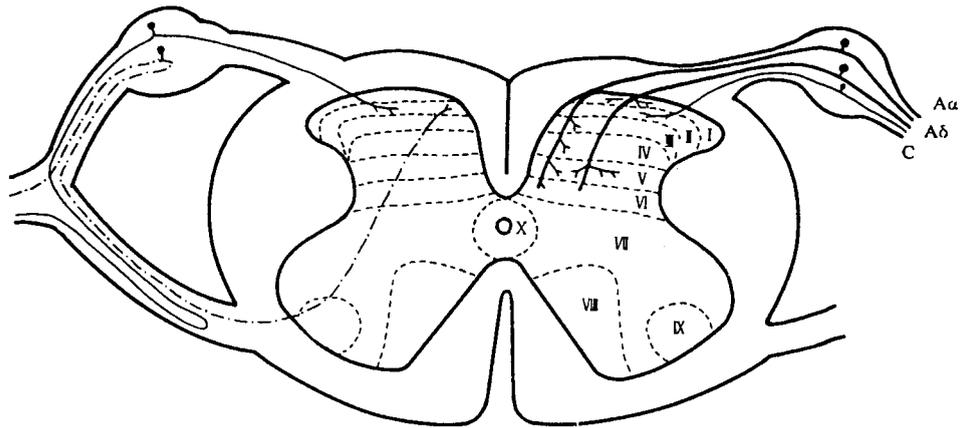
| 致痛物質 | 釋放來源/合成 | 對初級傳入末梢作用 |
|----------------|----------------|-----------|
| K ⁺ | 損傷細胞 | 激活 |
| Ach | 損傷細胞 | 激活 |
| ATP | 損傷細胞 | 激活 |
| 5-HT | 血小板/色氨酸氫化 | 激活 |
| BK | 血漿激? 原/激? 釋放 | 激活 |
| histamine | 肥大細胞 | 激活 |
| PG | 花生四烯酸代謝物/環氧? | 降低閾值 |
| Leukotrienes | 花生四烯酸代謝物/5-脂氧? | 降低閾值 |
| SP | 初級傳入末梢 | 降低閾值 |

總結外周局部的致痛物質引起傷害性感受器的激活和敏感效應分為：1.直接作用--傷害性刺激使細胞損傷導致 K⁺的釋放和緩激?、前列腺素的合成, K⁺和緩激? 直接興奮傷害性感受器的末梢, 前列腺素增加末梢對 K⁺和緩激? 的敏感性; 2.繼發作用--傷害性傳入衝動不僅傳入中樞, 而且也在傳入纖維分叉處傳向另一末梢分支, 在外周末梢引起 P 物質等化學物質的釋放。P 物質直接引起血管舒張和組織水腫, 進而增加緩激? 的累積。P 物質也刺激肥大細胞釋放組織胺和血小板釋放 5-HT, 刺激感受器活動。另一方面, 組織胺和 5-HT 在胞外水平的升高, 繼發地激活鄰近的傷害性感受器, 從而造成在傷害性刺激停止以後的持久疼痛和痛覺過敏的發展。在外周組織中, 傷害性感受器的活動是傷害性刺激引起的一系列複雜的生理和病理反應的一部分, 它與組織損傷引起的局部血流增加和水腫等效應之間有協同作用。因此, 傷害性感受器不僅傳遞組織損傷的信息, 而且在局部組織防禦和修復機制中也起一定的作用。

D. 脊髓背角是痛覺的初級中樞

傷害性感受器傳入末梢與背角淺層細胞發生突觸聯繫，Rexed 將脊髓分為十層（如圖一），與感受傳入有關的主要是背角的 I~VI 層和 X 層。第 I 層中的邊緣細胞的軸突投射到腦幹和丘腦。第 II 層也叫膠質層，由排列緊密的小細胞和纖維組成，其外層(IIo:中的柄細胞(stalked cell)，多數是興奮性中間神經元，內層(IIi:中的島細胞(islet)是抑制性中間神經元。第 III 層由大量的有髓鞘纖維、投射神經元和類似第 II 層的中間神經元組成。第 IV 層是背角中最厚的一層，由多種大和小的神經元組成，大的投射細胞的軸突伸延到第 II 層廣泛分佈。在第 I~IV 層(特別是第 II 層)中，有一種背角特有的突觸球(glomeruler)結構，它是由居中的初級傳入末梢和包圍在四周的許多樹突和軸突組成，相互構成軸突-軸突、軸突-樹突和樹突-軸突型的突觸。這種突觸球在感覺信息調制中起重要作用。第 V 層在背角是最狹窄的部分，其投射神經元是背角中最大的，樹突與第 IV 層的相似。第 VI 層是背角中的最後一層，只在頸腰膨大部分存在，有大量來自腦的下行纖維終止在這一層。第 VII 層是脊髓灰質中心部分的一個不規則區域。第 VI 層和第 VII 層中有投射神經元和中間神經元存在。脊髓腹角的第 VIII 和 IX 層是運動神經元集中的區域。第 X 層是圍繞中央導水管周圍的灰質。

應用切斷背根追索變性纖維、標記氨基酸注射到背根神經節作初級傳入末梢放射自顯影和 HRP 纖維內注射等技術，結合電生理機能鑑定，已明確了感覺初級傳入在脊髓的投射分佈；A 和 C 傷害性感受器的傳入纖維由背根經李騷氏束進入背角，皮膚傳入的 A 纖維終止在第 I、V、X 層。傷害性感受器的 C 傳入纖維終止在 IIo 層，低閾值機械感受器的 C 纖維終止在第 III 層。傳遞非傷害性信息的 A 傳入纖維終止在第 III~V 層。內臟傳入纖維主要投射到第 I、IIo、V 和 X 層，肌肉傳入主要在第 I 和第 V 層的外側部。



圖一：脊髓腰段背角 Rexed 分層、背根（右側）和腹根（左側）傳入示意圖

E. P 物質和興奮性氨基酸介導傷害性初級傳入向背角的傳遞

隨著神經化學解剖學的進展，已發現在初級感覺神經元中有十幾種生物活性物質存在。目前只有谷氨酸和 P 物質較多地符合作為傷害性信息傳遞信使的條件。如前所述，小的背根神經節神經元是傷害性感受器，其中 20% 和 70% 分別含有 P 物質和谷氨酸。近來發現在一些傳入末梢中兩種物質共存，分佈在背角第 II 層中。谷氨酸在 A_α、A_δ 和 C 纖維末梢中均存在，而 P 物質僅在 C 纖維中與谷氨酸共存。超顯微觀察表明，小清亮囊泡含谷氨酸，而大致密囊泡含 P 物質。

P 物質是一種 11 β ，是速激 β 家族中的一員。在哺乳類中樞神經系統中的速激 β 只有 P 物質、神經激 β A (neurokinin A) 和神經激 β B。其相應的受體為 NK-1、NK-2 和 NK-3。P 物質及其受體豐富地分佈在脊髓第 I、II 和 X 層。如果 P 物質作為傳遞物參與脊髓痛覺信息傳遞的話，一個重要條件是傷害性刺激應該可引起它在初級傳入末梢的釋放。放射免疫測定的研究表明，高鉀引起培養的背根節神經元釋放 P 物質，強電流刺激離體脊髓背根也引起 P 物質在灌流液中的濃度明顯增加。這些結果在整體動物實驗得到驗證：只有強電流興奮外周神經 C 纖維和傷害性刺激皮膚才能引起 P 物質的釋放，而興奮 A

類纖維或非傷害性刺激均無效。嗎啡和去甲腎上腺素可抑制 P 物質的釋放。近來用新發展的一項可測定神經 P 釋放的新技術--抗體微電極，精確測定了 P 物質在脊髓釋放的部位，應用傷害性刺激或選擇性興奮 C 纖維的神經毒—辣椒素作用於外周神經，可在 C 纖維終止的背角第 II 層誘發 P 物質的釋放，為傷害性感受器傳入末梢釋放 P 物質提供了直接證據。²

三、針刺鎮痛

A. 針刺鎮痛有關之神經傳導

Melzack 和 Wall 在 1965 年提出閘門學說 (Gate theory)³，認為粗纖維感覺神經傳入脊髓的同時，在脊髓的同一節段可興奮另一中間神經元來阻止細纖維神經衝動之傳入。在此，可假設粗纖維傳導針刺或 TENS 的刺激來抑制細纖維傷害性 (nociceptive) 訊息的傳入。電針具同節段的脊髓鎮痛作用及針麻時在局部使用高頻率的 TENS，似乎符合上述之閘門學說。然而，傷害性訊息與電針刺激若非在同一節段上，針刺的鎮痛作用則須經由複雜的內源性鎮痛系統來完成，其中包含了鴉片樣系統及非鴉片樣系統兩大類。而與針刺作用最密切的神經傳導有下視丘弓狀核、大腦導水管周圍灰質、中縫大核、藍斑等^{4, 5}。下視丘弓狀核富含 β -內啡肽之神經元，在電針鎮痛時，會增加 PAG 之神經元放電增加，再經由 NRM 及 LC 之下行 serotonergic 及 noradrenergic pathways 下傳到脊髓，與脊髓中之腦啡肽性中間神經元 (enkephalinergic interneuron) 相連，進而抑制初級痛覺傳入神經釋放 P 物質。⁶⁻⁹

B. 針刺鎮痛與鴉片樣物質之關係

鴉片樣物質 (Opiate-like Substance; OLS) 自 Hughes 於 1975 年首次從腦組織分離出具有嗎啡活性的多勝肽 (polypeptides) 後，OLS 與針刺鎮痛效應的關係，就受到許多學者的注意。例如在針刺鎮痛時，人內

腦脊髓液中的 內啡? 樣物質的含量增加¹⁰。同樣的,在家兔受電針刺激後,視前區內 內啡? 樣免疫活性物質增加¹¹,表明電針能促使腦內釋放 內啡? 來參與鎮痛作用。電針刺激後亦能加速大鼠中樞腦啡? 的合成¹²,不論是在導水管周圍灰質¹³、nucleus accumbens^{14、15}、尾核、下視丘¹⁶或在脊髓的背角¹⁷,腦啡? 的釋放皆有明顯的增加。另外,強啡? 在家兔脊髓中亦被證實參與電針鎮痛之作用¹⁸。

然而,早在 1979 年 Cheng 和 Pomeranz 就認為媒介電針鎮痛作用的類鴉片接受體,在不同頻率的電針下,似乎有不同的機轉¹⁹。電針鎮痛能被類鴉片接受體拮抗劑 naloxone 所逆轉,尤其是在低頻率(2Hz)的電針,相反的高頻率(100 Hz)電針之鎮痛作用並不受 naloxone 所影響^{20、21}。Han 等人則認為,2 Hz 電針鎮痛作用在大鼠脊髓是由 μ -及 類鴉片接受體媒介,而 100 Hz 電針由 類鴉片接受體媒介。^{22、23}。另外 2/15 Hz 變頻電針的鎮痛作用在大鼠脊髓則與 μ -、 δ -、 κ - 三種接受體都有關聯²⁴。

由上述研究可知,鴉片樣物質及接受體與針刺鎮痛關係密切,當針刺訊息傳入相關的腦區後,可增強 OLS 的活性或興奮 OLS 能神經元釋放 內啡?、腦啡? 及強啡? 等物質,分別經由不同的類鴉片接受體來媒介不同頻率電針之鎮痛作用。

C.針刺耐受與抗鴉片樣物質之關係

多次注射嗎啡、腦啡? 或 內啡? 等鴉片樣物質可產生耐受性 (tolerance)作用,而連續長時間反覆電針時,腦內釋放大量 OLS,也可引起耐受性,使針效逐漸減弱,稱為 "針刺耐受性"。

鴉片類物質的耐受作用與中樞神經? Cholecystokinin (CCK)有關^{25、26}。由腦室或脊髓給予 Cholecystokinin octapeptide (CCK-8)可拮抗鴉片類物質及電針之鎮痛作用²⁷。證實 CCK-8 在腦或脊髓中是

造成嗎啡耐受和針刺耐受的抗鴉片樣物質(Anti-opioid substance , AOS)。更有學者指出, CCK-8在大鼠脊髓中可經由 CCK-B 接受體來媒介抗鴉片樣物質之作用²⁸,並可有效地對抗 μ -和 δ - 接受體媒介之鎮痛作用^{29、30}。而 CCK-8 之拮抗劑則可逆轉鴉片樣物質造成之耐受,並有效增強嗎啡之鎮痛效果³¹⁻³⁵。

因此,針刺耐受性及和嗎啡間之交叉耐受(cross tolerance)作用³⁶,與抗鴉片樣物質(AOS)之產生有關。

D.針刺鎮痛與單胺類物質之關係

早在 1979 年 Cheng 和 Pomeranz 就提出電針鎮痛的機轉有 endorphin 和 non-endorphin 兩個主要系統,當時認為低頻率電針鎮痛作用是由 endorphin 來媒介,而高頻率電針可能有 serotonin 的參與¹⁹。後來大量研究顯示,針刺鎮痛後動物腦中 5-HT 的含量上升³⁷,而外源性的 5-HT 由腦室給予亦可加強電針的鎮痛作用³⁸。另外,有學者指出,在家兔中央灰質內直接注射或由腹腔注射 PCPA 可降低電針的鎮痛作用³⁹,而在杏仁核內注入 5-HT 的前驅物 5-HTP 則可加強電針鎮痛之作用⁴⁰。同樣地,在電生理學實驗中發現電針足三里可以加強中縫大核 (NRM)的放電頻率⁴¹,而用 5, 6-DHT 毀損腦中之 Serotonergic fiber 則減低電針之鎮痛效果⁴²。更進一步,在 1989 年 Tsai 提出,在電針後脊髓中 5-HT 之釋放增加,可能進一步活化 Enkephalin-interneurons,再由突觸前抑制 primary sensory neurons 對痛覺的傳導⁸。由上述研究可知 5-HT 必定是調節針刺鎮痛的重要神經傳導物質。至於電針鎮痛後,5-HT 與 NE 或鴉片樣物質間是否有交互作用?由何種 receptor subtype 來媒介,則有待進一步探討。

中樞神經系統中的去甲腎上腺素(NE)對針刺鎮痛究竟是增強或對抗作用,學者的看法仍不一致。Han 在 1983 年提出電針刺激使腦和脊髓中 NE 含量下降,並認為腦和脊髓中的 NE 在電針鎮痛中起著

截然不同的作用，腦內 NE 主要是透過 α_2 接受體對抗電針鎮痛，並兼有較弱的 α_1 接受體加強電針之作用；而相反的脊髓內 NE 則是透過 α_1 接受體來加強電針鎮痛作用^{43, 44}。後來，又有學者提出 clonidine（ α_2 接受體致效劑）會減低針刺的鎮痛作用⁴⁵，相反的，亦有學者提出 clonidine 可加強電針鎮痛作用⁴⁶。因此，較肯定的是 NE 的確與電針鎮痛有關，但到底是促進或抑制？與 serotonin 或 opioid substance 是否有關？則值得進一步的研究。

E. 不同頻率電針鎮痛之研究

在電針鎮痛的機轉中，電針時所施予的參數，如電流量、電壓、頻率、電針時間等，都必須清楚的選擇，而其中尤其是頻率更重要。早在 1976 年 Bruce Pomeranz 就提出 0.2 Hz 電針沒有鎮痛作用，4 Hz 低頻率電針具有鎮痛作用，且經由 endorphin 媒介，而 200Hz 高頻率電針亦具有鎮痛作用，且認為乃 serotonin 所媒介^{19, 47}。Han 在 1986 年後，相繼發表許多研究，認為 naloxone 逆轉電針鎮痛的程度決定於電針的頻率，2 和 15 Hz 電針鎮痛可被 naloxone 所逆轉，而 100 Hz 電針則不然。更認為電針刺激強度(1、2、3V)並不影響 naloxone 逆轉電針鎮痛的百分比⁴⁸。1989 年，Han 更進一步說明在脊髓中不同頻率的電針鎮痛作用是由不同類型的類鴉片接受體所媒介，認為 μ -類鴉片接受體參與 2 Hz 電針鎮痛，而 δ -類鴉片接受體參與 100Hz 電針鎮痛，而且 2 Hz 與 100 Hz 間無交叉耐受作用²³。後來在 1992 及 1993 年又補充說明，認為 2 Hz 電針鎮痛作用主要由 μ -及 δ -接受體共同媒介，100 Hz 電針鎮痛由 δ -接受體媒介，而 2/15Hz 交替之電針鎮痛時，則 μ -、 δ -、 κ -三種鴉片類接受體皆參與其中^{22、}

²⁴。

另外，亦有學者從不同頻率電針下 c-fos 基因在不同腦區神經核之表現，來證實低頻與高頻電針的確經由不同的神經路徑⁴⁹。除此之外，尚有許多研究認為不同頻率電針有 glutamic acid 及 CCK-8 等神

經傳導物質的參與^{50, 51}，但較一致的結論是，不同頻率電針鎮痛機轉不同，其中低頻率電針是可被 naloxone 逆轉。

然而，除了頻率外，電針刺激強度與電針時間似乎也不容忽視。Pomeranz 在 1988 年提出電針 10 分鐘後，休息 90 分鐘，再電針 10 分鐘時，第二次的電針效果更加顯著⁵²，而在電針前先給予長效類鴉片接受體拮抗劑 naltrexone 可逆轉電針鎮痛作用，但若在電針後才給予，則無法阻斷電針之鎮痛作用⁵³。可見給藥時間與電針時間都與電針作用相關。Wang 在 1993 年更提出電針刺激強度及頻率與電針後之暫時性陣痛(transient analgesic effect)及後效作用(after-effect) 有關，認為在暫時性鎮痛作用中，低頻率(10Hz)、高強度(6V)優於高頻率(200 Hz)、低強度(3V)，而在後效作用中則恰相反⁵⁴，是否暗示電針後之立即鎮痛作用與刺激強度較有關，而之後產生之後效作用與電針頻率較有關，實在值得進一步加以探討。

四、疼痛的分子生物學研究

愈來愈多的証據顯示，長期的傷害性刺激會導致中樞神經特殊的改變，使得中樞神經敏感化(sensitization)，對於輕微而短暫的刺激產生強烈而持續的反應^{55, 56}。疼痛刺激從初級傳入神經去極化開始，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。這些經由傷害性神經刺激所造成的中樞神經可塑性變化(neuroplasticity)，主要經由興奮性胺基酸受器(excitatory amino acid receptor)以及受器活化後引發的一連串胞內訊息傳遞物質的影響⁵⁷。這些物質包括了興奮性胺基酸，神經細胞內鈣離子，一氧化氮(nitric oxide)，前列腺素(prostaglandin)，PKC 以及 Jun, Fos 等蛋白的調節。因此當細胞受到疼痛刺激後，經由興奮性胺基酸受器，以及一連串胞內的訊息傳遞物質會導致神經細胞特殊變化的分子生物學機轉。

A.初級訊息傳遞者--疼痛訊號的產生和製造

(一)興奮性胺基酸(EAA)釋出

在人體內參與的 EAA 介質，主要是天冬氨酸(L-aspartate)，谷氨酸(L-glutamate)。雖然其釋出來源是 C 型纖維神經末梢，但它並非在該處合成，而是由神經末梢附近的神經膠元細胞(astrocyte)的 glutamate synthase 負責製造，再轉送至神經末梢內包裝及儲存。一般而言，它最常和其它介質如 Substance P， calcitonin gene-related peptide(CGRP)包裝在一起。平時這些介質從單一包裝的貯存囊(vesicle)釋放，造成背角神經元細胞膜快速去極化，一旦刺激停止，去極化就立刻消失。而當強烈刺激來臨時，混合包裝的貯存囊就會從 C 型纖維末梢釋出，稱為合併釋出現象(co-release)。這些介質單獨出現僅能傳遞短暫的訊息，唯有當 substance P 和 EAA 同時存在時，背角神經元細胞膜去極化才會持續較長的時間^{58 59}。當中樞神經系統受損時(例如缺氧、外傷、中毒、疾病)，興奮性胺基酸會大量製造並且累積在神經元週圍，造成長時間的神經元興奮，更加深了神經系統受損的程度⁶⁰。當今的「神經可塑性」學說便提出：興奮性胺基酸的大量釋出，是造成許多慢性疼痛的原因之一⁶¹。

在脊髓背角神經元上的受器可分為 NMDA(N-methyl-D-aspartate)及非 NMDA 型(包括 AMPA/KA 型)。在中樞神經系統中，形成疼痛過敏的過程是由非 NMDA 受器負責誘導，NMDA 受器則扮演著維持者的角色⁶²。以福馬林疼痛試驗而論，早期興奮波主要就是由非 NMDA 受器誘發而來，並和運動神經元直接串聯，形成強烈的疼痛反射。晚期興奮波則因 NMDA 受器的激活，以及一連串的訊息傳遞，導致神經核內新物質的生成，以及神經元細胞的改變而產生。其中 NMDA 受器的激活是疼痛過敏最重要的一節，直接刺激 NMDA 受器可以誘發疼痛過敏⁶³。如果在福馬林疼痛實驗前，先在脊柱內投予 NMDA 拮抗劑可以阻斷疼痛過敏，相反地，如果是在福馬林注射後

再投予，則無阻斷效果⁶⁴。

(二)NMDA 受器活化

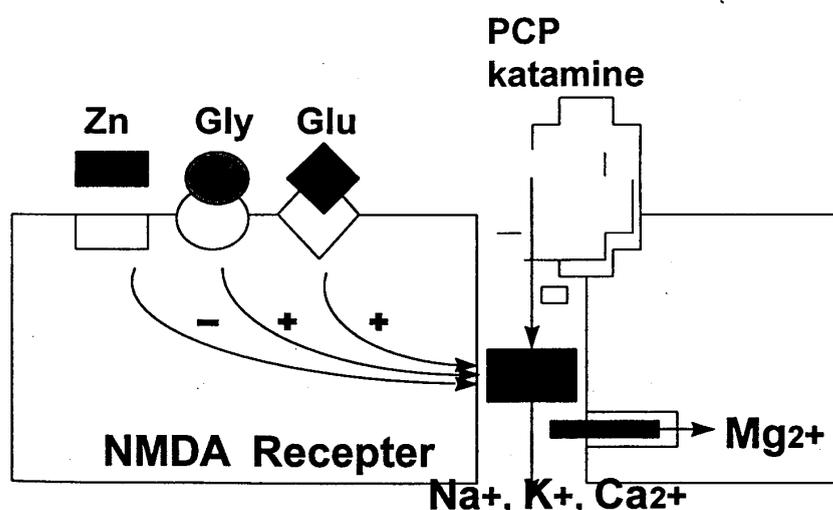
NMDA 所主導的離子通道可進出鈉、鉀、鈣等離子。平常狀態下，鎂離子持續阻斷其流通（如圖二）⁶⁵。NMDA 型受器接受雙向調節，它的開啟不但需要 glutamate，還與細胞膜電位有關。結構體分為：1.離子通道，2.介質結合區兩大部份。其中興奮性胺基酸(如 glutamate)和抑制性胺基酸(如 glycine)分別結合在不同的區域，但是都會活化離子通道。鋅離子結合區則屬於抑制性功能，這些區域屬於競爭型結合狀態。傳統的 NMDA 競爭型拮抗劑(如 AP5)，作用在 glutamate 結合區，雖然在藥理學研究上扮演極重要的角色，卻因改變神智的副作用過強，在臨床上無法使用。目前，藥理學家將希望全部放在甘氨酸(glycine)結合區上，因為它具有相似的止痛療效卻不影響精神狀態，是 NMDA 家族中最有臨床潛力的一環。NMDA 離子通道屬於 slow channel，平常受到鎂離子阻斷很難開啟，只有非 NMDA 受器及 NK-1 受器活化後產生的 fastEPSP 將鎂離子推開後，才能打開離子通道。在通道的入口處還有兩個區域可接受調節：PCP-site 和 MK801-site，兩者同屬非競爭阻斷劑型(non-competitive antagonist)，目前惟一可在臨床上使用的藥品 ketamine 和 dextromethorphan 就是屬於此類，使用上所產生的副作用和上述的 NMDA 競爭型拮抗劑很相近。

(三) 臨床應用

由於生理上激活 NMDA 受器的理論決定在：1.突觸前強化一強烈的疼痛刺激使得 C 型纖維神經末稍不斷釋出多種興奮性介質如 substance P，CGRP，glutamate 使突觸後細胞膜一直保持在易興奮狀態⁶⁶⁻⁷⁰，當細胞膜電位去極化至一程度後（例如非 NMDA 受器活化）或 metabotropic NMDA 受器活化，經一連串訊息激活 PKC⁷¹，可以將

阻斷 NMDA 離子通道的鎂離子移開，並且引發胞外鈣離子經由 NMDA 通道及其它鈣離子通道進入胞內。2.突觸後神經元調節：痛覺刺激後，細胞內活化的 PKC 與 PKA 可以從細胞膜內將 NMDA 受器磷酸化，也會使它更易激活⁷²。目前有一種全新的理論—「前瞻性止痛法」就是根據以上的結果所得到的啟示⁷³。

NMDA Receptor



圖二：NMDA Receptor 圖

B.次級訊息傳遞者--疼痛訊號的放大

(一)鈣離子

鈣離子不僅直接改變了細胞膜其它離子的通透性，更重要的是它身為次級訊息傳遞者，負責啟動一連串的酵素反應將痛覺訊號放大，這些活動包括：1.誘發細胞膜 PLC 酵素的活化，產生 IP₃ 及 DAG；2.經由 DAG 誘發細胞質酵素 PKC 的活化，或經由 IP₃ 選擇性的釋出內質網(ER)內的鈣離子⁷⁴。胞內鈣離子主要是貯存在內質網，由於內質網分散在細胞質中，是胞內區域性活化的關鍵⁷⁵。鈣離子進出細胞

質的管道很多，一是來自胞外的組織間液，一是來自胞內的內質網，分別由兩種膜電位掌控：1.經由 fast EPSP 的開啟，鈉離子大量湧入造成細胞膜快速去極化，使疼痛訊號沿著軸突和樹突傳送達至較高的中樞，或形成區域反射弧；也可以藉 G protein 而啟動 PLC 放出 IP₃，再由內質網釋出鈣離子。因為鈣離子很快會被再回收至內質網，以致這個訊號很短暫就消失。2.slow EPSP 緩而久的去極化可以引導細胞膜上鈣離子通道的活化。在神經元的細胞膜上，鈣離子進出的管道和其它興奮性細胞(例如：心肌、血管平滑肌、骨骼肌等)不同，主要是經由(1)NMDA 受體所管制的鈣離子通道，(2)L 型鈣離子通道。兩者的調節機制小同而大異，相同的是都必須反覆使用後才逐漸激活 (use-dependent)，並且由膜電位來調控；相異的是，前者還接受興奮性胺基酸調節 (ligand-gated)，管道在開與閉之間有極為懸殊的差異，微調和粗調各有不同的生理意義。而後者在疼痛所引發的鈣離子湧入中的重要性甚低，雖然 L 型鈣離子通道可以接受鉀離子增加而大量開啟 (potassium dependent)，一般認為它在疼痛訊號傳遞過程中僅扮演配角，屬於緩慢而持續的鈣離子滲透通道 (leakage channel)。因此傳統的 L 型鈣離子通道阻斷劑，例如 nifedipine 或 verapamil，單獨使用根本無法阻止疼痛所引起的鈣離子湧入現象。目前的研究主要是放在協同嗎啡類藥品止痛，動物實驗上有不錯的成績⁷⁶。

(二)PKC

NMDA 受器一旦開啟，鈣離子長期地灌入後，PKC 就會不斷被活化。PKC 可以刺激一氧化氮產生，接著製造 cGMP 而繼續再活化 PKC。同時 PLC 也製造 DAG 活化前列腺素，可以再由膜上之 PG 受器反向刺激自己或別的細胞。顯然 PKC 的角色就是不斷地放大鈣離子所帶來的訊息，產生疼痛的活化。藥理的證據顯示，以微透析方式將 phobol ester 注入猴子脊髓後角區，可以在視丘記錄到緩慢出現的痛覺過敏現象⁷⁷，利用 ganglionside 來中止 PKC 蛋白的 translocation，

可以在動物身上達到前瞻性止痛作用⁷⁸。由於 PKC 自我放大的迴路如此強大，是不是細胞就不斷被活化永不停止呢？以致於人們不禁開始擔心 PKC 的活化訊息會不會在適當的時機停止？最近的研究指出肯定的答案，除了直接針對 PKC 去磷酸化活性的方式以外，值得注意的是，雖然 PKC, calmodulin 等，一面製造了 cGMP, 牽制了 cAMP, 但卻一方面慢慢地激活 cGMP phosphodiesterase (PDE)來消耗 cGMP, 同時也激活 adenylyl cyclase 來活化 cAMP。也就是說，它利用其它因子間接拮抗自己產生的信號，這其中的間隔有多久，目前並沒有研究很透徹。在這方面下功夫研究其控制的變因，也許是將來有用的目標⁷⁹。

(三)超越突觸障礙之細胞間傳信者--擴散性介質

傳統神經生理學家相信神經細胞間的訊號必須透過突觸來傳遞。然而最近的研究顯示，在疼痛傳遞中一氧化氮(nitric oxide)和前列腺素以獨特自由擴散的方式，透過細胞膜自由進出鄰近的神經細胞，完成興奮性調節作用，完全不必仰賴突觸傳遞。長久以來神經生理學家對於疼痛感受區擴大的現象一直無法提供合理解釋。近年來，雖然 EAA 的角色不斷被強調⁸⁰，但是對於局部產生的介質如何穿透空間的障礙仍然一籌莫展。直到擴散性介質的作用在疼痛訊息傳遞中被發現，疑雲才逐漸開朗⁸¹。原來，擴散性介質在突觸後神經元形成後，以它們有利的物理特性向週邊均勻擴散，其濃度隨著距離遞減，愈靠近幅射核心，受到的影響愈大。由於中樞神經系統內神經與神經之間的聯繫十分密切，擴散性介質不僅可以直接作用在鄰近神經的細胞體上產生直接的調節作用外，也可以透過互相接觸的軸突與樹突去影響遠方的神經元。除了空間效應外，影響範圍隨著時間而逐漸擴大的現象，也和擴散的原理不謀而合。

1. 一氧化氮

NMDA 受器活化後很重要的事件就是一氧化氮形成。一氧化氮是一種極不穩定的氣體，它在細胞內具有自由基的功能。由於它的一些特性，最近一直被熱烈討論著，很可能它是神經修飾作用中一個很重要的訊息傳遞因子⁸²。一氧化氮的半生期很短，僅有數秒鐘的壽命，很快形成並且迅速消逝。儘管壽命如此短暫，它卻以驚人的速度分別進出細胞膜：(1)以自由擴散的方式迅速穿透鄰近神經元細胞膜，構成所謂的「反向訊息傳遞因子」，一般相信反向傳訊可以提高突觸間強度。(2)它還可以繼續深入該神經元之細胞核膜，誘發三級訊息傳遞者(例如 Jun, Fos, Krox 轉錄因子)⁸³。一氧化氮合成酵素(nitric oxide synthase, NOS)平時以不活動狀態存在於細胞質內，當胞內鈣離子濃度增加而活化 calcium dependent calmodulin (NOS 的一個 cofactor) 時，兩者互相結合才形成有作用的酵素。所產生的一氧化氮有許多效應，其中被認為與疼痛過敏最有關係的是活化可溶性 guanylyl cyclase 它的結構類似血紅素(hemoglobin)。一氧化氮的受器就是其正中央的二價鐵離子，它的活化產物 cGMP 再活化 protein kinase G，一種具有蛋白磷酸化，具有改變膜通透性，及基因調節能力的磷酸化酵素⁸⁴。一氧化氮和 cGMP 有關疼痛過敏在藥理學上的證據顯示：注射一氧化氮的前驅物(L-arginine)，可以引發「溫覺疼痛過敏」(thermal hyperalgesia)，而非「機械性疼痛過敏」(mechanical hyperalgesia)⁸⁵；相反的，由脊內注入 NMDA 所引發的「疼痛過敏」可被一氧化氮合成酵素抑制劑(L-NAME/L-NMMA)，可溶性 guanylate-cyclase 的抑制劑，或是血紅素來阻斷⁸⁶。有趣的是血紅素必須在細胞外清除一氧化氮，因此一氧化氮被認為可能不是直接作用在原生細胞，而是四處擴散，它可能在突觸後神經元形成，再反饋突觸前神經元，或是由中間神經元製造再四處影響⁸⁷。因此，把一氧化氮比喻成一種以疼痛為起源的廢氣污染，利用氣體擴散而將疼痛的訊息散佈各處，這種見解確有幾分神似。

2. 前列腺素

前列腺素不論在中樞或是週邊神經系統中都對疼痛過敏的形成佔極重要的地位。在發炎區局部注射其拮抗劑 NSAID's，可以抑制疼痛過敏，相反地，用 PGE₂，PGI₂則可興奮 C 型纖維。與前列腺素在藥理學上作用相似的介質尚包括腺苷 (adenosine)及血清擴張素。它們分別經 A₂, 5-HT 受器連結的 Gi 蛋白(inhibitory G protein)減少 cAMP。

在中樞神經系統方面，脊內注射 PGE₂，PGD₂，PGF₂，也可以誘發疼痛過敏。而在脊內注射 NSAID 雖然不能抑制福馬林疼痛實驗中的早期階段興奮波，但卻可以有效抑制晚期階段興奮波，並且與施予劑量呈正相關。當 NSAID 和嗎啡類藥品或 A₂ 興奮劑聯合使用時，這種效應有互相加成的作用⁸⁸。脊內前列腺素的來源包括背角神經元上的 NMDA 受器活化 PLA₂，並促進甘油二脂(diacylglycerol, DAG)崩解，使得花生四烯酸(arachidonic acids)增加，以及 substance P 刺激神經膠原細胞釋出。很可能是前列腺素促使背角神經元上的晚期階段興奮性突觸後電位持續如此長的時間⁸⁶。

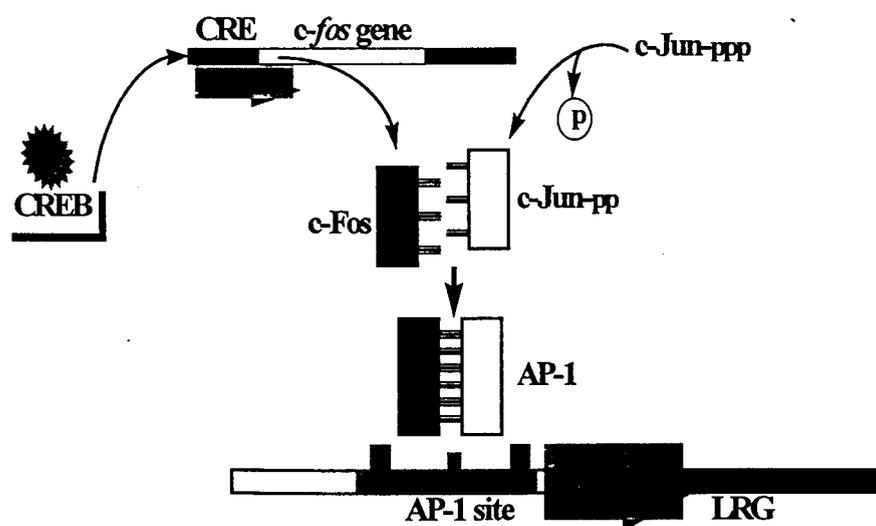
C.三級訊息傳遞者--訊號的維持與執行

c-fos 細胞致癌基因屬於早發性迅速基因(immediate early gene, IEG)，在刺激出現後 5 分鐘就開始轉錄作用，30 分鐘後在細胞核內便可以出現其活化後產物 Fos 蛋白，約兩小時達到最高峰，四小時後逐漸消失。Fos 是正常細胞核內的轉錄因子，在訊號傳遞中扮演著極為重要的角色。藉著 c-fos 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。

生物體內有許多基因，在正常狀況下只有維持很低的活動度，平時處於休眠狀態，但是當某些外在的刺激下，會很快速的表現出它的調節功能，因此被稱為早發性迅速基因。這些刺激包括：光線、感覺神經的激活、去極化興奮、藥物、及各種神經的傳導物質。這個歸類項目下，包括一百餘種不同類型基因。其活化產物是轉錄因子，形成

之後在核內調節其它基因的表現。負責製造該蛋白產物的 mRNA 在細胞出現後，立刻送入細胞質內完成轉譯作用，然後迅速將蛋白送回細胞核作用在後續基因(late response gene,LRG), 例如 pro-dynorphin , pro-enkephalin gene 上（如圖三）⁵⁷。後續基因負責細胞實際上功能與結構的維持，產品包括:各種酵素、結構蛋白、介質、荷爾蒙。

C-fos Cascade



圖三：細胞核內 c-fos 相關疼痛訊號傳遞過程圖

(一)c-jun 的調節

在細胞核內 Jun 原先就存在了，它的活性主要是靠兩個調節區域的磷酸化和去磷酸化來決定，但十分有趣的是這兩個調節區域磷酸化之後，功能正好顛倒。其中靠 C 端的 DNA bind area(DBA)很靠近與 Fos 結合的區域，一旦被磷酸化形成 Jun-DBA-ppp(磷酸化的 DBA)，不但不能和 DNA 結合，反而會把 Fos 分解掉，可見 Jun 必須維持在 Jun-DBA-pp 狀態(去磷酸化的 DBA)，才會和 Fos 結合成最穩定的 AP-1-like 蛋白。在未受到刺激的一般狀態下，Jun 蛋白平常是以不具活性的 Jun-DBA-ppp 存在，疼痛的次級訊息透過 PKC 活化 Jun

pyrophosphatase，它先進入細胞核把 Jun 的 DBA 去磷酸化 (dephosphorylation)，等待 Fos 來結合⁸⁷。換言之，在細胞核內把 Jun 蛋白的 DBA 磷酸化，就可以自我摧毀三級訊息的傳遞。很巧妙的，在 Jun DBA 之靠 N 端的位置，也就是靠近要被 AP-1-dimer 的啟動區 (故稱 transcription domain)，反而要磷酸化才有活性，有利於其他酵素的工作。

Fos/Jun 活動的範圍只在核內，而且啟動 LRG(late response gene) 後會回頭抑制 c-fos 轉錄，增加 c-jun 轉錄，如果沒有繼續從次級訊息傳遞者將訊息送來 (例如 PKC 的後續強化訊號)，Jun 又會回復到自然地磷酸化狀態。此時縱然有大量的 Fos 形成，三級的訊號傳遞還是很快就在核內中止了，這和前述 PKC 的自我調控不同。PKC 可藉 PG 及 NO 來自我加強，而三級訊息傳遞者的調節多半是抑制，任務完成就自我毀滅，至今尚未有類似的自我放大迴路⁸⁸。除了 Jun DAB 磷酸化以外，Jun family 中還有一種 Jun-B 在晚期會慢慢出現取代 Jun。此物對 Fos 的親合力和 Jun 一樣強，但卻沒有什麼 AP-1-like activity，一旦取代 Jun 和 Fos 相結合，細胞核的活化便終止了，因此 Jun-B 也是扮演負面調節的角色⁸⁹。

(二)c-fos 的產生與調節

人類 c-fos 基因位於第 14 對染色體的 14q24.3-q31⁹⁰，它的基因表現受到兩種細胞外物質的活化：1. 促進細胞分裂劑 (mitogen) - 其中以 TPA 最有名，在細胞核內負責接受 TPA 訊號，誘發細胞分裂的 DNA 片段就命名為 TRE (TPA response element)。2. 血清 - 主要是血清中所含的調節細胞分裂之生長激素，如 epidermal growth factor, nerve growth factor。早期的研究在培養皿中加入血清，發現也可以刺激 c-fos 基因的表現，讓 DNA 片段又命名為 SRE (serum response element)。原先以為兩者是重覆的命名，現在慢慢瞭解這兩者是不同的 DNA 片段，並且經由不同的順序來調節基因，其中 SRE 和 TRE 位在 c-fos

基因前方調節 c-fos 轉錄，而 TRE 同時還是 AP-1-site 的主要成份。截至目前為止，大家對於影響 c-fos 的酵素不像對 c-jun 活化和抑制的相關酵素那麼清楚，只知道在細胞質內鈣離子大量湧入後，會活化 MAP(mitogen activated protein) kinase 和 RSK(ribosom S6 kinase)直接進入細胞核將 Fos 蛋白的氨基酸磷酸化⁹¹。另外在疼痛的胞內訊號傳遞中，細胞質內主要是由鈣離子所主導。近來的研究顯示，雖然細胞內鈣離子只有一種，但經由不同通道進入胞內的鈣離子(如 NMDA 的鈣離子通道和 L 型鈣離子通道)，對於 c-fos 的調節居然有不同的方式。Bading 等人利用基因工程的技術將人類的 c-fos 基因和它前端的控制基因植入組織培養的大白鼠腦細胞內，發現 NMDA 的鈣離子通道和 L 型鈣離子通道同時都可以激活 c-fos 基因表現，但是卻發生在不同的控制基因段，換言之，兩者雖然都是經由鈣離子來誘導 c-fos 表現，但是其細胞核內調節的機轉和方式，竟然有很大的差異⁹²！為什麼有這樣的安排，目前仍然不甚清楚。可以確定的是，疼痛訊號從突觸前誘導細胞內次級訊息傳遞者的鈣離子，再穿越細胞核完成三級訊息傳遞者 Fos 的活化過程，並不是單一的路徑，不同類型的離子通道，雖然引導相同的次級訊息傳遞者活化，但是其後續的傳遞及調節過程仍然是遵循獨立的管道，Fos 可能只是參與其中一項重要的環節，還有許多細胞核內其它的調控因素在主導這個微妙的反應。

新產生的 Fos 若是未能遇見 Jun-DBA-pp(去磷酸化的 DBA)，很快就被分解了⁹³。幸好 PKC 被刺激時，Jun pyrophosphatase 也一起被激活，它先進入細胞核把 Jun 的 DBA 去磷酸化，Fos/Jun dimer 才能順利完成。另外值得一提的是，細胞質內其它 tryosine kinase(例如上述的 MAP kinase 和 RSK)若不斷的刺激，也會直接進入細胞核將 Fos 蛋白的氨基酸磷酸化⁹⁴，結果 Fos 反而會下降，這個矛盾的現象與 Jun 的 DBA 去磷酸化的反向調節 AP-1 有異曲同功之妙，可惜目前並不清楚這些巧妙的微控調節罷了。

(三)轉錄後產物的功能

c-fos, c-jun 其活化產物是 Fos 及 Jun 蛋白, 個別轉錄因子並無活性, 要形成 AP-1(Activator-Protein)之後才能在核內調節其它基因的表現。AP-1 蛋白質具有一種特殊的結構(zinc finger), 可以辨認一段特殊的 DNA 序列。AP-1 的種類包括多種核蛋白組合方式: homodimer (如 Jun-Jun), heterodimer (如 Fos-Jun), 在疼痛傳導的訊息傳遞中, 最穩定的 AP-1 就是 Fos-Jun dimer。

和 AP-1 同類的 DNA 結合蛋白中, 還有另外一種名為 CREB (cAMP/calcium response element-bind protein)的蛋白, 它只能辨認 DNA 上一段特殊的排列密碼 CRE(cAMP/Calcium response element), CRE 位在 c-fos 前方負責 c-fos 的轉錄(另外一個調節基因是 SRE), 因此 CREB 是控制 c-fos 轉錄的蛋白之一。CREB 主要是由 cAMP 所誘發, 少數情形由 NMDA/鈣離子引發, 除了可以啟動早發性迅速基因的活動以外, 還可直接啟動某些後續基因。Fos 形成後以 AP-1 的型式來活化 LRG 前方的 AP-1 site, 因此 AP-1 是控制 LRG 的轉錄因子之一。CREB 和 AP-1 雖然都是轉錄因子, 但是作用在不同段的基因, 調節對象不同, 時間順序上也並非同時發生。

脊髓背角區和疼痛關係較為密切的兩種極為重要後續基因是 pre-proenkephalin 及 pre-prodynorphin gene。強啡? 和腦啡? 是其主要產物, 分別作用在 μ receptor 和 δ receptor 上⁹⁵。它們的功能原先以為是用來抑制附近的神經元, 從而達成止痛作用⁹⁶, 然而近年的文獻卻發現, 它們的含量在疼痛刺激後顯著增加, 竟然可以強化疼痛⁵⁶! 原來在脊髓背角區, 這兩種介質的直接作用是興奮性, 平時含有這些介質的局部神經元長期處於壓制的狀態。而當強烈的興奮性訊息湧入背角區時, 原來不活動的局部神經元便可以大量釋出強啡? 和腦啡?, 於是就產生了強化疼痛的訊息⁶⁸。最近的研究更進一步指出, 強啡? 除了作用在 μ receptor 外, 還可以直接透過 NMDA 受器活化,

來幫助突觸後神經元之興奮現象⁹⁷，顯然這些調節機制仍有極大的研究空間。

由於疼痛傳遞訊息因子只出現在很短暫的特定時間，並且彼此互相依賴，息息相關。因此，以阻斷疼痛分子訊息傳遞作為慢性疼痛治療的藥物策略，在理論上是一個可行的方式。本研究為動物實驗，以白鼠 Wistar rats 為研究對象，針對次級疼痛分子訊息傳遞一氧化氮，在疼痛測試前先經脊髓腔投予一氧化氮酵素抑制劑 L-NAME，以抑制一氧化氮的生成，並觀察這個治療對於下游疼痛訊息 c-fos 表現，以及疼痛行為的影響。

五、過敏性疼痛的評估與實驗方法

在本研究所有的動物實驗中，我們以福馬林刺激作為過敏性疼痛的測試模式，並使用 Fos 蛋白質為疼痛的生化標記作為我們評估過敏性疼痛最主要的依據。這些方法的特色，以及採行的理由，分別敘述如下：

A. Fos 蛋白質在疼痛訊號傳遞過程中扮演的角色

以 c-fos 細胞致癌基因的活動度來做為疼痛的指標，是近年來疼痛學研究中嶄新的方向。和傳統的測驗最大的不同點：Fos 在神經核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。以解剖組織學中類似其他的方法為例，碳 14-2-去氧葡萄糖(14C-2-deoxyglucose, 2DG)是目前用來探測神經元代謝度的最敏感指標之一，而 Fos 用在代謝分佈的測試上與 2DG 的吸收極為接近⁹⁸，但是後者用在痛覺測試時卻無法呈現出刺激(痛覺) 反應(標示區)的解剖對應性⁹⁹。

以 Fos 做為實驗動物疼痛指標好處包括 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，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。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¹⁰⁰。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¹⁰¹。4.可以參考其分佈情形，具有極佳的定位性 (somatotopic presentation)¹⁰²。5.不同的疼痛刺激會產生不同的表現¹⁰³，如：機械性疼痛，炎性疼痛(例如：結核菌素關節內注射，福馬林皮下注射)，神經傷害疼痛模式，內臟疼痛¹⁰⁴⁻¹⁰⁷。6.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¹⁰⁸。7.更重要的是 Fos 的誘導與調節機制已經在分子生物學的研究中得到強烈的佐證，與細胞內訊息傳遞息息相關¹⁰⁹。藉著 Fos 的激活，神經細胞核啟發一連串之蛋白質合成及細胞膜電位改變的反應，這種現象不啻為神經可塑性參與疼痛最直接的證據¹¹⁰。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度方法中，極為理想的工具。

B.Fos 作為疼痛指標的限制

然而，Fos 在生理上是一種普及型的後續基因轉錄因子，可以同時接受多種刺激的訊息，因此在表現上受到眾多因素所主導。缺乏對疼痛刺激的專一性反應，是 Fos 做為疼痛的指標的先天上缺憾。在活體(in vivo)的動物實驗中，強光、噪音、驚嚇¹¹¹⁻¹¹³等非疼痛刺激都可以誘導腦幹及大腦皮質區 Fos 的形成。在細胞培養皿(in vitro)中，它對於多種藥品都有反應，差別只是反應強弱不同而已¹¹⁴。

儘管如此，在神經解剖學家的觀點中，倘若和其它更具侵犯性的一般神經學研究方法相比較，上述的缺陷簡直微不足道。他們認為對刺激的非專一性反應，普遍存在於各種神經科學的研究方法中，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。因此在邏輯推論上要特別留意 c-fos 基因表現既非疼痛刺激的充份條件，也非其必要條件!換言之，看到某處染有大量 Fos 標記的細胞核，並不能反過來推論該處神經表現必定與疼痛有關。舉例來說，疼痛刺激後可以在腎上腺髓質的神經節(ganglion)細胞核看到大量 c-fos mRNA 的形成，若因此而推論這些反應是疼痛的結果，並不太恰當。

此外，並非所有參與疼痛傳遞的神經必定會表現 Fos 蛋白。以初級傳入神經之背根神經節(dorsal root ganglion)為例，利用傳統電生理學的方法，已證實確有參與神興奮性修飾的過程，然而即使在極強烈的刺激下，該處細胞核從未出現 Fos 蛋白。如果片面依據「疼痛訊號傳遞 Fos」的學說，是否就必須推翻早先的電生理發現，而否定背根神經節在痛覺可塑性中所扮演的角色?答案當然是否定的。合理的推測是，背根神經節中疼痛訊號傳遞 AP-1 仍然存在，但是其 AP-1 並非由 Fos-Jun dimer 所組成，可能以其它方式出現，例如 Jun-Jun dimer 或 Jun-Fra dimer，Fos 並不參與，可惜在疼痛訊號傳遞中目前仍然沒有得到證實¹¹⁵。

無可諱言，Fos 並不是最理想的疼痛標記，目前比較持平的看法認為實驗設計者必須掌握良好的控制條件，c-fos 基因的活動度便可以確實反應出疼痛的大小。反之，若是刺激變數不在控制之內，Fos 的量化就失去了推論的價值。這些條件包括：1.適當的疼痛刺激—利用良好的對照組設計，過濾一些在實驗過程中無可避免的其他類型刺激；疼痛刺激要施於有限的部位；選擇適當刺激類型。例如，若要誘發大白鼠面頰的痛覺受器，必須將觸鬚及毛髮剃除，所用的刺激方式僅僅產生疼痛，不會誘發觸覺或非疼痛感覺。2.適量的刺激強度—選擇刺激強度應足以誘發痛覺為前提，以溫度為例，溫熱感(攝氏 41 度)

和熱痛閾值(攝氏 47 度)都會在脊髓背角產生 Fos¹¹⁶。3.在適當的時間內進行觀察 - 觀察 c-fos 基因的表現具有極為嚴格的時間限制。以福馬林皮下注射為例，注射後 30 分鐘可以得到最強的 mRNA 含量，兩小時左右 Fos 蛋白反應最強，超過這個最佳的時段，不僅其含量大減，分佈的部位也有極大的改變。相反地，若是採用坐骨神經約束法或結核菌素注射法，觀察的最佳時間是在數天之後¹⁰⁴。4.在適當的部位觀察一疼痛刺激和神經的解剖相對應部位有絕對的關連。以足底的熱刺激為例，該處神經皮節對應區 L4 部位，該側的脊髓背角區是最佳的觀察部位。同時間在間腦和大腦皮層也會出現大量的 Fos，仔細觀察它們的分佈和量化關係，確實可以提供日後研究極大的參考，但若採用腦部 Fos 蛋白反應來作為疼痛的指標，就不是一個理想的對象，因為正常活動老鼠的腦部原本就有一些 Fos 活動度。就該部位而言，Fos 活動度無法區分疼痛刺激和其它訊息。

C.從 Fos 到過敏性疼痛的發生

過去 c-fos 的研究工作多集中在「刺激 Fos」之間的變化，也就是所謂的轉錄前現象，有關於 c-fos 轉錄後的結果及影響的論文卻十分有限。但是，隨著人們對於神經系統整合功能的關注，科學家對於 c-fos 轉譯後的細胞變化就產生了高度的興趣。儘管如此，愈來愈多的疑點有待克服。c-fos 基因接受膜外訊息而轉譯為 Fos 蛋白再形成 AP-1，其功用就是調節後續基因的表現。Fos 只是這個流程中的一個傳遞者，重要的課題是 Fos 蛋白調節那些後續基因?這些基因的活化為細胞帶來何種改變?神經細胞的功能和型態是否因此而受到影響?簡而言之，這一連串的疑問就是在探討 c-fos 轉譯後現象，與過敏性疼痛發生的關係。目前在學理上比較理想的方法，是在活體(in vivo)動物操控該段基因，例如採用 antisenseDNA，transgene 的技術，直接在 c-fos 基因上動手腳，然後比較其間的差異，是一個勢在必行的研究方向。

六、以福馬林皮下注射作為過敏性疼痛的研究模式

福馬林注射疼痛測試和大多數疼痛測試，最大的不同在於它能測試動物對於組織傷害所產生強烈而持續性疼痛的反應。一般認為，它提供比其他如機械性壓痛或熱痛等急性疼痛測試更能有效而精確的評估^{117, 118}。福馬林注射疼痛測試於1977年由Dubuisson以及Dennis兩位學者提出¹¹⁷。他們發現在老鼠皮下注射福馬林之後，仔細觀察老鼠的疼痛行為反應，發現老鼠會產生兩個階段的疼痛行為反應，分別代表不同的疼痛刺激。第一階段(早期階段)在注射福馬林之後立刻發生，持續約3-5分鐘，一般相信這個反應來自福馬林注射對疼痛受器直接的化學刺激^{117, 119}，主要刺激了C以及A神經纖維¹²⁰，之後約有10-15分鐘動物安靜下來，幾乎沒有表現任何疼痛行為。第二階段(晚期階段)約在注射15-20分鐘之後展開，並持續20-40分鐘左右。非類固醇消炎藥物如indomethacin只能降低福馬林刺激的第二階段疼痛行為，而非第一階段疼痛行為¹²¹。即使注射低濃度的福馬林，注射非類固醇消炎藥物仍無法降低第一階段疼痛行為，表示兩個階段的行為反應不同並非來自刺激強度的差別。一般認為第一階段疼痛反應來自周邊疼痛受器直接受到刺激，而第二階段疼痛反應來自中樞神經過敏化的結果。但也有實驗證據顯示，在周邊神經，第一階段參與的分子包括substance P以及bradykinin，而第二階段則有histamine, serotonin, prostaglandins以及bradykinin參與¹²²。而電生理學的結果也發現bradykinin B受器的拮抗劑抑制了第二階段疼痛反應，卻無法抑制第一階段反應，顯示了bradykinin主要參與了晚期的疼痛表現¹²³。這些證據都顯示了，周邊、炎性反應，對於第二階段疼痛表現是有貢獻的。

當然，實驗結果指出，脊髓中樞的變化是造成福馬林刺激第二階段疼痛很重要的原因。在福馬林皮下注射後，紀錄脊髓背角單一神經元，發現在一階段之前注射局部麻醉劑，能夠預防第二階段疼痛行為

的發生¹²⁴。同樣，如果以 opiate 阻斷在第一階段疼痛反應，就算在第二階段以 naloxone 拮抗 opiate 也無法恢復第二階段的疼痛反應¹²⁵。同樣，在行為的研究也証實只有在第一階段在注射部位給予局部麻醉藥才能有效地降低第二階段的疼痛行為。如果在兩個階段之間給予局部麻醉藥則沒有效果⁶¹。因此，單純周邊發炎反應是不足以構成第二階段的疼痛反應，因為其他更強烈的炎性刺激物如 carrageenan 或 yeast 所產生的疼痛行為並沒有這麼激烈¹²⁶，因此必須有第一階段的疼痛刺激脊髓的改變，以及周邊的炎性刺激共同反應，才形成了福馬林第二階段的疼痛行為。

由於第二階段的疼痛反應必須倚靠第一階段的疼痛刺激。因此，福馬林測試，在研究各種阻斷劑的對於過敏性疼痛的止痛效用時，便提供了我們很好的一個疼痛行為評估模式。

而其他研究疼痛的實驗動物模式包括：簡單反射測量模式，如 tail-flick test limb-withdrawal reflex、jaw-open reflex；持續疼痛模式，如 formalin test、adjuvant polyarthritis、carrageenan induced inflammation；未學習行為反應模式，如 hot-plate test、writhing response；學習行為反應模式，如 shock titration, reaction time conflict task 等¹²⁷，不外乎包含於機械刺激法、熱刺激法、電刺激法及化學刺激法等四大類傷害性刺激中。由於常用的幾個疼痛模式中，各有其限制及缺點。例如 tail-flick test 雖然是一簡單且量化性高的實驗，但也僅能代表動物對痛覺的反射行為 (reflex behaviour)，而沒有高級中樞痛覺整合的參與，且須注意實驗過程中不能影響到動物的運動神經及肌肉的功能，否則會改變反射的延遲時間而造成誤判，另外 baseline 的變異不小，亦是 tail-flick test 的困擾，因此必須選擇合適的紅外線功率及 cut-off 時間。在近幾年的研究中，實驗環境溫度及鼠尾溫度都有學者提出會干擾 baseline latency^{128、129}，因此，必須控制固定且合適的室溫(22-24)並記錄實驗前後的鼠尾溫度變化，若有改變要再用

公式來校正。又如，化學刺激中，用醋酸腹腔注射造成急性腹膜炎所引起的臟腑痛(visceral pain)，可見到扭體反應 (writhing response)，其中要注意實驗動物的年齡及體重造成的誤差，而扭體反應也僅能代表位於周邊的疼痛作用；相反的許多機械性刺激(tail pressure test,tail pinch test)、熱刺激(hot plate)及電刺激(electric foot shock)亦僅能代表中樞的鎮痛作用。唯有化學性刺激中的福馬林試驗較特別，它可同時測得中樞以及周邊所引起的痛覺反應，這是此試驗的優點。而針刺鎮痛的試驗多半用 tail-flick test 來評估，較局限於脊髓痛覺反射之探討。因此，本研究用福馬林試驗來評估電針之鎮痛作用，並進一步探討不同強度電針鎮痛之機轉。

七、足三里穴的解剖位置及功用

- (一)別名：三里、下陵、下三里、下陵三里¹³⁰。
- (二)釋名：「下陵，膝下三寸脛骨外三里也，為合」。位於膝下三寸因稱「三里」，為與手三里相區分，故冠「足」字。故所謂「三里者，下膝三寸也」¹³¹即所謂的足三里穴，屬於足陽明胃經合穴，是回陽九針之一。
- (三)體表定位：犢鼻穴直下三寸，脛骨前緣外開一寸處。
- (四)取穴法：正坐垂足，先取犢鼻，脛骨頭上緣沿脛骨往下量取三寸，再由此向 脛骨外側旁開約一寸餘，有一隆起之筋，按之則筋分開，其溝中是穴¹³²。
- (五)局部解剖：1.肌肉 - 在脛骨前肌、伸趾長肌之間。
2.血管 - 有脛前動靜脈。
3.神經 - 淺層佈有腓腸外側皮神經及隱神經的皮支，深層正當腓深神經¹³³。
- (六)刺灸法：針法直刺 1-2 寸，有麻電感向足背放射。溫灸 10-30 分鐘，小兒忌灸，灸則反生疾¹³³。
- (七)功能：和胃健脾，通腑化痰，升降氣機¹³⁴。

(八)主治：1.古代記述

- (1)「著痺不去，人寒不已」，「腸中不便，取三里」¹³⁵。
- (2)肌肉痛，熱中善饑，寒中腸鳴腹痛¹³⁶。
- (3)氣在于腸胃¹³⁷。
- (4)胃中寒，心腹脹滿，腸鳴，臟氣虛憊，真氣不足，腹痛食不下，大便不通，心悶不已，卒心痛，腹有逆氣上攻，腰痛不得俯仰，小腸氣，水氣蠱毒，鬼擊膝脛痛，目不明，產婦血暈。秦承祖云諸病子皆治，千金翼云主腹中寒脹滿，腸中雷鳴，氣上衝胸，喘不能久立，腹痛，胸腹中瘀血，傷寒熱未已，熱病汗不出，壯熱，陽厥，悽悽惡寒，頭眩，小便不利¹³⁸。

2.現代報導

- (1)急慢性胃炎、腸胃功能運動失調，潰瘍病。
- (2)急慢性腸炎，腸梗阻，幽門痙攣。
- (3)高血壓，高血脂症。
- (4)氣喘，過敏性疾病。
- (5)肝炎，黃疸。
- (6)虛弱，貧血。白細胞減少症。
- (7)下肢癱瘓。
- (8)泌尿生殖系統疾病¹³⁹。

(九)大鼠取穴法：膝關節下 5 mm，脛骨旁開 2 mm，針入 5 mm¹⁴⁰。

八、動物實驗之髓鞘內給藥法

許多動物實驗中，利用大鼠(rat)及小鼠(mice)，由髓鞘內給藥的途徑，研究藥物在脊髓方面的作用，其給藥的方法，主要為以下二種：

Hyden 是使用 pentobarbital 麻醉小鼠後，直接以 30 號針由第五腰椎或第六腰椎處進行髓鞘內給藥，此種方式較為簡便，對脊神經的損傷較小¹⁴¹，但只適用於小鼠，且無法多次給藥¹⁴²。

1976 年 Yaksh 和 Rudy 提出利用聚乙烯管 (polyethylene tube, PE-10) 自大鼠腦池(cisterna)插入，向脊髓腰椎(lumbar spinal cord)方向推入約 7.5~8.5 cm，進行髓鞘內給藥(intrathecal administration, i.t.)，以探討脊髓在鎮痛作用中所扮演之機轉¹⁴³。有很多研究者沿用此法進行實驗，可以說是目前最普遍之方法。但是此法容易損傷動物脊髓，破壞了神經生理功能，造成實驗動物神經功能缺失(neurological deficit)或是下肢偏癱(paralysis)。其手術的成功率並不高。

本研究使用重 250-350 g 之 Wistar 鼠。動物先以 pentobarbital 50 mg/kg 腹腔注射麻醉。從枕骨與第一頸椎處，剪開肌肉層，並輕挑硬脊膜，將 PE-5 細管置入脊髓腔內 8 cm，使尖端大約位在脊椎腰椎膨大處 lumbar enlargement。細管尾端套上 silicon tube 經皮下在白鼠耳間部位拉出並固定。等待 3-4 天的恢復期。我們從 silicon tube 以 10 μ l 2% xylocaine 測試細管功能，並在死後解剖以確定位置。只有細管功能正常及位置正確的老鼠才列入實驗。本手術法經多位學者專家不斷研究改進缺失對脊髓之傷害已趨少¹⁴⁴⁻¹⁴⁶，再經本實驗室反覆改良其成功率約可達 90%。(如下圖)



圖四：本實驗室設計之插管平台及作業情形圖

第三章 材料與方法

一、實驗動物

雄性之 Wistar 系大鼠，約 250-350 g，飼養於 12 小時黑暗，12 小時白晝之飼養室中，溫度控制於 21-23℃，飼料及水供動物自由取食。實驗動物購自臺灣大學實驗動物中心。

二、髓鞘內插管之手術方法

本手術方法依本研究室所用之髓鞘內插管手術法，將重 250-350 g 之 Wistar 鼠先以 pentobarbital 50 mg/kg 腹腔注射麻醉。從枕骨與第一頸椎處，剪開肌肉層，並輕挑硬脊膜，將 PE-5 細管置入脊髓腔內 8 cm，使尖端大約位在脊椎腰椎膨大處 lumbar enlargement。細管尾端套上 silicon tube 經皮下在白鼠耳間部位拉出並固定 等待 3-4 天的恢復期，我們從 silicon tube 以 30 μ l 2% xylocaine 測試細管功能，注射後大鼠兩後腳麻痺，但於 8-10 分鐘左右恢復正常者視為插管成功；實驗約在一星期左右進行，並在死後解剖以確定位置。只有細管功能正常及位置正確的老鼠才列入實驗。手術後大鼠的飼養，必須各飼養籠只飼養一隻大鼠，否則大鼠會因互相搔抓，或互相舔咬大鼠身體上異物，使大鼠後頸部皮膚露出之 PE-5 管，因而破壞；個別飼養時，大鼠之前肢並不會抓到後頸部，故毋須擔心露出之 PE-5 管被破壞。

三、L-NAME 的製備

L-N^G-nitro-arginine methyl ester (L-NAME) (Merk # N5751) 為 NMDA 受體之拮抗劑，分子量 268，將一瓶(250 mg)溶於 3c.c. 0.9% 生理食鹽水中，則 1 c.c.含 300 nmole 之 L-NAME，所以 10 μ l 含 3000 nmole；再將此溶液 3.3 μ l 加 6.7 μ l 生理食鹽水稀釋則每 10 μ l 含 1000

nmole 之 L-NAME；若將 1 μ l 此溶液加 9 μ l 生理食鹽水稀釋則每 10 μ l 含 300 nmole 之 L-NAME。先將上述不同濃度 L-NAME 製備後冷凍備用。

四、電針刺激

1. 大白鼠先置入流通有 1% Halothane 的方形透明容器，待其昏迷後置入特製之大白鼠固定器，兩後肢及尾部自然露出容器外，固定器接上麻醉機，繼續以 1% Halothane 進行麻醉。
2. 大白鼠後肢小腿外側剃毛。
3. 將一支不鏽鋼 36 號針（直徑約 0.2 mm）插入後小腿脛骨粗隆及腓骨頭中間之脛骨前肌處相當於足三里穴位（膝關節下 5 mm，脛骨旁開 2 mm），針入 5 mm，另一支針插入穴位正下方 5 mm 處。
4. 連接鋼針及 CCU 導線於電針機（611 STIMULATOR），打開電源，調整電波為單向波(monophasic)波寬為 5 msec.，刺激頻率為 4 Hz，電流強度漸增至出現局部肌肉顫動(大約 0.5 mV)，定義此電流強度為基本強度(baseline intensity)。在不影響大白鼠麻醉深度的情形下，逐漸調高刺激強度至實驗之要求（10 倍及 20 倍的基本強度，本研究分別為 5 mV 及 10 mV），電針時間為 20 分鐘。

五、固定液之灌流程序

Pentobarbital 以 100 mg/kg 之量腹腔注射麻醉，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，便可看到主上升動脈。先起動 pump 確定輸液有進入後，保持輸液流動狀態，將 18 # 鈍面注射針從左心室插入至主動脈內 0.5 cm，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，血循停止，灌流必須在二、三分鐘內完成，否則易形成小血管的血栓及微血管滯留。先以 0.9% 的生理食鹽水 500 ml 完成血液沖洗，再將 pump 管路轉換至 3.8% paraformaldehyde (溶劑配製法如表三) 以 500 ml/ 半小時的速度灌流完成固定。期間血液沖洗完全的鼠肝呈淺土黃色，開始以 paraformaldehyde 灌流時可以看到四肢抽搐，手舞足蹈 (fasciculation) 的現象，灌流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。

六、取出大白鼠脊髓之手術

將大鼠腹部朝下，用圓頭解剖刀沿著背部脊柱中間將皮膚劃開，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 的橫突 (transverse process)。先從 L6 起，將兩側脊突 (spinous process)，橫突和椎間關節 (pars interarticularis) 部份剪斷，再用小骨剪小心剪開 lamina，將覆蓋在 spinal cord 上方的 lamina 及兩旁的 pedicle 剪斷，並保留脊髓硬膜 (dura matter) 之完整。待全部的脊椎完全打開後再剪開硬膜，取出馬尾 (spinal cord cauda equina) 部份用平頭小剪夾住上翻，脊神經 (spinal nerves) 及 T10 之脊柱處 (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辨認左右。所取出之脊柱置於 3.8% paraformaldehyde 中約 4 小時，而後置於 30% sucrose (溶劑配製法如表四) 中脫水一夜。

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 50 ml

6. 3.8% paraformaldehyde 50 ml

表三：3.8% Paraformaldehyde in PBS 溶劑配製法

| | | |
|--|---------|---------|
| ID-H ₂ O | 2000 ml | 1000 ml |
| NaH ₂ OPO ₄ · H ₂ O | 6.35 g | 3.18 g |
| Na ₂ HPO ₄ | 22.72 g | 11.36 g |
| Paraformaldehyde | 80.00 g | 40.00 g |
| NaCl | 18.00 g | 9.00 g |

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

表四：30% Surcose in PBS 溶劑配製法

| | |
|--|---------|
| ID-H ₂ O | 100 ml |
| NaH ₂ OPO ₄ · H ₂ O | 0.318 g |
| Na ₂ HPO ₄ | 1.136 g |
| NaCl | 0.9 g |
| Surcose | 30 g |

七、免疫組織染色操作法

- (一) 冷凍切片：-20 ， 4 μm
- (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
- (七) 洗淨
- (八) 次級抗體反應 - 1：200 biotinylated goat anti-rabbit IgG
- (九) 洗淨
- (十) 聚合反應 - 1：50 ABC polymerization
- (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

詳細步驟如表五¹⁴⁷

表五：免疫組織染色操作詳細步驟表

| | |
|---|--|
| <p>一、冷凍切片</p> <p>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 100 ml(溶劑配製法如表六)6. 鑷子一把7. 毛筆一枝8. 快速冷媒劑9. 冷媒(Frozen specimen embedding medium, CryomatrixTM, Shandon) | <p>步驟：(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 1 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 cm 長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. 拉上桿子保護刀鋒8. 將台子放置固定台，台子放置 lock 要先壓下調整。9. 微調整10. 盛片之盒子放入 box 裏面11. 培養皿分別 labelA、B、C、D 分別加入 PBS 約 20 ml12. 將厚度設定為 4 μm <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. 將微調退至底部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>準備用具：Wash Buffer (溶劑配製法如表七)</p> | <p>步驟：</p> <ol style="list-style-type: none">1. 用玻璃吸管將試管中 Wash Buffer 吸乾，再加入新的 W.B.如此重覆三次，每次 5 分鐘 |

表五：續

| | | | | | | | | | | | |
|---|---|----------|---------|------------------------------------|---------|------------------|---------|-----|-----|----------------|------|
| <p>三、消除內源性過氧化氫酵素</p> <p>準備用具：</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Wash Buffer 2. 30 % H₂O₂ | <p>2. shaking</p> <p>配置方法：</p> <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 70%;">W.B.</td> <td style="text-align: right;">2.97 ml</td> </tr> <tr> <td>30 % H₂O₂</td> <td style="text-align: right;">0.03 ml</td> </tr> </table> <p>步驟：搖晃 10 分鐘</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</p> <p>準備用具：</p> <ol style="list-style-type: none"> 3. Wash Buffer 4. NGS <p>六、初級抗體反應</p> <p>準備用具：</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. rabbit anti-c-fos polyclonal antibody (1 : 600) (Santa Cruz # sc-52) 2. NGS 3. Wash Buffer | <p>配置方法：</p> <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 70%;">W.B.</td> <td style="text-align: right;">2.7 ml</td> </tr> <tr> <td>NGS</td> <td style="text-align: right;">0.3 ml</td> </tr> </table> <p>步驟：搖晃 20 分鐘</p> <p>配置方法：</p> <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 70%;">W.B.</td> <td style="text-align: right;">2.95 ml</td> </tr> <tr> <td>NGS</td> <td style="text-align: right;">1 滴</td> </tr> <tr> <td>c-fos antibody</td> <td style="text-align: right;">5 µl</td> </tr> </table> <p>步驟：搖晃 20 分鐘</p> | W.B. | 2.7 ml | NGS | 0.3 ml | W.B. | 2.95 ml | NGS | 1 滴 | c-fos antibody | 5 µl |
| W.B. | 2.7 ml | | | | | | | | | | |
| NGS | 0.3 ml | | | | | | | | | | |
| W.B. | 2.95 ml | | | | | | | | | | |
| NGS | 1 滴 | | | | | | | | | | |
| c-fos antibody | 5 µl | | | | | | | | | | |
| <p>七、洗淨</p> | <p>如步驟二</p> | | | | | | | | | | |
| <p>八、次級抗體反應</p> <p>準備用具：</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. goat anti-rabbit IgG (1 : 200) 2. NGS 3. Wash Buffer | <p>配置方法：</p> <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 70%;">W.B.</td> <td style="text-align: right;">10 ml</td> </tr> <tr> <td>NGS</td> <td style="text-align: right;">2 滴</td> </tr> <tr> <td>goat anti-rabbit</td> <td style="text-align: right;">1 滴</td> </tr> </table> <p>步驟：搖晃 1 小時</p> | W.B. | 10 ml | NGS | 2 滴 | goat anti-rabbit | 1 滴 | | | | |
| W.B. | 10 ml | | | | | | | | | | |
| NGS | 2 滴 | | | | | | | | | | |
| goat anti-rabbit | 1 滴 | | | | | | | | | | |
| <p>九、洗淨</p> | <p>如步驟二</p> | | | | | | | | | | |
| <p>十、聚合反應</p> <p>準備用具：</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. elite ABC complex (1:50 , Vectastain) 2. W.B. <p>應於使用前 30 分鐘混合均勻</p> | <p>配置方法：</p> <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 70%;">W.B.</td> <td style="text-align: right;">10 ml</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td style="text-align: right;">4 滴</td> </tr> <tr> <td>B</td> <td style="text-align: right;">4 滴</td> </tr> </table> <p>步驟：搖晃 1 小時</p> | W.B. | 10 ml | A | 4 滴 | B | 4 滴 | | | | |
| W.B. | 10 ml | | | | | | | | | | |
| A | 4 滴 | | | | | | | | | | |
| B | 4 滴 | | | | | | | | | | |
| <p>十一、洗淨</p> | <p>如步驟二</p> | | | | | | | | | | |
| <p>十二、呈色反應</p> <p>準備用具：</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 0.1% DAB | <p>配置方法：</p> <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 70%;">0.1% DAB</td> <td style="text-align: right;">7 mg</td> </tr> </table> | 0.1% DAB | 7 mg | | | | | | | | |
| 0.1% DAB | 7 mg | | | | | | | | | | |

表五：續

| | |
|---|---|
| <p>2. 0.01% H₂O₂</p> <p>3. nickel 6 mg/ml(0.2%) (溶劑配製法如表八)</p> <p>4. Tris buffer (溶劑配製法如表九)</p> <p>應於使用前 30 分鐘混合均勻</p> <p>注意：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>十三、洗淨</p> | <p>0.01% H₂O₂ 5 ml</p> <p>nickel 6 mg/ml(0.2%) 1.2 ml</p> <p>Tris buffer 13.8 ml</p> <p>步驟：搖晃 6-10 分鐘</p> <p>A.試片：</p> <ol style="list-style-type: none"> 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。 2. 若呈色正常於 10×10 倍數顯微鏡下可以清晰看出深黑色顆粒的 Fos 細胞核，背景也可以清晰分辨出灰質和白質的界限。 <p>B.正式反應。</p> <p>如步驟二（十次以上）</p> |
| <p>十四、展片</p> <p>準備用具：</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. slides 2. gelatin 3. 毛筆 | <p>配製方法：</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. gelatin 0.8 g 加入 112 c.c.之水最後加入 95 % 酒精 100 ml 綜合 2. 以 1:1 或 1:2 對水稀釋使用（以免太黏稠） |
| <p>十五、脫水乾燥</p> <p>準備用具：</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 組織放入乾燥箱一天即可 2. alcohol 50%、75%、95%、100% 3. xylene I 4. mounting medium 5. 蓋玻片 6. 針頭乙支 | <p>步驟：</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 50%酒精 3 分鐘 2. 75%酒精 3 分鐘 3. 95%酒精 3 分鐘 4. 100%酒精 6 分鐘 5. xylene I 6 分鐘 6. 滴入 mounting medium 於戴玻片上 7. 趁 xylene 未乾時蓋入蓋玻片，注意勿讓氣泡存留於標本上 8. 用指甲油塗抹於蓋玻片邊緣，防止 mounting medium 之溶劑流失 |

表六：0.1M PBS 溶劑配製法

| ID-H ₂ O | 2000 ml | 1000 ml | 3000 ml |
|--|---------|---------|---------|
| NaH ₂ OPO 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

表七：Wash Buffer 溶劑配製法

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

表八：Nickel (50 mg/ml) 溶劑配製法

| | | | | |
|--------|---------|---------|---------|---------|
| Nickel | 1250 mg | 2500 mg | 3750 mg | 5000 mg |
| Tris | 25 ml | 50 ml | 75 ml | 100 ml |
| | 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.泡好之溶液以透明玻璃瓶裝，以貼紙做好標示日期冷藏之

表九：Tris Buffer 溶劑配製法

| | | | | | |
|-------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 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

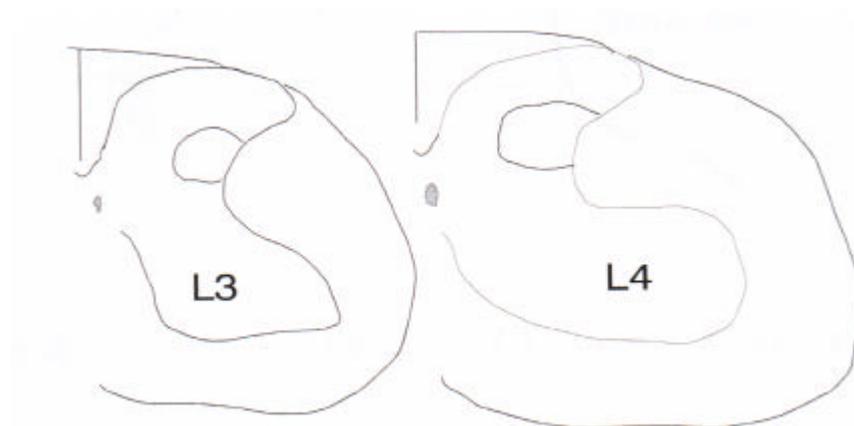
2.泡好之溶液以透明玻璃瓶裝，以貼紙做好標示日期冷藏之

八、型態分析

(一) 選定皮節

在低倍之 dark field 背景下審視脊髓切片，根據其白質及灰質之

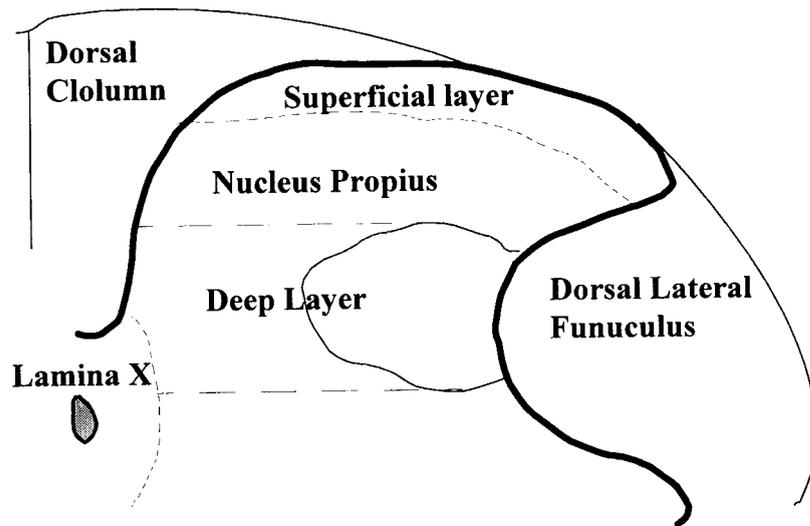
比例，及前角之形狀，可以將各皮節區之特定形態篩檢出來，挑選出 L1、L2、L3、L4、L5 之片子，其中 L3 有如尖頭鞋，L4 有如鈍頭馬靴（如圖五）¹⁴⁸。然後記錄該切片在顯微鏡載物台上之座標，供日後篩選。



圖五：大白鼠脊髓皮節的區分圖

（二）劃分層區

在 $10 \times 10 \times 1.25$ 倍之 dark field 下，選定該皮節之背角區，在 Camera Lucida 下將背角之輪廓劃出，其中可以明顯劃出 Reticular part 之外型。取其上緣及下緣各做出一條平行線，便可訂出 Deep layer (D) 之邊界；Superficial layer (S) 和 Nucleus proprius (NP) 的界限，由瀰漫於 NP 中的微細縱向神經束來區分；一般而言，S 約佔 $1/3$ 而 NP 約佔 $2/3$ 的比例（如圖六）¹⁴⁸。



圖六：大白鼠脊髓背角的分層圖

九、研究設計與實驗流程

(一) 不同劑量的一氧化氮合成酵素抑制劑 (L-NAME) 對福馬林測試誘發之 c-fos 表現以及疼痛行為反應

實驗共分四組，動物依隨機方式在福馬林測試前 30 分鐘經細管給予 1. 0.9% 生理食鹽水 10 μ l (n=6)。 2. 300 nM L-NAME /0.9% 生理食鹽水 10 μ l (n=6)。 3. 1000 nM L-NAME/0.9% 生理食鹽水 10 μ l (n=6)。 4. 3000 nM L-NAME/ 0.9% 生理食鹽水 10 μ l (n=6)。給藥之後，再經由細管內以 10 μ l 生理食鹽水灌沖。

福馬林疼痛測試以 26 號針頭在老鼠左後腳掌皮下注射 50 μ l 5% 福馬林開始，隨即將老鼠置入 30x30x30 cm 的鐵籠內，並在外下方 45 度角置一鏡面，以方便從所有的角度觀察動物行為。我們利用自己設計之程式記錄並觀察老鼠的疼痛加權分數 (weighted pain score)。疼痛加權分數的評估¹¹⁷為所有動物表現在不同疼痛行為的時間乘上加權計分之總和的平均。疼痛行為的加權計分分別為：0，注射腳沒有表現任何疼痛行為。1，注射腳輕輕著地，幾乎沒有負荷體重。2，注射腳抬高，沒有任何面與地面接觸。3，老鼠舔、咬注射

腳或注射腳顫動。在注射後的 1 小時期間，用電腦程式計算老鼠表現之各種疼痛行為的時間乘上加權計分，並以每 5 分鐘為單位平均。觀察者並不知道動物的給藥以及分組。

福馬林疼痛測試結束之後，老鼠立即給予大量 pentobarbital (100 mg/kg) 腹腔注射麻醉，剪開胸骨，經心臟灌流食鹽水沖血，並以 3.8% paraformaldehyde 固化。取出脊髓腰椎膨大部位後固定，並以 30% sucrose 隔夜脫水並冷藏保護 4 μ m 冷凍切片以 phosphate buffer 收集。在洗淨及阻斷反應後給予稀釋成 1:600 之兔多株 anti-c-fos 抗血清 20 分鐘，接著是對抗兔血清之 biotin 化羊 IgG 1 小時，然後是標準的 avidin-biotin-complex 之聚合反應 (ABC polymerization) 1 小時。呈色後切片置放在 gelatin 塗抹之載玻片上脫水，風乾，蓋上蓋玻片供顯微鏡觀察。我們檢查第四腰椎脊髓背角各層區 laminae 有 Fos 標記的神經細胞分佈。在暗視野下，我們進一步將脊髓背角分為三個區域：1. 表淺層 Superficial laminae (laminae I/II)；2. 中間層 Nucleus proprius (laminae III/IV)；3. 深層 Deep laminae (laminae V)。我們計算各分層內顏色較深之 Fos 標記的神經細胞數量。每個數據至少計算十片切片，取其中前三最高值作為平均。

(二) 不同強度電針對福馬林測試誘發之 c-fos 表現以及疼痛行為反應

實驗共分五組，動物依隨機方式在福馬林測試前 30 分鐘 1. 經細管給予 0.9% 生理食鹽水 20 μ l (n=6)。2. 十倍強度電針刺激於左側足三里 20 分鐘。3. 十倍強度電針刺激於右側足三里 20 分鐘。4. 二十倍強度電針刺激於左側足三里 20 分鐘。5. 二十倍強度電針刺激於右側足三里 20 分鐘。其餘福馬林疼痛測試與 Fos 蛋白的計算方法同 (一)。

(三) 不同強度電針刺激與 L-NAME 結合的鎮痛研究

實驗共分五組，動物依隨機方式在福馬林測試前 30 分鐘經細管給予 1. 0.9% 生理食鹽水 10 μ l (n=6)。2. 1000 nM L-NAME /0.9% 生理食鹽水 10 μ l 加十倍強度電針刺激於左側足三里 20 分鐘 (n=6)。3. 300 nM L-NAME/0.9% 生理食鹽水 10 μ l 加十倍強度電針刺激於左側足三里 20 分鐘 (n=6)。4. 1000 nM L-NAME/ 0.9% 生理食鹽水 10 μ l 加二十倍強度電針刺激於左側足三里 20 分鐘 (n=6)。5. 300 nM L-NAME/0.9% 生理食鹽水 10 μ l 加二十倍強度電針刺激於左側足三里 20 分鐘。其餘步驟同 (一)。

(四) 10 L 電針與 L-NAME 結合的鎮痛研究

將生理食鹽水對照組、十倍強度電針刺激於左側足三里組、300 nM L-NAME 加十倍電針組、1000 nM L-NAME 加十倍電針組等四組一起比較福馬林疼痛測試與 Fos 蛋白的表現。

(五) 20 L 電針與 L-NAME 結合的鎮痛研究

將生理食鹽水對照組、二十倍強度電針刺激於左側足三里組、300 nM L-NAME 加二十倍電針組、1000 nM L-NAME 加二十倍電針組等四組一起比較福馬林疼痛測試與 Fos 蛋白的表現。

(六) 不同劑量的 L-NAME 及不同強度電針對福馬林測試誘發之 c-fos 表現以及疼痛行為反應

即比較生理食鹽水對照組、十倍與二十倍強度電針刺激於左側足三里組、十倍與二十倍強度電針刺激於右側足三里組、300 nM L-NAME、1000 nM L-NAME、3000 nM L-NAME 等八組福馬林疼痛測試與 Fos 蛋白的表現。

十、統計分析

所有數據均以平均值土標準差 (mean \pm standard deviation) 表

示，對於 Fos 標記的神經細胞數量比較我們採用單因子變異數分析 (one-way ANOVA)來統計，事後比較(post-hoc test)則使用 Scheffe's Test。所有的疼痛行為分數都轉化為曲線下區域 area under curve (AUC)。疼痛行為亦以單因子變異數分析 (one-way ANOVA)來統計，事後比較(post-hoc test)則使用 Duncan's Multiple Range Test。p 值小於 0.05 視為有統計意義之差異。

第四章 結 果

一、生理食鹽水對照組在第一至第五腰椎左、右兩側背角的 Fos 神經細胞數

本研究福馬林疼痛刺激前共經過以下各種不同的處置過程：(一)生理食鹽水對照組，(二)30Q、100Q、3000 nM L-NAME 實驗組 (300、1000、3000)，(三)十倍、二十倍左右兩側電針組 (10L、10R、20L、20R)，(四)十倍、二十倍左側電針加 30Q、1000 nM L-NAME 結合治療組(10L30Q、10L100Q、20L30Q、20L100Q) 等十二種不同之處置過程，各種參數變化甚大，為確定本研究之正確性，我們先觀察生理食鹽水對照組之脊髓各層 (L1~L5) 左右兩側 c-fos 量之變化情形，結果顯示：生理食鹽水對照組左側 (福馬林施打於左腳掌) 表淺層 (S) L4 及 L5 之 c-fos 量明顯高於 L1、L2 及 L3 各組，而且 L4 亦高於 L5，中間層 (NP) L4 及 L5 之 c-fos 量亦明顯高於 L1、L2 及 L3 各組，深層 (D) L4 之 c-fos 量明顯高於 L1、L2 及 L5 各組，而 L3 高於 L1 及 L2，L5 高於 L1；總量部分可見 L4 之 c-fos 量明顯高於 L1、L2、L3 及 L5 各組，而 L3 及 L5 又高於 L1 及 L2。(如表十及圖七) 而右側部分無論是表淺層、中間層、深層或是總量 L1~L5 之間 c-fos 量皆無明顯差別，可見本實驗在各項操作手續上皆符合標準。(如表十一及圖八)

二、不同劑量的一氧化氮合成酵素抑制劑 (L-NAME) 對福馬林測試誘發之 c-fos 表現以及疼痛行為反應

在生理食鹽水控制組中，在注射福馬林腳同側的第四腰椎脊髓背角可發現許多 Fos 標記的神經細胞(168 ± 37 個 Fos 標記神經細胞/每一片切片)，在對側則很少。Fos 標記神經細胞的層區分布和過去我們的研究差不多^{149、150}，大部分的 Fos 標記神經細胞分布在表淺層

superficial laminae 以及深層 deep laminae (分別佔了全部 Fos 標記神經細胞數量的 30%以及 46%) ,在中間層的分布則較少。L-NAME (300, 1000, 3000 nM) 以劑量依賴的方式降低福馬林刺激後脊髓 Fos 標記神經細胞的總量 (各為生理食鹽水控制組之 74% , 69% , 52%) 。L-NAME 對各層區的 Fos 標記神經細胞抑制也是呈劑量依賴性的, 依 300, 1000, 3000 nM L-NAME 的次序它們在各層區的抑制效果分別是: 表淺層 Superficial laminae 為生理食鹽水控制組的 75% , 67% , 57% , 中間層 Nucleus proprius 為生理食鹽水控制組的 67% , 70% , 50% , 深層 Deep laminae 為生理食鹽水控制組的 77% , 70% , 51% 。L-NAME 對各層區的 c-Fos 標記神經細胞抑制比較之下, 所有劑量的 L-NAME 對表淺層 中間層以及深層 Fos 標記神經細胞的抑制皆呈劑量依賴性之趨勢。(如表十二及圖九)

皮下注射 5% 福馬林產生兩個階段的疼痛行為模式¹¹⁷。第一階段(早期階段)在注射福馬林之後立刻發生, 持續約 3-5 分鐘, 之後約有 10-15 分鐘動物安靜下來, 幾乎沒有表現任何疼痛行為。第二階段(晚期階段)約在注射 15-20 分鐘之後展開, 並持續 20-40 分鐘左右。L-NAME (300, 1000, 3000 nM) 脊髓注射可以降低早期及晚期階段福馬林疼痛反應。(如表十三及圖十、十一、十二)

三、不同強度電針對福馬林測試誘發之 c-fos 表現以及疼痛行為反應

依十倍強度電針刺激左側足三里 (簡稱 10 L) , 十倍強度電針刺激右側足三里 (10 R) , 二十倍強度電針刺激左側足三里 (20 L) , 二十倍強度電針刺激右側足三里 (20R) 的順序亦分別降低了福馬林刺激後第四腰椎脊髓背角 Fos 標記神經細胞的總量(各為生理食鹽水控制組的 76%, 28%, 67%, 45%), 不僅上述的電針刺激均能有效的降低 Fos 的表現 ($p < 0.001$ Scheff's Test 事後檢定) , 且對側電針刺激的抑致效果優於同側電針刺激 ($10 L > 10 R$, $20 R > 10 R$) 而十倍電針強度與二十倍電針強度彼此間無明顯差異, 而對各層區 Fos

標記神經細胞的抑制依 10L, 10R, 20L, 20R 的順序分別為：表淺層(S)為生理食鹽水控制組的 58%, 17%, 44%, 25%；中間層(NP)為生理食鹽水控制組的 88%, 43%, 70%, 61%；深層(D)為生理食鹽水控制組的 83%, 26%, 80%, 48%。(如表十四及圖十三)而皮下注射 5% 福馬林的疼痛行為四組的電針刺激中早期階段以 10L 及 20L 較有疼痛的抑制效果 ($p < 0.01$ Duncan's Multiple Range Test)；而晚期階段則以 10L 及 10R 有較佳的疼痛抑制效果($p < 0.05$)。(如表十五及圖十四、十五、十六)

四、不同強度電針刺激與 L-NAME 結合的鎮痛研究

在生理食鹽水控制組中,在注射福馬林腳同側的第四腰椎脊髓背角可發現許多 Fos 標記的神經細胞(168 ± 37 個 Fos 標記神經細胞/每一片切片),在對側則很少。大部分的 Fos 標記神經細胞分布在表淺層 superficial laminae 以及深層 deep laminae (分別佔了全部 c-Fos, 標記神經細胞數量的 30% 以及 46%),在中間層的分布則較少。實驗組能有效的降低 Fos 的表現 ($p < 0.001$ Scheff's Test 事後檢定),依 1000 nM L-NAME /0.9% 生理食鹽水 10 μ l 加十倍強度電針刺激於左側足三里 (10L1000)、300 nM L-NAME/0.9% 生理食鹽水 10 μ l 加十倍強度電針刺激於左側足三里(10L300)、1000 nM L-NAME/0.9% 生理食鹽水 10 μ l 加二十倍強度電針刺激於左側足三里(20L1000)、300 nM L-NAME/0.9% 生理食鹽水 10 μ l 加二十倍強度電針刺激於左側足三里(20L300), (10L1000、10L300、20L1000、20L300) 的順序分別降低福馬林刺激後第四腰椎脊髓背角 Fos 標記神經細胞的總量 (各為生理食鹽水控制組之 36%、70%、28%、49%)。對各層區的 Fos 標記神經細胞抑制也大致符合此規律,依 10L1000、10L300、20L1000、20L300 的次序它們在各層區的抑制效果分別是：表淺層(S)為生理食鹽水控制組的 32%、46%、16%、33%，中間層(NP)為生理食鹽水控制組的 46%、88%、43%、61%，

深層 (D) 為生理食鹽水控制組的 34%、75%、28%、52%。對各層區的 Fos 標記神經細胞抑制比較之下,所有劑量的 L-NAME 及電針刺激對表淺層、中間層以及深層 Fos 標記神經細胞的抑制皆呈劑量依賴性之趨勢。(如表十六及圖十七)。

L-NAME (300、1000 nM) 脊髓注射加同側電針刺激足三里穴 (10L、20L) 可以降低早期及晚期階段福馬林疼痛反應 ($p < 0.01$ Duncan's Multipal Range Test) (如表十七及圖十八、十九、二十)。

五、10L 電針刺激與 L-NAME 結合的鎮痛研究

在生理食鹽水控制組中,在注射福馬林腳同側的第四腰椎脊髓背角可發現許多 Fos 標記的神經細胞(168 ± 37 個 Fos 標記神經細胞/每一片切片),在對側則很少。大部分的 Fos 標記神經細胞分布在表淺層 superficial laminae 以及深層 deep laminae (分別佔了全部 Fos 標記神經細胞數量的 30% 以及 46%),在中間層的分布則較少。實驗組能有效的降低 Fos 的表現 ($p < 0.001$ Scheff's Test 事後檢定),依十倍強度電針刺激於左側足三里 (10L)、300 nM L-NAME/0.9% 生理食鹽水 10 μ l 加十倍強度電針刺激於左側足三里(10L300)、1000 nM L-NAME/0.9% 生理食鹽水 10 μ l 加十倍強度電針刺激於左側足三里(10L1000),(10L、10L300、10L1000) 的順序分別降低福馬林刺激後脊髓 Fos 標記神經細胞的總量 (各為生理食鹽水控制組之 76%、70%、36%)。對各層區的 Fos 標記神經細胞抑制也大致符合此規律,依 10L、10L300、10L1000 的次序它們在各層區的抑制效果分別是:表淺層(S) 為生理食鹽水控制組的 58%、46%、32%,中間層(NP) 為生理食鹽水控制組的 88%、88%、46%,深層(D) 為生理食鹽水控制組的 83%、75%、34%。對各層區的 Fos 標記神經細胞抑制比較之下,所有劑量的 L-NAME 及電針刺激對表淺層、中間層以及深層 Fos 標記神經細胞的抑制皆呈劑量依賴性之趨勢。(如表十八及圖二十一)。

10L、10L300、10L1000 三組均可以降低早期及晚期階段福馬林疼痛反應($p < 0.01$ Duncan's Multipal Range Test), 由於顫動、舔腳與加權計分顯示之結果均頗一致, 而加權計分為所有大鼠疼痛反應之總合, 更能全面代表大鼠之疼痛反應, 故從本部分開始僅呈現加權計分之結果 (如表十九及圖二十二)。

六、20L 電針刺激與 L-NAME 結合的鎮痛研究

在生理食鹽水控制組中, 在注射福馬林腳同側的第四腰椎脊髓背角可發現許多 Fos 標記的神經細胞(168 \pm 37 個 Fos 標記神經細胞/每一片切片), 在對側則很少。大部分的 Fos 標記神經細胞分布在表淺層 superficial laminae 以及深層 deep laminae (分別佔了全部 Fos 標記神經細胞數量的 30% 以及 46%), 在中間層的分布則較少。實驗組能有效的降低 Fos 的表現 ($p < 0.001$ Scheff's Test 事後檢定), 依二十倍強度電針刺激於左側足三里 (20L) 300 nM L-NAME/0.9% 生理食鹽水 10 μ l 加二十倍強度電針刺激於左側足三里(20L300)、1000 nM L-NAME/0.9% 生理食鹽水 10 μ l 加二十倍強度電針刺激於左側足三里(20L1000), (20L、20L300、20L1000) 的順序分別降低福馬林刺激後脊髓 Fos 標記神經細胞的總量 (各為生理食鹽水控制組之 67%、49%、28%)。對各層區的 Fos 標記神經細胞抑制也大致符合此規律, 依 20L、20L300、20L1000 的次序它們在各層區的抑制效果分別是: 表淺層 (S) 為生理食鹽水控制組的 44%、33%、16%, 中間層 (NP) 為生理食鹽水控制組的 70%、61%、43%, 深層 (D) 為生理食鹽水控制組的 80%、52%、28%。對各層區的 Fos 標記神經細胞抑制比較之下, 所有劑量的 L-NAME 及電針刺激對表淺層、中間層以及深層 Fos 標記神經細胞的抑制皆呈劑量依賴性之趨勢。(如表二十及圖二十三)。

20L、20L300、20L1000 三組均可以降低早期及晚期階段福馬林疼痛反應($p < 0.01$ Duncan's Multipal Range Test)(如表二十一及圖二十

四)。

七、不同劑量的 L-NAME 及不同強度電針對福馬林測試誘發之 c-fos 表現以及疼痛行為反應

比較生理食鹽水對照組 十倍與二十倍強度電針刺激於左側足三里組、十倍與二十倍強度電針刺激於右側足三里組、300 nM L-NAME、1000 nM L-NAME、3000 nM L-NAME 等八組福馬林疼痛測試與 Fos 蛋白的表現。實驗組能有效的降低 Fos 的表現 ($p < 0.001$ Scheff's Test 事後檢定)，依 10L、10R、20L、20R、300 nM、1000 nM、3000 nM 的順序分別降低福馬林刺激後第四腰椎脊髓背角 Fos 標記神經細胞的總量 (各為生理食鹽水控制組之 76%、28%、67%、45%、74%、69%、52%)。其中 10R 和 20R 的 Fos 表現更明顯低於 10L、300 nM 和 1000 nM 組；而 10R 組的 Fos 表現亦低於 20L 和 3000 nM 組。對各層區的 Fos 標記神經細胞抑制也大致符合此規律，依 10L、10R、20L、20R、300 nM、1000 nM、3000 nM 的次序它們在各層區的抑制效果分別是：表淺層 (S) 為生理食鹽水控制組的 58%、17%、44%、25%、75%、67%、56%，中間層 (NP) 為生理食鹽水控制組的 88%、43%、70%、61%、67%、70%、50%，深層 (D) 為生理食鹽水控制組的 83%、26%、80%、48%、77%、70%、50%。(如表二十二及圖二十五)。

10L、20L、300 nM、1000 nM、3000 nM 等五組可以降低早期階段福馬林疼痛反應 ($p < 0.01$ Duncan's Multipal Range Test)；10L、10R、300 nM、1000 nM、3000 nM 等五組可以降低晚期階段福馬林疼痛反應 ($p < 0.01$ Duncan's Multipal Range Test) (如表二十三及圖二十六)。

八、比較左側十倍、二十倍電針組在第一至第五腰椎左側背角的 Fos 神經細胞數

左側十倍電針組在第一至第五腰椎左側背角的 Fos 神經細胞數

顯示：表淺層 (S) L4 之 c-fos 量明顯高於 L1、L2、L3 及 L5 各組，而 L5 亦高於 L1；中間層 (NP) L4 之 c-fos 量亦明顯高於 L1、L2、L3 及 L5 各組，而 L5 亦高於 L1 及 L2；深層 (D) L3 及 L4 之 c-fos 量明顯高於 L1、L2 及 L5 各組；總量部分可見 L4 之 c-fos 量明顯高於 L1、L2、L3 及 L5 各組，而 L3 又高於 L1 及 L2，L5 也高於 L1。
(如表二十四及圖二十七)

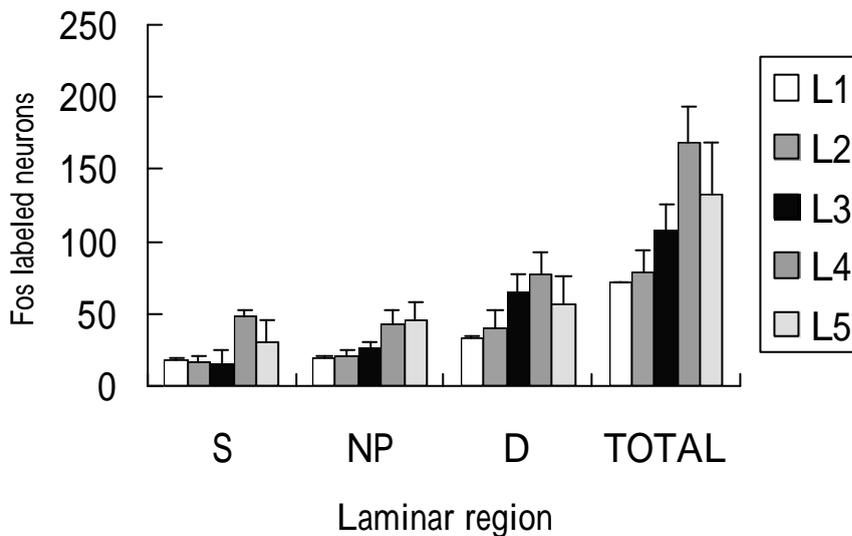
左側二十倍電針組在第一至第五腰椎左側背角的 Fos 神經細胞數顯示：表淺層 (S) L4 之 c-fos 量明顯高於 L1、L2、L3 及 L5 各組；中間層 (NP) L4 之 c-fos 量亦明顯高於 L1 及 L2，而 L3 亦高於 L1；深層 (D) L4 之 c-fos 量明顯高於 L1、L2、L3 及 L5 各組，而 L2 及 L3 亦高於 L1 及 L5；總量部分可見 L4 之 c-fos 量明顯高於 L1、L2、L3 及 L5 各組，而 L2 及 L3 又高於 L1。(如表二十五及圖二十八)

表十：生理食鹽水對照組在 L1-L5 左側背角發現的 Fos 神經細胞數比較

| 組別 \ 區域 | L1 | L2 | L3 | L4 | L5 | F Value | Multiple |
|---------|-------------|-------------|--------------|--------------|--------------|----------|----------------------|
| | Mean±SD | Mean±SD | Mean±SD | Mean±SD | Mean±SD | | Comparison# |
| S | 18.64±3.45 | 17.28±9.12 | 15.97±3.98 | 48.41±14.82 | 30.44±9.88 | 9.67*** | 4>1,2,3,5; 5>1,2,3 |
| NP | 19.49±5.03 | 20.67±4.54 | 26.64±8.54 | 43.51±12.64 | 45.18±19.80 | 10.56*** | 4,5>1,2,3 |
| D | 33.21±11.82 | 40.95±12.46 | 64.74±15.77 | 76.92±19.24 | 56.46±18.32 | 8.13*** | 4>1,2,5; 3>1,2; 5>1 |
| TOTAL | 71.33±14.89 | 78.90±18.84 | 107.36±24.58 | 168.85±37.13 | 132.08±41.56 | 14.94*** | 4>1,2,3,5 3,5>1,2 |

***P<0.001

#Scheffe's Test 事後檢定

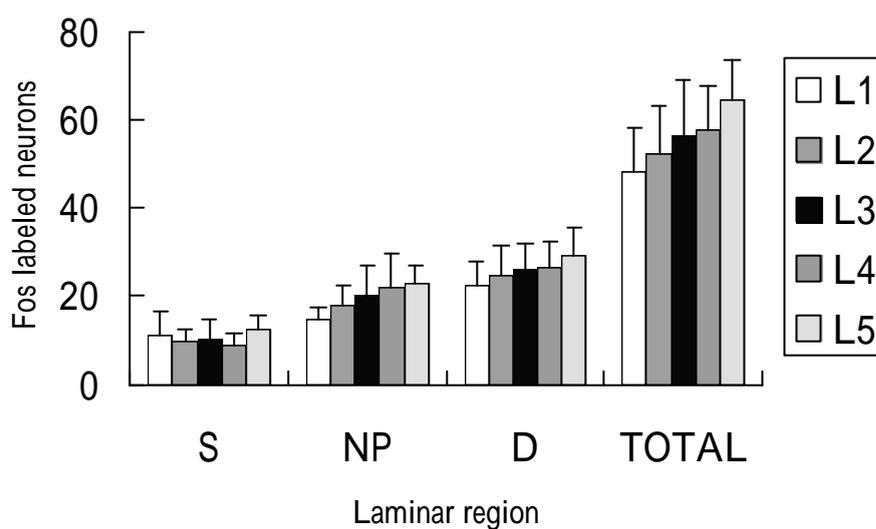


圖七：生理食鹽水對照組在第一至第五腰椎左側背角發現的 Fos 神經細胞數比較。S：表淺層，NP：中間層，D：深層，TOTAL：左側背角之總量。

表十一：生理食鹽水對照組在 L1-L5 右側背角發現的 Fos 神經細胞數比較

| 組別 | L1 | L2 | L3 | L4 | L5 | F Value | Multiple |
|-------|------------|-------------|-------------|------------|------------|---------|-------------|
| 區域 | Mean ± SD | Mean ± SD | Mean ± SD | Mean ± SD | Mean ± SD | | Comparison# |
| S | 11.15±5.29 | 9.69±2.89 | 10.10±4.52 | 9.10±2.65 | 12.46±3.27 | 1.77 | |
| NP | 14.72±2.89 | 17.77±4.55 | 20.36±6.76 | 22.15±7.40 | 22.82±4.25 | 3.33 | |
| D | 22.49±5.33 | 24.67±6.83 | 25.95±6.05 | 26.56±5.64 | 29.39±6.11 | 1.97 | |
| TOTAL | 48.36±9.68 | 52.13±11.18 | 56.41±12.52 | 57.82±9.94 | 64.67±8.85 | 3.11 | |

#Scheffe's Test 事後檢定



圖八：生理食鹽水對照組在第一至第五腰椎右側背角發現的 Fos 神經細胞數比較。S：表淺層，NP：中間層，D：深層，TOTAL：右側背角之總量。

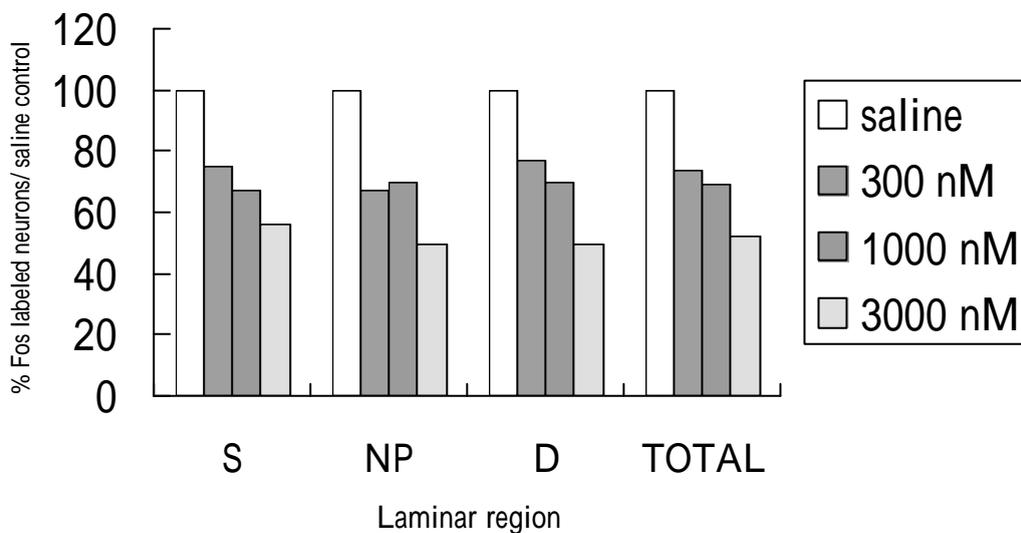
表十二：對照組及 L-NAME 各組在第四腰椎左側背角發現的 Fos 神經細胞數比較

| 組別 | Saline (1) | 300 nM (2) | 1000 nM (3) | 3000 nM (4) | F Value | Multiple |
|-------|------------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|----------|--------------|
| 區域 | Mean±SD | Mean±SD | Mean±SD | Mean±SD | | Comparison# |
| LL4S | 48.41±14.82 (100%) | 36.42±9.48 (75%) | 32.4±10.24 (67%) | 27.63±10.63 (57%) | 6.32** | 1>3,4 |
| LL4NP | 43.51±12.64 (100%) | 29.08±3.72 (67%) | 30±7.74 (70%) | 21.81±5.82 (50%) | 11.73*** | 1>2,3,4 |
| LL4D | 76.92±19.24 (100%) | 59.13±10.65 (77%) | 53.93±11.83 (70%) | 38.93±8.63 (51%) | 13.64*** | 1>3,4; 2>4 |
| TOTAL | 168.85±37.13 (100%) | 124.63±14.92 (74%) | 116.33±17.89 (69%) | 88.37±16.56 (52%) | 19.29*** | 1>2,3,4; 2>4 |

Mean±SD 下面括弧內為相較於生理食鹽水對照組之百分比

P<0.01 *P<0.001

#Scheffe's Test 事後檢定



圖九：對照組及 L-NAME 各組相對於生理食鹽水對照組在第四腰椎左側背角各區 Fos 神經細胞數百分比。S：表淺層，NP：中間層，D：深層，TOTAL：第四腰椎左側背角之總量。

表十三、對照組及 L-NAME 各組福馬林注射後疼痛加權計分比較

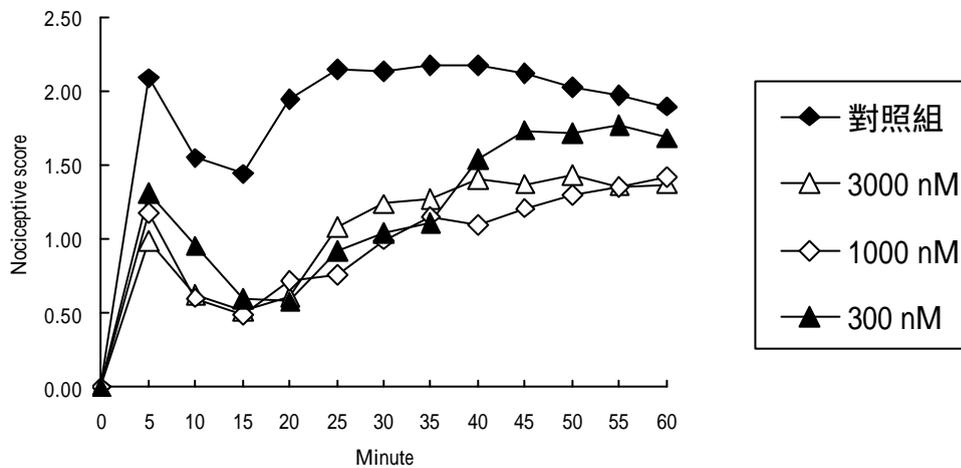
| 組別 | Saline (1) | 300 nM (2) | 1000 nM (3) | 3000 nM (4) | F Value | Multiple Comparison [#] |
|----------|------------|------------|-------------|-------------|----------|----------------------------------|
| 時段 | Mean±SD | Mean±SD | Mean±SD | Mean±SD | | |
| Phase I | 2.09±0.37 | 1.31±0.72 | 1.17±0.72 | 0.99±0.74 | 6.77*** | 1>2,3,4, |
| Phase II | 21.58±2.59 | 13.64±3.12 | 11.11±5.30 | 12.28±7.18 | 11.67*** | 1>2,3,4, |

***P<0.001

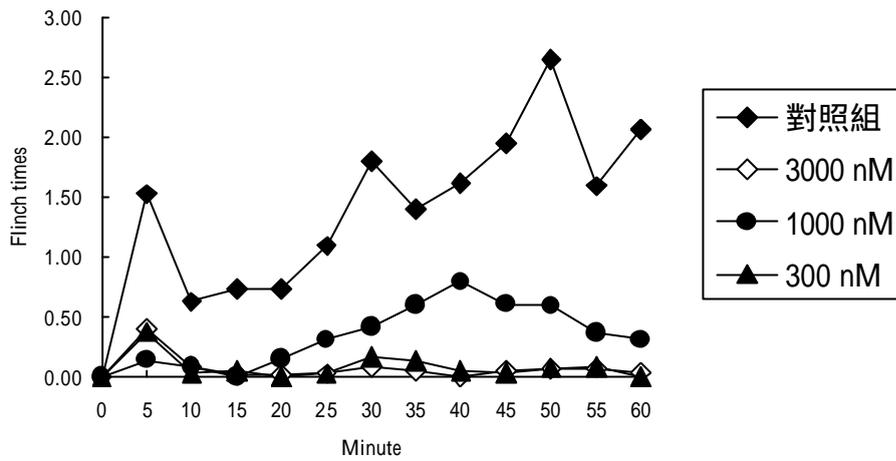
#Duncan's Multiple Range Test

Phase I: 為 0~5 分鐘

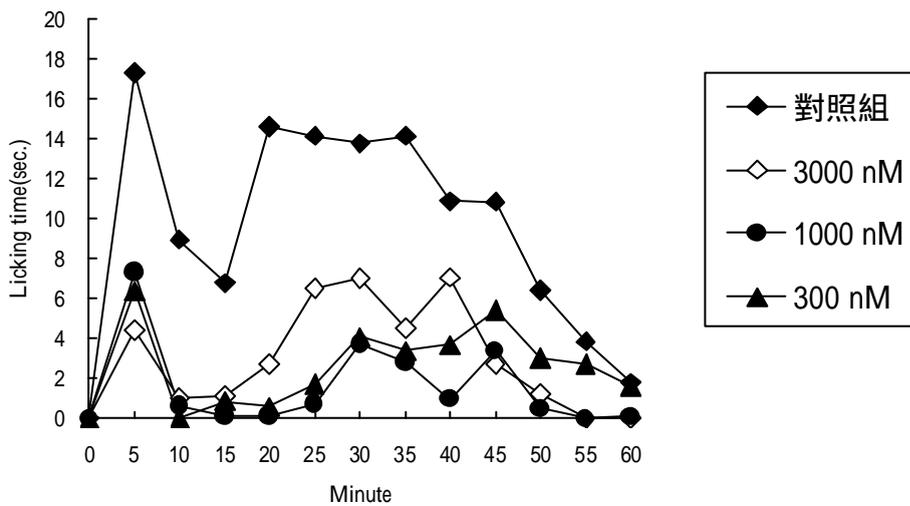
Phase II: 為 5~60 分鐘



圖十：對照組及 L-NAME 各組福馬林注射後之疼痛加權分數，橫軸為時間（分），縱軸為每 5 分鐘之疼痛加權計分。



圖十一：對照組及 L-NAME 各組福馬林注射後之注射腳顫動次數，橫軸為時間（分），縱軸為每 5 分鐘之顫動次數。



圖十二：對照組及 L-NAME 各組福馬林注射後大鼠之舔腳時間數，橫軸為時間（分），縱軸為每 5 分鐘之舔腳秒數。

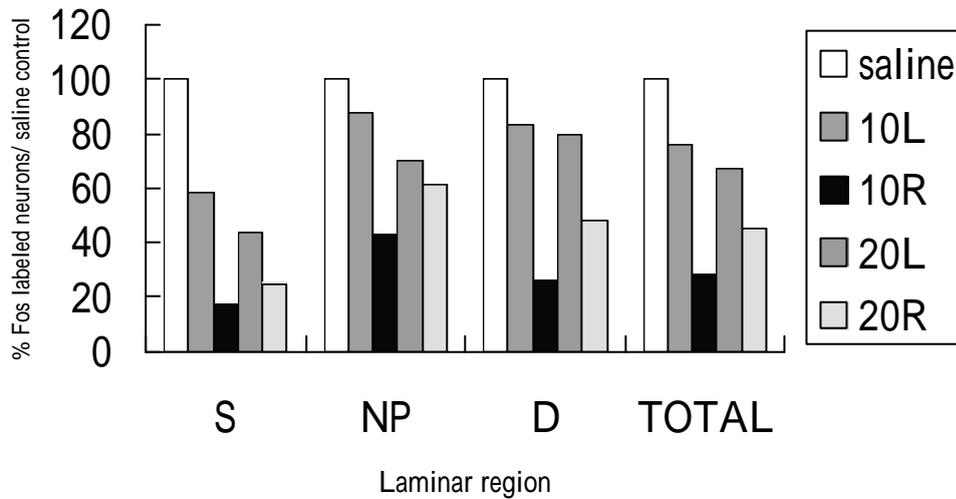
表十四：對照組及電針各組在第四腰椎左側背角發現的 Fos 神經細胞數比較

| 組別 | Saline (1) | 10 L (2) | 10 R (3) | 20 L (4) | 20 R (5) | F Value | Multiple |
|-------|------------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|----------|-------------------------|
| 區域 | Mean±SD | Mean±SD | Mean±SD | Mean±SD | Mean±SD | | Comparison# |
| LL4S | 48.41±14.82 (100%) | 27.54±6.51 (58%) | 8.08±1.62 (17%) | 20.92±3.54 (44%) | 11.54±4.12 (25%) | 34.81*** | 1>2,3,4,5; 2>3,5 |
| LL4NP | 43.51±12.64 (100%) | 38.17±8.99 (88%) | 19.04±4.98 (43%) | 31.04±9.10 (70%) | 26.71±6.89 (61%) | 9.97*** | 1>3,5; 2>3 |
| LL4D | 76.92±19.24 (100%) | 63.75±12.50 (83%) | 19.63±5.54 (26%) | 61.38±9.10 (80%) | 37.29±4.80 (48%) | 30.35*** | 1,2,4>3,5 |
| TOTAL | 168.85±37.13 (100%) | 129.46±22.21 (76%) | 46.75±10.45 (28%) | 113.33±17.39 (67%) | 75.54±13.06 (45%) | 36.99*** | 1>2,3,4,5 2>3,5; 4>3 |

Mean±SD 下面括弧內為相較於生理食鹽水對照組之百分比

***P<0.001

#Scheffe's Test 事後檢定



圖十三：電針各組相對於生理食鹽水對照組在第四腰椎左側背角各區 Fos 神經細胞數百分比。S：表淺層，NP：中間層，D：深層，TOTAL：第四腰椎左側背角之總量。

表十五：對照組及電針各組福馬林注射後疼痛加權計分比較

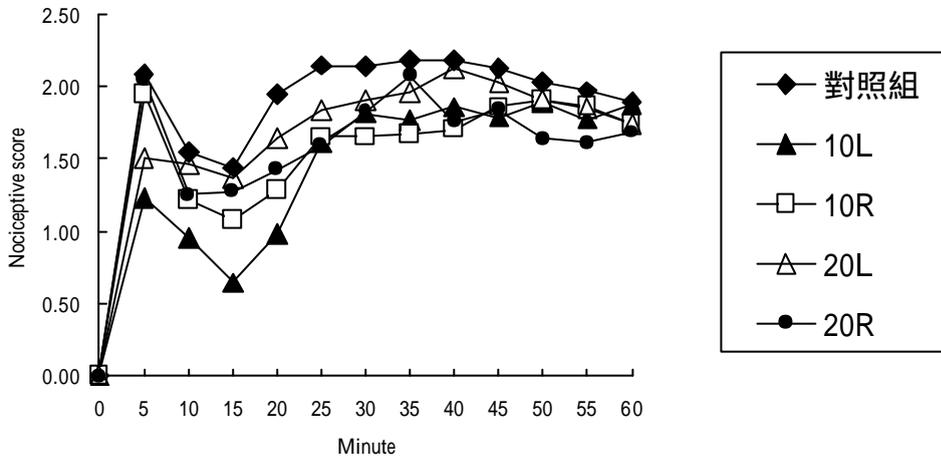
| 組別 | Saline (1) | 10 L (2) | 10 R (3) | 20 L (4) | 20 R (5) | F Value | Multiple Comparison [#] |
|----------|------------|------------|------------|------------|------------|---------|----------------------------------|
| 時段 | Mean±SD | Mean±SD | Mean±SD | Mean±SD | Mean±SD | | |
| Phase I | 2.09±0.37 | 1.23±0.66 | 1.95±0.26 | 1.50±0.68 | 2.05±0.44 | 5.18** | 1,5>2,4; 3>2 |
| Phase II | 21.58±2.59 | 16.96±3.68 | 17.60±4.70 | 19.81±3.34 | 17.96±4.14 | 2.83* | 1>2,3 |

*P<0.05 **P<0.01

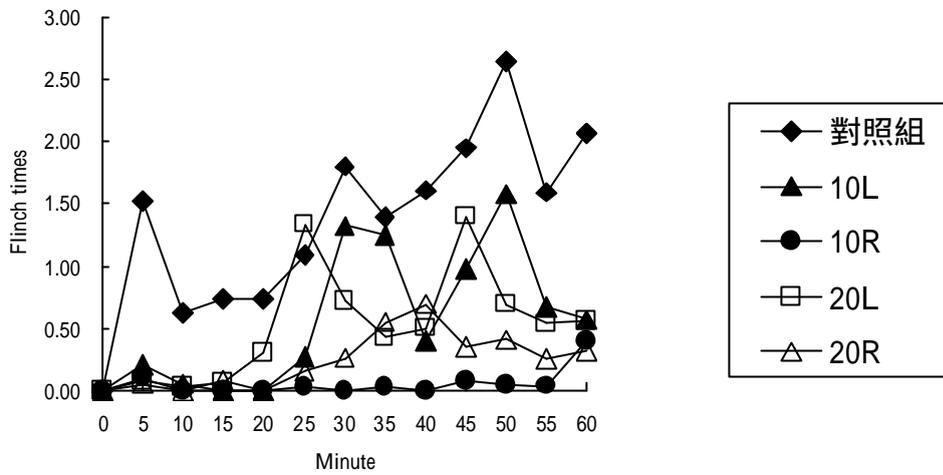
#Duncan's Multiple Range Test

Phase I: 為 0~5 分鐘

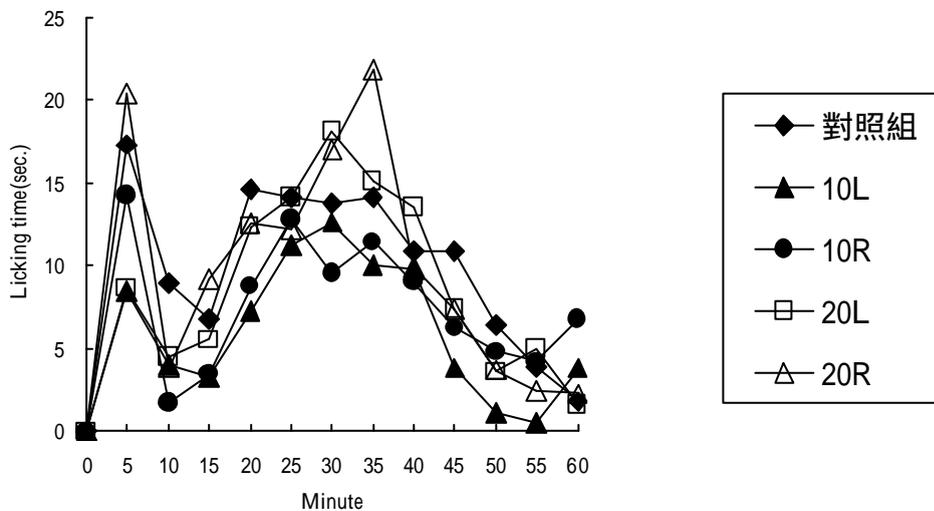
Phase II: 為 5~60 分鐘



圖十四：對照組及電針各組福馬林注射後之疼痛加權分數，橫軸為時間（分），縱軸為每 5 分鐘之疼痛加權計分。



圖十五：對照組及電針各組福馬林注射後之注射腳顫動次數，橫軸為時間(分)，縱軸為每 5 分鐘之顫動次數。



圖十六：對照組及電針各組福馬林注射後大鼠之舔腳時間數，橫軸為時間(分)，縱軸為每 5 分鐘之舔腳秒數。

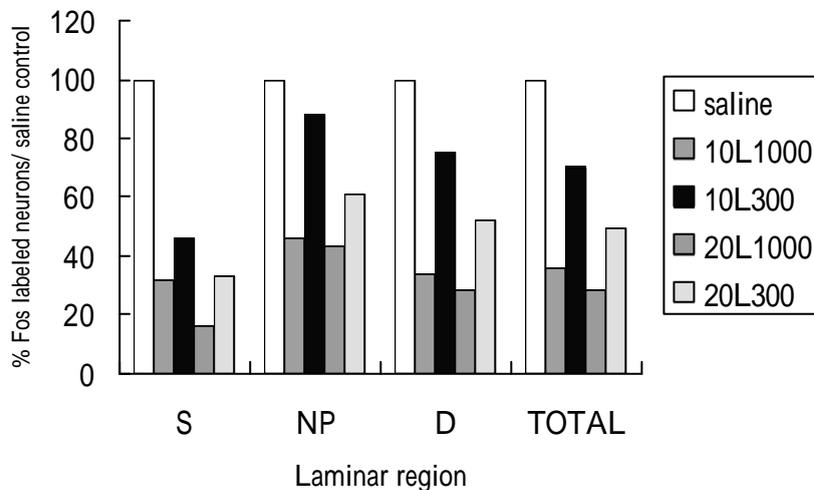
表十六：對照組及電針與 L-NAME 結合各組在第四腰椎左側背角發現的 Fos 神經細胞數比較

| 組別 | Saline (1) | 10L1000 (2) | 10L300 (3) | 20L1000 (4) | 20L300 (5) | F Value | Multiple |
|-------|------------------------|---------------------|-----------------------|---------------------|----------------------|----------|------------------|
| 區域 | Mean±SD | Mean±SD | Mean±SD | Mean±SD | Mean±SD | | Comparison# |
| LL4S | 48.41±14.82 (100%) | 15.63±3.58 (32%) | 22.29±5.86 (46%) | 7.71±1.78 (16%) | 16.00±7.64 (33%) | 32.15*** | 1>2,3,4,5 |
| LL4NP | 43.51±12.64 (100%) | 20.08±4.31 (46%) | 38.42±6.70 (88%) | 18.79±2.46 (43%) | 26.71±6.29 (61%) | 17.79*** | 1>2,4,5; 3>2,4 |
| LL4D | 76.92±19.24 (100%) | 26.04±5.32 (34%) | 57.88±10.65 (75%) | 21.25±1.43 (28%) | 40.33±17.69 (52%) | 28.41*** | 1>2,4,5; 3>2,4 |
| TOTAL | 168.85±37.13 (100%) | 61.75±7.86 (36%) | 118.58±20.41 (70%) | 47.75±1.69 (28%) | 83.04±28.35 (49%) | 38.95*** | 1>2,3,4,5; 3>2,4 |

Mean±SD 下面括弧內為相較於生理食鹽水對照組之百分比

***P<0.001

#Scheffe's Test 事後檢定



圖十七：電針與 L-NAME 結合各組相對於生理食鹽水對照組在第四腰椎左側背角各區 Fos 神經細胞數百分比。S：表淺層，NP：中間層，D：深層，TOTAL：第四腰椎左側背角之總量。

表十七：對照組及電針與 L-NAME 結合各組福馬林注射後疼痛加權計分比較

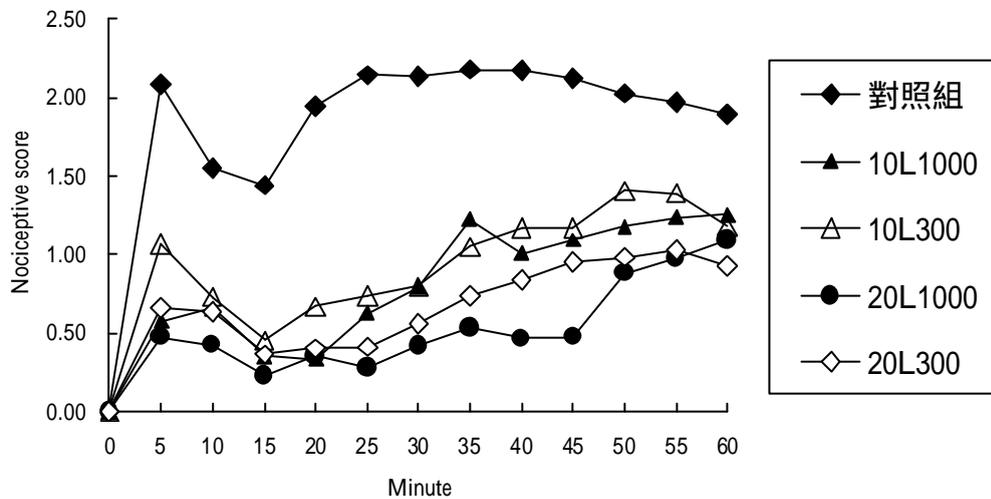
| 組別 | Saline (1) | 10L1000 (2) | 10L300 (3) | 20L1000 (4) | 20L300 (5) | F Value | Multiple Comparison [#] |
|----------|-----------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|----------|----------------------------------|
| Phase I | Mean±SD 2.09±0.37 | Mean±SD 0.58±0.61 | Mean±SD 1.07±0.89 | Mean±SD 0.48±0.51 | Mean±SD 0.66±0.81 | 11.69*** | 1>2,3,4,5 |
| Phase II | Mean±SD 21.58±2.59 | Mean±SD 9.77±5.33 | Mean±SD 10.76±5.22 | Mean±SD 6.15±4.60 | Mean±SD 7.86±5.93 | 18.64*** | 1>2,3,4,5 |

***P<0.001

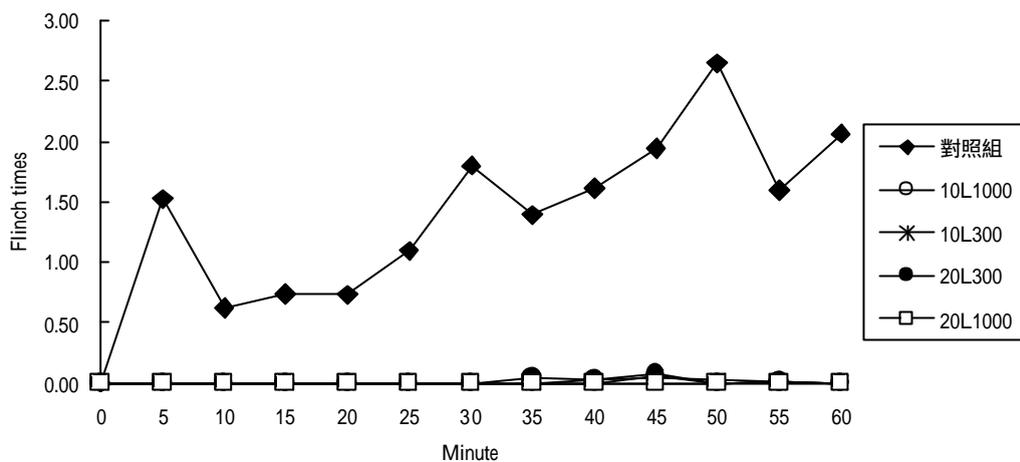
#Duncan's Multiple Range Test

Phase I: 為 0~5 分鐘

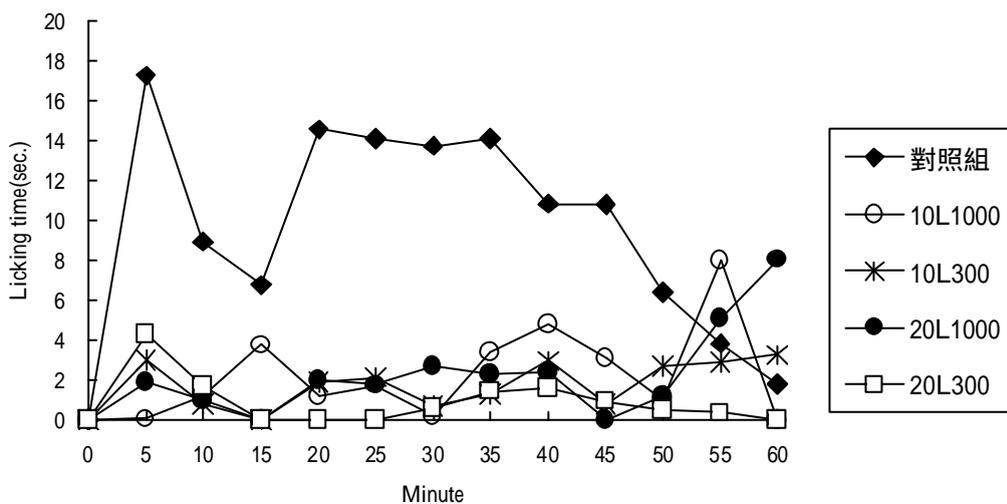
Phase II: 為 5~60 分鐘



圖十八：對照組及電針與 L-NAME 結合各組福馬林注射後之疼痛加權分數，橫軸為時間（分），縱軸為每 5 分鐘之疼痛加權計分。



圖十九：對照組及電針與 L-NAME 結合各組福馬林注射後之注射腳顫動次數，橫軸為時間（分），縱軸為每 5 分鐘之顫動次數。



圖二十：對照組及電針與 L-NAME 結合各組福馬林注射後大鼠之舔腳時間數，橫軸為時間（分），縱軸為每 5 分鐘之舔腳秒數。

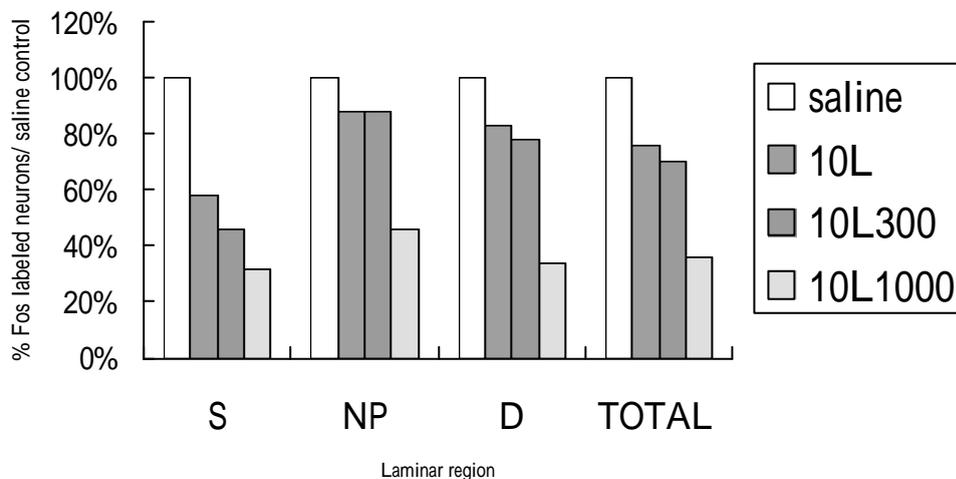
表十八:對照組及 10L 電針與 L-NAME 結合各組在第四腰椎左側背角發現的 Fos 神經細胞數比較

| 組別 | Saline (1) | 10L (2) | 10L300 (3) | 10L1000 (4) | F Value | Multiple |
|-------|------------------------|-----------------------|-----------------------|---------------------|----------|----------------|
| 區域 | Mean±SD | Mean±SD | Mean±SD | Mean±SD | | Comparison# |
| LL4S | 48.41±14.82 (100%) | 27.54±6.51 (58%) | 22.29±5.86 (46%) | 15.63±3.58 (32%) | 16.72** | 1>2,3,4; 2>4 |
| LL4NP | 43.51±12.64 (100%) | 38.17±8.99 (88%) | 38.42±6.70 (88%) | 20.08±4.31 (46%) | 5.74** | 1,2,3>4 |
| LL4D | 76.92±19.24 (100%) | 63.75±12.50 (83%) | 57.88±10.65 (75%) | 26.04±5.32 (34%) | 11.60*** | 1>3,4; 2,3>4 |
| TOTAL | 168.85±37.13 (100%) | 129.46±22.21 (76%) | 118.58±20.41 (70%) | 61.75±7.86 (36%) | 27.06*** | 1>2,3,4; 2,3>4 |

Mean±SD 下面括弧內為相較於生理食鹽水對照組之百分比

P<0.01 *P<0.001

#Scheffe' s Test 事後檢定



圖二十一：10L 電針與 L-NAME 結合各組相對於生理食鹽水對照組在第四腰椎左側背角各區 Fos 神經細胞數百分比。S：表淺層，NP：中間層，D：深層，TOTAL：第四腰椎左側背角之總量。

表十九：對照組及 10L 電針與 L-NAME 結合各組福馬林注射後疼痛加權計分比較

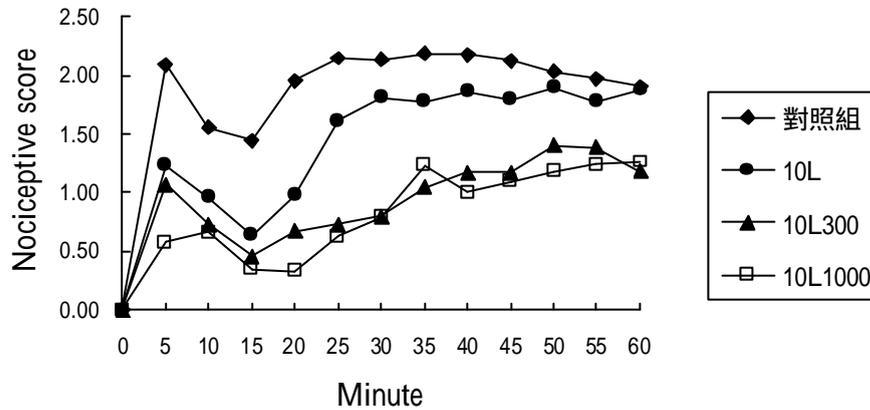
| 組別 | Saline (1) | 10L (2) | 10L300 (3) | 10L1000 (4) | F Value | Multiple Comparison [#] |
|----------|------------|------------|------------|-------------|----------|----------------------------------|
| 時段 | Mean±SD | Mean±SD | Mean±SD | Mean±SD | | |
| Phase I | 2.09±0.37 | 1.23±0.66 | 1.07±0.89 | 0.58±0.61 | 10.37*** | 1>2,3,4, |
| Phase II | 21.58±2.59 | 16.96±3.68 | 10.76±5.22 | 9.77±5.33 | 17.62*** | 1>2,3,4, |

***P<0.001

#Duncan's Multiple Range Test

Phase I: 為 0~5 分鐘

Phase II: 為 5~60 分鐘



圖二十二：對照組及 10L 電針與 L-NAME 結合各組福馬林注射後之疼痛加權分數，橫軸為時間（分），縱軸為每 5 分鐘之疼痛加權計分。

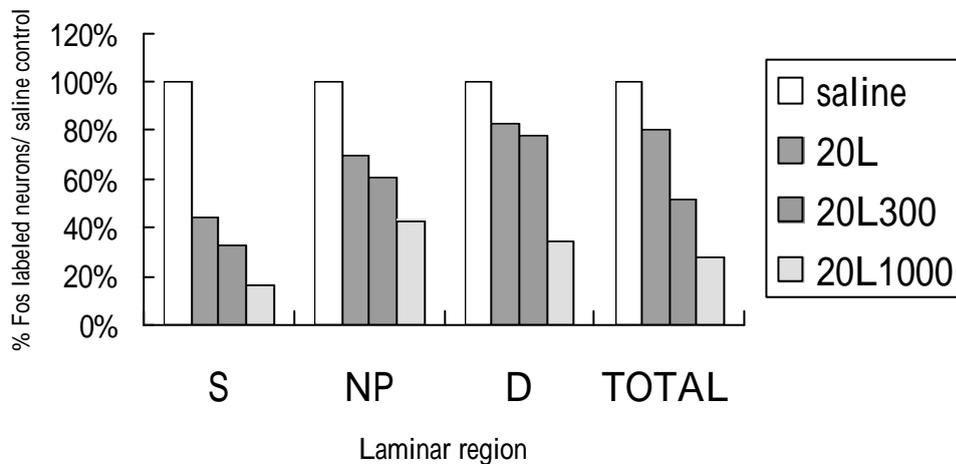
表二十：對照組及 20L 電針與 L-NAME 結合各組在第四腰椎左側背角發現的 Fos 神經細胞數比較

| 組別 | Saline (1) | 20L (2) | 20L300 (3) | 20L1000 (4) | F Value | Multiple |
|-------|------------------------|-----------------------|----------------------|---------------------|----------|-------------------|
| 區域 | Mean±SD | Mean±SD | Mean±SD | Mean±SD | | Comparison# |
| LL4S | 48.41±14.82 (100%) | 20.92±3.54 (44%) | 16.00±7.64 (33%) | 7.71±1.78 (16%) | 33.75*** | 1>2,3,4; 2>4 |
| LL4NP | 43.51±12.64 (100%) | 31.04±9.10 (70%) | 26.71±6.29 (61%) | 18.79±2.46 (43%) | 18.72*** | 1>3,4; 2>4 |
| LL4D | 76.92±19.24 (100%) | 61.38±9.10 (80%) | 40.33±17.69 (52%) | 21.25±1.43 (28%) | 26.53*** | 1>3,4; 2>3,4; 3>4 |
| TOTAL | 168.85±37.13 (100%) | 113.33±17.39 (67%) | 83.04±28.35 (49%) | 47.75±1.69 (28%) | 37.00*** | 1>2,3,4; 2>4 |

Mean±SD 下面括弧內為相較於生理食鹽水對照組之百分比

***P<0.001

#Scheffe' s Test 事後檢定



圖二十三：對照組及 20L 電針與 L-NAME 結合各組相對於生理食鹽水對照組在第四腰椎左側背角各區 Fos 神經細胞數百分比。S：表淺層，NP：中間層，D：深層，TOTAL：第四腰椎左側背角之總量。

表二十一：對照組及 20L 電針與 L-NAME 結合各組福馬林注射後疼痛加權計分比較

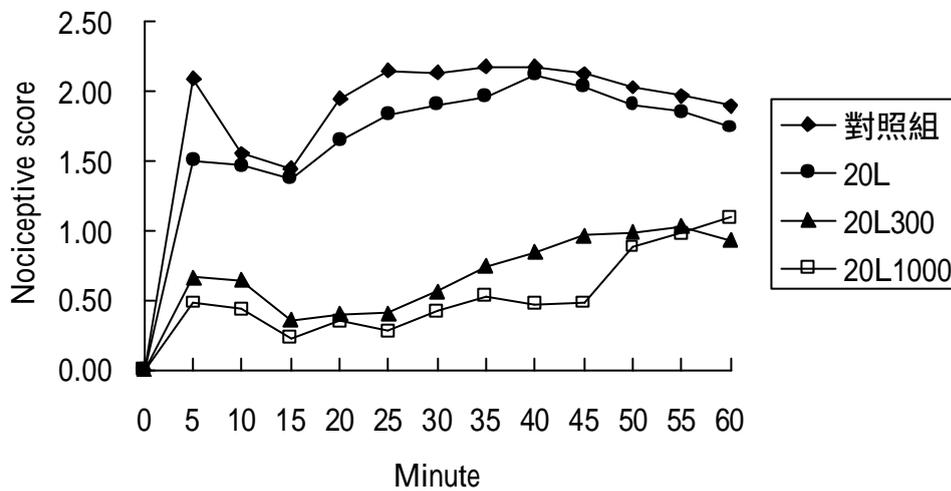
| 組別 | Saline (1) | 20L (2) | 20L300 (3) | 20L1000 (4) | F Value | Multiple Comparison [#] |
|----------|------------|------------|------------|-------------|----------|----------------------------------|
| 時段 | Mean±SD | Mean±SD | Mean±SD | Mean±SD | | |
| Phase I | 2.09±0.37 | 1.50±0.68 | 0.66±0.81 | 0.48±0.51 | 13.35*** | 1>2,3,4, |
| Phase II | 21.58±2.59 | 19.81±3.34 | 7.86±5.93 | 6.15±4.60 | 19.56*** | 1>2,3,4, |

***P<0.001

#Duncan's Multiple Range Test

Phase I: 為 0~5 分鐘

Phase II: 為 5~60 分鐘



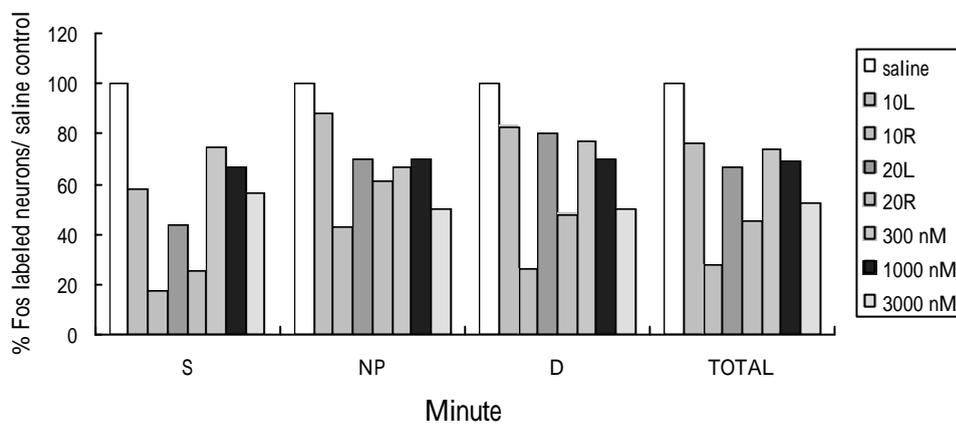
圖二十四：對照組及 20L 電針與 L-NAME 結合各組福馬林注射後之疼痛加權分數，橫軸為時間（分），縱軸為每 5 分鐘之疼痛加權計分。

表二十二：各實驗組 L4 左側背角發現的 Fos 神經細胞數相對於對照組之百分比

| 組別 \ 區域 | Saline (1) | 10L (2) | 10R (3) | 20L (4) | 20R (5) | 300 nM (6) | 1000 nM (7) | 3000 nM (8) |
|---------|------------|---------|---------|---------|---------|------------|-------------|-------------|
| | % | % | % | % | % | % | % | % |
| LL4S | 100% | 58% | 17% | 44% | 25% | 75% | 67% | 56% |
| LL4NP | 100% | 88% | 43% | 70% | 61% | 67% | 70% | 50% |
| LL4D | 100% | 83% | 26% | 80% | 48% | 77% | 70% | 50% |
| TOTAL | 100% | 76% | 28% | 67% | 45% | 74% | 69% | 52% |

TOTAL 部分 F-Value = 28.48*** ; Multiple Comparison# : 1 > 2,3,4,5,6,7,8 ; 2,6,7 > 3,5 ; 4,8 > 3 ; P<0.001

#Scheffe's Test 事後檢定



圖二十五：各實驗組相對於生理食鹽水對照組在第四腰椎左側背角各區 Fos 神經細胞數百分比。S：表淺層，NP：中間層，D：深層，TOTAL：第四腰椎左側背角之總量。

表二十三：實驗各組福馬林注射後疼痛加權計分比較

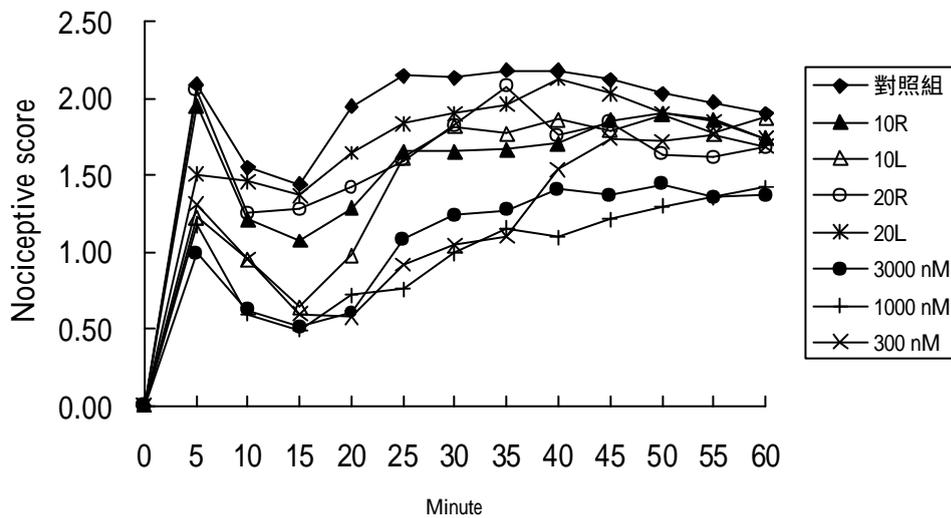
| 組別 | Saline (1) | 10L (2) | 10R (3) | 20L (4) | 20R (5) | 300 nM (6) | 1000 nM (7) | 3000 nM (8) | F | Multiple |
|----------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-------------|-------------|-------|---------------------------------------|
| 時段 | Mean±SD | Mean±SD | Value | Comparison# |
| Phase I | 2.09±0.37 | 1.23±0.66 | 1.95±0.26 | 1.50±0.68 | 2.05±0.44 | 1.31±0.72 | 1.17±0.72 | 0.99±0.74 | 17.69 | 1>2,4,6,7,8;3> *** 2,6,7,8; 5>7,8, |
| Phase II | 21.58±2.59 | 16.96±3.68 | 17.60±4.70 | 19.81±3.34 | 17.96±4.14 | 13.64±3.12 | 11.11±5.30 | 12.28±7.18 | 21.58 | 1>2,3,6,7,8;3 *** ,4,5>6,7,8 |

***P<0.001

#Duncan's Multiple Range Test

Phase I: 為 0~5 分鐘

Phase II: 為 5~60 分鐘



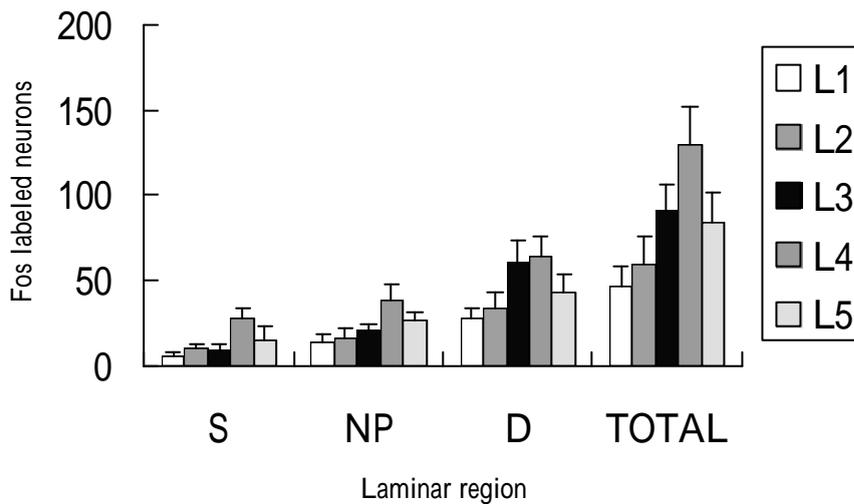
圖二十六：實驗各組福馬林注射後之疼痛加權分數，橫軸為時間（分），縱軸為每 5 分鐘之疼痛加權計分。

表二十四：左側十倍電針組在 L1-L5 左側背角發現的 Fos 神經細胞數比較

| 組別 | L1 | L2 | L3 | L4 | L5 | F Value | Multiple |
|-------|-------------|-------------|-------------|--------------|-------------|----------|-------------------------|
| 區域 | Mean±SD | Mean±SD | Mean±SD | Mean±SD | Mean±SD | | Comparison# |
| S | 5.08±2.78 | 10.00±2.78 | 9.21±3.14 | 27.54±6.51 | 15.33±7.28 | 9.00*** | 4>1,2,3,5; 5>1 |
| NP | 13.58±4.37 | 16.17±5.77 | 21.04±3.50 | 38.17±8.99 | 26.63±3.92 | 8.99*** | 4>1,2,3,5; 5>1,2 |
| D | 27.29±6.16 | 33.50±9.12 | 60.92±11.94 | 63.75±12.50 | 42.46±11.40 | 8.90*** | 3,4>1,2,5 |
| TOTAL | 45.96±11.78 | 59.67±15.82 | 91.17±14.59 | 129.46±22.21 | 84.42±16.56 | 12.86*** | 4>1,2,3,5 3>1,2; 5>1 |

***P<0.001

#Scheffe's Test 事後檢定



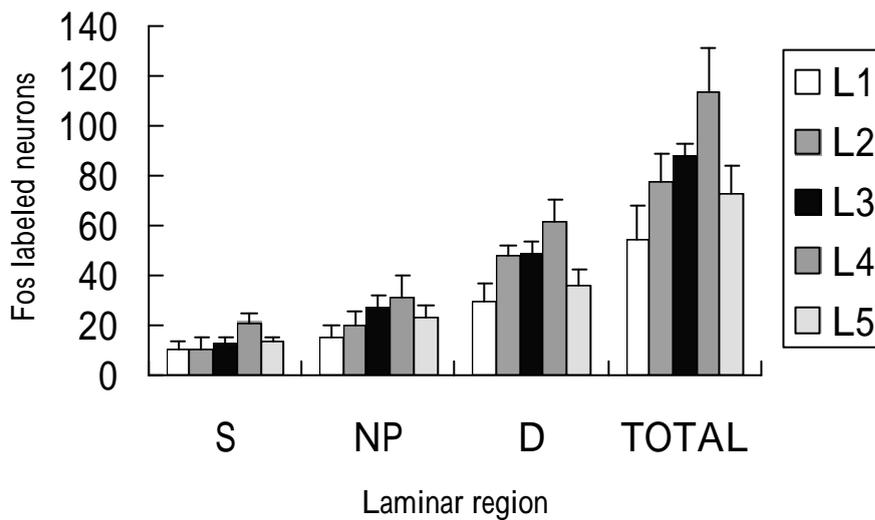
圖二十七：左側十倍電針組在第一至第五腰椎左側背角發現的 Fos 神經細胞數比較。S：表淺層，NP：中間層，D：深層，TOTAL：左側背角之總量。

表二十五：左側二十倍電針組在 L1-L5 左側背角發現的 Fos 神經細胞數比較

| 組別 | L1 | L2 | L3 | L4 | L5 | F Value | Multiple |
|-------|-------------|-------------|------------|--------------|-------------|----------|--------------------|
| 區域 | Mean±SD | Mean±SD | Mean±SD | Mean±SD | Mean±SD | | Comparison# |
| S | 10.0±3.58 | 10.08±4.71 | 12.17±2.59 | 20.92±3.54 | 13.42±1.68 | 5.67*** | 4>1,2,3,5 |
| NP | 15.08±4.45 | 19.71±5.23 | 26.83±4.75 | 31.04±9.10 | 23.33±4.71 | 3.74** | 4>1,2; 3>1 |
| D | 29.42±7.18 | 47.71±4.51 | 48.63±4.40 | 61.38±9.10 | 35.79±6.43 | 13.51*** | 4>1,2,3,5; 2,3>1,5 |
| TOTAL | 54.50±13.51 | 77.50±11.32 | 87.63±4.98 | 113.33±17.39 | 72.54±11.12 | 11.58*** | 4>1,2,3,5; 2,3>1 |

P<0.01 *P<0.001

#Scheffe's Test 事後檢定



圖二十八：左側二十倍電針組在第一至第五腰椎左側背角發現的 Fos 神經細胞數比較。S：表淺層，NP：中間層，D：深層，TOTAL：左側背角之總量。

第五章 討 論

中國傳統醫學中，針灸是最主要也是起源最早的治療疾病方法之一。針刺止痛、內臟功能的調整和免疫功能的調整是針灸的三個主要作用，然而詳細的機轉尚未明瞭。約在七十年代末期，針刺鎮痛甚至針刺麻醉於臨床應用的嚐試與初步成功，在中國大陸和世界其他各角落掀起了一陣針刺的研究熱潮。針刺鎮痛的現象，可用三個假說來解釋。1.經絡學說：認為氣血運行於經絡之間發生阻滯就引起疼痛，所謂「不通則痛」。因此必需行氣血，濡陰陽，使經絡通則不痛。2.神經論：認為體內有致痛神經，也有鎮痛神經，兩者之間的平衡，決定人體對痛的感受。3.體液論：認為針刺可使體內產生鎮痛物質，例如內源性嗎啡等，是傳達止痛作用的重要角色¹⁵¹。

自從 1977 年 Mayer 等人提出針刺鎮痛(acupuncture analgesia)與內源性阿片樣物質之產生有關¹⁵²。隨後近二十年的深入研究，大陸學者韓濟生教授利用電針止痛之模式，發現 2Hz 之刺激頻率可促使白鼠體內 β -內啡呔 (β -endorphin)之產生，在 15 Hz 時，可刺激體內產生腦啡呔(enkephalin)和強啡呔(dynorphin)，另外在 100 Hz 刺激時，可刺激體內產生強啡呔¹⁵³。不同頻率的電刺激可使體內產生不同的阿片樣物質，作用於不同的受體，例如 μ 受體(β -endorphin)，受體(enkephalins)，和 κ 受體(dynorphin)等，達到鎮痛的作用。除了內源性阿片樣物質外，血清素或 5-羥色胺(5-HT)和正腎上腺素(norepinephrin)等，也被認為與針刺鎮痛有關。

另外，1965 年 Melzack 和 Wall 所提出的「閘門控制學說」，對於針刺鎮痛現象，也有其理論基礎¹⁵⁴。根據這個理論，刺激粗的有髓鞘的神經纖維(如壓、觸、麻感等)，可抑制細的無髓鞘神經，如痛神經的傳導。一般而言，高頻(100 Hz- 200 Hz)刺激粗的有髓鞘神經衝動之傳遞，而低頻則刺激細的無髓鞘神經衝動之傳導。

「痛」在包括人類的動物中，是極重要且不可缺少的感覺，英文稱「nociception」。人類與其它動物在痛的表示方面，有極大的差異。人類因為有思想、感覺，所以可以說出在痛刺激後什麼時候有「痛感覺」，什麼時候無法承受這種疼痛，這種由痛刺激開始，到有疼痛感覺稱「痛閾」，到無法承受痛刺激時稱「疼痛耐受閾」。然而動物體因無法說話，只能用身體的反應來表示疼痛的感覺稱「痛反應」，一般可分為體壁反應（如縮腿，甩尾，搖頭等），和內臟反應（如瞳孔之變化，血壓之變化等）。通常動物的「痛閾」是指痛刺激到痛反應所需要的時間稱之，是評估針刺止痛的客觀指標。

對於疼痛或是鎮痛的研究，最困難的就是對痛感的評估。因為「痛」是非常主觀的感覺，有的人對「痛」非常敏感脆弱，有的則視之為正常的感覺。也正因如此，加上針刺的治療隨施針者經驗而有不同的手法，使得針刺鎮痛機轉的研究無法突破。一直到二十幾年前，利用動物體的痛反應當作評估的變項，以固定的針刺頻率，振幅，波寬等當作電針刺激的參數，才使得針刺鎮痛的機制有了科學的根據與實質上的進展。這種以動物實驗為基礎來研究中國古老針灸醫術的研究方法，稱之為「實驗針灸學」。其目的在瞭解過去可以解釋的現象，解釋過去無法解釋的現象，簡化目前已有的穴位，甚至更進一步創造穴位。實驗針灸學的發展，不僅是針灸研究科學化的基石，也是針灸研究國際化的里程碑。

實驗針灸學中利用固定的痛刺激，如福馬林刺激，紅外線熱源刺激，鉀離子滲入法等，來觀察動物的「痛反應」，其可重覆性，精準性與特異性，提供了對疼痛致痛機轉和鎮痛機制探討的科學方法，使得過去僅對痛主觀的描述有了突破性的進展。利用動物的鎮痛模式，最近一、二十年來的研究，除了腦內阿片樣物質以外，五-羥色胺(5-HT)和正腎上腺素(NE)也是體內媒介鎮痛的重要物質。除此之外，腦內中樞神經的某些核團，是參與特殊鎮痛物質釋出的主要地

方，也都被一一定位出來。相反地，體內並非一味地產生鎮痛物質。根據過去研究顯示，在連續電刺激超過一小時以上，動物的鎮痛作用慢慢的變成不明顯，此現象稱為「電針耐受性」¹⁵⁵。最近的針刺研究進展，發現膽囊收縮素(CCK)是腦內產生的一種抗鎮痛物質，也就是說電針久後對痛之耐受性，可能源由腦內 CCK 濃度增高之故。所以痛之感覺高低，與體內致痛物質(substance P, CCK 等)和鎮痛物質(如 endorphin, 5-HT, NE 等)的平衡有絕對之關係，針刺參數之選擇，對於鎮痛之程度和其電針耐受性 佔著一不可忽視的角色。如何選擇針刺之方式與其可能引起之鎮痛機轉和電針耐受性，是臨床醫師不可不知的訊息。

福馬林試驗乃 Dubuisson 和 Dennis 在 1977 年首先提出，觀察動物行為上的變化來評估化學性傷害刺激造成的持續性疼痛¹⁵⁶，近年來愈來愈多學者使用福馬林試驗當作實驗性動物疼痛的模型。在 1989 Shibata 和 Takahashi 等人又對福馬林試驗提出修正，認為在老鼠腳掌注射福馬林溶液後會造成雙相(biphasic)的痛覺反應，即有早期(early phase)和晚期(late phase)兩種疼痛表現的尖峰。早期大多在注射後的 0-5 分鐘，晚期則在注射後 15-20 分鐘內出現¹⁵⁶。早期的神經傳導物質主要為 substance P，而晚期則有 histamin、serotonin、prostaglandin 及 somatostatin 等周邊化學物質的參與^{157、158}。至於早期反應的機轉可能是因直接刺激痛覺接受體經 A 及 C 纖維傳入中樞^{159、160}，屬中樞神經性痛覺反應，而晚期則有許多周邊化學物質的釋出，屬炎症痛覺反應¹⁶¹。

然而，福馬林試驗中大鼠行為改變的評分(weighting score)或統計小鼠舔腳的總秒數(total licking time)都與福馬林溶液的濃度有關，Rosland 等人在 1990 年建議若僅欲探討中樞之反應，可用 0.05-0.2% 的福馬林溶液並儘量減少老鼠受到傷害的刺激，但若希望也觀察到周邊的晚期反應，則須用 1% 或更高的濃度才可誘發出來，當福馬林濃

度達 5%時，則可由組織的鑑定發現有急性炎症反應，甚至顆粒球的腫脹及破壞¹⁶²。至於觀察的時間則和所給予的濃度有正相關，早期 0-5 或 0-10 分鐘，晚期則可統計 10-30、10-40 甚至至一小時皆可，視各實驗室的條件和需求。但必須注意的是環境的控制，嘈雜的環境會影響動物的注意力，造成實驗的誤差；而室溫的控制更加的重要，Rosland 在 1991 年提出環境溫度會影響福馬林試驗的結果，尤其是晚期反應¹⁶³。Hole 和 Tjolsen 在 1993 年又補充說明認為室溫不宜太低，否則晚期的基準線會下降，且實驗所給的藥物若改變動物的皮膚溫度，則會造成晚期反應的改變，形成錯誤的解釋¹⁶⁴。

在針刺鎮痛的研究中，多數學者使用甩尾試驗來評估，但僅能以推論脊髓中之痛覺反射，較無法解釋中樞脊髓上(supraspinal)及周邊炎症(peripheralinflammation)之痛覺傳導。由於針刺作用絕非單獨的脊髓閘門理論所能涵蓋，故本研究用福馬林試驗來評估電針的鎮痛作用，並在每天固定的時間內完成實驗(AM.9:00-12:00，PM.2:00-6:00)來減少晝夜節律(circadian)造成的影響，並控制實驗室的溫度於 22-25℃，且讓老鼠適應新環境至少 30 分鐘後才進行實驗。另外，在每次的實驗中隨機地將老鼠分成對照組及實驗組(L-NAME、電針、L-NAME 加電針)以減少系統性誤差，達到更嚴謹的實驗室品質控制。

Pomeranz 在 1976 年就已提出不同頻率電針鎮痛作用的機轉並不相同⁴⁷，當時認為低頻率 (4 Hz)電針鎮痛是經由 endorphin 的作用，而高頻率(200 Hz)則可能與 serotonin 有關。在本研究中，為使電針足三里穴所產生的鎮痛作用在福馬林試驗的早期及晚期皆有明顯的鎮痛作用。因此我們選擇了可以有較長時間鎮痛作用的 4Hz 為電針模式。

本實驗証實了脊髓腔注射 L-NAME (300，1000，3000 nM)可以降低早期及晚期階段福馬林疼痛反應，而且所有劑量的 L-NAME 對表淺層、中間層以及深層 c-Fos 標記神經細胞的抑制皆呈劑量依賴

性之趨勢。這與早先本實驗室所作脊髓腔注射低或中劑量 L-NAME (100, 370, 1000 nM) 能以劑量依賴方式降低福馬林誘發之晚期階段疼痛反應，並抑制了主要位於脊髓中間層與深層之 Fos 蛋白質表現。而注射高劑量 L-NAME (3000 nM) 則降低了福馬林誘發之早、晚期階段疼痛反應，以及所有脊髓背角層區 Fos 蛋白質之表現稍有不同，但是趨勢相同，這應該是本實驗室技術更加成熟之故。Chapman 等人於 1995 提出選擇性的神經 NOS 抑制劑 7-nitro-indazole 能夠主要抑制在位於脊髓深層，而非淺層之 Fos 蛋白質表現。而全身性給予 L-NAME 注射可以同時降低 carrageenin 所誘發在脊髓背角包括表淺層以及深層之 Fos 蛋白質表現¹⁶⁵。由於 L-NAME 同時具備了周邊的消炎作用以及抑制中樞神經內的訊息傳遞功能¹⁶⁶⁻¹⁶⁸。因此必須從脊髓腔給予藥物才能排除 NOS 抑制劑的周邊消炎作用，並進一步了解周邊刺激之後，脊髓內的被活化的 NO 對於神經活動以及相關的疼痛行為的影響。

NOS 在腰椎脊髓背角主要分布在淺層⁸³，然而，我們的結果卻顯示，Fos 表現的抑制發生在脊髓背角三層都有。因此，在這些較深層區的 Fos 表現的抑制應該來自一些連結周邊傳入訊息到脊髓背角更深的層區的聯絡網路 interneuronal circuitry。很可能這些座落在脊髓背角淺層的聯絡神經 interneuron 本身就含有 NOS，它能經由伸入較深層區的纖維釋放 NO，調節了脊髓背角深層的神經活動。支持這個推論的證據包括了 Herdegen 等人的觀察，他們發現在周邊刺激之後，脊髓內含 NOS 的神經纖維在脊髓背角深層平均接觸 15 個早發性迅速基因標記 IEG-labeled 的神經細胞。而在實驗室內也發現，NO 能夠直接在 striatal 神經細胞中誘發出 c-fos 以及 zif/268 基因的表現¹⁶⁹。這些證據顯示，NO 很可能直接由神經細胞延伸入較深層區的纖維中釋放出來，參與了脊髓背角較深層 deeper laminae 早發性迅速基因的誘發。當然，我們無法排除另一種可能性，這些聯絡神經 interneuron 本身不含 NOS，但受到表淺層鄰近含 NOS 神經釋放

NO 的影響，經過伸入較深層區的纖維進而調節脊髓背角深層的神經活動。

曾經有報告顯示，全身性或者經由腦室給與嗎啡可以對周邊傷害達到完全止痛效果，但卻無法完全抑制脊髓背角表淺層的 Fos 表現^{101、170}。或許可以推論，脊髓背角表淺層有一群聯絡神經受到傳入的訊息刺激後誘發出 Fos 的表現，但這些聯絡神經可能另有別的功能，其 Fos 表現與隨後發生的疼痛過敏行為並不相干。或是由於 NO 能夠擴散出細胞外並回溯到主要傳入神經細胞，使得興奮性胺基酸 excitatory amino acid 再釋放，更促進突觸後神經的興奮。

綜言之，藉由本實驗我們認為受到周邊刺激之後，脊髓 NOS 活化產生 NO，這些 NO 能夠分別以反溯回饋或向前傳導等不同的機制調整疼痛訊息的傳遞，參與了疼痛過敏行為的發生。

而電針刺激部分，不論十倍強度電針刺激左側足三里，或十倍強度電針刺激右側足三里，或二十倍強度電針刺激左側足三里，或是二十倍強度電針刺激右側足三里均能有效的降低 Fos 總量的表現，且對側電針刺激的抑致效果優於同側電針刺激，而十倍電針強度與二十倍電針強度彼此間無明顯差異，而對各層區 Fos 標記神經細胞的抑制則以表淺層的效果最好，中間層及深層則稍差；由於電針本身對實驗鼠而言亦是一種疼痛刺激，故可能會增加相關脊髓區域之 Fos 量，故本實驗設計了對側與同側的電針刺激比較，果然就 Fos 而言對側電針刺激的抑致效果優於同側電針刺激，然而福馬林的疼痛行為早期階段卻以同側電針刺激的抑制效果較佳，而晚期階段則同側與對側就都有不錯的疼痛抑制效果。

由於 NO 從外周至中樞的多個部位參與了對傷害性刺激的傳遞和調制過程，其作用較複雜，可通過不同的環節參與致痛和鎮痛兩個方面的效應¹⁷¹。如 NO 在炎症局部即參與痛覺的調制，表現為致痛和

鎮痛的雙重功能，如在大鼠局部注射福馬林的同時，又注射低劑量的 L-Arg (0.1~1 μ g)，可延長第二期的痛覺過敏，大劑量 (10 μ g) 可抑制痛覺過敏；若注射 L-NAME 可劑量依賴性的抑制第二期反應^{172、173}。而且 NO 與內源性阿片 μ 亦息息相關，有人認為 NO 或 L-Arg-NOS/ NO-cGMP 系統在傷害性刺激的傳遞中起促進作用，從而拮抗阿片 μ 的鎮痛作用¹⁷⁴。但也有人發現 NO 可產生鎮痛作用，並與阿片 μ 受體有關¹⁷⁵。

而 NO 也參與了外周至中樞的傷害性刺激的傳遞和脊髓水平的痛覺過敏的維持¹⁷⁶，正常大鼠的形態學表明，與傷害性刺激的初級傳入有關的結構，如脊神經節、三叉神經脊束核尾側亞核內神經元呈 NOS 陽性，且均為中、小型細胞。這些中、小型細胞一般被認為發出傳導傷害性刺激的 A 或 C 纖維，脊神經節內 NOS 陽性神經元可和外周傷害性刺激傳遞有關的遞質 CGRP 或 SP 等共存¹⁷⁷。在脊髓背角與傷害性刺激傳遞關係密切的 I II 層內含有致密的 NOS 陽性終末和陽性細胞。這些提示 NO 可能參與了傷害性刺激外周至中樞的傳遞過程。電生理和行為學的研究也表明 NOS 的抑制劑可通過抑制 NO 的合成抑制痛覺過敏從而產生鎮痛作用。這種作用除了有外周機制外，也有中樞的參與，並與劑量有關。鞘內注射低劑量的 NOS 的抑制劑 L-NAME 或氨基胍可顯著抑制福馬林的痛敏反應，而提前注射 L-Arg 可翻轉上述效應，但如果在鞘內注射大劑量的 L-NAME (10~20 μ mol) 或氨基胍可引起大鼠明顯的痛敏，L-NAME 還可引起大鼠截癱，由此可見 NO 可能與脊髓水平痛覺過敏有關，但過度抑制 NO 的產生其結果相反¹⁷⁷。因此本研究後續的實驗即選擇低或中劑量的 L-NAME (300、1000 nM) 與電針結合以避免上述的反效果發生。

由電針和脊髓腔注射 L-NAME 的止痛效果比較，似乎電針刺激有較好的 Fos 抑制效果，然而脊髓腔注射 L-NAME 卻有較佳的抑制疼痛行為表現，因此結合電針和脊髓腔注射 L-NAME 來獲得臨床

上最佳的疼痛控制模式即值得深入研究探討。

由於電針本身對實驗鼠而言亦是一種疼痛刺激，故可能會增加相關脊髓區域之 Fos 量，果然就 Fos 而言對側電針刺激的抑致效果優於同側電針刺激，然而福馬林的疼痛行為早期階段卻以同側電針刺激的抑制效果較佳，因此後續的實驗設計乃採取同側的電針刺激與低劑量的 L-NAME 相結合以 1000 nM L-NAME /0.9% 生理食鹽水 10 μ l 加十倍強度電針刺激於左側足三里 (10L1000)、300 nM L-NAME/0.9% 生理食鹽水 10 μ l 加十倍強度電針刺激於左側足三里(10L300)、1000 nM L-NAME/0.9% 生理食鹽水 10 μ l 加二十倍強度電針刺激於左側足三里(20L1000)、300 nM L-NAME/0.9% 生理食鹽水 10 μ l 加二十倍強度電針刺激於左側足三里(20L300)等四種模式進行研究，發現依 (10L1000、10L300、20L1000、20L300) 的順序可分別降低福馬林刺激後脊髓 Fos 標記神經細胞的總量 (各為生理食鹽水控制組之 36%、70%、28%、49%)，呈劑量依賴性之趨勢；而對各層區的 Fos 標記神經細胞抑制比較之下，所有劑量的 L-NAME 及電針刺激對表淺層、中間層以及深層 Fos 標記神經細胞的抑制亦皆呈劑量依賴性之趨勢。這部分的研究證實同側的電針刺激與低劑量的 L-NAME 相結合取得不錯的止痛與 Fos 抑制效果。L-NAME (300、1000 nM) 脊髓注射加同側電針刺激足三里穴 (10 L、20 L) 均可以降低早期及晚期階段福馬林疼痛反應。此可供醫師作為臨床上對付各種頑固性疼痛的治療參考。

既然同側的電針刺激與低劑量的 L-NAME 相結合取得不錯的止痛與 Fos 抑制效果，我們當然要問(10L、10L300、10L1000)和(20L、20L300、20L1000)兩組的治療模式孰優孰劣呢？

比較 (10L、10L300、10L1000) 和 (20L、20L300、20L1000) 兩部分的研究可知：L-NAME (300、1000 nM) 部分有劑量依賴上之趨勢，而電針部分 (10L、20L) 則無此傾向；而且增加 L-NAME 脊髓

注射的效果優於單純電針。在 Fos 蛋白部分，電針強度增強（10L、20L）並不會增加第四腰椎（L4）的 Fos 量，反而有減少之趨勢，因此若以 Fos 為疼痛之指標，則較強的電針刺激亦能夠較有效的抑制福馬林疼痛刺激所引發的 Fos 量。

早先的研究對於電針和脊髓腔注射 L-NAME 的止痛效果比較，似乎電針刺激有較好的 Fos 抑制效果，然而脊髓腔注射 L-NAME 卻有較佳的抑制疼痛行為表現；而本研究證實了結合電針刺激與脊髓腔注射 NOS 抑制劑對福馬林皮下注射有良好的止痛效果，就分子生物領域 Fos 蛋白質的表現也取得全面的抑制效果；然而（20L、20L300、20L1000）這一部份不論是在疼痛行為反應或是 Fos 蛋白的表現上抑制的趨勢均較（10L、10L300、10L1000）一致，因此在疼痛控制上或許（20L、20L300、20L1000）這樣的模式會是更好的選擇。

我們先前的研究¹⁷⁹顯示，2Hz 或 100Hz 都產生 Fos，且在同側量明顯增加，尤以 100 Hz 電針後表現更為明顯。其中尤以 L3、L4 之表淺層區明顯差異；這結果與 Molander 等人所提出：電刺激坐骨神經方式，在 L4 第 1、2 層(表淺層)Fos 量表現最多，而第 5 層（深層區）表現亦較多^{148、180}，結果有部分相似，亦有不同，這可能是針刺部位不同及刺激方式不同，故有不同的表現。在 2 Hz 及 100 Hz 電針組中，比較刺激側與對側脊髓背角 Fos 量在各椎體間的變化，顯示表淺層以 L3 處最為明顯，深層區以 L3、L4 有較為明顯之差異；而中間層則左右二側各椎體間無明顯差別。若再細分大鼠對電針之高反應與低反應，由於 2Hz 組中，兩側之高低反應組在各層皆無變化，因此本實驗（4 Hz）並不將此列入考量。另外有報導指出電刺激 30 分鐘，脊髓 c-fos 陽性神經元即出現在刺激側背角 III、IV 及 V 層（中間及深層），而福馬林等化學性刺激可誘導大鼠脊髓背角 I、II、V、VI 和 X 層內的 c-fos 和 c-jun 的表達¹⁸¹。而本研究卻顯示十倍電針組

在第一至第五腰椎同側背角的 Fos 神經細胞數：表淺層 (S) L4 之 c-fos 量明顯高於 L1、L2、L3 及 L5 各組，而 L5 亦高於 L1；中間層 (NP) L4 之 c-fos 量亦明顯高於 L1、L2、L3 及 L5 各組，而 L5 亦高於 L1 及 L2；深層 (D) L3 及 L4 之 c-fos 量明顯高於 L1、L2 及 L5 各組；總量部分可見 L4 之 c-fos 量明顯高於 L1、L2、L3 及 L5 各組，而 L3 又高於 L1 及 L2，L5 也高於。二十倍電針組在第一至第五腰椎同側背角的 Fos 神經細胞數顯示：表淺層 (S) L4 之 c-fos 量明顯高於 L1、L2、L3 及 L5 各組；中間層 (NP) L4 之 c-fos 量亦明顯高於 L1 及 L2，而 L3 亦高於 L1；深層 (D) L4 之 c-fos 量明顯高於 L1、L2、L3 及 L5 各組，而 L2 及 L3 亦高於 L1 及 L5；總量部分可見 L4 之 c-fos 量明顯高於 L1、L2、L3 及 L5 各組，而 L2 及 L3 又高於 L1。由於其間牽涉電針劑量與福馬林刺激而使結果呈現多元化，在此一併述明，此有待日後更進一步之研究。

第六章 結 論

經過了針灸安全性^{182、183}、舒適性¹⁸⁴及甩尾鎮痛¹⁷⁹等一系列的研究，我們確定電針在良好的參數控制下是一項安全又可靠的治療工具，頗適合臨床推廣運用，而其療效評估更是能否在鎮痛領域中獨顯風騷的關鍵；現代麻醉技術已經可使病人在手術當中免於疼痛，但在術後疼痛的緩解效果上卻不是很理想。本研究室先前在臨床止痛上以結合目前常用的病人自控式止痛法(PCA)探討電針在下腹部手術術後疼痛的緩解效應¹⁸⁵，證實電針組在恢復室中第一次要求止痛藥的時間間隔較對照組和偽假電針組為長，的確可延長術後疼痛的發生時間；且術後一至二十四小時內 PCA 按鈕總次數和嗎啡總需求量均明顯降低。而在鴉片類相關副作用的研究中，結果顯示電針組噁心、暈眩的發生率亦明顯減少，可知電針組 PCA 嗎啡需求量的減少，而使鴉片類相關副作用發生率降低。再經過本次一系列電針刺激與一氧化氮合成酵素抑制劑 L-NAME 脊髓給藥之鎮痛研究後，我們證實在福馬林刺激所引起這種頑固性疼痛的鎮痛效果上取得了良好的成效，不僅可以抑制第二階段的週邊發炎性疼痛反應，對第一階段的中樞反射性疼痛亦可以輕鬆達到鎮痛的效果，這與早先其他的研究認為第一階段的中樞反射性疼痛不容易抑制，或須高劑量的藥物如（L-NAME 3000nM）才有可能達到抑制效果是一項重大的突破，如前所述降低藥物劑量即所以降低副作用，本研究證實可以結合電針治療的方式降低 L-NAME 所需的劑量，輕鬆達到完美的止痛效果，將可作為臨床使用之參考，並驗證了傳統針灸治療的偉大。爾後我們將繼續精研電針配穴及電針頻率與強度的最佳動物與臨床鎮痛模式，達到針灸劑量化(acupuncture dosage)的科研目標。作為臨床止痛的指引。

傷害性刺激誘導的中樞內 c-fos 基因的蛋白表達可被一些鎮痛物質如嗎啡、內源性阿片 μ 、5-HT、生長抑素、NMDA 受體的拮抗劑及電針等所抑制，提示 c-fos 不僅是一個"標誌物"，而且也參與了疼

痛的調制¹⁸¹。電針刺激可透過神經傳導直接在脊髓背角產生抑制作用，或通過局部迴路抑制性調制間接作用於傷害性感受神經元，更或是激活下行抑制系統而抑制脊髓背角傷害性感受神經元的傳遞等機轉達到鎮痛作用，並配合 L-NAME 對 NO 的抑制阻斷疼痛訊息的傳遞與擴大等機制，阻斷一級、二級與三級等疼痛分子訊息的傳遞，庶免造成疼痛過敏、觸物感痛以及疼痛時間延長等慢性疼痛的主要症狀，而臨床上包括手術後疼痛(post operative pain)及幻肢痛(phantom pain)等頑固疼痛，也可以藉由本研究為其臨床止痛開啟一道曙光。

參考文獻

1. 韓濟生主編：神經科學綱要，昭人出版社，台中 1996；535.
2. 韓濟生主編：神經科學綱要，昭人出版社，台中 1996；539.
3. Melzack R, Wall PD: Pain mechanism. A new theory. *Science* 1965; 150: 971-979.
4. Lee JH, Beitz AJ: The distribution of brain-stem and spinal cord nuclei associated with different frequencies of electroacupuncture analgesia. *Pain* 1993; 52: 11-28.
5. Takeshige C, Sato T, Mera T, Hisamitsu T, Fang J: Descending pain inhibitory system involved in acupuncture analgesia. *Brain Res. Bull* 1992; 29: 617-634.
6. Han JS: Acupuncture analgesia: its neuronal pathways and relevant neurotransmitters. *Sheng Li Ko Hsueh Chin Chan* 1984; 15 (4): 294-300.
7. Yu XM, Yin QZ: Changes in unit discharge of hypothalamic arcuate nucleus area during noxious stimulation or acupuncture in rats. *Acta Physiol. Sin.* 1984; 36 (1): 33-41.
8. Tsai HY, Chen YF, Lin JG: Effect of electroacupuncture on the serotonergic neurons in rat central nervous system. *Chin. Pharm. J.* 1988; 41 (2): 123-126.
9. Tsai HY, Lin JG, Inoki R: Further evidence for possible analgesic mechanism of electroacupuncture: Effects on neuropeptides and serotonergic neurons in rat spinal cord. *Jpn. J. Pharmacol.* 1989; 49: 181-185.
10. Ying CB, Ping PX: Correlation of pain threshold and level of β -endorphin-like immunoreactive substance in human CSF during electroacupuncture analgesia. *Acta Physiol. Sin.* 1984; 36 (2): 183-187.
11. Zhu JM, He XP, Cao XD: Changes of releases of β -endorphin-like immunoreactive substances and noradrenaline in rabbit's preoptic area during acupuncture analgesia. *Acta Physiol. Sin.* 1990; 42 (2): 188-193.
12. Yuan H, Han JS: Electroacupuncture accelerates the biogenesis of central enkephalins in the rat. *Acta Physiol. Sin.* 1985; 37 (3): 265-273.
13. Han JS, Fei H, Zhou ZF: Met-Enkephalin-Arg-Phe-like immunoreactive substances mediate electroacupuncture analgesia in the periaqueductal gray of the rabbit. *Brain Res.* 1984; 322: 289-296.
14. Jin WQ, Zhou ZF, Han JS: Inhibition of enkephalins degradation in nucleus accumbens leads to potentiation of acupuncture and morphine analgesia. *Acta Physiol. Sin.* 1985; 37 (4): 377-382.
15. Xuan YT, Shi YS, Zhou ZF, Han JS: Studies on the mesolimbic loop of antinociception-II. A serotonin-enkephalin interaction in the nucleus accumbens. *Neuroscience* 1985; 19(2): 403.

16. Xie CW, Zhang WG, Hong XJ, Han JS: Relation between the content of central met-enkephalin and the analgesic effect of electroacupuncture in rats. *Acta Physiol. Sin.* 1984; 36 (2): 192-197.
17. Xu SF, Zhou GZ, Lu WX, Jiang YF, Dong WQ: Changes in noradrenaline, serotonin and enkephalin contents in certain brain structures of rabbit related to descending inhibition during acupuncture analgesia. *Acta Physiol. Sin.* 1984; 36 (3): 220-229.
18. Han JS, Xie GX: Dynorphin: Important mediator for electroacupuncture analgesia in the spinal cord of the rabbit. *Pain* 1984; 18: 367-376.
19. Cheng RSS, Pomeranz B: Electroacupuncture analgesia could be mediated by at least two pain-relieving mechanisms; endorphin and non-endorphin system. *Life Sci.* 1979; 25: 1957-1962.
20. Bing Z, Villanueva, Bars DL: Acupuncture and diffuse noxious inhibitory controls : Naloxone-reversible depression of activities of trigeminal convergent neurons. *Neuroscience* 1990; 37: 809-818.
21. He L, Dong WQ, Wang M: Effects of iontophoretic etorphine and naloxone, and electroacupuncture on nociceptive responses from thalamic neurones in rabbits. *Pain* 1991; 44:89-95.
22. Chen XH, Han JS: Analgesia induced by electroacupuncture of different frequencies is mediated by different types of opioid receptors: Another cross-tolerance study. *Behav. Brain Res.* 1992; 47: 143-149.
23. Sun SL, Han JS: High and low frequency electroacupuncture analgesia are mediated by different types of opioid receptors at spinal level: A cross tolerance study. *Acta Physiol. Sin.* 1989; 41 (4): 416-420.
24. Chen XH, Han JS: All three types of opioid receptors in the spinal cord are important for 2/15 Hz electroacupuncture analgesia. *Eur. J. Pharmacol.* 1992; 211:203-210.
25. Faris PL, Komisaruk BR, Watkins LR, Mayer DJ: Evidence for the neuropeptide cholecystolonin as an antagonist of opiate analgesia. *Science* 1983; 29: 310-312.
26. Wiertelak EP, Maier SF, Watkins LR: Cholecystokinin antianalgesia: Safety cues abolish morphin analgesia. *Science* 1992; 256: 830-833.
27. Han, JS, Ding XZ, Fan SG: Cholecystokinin octapeptide (CCK-8) antagonism to electroacupuncture analgesia and a possible role in electroacupuncture tolerance. *Pain* 1986; 27: 101-115.
28. Zhou Y, Sun YH, Zhang ZW, Han JS: Increased release of immunoreactive cholecystokinin octapeptide by morphine and potentiation of μ -opioid analgesia by CCK_B receptor antagonist L-365,260 in rat spinal cord. *Eur. J. Pharmacol.* 1993; 234:147-154.

29. Wang XH, Wang XJ, Han JS: Cholecystokinin octapeptide (CCK-8) antagonized analgesia mediated by mu and kappa opioid receptors. *Acta Physiol. Sin.* 1990; 42 (3): 219-225.
30. Wang XJ, Wang XH, Han JS: Cholecystokinin octapeptide antagonized opioid analgesia mediated by μ - and κ - but not δ - receptors in the spinal cord of the rat. *Brain Res.* 1990; 523: 5-10.
31. Watkins LR, Kinscheck IB, Mayer DJ: Potentiation of morphine analgesia by the cholecystokinin antagonist proglumide. *Brain Res.* 1985; 327: 169-180.
32. Watkins LR, Kinscheck IB, Kaufman EFS, Miller J, Frenk H, Mayer DJ: Cholecystokinin antagonists selectively potentiate analgesia induced by endogenous opiates. *Brain Res.* 1985; 327: 181-190.
33. Kellstein DE, Mayer DJ: Chronic administration of cholecystokinin antagonists reverses the enhancement of spinal morphine analgesia induced by acute pretreatment. *Brain Res.* 1990; 516: 263-270.
34. Ding XZ, Fan SG, Zhou JP, Han JS: Reversal of tolerance to morphine but no potentiation of morphine-induced analgesia by antiserum against cholecystokinin octapeptide. *Neuropharmacology* 1986; 25 (10): 1155-1160.
35. Poggioli R, Vergoni AV, Sandrini M, Barbafiera L, Marrama D, Bertolini A: Influence of the selective cholecystokinin antagonist L-364,718 on pain threshold and morphine analgesia. *Pharmacology* 1991; 42: 197-201.
36. Zhou Z, Xuan Y, Wu W, Han JS: Tolerance to electroacupuncture and its cross tolerance to morphine in rabbits. *Acta Physiol. Sin.* 1982, 34 (2): 185-190.
37. Qian ZN, Gu ZL, Pan JX: Effects of acupuncture analgesia on the monoamine transmitters levels in the striata and spinal cord in rats. *Chen Tzu Yen Chiu* 1985; (3): 199-201.
38. Zhu S, Shi F, Liu Z, Jiang J: Autoradiographic visualization on the role of central H-5-hydroxytryptamine in acupuncture analgesia. *Chen Tzu Yen Chiu* 1990; (4): 269-273.
39. Sun F, Xu M, Xu S: Effects of microinjections of naloxone and p-chloroamphetamine into rabbit central grey on acupuncture analgesia. *Acta Physiol. Sin.* 1982; 34 (2): 173-178.
40. Xu DY, Zhou ZF, Han JS: Amygdaloid serotonin and endogenous opioid substances (OLS) are important for mediating electroacupuncture analgesia and morphine analgesia in the rabbit. *Acta Physiol. Sin.* 1985; 37 (2): 162-171.
41. Liu X, Zhang SX, Zhu B, Chen ZR: Effects of noxious stimulation and electroacupuncture on raphe-spinal neurons in nucleus raphe magnus of rats. *Acta Physiol. Sin.* 1984; 36 (4): 349-357.
42. Dong XW, Ye WL, Feng XC, Shen E: Effects on acupuncture analgesia by

- injection of 5,6-DHT into the rat's locus coeruleus. *Acta Physiol. Sin.* 1984; 36 (3): 214-219.
43. Wang Y, Wang S: Effects of intraperitoneal injection of bicuculine or atropine on electroacupuncture analgesic effect and the change of brain noradrenaline content in rats. *Chen Tzu Yen Chiu* 1988, 1: 310-313.
 44. Xie CW, Tang J, Han JS: Central norepinephrine in acupuncture analgesia : differential effects in the rat brain and spinal cord. *Acta Physiol. Sin.* 1983; 35 (2): 186-192.
 45. Su S, Zheng S, Su C: Effects of four adrenergic drugs on electroacupuncture analgesia. *Chen Tzu Yen Chiu* 1992; 17 (3): 175-178.
 46. Yu GD, Cui CD, Zhang HQ, Yin WP, Yin QZ: Effect of locus coeruleus stimulation and electroacupuncture on nociceptive response of spinal dorsal horn neurons in rats. *Acta Physiol. Sin.* 1990; 42 (1): 76-81.
 47. Pomeranz B: Relation of stress-induced analgesia to acupuncture analgesia. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1986; 467: 444-447.
 48. Han JS, Ding XZ, Fan SG: The frequency as the cardinal determinant for electroacupuncture analgesia to be reversed by opioid antagonists. *Acta Physiol. Sin.* 1986, 38 (5): 475-482.
 49. Lee JH, Beitz AJ: Electroacupuncture modifies the expression of c-fos in the spinal cord induced by noxious stimulation. *Brain Res.* 1992; 557: 80-91.
 50. Cao W, Deng Y, Dong X, Wang Y, Lu Z: Effects of electroacupuncture at different frequencies on the nociceptive response and central contents of GABA and glutamic acid in arthritic rats. *Chen Tzu Yen Chiu* 1993; 18 (1): 48-52.
 51. Chen XH, Han JS, Huang LT: CCK receptor antagonist L-365,260 potentiated electroacupuncture analgesia in Wistar rats but not in audiogenic epileptic rats. *Chinese medical Journal-Peking* 1994; 107(2): 113-118.
 52. Pomeranz B, Warma N: Electroacupuncture suppression of a nociceptive reflex is potentiated by two repeated electroacupuncture treatments: The first opioid effect potentiates a second non-opioid effect. *Brain Res.* 1988; 452: 232-236.
 53. Pomeranz B, Bibic L: Electroacupuncture suppresses a nociceptive reflex: naltrexone prevents but does not reverse this effect. *Brain Res.* 1988; 452: 27-231.
 54. Wang Y, Wang S: Analgesic effects of electroacupuncture stimulation at different intensities and frequencies. *Chen Tzu Yen Chiu.* 1993; 18(1): 44-47.
 55. Woolf CJ, Thompson SWN: The induction and maintenance of central sensitization is dependent on N-methyl-D-aspartic acid receptor activation: Implications for the treatment of post-injury pain hypersensitivity states. *Pain* 1991; 44: 293-299.
 56. Dubner R, Ruda MA: Activity-dependent neuronal plasticity following tissue injury and inflammation. *Trends Neurosci.* 1992; 15: 96-101.

57. 孫維仁、侯文詠、謝正勇、劉健強、林瑞明:C-fos 細胞致癌基因在疼痛訊號傳遞過程中所扮演的角色。疼痛醫學雜誌 1994; 4: 75-88.
58. Coderre TJ, Yashpal K: Intracellular messengers contributing to persistent nociception and hyperalgesia induced by L-glutamate and substance P in the rat formalin pain model. *Eur. J. Neurosci.* 1994; 6:1328-1334.
59. Chapman V, Dickenson AH, Tjolsen A: Bidirectional effects of intrathecal NMDA and substance P on rat dorsal horn neuronal responses. *Neurosci. Lett.* 1994; 178: 90-94.
60. Lipton SA, Rosenberg PA: Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *New Eng. J. Med.* 1994; 330: 613-622.
61. Coderre TJ, Vaccarino AL, Melzack R: Central nervous system plasticity in the tonic pain response to subcutaneous formalin injection. *Brain Res* 1990; 535: 155-158.
62. Neugebauer V, Lucke T, Scaible HG: N-methyl-D-aspartate (NMDA) and non-NMDA receptor antagonists block the hyperexcitability of dorsal horn neurons during development of acute arthritis in rat's knee joint. *J. Neurophysiol.* 1993; 70: 1365-1377.
63. Haley JE, Sullivan AF, Dickenson H: Evidence for spinal NMDA receptor involvement in prolonged chemical nociception in the rat. *Brain Res.* 1990; 518: 218-226.
64. Eisenburg E, Strassman AM, Vos BP: The NMDA antagonist Memantine blocks pain behavior in a rat model of formalin induced facial pain. *Pain* 1993; 54: 301-308.
65. Kress HG, Tas PW: Effects of volatile anesthetics on second messenger calcium in neurones and non-muscular cells. *Br. J. Anaesth.* 1993; 71: 47-58.
66. Dougherty PM, Willis WD: Enhancement of spinothalamic neuron responses to chemical and mechanical stimuli following combined microiontophoretic application of N-methyl-D-aspartic acid and substance P. *Pain* 1991; 47: 85-93.
67. Kangrga I, Randic M : Tachykinins and calcitonin gene-related peptide enhance release of endogenous glutamate and aspartate from the rat spinal dorsal horn slice. *J. Neurosci.* 1990; 10: 2026-2038.
68. Skilling SR, Smullin DH, Larson AA: Extracellular amino acid concentration in the dorsal spinal cord of freely moving rats following veratridine and nociceptive stimulation. *J. Neurochem.* 1992; 51: 127-132.
69. DeBiasi S, Rustioni A: Glutamate and substance coexist in primary afferent terminals in the superficial laminae of spinal cord. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1988; 85: 7820-7824.
70. Willcockson WS, Chung JM, Hori Y, Lee KH, Willis WD: Effects of

- iontophoretically released peptides on primate spinothalamic tract cells. *J. Neurosci.* 1984; 4: 732-740.
71. Chen L, Huang LYM: Protein kinase C reduces Mg^{2+} block of NMDA receptor channels as a mechanism of modulation. *Nature* 1992; 356: 521-523.
 72. Raymond LA, Blackstone CD, Huganir RL: Phosphorylation and modulation of recombinant GluR6 glutamate receptors by cAMP-dependent protein kinase. *Nature* 1993; 361: 637-641.
 73. Woolf CJ, Chong MS: Preemptive analgesia-treating postoperative pain by preventing the establishment of central sensitization. *Anesth. Analg.* 1993; 77: 362-379.
 74. Berndge MJ, Galione A : Cytosolic calcium oscillators. *FASEB J.* 1988; 2: 3047-3083.
 75. Nishizuka Y: The family of protein kinase C for signal transduction. *JAMA* 1989; 262: 1826-1833.
 76. Ornote K, Sonoda H, Kawamata M, Iwasaki H, Namiki A: Potentiation of antinociceptive effects of morphine by calcium-channel blockers at the level of the spinal cord. *Anesthesiology* 1993; 79: 746-752.
 77. Palecek J, Palecekova V, Dougherty PM, Willis WD: The effect of phorbol esters on the responses of primate spinothalamic neurons to mechanical and thermal stimuli. *J. Neurophysiol.* 1994; 71: 529-537.
 78. Hayes RL, Mao J, Price DD, Germano A: Pretreatment with ganglionsides reduced abnormal nociceptive responses associated with a rodent mononeuropathy. *Pain* 1992; 48: 391-396.
 79. Wilkinson SE, Hallam TJ: Protein kinase C: is its pivotal role in cellular activation over-stated? *TIPS* 1994; 15: 53-57.
 80. 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.
 81. Li P, Tong C, Eisenach JC, Figueroa JP: NMDA causes release of nitric oxide from rat spinal cord in vitro. *Brain Res.* 1994; 637: 287-291.
 82. Wiertelak EP, Fumess LE, Horan R, Martinez J: Subcutaneous formalin produces centrifugal hyperalgesia at a non-injected site via the NMDA-nitric oxide cascade. *Brain Res.* 1994; 649: 19-26.
 83. Herdegen T, Rudiger S, Mayer B, Bravo R, Zimmermann M: Expression of nitric oxide synthase and colocalization with Jun, Fos and Krox transcription factors in spinal cord neurons following noxious stimulation of the rat hindpaw. *Mol. Brain Res.* 1994; 22: 245-258.
 84. Snyder SH, Brecht DS: Biological roles of nitric oxide. *Sci. Am.* 1992; 5: 68-77.

85. Meller ST: Nitric oxide and pain. IN: Congress Abstract, 7th World Congress on Pain, Paris 1993; 122.
86. Maimberg AB, Yaksh TL: Hyperalgesia mediated by spinal glutamate or substance P receptor blocked by spinal cyclooxygenase inhibition. *Science* 1992; 257: 1276-1279.
87. Snyder SH, Brecht DS: Nitric oxide: a novel neuronal messenger. *Neuron* 1992; 8: 8-11.
88. Malmberg AB, Yaksh TL: Pharmacology of spinal action of ketorolac, morphine, ST-91, U50488H, and L-PIA on the formalin test and an isobolographic analysis of the NSAID interaction. *Anesthesiology* 1993; 79: 270-281.
89. Deng T, Karin M: Jun B differs from c-Jun in its DNA-binding and dimerization domains, and represses c-Jun by formation of inactive heterodimers. *Genes Develop.* 1993; 7: 479-490.
90. Barker PE, Rabin M, Watson M: Human c-fos oncogene mapped within chromosome region 14q21-q31. *PNAS* 1984; 81: 5826-5830.
91. Morgan JI, Curran T: Role of ion flux in the control of c-fos expression. *Nature* 1986; 322: 552-555.
92. Bading H, Ginty DD, Greenberg ME: Regulation of gene expression in hippocampal neurons by distinct calcium signalling pathways. *Science* 1993; 253: 912- 915.
93. De Groot RP, Auwerx J, Bourouis M, Sassone-Corsi P: Negative regulation of Jun/AP-1: conserved function of glycogen synthase kinase3 and the *Drosophila* kinase shaggy. *Oncogene* 1992; 7: 841-847.
94. Chen RH, Abate C, Blenis J: Phosphorylation of the c-fos transrepression domain by mitogen activated protein kinase and 90-kDa ribosomal S6 kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993:10952-10956.
95. Sonnerberg JL, Rauscher III FJ, Morgan JI, Curran T: Regulation of pro-enkephalin by Fos and Jun. *Science* 1989; 246: 1622-1625.
96. Noguchi K, Dubner R, Ruda MA: Preproenkephalin mRNA in spinal dorsal horn neurons is induced by peripheral inflammation and is co-localized with Fos and Fos-related proteins. *Neuroscience* 1992; 46: 561-570.
97. Shuka VK, Lemaire S: Non-opioid effects of dynorphins: possible role of NMDA receptor. *TIPS* 1994; 15: 420-424.
98. Sharp FG, Gonzalez MF, Sharp JW, Sagar SM: C-fos expression and ¹⁴C-2-deoxyglucose uptake in the caudal cerebellum of the rat during motor/sensory cortex stimulation. *J. Comp. Neurol.* 1989; 284: 621-623.
99. Mao J, Price DD, Coghill RC, Mayer DJ: spatial patterns of spinal cord [¹⁴C]-2-deoxyglucose metabolic activity in a rat model of painful peripheral

- mononeuropathy. *Pain* 1992; 50: 89-100.
100. 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.
 101. Gogas KR, Presley RW, Leving JD, Basbaum 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.
 102. Bullitt E: Expression of c-fos-like protein as a marker for neuronal activity following noxious stimulation in the rats. *J. Comp. Neurol.* 1990; 296: 145-152.
 103. Hunt SP, Pini A, Evan G: Induction of c-fos-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation. *Nature* 1987; 328: 632-634.
 104. Abbadie C, Besson JM: C-fos expression in rat lumbar spinal cord during the development of adjuvant-induced arthritis. *Neuroscience* 1992; 48: 985-993.
 105. Menetrey D, Gannon A, Levine JD, Basbaum AI: 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: 177-195.
 106. Williams S, Evan GI, Hunt SP: C-fos induction in the spinal cord after peripheral nerve lesion. *Eur. J. neurosci.* 1991; 3: 887-894.
 107. Traub RJ, Herdegen T, Gebhart GF: Differential expression of c-fos and c-jun in two regions of the rat spinal cord following noxious colorectal distention. *Neurosci. Lett.* 1993; 160: 121-125.
 108. 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.
 109. Karin M, Smeal T: control of transcription factors by signal transduction pathway: the beginning of the end. *TiBS.* 1992; 17: 418-422.
 110. Sheng M, Greenberg: The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron* 1990; 4: 477-485.
 111. Sagar SM, Sharp FR: Light induces a Fos-like nuclear antigen in tectal neurons. *Mol. Brain Res.* 1990; 7: 17-21.
 112. Sato K, Houtani T, Ueyama T, Ikeda M: 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.
 113. 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.
 114. Smeyne RJ, Vendrell M, Hayward M, Baker SJ: Continuous c-fos expression precedes programmed cell death. *Nature* 1993; 363: 166-169.

115. Nestler EJ, Hope BT, Windnell L: Drug addiction : a model for the molecular basis of neural plasticity. *Neuron* 1992; 11: 995-1006.
116. Strsaaman AM, Vos BP, Mineta Y, Naderi S: Fos-like immunoreactivity in the superficial medullary dorsal horn induced by noxious and innocuous thermal stimulation of facial skin in the rat. *J. Neurophysiol.* 1993; 70: 1811-1821.
117. Dubuisson KR, Dennis SG: The formalin test: a quantitative study of the analgesia effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain* 1977; 4: 161-174.
118. Abbott FV, Franklin JB, Ludwick RJ, Malzack R: Apparent lack of tolerance in the formalin test. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1981; 31:637-640.
119. Hunter JC, Woodbum VL, Durieux C, Pettersson EJE, Poat JA, Hughes J: C-fos antisense oligonucleotide increases formalin-induced nociception and regulates preprodynorphin expression. *Neuroscience* 1995; 2: 485-492.
120. Heapy CG, Jamieson A, Russell NJW: Afferent C-fibre and A-delta activity in models of inflammation. *Br. J. Pharmacol.* 1987; 90: 164.
121. Rosland JH, Tjolsen A, Mahle B, Hole K: The formalin test in mice-effect of formalin concentration. *Pain* 1990; 42: 235-242.
122. Shibata M, Ohkubo T, Takahashi H, Inoki R: Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. *Pain* 1989; 38: 347-352.
123. Haley JE, Dickenson AH, Schachter M: Electrophysiological evidence for a role of bradykinin in chemical nociception in the rat. *Neurosci. Lett.* 1989; 97: 437-446.
124. Dickenson AH, Sullivan AR: Peripheral origins and central modulation of subcutaneous formalin-induced activity of rat dorsal horn neurones. *Neurosci. Lett.* 1987; 83: 207-211.
125. Dickenson AH, Sullivan AR: Subcutaneous formalin-induced activity of dorsal horn neurones in the rat: differential response to an intrathecal opiate administered pre or post formalin. *Pain* 1987; 30: 349-360.
126. Wheeler-Aceto H, Porreca F, Cowan A: The rat paw formalin test: comparison of noxious agents. *Pain* 1990; 40: 229-238.
127. Dubner R.: Methods of assessing pain in animals. *Textbook of Pain Vol. I* Second Ed. (Wall PD and Melzack R), Churchill Livingstone, Edinburgh London Melbourne and New York 1989; 247-256.
128. Eide PK, Berge OG, Tjolsen A, Hole K: Apparent hyperalgesia in the mouse tail-flick test due to increased tail skin temperature after lesioning of serotonergic pathways. *Acta Physiol. Scand.* 1988; 134: 413-420.
129. Eide PK, Rosland JH: The role of tail skin temperature in the facilitation of the tail-flick reflex after spinal transection or interference with descending

- serotonergic neurotransmission. *Acta Physiol. Scand.* 1988; 135: 427-433.
130. 王肯堂輯：靈樞卷一，本輸篇第二，醫統正脈全書，新文豐出版公司，台北 1975；1164.
 131. 王肯堂輯：素問卷十四，絨解篇第五十四，醫統正脈全書，新文豐出版公司，台北 1975；545.
 132. 黃維三：針灸科學，正中書局，台北 1985；270.
 133. 鍾傑：針灸十四經腧穴分解，正光書局，台北 1986；221.
 134. 楊甲三：針灸學，知音出版社，台北 1990；303.
 135. 王肯堂輯：靈樞卷四，四時氣篇第十九，醫統正脈全書，新文豐出版公司，台北 1975；1280.
 136. 王肯堂輯：靈樞卷五，五邪篇第二十，醫統正脈全書，新文豐出版公司，台北 1975；1283-1284.
 137. 王肯堂輯：靈樞卷六，五亂篇第三十四，醫統正脈全書，新文豐出版公司，台北 1975；1328.
 138. 明·楊繼洲：針灸大成，志遠書局，台北 1989；276.
 139. 裘沛然 陳漢平：新編中國針灸學，上海科技出版社，上海 1992；200-201.
 140. Cheng R, Pomeranz B: Electroacupuncture analgesia could be mediated by at least two-relieving mechanisms: Endorphin and non-endorphin system. *Life Sci.* 1979; 25: 1957-1962.
 141. Hyiden, Janice LK, Wilcox, George L: Intrathecal morphine in mice: A new technique. *Eur. J. Pharmacol.* 1980; 67: 313-316.
 142. Tsai HY, Maeda S, Inoki R: Effect of somatosatin on labeled 5-hydroxytryptamine release from rat spinal cord and methionine enkephalm antagonism in vivo. *Jpn. J. Pharmacol.* 1983; 33 (4): 900-902.
 143. Yaksh TL, Rudy TA: Chronic catheterization of the spinal subarachnoid space. *Physiol. And Behav.* 1976; 17: 1031-1036.
 144. Martin H, Kocher L, Sylviane CC: Chronic lumbar intrathecal catheterization in the rat with reduced-length spinal compression. *Physiol. Behav.* 1984; 33 (1): 59-161.
 145. Dib B: Intrathecal chronic catheterization in the rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1984; 20(1): 45-48.
 146. Wang BC, Willian, Dean E, Li D, Turndorf H: Lumbar subarachnoid catheterization in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1991; 38 (3): 685-688.
 147. Hsu SM, Raine L, Fanger H: Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J. Histochem. Cytochem.* 1981; 29: 577-580.
 148. Molander C, Hongpaisan J, Grant G: Changing pattern of c-Fos expression in spinal cord neurons after electrical stimulation of the chronically injured sciatic

- nerve in the rat. *Neurosci* 1992; 50(1): 223-36.
149. Sun WZ, Shyu BC, Shieh, JY: Nitrous oxide or halothane , or both, fail to suppress c-fos expression in rat spinal cord dorsal horn neurones after subcutaneous formalin. *Br. J. Anaesth.* 1996; 76: 99-105.
 150. Hou WY, Shyu BC, Chen TM, Lee JW, Shieh JY, Sun WZ: Intrathecally administered c-fos antisense oligodeoxynucleotide decreases formalin-induced nociceptive behavior in adult rats. *J. Eur. Pharmacol.* 1997; 329: 17-26.
 151. 洪傳岳、黃怡超、邱仁輝：中醫藥現代化：研究論文評介，橘井文化公司，台北 1999；66-68.
 152. Mayer DJ, Price DD: Antagonism of acupuncture analgesia in man by the narcotic antagonist naloxone. *Brain Res.* 1977; 121: 368.
 153. Han JS, Zhou ZF, Fei H: Mobilization of specific neuropeptides by peripheral stimulation of identified frequencies. *NIPS* 1992; 7: 176.
 154. Burt AM: *Textbook of Neuroanatomy.* Philadelphia. WB Saunders Company, 1993; 195.
 155. Han JS, Ding XZ, Fan SG: Cholecystinin octapeptide (CCK8) : antagonism to electroacupuncture analgesia and a possible role in electroacupuncture tolerance. *Pain* 1986; 27: 101.
 156. Dubuisson D, Dennis SG: The formalin test: a quantitative study of the analgesia effects of morphine, meperidine and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain* 1977; 4 :161-174.
 157. Shibata M, Ohkubo T, Takahashi H, Inoki R: Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. *Pain* 1989; 38: 347-352.
 158. Ohikubo T, Shibata M, Takahashi H, Inold R: Roles of substance P and somatostatin on transmission of nociceptive information induced by formalin in spinal cord. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1990; 252 (3): 1261-1268.
 159. Tjolsen A, Berge OG, Hunskaar S, Rosland HH, Hole K: The formalin test: An evaluation of the method. *Pain* 1992; 51: 5-17.
 160. Heapy CG, Jamieson A, Russel NJW: Afferent C-fiber and A fiber activity in models of inflammation. *Br. J. Pharmacol.* 1987; 90: 164-170.
 161. Vaccarino AL, Marek P, Liebekind JC: Stress-induced analgesia prevents the development of the tonic, late phase of pain produced by subcutaneous formalin. *Brain Res.* 1992; 572: 250-252.
 162. Rosland JH, Tjolsen A, Maehie B, Hole K: The formalin test in mice: effect of formalin concentration. *Pain* 1990; 42: 235-242.
 163. Rosland JH: The formalin test in mice: the influence of ambient temperature. *Pain* 1991; 45: 211-216.
 164. Hole K, Tjolsen: The tail-flick and formalin tests in rodents: changes in skin

- temperature as a confounding factor. *Pain* 1993; 53: 247-254.
165. Chapman V, Buritova J, Honore P, Besson JM: 7-nitro-indazole, a selective inhibitor of neuronal nitric oxide synthase reduces formalin evoked c-fos expression in dorsal horn neurons of the spinal cord. *Brain Res.* 1995; 258-261.
166. Huges SR, Williams TJ, Brain SD: Evidence that endogenous nitric oxide modulates oedema formation induced by substance P. *Eur. J. Pharmacol.* 1990; 191: 481-484.
167. Malmberg AB, Yaksh TL: Spinal nitric oxide synthesis inhibition blocks NMDA-induced thermal hyperalgesia and produces antinociception in the formalin test in rats. *Pain* 1993; 54: 291-300.
168. Lippe IT, Stabentheiner A, Holzer P. Participation of nitric oxide in the mustard oil-induced neurogenic inflammation of the rat paw skin. *Eur. J. Pharmacol.* 1993; 232: 113-120.
169. Morris BJ: Stimulation of immediate early gene expression in striatal neurons by nitric oxide. *J. Biol. Chem.* 1995; 270: 24740-24744.
170. Presley RW, Menetrey D, Levine JD, Basbaum AI: Systemic morphine suppresses noxious stimulation evoked fos protein like immunoreactivity in the rat spinal cord. *J. Neurosci.* 1990; 10: 323-335.
171. 張吉主編：針灸鎮痛機制與臨床，人民衛生出版社，北京 2002；197-199.
172. Zhand X, Verge: Nitric oxide synthase- like immunoreactivity in lumbar dorsal root ganglia and spinal cord of rat and monkey and effect of peripheral axotomy. *J. Comp. Neurol.* 1993; 335: 563-575.
173. Solodkin, A, Traub RJ, Gebhart GF: Unilateral hindpaw inflammation produces a bi-lateral increase in NADPH - diaphorase histochemical staining in the rat lumbar spinal cord. *Neuroscience* 1992, 51 (3): 495-499.
174. Xu JY, Pieper GM, Tseng LF: Activity of a NO-cyclic GMP system by NO donors potentiates μ -endorphin- induced antinociception in the mouse. *Pain* 1995; 63: 377-383.
175. 陳軍、鄭繼旺：NO 與阿片依賴和耐受。中國藥理學通報，1997; 13 (1)： 6-9.
176. Meller ST, Gebhart GF. Nitric oxide and nociceptive processing in the spinal cord. *Pain* 1993; 52: 127-136.
177. 章為、周雪、鄒曉菊：一氧化氮同功異構酶在大鼠中樞神經系統的分布。神經解剖學雜誌 1999； 15 (2):171-174.
178. 胡文輝、孫秀軍、萬選才：NOS 抑制劑 L-NAME 的鎮痛、致痛和致癱作用。中國藥理學通報 1996； 12 (4):309-313.
179. 李佳霓：針刺鎮痛「有效反應」與「無效反應」之分子生物學機轉 - c-fos 細胞致癌基因在脊髓背角之反應。中國醫藥學院碩士論文 1999; 73-74.
180. Bullitt E, Lee CL, Light AR: The effect of stimulus duration on noxious-stimulus

- induced c-fos expression in the rodent spinal cord. *Brain Res.* 1992; 580(2): 172-179.
181. 張吉主編：針灸鎮痛機制與臨床，人民衛生出版社，北京 2002；201.
 182. 林昭庚、鄭秋霞、張永賢、曹永昌、許朝添、賴義雄：電針及針刺對肌肉組織的影響，*中國中西醫結合雜誌* 1996；16(10):615-616.
 183. 曹永昌、林昭庚、李偉華：以電腦輔助影像測圖比較不同頻率與頻繁度的電針刺激對肌肉組織所造成之病理變化，*中國醫藥學院雜誌* 1999; 8(2): 61-70.
 184. 曹永昌、王清福、陳春發：電針治療不同電流型式之舒適度比較。台北市中醫藥年報 1997; 4(1): 37-59.
 185. Lin JG, Lo MW, Wen YR, Hsieh CL, Tsai SK, Sun WZ: The Effect of High and Low Frequency Electro-acupuncture in Pain After Lower Abdominal Surgery. *Pain* 2002; 99(3): 509-514.

**THE STUDY OF ELECTROACUPUNCTURE AND NOS INHIBITOR
ON ANALGESIA- BY THE MODE OF FORMALIN STIMULATION
AND MEASUREMENT OF FOS PROTEIN IN WISTAR RATS**

Yun-Tson Tsao

Institute of Chinese Medical Science, China Medical College, Taichung, Taiwan

Major Professor : Jaung-Geng Lin

Abstract

Systematically administrated nitric oxide synthase (NOS) inhibitor, L-N nitro-arginine methyl ester (L-NAME), dose-dependently reduced c-fos expression in the rat lumbar spinal cord. The effects of treatment of NOS inhibitors include anti-inflammation in peripheral system and neurogenic in central system. Dosage in the route of spinal cord could exclude the anti-inflammation effect of NOS inhibitors. To investigate the effects of activated NOS in spinal cord on neuronal activities and related behaviors of pain following peripheral stimulation. We examined formalin-induced hyperalgesia and c-fos expression following treatment of NOS inhibitor (L-NAME) by the route of spinal cord combined with electroacupuncture on Zusanli in order to seek the best anti-algesia strategy.

We observed that L-NAME (300, 1000 nM) administrated in the route of spinal cord combined with (10X,20X) intensity of electroacupuncture on Zusanli decreased both primary and late stage of hyperalgesia effects induced by formalin ;And these treatments decreased the amount of c-fos-labeled neurons in all three regions of dorsal horn (the superficial lamina, nucleus proprius and deep lamina) in a likely dose dependent manner. Electroacupuncture combined with

L-NAME treatments maybe the best choice of the analgesia strategy in the clinics.

Key words: electroacupuncture, L-NAME, Fos, analgesia

誌 謝

轉眼之間已過了六個寒暑，回首前塵，真令人驚悚於時光的飛逝，我就這樣兢兢業業地走過了這漫長的中醫研究路程，雖然是入寶山而僅取一瓢飲，那也夠讓人回味無窮，讚詠不已。

六年多前頂著中華民國第一屆中醫高考及格的光環及初生之犢不畏虎的雄心壯志，從小小的和平醫院住院醫師榮調至行政院衛生署中醫藥委員會擔任中醫組技正兼代理中醫組組長一職起，便開啟了這一段充滿歡樂、汗水及酸甜苦辣的旅程。這一切首先得感謝蘇貫中主委的賞識與栽培，在進到中醫藥委員會後沒多久，他就提醒我：「不是有心要繼續深造嗎？」我訝異於他的大方和信任，讓一個初膺如此重要職位的人，連業務都還沒嫻熟就有在職進修的機會，趕在最後一刻辦好了公文並完成報名手續(感謝恩師也是現在的指導教授林昭庚老師推介中醫界的耆老馬光亞教授及黃維三教授寫推薦函，及陽明大學傳醫所同窗好友劉國同贊助研究計畫)，雖然時間緊迫，但所幸考試內容都與臨床有關，也不辜負了我在和平醫院「教學最認真的住院醫師」的美名，僥倖以第一名成績錄取，從此得以在中醫的最高學堂浸淫於學術研究的樂趣；在中醫藥委員會這一年半的時光裡，我認真的學習，並不斷地把學理與實務結合，終日南北奔波，過著也無晨昏也無假期的日子，由於職務的關係這段期間跑遍了台灣各個角落，也到了大陸考察訪問，更去了趟美國，我的中醫世界豁然開朗，更堅定了我把中醫推向世界舞台中心的決心。

研究所裡歡樂學習的日子至今仍令人眷戀，教授們雋智的教誨也常激盪於午夜夢迴時，黃維三老師中醫學養的厚實，林昭庚老師對針灸的博大精深與專注，張恆鴻前所長對中醫研究的矜持，謝慶良前所長的學貫中西，高尚德所長臨床與研究的術德兼備，陳榮洲老師在典籍研究上深厚的功力，李采娟老師在生物統計學上的造詣，彭主榮老

師的儒人風範，還有蔡金川老師、賴東淵老師、陳必誠老師、許昇峰老師……等等亦師亦友的教導與扶持，讓我們有如置身在中醫將官班的春風中，而今雖驪聲已揚，卻真讓人捨不得離開。

走入針灸鎮痛研究的領域應該是宿命的安排，從大學時代就深受林昭庚老師的關愛與提攜，十餘年來可說是始終如一，從畢業後的就業、研究生涯的開展、中醫師公會中的歷練、健保審查業務的參與、中西醫病名對照的編著到襄贊中醫師考試等等，可說是師恩浩瀚，禿筆難書；碩士班作的就是針灸安全性的評估，因此博士班時就想要在針灸療效的研究上有所突破，在老師的巧妙安排下，讓我又回到熟悉的台大醫院，認識了孫維仁老師，孫 P 當時擔任台大麻醉部疼痛科的主任，是他開啟了台大疼痛基礎研究的先河，而止痛的最高境界不就是麻醉嗎？這樣的研究環境正是我所夢寐以求的，林老師總是設身處地的為學生著想，也因此讓我們能無後顧之憂的發揮最大的研究能量。孫 P 思路清晰，作研究腳踏實地，並力求完美，追求卓越，在他的實驗室裡沒有壓力卻不輕鬆，我們就為了一個小小 PE 管希望從 10 號精進到 5 號，三番二次跑到高雄長庚取經（感謝麻醉科楊明正醫師及吳炳慶助理的傾囊相授），更大費周章的遠至美國下單訂製；也為了提高實驗動物的成功率，不惜耗費鉅資添購或請廠商製作各式各樣的設備，就這樣萬事起頭難的逐一完成這項難度頗高的研究，當然這段期間要感謝兩位助理振中與益豪的幫忙，以及安琇小姐行政事務的協助，還有伍淑敏大姐生活點滴的關懷，新光溫永銳醫師的友情贊助；而中醫所裡聰明可人的周美惠助教無論在資料統計、電腦處理、還是所內庶務上也都幫了大忙，就這麼一群可愛團隊的歡笑聲伴隨著枯燥的實驗與陣陣的老鼠味，飄蕩著這幾年的光陰。

離開中醫藥委員會實在是不想虛耗光陰在無謂的行政流程上，短短一年半內，一共經歷了二位署長、三位主任委員，只記得每天都在作簡報，都在人事更迭上修正有如「之」字型般搖擺不訂的政策；來

到了中興醫院要感謝李壽星副院長及林永福院長的幫忙，在一次的訪查過程中，我發現中興醫院有最嶄新的建築，正副院長更是對中醫全心全力的支持，正是個一展所長的好環境，果然在杜永光院長、施天岳院長、翁林仲院長等歷任院長卓越領導下，中興醫院中醫科已經是所有市立醫院中業績最好、口碑最佳、教學與研究表現最卓越的中醫部門，在繁重的診務和行政工作下讓我還能夠順利完成博士學位，當然要感謝謝瓊慧醫師、吳明珠醫師、樂英如醫師幾位主治醫師，以及沈邑穎和趙裔智兩位住院醫師的幫忙，大家合作無間的默契、全力以赴的拼勁，才能讓我們在服務、教學及研究各領域都拔得頭籌。

艱苦的時光總算要熬過去了，歡欣迎接美麗晨曦的來臨時，我最摯愛的父母親、妻子及三個小孩她們總是最緊密的倚靠著我，分享這一切一切的心情與喜悅，在眾家親朋好友的扶持下，終於完成了這一趟精采的旅程，如今停留在驛站上，我是否該思考另一個新的開始呢！

曹永昌謹誌
九十二年七月