

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

一氧化氮在末梢神經電刺激鎮痛所扮演的角色—福馬林試驗

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC91-2320-B-039-032-

執行期間：91年08月01日至92年07月31日

執行單位：中國醫藥大學中國醫學研究所

計畫主持人：林昭庚

計畫參與人員：劉旭然，方姿琪

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 10 月 1 日

九十一年度國科會報告書

研究題目：一氧化氮在末梢神經電刺激鎮痛所扮演的角色—福馬林試驗

主持人：林昭庚

共同主持人：謝慶良

研究人員：劉旭然 方姿琪

成果報告類型：精簡報告

計畫編號：NSC 91-2320-B-039-032

執行期限 91/08/01~92/07/31

執行機關：中國醫藥大學中國醫學研究所

## 中文摘要

**關鍵詞：**一氧化氮，電刺激末梢神經，福馬林試驗

我們先前的研究已知電刺激末梢神經能減少 formalin 所誘發的疼痛，但鎮痛機轉至今仍然不清。一氧化氮(NO)是一種神經傳遞物質，它在維持人體正常生理功能上扮演一個重要的角色。NO 在脊髓內能調控嗎啡的止痛作用，在癲癇或腦缺血的實驗模式中，電針會減少 NO 的產生，由此可知 NO 和電針作用之間有密切的關連。因此本研究的目的探討 NO 與電刺激末梢神經的止痛的關係。我們將 48 隻雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠分成八組，每組六隻。第一組於大白鼠之左後肢 plantar 表面皮下注射 50 ul 之 normal saline，第二組注射等量之福馬林 (5%，50 ul)，第三組在注射福馬林之前、後 15 分鐘分別以 2Hz 電刺激左側坐骨神經處理 15 分鐘，第四組在電刺激前 15 分鐘先注射 NOS 之抑制劑—L-N(G)-nitro arginine methyl ester (L-NAME, 20mg/kg, i.p.)，其餘步驟與第三組相同。另外，第五、六、七和八組，其處理和第一、二、三、四組相同，但是在福馬林或 normal saline 注射前及後 5、15、30、45、60 分鐘分別抽血測量 NO 的含量。結果顯示電刺激坐骨神經和 L-NAME 兩者都能減少 early phase 的 licking 和 biting，以及 lately phase 的 licking 和 biting。formalin 注射後 5 分鐘，它們血液中的 NO 濃度的變化和注射 normal saline 相似，但用 L-NAME 前治療，則比 formalin 有較低的 NO 濃度，而電刺激坐骨神經，則沒有和 L-NAME 得到相似的結果。Formalin 注射後 30 分鐘和 45 分鐘，血液中的 NO 變化比注射 normal saline 高，而電刺激坐骨神經和 L-NAME 前治療兩者都能減少 NO 的濃度。

我們的結論是電刺激坐骨神經減少 formalin 誘發 lately phase 的疼痛與 NO 有關。

## **English abstract**

**Keywords:** Nitric oxide, Electrical stimulation of peripheral nerve, Formalin test

Our previous studies have known that electric stimulation can reduce formalin-induced pain, but its analgesic mechanism remains unclear. Nitric oxide (NO) is one of neurotransmitters, and it plays an important role in maintaining normal physiological function of human body. NO in the spine cord can regulate the morphine for pain relief, and in the mode of epilepsy or cerebral ischemia, the electroacupuncture (EA) can reduce the production of NO has been found, therefore, suggesting that have a closely relationship between NO and EA. The aim of the present study was to investigate the relationship between NO and electric stimulation of peripheral nerve. A total 48 male Sprague-Dawley (SD) rats were studied, they

were divided into eight groups of each six rats as follows: 1) Group I: normal saline (50  $\mu$ l) was injected subcutaneously into the left plantar surface of the rats; 2) Group II: formalin (5%, 50  $\mu$ l) was injected subcutaneously into the left plantar surface of the rats; 3) Group III: 2Hz electric stimulation was applied to left sciatic nerve 15 min before and after formalin injection; 4) Group IV: L-N(G)-nitro arginine methyl ester (L-NAME, 20mg/kg, i.p.) was administration 15 min prior to formalin injection. In addition, the methods were the same as mentioned-above Group I, II, III, and IV in the Group VI, VII, VIII and IX, respectively, but the NO levels of peripheral blood were measured before, and 5 min, 15 min, 30 min, 45 min and 60 min after normal saline or formalin injection, respectively. The results indicated that both electric stimulation of sciatic nerve and L-NAME can reduce licking and biting in the early and lately phases in the formalin-treated rats. NO levels changes were similar between 5 min after normal saline-treated rats and formalin-treated rats. NO levels were lower in the L-NAME pretreatment group than formalin-treated group, but no similar changes were found in the electric stimulation of sciatic nerve group. NO levels were greater in the formalin-treated group than normal saline-treated group in the 30 min and 45 min after formalin administration, whereas that increase can be reduced by electric stimulation of sciatic nerve or by L-NAME pretreatment.

Our conclusion is that they have a closely relationship between the analgesic effect of sciatic nerve electric stimulation reducing formalin-induced pain in the lately phase and NO.

## 一、研究背景及目的。

針刺是以特製之金屬針，刺入人體之腧穴部位，施行一定之手法，產生刺激作用，以促使氣血調和，經絡暢通，而達到治療疾病與恢復健康之目的<sup>1</sup>。Sarlandiere 於 1825 年首先發表電針(electroacupuncture)療法<sup>2</sup>。Pomeranz and Chiu 首先提出針刺作用與 endorphin 之間的關係<sup>3</sup>，Cheng and Pomeranz 認為不同頻率的電針有不同的止痛機轉<sup>4</sup>，低頻率(2 Hz)的電針止痛能被 naloxone 逆轉，高頻率(100 Hz)的電針止痛作用則不受 naloxone 影響<sup>5,6</sup>。我們曾經在大白鼠的兩側足三里穴及三陰交穴插入不鏽鋼針，並分別通以 2KHz 和 5KHz 的電氣刺激 10 分鐘。我們的結果顯示它們兩者都能增加甩尾潛伏期，這說明它們有抗疼痛的作用。我們的結果也同時指出 2KHz 的電氣刺激比那些使用 5KHz 的電氣刺激產生更大的抗疼痛作用。此外，類鴉片拮抗劑 naloxone (20mg/Kg，皮下注射)可以阻斷 50% 2KHz 電氣刺激所產生的抗疼痛作用，但它不能阻斷 5KHz 電氣刺激所產生的。根據這些結果，可以推論 2KHz 電氣刺激能在大白鼠身上引發一種由類鴉片傳達的抗疼痛作用，而 5KHz 電氣刺激的抗疼痛作用較不明顯，其在本質上是一種非類鴉片的<sup>7</sup>。另外，我們發現外源性血清素(5-HT)和腎上腺素(NE)能加強 2Hz、10Hz 和 100Hz 的電氣刺激，特別是 100Hz 的電針刺激所產生的止痛作用，但這些作用能被 p-chlorophenylalanine(PCPA)減弱，和能被 5-hydroxytryptophan(5-HT)所加強。Naloxone 能逆轉 2Hz 和 10Hz 電針刺激所引起的止痛作用，但對 100Hz 電針刺激所引起的則不能，而 Naltrindole 能逆轉 10Hz 和 100Hz 電針刺激所產生止痛作用，但對 2Hz 電針刺激所引起的則沒有此作用。Prazocin 和 Clonidine 能加強 2Hz、10Hz 和 100Hz 電針刺激所引起的止痛作用，而 yohimbine 能逆轉 2Hz 和 10Hz 電針刺激所引起的止痛作用和加強 100Hz 電針刺激的止痛作用。Pindobind-5-HT<sub>1A</sub> 與 LY-278584 能逆轉 2Hz、10Hz 和 100Hz 電針刺激的止痛作用。Ketanserin 加強 100Hz 電針刺激的止痛作用。從這些結果推論 2Hz、10Hz 和 100Hz 電針刺激的止痛作用與血清素性及正腎上腺素性神經元有關。在血清素性的路徑中，電針刺激的止痛作用可能藉由 5-HT<sub>1A</sub> 和 5-HT<sub>3</sub> 接受器傳達，而 5-HT<sub>2</sub> 可能涉及到高頻率的電針刺激止痛。在正腎上腺素性的路徑中， $\alpha$ -1 和  $\alpha$ -2 接受器兩者都涉及到電針刺激的止痛作用，而且它們可能扮演著互相對立的角色。另外，低頻率的電針刺激止痛經由  $\mu$ -類鴉片接受器傳達，而高頻率的電針刺激止痛是經由  $\delta$ -類鴉片接受器傳達<sup>8</sup>。我們先前的研究可以結論為不同頻率的電針刺激將導致不同亞型類鴉片或血清素接受器的傳達止痛作用。使用輪流的電針刺激模式來治療慢性疼痛優於使用同時性的電針刺激模式，因它可以使電針的耐受性延後發生。電針的止痛機轉與神經汰和單胺神經元有密切的關係，其中包含了中樞神經系統中的血清素性和正腎上腺素神經元。

NO (nitric oxide)是近年來備受重視的神經傳遞物質(neurotransmitter)，它是

維持血管、泌尿道、腸胃、大腦、行為等正常生理所必需的物質，但是過量則具神經毒性(neurotoxicity)<sup>15</sup>。NO 在脊髓內也調控嗎啡的止痛作用<sup>16</sup>。在 penicillin 誘發癲癇的模式中，電針能減低 hippocampus 中 nNOS 和 iNOS mRNA 的含量<sup>17, 18</sup>。在大腦缺血的模式中，電針也有降低 NO 的作用<sup>19</sup>。由此可知 NO 和電針作用之間有密切的關連。先前我們的研究發現在大白鼠的坐骨神經電刺激可以減輕福馬林所引發的疼痛，末梢神經的電刺激以 2 Hz 及痛覺未發生前施予為佳，同時我們推論末梢神經電刺激的鎮痛效果可能來自於脊髓以上的中樞<sup>20</sup>，因此本研究的目的是進一步探討 NO 在末梢神經電刺激鎮痛效應所扮演的角色。我們使用 L-NAME，是一種 nitric oxide synthase (NOS) 的拮抗劑來了解 NO 與福馬林疼痛的關係，然後進一步的觀察福馬林疼痛與 2 Hz 末梢神經電刺激之 NO 變化的時間經過關係。

## 二、材料與方法

### (一) 實驗動物：

自國科會購買雄性 Sprague-Dawley rats，體重 160-180 公克，飼養於中國醫藥學院動物中心，溫度維持  $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$ ，相對濕度  $55 \pm 5\%$ ，半日照環境，自由飲水及標準飼料。實驗過程遵循實驗動物醫學倫理之道德規範<sup>21</sup>。

### (二) 福馬林試驗：

大白鼠分別置於透明的觀察箱(長 40 公分，寬 40 公分，高 50 公分)中一小時。於大白鼠之左後趾底皮下注射，以微量注射器 (microsyringe) 皮下注射 50 ul 之 5% 福馬林溶液(2.5 mg paraformaldehyde 溶於 50 ul 蒸餾水)，注射後立即將大白鼠放於觀察箱中，觀察並記錄大白鼠咬 (biting) 或舔 (licking) 左後腳注射部位之累積次數，每隔 5 分鐘記錄一次，共記錄 60 分鐘。將 0-5 分鐘的累積秒數稱為早期 (early phase) 的痛覺反應相，而 21-35 分鐘之累積秒數總和稱為晚期 (late phase) 的痛覺反應相。

### (三) 電極之準備：

電刺激前一週，在麻醉狀態下(chloral hydrate, 400 mg/ kg, i.p.) 埋入電極。頭部以立體定位儀固定之。小心地將左側坐骨神經顯露出來，並纏繞陰陽兩極，另一對陰陽極則縫於頸部肌肉中。所有金屬線皆經由皮下組織塞進連接管中，並以無菌鋼釘與牙科接合劑將其固定於頭蓋骨上，以利連接管與電刺激器連接 (Belgium, Gymma Co., Inter-Dia 200)。

### (四) 實驗分組：

將 48 隻實驗動物隨機分為八組，第一組於大白鼠之左後肢 plantar 表面，以微量注射器 (microsyringe) 皮下注射 50 ul 之 normal saline，第二組注射等量之福馬林 (5%，50 ul)，第三組在注射福馬林之前、後 15 分鐘分別以電刺激左側

坐骨神經處理 15 分鐘(選擇方波，電流強度 1 mA，波寬 250 us，頻率 2 Hz)。第四組在電刺激前 15 分鐘先注射 NOS 之抑制劑—L-N(G)-nitro arginine methyl ester (L-NAME, 20mg/kg, i.p.)，其餘步驟與第三組相同。

我們另外分出第五、六、七和八組，其處理和第一、二、三、四組相同，但是在福馬林或 normal saline 注射前及後 5、15、30、45、60 分鐘分別抽血測量 NO 的含量。我們以 formalin 或 normal saline 注射前的 NO 值做為分母，即各組注射前的值為 1，然後比較各組間注射後 5 分鐘，及 30 分鐘和 45 分鐘平均值 NO 的差異。

### (五) NO 的測量：

NO 的測量使用 Nitric Oxide Analyzer 型號為 NOA™ 280i 是美國 Sievers Instruments 公司製造，由台灣和航公司代理進口。可針對液體及氣體的欲測樣品來做分析，亦可應用於臨床上，直接由病人吹氣測得濃度，可節省時間並有利於建立統計數值。是目前探討 NO 領域中相當靈敏的機器。

機器原理主要是利用化學冷光法。將 Sample 所產生的  $\text{NO}_3^-$  經由三氯化釩(還原劑) 還原為 NO 狀態： $2\text{NO}_3^- + 3\text{V}^{+3} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{NO} + 3\text{VO}^{3+} + 4\text{H}^+$ 。打入純氧 ( $\text{O}_2$ ) 會經由臭氧製造器產生臭氧( $\text{O}_3$ )，此時 NO 會與  $\text{O}_3$  結合： $\text{NO} + \text{O}_3 \rightarrow \text{NO}_2^*$  (激態) +  $\text{O}_2$ ， $\text{NO}_2^*$  經由 PMT 管(發光器) 上的濾光片產生波長，由電路板再轉變成電量單位，以電量來表示  $\text{NO}_2$  的量： $\text{NO}_2^* \rightarrow \text{NO}_2 + h\nu$ ，機台與電腦連接，經數據處理(積分)後，即成為濃度單位。

### (六) 測量步驟：

#### 1. 血液的抽取：

先將 PE 管附著一層抗凝血劑，以防插管及抽血時血液附著於管壁造成阻塞。以 isoflurane 麻醉 SD 實驗大白鼠後將其四肢固定，使用 PE 管從大白鼠的右側股動脈插入，然後將 PE 管經由皮下穿出於大白鼠之背部，以防大白鼠清醒後咬斷 PE 管，此時將穿出於大白鼠背部那端的 PE 管以釣魚線封住出口。於福馬林或 normal saline 注射前及注射後 5 分、15 分、30 分、45 分、60 分鐘分別抽取 0.5 ml 的動脈血測量 NO 濃度。

#### 2. 血液的處理：

採得之血液置於含 heparin 之採血管中備用。欲以 NO Analyzer 偵測時再行去蛋白之動作，否則應以全血狀態貯存。

以 Cold Ethanol Precipitation 法去蛋白，步驟如下：

- (1) 以去離子水先沖洗過玻璃器皿，以去除所有殘留之 Nitrate。
- (2) 吸取 0.5ml 之全血至 1.5ml 離心管中，加入 1ml 已冷卻至  $0^\circ\text{C}$  的 Cold Ethanol，以 Vortex 振盪混合均勻，置於  $0^\circ\text{C}$  下 30min。
- (3) 以 14000rpm 下，離心 5 分鐘。抽取上層液即可。



此處理後之上層液濃度已稀釋為原來之 1/3

### 3. 標準品的製作：

先秤取 0.85mg 之 Sodium Nitrate 溶於 10ml 之 Q 水，此為 10mM，再做 1mM、0.5mM、100  $\mu$ M、50  $\mu$ M、25  $\mu$ M、10  $\mu$ M、5  $\mu$ M、2.5  $\mu$ M、1  $\mu$ M、0.5  $\mu$ M、0.25  $\mu$ M 等數個不同濃度之稀釋液作為標準品。

### 4. NO 測量儀器的準備：

開啟 NOA 進行偵測，待機器反應槽壓力平穩後，即可依序打入不同溶度之 std (由低濃度至高濃度)。經電腦處理後，可畫出一條標準曲線，並儲存之。

### 5. NO 的偵測：

待畫出標準曲線後即可打入欲偵測之血液 sample，電腦會將 sample 濃度與標準曲線作統計，以得知此未知 sample 之濃度，此時之數值需再乘回 3 倍 (因去蛋白時稀釋為原來的 1/3)。若測出 sample 濃度過高時，可能會超出標準曲線，此時未知 sample 可稀釋之，待測出濃度後再乘回所稀釋倍數即可。

### (七) 統計分析：

實驗數據以 mean $\pm$  SD 表示，以單因子變方分析(one way ANOVA)來比較各組之差異，p 值小於 0.05 則具有統計顯著性。

## 三、結果

### (一) 電刺激坐骨神經和 L-NAME 對 formalin 誘發疼痛反應的影響

在大鼠左後肢的 plantar 表面皮下注射 formalin (5%，50 ul) 後，所有大鼠左後肢呈現 elevating，shaking，licking 的行為，他們的行為有兩個明顯的 phases。一個 early phase 出現在 formalin 注射後持續 5 分鐘，以及一個 lately phase 大約從 formalin 注射後的 21 分鐘到 35 分鐘。結果顯示電刺激坐骨神經和 L-NAME 兩者都能減少 early phase 的 licking 和 biting (P < 0.05, P < 0.001, respectively)，以及 lately phase 的 licking 和 biting (P < 0.001, P < 0.001, respectively)。

### (二) 電刺激坐骨神經和 L-NAME 對 formalin 誘發 NO 的影響

在大鼠左後肢的 plantar 表面皮下注射 formalin (5%，50 ul) 後 5 分鐘，它們血液中的 NO 濃度的變化和注射 normal saline 相似(P > 0.05)，但用 L-NAME 前治療，則比 formalin 有較低的 NO 濃度 (P < 0.001)，而電刺激坐骨神經，則沒有和 L-NAME 得到相似的結果 (P > 0.05)。在大鼠左後肢的 plantar 表面皮下注射 formalin (5%，50 ul) 後 30 分鐘和 45 分鐘，血液中的 NO 變化比注射 normal saline 高 (P < 0.01)，而電刺激坐骨神經和 L-NAME 前治療兩者都能減

少 NO 的濃度 (all  $P < 0.01$ )。

#### 四、討論和結論

我們的結果顯示在大鼠左側的 plantar 表面的皮下注射 formalin 後出現 elevating, shaking, licking 和 biting 行為，這些行為呈現一個 early phase，發生在 formalin 注射後持續 5 分鐘，和一個 lately phase，發生大約在 formalin 注射後 20 分鐘，持續 20-30 分鐘，這些結果和我們先前研究的結果一致<sup>20</sup>。另外，我們的結果顯示電刺激坐骨神經和 L-NAME 前治療兩者都能減少 formalin 所誘發 early phase 和 lately phase 的 licking 和 biting 現象，這些結果說明電刺激能抑制 formalin 所誘發的疼痛，以及 formalin 所誘發的疼痛可能和 NO 有關。

本研究的結果發現 formalin 注射後 5 分鐘 NO 的濃度變化和注射 normal saline 相似，但 30 分鐘後 NO 的濃度上升，這個結果和一些更早期的研究發現 NO 的濃度於 formalin 注射後 18-33 min 達到 peak 相類似<sup>22</sup>。另外，我們的結果顯示電刺激坐骨神經和 L-NAME 前治療相似，兩者都能減少 formalin 注射後 30 和 45 分鐘的 NO 濃度。有研究報告指出 NO 的釋放能隨著有害化學物質的刺激，而貢獻於續發性的疼痛，又在 capsaicin 皮內注射的後角神經細胞的中樞敏化作用有 NOS (nitric oxide synthase) I 和 NOS II 牽連在內<sup>23</sup>。L-NAME 能阻斷 capsaicin 誘發的疼痛行為和 formalin 誘發 paw licking 行為的第二相<sup>23</sup>。因此我們推測電刺激坐骨神經減少 formalin 誘發第二相 (lately phase) 的 licking 和 biting 行為和 NO 有關，至於電刺激坐骨神經減少 formalin 誘發 early phase 的 licking 和 biting 行為的機轉如何有待進一步的探討，由於有研究已指出 formalin 所誘發的 early phase 是直接化學刺激所引起<sup>24</sup>，而 lately phase 是周邊發炎和中樞改變的結果<sup>25</sup>。

我們的結論是電刺激坐骨神經減少 formalin 誘發 lately phase 的疼痛與 NO 有關。

#### 五、參考文獻

1. 黃維三：針灸科學。正中書局，台北。Pp.1，1997。
2. Frederick F. Kao and John J. Kao: Recent advances in acupuncture research. In: Gustaf Landgren, Treatise on Acupuncture Academic Thesis for the Degree of Medicinæ Doctor at Uppsala University 16 May 1829. Institute for Advanced Research in Asian Science and Medicine, Garden City, New York, 1979, pp. 37-48.
3. Pomeranz B and Chiu D: Naloxone blockade of acupuncture analgesia: endorphin implicated. Life Sci. 19:1757-1762, 1976.
4. Cheng RS and Pomeranz B: Electroacupuncture analgesia could be mediated by at least two pain-relieving mechanisms; endorphin and non-endorphin systems. Life

Sci. 25:1957-1962, 1979.

5. Bing Z, Villanueva L and Le Bars D: Acupuncture and diffuse noxious inhibitory controls: naloxone-reversible depression of activities of trigeminal convergent neurons. *Neuroscience*. 37:809-818, 1990.
6. He LF, Dong WQ and Wang MZ: Effects of iontophoretic etorphine and naloxone, and electroacupuncture on nociceptive responses from thalamic neurones in rabbits. *Pain*. 44:89-95, 1991.
7. Lin JG, Chen XH and Han JS: Antinociception produced by 2 and 5 KHz peripheral stimulation in the rat. *Intern. J. Neuroscience*. 64: 15-22, 1992.
8. Yu MC, Lin JG, Tsai HY and Chen YF: Studies of action mechanisms in different frequencies of EAc analgesia on central monoaminergic and opioid receptors. Institute of Chinese Medical Science china Medical College, Master thesis, 1995.
9. Kuo CC, Tsai HY, Lin JG and Chen YF: Studies of action mechanisms of electroacupuncture in different frequencies on spinal serotonergic and opioid receptors. Institute of Chinese Medical Science China Medical College , Master thesis, 1995.
10. Lin JG, Hao T, Chen XH and Han JS: Intermittent-alternating mode of administering electroacupuncture stimulation postpones the development of electroacupuncture tolerance. *Am. J. Acupuncture*. 21 (1): 51-57, 1993.
11. Tsai HY, Lin JG and Inoki R: Further evidence for possible analgesic mechanism of electroacupuncture: Effects on neuropeptides and serotonergic neurons in rat spinal cord. *Jpn. J. Pharm.* 49: 181-185, 1989.
12. Tsai HY, Chen YF and Lin JG: Effect of electroacupuncture on the serotonergic neurons in rat central nervous system. *Chin. Pharm. J.* 41 (2):123-126, 1989.
13. Tsai HY, Chen YF, Lin JG and Chen CF : Effects of electroacupuncture analgesia on the central monoaminergic neurons. *Chin. Pharm. J.* 46: 207-218, 1994.
14. Lin LM, Huang CT, Lin JG and Tasi SK: A comparison between the pain relief effect of electroacupuncture, regional nerve block and electroacupuncture plus regional nerve block in frozen shoulder. *Acta Anesthesiologica Sinica*. 32: 237-242, 1994.
15. Baranano DE, Snyder SH: Neural roles for heme oxygenase: contrasts to nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(20):10996-1002, 2001.
16. Li X, Clark JD: Spinal cord nitric oxide synthase and heme oxygenase limit morphine induced analgesia. *Brain Res Mol Brain Res* 95(1-2):96-102, 2001.
17. Yang R, Huang ZN, Cheng JS: Anticonvulsion effect of acupuncture might be related to the decrease of neuronal and inducible nitric oxide synthases. *Acupunct Electrother Res* 24(3-4):161-167, 1999.
18. Huang ZN, Yang R, Chen G, Cheng JS: Effect of electroacupuncture and 7-NI on

- penicillin-induced epilepsy and their relation with intrahippocampal NO changes. *Sheng Li Xue Bao* 51(5):508-514, 1999.
19. Zhao P, Huang ZN, Chen G, Cheng JS. Electro-acupuncture attenuates nitric oxide release from rat striatum after transient middle cerebral artery occlusion. *Acupunct Electrother Res* 25(2):101-107, 2000.
  20. Hsieh CL, Kuo CC, Chen YS, Li TC, Hsieh CT, Lao CJ, Lee CJ and Lin JG: Analgesic effect of electric stimulation of peripheral nerves with different electric frequencies using the formalin test. *Am. J. Chin. Med.* 28(2):291-299, 2000.
  21. Zimmermann M: Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain.* 16(2):109-110, 1983.
  22. Vetter G, Geisslinger G and Tegeder I. Release of glutamate, nitric oxide and prostaglandin E2 and metabolic activity in the spinal cord of rats following peripheral nociceptive stimulation. *Pain.* 92: 213-218, 2001.
  23. Wu J, Fang L, Lin Q and Willis WD. Nitric oxide synthase in spinal cord central sensitization following intradermal injection of capsaicin. *Pain.* 94: 47-58, 2001.
  24. Dubuisson D and Dennis SG. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain.* 4:161-174, 1977.
  - 25.Coderre TJ, Vaccarino AL and Melzack R. Central nervous system plasticity in the tonic pain response to subcutaneous formalin injection. *Brain Res.* 535: 155-158, 1990.

## 六、計畫成果自評

1. 研究成果與原計畫相符，達成預期目標
2. 研究成果可以成為教學的一部份，並做為臨床的參考。
3. 研究成果對電刺激末梢神經的機轉有更進一步的瞭解，並針灸的生理機轉有更深一層的認識。