

行政院國家科學委員會專題研究計畫 期中進度報告

缺乏睡眠對大白鼠傷害感受及 c-fos 表現上的效應(1/2)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC91-2314-B-039-019-

執行期間：91年08月01日至92年07月31日

執行單位：中國醫藥學院醫學系

計畫主持人：吳世銓

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 92 年 6 月 2 日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫

■期中進度報告

缺乏睡眠對大白鼠傷害感受 c-fos 表現上的效應

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC91-2314-B-039-019

執行期間：九十一年七月一日至九十三年七月三十一日

計畫主持人：吳世銓

共同主持人：陳志榮、黃家樂、陳玉芳、陳柏機

計畫參與人員：

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

赴國外出差或研習心得報告一份

赴大陸地區出差或研習心得報告一份

出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份

國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年 二年後可公開查詢

執行單位：中國醫藥學院附設醫院麻醉部

中 華 民 國 九 十 二 年 五 月 三 十

研究計畫中英文摘要：

(一) 計畫中文摘要。(五百字以內)

關鍵詞: 缺乏睡眠；大白鼠；傷害感受；Naloxone；福馬林測試；c-fos細胞致癌基因。

缺乏睡眠會影響生理狀，甚至會導至死亡。我們亦知道動物傷害感受會隨生理狀的改變而有所影響。但以前文獻中，缺乏睡眠對傷害感受之直接影響則從未見報導。我們的研究曾發現缺乏睡眠不只會降低大白鼠對吸入性麻醉藥福來生的最低肺泡濃度，對其疼痛閾值亦會有提升作用。本實驗乃採取前瞻性之單盲隨機設計，分別以250-350公克大白鼠來研究缺乏睡眠影響傷害感受的機轉。本計劃包含三個預期在兩年內完成之實驗。

第一年；實驗一：Naloxone對缺乏睡眠提升大白鼠疼痛閾值的效應。

背景：我們的研究曾經發現在大白鼠缺乏睡眠一、三及五天分別明顯延長擺尾潛伏期(Tail flick latency)35%、36%及30%之久。倘若缺乏睡眠是經鴉片途徑影響疼痛閾值，則像 Naloxone一類的嗎啡抗頓劑，將可抗頓缺乏睡眠對疼痛的效應。

方法：實驗把廿隻大白鼠，隨機個別飼養在一特製製造缺乏睡眠環境的飼養器內。在經三天之適應期後讓其無法睡眠三天。在無法睡眠前及無法睡眠的第四天早上進行擺尾測試，並記錄測試結果。在完成第四天早上測試後，給予naloxone 1mg/kg i.p.，並在給藥後5分鐘再進行擺尾測試。在完成所有資料之收集後，以 Student's t-test分析比較缺乏睡眠前、後及給予naloxone後擺尾測試之效應。

實驗二：缺乏睡眠對大白鼠皮下注射福馬林後行為反應及脊髓背角 c-fos 活動表現上的效應。

背景：因擺尾測試只能測量動物瞬間短暫疼痛之反應，故其研究結果仍是未能說明缺乏睡眠影響傷害感受的機轉。福馬林測試 (Formalin test) 可量化測量長疼痛刺激的行為反應，故近似真實狀下的疼痛傷害。本實驗之目的在比較缺乏睡眠及允許充份睡眠大白鼠在皮下注射福馬林後行為反應及脊髓背角 c-fos 活動表現上的差異性。

方法：本計劃把六十隻大白鼠隨機分成 D0、D1、D3、D5 及 D7 五組。實驗先讓老鼠適應環境三天。分別讓 D1、D3、D5 及 D7 組大白鼠缺乏睡眠 1、3、5 及 7 天後給予福馬林測試。D0 組大白鼠則在適應期後立即進行測試。在測試後一小時內記錄大白鼠對福馬林疼痛之行為反應。並在犧牲後記錄脊髓背角 c-fos 之活動表現。並在完成資料蒐集後，分析比較各相關資料。

計畫英文摘要。(五百字以內)

Keywords : Sleep deprivation; Rats; Nociception; Naloxone; Formalin test; c-fos.

Sleep deprivation precipitates adverse physiological effects and may even cause death. It is well established that nociception is influenced by numerous physiological changes but in the literature, there were no report on the effects of sleep deprivation on pain. In our previous studies we have demonstrated that sleep deprivation not only decreases halothane MAC but also augments pain threshold in rats. In this protocol we intended to investigate the possible mechanism on how sleep deprivation affects nociception. Our study includes 3 experiments performed within a period of 2 years

First year; Experiment I: Assessment of the effects of naloxone on the augmented pain threshold after sleep deprivation.

Background: We have previously demonstrated that after 1, 3, and 5 days of sleep deprivation, there were a significant increase from baseline in tail flick latency by 35%, 36% and 30% respectively. If sleep deprivation acts through the opiate pathway to augment pain threshold, then naloxone, an opiate antagonist should block the sleep deprivation effects. The aim of this study is to examine if naloxone given after sleep deprivation will alleviate the sleep deprivation effect.

Methods: Twenty rats weighing 250-350 g will be placed into a specially design sleep deprivation apparatus. After 3 days of adaptation, the rats will be subjected to have three days of sleep deprivation. Tail-flick test will be performed and results recorded on the morning of day before sleep deprivation and that of the 4th day. After recording of the tail flick responses on the 4th day, naloxone 1mg/kg i.p. will be injected and tail-flick test will be performed and recorded 5mins later. Data will be compared and analyzed by Student's t-test to see if the sleep deprivation or naloxone effects on tail flick responses are significant.

Experiment II Assessment of the effects of sleep deprivation on behavior reaction and c-fos immunoreactivity of the spinal cord in rats after subcutaneous formalin injection.

Background: As tail flick test only measures transient pain, the mechanism of sleep deprivation influencing pain perception could not be revealed merely from the result. Formalin test quantitates the behavioral response to a relatively long lasting pain stimulus, which resembles pain as it is seen in actual disease states. The aim of this study is to use the test to compare behavior reaction and c-fos immunoreactivity of the spinal cord after subcutaneous formalin injection between rats with sleep deprivation and adequate sleep.

Methods: Sixty rats will be randomly and equally allocated into 5 groups, group

D0, D1, D3, D5, and D7. Before the study, all rats will have 3 days of adaptation period. Rats from Group D1, D3, D5 and D7 will be subjected to 1, 3, 5, and 7 days of sleep deprivation respectively. Formalin test will be applied to Group D1, D3, D5 and D7 rats on the second, fourth, sixth and eighth day of confinement respectively. Group D0 rats will have the test immediately after adaptation period.

Immediately after formalin injection, behavior reaction will be recorded for an hour. The rats will be sacrificed and c-fos immunoreactivity of the spinal cord will be examined. Data between groups will be analyzed and compared.

期中報告內容

一、前言

缺乏睡眠會影響生理狀況，甚至會導致死亡。我們亦知道動物傷害感受會隨生理狀況的改變而有所影響。但以前文獻中，缺乏睡眠對傷害感受之直接影響則從未見報導。我們的研究曾發現缺乏睡眠不只會降低大白鼠對吸入性麻醉藥福來生的最低肺泡濃度，對其疼痛閾值亦會有提升作用。本實驗乃採取前瞻性之單盲隨機設計，分別以250-350公克大白鼠來研究缺乏睡眠影響傷害感受的機轉。本計劃包含三個預期在兩年內完成之實驗。

二、背景簡介

背景：我們的研究曾經發現在大白鼠缺乏睡眠一、三及五天分別明顯延長擺尾潛伏期(Tail flick latency) 35%、36%及30%之久。倘若缺乏睡眠是經鴉片途徑影響疼痛閾值，則像Naloxone一類的嗎啡抗頓劑，將可抗頓缺乏睡眠對疼痛的效應。

方法：實驗把廿隻大白鼠，隨機個別飼養在一特製製造缺乏睡眠環境的飼養器內。在經三天之適應期後讓其無法睡眠三天。在無法睡眠前及無法睡眠的第四天早上進行擺尾測試，並記錄測試結果。在完成第四天早上測試後，給予naloxone 1mg/kg i.p.，並在給藥後5分鐘再進行擺尾測試。在完成所有資料之收集後，以Student's t-test分析比較缺乏睡眠前、後及給予naloxone後擺尾測試之效應。而特製製造缺乏睡眠環境的飼養器是利用特製轉盤以每分鐘3.5轉，轉10秒停15秒促使老鼠缺乏睡眠，但此方法並無法準確判定老鼠缺乏睡眠，吾等利用全程錄影設備來監錄老鼠合眼時間來認別缺乏睡眠情形，發現以此方法，老鼠睡眠合眼時間低於25%，此法與原先Rechtschaffen雖無太大差異，

唯仍未算是一個準確製造出缺乏睡眠的環境的方法，為能設計出一個更有效區別老鼠是否睡覺的方法來進行 Naloxone 對缺乏睡眠提升大白鼠疼痛閾值的效應，吾等決定改造製造缺乏睡眠環境。實驗先進行方法一：取重約 250公克的大白鼠，以 I.P 90mg/kg ketalar 麻醉，將電極植入frontal, parietal and occipital skull areas，縫合後將接頭固定在頭皮上。

結果：因電極接頭無法固定在正確位置，使 EEG 訊號無法穩定送出，雖然使用 MP30 (BIOPAC System) 儀器測 EEG，發現有雜訊干擾，所以無法達到所需要的功能。

背景：因方法一無法得到穩定的 EEG 來區別老鼠是否睡覺，而慈濟醫學大學神經醫學所郭伯昭教授對老鼠睡眠有所研究，便到慈濟醫學大學神經醫學所郭教授實驗室學習。經學習後依郭教授方法得方法二：取重約 250 公克的大白鼠，以 I.P 90mg/kg ketalar 麻醉，將電極植入 frontal, parietal and occipital skull areas，縫合後將接頭以 Bone cement 固定在頭皮上。

結果：因皮膚會滑動造成電極無法固定在正確位置，使訊號無法穩定送出，而使用聽覺誘發電位測睡眠狀態，亦因無法送出誘發電位變化的聲音到老鼠耳內而無法區別老鼠是否睡覺。

背景：因上述方法皆無法得到穩定 EEG 訊號，因而無法無法達到區別老鼠是否睡覺，後依中國醫藥學院附設醫院醫研部張芳嘉副研究員提供建議按方法三：取重約250公克的大白鼠，以I.P 90mg/kg ketalar 麻醉，將電極 (Plastic One, Roanoke, VA) 以螺絲鎖入frontal, parietal and occipital skull areas，並將老鼠頭骨上出血止住，接頭以 Bone cement 一層一層慢慢固定在頭骨上。

結果：電極接頭可固定在正確位置，使 EEG 訊號穩定送出，使用 MP30 (BIOPAC System) 儀器測 EEG，訊號無干擾，但因 MP30 只能收訊號，無法區格老鼠睡眠的閾值送出訊號來驅動特製轉盤使老鼠無法睡覺，所以依然需有適合之儀器輔助，特改用 MP150 (BIOPAC System) 儀器來作為電腦腦波監測儀 及 alpha/theta wave 迴饋儀以監測睡眠腦波。成功的讓迴饋儀在老鼠的腦波監測器中發現有 theta wave 時，便驅動馬達讓旋轉盤讓老鼠無法入眠。

三、計畫成果自評

以前本實驗室使用製造缺乏睡眠環境的飼養器是利用特製轉盤以每分鐘3.5轉，轉10秒停15秒促使老鼠缺乏睡眠，但此方法並無法準

確判定老鼠缺乏睡眠，只能約略以老鼠睡眠時間低於25%計算，故希望能更有效區別老鼠是否睡覺的方法，目前以 EEG 來判斷區格老鼠是否睡覺是較準確的方式，本實驗室已成功利用MP150 (BIOPAC System)來設定閾值區格睡眠時的EEG變化，當測量到老鼠睡覺時可輸出訊號來驅動特製轉盤，使老鼠無法睡覺，吾等在透過監視器錄影來判斷老鼠缺乏睡眠的狀況時，亦證實可讓老鼠無法睡覺達100%的程度，即更優於前人Rechtschaffen 所 design之model。在這一年來，為了要建立更準確的老鼠缺乏睡眠系統，雖然影響了整個實驗的進度，但想到往後缺乏睡眠實驗將會有更準確的資料及能更順利地進行，本實驗室覺得此等時間上的付出是值得的。