

中國醫藥大學中國醫學研究所碩士論文

編號：GICMS-321

指導教授：陳必誠 博士

共同指導教授：陳悅生 博士

論文題目：

葛根明膠神經導管對神經再生之影響評估

Evaluation of Gelatin Nerve Conduits Containing
Radix Puerariae on Nerve Regeneration

研究生：王隆碩

中華民國九十六年七月

目 錄

第一章 前言	1
第二章 文獻回顧	4
2.1 周邊神經損傷	4
2.1.1 周邊神經損傷的分類	4
2.1.1.1 Seddon 分類法	4
2.1.1.2 Sunderland 分類法	5
2.1.2 周邊神經損傷的修補技術	5
2.1.2.1 斷端縫合術 (end-to-end suturing techniques)	5
2.1.2.2 組織纖維黏合法 (Tissue fibrin adhesive techniques)	6
2.1.2.3 雷射神經癒合術 (Laser nerve repair techniques)	6
2.1.2.4 神經移植手術 (Nerve grafting operation)	6
2.1.2.5 神經導管接合術 (Nerve bridging techniques)	7
2.2 神經與中醫	7
2.2.1 神經系統的中醫觀點	7
2.2.1.1 神經的中西醫學發展史	7
2.2.1.2 腦髓與神經的關係	9
2.2.1.3 臟腑與神經的關係	9
2.2.1.4 經絡與神經的關係	10
2.2.2 周邊神經損傷的中醫觀點	13
2.2.2.1 周邊神經損傷的中醫證型	13
2.2.2.2 周邊神經損傷的中醫治療	13
2.2.2.2.1 中藥治療	13
2.2.2.2.2 針灸治療	14
2.3 製備神經導管的常用生醫材料	14
2.3.1 生醫材料的種類	14
2.3.2 神經導管材料的選擇條件	15
2.3.3 神經導管材料各論	16
2.3.3.1 膠原蛋白 (collagen)	16

2.3.3.2 明膠 (Gelatin)	17
2.3.3.3 甲殼素 (chitin) 與幾丁聚醣 (chitosan)	18
2.4 交聯與交聯劑	19
2.4.1 交聯的作用	19
2.4.2 交聯的方法	20
2.4.3 化學交聯劑的種類	20
2.4.4 交聯方法的比較	21
2.5 藥物控制釋放在神經導管上的應用	22
2.5.1 控制釋放的基本概念	22
2.5.2 葛根	23
2.5.2.1 葛根簡介	23
2.5.2.2 葛根的神經相關文獻探討	23
第三章 材料與方法	25
3.1 製備葛根濃縮粉末	25
3.1.1 目的	25
3.1.2 主要材料	25
3.1.3 製備方法	25
3.2 製備神經導管	26
3.2.1 目的	26
3.2.2 主要材料	26
3.2.3 製備方法	27
3.2.3.1 製備對照組神經導管	27
3.2.3.2 製備實驗組神經導管	28
3.3 神經導管接合術	29
3.3.1 目的	29
3.3.2 主要材料	29
3.3.3 手術方法	30
3.4 觀察大鼠植管後 0~8 週狀態	31
3.5 觀察神經再生情形及導管降解狀態	31
3.6 神經電生理檢測實驗	32

3.6.1 目的	32
3.6.2 實驗方法	32
3.7 再生神經組織學切片分析	32
3.7.1 目的	32
3.7.2 實驗方法	32
第四章 結果	34
4.1 葛根濃縮粉末製藥結果	34
4.2 神經導管製備結果	34
4.3 大鼠植管後 0~8 週狀態觀察結果	36
4.3.1 一般性觀察結果	36
4.3.2 體重變化與厭食	38
4.3.3 自殘	39
4.4 觀察神經再生及導管降解狀態結果	41
4.4.1 一般性觀察結果	41
4.4.2 神經導管降解程度觀察結果	44
4.4.3 神經再生觀察結果	45
4.5 神經電生理檢測結果	49
4.5.1 潛期	49
4.5.2 波期	50
4.5.3 振幅	51
4.5.4 波下面積	52
4.5.5 神經傳導速度	53
4.6 再生神經組織學切片評估結果	54
4.6.1 光學顯微鏡 40 倍鏡檢結果	54
4.6.2 光學顯微鏡 100 倍鏡檢結果	56
4.6.3 光學顯微鏡 400 倍鏡檢結果	60
4.6.4 光學顯微鏡 1000 倍鏡檢結果	63
第五章 討論	66
5.1 藥物	66
5.2 神經導管的製備	67

5.3 大鼠植管後 0~8 週的狀態觀察.....	68
5.4 神經電生理評估.....	69
5.5 再生神經組織學切片評估.....	70
第六章 結論.....	72
參考文獻.....	73
英文摘要.....	89
作者簡歷.....	90
謝辭.....	91



圖 目 錄

圖 4.1 葛根濃縮粉末	34
圖 4.2 對照組神經導管	35
圖 4.3 實驗組神經導管	35
圖 4.4 神經導管之比較	36
圖 4.5 大鼠植管後 0~8 週體重變化比較圖	38
圖 4.6 大鼠自殘狀態	39
圖 4.7 對照組神經再生及神經導管降解圖	42
圖 4.8 實驗組神經再生及神經導管降解圖	43
圖 4.9 神經導管降解程度比較圖	45
圖 4.10 對照組 A1 大鼠只有微細再生神經出現	46
圖 4.11 對照組 A8 大鼠可觀察到粗大的再生神經	47
圖 4.12 實驗組 B3 大鼠可觀察到粗大的再生神經	47
圖 4.13 對照組 A4 大鼠之分離坐骨神經	48
圖 4.14 實驗組 B3 大鼠之分離坐骨神經	48
圖 4.15 潛期比較圖	49
圖 4.16 波期比較圖	50
圖 4.17 振幅比較圖	51
圖 4.18 波下面積比較圖	52
圖 4.19 神經傳導速率比較圖	53
圖 4.20 實驗組神經切片 (縱切面, 40 倍)	55
圖 4.21 對照組神經切片 (橫切面, 40 倍)	55
圖 4.22 實驗組神經切片 (橫切面, 40 倍)	56
圖 4.23 實驗組神經切片 (縱切面, 100 倍)	57
圖 4.24 對照組神經切片 (橫切面, 100 倍)	58
圖 4.25 實驗組神經切片 (橫切面, 100 倍)	58
圖 4.26 對照組神經切片 (斜切面, 100 倍)	59
圖 4.27 實驗組神經切片 (斜切面, 100 倍)	59
圖 4.28 實驗組神經切片 (縱切面, 400 倍)	60

圖 4.29 對照組神經切片（橫切面, 400 倍）	61
圖 4.30 實驗組神經切片（橫切面, 400 倍）	62
圖 4.31 對照組神經切片（橫切面, 1000 倍）	64
圖 4.32 實驗組神經切片（橫切面, 1000 倍）	65
圖 5.1 神經導管內神經再生機制圖	68
圖 5.2 動作電位比較圖	71



表 目 錄

表 4.1 大鼠植管後 0~8 週狀態觀察結果	37
表 4.2 大鼠植管後厭食數目比較表	39
表 4.3 大鼠植管後自殘數目比較表	40
表 4.4 神經導管降解程度分級標準	44
表 4.5 神經導管降解程度分級結果	44
表 4.6 肉眼觀察神經再生結果比較表	46
表 4.7 潛期統計結果表	50
表 4.8 波期統計結果表	51
表 4.9 振幅統計結果表	52
表 4.10 波下面積統計結果表	53
表 4.11 神經傳導速度統計結果表	54



葛根明膠神經導管對神經再生之影響評估

研究生：王隆碩

指導教授：陳必誠 博士

中國醫藥大學 中國醫學研究所

本研究係以明膠來製備可降解之神經導管，將其植入雌性 Sprague-Dawley 大鼠截斷坐骨神經 10 mm 之斷面，藉以評估導管對神經再生之影響。實驗所採用之對照組為未加中藥之明膠神經導管，實驗組為添加葛根之明膠神經導管。導管採用戊二醛進行化學交聯。植管後，將大鼠飼養八週後收成，再以肉眼觀察神經再生情形及導管降解狀況，並以電生理檢測及神經切片組織學分析，來評估神經再生及功能恢復的狀況。我們的研究結果顯示，在肉眼觀察上，兩組皆取得良好神經再生結果，導管降解程度亦皆良好。在電生理評估上，實驗組比對照組的神經功能良好，且已達到統計上的顯著差異。在組織學鏡檢觀察上，實驗組的再生神經組織顯得較為緻密，對照組組織則較為疏鬆。因此我們的結論是，添加葛根的神經導管比未添加葛根之明膠導管，對神經的再生及功能恢復具有助益。

關鍵字：神經導管、葛根、周邊神經再生。

第一章 前言

本研究之主題，主要歸屬於生物醫學工程中的生醫材料範疇。我們係採用將生醫材料的技術應用於中醫藥上的方法，來進行研究。根據美國國家衛生研究院（National Institutes of Health, NIH）的定義，「生物醫學工程」（Biomedical engineering, BME）是結合物理、化學、數學、資訊等科學與工程的學理，來研究生物學、醫學、行為科學、衛生學的一門學問。其知識領域涵蓋了從分子到器官系統各階層，在生物學、材料學、信號處理學、移植學、儀器科學、生物訊息學上發展出新的研究方向，並加以應用於疾病的預防、診斷、治療，以及病人的復健，和促進人類健康之上^[1]。而根據第六屆國際生醫材料年會的定義，「生物醫學材料」（Biomedical materials）是一種可以被植入（implantation）或併入（incorporation）生命活體系統中，或是可以與活體系統相結合的物質，它是一種不會引起生物藥理反應的鈍性物質^[2]。從應用的角度來看，生醫材料是可用於人工器官、外科修復、物理治療、診斷、檢查等醫療保健領域的一種具有特殊性質與功能，能滿足特殊要求的材料之總稱。由於人體生理環境的複雜性，用於人體內的生物醫學材料及其製品介入人體的生理環境後，會相互影響，因而導致一連串的生物反應，如組織、血液、免疫等方面，因此在生醫材料研製與應用的階段，皆須注意材料與生物體之間的相互作用以及可能產生的結果^[3]。

在生物醫學工程的研究領域裡，如何修復斷損的神經，一直是學者們深感興趣的課題。其中，神經導管接合技術（Nerve bridging technique）是近年來的熱門研究方向。此技術係將神經兩斷端分別以手術縫合於一個生醫材料神經導管（Nerve guide conduit, NGC）的兩端，來導引及支持再生神經的生長，促進神經的再生及其功能的修復。其優點包括：1. 植入神經導管處較不會有干擾神經生長的結締組織增生；2. 導管能導引再生神經向正確的方向生長；3. 導管能減少神經生長因子的流失；4. 可以將抑制神經再生的因子排除於導管外^[4]。在神經導管的製造上，生醫材料與交聯劑的種類、導管的製程、管中所添加成份的種類與劑量等，

都是必須考慮的參數。

理想的神經導管必須具備以下條件：1. 良好的生物降解性，以避免進行二次手術移除導管的過程，並減少導管長時間刺激所產生的慢性組織反應；2. 良好之手術縫合性；3. 材質的機械強度必須足以提供神經再生之保護空間；4. 完全降解所需時間夠長，可以支持及保護再生神經軸突延伸至遠端；5. 材質的生物相容性佳，不會與周圍組織產生過度免疫反應，並可提供神經軸突生長錐（axon cone）爬行之介面，穩定神經纖維結構^[5]。文獻上報導的較佳可降解生醫材料有膠原蛋白（collagen）^[6-7]、幾丁質（chitin）及幾丁聚糖（chitosan）^[8-10]、明膠（gelatin）^[11-12]等。它們皆不具神經毒性，而且有良好的生物相容性^[6-12]。然而，膠原蛋白必需藉助化學修飾來降低其生物排斥性，而且有價錢昂貴的缺點^[13]。幾丁聚糖有促進神經生長的作用^[10]，但有脆度較大的缺點^[13]。明膠除了免疫排斥性比膠原蛋白低，尚具有價錢便宜的優點^[13-15]。

可降解的導管如果在生物體內降解太快，便無法提供神經生長足夠的支持空間。為了要延長導管材料降解的時間，必須使用交聯劑（crosslinking agents）來與材料進行交聯（crosslinking），以延長降解的時間^[16-17]。交聯劑的主要功用包括：延緩神經導管的降解速率^[19-21]、延長導管中藥物釋出的時間^[19-21]、提升管壁結構的機械強度^[22-23]、減輕免疫攻擊及酵素分解效應^[22-23]等。有的交聯劑具有降低發炎反應的作用^[24]。常用的交聯劑有：formaldehyde、glutaraldehyde、epoxy compound、1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl)-carbodiimide (EDC)、綠梔子素（genipin）、acyl azides、water-soluble carbodiimides 等^[25-26]。

於製管過程中，在可降解的神經導管內加入藥物，有可能促進再生神經的生長。當可降解的導管植入生物體內後，會受到酵素攻擊而隨著時間增加逐漸分解，導管中的藥物也就逐漸釋放出來。我們的研究感興趣的藥物是中藥葛根。由本實驗室之前的研究顯示，以明膠製成的神經導管對截斷坐骨神經大鼠的神經再生，有統計上的顯著促進作用

[13-15,27]。而文獻顯示，葛根素(Puerarin)有抗神經毒性(anti-neurotoxicity)作用^[28]，並能增加人類 neuroblastoma cells 的神經元存活率^[29]。本研究則嘗試在明膠神經導管管壁中加入中藥葛根，用以評估葛根明膠神經導管是否對神經再生具有促進或抑制的作用。



第二章 文獻回顧

2.1 周邊神經損傷

2.1.1 周邊神經損傷的分類

周邊神經損傷的分類，主要有 Seddon 分類法和 Sunderland 分類法兩種，分別論述如下。

2.1.1.1 Seddon 分類法

Seddon 在 1943 年，將神經損傷分成三大類^[26,30-32]：

(1). 神經失用 (neurapraxia)

「神經失用」係指神經的應激性 (excitability) 雖然仍然存在，可是在連續的軸突內發生局部傳導阻斷 (local conduction block) 的情形。在病理學及解剖學上，可以觀察到局部髓鞘損傷的情形，但是軸突的連續性 (axonal continuity) 仍保持完整，也沒有 Wallerian 氏退化 (Wallerian degeneration) 的情形發生。在功能障礙上，神經失用通常會對運動功能以及自體刺激感覺 (proprioception) 造成影響，但感覺及交感神經功能一般較不受影響。神經傳導阻斷通常會持續幾星期或幾個月之久，直到局部髓鞘自行修復。神經受到擠壓受傷後產生的急性局部去髓鞘的阻斷 (acute local demyelinating block)，就是神經失用的一種。

(2). 軸突斷傷 (axonotmesis)

「軸突斷傷」係指軸突因受傷而失去了連續性，但是神經內膜仍然完整的情況。軸突的連續性遭受破壞後，軸突的遠端會發生 Wallerian 氏退化 (Wallerian degeneration)。軸突斷傷後，軸突一般會沿著舊有的途徑再生，並且重新支配原本的目標組織，所以預後良好。神經恢復功能所需時間的長短，則取決於再生軸突重新支配 (reinnervated) 原來目標組織的時間。

(3). 神經斷傷 (Neurotmesis)

「神經斷傷」係指除了軸突斷傷以外，也造成神經幹 (nerve trunk) 斷傷，導致軸突的連續性發生部分或全部的喪失。只要有神經內膜 (endoneurium)、神經束膜 (perineurium)、及神經外膜 (epineurium) 等發生損傷，都歸於此類別。神經的斷離也是神經斷傷的一種。神經斷傷發生後，必需經由手術修復，而且神經功能恢復的預後一般不佳。

2.1.1.2 Sunderland 分類法

Sunderland 根據神經幹不同組織的病理解剖情況，加以分類。他將神經損傷分為五個階段^[26,33-34]：

第一型：相當於 Seddon 之神經失用 (neurapraxia)。

第二型：相當於 Seddon 之軸突斷傷 (axonotmesis)。

第三型：相當於 Seddon 之神經斷傷 (Neurotmesis)，軸突連續性及神經內膜喪失，但是神經束膜仍然完整。

第四型：相當於 Seddon 之神經斷傷，軸突連續性、神經內膜、神經束膜喪失，但神經外膜仍完整。

第五型：相當於 Seddon 之神經斷傷，神經幹完全斷離，軸突連續性、神經內膜、神經束膜、神經外膜均喪失。

2.1.2 周邊神經損傷的修補技術

現今神經斷傷後有以下五種修補技術^[35]：斷端縫合術 (end-to-end suturing techniques)、組織纖維黏合法 (Tissue fibrin adhesive techniques)、雷射神經癒合術 (Laser nerve repair techniques)、神經移植手術 (Nerve grafting operation)、神經導管接合術 (Nerve bridging techniques) 等。以下分別論述。

2.1.2.1 斷端縫合術 (end-to-end suturing techniques)

「斷端縫合術」是將斷裂神經的兩個斷端拉近對齊後，進行外科手術以縫線加以縫合。根據縫合位置的不同，一般可以分為三種：神經外膜縫合法 (Epineurial repair)、神經纖維束縫合法 (Group fascicular

repair)、神經束膜縫合法 (Perineurial repair) 等。「神經外膜縫合法」是目前最常採用的神經修復法，但是因為縫合點是在神經外膜，所以神經束未必能完全緊密接合，可能會影響到神經功能的恢復^[36-37]。「神經纖維束縫合法」，係將兩斷端之神經外膜剝離，再以縫線將兩端相對應的神經束自神經束膜處縫合。此法能使神經束正確接合，有助於神經功能的恢復；但因其手術過程複雜，較易引起血管受損及術後水腫情形。「神經束膜縫合法」，係將受損的神經束加以分離，將神經束膜進行不連續縫合。因為此術複雜且耗時，較容易產生疤痕組織，可能妨礙神經的生長，所以一般僅應用在單一且功能特殊的神經束上^[38]。

2.1.2.2 組織纖維黏合法 (Tissue fibrin adhesive techniques)

「組織黏著劑黏合法」，係將神經的兩個斷面加以修剪整齊並接合在一起，再從遠離斷面的兩端神經外膜進行暫時性的縫合，使兩斷面不致脫離，然後用纖維蛋白膠 (fibrin glue) 將神經的接合面加以包覆黏合。這個方法因為沒有直接在斷面進行縫合，所以可以減少縫合導致的手術傷害以及縫線造成的異物反應^[39-40]。

2.1.2.3 雷射神經癒合術 (Laser nerve repair techniques)

「雷射神經癒合術」，是一種使用雷射光束來接合神經斷面的技術。採用低能量雷射光束時，是以血液來作為黏著膠，來把神經斷面接合。此種低能量雷射法，比較適合用於較細的神經上。採用高能量雷射光束時，是將兩斷端的神經外膜進行燒灼性接合，比較適合用於較粗的神經上。雖然雷射神經癒合術有避免縫線造成不良異物反應的優點，但相對地也具有雷射光束可能對神經纖維造成熱傷害的缺點^[41-42]。

2.1.2.4 神經移植手術 (Nerve grafting operation)

「神經移植手術」主要是採用自體神經移植 (autograft) 的方法，也就是切下自體的非損傷神經片段，然後移植到斷損神經的缺口處的技術。最常被用來移植的神經是腓腸神經 (sural nerve)，因為它所含的神經束包括單一及多重神經束，分支也少，而且可取用的長度比較大。此

法比較適合用於較長的神經缺損。近年來外科手術的進步，已經使移植成功率大為提升，但是取得移植來源神經的過程，仍可能造成該處的功能損傷^[37]。

2.1.2.5 神經導管接合術 (Nerve bridging techniques)

「神經導管接合術」，是將人造的導管以手術縫合於神經的兩斷端之間，提供再生神經生長的支持介面。此法比較適合用於較長的神經缺損。神經導管接合術有諸多優點：

1. 傷處周圍增生的結締組織很容易形成神經瘤 (neuroma)，可能會壓迫到再生的神經，而妨礙神經生長。神經導管可以防止周圍增生的結締組織迫近壓迫再生神經，使其不致於阻斷軸突的生長^[43]。

2. 神經導管能提供神經軸突生長的支持介面，並使生長所需的相關因子保留於內，不致太快流失^[44]。

3. 由於神經導管是人工製作，所以可以調控其組成與特性，亦可於其內加入藥物，對神經生長提供了良好的研究工具^[45]。

2.2 神經與中醫

2.2.1 神經系統的中醫觀點

2.2.1.1 神經的中西醫學發展史

人類對神經的最早記錄，一般咸信是由生理學和病理學創始人埃及醫師Erasist Ratus (約西元前310~前250年) 所描述的，他說：「那是一種單一的、固體的束狀物，能使人體產生自主運動。若將其切斷，則運動便無法完成」。與其同時代有解剖學之父之稱的著名醫師Herophilus (西元前335~前260年左右)，是第一位對腦和脊髓解剖進行系統研究的醫學家，他描述並命名了神經，「神經」此名詞就是藉由他採用的希臘文 $\nu \epsilon \rho \omicron \upsilon$ (nerve) 一詞而確定下來。他發現了神經通路，觀察到神經聯繫著大腦及脊髓，知道神經能將感覺傳導至中樞系統，並司管運動，並提出了腦是人類智慧所在之處的觀點^[46]。

西元1582年，正當中國的明朝末年時，一位來自義大利的著名天主教傳教士兼科學家利瑪竇（Matteo Ricci, 1552~1610年）來到中國，於1595年在江西南昌著成最早向中國介紹西方生理學內容的『西國記法』一書（利瑪竇詮著，朱鼎瀚添定），論述記憶與腦的關係：「記含有所，在腦囊；蓋顱凶後，枕骨下，為記含之室」^[47]。1623年，另一位義大利傳教士艾儒略神父（Julio Aleni, 1582~1649年, 1613年來華）所著『性學痠述』一書，對神經系統進行解剖學論述：「脊骨生二十四雙之筋，十二雙帶動覺之德，於左自背而下至腰以至足，在右亦如之。蓋腦髓所生，動覺之細德，其從頭至足者，在各肢有本，所俱動覺之德也」。又云：「腦為五官之根源，由細筋管傳覺氣於五官，又由此細管復納五官所受物象而總知之，總知所處在腦中」^[48]。德國傳教士鄧玉函（Jean Terrenz, 1576~1630年, 1620年來華），於1643年，發表『泰西人身說概』一書。在該書中，已將「細筋」特指為「神經」了。書中云：「細筋是純分，其體合三者而成，乃皮與骨髓肉筋是也，其用為分佈覺動之力。夫筋不覺不動，全賴靈魂之氣，力以覺動之。凡有體有髓有皮之，有細筋」；「細筋中無空處，只有氣而無血，故為身體不能覺不能動者，因無氣則無力也」；「細筋都生於頭上，或從腦從髓而生」；「細筋為主知覺之司」。在解釋視覺原理時寫道：「由人腦從頸體生二細筋上合為一，分為二枝到雙眼」^[46]。由此可知，「細筋」是西醫傳入中國初始對神經的翻譯專用名詞。「神經」一詞為中國採用應在1904~1909年間，估計首先出現在留日學者所撰寫的專業教科書中。在1909年張錫純的『醫學衷中參西錄』書中，已採用日本將「nerve」翻譯成「神經」的辭彙了^[49]。

神經系統是近代經由西方解剖學而建立的，在中國古代自然沒有神經系統的概念。然而，不論古今，醫學的研究對象都是人，人體的各種生理功能從古至今一直都是醫學所關注的對象，只是在不同年代闡述的理論與方法不同罷了。傳統醫學對人體神經系統功能的觀點，主要描述於中醫生理學中，其主要內容則涵蓋於腦髓、臟腑、經絡的範疇上。

2.2.1.2 腦髓與神經的關係

『內經·靈樞』曰：「人始生，先成精，精成而腦髓生」。又云：「腦為髓之海，……眾神也」。唐代孫思邈也說：「頭者，人之元首，人神所注，三百六十五絡，皆上歸於頭」。明代李時珍指出：「腦為元神之府」。清朝王清任言：「靈機記性在腦」。清代汪昂於『本草備要』一書中有云：「人之記憶，皆在腦中」。由此可知，從黃帝內經成書時代到清朝歷代醫家，都認為腦為人身的統帥，總統全身一切神志的活動。腦可藉由經絡聯繫人的五臟六腑，並經由精、氣、血、津液的作用，來維持人體的生命活動，也是人類精神心理活動的主宰。由現代醫學觀之，人體的中樞神經系統包括腦與脊髓兩部份，控制人的意志與周身之活動，而中醫所言之「腦髓」已涵蓋中樞神經系統的主要功能^[50]。

2.2.1.3 臟腑與神經的關係

中醫的許多臟腑功能，都與神經系統有密切相關。以脾論之，『素問·靈蘭秘典篇』云：「脾胃者，倉廩之官，五味出焉」；『靈樞·本神篇』云：「心有所憶，謂之意」。在現代醫學觀點，中醫脾臟的功能，與嗅覺、味覺、學習、消化系統有關，相當於大腦顳葉前部皮質、海馬、下視丘、自主神經系統的功能^[51]。另有研究顯示，發生中醫「脾虛證」時，自主神經系統的功能會發生紊亂。主要表現為：(1). 交感神經功能偏低，副交感神經功能偏亢；(2). 交感與副交感神經的應激能力低下^[52]。若將脾虛證進行分型來研究脾與神經系統的關係，發現脾虛夾寒型大腦皮質抑制較強，副交感神經興奮佔優勢；而脾虛夾熱型大腦皮質興奮較強，交感神經興奮佔優勢^[53]。中醫臟腑的功能常以陰陽虛實來加以分類，研究顯示，臟腑功能呈現陽虛者CGMP增加，CAMP/CGMP下降；而陰虛者CAMP上升，CAMP/CGMP比值升高^[54,55]。CAMP/CGMP是神經介質、激素、免疫活性物質的中間產物，可見臟腑功能的運作與神經系統有其相關性存在。

以心論之，『素問·宣明五氣篇』：「心藏神」；『素問·靈蘭秘典篇』：「心者，君主之官，神明出焉」。在現代醫學觀點，中醫心臟的功能，

類似於大腦皮質的精神、意識、思維活動，以及腦幹的上行性網狀賦活系統 (ascending reticular activity system, ARAS) 的清醒功能。以肝論之，『素問·靈蘭秘典篇』云：「肝者，將軍之官，謀略出焉」；『素問·六節臟象篇』云：「肝者，罷極之本，魂之處也」；『靈樞·本神篇』云：「隨神往來謂之魂」。在現代醫學觀點，中醫肝臟的功能，類似於隨意性、意識性的大腦皮質錐體路徑。以肺論之，『素問·靈蘭秘典篇』云：「肺者，相傳之官，治節出焉」；『素問·六節臟象篇』云：「肺者，氣之本，魄之處也」；『靈樞·本神篇』云：「並精出入謂之魄」。在現代醫學觀點，中醫肺臟的功能，類似於反射性、下意識性的皮質下錐體外路徑，以及感覺系統及小腦系統。以腎論之，『素問·靈蘭秘典篇』云：「腎者，作強之官，技巧出焉」；『素問·六節臟象篇』云：「腎者，主蛰，封藏之本，精之處也」；『靈樞·本神篇』云：「意之所存，謂之志」。在現代醫學觀點，中醫腎臟的功能，類似於記憶、動機、情緒的表現，與腦下垂體 (pituitary gland)、下視丘 (hypothalamus)、邊緣系統 (limbic system) 有關^[51]。綜合上述可知，中醫的臟腑與現代醫學的神經系統功能，有極為密切的關係。

2.2.1.4 經絡與神經的關係

經絡與神經的關係，是近年來許多學者深感興趣的課題。目前，文獻上的經絡研究有多種發現，包括：經絡與周圍神經和血管相關、與神經節段相關、與神經體液調節功能相關、與中樞神經功能相關等，此外也有從生物電和物理場角度探討的。文獻上所提出的關於經絡的理論互有異同，簡述於下：

1. 經絡主要是中樞神經系統的功能表現：此理論係由蔣大宗首先提出，他認為經絡的作用存在於中樞神經系統，經絡路線實際上是在大腦皮層或白質中的聯繫網路在軀體上的映射。經絡路線並沒有物理上的實質存在，經絡的現象乃是軀體上的刺激及其引起的各種反應，這種現象是經由上行與下行的神經在大腦活動而產生的結果^[56]。另有學者認為，經絡系統並不是人體的特殊解剖結構或系統，只不過是大腦皮質中的循行性立體反射系統的功能表現。大腦皮質某部位發生神經興奮後，其反

應於體表的投射，即形成了中醫所言「循經感傳」的感覺^[57]。以上的看法皆認為經絡並無實質的存在；然而，另有學者抱持不同看法，認為肥大細胞（mast cells）可能是經絡的物質基礎。針灸會使組織中的肥大細胞受到刺激或損傷，而釋放出活性物質。這些物質具有改變毛細血管通透性、改變細胞膜電位、擴張小血管、收縮平滑肌等作用，從而激發了局部的經絡感傳現象。實驗研究也發現穴位的肥大細胞數目明顯高於其周邊，而且結締組織中的肥大細胞與穴位的低電阻特性具有密切的相關性^[58]。另有研究顯示，刺激脾經的陽陵泉穴，會在大腦的海馬迴處出現最強的反應成像；刺激腎經的太谿穴，則會在大腦的基底節出現最強的反應成像。由此可知，中樞神經系統與經絡穴位的功能密切相關^[59]。

2. 經絡具有生物能量場的表現：支持本假說的學者認為，經絡與穴位具有電場、磁場、紅外線輻射、次聲波、微波等能量場的表現。生物體不僅是由細胞和分子所構成的物質系統，而且是不斷發生著化學和電磁振盪的資訊系統。經穴，是神經組織能量場存在的處所。神經組織的能量間接地投射在人體的表面，便形成了經絡。經絡是一種聚合的能量場形式，在體內並沒有可見的解剖結構，它只是神經能量的投影點^[57]。關於生物能量場，1973年，Davydov首先運用半經典的量子力學方法，建立非線性方程組，來描述 α -螺旋蛋白分子結合的生物場孤立波運動模式^[60]。龐小峰等人對Davydov的理論加以改進，發表了與實驗結果較為符合的Pang's模型，以非線性的Schrodinger方程式描述生物能量場的動力學方程式^[61]。這些物理方程式已能對經絡的生物能量場進行科學性的量測與計算，而經絡能量場的傳輸過程，蛋白質被認為是最佳的能量傳輸載體。關於這種傳輸能量的蛋白質，有學者認為，在人體內能作為經絡能量載體的蛋白質只有膠原蛋白。膠原蛋白分子鏈上存在有波速為0~15.5 m/s的孤立波，以對稱孤立波和非對稱孤立波兩種形式行進，這種膠原分子鏈上的孤立波運動可能就是針刺時經絡能量轉移的形式^[62]。

3. 循經感傳與神經系統功能相關：研究顯示，人體生理上所感覺到的循經感傳的路線，與中醫理論上的經絡路線基本上是一致的。感傳的

速度一般在10~20 cm/s，具有快傳與慢傳之分，且有間歇現象。溫度和壓力可以影響循經感傳，阻滯傳導的臨界溫度為 $21.16\pm 0.4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，阻滯傳導的壓力一般在每 $500\sim 1000\text{ g/cm}^2$ 左右^[57]。實驗顯示，機械壓迫、注射液體、局部降溫可以阻斷循經感傳^[63]。循經感傳屬於軀體感覺的範疇，自然與中樞及周邊神經系統皆有密切關係。然而，循經感傳和循經小分子物質的移動速度在每秒幾毫米到幾釐米左右，而人體神經纖維的傳導速度一般為每秒數米至百餘米左右，血管內血液循行的速度則是每秒幾十釐米左右，而體液的傳導速度是以小時與天數計的；所以，從經絡的傳導速度來看，經絡並不是單純的神經傳導或血液、淋巴液的傳導。而且，能阻礙循經感傳的溫度和壓力因素並不會影響神經的正常傳導，這顯示經絡的感傳不只受到神經系統影響，還同時受到許多其他機轉的影響^[64]。

4. 鈣離子與經絡功能有關：有研究顯示，人體經絡穴位可能是以結締組織為基礎，連帶其中的血管、神經叢和淋巴管等交織而成的複雜體系，而且鈣離子可能在信號傳遞上扮演重要角色^[65]。鈣離子與經絡關係可大致歸結為：(1). 穴位和經絡線處的鈣離子含量，遠比非穴位和經絡線處高許多^[65]；(2). 臟腑疾病會影響患者臟腑經絡線上鈣離子濃度^[65]；(3). 針刺會使該經絡及穴位的鈣離子濃度明顯升高，其旁開部位的鈣離子濃度降低^[66]；(4). 鈣離子震盪是經絡調頻的信號^[67]。

5. 經絡與神經傳遞物質有關：經絡與神經系統的關係，表現在循經感傳上，而神經傳遞物質扮演了關鍵性的作用^[68]。有學者以電生理方法研究大鼠足太陽膀胱經穴位刺激，對相鄰節段或者遠處的穴位支配神經的影響，證實了模擬穴位刺激可引起循經感傳的資訊傳遞，而substance P (SP)、calcitonin gene related peptide (CGRP)、neuropeptide A (NKA)等神經傳遞物質藉由與相應的受體結合，來引導周邊神經進行跨節段的資訊傳遞^[69]。：經絡線上的許多神經傳遞物質，可刺激支配該處的傳入神經末梢，通過軸突反射再釋放神經傳遞物質，誘發肥大細胞釋放組織胺，刺激相鄰的神經末梢。如此一連串的反應，就可形成在周邊神經末梢間跨

節段的衝動傳遞，造成循經感傳的生理感覺^[70-73]。

2.2.2 周邊神經損傷的中醫觀點

2.2.2.1 周邊神經損傷的中醫分型

周邊神經系統損傷，就其症狀與醫學意涵而言，以中醫辨證可分為虛實兩證，即痺證和痿證兩大類^[74]。

1. 痺證：創傷後神經受到牽拉、擠壓，或受到骨折刺傷或血腫壓迫所致。『素問·痺論篇』云：「痺，或痛，或不痛，或不仁……，其不痛、不仁者，榮衛之行澀，經絡時疏，故不通，皮膚不營，故為不仁」。痺者，痺塞不通之意。經脈痺阻不通，氣血運行不暢，筋骨失於榮養，則見肢體感覺喪失、感覺異常、肌肉無力、肌肉失用等症狀。這些症狀與周邊神經損傷初期，神經功能受損致使感覺及運動功能失常的症狀，可謂頗為相符。

2. 痿證：『素問·太陰陽明論』：「四肢皆稟氣於胃，而不得至經，必因於脾，乃得稟也。今脾病不能為胃行其津液，四肢不得稟水穀氣，氣日以衰，脈道不利，筋骨肌肉皆無氣以生，故不用焉」。中醫的痿症，係指經脈長期痺阻不通，筋脈肌肉失養，逐漸出現肢體痿軟無力，甚至廢弱失用的情形。這些症狀與嚴重周邊神經損傷或神經損傷已久，導致肢體癱瘓失用的症狀，可謂頗為相符。

2.2.2.2 周邊神經損傷的中醫治療

2.2.2.2.1 中藥治療

有研究顯示，將大鼠坐骨神經以鉗子夾傷，以中藥「補陽還五湯」灌服作為實驗組，治療一定時間後，通過電生理測定動作電位潛伏期、神經傳導速度，並以組織學方法計數神經軸突、測量腓腸肌細胞直徑、小腿三頭肌濕重等指標，發現中藥療效統計上優於維生素B組^[75]。用足

印測定法計算坐骨神經功能指數（SFI），也證明「補陽還五湯」對大鼠坐骨神經切斷接合手術後的神經功能恢復，優於西藥維生素B組的療效^[76]。將單味黃芪、人參、當歸、丹參、川芎等中藥製劑經小白鼠灌服，發現這些藥物能提高神經元的活性及其受損傷後的再生能力，減輕神經的水腫、炎症、出血、變性和脫髓鞘現象^[77]。一般而言，黃芪是比較公認的對周邊神經損傷有肯定療效的中藥，與其富含微量元素硒、提高機體的免疫功能、增加血漿cAMP含量、延長二倍體細胞的生長週期、促進蛋白質合成，從而增強修復能力有關^[78]。我們的實驗係採用中藥葛根進行神經再生的評估，但在臨床及實驗的文獻上，目前並未查到有葛根能促進神經再生的紀錄。

2.2.2.2.2 針灸治療

有研究顯示，應用電生理學的方法，動態觀察針刺對坐骨神經損傷大鼠癱肢的功能活動、誘發電位的影響，結果表明，通過針刺環跳、足三里等穴位能明顯減輕坐骨神經損傷後的時間-強度曲線右移程度，能減輕誘發電位元振幅的降低程度，並能促進組織興奮性和振幅的恢復，因此推斷電針能形成穩定電場以促進損傷神經的再生^[79]。又，經由動物實驗，通過肌電圖、組織切片和電子顯微鏡觀察，顯示針刺能促進大鼠損傷神經的修復^[80]。又，藉由大鼠坐骨神經損傷模型，用HRP追蹤觀察的方法，發現電針治療組大鼠的L4、L5脊髓前角和L4、L5脊神經節內的標記細胞數目比西藥維生素組多，顯示神經損傷後用電針治療可以促進周圍神經與中樞神經連續性的建立，從而促進神經再生及功能恢復^[81]。然而，於本實驗室之前的實驗顯示，電針對截斷坐骨神經大鼠之神經再生，反而有統計上顯著的抑制作用^[82]。

2.3 製備神經導管的常用生醫材料

2.3.1 生醫材料的種類

製造神經導管的材料，基本上可分為天然生物材料（biological materials）和人工合成材料（synthetic materials）兩大類。「天然生物材

料」又可依取得來源，概分為生物結締組織材料（connective tissue materials）和生物來源材料。「生物結締組織材料」，係指直接將生物體的結締組織依所需擷取下來再移植他處使用的方法，常用的結締組織包括：靜脈、羊膜、骨骼肌等。「生物來源材料」，係指自生物體純化煉出來的材料，常用的包括：膠原蛋白（collagen）、明膠（gelatin）、幾丁質（chitin）與幾丁聚醣（chitosan）等。「人工合成材料」，係指非生物來源的材料，依照在生物體內能否自然分解，可概分為可生物降解性合成材料（degradable synthetic materials）和非生物降解性合成材料（non-degradable synthetic materials）兩種。「可生物降解性合成材料」，包括：聚乳酸（polylactin acid，PLA）、聚甘醇酸（polyglycolic acid，PGA）、聚己內酯（polycaprolactone，PCL）、聚磷腈（polyphosphazenes）等。「非生物降解性合成材料」，包括：矽膠（silicon）、金屬、陶瓷等。

2.3.2 神經導管材料的選擇條件

適合用來製造神經導管的理想生醫材料，最好能具備以下特點：

1. 要有生物可降解性：若材料能在生物體內自然降解，便能免除二次手術移除導管的過程，並避免材料長時間刺激產生的慢性組織反應^[5]。
2. 適當的降解速率：材料必須緩慢降解，才能夠維持神經再生所需的穩定支持結構。但降解過慢，導管反而會壓迫到神經，妨礙其生長^[83]。
3. 無生物毒性：材料若具有生物毒性，可能會妨礙神經的生長。
4. 適當機械強度：材料具有良好機械強度，才能提供神經生長的環境，對再生神經提供保護作用。但如果材質過硬過脆，容易因生物運動而在生物體內斷裂，也不適合。
5. 適當的孔隙率（porosity）：材料具有適當的孔隙率，可以提供神經及血管生長的空間，並有利於養分的供應及代謝廢物的運離。但如果孔隙太大，可能會使藥物流失。
6. 良好生物相容性（biocompatibility）：如果材質的生物相容性良好，就不會與周圍組織產生過度免疫反應，對神經再生較有利^[83]。
7. 適當的通透性（permeability）：導管必須能讓養分和其他必須分子能以擴散方式進入（diffusional transport），同時又必須能阻止外部的細

胞進入導管^[83]。

8. 能促進血管快速生成：材料必須能夠提供快速血管新生（revascularized）的良好環境，才能克服養分運輸不足的問題^[83]。
9. 具備手術可行性（surgically practicable）：材料的種類及特質，必須要以手術將導管植入才行^[83]。
10. 具有細胞附著性（cell attachment）和細胞散播性（cell spreading）：材料的表面必須能讓細胞附著與散播，才有利神經生長^[70]。

2.3.3 神經導管材料各論

基於上一節的選擇條件，一般最常用來作為神經導管的材料，是生物來源材料。以下就膠原蛋白、明膠、幾丁質與幾丁聚醣等三大類，加以敘述。

2.3.3.1 膠原蛋白（collagen）

膠原蛋白是生物體內的一種非常重要的蛋白質，生物體內約有20~25%的蛋白質是膠原蛋白，主要存在於結締組織中。它具有長的纖維狀結構，有很強的伸張能力，是軟骨、硬骨、韌帶、肌腱、牙齒的主要成份。膠原蛋白還是細胞外基質（extracellular matrix）的主要組成成分，它能使皮膚和血管壁保持彈性。膠原蛋白也以結晶的形式存在於眼睛的角膜。

在空間結構上，膠原蛋白顯示出特殊的三股螺旋（triple helix）纏繞的結構，三條相互獨立的膠原蛋白肽鏈，藉由甘氨酸（glycine）之間形成的氫鍵，來維繫三股螺旋相互纏繞的結構。這種特殊的三股螺旋結構造成了它的機械強度。

膠原蛋白已經被廣泛使用在神經修復上^[83-85]。所以如此，與其相當符合神經導管材料所需條件有關。膠原蛋白的結構平滑，而且具有良好的通透性，能夠當做基質（collagen matrices），讓神經細胞於上生長^[86,87]。以膠原蛋白基質培養血管內皮細胞的實驗顯示，膠原蛋白的結構具有促進血管新生（angiogenetic）的能力^[88]。而且，膠原蛋白是生物可降解性

的，藉由交聯度的控制，膠原蛋白在生物體內的結構穩定度和降解率，都已經能調控到期望的程度^[89-91]。此外，膠原蛋白的特殊黏附性（adhesiveness）能讓多種細胞於其上存活並且增殖^[92]。由於具有多種良好特質，膠原蛋白已成為神經修復的熱門生醫材料。

近年來許多文獻顯示，以膠原蛋白神經導管能成功促使 20 mm 的截斷大鼠坐骨神經溝再生過去^[93-97]。有學者以聚甘醇酸-膠原蛋白神經導管（polyglycolic acid-collagen tube）內填神經營養因子（neurotrophic factors），手術縫合於成貓坐骨神經 25 mm 的斷面上，獲得神經成功再生結果^[98]。另有學者以兩千條膠原蛋白絲（collagen filaments）編成 31 mm 的神經導管，植入截斷的大鼠坐骨神經溝中，在術後 12 週得到神經成功再生的結果^[99]。又，有學者以聚甘醇酸-膠原蛋白神經導管，內填以 laminin 包覆的膠原蛋白纖維，手術植入狗的腓骨神經（peroneal nerve）80 mm 的斷面，結果在術後 12 個月，得到神經成功再生的結果^[100]。由以上文獻可知，膠原蛋白確為製備神經導管的良好生醫材料。

2.3.3.2 明膠（Gelatin）

明膠，是一種半透明、無色或淺黃色的膠狀固體聚合物，主要成份為蛋白質。明膠是將膠原蛋白進行不可逆的部分水解產生的，膠原蛋白可以從動物的骨頭或結締組織裡，藉由酸或鹼萃取提煉出來^[101]。在商業用途上，明膠是肉品和皮革業的副產品，通常是從豬皮、豬肉、牛骨提煉出來。明膠被廣泛用於食品業、製藥業、化妝品業、攝影工業上。它是一種天然的乳化劑，也是食品添加劑。

明膠具有在加熱後融化成液狀，冷卻後又恢復成固態的特質。將明膠與水混合後，可以形成高黏度的半固態膠體（semi-solid gel），因此方便於依實驗用途塑形上。明膠會溶解在強酸中，但是它的化學性質相當穩定，在 10~15 天內都不會改變，因此常被用來作為包覆（coating）的材料。明膠的性質受溫度和濃度的影響很大，溫度和濃度愈高，黏度

就愈大。明膠的物理及化學性質，隨著以酸或鹼液萃取的方法不同、熱變性的程度、電解質的含量的不同，而有不同的表現^[101-104]。藉由在製造過程中對等電點（isoelectric point）的調整，我們可以製造出負電性的酸性明膠，或正電性的鹼性明膠，以符合不同用途所需。帶電性的明膠可以扮演載體（carrier）的角色，來攜帶具有相反電荷的分子，使用在藥物的控制釋放上^[105,106]。

明膠因為具有類似膠原蛋白的性質，所以也是良好的生醫材料，但是用在製造人造神經導管上的文獻，遠較膠原蛋白稀少甚多。明膠具有良好的生物可降解性、生物相容性，而且不具毒性^[26-27, 107-111]。將明膠使用於生物體上，已被證實是相當安全的^[112]。本實驗室之前的研究顯示，以綠梔子素交聯明膠神經導管，手術移植於大鼠截斷 10 mm 之坐骨神經斷面，能成功促進神經再生^[26]。本研究則延續之前的實驗，繼續採用明膠為神經導管的材料，進行神經再生的評估。

2.3.3.3 甲殼素（chitin）與幾丁聚糖（chitosan）

幾丁質（chitin）的分子式為 $(C_8H_{13}O_5)_n$ ，一般常被稱為「甲殼素」，是自然界中的一種半透明的、材質堅硬的材料。甲殼素是真菌的細胞壁和節肢動物的外骨骼裡的主要組成成份，其他的動物多少也含有此物質。它的結構呈長鏈狀，是約由 8000 多個 β 葡萄糖（beta-glucose）聚合而成的多醣類。它是由兩個 N-乙醯葡萄糖多醣體（N-Acetylglucosamine）為單位，藉由 β -1,4 鍵結模式（beta-1,4 linkage）形成的龐大聚合物。由於這種特殊的結構，使得甲殼素具有良好的機械強度。

甲殼素在產業上有多種不同用途。甲殼素被用於水質淨化、食品添加劑、藥品、染料、紡織品、黏合劑、造紙業上。在醫學上，甲殼素可以用來製造可降解的外科縫線，而且甲殼素有促進傷口癒合的作用，可以作為癒合劑使用。

將甲殼素進行N-去乙酰化 (N-deacetylation) 處理後，即產生幾丁聚糖 (chitosan)。幾丁聚糖帶有正電荷，可在酸性及中性溶液中溶解，而且容易吸附在帶有負電荷性質的黏膜表面上。而且，它具有良好的耐熱性、生物相容性 (biocompatibility)、生物可降解性 (biodegradation)、傷口癒合作用、抗菌作用。基於上述特質，幾丁聚糖可以用來作為一種載體 (carrier)，來運輸具有極性的藥物到上皮表面，是一種良好的生醫材料^[113-117]。

可以用來做人造神經導管的並非幾丁質，而是幾丁聚糖，因為它不像幾丁質那麼堅硬，所以具有可塑性。然而，幾丁聚糖的低機械強度，卻限制了它的應用範圍^[118-122]。為了解決這個問題，幾丁聚糖神經導管必須經過皂化處理 (soaking method)，來提升其機械強度^[123-125]。120°C 的高溫物理處理也能減少幾丁聚糖在水中的溶解度，來避免管壁腫脹而減少內徑^[126-128]。另外，將其製備成三角形的幾丁聚糖神經導管，對神經再生較為有利^[129,130]。

有學者以hydroxy apatite (Hap) 皂化處理過的幾丁聚糖神經導管植入截斷坐骨神經15 mm的斷面裡，獲得神經成功再生的結果^[129]。另有學者以Hap皂化處理過的幾丁聚糖神經導管，吸收laminin peptides後，再植入截斷坐骨神經15 mm的斷面裡，亦獲得良好神經再生結果^[131]。另有學者將皂化處理及熱處理過的三角形的幾丁聚糖神經導管，植入截斷坐骨神經15 mm的斷面裡，也獲得良好神經再生結果^[130]。這些研究顯示，幾丁聚糖是製備神經導管的良好生醫材料。

2.4 交聯與交聯劑

2.4.1 交聯的作用

可生物降解的生醫材料植入生物體內後，由於它是一種外來物質，會受到體內免疫系統的酵素攻擊而逐漸分解。如果神經導管材料降解的速度太快的話，就無法提供神經再生所需要的支持作用，導管內的藥物

也會流失過快，而失去促進神經生長的作用。因此，為了減緩導管被降解掉的速率，延長導管在生物體內存在的時間，我們必須將材料事先進行交聯(crosslinking)的處理程序。化學交聯法是藉由交聯劑(crosslinking agents)來完成的。交聯劑的主要功用包括：減緩材料的降解速率^[16-18]、延長藥物從材料釋出的時間^[19-21]、提升材料結構的機械強度^[22-23]、減輕免疫攻擊及酵素分解效應^[22-23]、使材料不會在水中溶解^[132]、增加材料對熱的穩定度^[132]等。有些交聯劑尚有降低發炎反應^[24]、促進神經生長的作用^[133-134]。

2.4.2 交聯的方法

交聯的方法主要有兩種：物理方法、化學方法。物理交聯方法，包括紫外線輻射法(UV-irradiation)、脫水加熱處理法(dehydrothermal treatment)等。化學交聯方法，就是使用交聯劑來和材料交聯的方法。化學交聯劑的作用機轉各不相同，有些能夠和材料分子發生化學反應產生鍵結，直接參與反應；有些則催化材料分子彼此產生化學鍵結，本身則不參與反應。不同的交聯劑，其與材料分子的作用點亦不相同。

2.4.3 化學交聯劑的種類

化學交聯劑可以概分為兩類：增長交聯劑(non-zero length crosslinkers)和等長交聯劑(zero-length crosslinkers)。「增長交聯劑」，能夠在兩個相鄰的蛋白質分子之間的自由的羧酸殘基(carboxylic acid residues)或胺基(amine groups)間形成鍵結，因而增強材料的機械強度。由於交聯劑本身會插入材料分子之間來形成鍵結，使得材料交聯後分子長度增加，所以稱為增長交聯劑。這類的交聯劑，包括：醛類(aldehydes)、多環氧類(polyepoxides)、異氰酸鹽(isocyanates)等。醛類常用的，有：甲醛(formaldehyde)、戊醛(glutaraldehyde, GTA)、甘油醛(glyceraldehyde)等^[111]。異氰酸鹽(isocyanates)則以hexamethylene diisocyanate (HMDI)為代表。

相反地，「等長交聯劑」本身並不會插入材料分子之間，它的作用

機轉是藉由催化材料蛋白質分子上的羧酸殘基，使其直接與相鄰蛋白質分子的胺基發生反應形成鍵結。由於交聯劑只是行催化作用，本身不會參與反應，所以比較不會影響材料本身的性質，對實驗工作者控制參數而言比較理想。這類交聯劑包括：醯基疊氮化物 (acyl azides, AA)、水溶性碳二醯胺類 (water-soluble carbodiimides, WSC) 等^[111,135]。WSC交聯劑最常被使用的，是N-(3-dimethylaminopropyl)-N-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC)。但是以EDC交聯的材料機械強度並不理想，在水溶液中容易溶解，所以一般必需配合以N-hydroxysuccinimide (NHS) 處理，來增加其機械強度^[136]。

2.4.4 交聯方法的比較

有些學者認為，物理交聯方法比較欠缺效率，而且較不易控制交聯度^[111]。然而，也有研究顯示，物理交聯法的成效比化學交聯法來的好，他們使用分別以紫外線照射 (ultraviolet, UV)、熱處理 (heating)、GTA三種方法交聯膠原蛋白神經管，然後植入截斷15 mm的大鼠坐骨神經斷面裡，評估神經再生得到UV組 > 熱處理組 > GTA組的明顯差異結果，而且UV組幾乎沒有發炎反應產生，因而推薦UV處理是神經導管的理想交聯方法^[137]。

化學交聯劑處理方法，可分增長交聯劑與等長交聯劑個別論述。在「增長交聯劑」中，以GTA交聯劑處理的生醫材料，因為有極為良好的機械強度及抗酵素分解能力，所以最常被採用，但其具有細胞毒性，可能會使組織纖維化而變硬^[18,138]。多環氧類也具有細胞毒性^[139]。同為增長交聯劑，多環氧類的毒性較GTA為低，但交聯度、機械強度、抗酵素分解能力均不及GTA理想^[140,141]。異氰酸鹽類的HMDI的生物毒性遠低於GTA^[142]，以HMDI交聯的細胞外蛋白質基質具有良好的黏彈性 (viscoelastic) 與韌性，性質類似於天然的彈性蛋白 (elastin)，所以可以用來作為修補血管壁的生醫材料^[143]。

在「等長交聯劑」中，EDC具有良好生物相容性^[144]，而且只有低生

物毒性^[145]。以EDC交聯膠原蛋白的抗酵素分解能力比GTA好，但機械強度則遠遠不及GTA^[136]。有學者以冷凍乾燥處理的幾丁聚糖支架進行實驗，對GTA、EDC、三聚磷酸鹽（tripolyphosphate, TPP）三種交聯劑做比較，發現GTA交聯處理的材料機械強度、張力、韌性最好，而且這些性質隨GTA量增加而增加。EDC和TPP交聯處理的材料機械強度、張力、韌性遠不及GTA良好，而且機械強度並沒有隨著交聯劑劑量的增加而增加^[146]。然而，另有學者比較以EDC及GTA交聯膠原蛋白-玻尿酸支架（collagen-hyaluronic acid scaffold）的結果，發現以EDA組對膠原蛋白酶（collagenase）的抵抗力，遠比0.625%的GTA組好。而且以L929纖維母細胞（L929 fibroblastic cells）進行細胞毒性測試，發現EDC組並沒有明顯的細胞毒性^[147]。另一種等長交聯劑是acyl azides（AA）。研究顯示，以GTA交聯的膠原蛋白材料之破碎能（fracture energy）為以AA交聯組的3.23倍，GTA組的張力強度（tensile strength）為AA組的1.72倍，可知AA交聯材料的機械強度遠不及GTA良好^[148]。

2.5 藥物控制釋放在神經導管上的應用

2.5.1 控制釋放的基本概念

控制釋放（controlled release, CR），也稱為持續釋放（sustained release, SR）。根據國際控制釋放協會（The Controlled Release Society, CRS）的定義，控制釋放是經由注射或非注射的途徑，藉由運用某些工具，來將藥物在生物體內以可預測的速率釋放出來的技術^[149]。一個控制釋放系統，通常會把一種生物活性物質（bioactive agent）導入一個載體（carrier）內，然後再植入生物體內。當載體在生物體內逐漸分解，生物活性物質就會持續釋放出來。釋放的速率，會受到載體的性質和生物體內的環境因子所影響。藥物從載體內釋放出來的機轉，主要有三種：(1) 擴散機轉（Diffusion controlled），藉由擴散作用通過膜（membranes）和基質（matrices）；(2) 化學機轉（Chemically controlled），利用腐蝕作用（erosion）和pendent chain釋出；(3) 溶劑活化機轉（Solvent activated），利用滲透壓（osmotic pressure）和腫脹性（swelling）來釋出^[150]。

神經導管在藥物控制釋放的應用原理，主要就是製造含有藥物的可降解生醫材料神經導管，將其植入生物體內的神經斷損處；導管會受到免疫系統的酵素攻擊而逐漸降解掉，其內所含的藥物也就隨之逐漸釋放出來。

2.5.2 葛根

由於本研究所採用的藥物是中藥葛根粉末，因此以下進行葛根對神經生長的相關文獻探討。

2.5.2.1 葛根簡介

葛根 (Radix Puerariae)，為豆科植物野葛 (Pueraria lobata (Willd) Ohwi) 的乾燥根。藤本，長約10 m，全株被覆黃褐色長硬毛，生於山坡草叢、路旁、樹林中較陰濕處。主要含有多種異黃酮類 (isoflavonoids) 成份，包括葛根素 (puerarin)、大豆甙元 (daidzein)、大豆甙 (daidzin)、葛根素-7-木糖甙 (puerarin-7-xyloside) 等。在藥理上，葛根能具有調節心臟功能、抗心肌缺氧、擴張血管、抗心律失常、降血壓、降血糖、降血脂、解熱、抑制血小板凝集等作用^[151]。

2.5.2.2 葛根的神經相關文獻探討

有一些人體臨床研究顯示葛根素對糖尿病引起的周邊神經病變有統計上顯著的療效^[152-154]。另有臨床研究顯示葛根素對神經性耳鳴具有顯著療效^[155]。在動物實驗方面，有學者研究葛根素對局灶性腦缺血-再灌流大鼠的影響，發現葛根素有抗神經細胞凋亡的作用，此作用與葛根素能抑制突觸內的鈣離子過量有關^[156]。又，葛根素能減少atrial natriuretic peptide及angiotensin II的釋出，調節自主神經系統功能，而改善兔的心力衰竭症狀^[157]。

實驗顯示，葛根的水萃取液有抗氧化作用 (antioxidant activity)^[158-161]、抗發炎作用 (Anti-inflammatory)^[162]、抗神經痛覺作用 (anti-nociceptive effects)^[162]。葛根富含的異黃酮素 (flavonoids) 具有

抗氧化作用，能夠保護mesencephalic dopamine neurones，抑制氧化引發的神經元凋亡（apoptosis）現象^[160]。葛根素對H₂O₂誘發的PC12神經細胞的凋亡，具有明顯抗凋亡的保護作用^[163]。葛根素能啟動癌細胞凋亡相關基因的表現，而顯著促進大腸癌HT-29細胞發生凋亡現象^[164]。葛根素對神經具有顯著保護作用，能對抗beta-amyloid、hydrogen peroxide、glutamate 誘發的毒性反應^[29]；此外，葛根素對1-methyl-4-phenylpyridinium（MPP⁺）誘發的PC12細胞的神經毒性，亦具有神經保護作用，其機轉與它能抑制粒線體失用（mitochondrial dysfunction）及caspase-3-like活化作用有關^[28]。綜上所述，可知葛根對神經具有一定的保護作用，但是否能促進神經再生，則未有文獻支持。在其他方面，葛根尚有抗焦慮作用（anti-anxiety）^[165,166]、抗憂鬱作用（antidepressant effect）^[167]、抗肝纖維化作用^[168]、降血膽固醇作用^[169]、改善心血管功能^[169-170]等作用，可能與神經系統亦有相關。



第三章 材料與方法

3.1 製備葛根濃縮粉末

3.1.1 目的

本研究的主要目的，是要觀察已在管壁中加入葛根的人造明膠神經導管，在植入大鼠坐骨神經 10 mm 斷面後，該導管對神經再生與功能恢復的影響性如何，是否具有促進或抑制作用。由於葛根生藥材的體積龐大，不可能加入管中，故需先予以加工，以符合實驗需求。而且中醫傳統用藥，均需先將藥材加以浸泡、煎煮、過濾，而後服用；因此本實驗的製藥方法，儘量採取類似傳統煎藥的科學程序進行，而不採用生藥材粉碎粉末或科學中藥粉末。本實驗步驟的目標，是欲將葛根生藥材製成濃縮乾燥粉末，俾於製備神經導管時使用。

3.1.2 主要材料

葛根 (*Radix Puerariae*) 生藥材，品系為豆科植物野葛 *Pueraria lobata* (willd.) Ohwi 的乾燥根。

3.1.3 製備方法

步驟 1：浸泡

秤取 100 g 葛根生藥材，置入 1000 ml 血清瓶中，加入 700 ml 逆滲透水。同法浸泡多瓶，然後放入 4 °C 冰箱，冷藏 24 小時。此步驟類同傳統煎藥法的藥材浸泡程序。

步驟 2：煎煮、過濾

藥材浸泡 24 小時後，把瓶蓋旋鬆，將浸有藥材的血清瓶置入快速高壓消毒器 (Autoclave, 購自 TOMIN medical equipment Co.) 中，以溫度 121°C 及壓力 1.2 kg/cm² 蒸煮 40 分鐘。蒸煮完成後，將瓶取出，以紗布三層過濾濾除藥渣，收集葛根粗萃取液於新瓶中，靜置直到溫度降至常

溫後，貯存於 4 °C 冰箱備用。此步驟類同傳統中藥煎藥法的藥材煎煮、過濾程序。

步驟 3：濃縮

經冷藏後，葛根粗萃取液已呈現固態凝膠狀，故欲進行濃縮前，需先置入烘箱中加熱，使其轉為液態。再將液態葛根粗萃取液置入減壓濃縮機(Rotary vacuum evaporator, 型號 EYELA, 購自日本 Tokyo Aikakikai Co.) 進行濃縮，每 500 ml 粗萃取液約濃縮 1.5 小時，濃縮至黏稠糊狀後，以血清瓶收集葛根糊，靜置直到溫度降至常溫後，貯存於 4 °C 冰箱備用。

步驟 4：冷凍乾燥

將固態凝膠狀的葛根糊取出，均勻攤布於盤上，置入 -20 °C 冰箱冷凍 1 小時後，再置入冷凍乾燥機（型號 WEST 4440）中進行冷凍乾燥。乾燥完成後，將葛根粉塊以研砵及杵磨細，即得葛根濃縮粉末。將粉末裝入乾淨血清瓶中，密封後，於常溫下貯存備用。

3.2 製備神經導管

3.2.1 目的

本實驗程序的目標，係欲以明膠為基本材料，並以戊二醛進行化學交聯，來製成具有生物降解性的人造神經導管。導管可分實驗組、對照組兩組，實驗組導管含有中藥葛根，對照組導管則不含葛根。

3.2.2 主要材料

1. 矽膠管

本實驗採用 Helix Medical Silicone Tube 矽膠管，內徑為 0.76 mm，外徑 1.65 mm，購自 Helix Medical, Inc (USA)。

2. 明膠 (gelatin)

為自豬皮萃取的 Type A、300 Bloom number 明膠，購自 Sigma Chemical Co, St Louis, MO (USA)。

3. 葛根濃縮粉末

為依 3.1 章節程序所自行製備者。

4. 戊二醛 (glutardialdehyde)

購自台灣默克股份有限公司。

3.2.3 製備方法

3.2.3.1 製備對照組神經導管

步驟 1：製備明膠水溶液

取 50 g 明膠粉末加入 455 ml 的逆滲透水，將溶液加熱至 60 °C，並以磁石攪拌使其完全均勻溶解，再降溫至 31~32 °C 備用。

步驟 2：以浸泡法 (dipping method) 製管

將打直的細鐵絲穿過矽膠管作為管模，將其浸泡於明膠水溶液中。第 1 次浸泡的時間為 5 分鐘，第 2~6 次浸泡時間為 1.5 分鐘，每次浸泡後於常溫下風乾 30 分鐘，使附著於矽膠管上的明膠乾燥成型。於第 6 次浸泡後，風乾時間增長為 1 小時，可得到白色、半透明的硬化成型的明膠管。

步驟 3：化學交聯

風乾 1 小時後，將明膠管於常溫下浸泡於 0.5 % 戊二醛交聯劑中 40 分鐘，以進行化學交聯^[25]。40 分鐘後，將交聯後的明膠管取出，於常溫下風乾 7 天。交聯後的明膠管呈金黃色，管壁平滑光潤。

步驟 4：加工

將已交聯的明膠管內的矽膠管及鐵絲抽除，選取管壁均勻、平直、光潤、無氣泡的部份，裁切 12 mm 短管共 10 個，在距離兩端各 1 mm 處各鑽兩孔，同側兩孔角度約成 90 度，一共四孔，以利神經導管接合手術縫線固定使用。加工完成，加以秤重，並經 γ -ray 滅菌後，以密封袋封存備用，即得對照組所需之明膠神經導管。

3.2.3.2 製備實驗組神經導管

步驟 1：製備葛根—明膠水溶液

取 50 g 明膠粉末及 5 g 葛根濃縮粉末，將兩者均勻混合後，加入 450 ml 的逆滲透水，將溶液加熱至 60 °C，並以磁石攪拌使其完全均勻溶解，再降溫至 31~32 °C 備用。

步驟 2：以浸泡法（dipping method）製管

將打直的細鐵絲穿過矽膠管作為管模，將其浸泡於葛根—明膠水溶液中。第 1 次浸泡的時間為 5 分鐘，第 2~6 次浸泡時間為 1.5 分鐘，每次浸泡後於常溫下風乾 30 分鐘，使附著於矽膠管上的葛根—明膠溶液乾燥成型。於第 6 次浸泡後，風乾時間增長為 1 小時，可得淡黃色、半透明的硬化成型葛根—明膠導管。

步驟 3：化學交聯

風乾 1 小時後，將葛根—明膠導管於常溫下浸泡於 0.5 % 戊二醛交聯劑中 40 分鐘，以進行化學交聯^[25]。40 分鐘後，將交聯後的葛根—明膠管取出，於常溫下風乾 7 天。交聯後的葛根—明膠管呈金黃色，管壁較明膠管略粗糙，色澤較暗。

步驟 4：加工

將已交聯的葛根—明膠管內的矽膠管及鐵絲抽除，選取管壁均勻、平直、光潤、無氣泡的部份，裁切 12 mm 短管共 10 個，在距離兩端各

1 mm 處各鑽兩孔，同側兩孔角度約成 90 度，一共四孔，以利神經導管接合手術縫線固定使用。加工完成，加以秤重，並經 γ -ray 滅菌後以密封袋封存備用，即得實驗組所需之葛根—明膠神經導管。

3.3 神經導管接合術

3.3.1 目的

本實驗神經導管接合術的目標，是要將人造神經導管以手術縫合於雌性大鼠右側坐骨神經的 10 mm 斷面上，再飼養八週，觀察神經再生以及神經導管降解情形。對照組大鼠 10 隻，植入明膠神經導管；實驗組大鼠 10 隻，植入葛根—明膠神經導管。

3.3.2 主要材料

1. 神經導管

為依 3.2 章節程序所自行製備者。明膠神經導管 10 個，葛根—明膠神經導管 10 個，長度 12 mm，外徑約 2.5 mm，內徑約 1.7 mm。

2. 實驗動物

採用的實驗動物為雌性 Sprague-Dawley (SD rat) 大白鼠，重量約為 221~287 gm，週齡為 8 週。實驗組及對照組各 10 隻，共 20 隻。所有大鼠購自台灣樂思科公司。植管手術後，所有大鼠皆委託中國醫藥大學動物中心代為飼養。飼養環境為中央空調房間，每一隻大鼠單獨飼養於一個籠子，溫度為 22 ± 3 °C，相對溼度為 55 ± 5 %，自由飲水，供給標準大鼠實驗飼料（福壽公司，台灣）加以餵養。

3. 9-0 Nylon 縫線

9-0 Nylon 縫線用於將斷損神經的兩端分別縫合於神經導管兩側上。購自日本 Mani 公司。

4. 4-0 Catgut chrom 縫線

用於縫合大鼠肌肉及皮膚。購自德國 B.Braun 公司。

5. 消毒劑

採用 Betadine Antiseptic Solution，用於實驗過程動物及器械的消毒。購自德國 Mundipharma 公司。

6. 麻醉劑

採用 AErrane 氣體麻醉劑，於手術過程將大鼠麻醉以減低其痛苦。將大鼠置於透明麻醉箱中，利用氣體麻醉機 (Forawick Vaporizer, 購自日本 Muraco Medical 公司) 麻醉。麻醉劑 AErrane (Isoflurane) 購自美國 Baxter 公司。

7. 抗生素

採用 Pamoxicillin (內含 Amoxicillin trichydrate 1.5 gm/60 ml, 購自台灣聯邦化學製藥公司)，每 1 g 溶解於 100 ml 逆滲透水中，作為大鼠術後二日份之飲水，以預防傷口感染。

3.3.3 手術方法

手術前先將大鼠置入連接氣體麻醉機的透明麻醉箱中進行麻醉。待大鼠停止活動後，將大鼠自箱中取出，把麻醉劑量改為 2 litter/kg · min，將麻醉機塑膠管套於大鼠口鼻上，持續給予麻醉。

大鼠失去意識後，將其擺出右側向上側臥姿勢，右膝彎曲，以股骨頭 (femur) 的位置為中心，於上下各約 3 cm 處，將大鼠臀部及大腿的毛剔除，剃毛區以 Betadine 自中心開始由內向外進行消毒。

大鼠消毒完成後，術者先以拇指及食指找到大鼠右側之股骨頭上的大轉子 (greater trochanter of femur) 及外側豆狀骨 (lateral fabella) 予以定位，並用 15 號手術刀沿此兩點之連線劃開皮膚。鈍性分離股二頭肌

(biceps femoris muscle) 與筋膜後，游離出長約 2.5 cm 之坐骨神經，在距梨狀肌 (piriformis) 下緣 8 mm 處，用剪刀整齊剪斷坐骨神經。然後，取出已滅菌之神經導管，以 9-0 Nylon 縫線於神經導管一端 1 mm 處孔洞入針，穿過神經斷端之神經外膜，由神經導管同一端另一個 1 mm 處孔洞穿出，於導管外以單結固定。導管另一側亦以相同方法固定於神經另一斷端。

神經與導管縫合完畢後，將麻醉劑之流量改為 1 litter/kg · min，並以 4-0 Catgut chrom 縫線縫合大鼠的肌肉及皮膚。手術完畢後，將大鼠秤重，然後放回籠子，以鎢絲燈泡照光來維持體溫，避免失溫死亡，靜待大鼠甦醒。

3.4 觀察大鼠植管後 0~8 週狀態

神經導管接合手術 (即：植管) 施術後，靜待大鼠甦醒，然後將其送往中國醫藥大學動物中心代為飼養照料八週。術後二日供應含有抗生素之飲水，即以 Pamoxicillin 1 g 溶解於 100 ml 逆滲透水中，以預防傷口感染。第三日起即供應正常逆滲透飲水。大鼠每籠一隻，共二十籠，每日正常供應飼料，及更換木屑墊料。每週觀察大鼠有無死亡、自殘、厭食狀況，並觀察傷口癒合以及活動狀況是否良好，加以記錄。至八週後加以秤重。最後將觀察結果進行統計檢定，預設顯著水準值為 0.05，以判定實驗組與對照組間有無統計上的顯著差異。

3.5 觀察神經再生情形及導管降解狀態

植管後飼養八週後，將大鼠麻醉、剃毛、以 Betadine 消毒後，定位出大鼠右側之股骨頭大轉子及外側豆狀骨，沿此兩點連線用手術刀劃開皮膚，鈍性分離股二頭肌與筋膜。然後以肉眼觀察神經導管降解情形、神經再生情形，予以拍照紀錄。最後將觀察結果進行統計檢定，預設顯著水準值為 0.05，以判定實驗組與對照組間有無統計上的顯著差異。

3.6 神經電生理檢測實驗

3.6.1 目的

電生理評估的目標，係欲測量大鼠植入神經導管側的肌肉對電刺激的反應，以觀察坐骨神經功能恢復情形，並比較實驗組與對照組是否具有統計上的顯著差異。

3.6.2 實驗方法

大鼠植管後飼養八週期滿，進行手術解剖觀察神經再生情形及導管降解狀態後，繼續手術分離出附著於脛骨之股二頭肌、腓腸肌，以及附著於坐骨神經分支周圍之脂肪層，然後以誘發電位儀（機型 Neuropack Four Mini, 購自日本 Nihon Kohden Co.）進行神經肌肉複合動作電位之誘發。先將正負紀錄電極（recording electrode）分別插入神經導管遠端之脛前肌肌腱及肌腹處，再將刺激電極（stimulating electrode）接觸神經導管近端之坐骨神經。當刺激電極釋放出 2.6 mA 電流刺激神經時，經由再生神經的傳導，於誘發電位儀上便可顯現神經肌肉複合動作電位（compound muscle action potential, CMAP）波形。將電位波形加以紀錄，並計算出其潛期（latency）、波期（duration）、振幅（amplitude）、波下面積、神經傳導速率（conduction motor nerve velocity, 或 nerve conduction velocity, NCV）等值。最後將觀察結果進行統計檢定，預設顯著水準值為 0.05，以判定實驗組與對照組間有無統計上的顯著差異。

3.7 再生神經組織學切片分析

3.7.1 目的

再生神經組織學切片評估的目的，係將再生神經採樣後製成切片，以鏡檢觀察神經生長狀態，並比較實驗組與對照組兩者有無差異。

3.7.2 實驗方法

大鼠植管飼養八週，經電生理評估後，犧牲大鼠，將導管內再生

的神經組織連同導管取下，於導管中段切取 2 mm 片段進行採樣，將樣品浸泡於 2.5 % 戊二醛溶液中。再將樣品以含 2.5 % 戊二醛、4 % paraformaldehyde、0.1 M cacoadehyde 混合液固定 1—2 日，隨即將神經以 1 % OsO₄ 後固定約 2 小時，之後以 50~95 % 酒精脫水，再以樹脂包埋，並將含有再生神經組織之樹脂置入 60~70 °C 烤箱中約 16 小時，等待樹脂硬化。隨後將包埋之再生神經組織作橫向 1 μm 切片後，以 Toluidine blue 染色，當組織切片染色後，髓鞘與 Schwann cell 會明顯呈色。切片製備完成後，以光學顯微鏡進行鏡檢觀察與分析。



第四章 結果

4.1 葛根濃縮粉末製藥結果

本研究所製備出之葛根濃縮粉末，為淡黃褐色的乾燥粉末，可瓶裝密封於常溫下正常保存，如圖 4.1 所示。



圖 4.1 葛根濃縮粉末

4.2 神經導管製備結果

本研究所製備之對照組明膠神經管，呈金黃色，外表平滑有光澤。實驗組之葛根明膠管，亦呈金黃色，但與對照組相較則顏色略深，外表較粗糙，光澤度不如對照組。裁切加工完成之神經導管，長度 12 mm，內徑約為 1.7 mm，外徑約為 2.5 mm。對照組導管如圖 4.2 所示，實驗組導管如圖 4.3 所示。兩者之比較，如圖 4.4 所示。

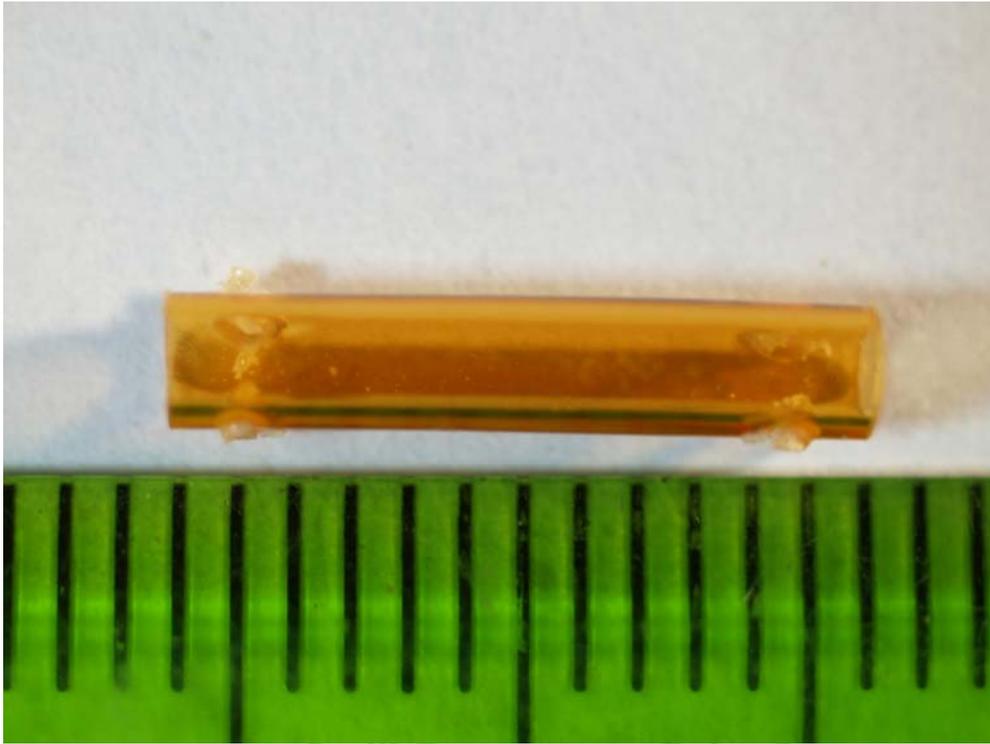


圖 4.2 對照組神經導管 (單位：mm)



圖 4.3 實驗組神經導管 (單位：mm)



圖 4.4 神經導管之比較（上管為實驗組，下管為對照組。）

4.3 大鼠植管後 0~8 週狀態觀察結果

4.3.1 一般性觀察結果

於坐骨神經接合術（植管）後，將大鼠飼養八週，觀察其傷口癒合狀況，以及是否有死亡、自殘、厭食等情形。於術後一週時，觀察手術傷口，皆已癒合，並無縫線脫落或腫脹化膿等情形。所有大鼠於飼養期間皆存活，無死亡情形。因此，在傷口癒合及存活狀態上，實驗組與對照組兩者間並無差異。一般性觀察結果整合如表 4.1 所示。

表 4.1 大鼠植管後 0~8 週狀態觀察結果

組別	大鼠 編號	術後 體重 (g)	八週 體重 (g)	體重 變化 (g)	有無 厭食	傷口 癒合	是否 死亡	有無 自殘
對 照 組	A1	221	255	+34	無	良好	否	有
	A2	255	270	+15	無	良好	否	有
	A3	248	273	+25	無	良好	否	有
	A4	250	283	+33	無	良好	否	無
	A5	249	280	+31	無	良好	否	無
	A6	287	312	+25	無	良好	否	無
	A7	266	297	+31	無	良好	否	無
	A8	233	250	+17	無	良好	否	有
	A9	261	278	+17	無	良好	否	有
	A10	146	295	+49	無	良好	否	無
實 驗 組	B1	237	262	+25	無	良好	否	有
	B2	227	254	+27	無	良好	否	有
	B3	223	263	+40	無	良好	否	有
	B4	236	260	+24	無	良好	否	有
	B5	240	276	+36	無	良好	否	無
	B6	245	254	+ 9	無	良好	否	有
	B7	232	255	+23	無	良好	否	有
	B8	296	264	- 32	有	良好	否	無
	B9	253	277	+24	無	良好	否	有
	B10	230	243	+13	無	良好	否	無

4.3.2 體重變化與厭食

於表 4.1 中，「術後體重」係坐骨神經接合手術剛完成時，於大鼠尚未甦醒前加以秤重所得。「八週體重」為飼養八週後，犧牲收成前秤重所得。因為我們無法有效監測大鼠進食狀況與飼料食用量，故以術後至犧牲期間之體重變化，來推測大鼠是否有厭食情形。若體重減輕，即判定為有厭食情形，反之則否。結果，除實驗組有一隻體重減輕外，其餘皆無厭食情形。對照組與實驗組大鼠之體重變化，以 t 檢定統計結果，得 P 值為 0.1193，大於我們的預設顯著水準 (significance level) 值 0.05，故研判兩組間並無統計上的顯著差異，亦即添加葛根對大鼠發育的體重變化並無影響。對照組體重於八週內平均增加 27.7 g，實驗組平均增加 18.9 g，對照組體重增加平均值較實驗組為大。兩組體重差之平均值比較，如圖 4.5 所示。

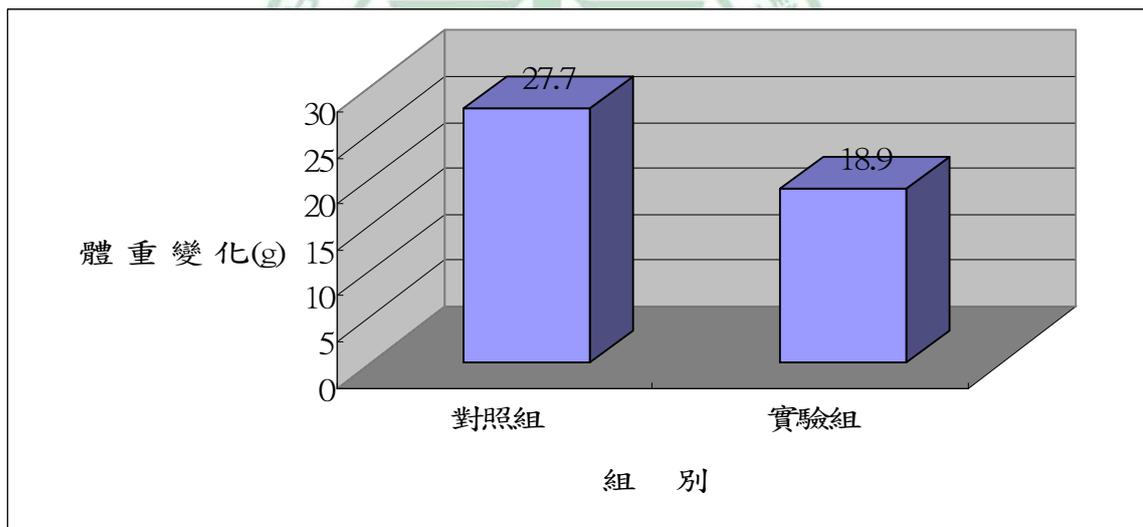


圖 4.5 大鼠植管後 0~8 週體重變化比較圖

兩組植管後的厭食情形，如表 4.2 所示。以 Fisher exact test 進行統計，得 P 值為 0.50，大於我們的預設顯著水準值 0.05，故認定實驗組與對照組在厭食行為上，並無統計上的顯著差異。亦即，添加中藥葛根，並不會促使大鼠發生厭食。

表 4.2 大鼠植管後厭食數目比較表

大鼠數目	對照組 (n=10)	實驗組 (n=10)	Fisher exact test
厭食 (無)	10	9	P > 0.05
厭食 (有)	0	1	無統計上差異

4.3.3 自殘

於植管後的八週觀察期，部份大鼠出現自殘行為。對照組共有 5 隻自殘，實驗組有 7 隻自殘，自殘部位皆發生於施術之後肢的足趾。自殘狀況如圖 4.6 所示。

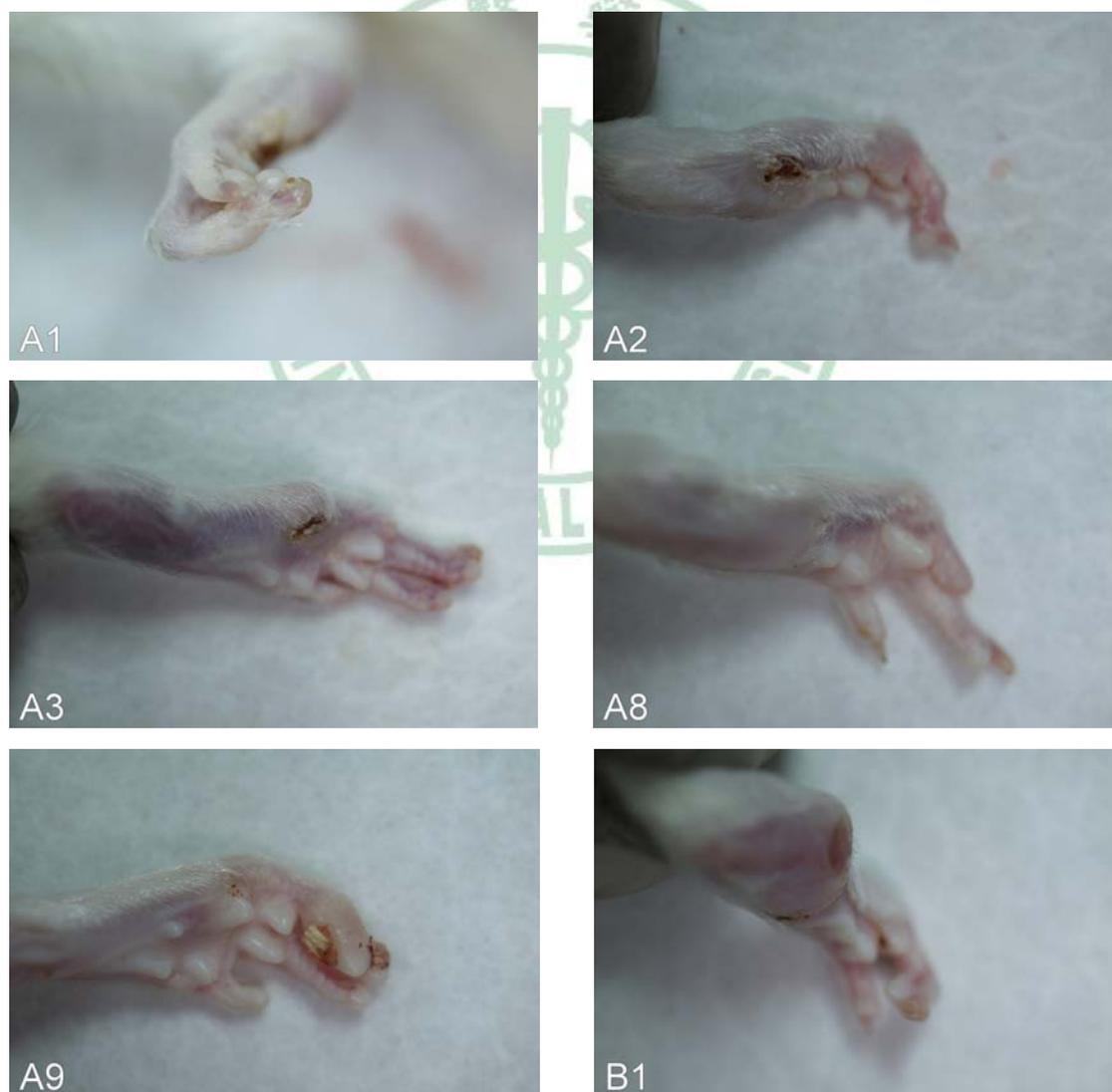


圖 4.6 大鼠自殘狀態 (A 為對照組，B 為實驗組)

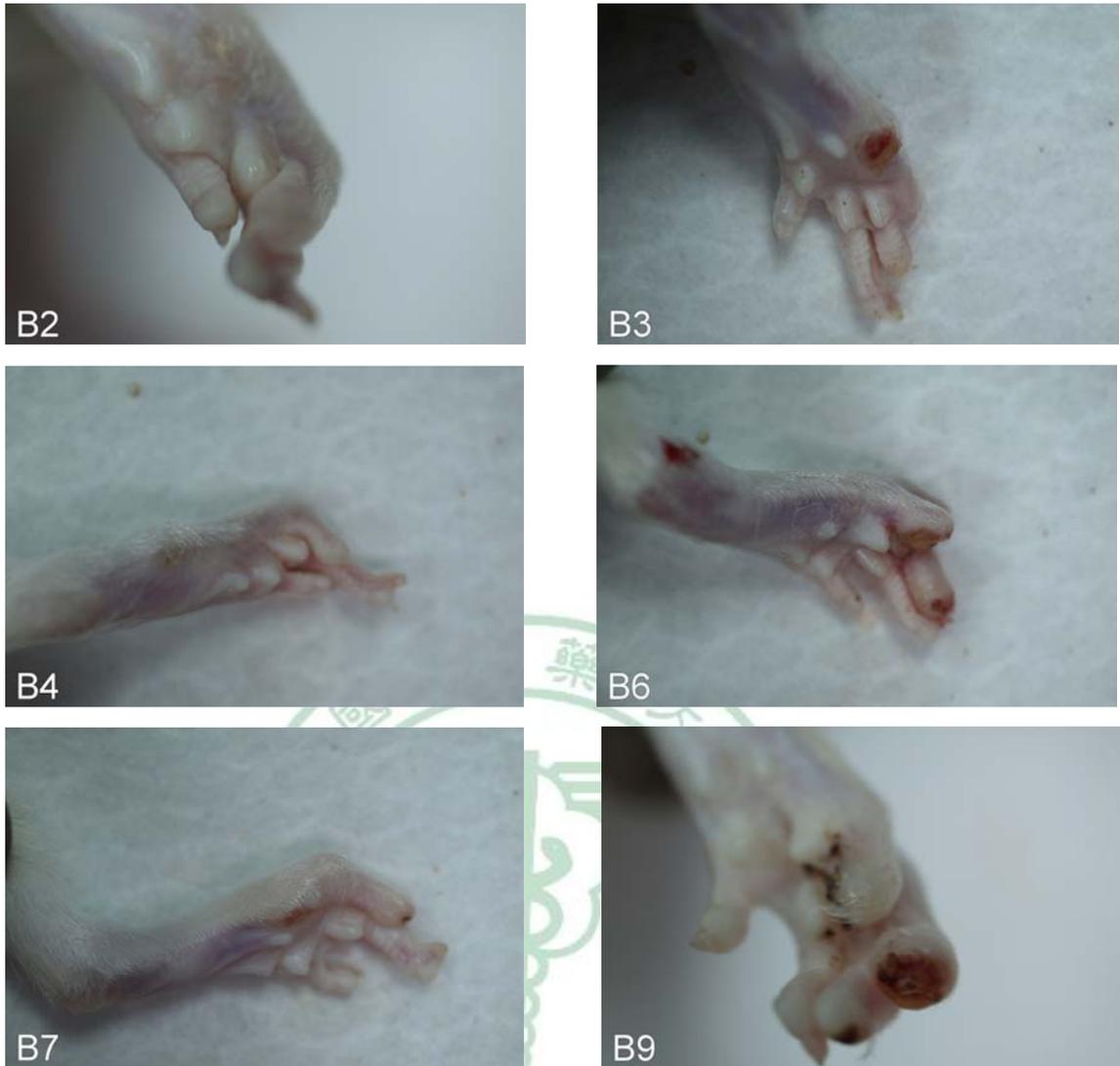


圖 4.6：續

兩組大鼠自殘數的比較，如表 3 所示。以 Fisher exact test 進行統計，得 P 值為 0.24，大於我們的預設顯著水準值 0.05，故認定實驗組與對照組在自殘行為上，並無統計上的顯著差異。亦即，添加中藥葛根，並不會促使大鼠發生自殘行為。

表 4.3 大鼠植管後自殘數目比較表

大鼠數目	對照組 (n=10)	實驗組 (n=10)	Fisher exact test
自殘 (無)	5	3	P > 0.05 無統計上差異
自殘 (有)	5	7	

4.4 觀察神經再生及導管降解狀態結果

4.4.1 一般性觀察結果

將植入神經導管之大鼠飼養八週後，把大鼠麻醉後解剖，可以藉由肉眼觀察到導管降解狀態以及神經再生情形。由於本研究製成之神經導管呈金黃色，我們可以觀察到在白色的坐骨神經及周邊組織上出現金黃色的尚未完全降解掉的導管殘餘物。染上金黃色的區域為原先植管處，在剛植管時該處是不存在神經的，我們可以觀察到在植管八週後，該區域是否有新的再生神經出現。將觀察結果加以拍照，所見之對照組如圖 4.7 所示，實驗組如圖 4.8 所示。



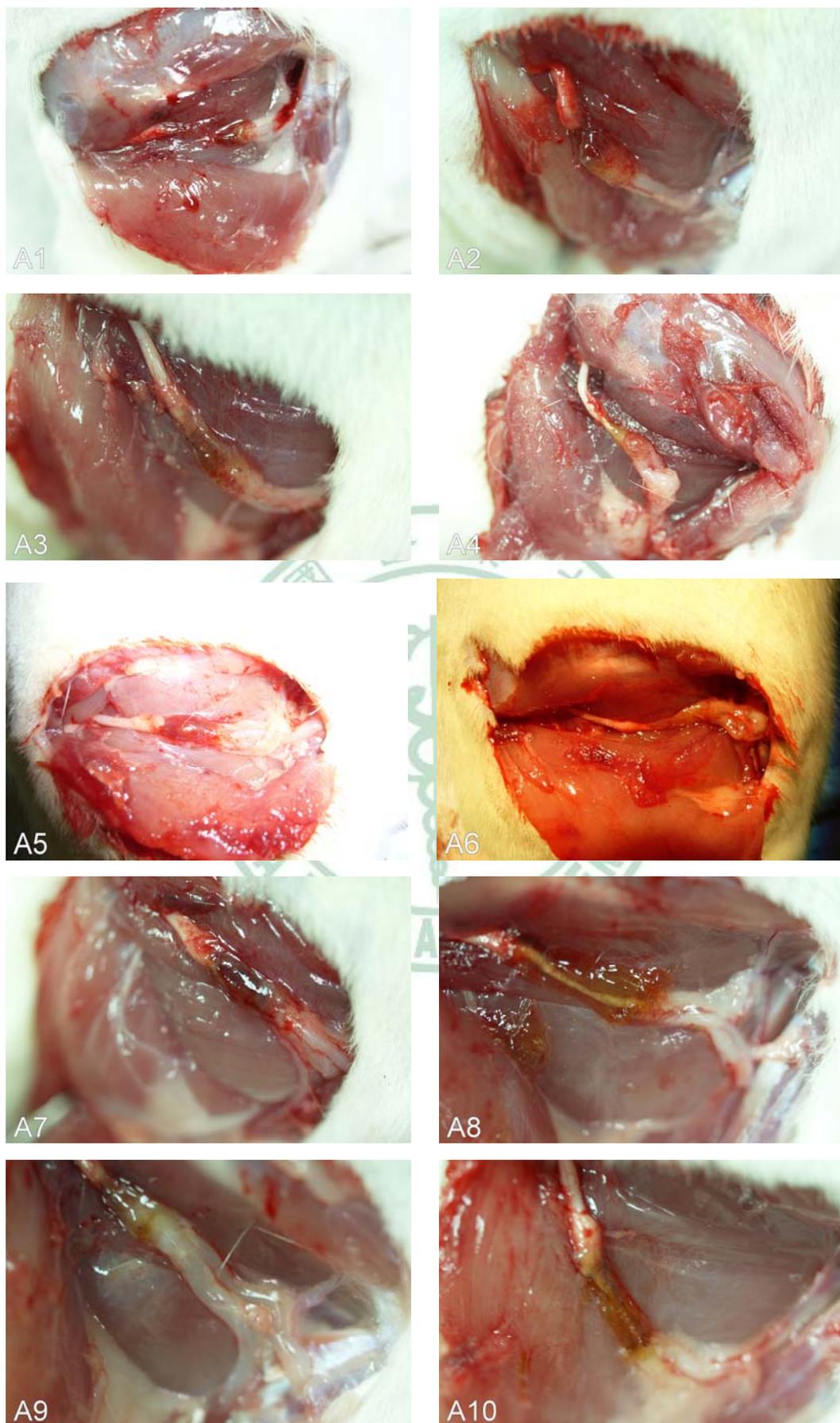


圖 4.7 對照組神經再生及神經導管降解圖

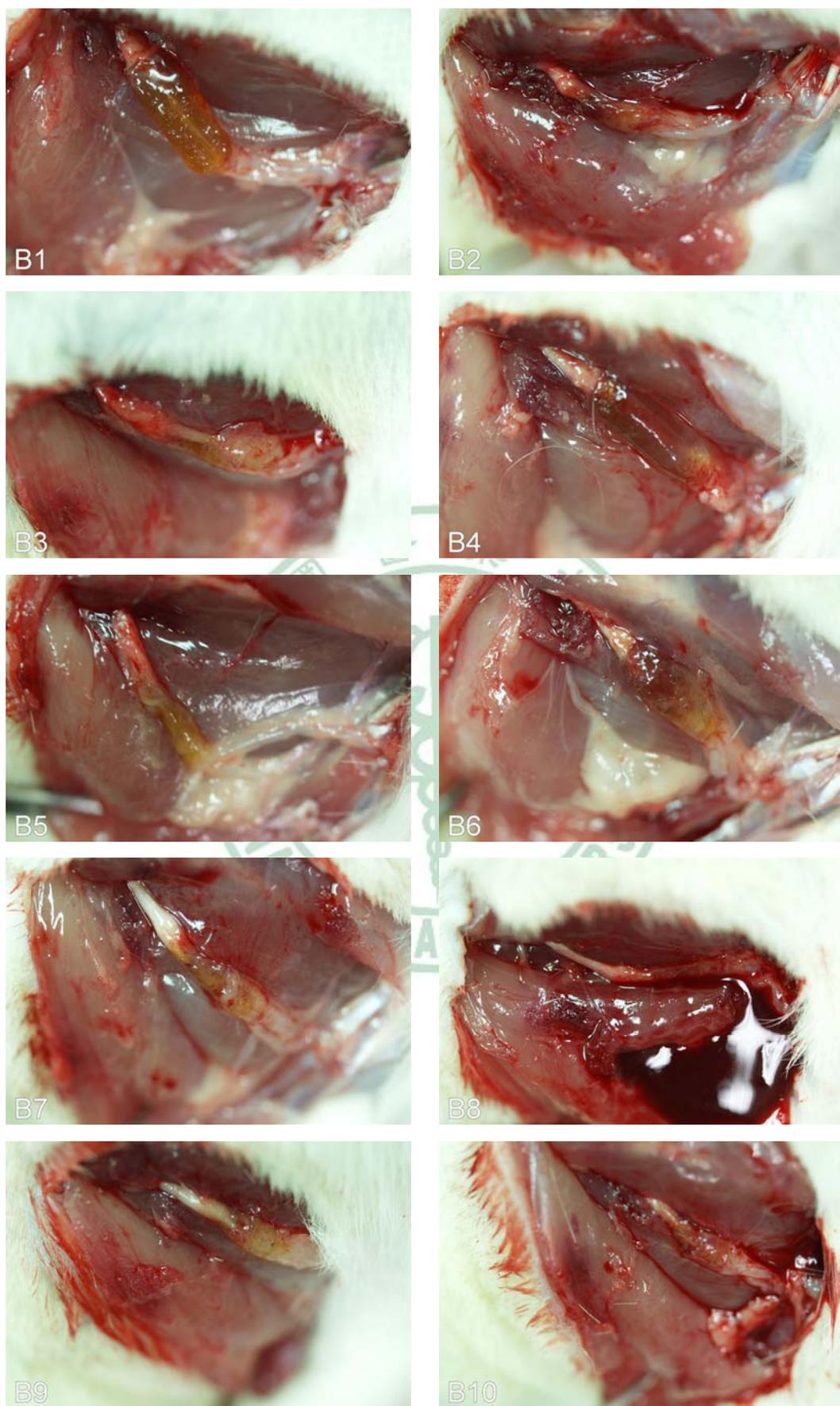


圖 4.8 實驗組神經再生及神經導管降解圖

4.4.2 神經導管降解程度觀察結果

我們可以藉由肉眼觀察金黃色的導管殘餘狀態，來評估導管在大鼠體內的降解程度。為了便於評比，我們將肉眼所見導管殘餘狀態分作四級，分級標準如表 4.4 所示。第一級代表幾乎沒有可觀察到的降解發生，第四級代表導管幾乎已被完全降解掉。級數愈高，代表降解程度愈大。

表 4.4 神經導管降解程度分級標準

降解程度	大鼠收成時神經導管降解狀態
第一級	導管外觀與植管時並無肉眼可見之明顯差異
第二級	導管已有降解，但仍可見明顯之導管輪廓。
第三級	可見導管殘餘物，但導管輪廓已不明顯。
第四級	沒有可肉眼觀察到的導管殘餘物

將圖 4.7 及圖 4.8 根據表 4.4 的標準加以分級，所得之導管降解程度結果，如表 4.5 所示。

表 4.5 神經導管降解程度分級結果

組別	對照組		實驗組	
	大鼠編號	總數	大鼠編號	總數
第一級	—	0	—	0
第二級	A2, A5, A6, A7, A8, A10	6	B1, B4, B6,	3
第三級	A1, A3, A4, A9	4	B2, B3, B5, B7, B8, B9, B10	7
第四級	—	0	—	0

將兩組降解程度加以比較的結果，如圖 4.9 所示。由圖可見，在肉眼觀察下，實驗組導管的降解程度比對照組來的好。將兩組以 Fisher exact test 進行統計，得 P 值為 0.15，大於我們的預設顯著水準值 0.05，故認定實驗組與對照組在降解程度上，並未達到統計上的顯著差異。

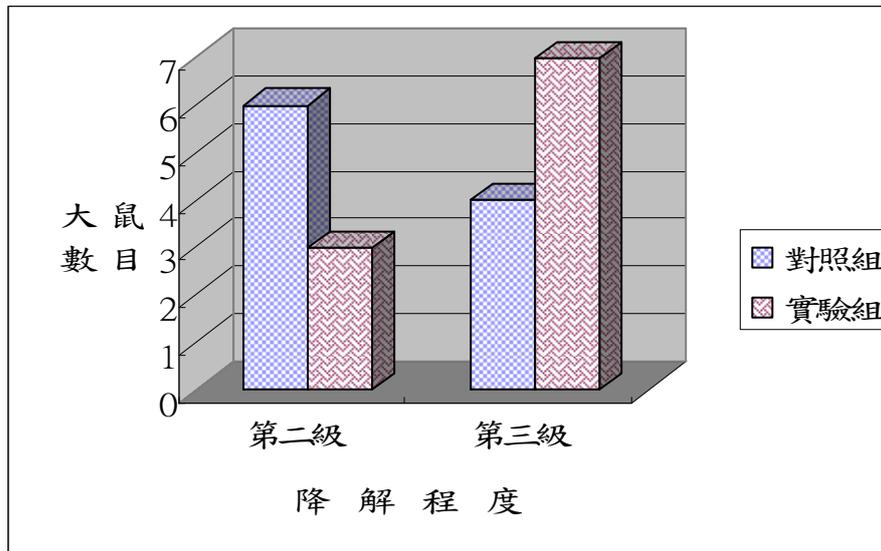


圖 4.9 神經導管降解程度比較圖

4.4.3 神經再生觀察結果

在原先植管的區域，由於存在導管降解後的殘餘物，會在神經及其周邊組織染上金黃色，因此我們可以藉由肉眼觀察該區域是否存在新生的坐骨神經，來研判在植管八週後神經再生的情況。觀察的結果，兩組所有大鼠皆出現再生的神經，但除了對照組編號 A1 大鼠只有再生神經明顯特別微細以外，其餘大鼠皆觀察到連接原先兩斷端的粗大再生神經。兩組肉眼觀察神經再生情形，如表 4.6 所示。因為兩組皆有再生神經出現，故在肉眼觀察再生結果上，並無統計上的顯著差異。

表 4.6 肉眼觀察神經再生結果比較表

大鼠數目	對照組 (n=10)	實驗組 (n=10)
神經再生 (無)	0	0
神經再生 (有)	10	10

A1 大鼠如圖 4.10 所示，並沒有出現其他大鼠可見之粗大的新生神經，僅有微細之再生神經出現。在圖 4.7 及圖 4.8 中，可看見其餘大鼠皆可見明顯新生神經。以圖 4.11 之對照組 A8 大鼠及圖 4.12 之實驗組 B3 大鼠為例，可以明顯看到在殘餘的金黃色導管中，出現新生的白色坐骨神經。

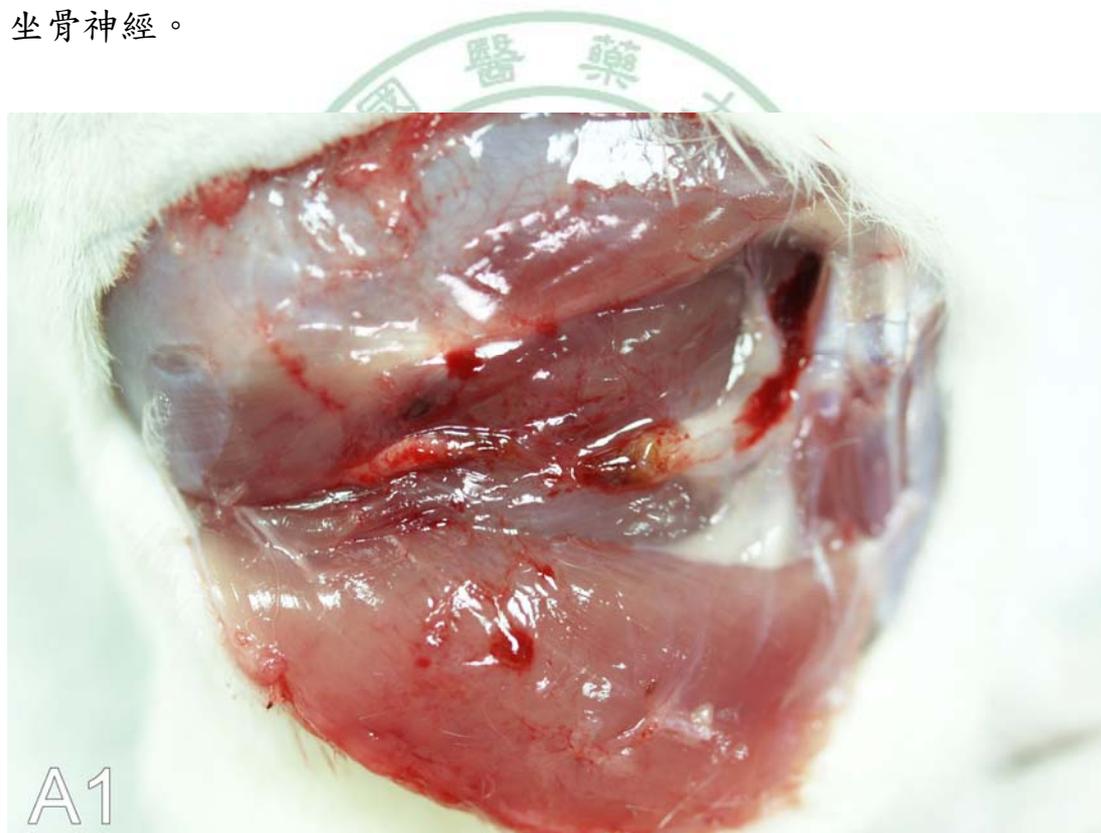


圖 4.10 對照組 A1 大鼠只有微細再生神經出現

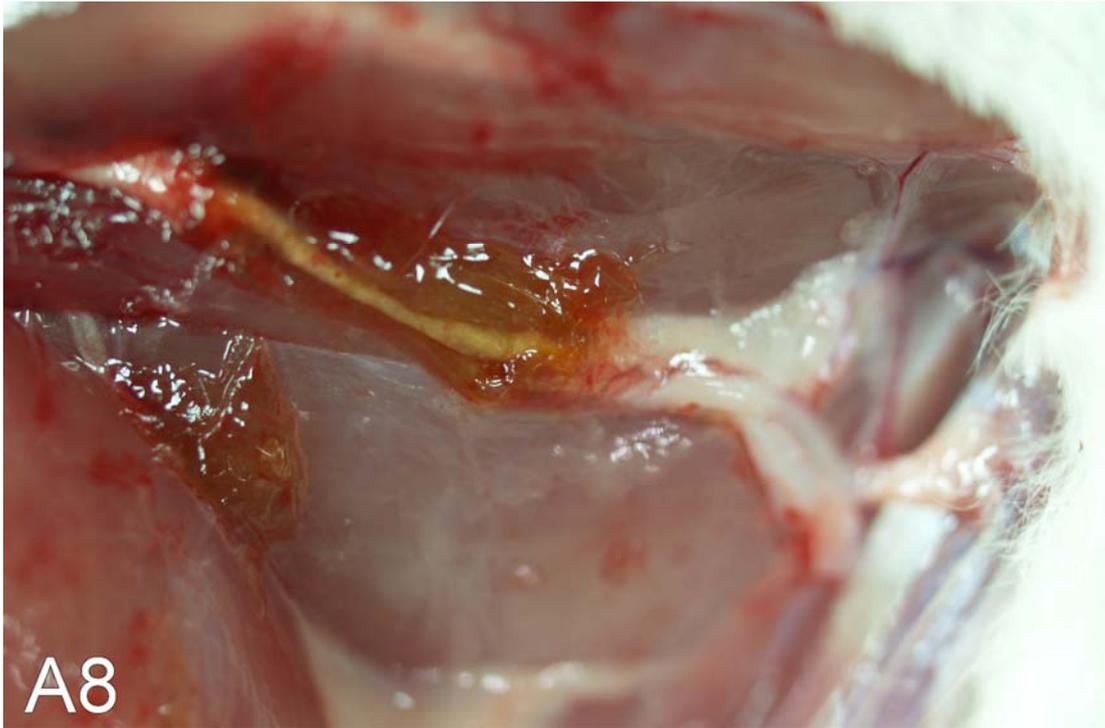


圖 4.11 對照組 A8 大鼠可觀察到粗大的再生神經



圖 4.12 實驗組 B3 大鼠可觀察到粗大的再生神經

為了增加觀察的清晰度，於大鼠犧牲後，我們將其坐骨神經剝離下來。於圖 4.13 之對照組 A4 大鼠，以及圖 4.14 之實驗組 B3 大鼠的分離神經，皆可清楚觀察到新生的再生神經橫跨斷面。圖中染黃區域為導管所植入之處。



圖 4.13 對照組 A4 大鼠之分離坐骨神經



圖 4.14 實驗組 B3 大鼠之分離坐骨神經

4.5 神經電生理檢測結果

於植管八週後，我們對大鼠施術端坐骨神經進行電生理檢測，以評估實驗組與對照組的神經功能是否具有顯著差異。本研究電生理評估的主要變項，包括神經肌肉複合動作電位 (compound muscle action potential, CMAP) 的潛期、波期、振幅、波下面積、神經傳導速度等數值。

4.5.1 潛期 (latency)

潛期，係指神經從受到刺激開始到產生動作電位反應的準備期間。神經的功能愈好，對刺激所需的反應時間自然愈快，因此發動電位所需的潛期自然愈短。我們對兩組大鼠進行電生理檢測，對照組潛期的平均值為 2.4625 ms，實驗組為 2.2215 ms，可見實驗組發動反應電位所需的潛期，要比對照組來的短。兩組潛期的比較，如圖 4.15 所示。將兩組數值以 t-test 進行統計分析，得到 P 值為 0.00036，小於我們的預設顯著水準值 0.05，故認定實驗組與對照組在神經潛期上，已達到統計上的顯著差異。亦即，添加葛根的實驗組導管對神經功能的恢復，在統計上較無添加中藥的對照組導管更為良好。統計結果，如表 4.7 所示。

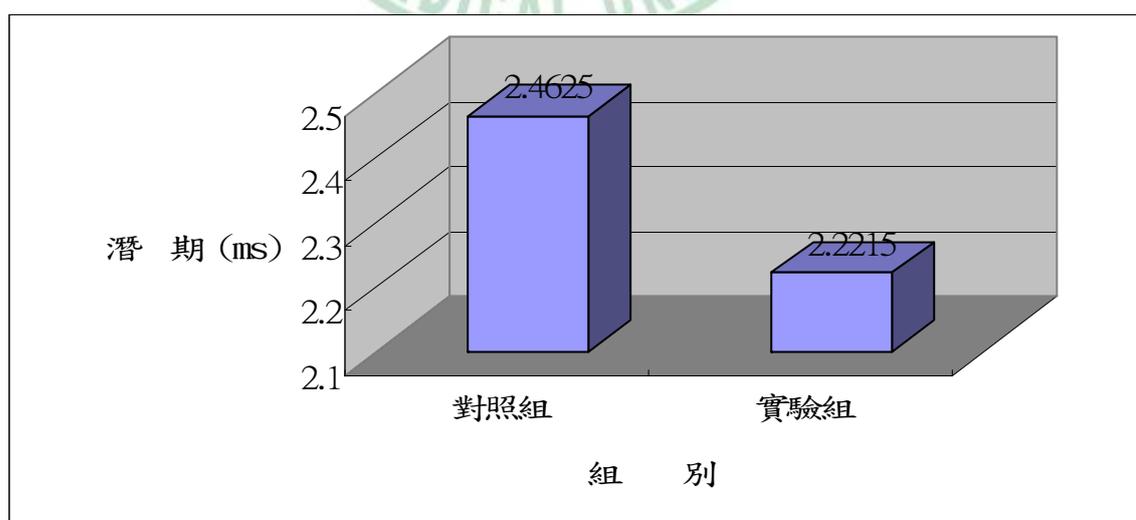


圖 4.15 潛期比較圖

表 4.7 潛期統計結果表

潛期	平均值(ms)	變異數	P 值	t-test
對照組	2.4625	0.06622	0.00036	P < 0.05 有顯著差異
實驗組	2.2215	0.11988		

4.5.2 波期 (duration)

波期，係指複合動作電位主波的長度。一般而言，神經的功能愈好，則對刺激所產生的動作電位波體較大，因此其波期也會較大。若神經功能不良，則對刺激的反應微弱，產生的波期也就微小。我們對兩組大鼠進行電生理檢測，對照組波期的平均值為 1.5095 ms，實驗組波期為 1.5440 ms，可見實驗組的波期，要比對照組來的大。也就是說，添加葛根對神經功能恢復，在波期平均值上看來是有幫助的。兩組波期的比較，如圖 4.16 所示。然而，將兩組數值以 t-test 進行統計分析，得到 P 值為 0.3254，大於我們的預設顯著水準值 0.05，故認定實驗組與對照組在神經波期上，尚未能達到統計上的顯著差異。統計結果，如表 4.8 所示。

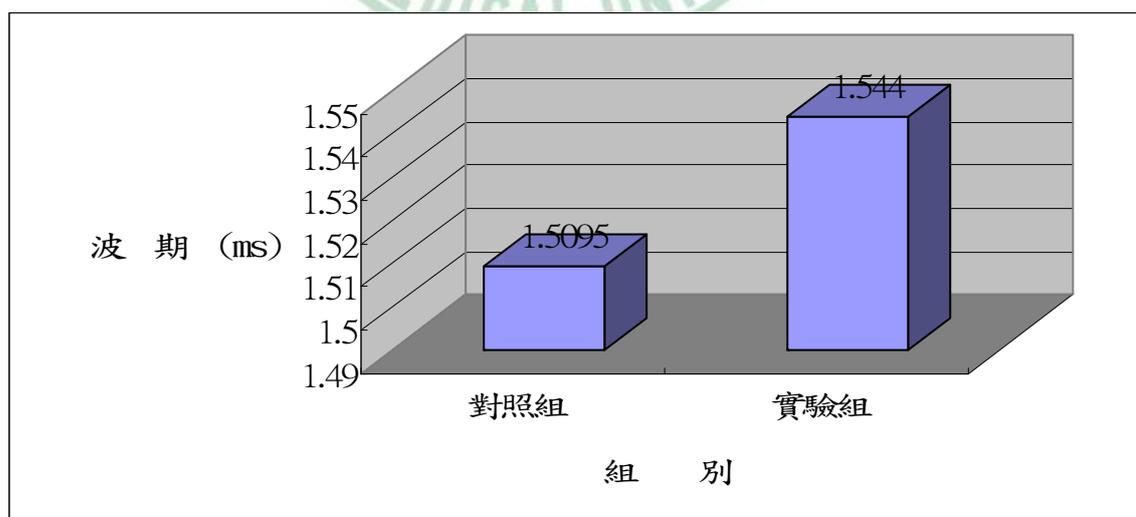


圖 4.16 波期比較圖

表 4.8 波期統計結果表

波期	平均值(ms)	變異數	P 值	t-test
對照組	1.5095	0.0876	0.3254	P > 0.05
實驗組	1.5440	0.1428		無顯著差異

4.5.3 振幅 (amplitude)

振幅，係指複合動作電位主波的高度。一般而言，神經的功能愈好，則對刺激所產生的動作電位波體較大，因此其振幅也會較大。若神經功能不良，則對刺激的反應微弱，產生的振幅也就微小。我們對兩組大鼠進行電生理檢測，對照組振幅的平均值為 11.5270 mV，而實驗組為 12.7935 mV，可見實驗組的振幅，要比對照組來的大。也就是說，添加葛根對神經功能恢復，在振幅平均值上看來是有幫助的。兩組振幅的比較，如圖 4.17 所示。然而，將兩組數值以 t-test 進行統計分析，得到 P 值為 0.2047，大於我們的預設顯著水準值 0.05，故認定實驗組與對照組在神經振幅上，尚未能達到統計上的顯著差異。統計結果，如表 4.9 所示。

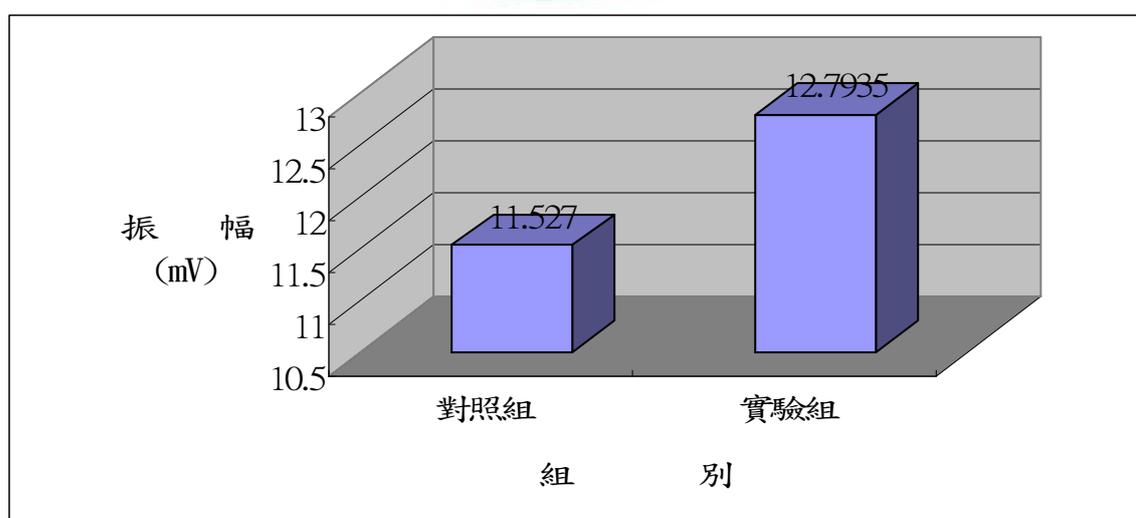


圖 4.17 振幅比較圖

表 4.9 振幅統計結果表

振幅	平均值(mV)	變異數	P 值	t-test
對照組	11.5270	32.6838	0.2047	P > 0.05
實驗組	12.7935	60.5121		無顯著差異

4.5.4 波下面積

波下面積，係指複合動作電位主波下的面積。一般而言，神經的功能愈好或再生神經數目愈多，則對刺激所產生的動作電位波體較大，因此其波下面積也會較大。我們對兩組大鼠進行電生理檢測，對照組波下面積的平均值為 6.7403 mV-ms，實驗組為 7.0978 mV-ms，可見實驗組的波下面積，要比對照組來的大。也就是說，添加葛根對神經功能恢復，在波下面積平均值上看來是有幫助的。兩組波下面積的比較，如圖 4.18 所示。然而，將兩組數值以 t-test 進行統計分析，得到 P 值為 0.3674，大於我們的預設顯著水準值 0.05，故認定實驗組與對照組在神經波下面積變項上，尚未能達到統計上的顯著差異。統計結果，如表 4.10 所示。

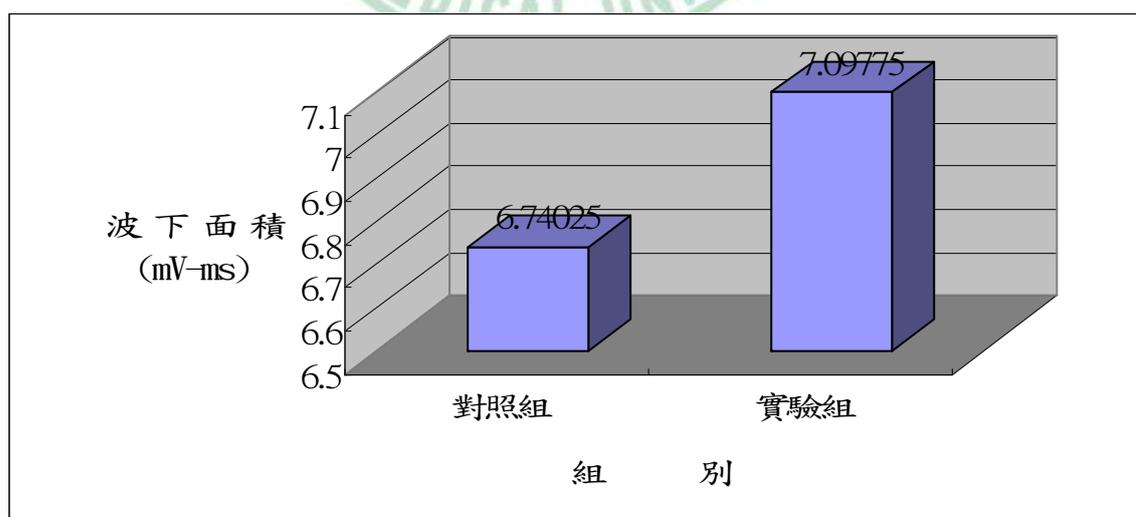


圖 4.18 波下面積比較圖

表 4.10 波下面積統計結果表

波下面積	平均值 (mV · ms)	變異數	P 值	t-test
對照組	6.7403	13.7857	0.3674	P > 0.05 無顯著差異
實驗組	7.0978	30.3843		

4.5.5 神經傳導速率 (nerve conduction velocity, NCV)

神經傳導速率，係指神經對刺激反應所產生動作電位的傳導速率。神經的功能愈好，傳導速率自然愈快。我們對兩組大鼠進行電生理檢測，得到對照組神經傳導速度的平均值為 21.4750 m/s，而實驗組則為 23.4075 m/s，可見實驗組的神經傳導速率要比對照組來的快。也就是說，添加葛根對神經功能恢復，在神經傳導速率平均值上看來是有幫助的。兩組神經傳導速率的比較，如圖 4.19 所示。將兩組數值以 t-test 進行統計分析，得到 P 值為 0.0022，小於我們的預設顯著水準值 0.05，故認定實驗組與對照組在神經傳導速率上，已達到統計上的顯著差異。亦即，添加葛根的實驗組導管對神經功能的恢復，在統計上較無添加中藥的對照組導管更為良好。統計結果，如表 4.11 所示。

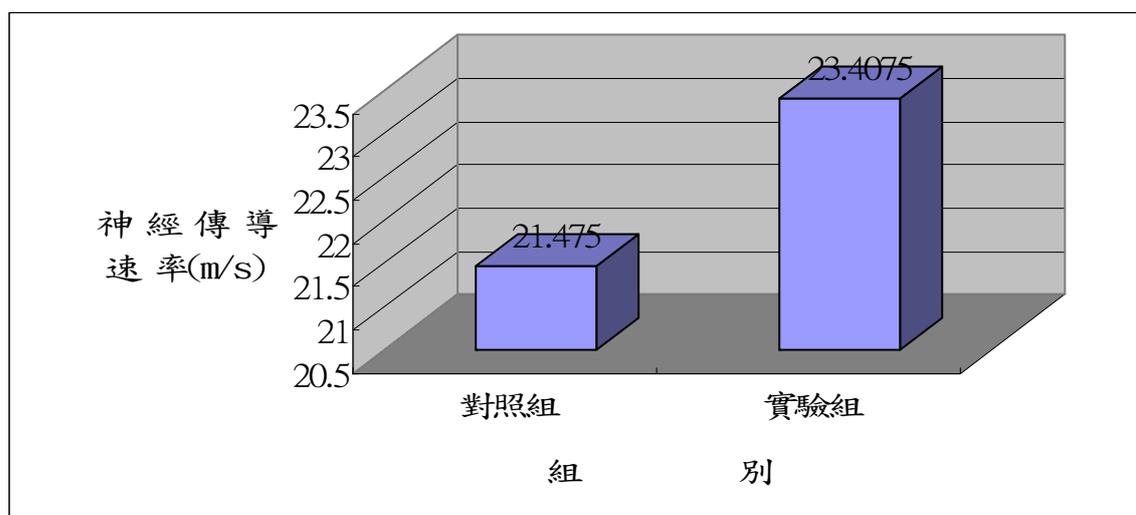


圖 4.19 神經傳導速率比較圖

表 4.11 神經傳導速度統計結果表

神經傳導速度	平均值(m/s)	變異數	P 值	t-test
對照組	21.4750	5.6101	0.0022	P < 0.05 有顯著差異
實驗組	23.4075	11.6443		

4.6 再生神經組織學切片評估結果

4.6.1 光學顯微鏡 40 倍鏡檢結果

我們係採用光學顯微鏡進行鏡檢，切片的採樣處為再生神經的中段。在 40 倍鏡檢時，可以觀察到神經外膜 (epineurium)、神經束膜 (perineurium)、神經纖維束 (fasciculi of nerve fibers)，以及週邊的結締組織。然而，較細微的結構，如神經內膜、軸突等，於此放大倍率並不能觀察的到。

圖 4.20 為實驗組神經縱切面切片，可見到許多再生神經纖維束穿越於結締組織間。圖 4.21 為對照組神經橫切面的切片，圖 4.22 為實驗組神經橫切面的切片。兩組皆可清楚觀察到中央具有多個神經纖維束，被白色的神經束膜所圍繞。在這些神經纖維束的最外層，包覆著疏鬆的白色神經外膜結締組織。由觀察結果可知，實驗組和對照組皆確實出現了新生的再生神經。然而，在此倍率下，並不能清楚觀察到兩組間存在顯著差異。

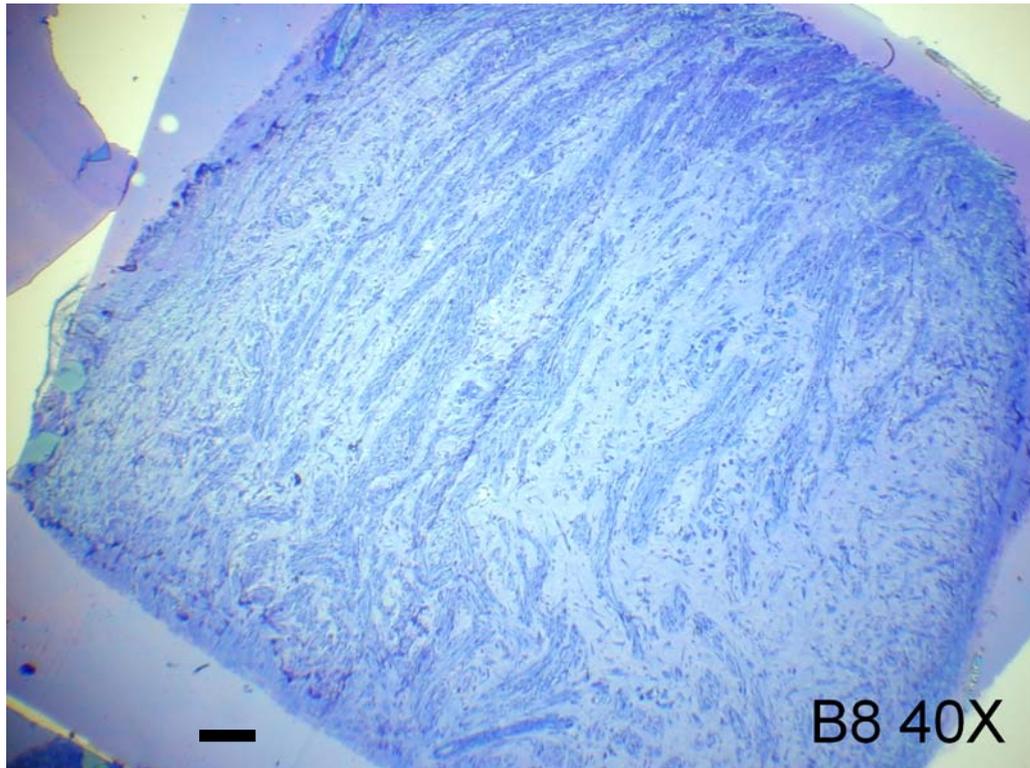


圖 4.20 實驗組神經切片（縱切面, 40 倍）(scare bar=100 μ m)

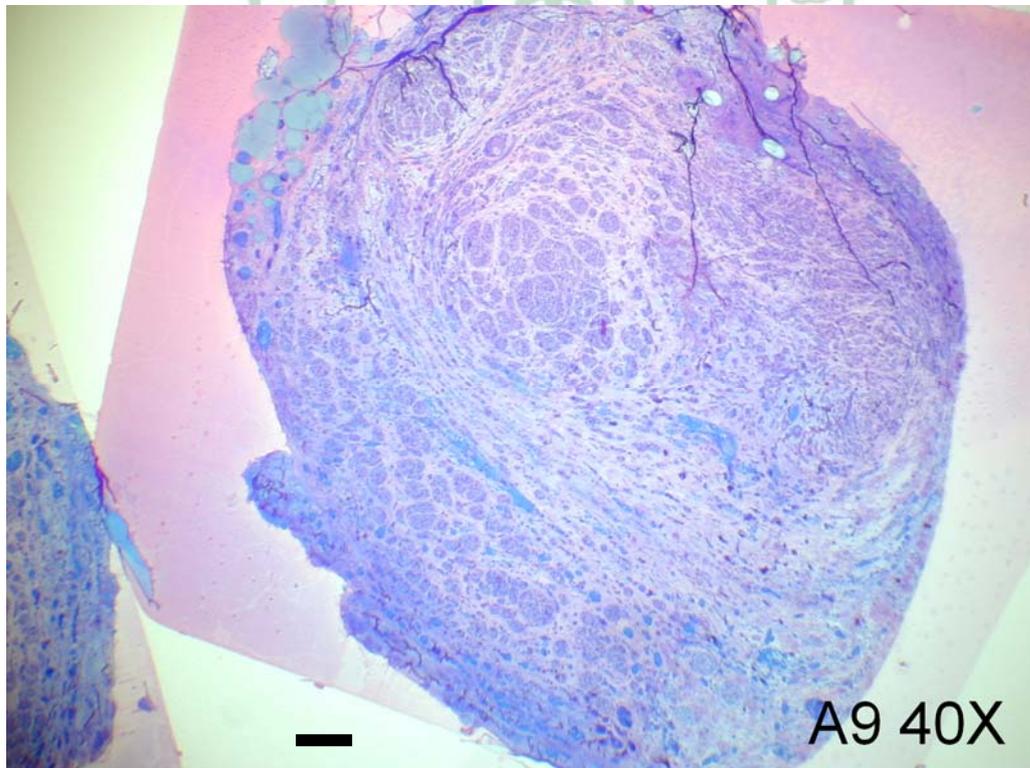


圖 4.21 對照組神經切片（橫切面, 40 倍）(scare bar=100 μ m)

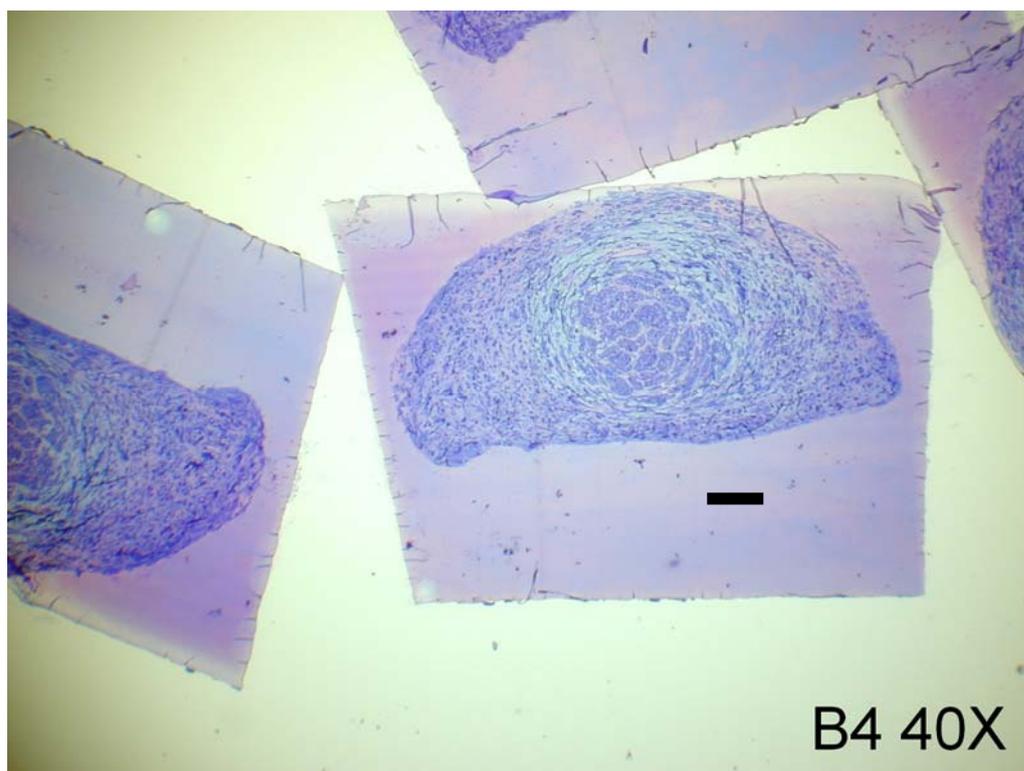


圖 4.22 實驗組神經切片（橫切面, 40 倍）(scale bar=100 μ m)

4.6.2 光學顯微鏡 100 倍鏡檢結果

在 100 倍下鏡檢神經橫切面切片，可以更清楚地觀察到神經外膜、神經束膜、神經纖維束，也約略可見神經軸突及圍繞其外的神經內膜，但並不清楚。圖 4.23 為實驗組神經縱切面的切片。由縱切面切片可以看到神經束的深染外緣，其內又被多個深染的連續髓鞘所隔開，許旺細胞核散見其中。於此圖中，可見到有很多淡染的神經束膜將神經纖維束分隔開來，神經纖維束中有許多連續的髓鞘，以及甚多許旺細胞核。

圖 4.24 為對照組神經橫切面的切片，圖 4.25 為實驗組神經橫切面的切片。由圖可見，神經被淡藍色的神經外膜圍繞著，神經束膜交通於神經纖維束之間。兩組相較，實驗組的神經纖維束較對照組為緻密，對照組的神經組織則顯得較為鬆散。

在 100 倍下鏡檢神經斜切面切片，可以觀察到神經纖維束的外緣，以及包圍軸突的許旺細胞（Schwann cells）的細胞核。由於斜切會使深

染的髓鞘看起來不相連續，相對地淡染的軸突和許旺細胞質會成為主體，因此呈像顯現出在許多淡染（白色）的軸突和許旺細胞中，出現不連續的深染髓鞘片段，以及深染的許旺細胞核。圖 4.26 為對照組神經斜切面的切片，圖中可觀察到多群神經纖維束，其中可見深染的髓鞘片段，以及許多深染的波浪狀許旺細胞核。圖 4.27 為實驗組神經斜切面的切片，亦可觀察到多群神經纖維束。兩組相較，可以發現實驗組中的髓鞘及許旺細胞核較對照組為多，而且分布較為緻密。

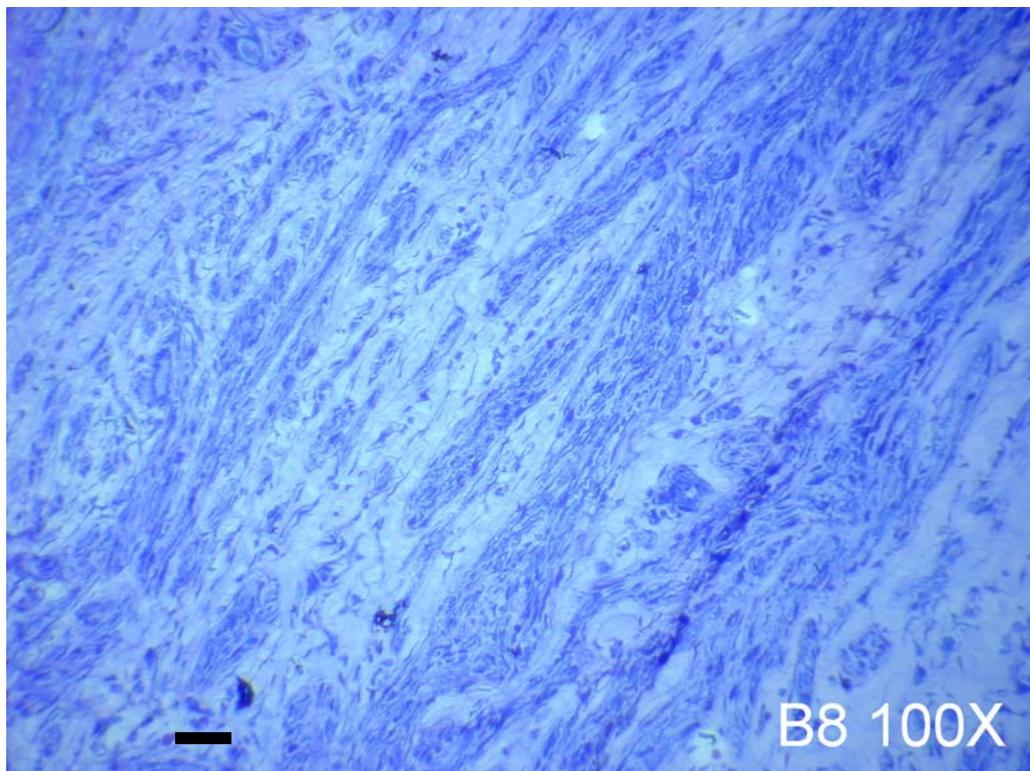


圖 4.23 實驗組神經切片（縱切面, 100 倍）(scale bar=40 μm)

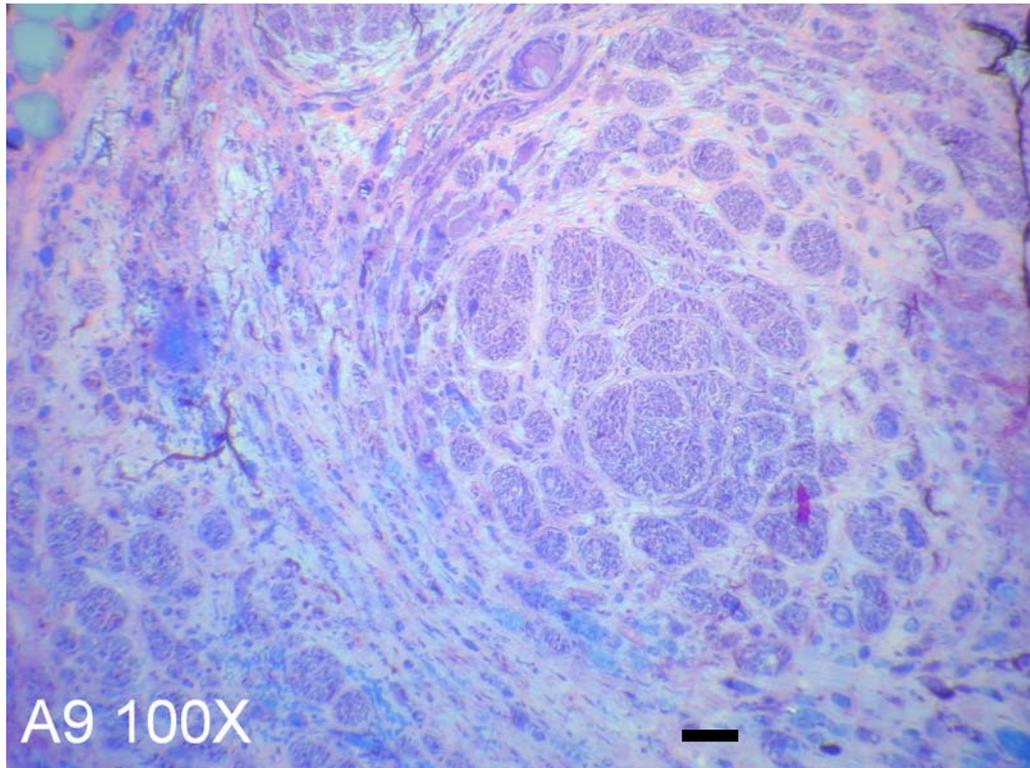


圖 4.24 對照組神經切片（橫切面, 100 倍）(scale bar=40 μm)

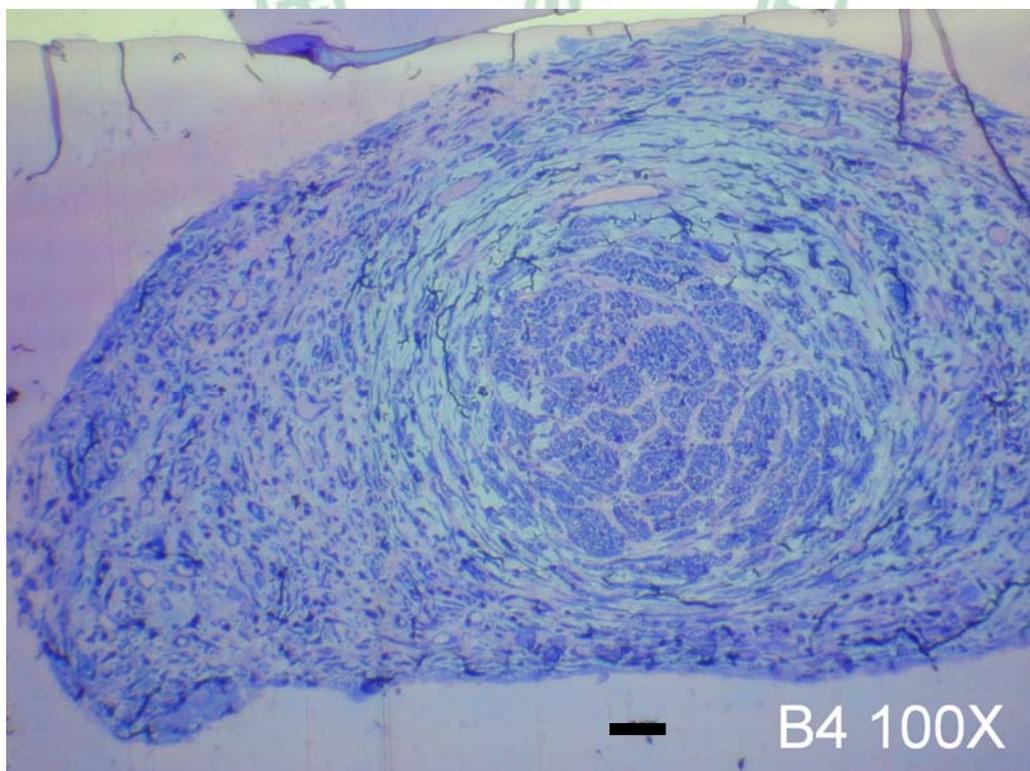


圖 4.25 實驗組神經切片（橫切面, 100 倍）(scale bar=40 μm)

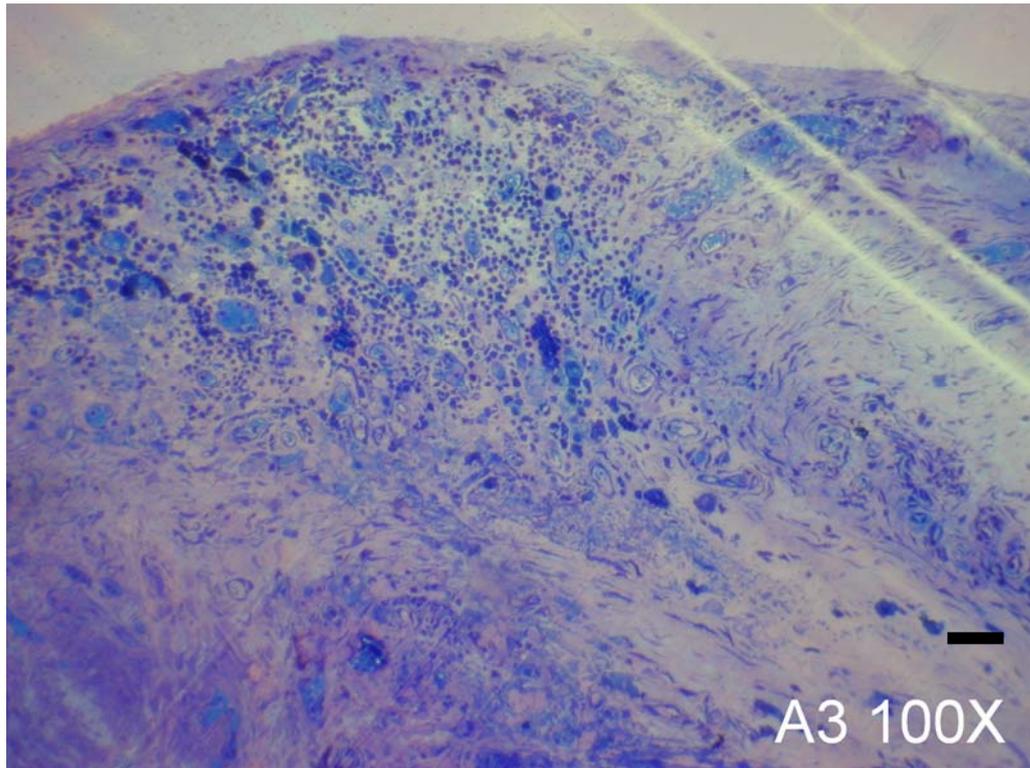


圖 4.26 對照組神經切片（斜切面, 100 倍）(scare bar=40 μm)

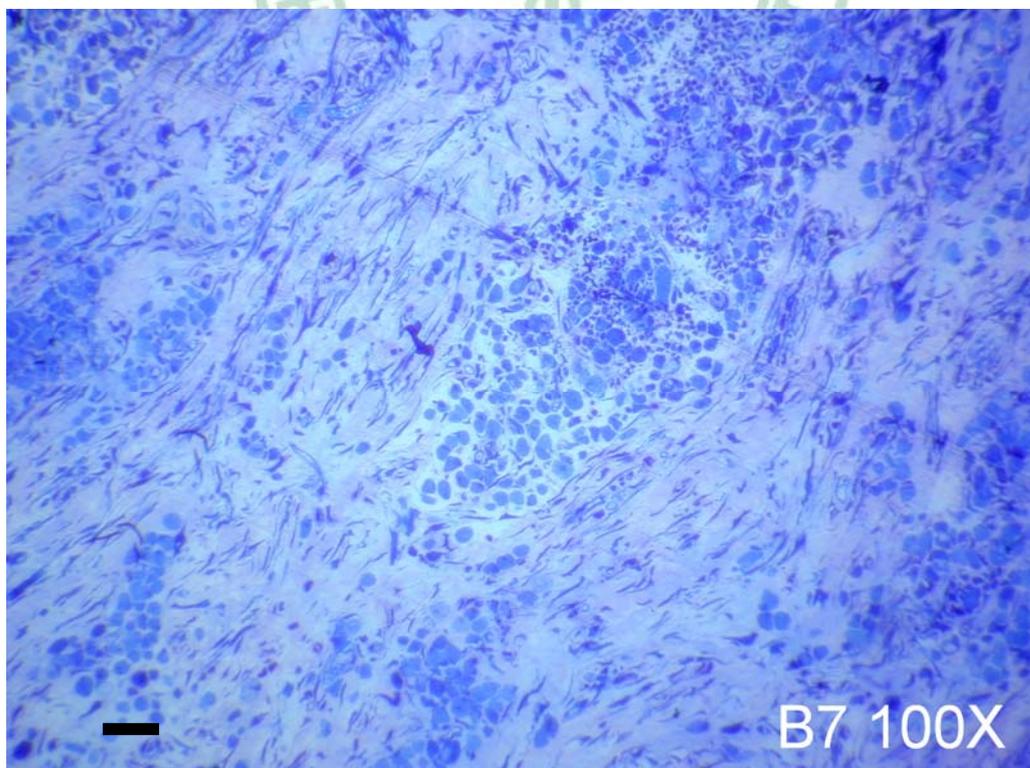


圖 4.27 實驗組神經切片（斜切面, 100 倍）(scare bar=40 μm)

4.6.3 光學顯微鏡 400 倍鏡檢結果

在 400 倍下做神經橫切面的鏡檢，已能清楚觀察到有髓鞘（myelin sheath）及無髓鞘的神經纖維，以及圍繞在軸突（axon）旁邊的神經內膜（endoneurium）。圖 4.28 為實驗組神經縱切面切片，可以看到在左側的神經束膜的右方，有許多有髓鞘與無髓鞘的神經纖維存在。圖 4.29 為對照組神經橫切面的切片，圖 4.30 為實驗組神經橫切面的切片。兩組相較，實驗組的神經纖維較對照組為多，有髓鞘的軸突較多，纖維形狀也較為規則。

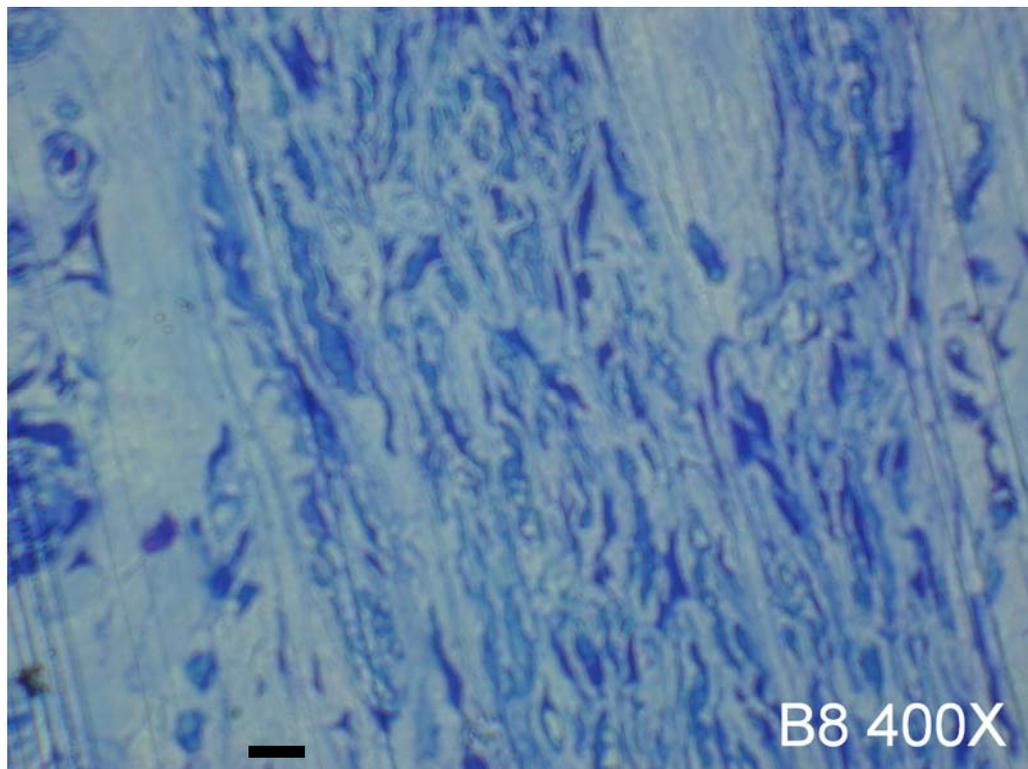


圖 4.28 實驗組神經切片（縱切面, 400 倍）(scale bar=10 μ m)

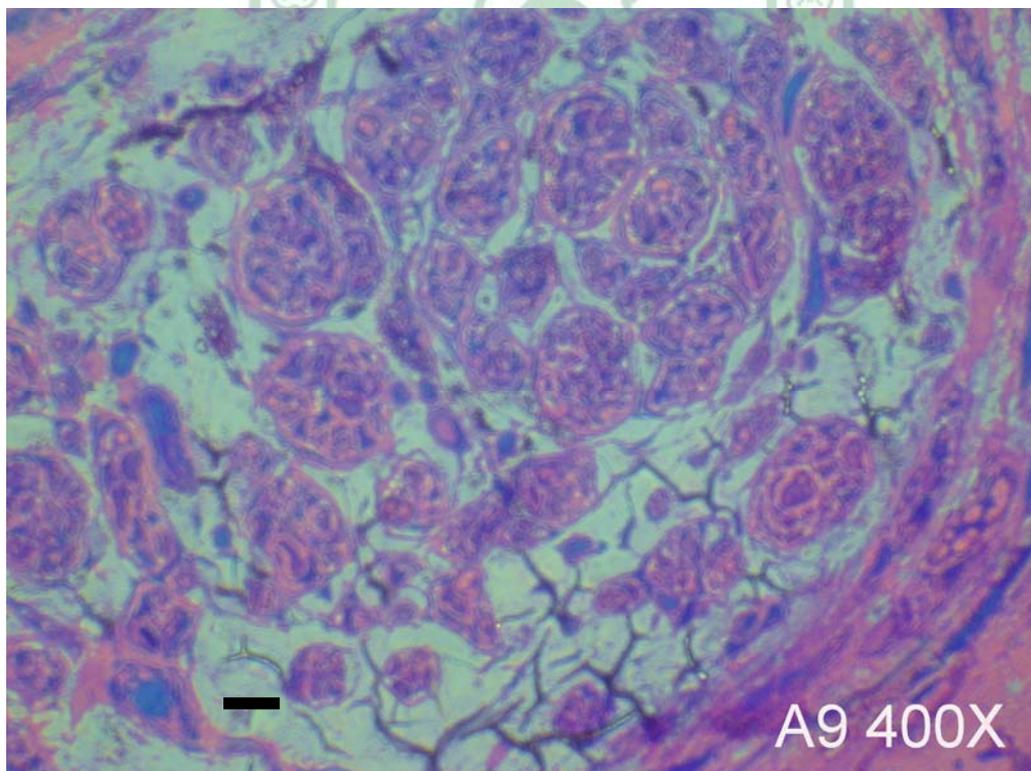
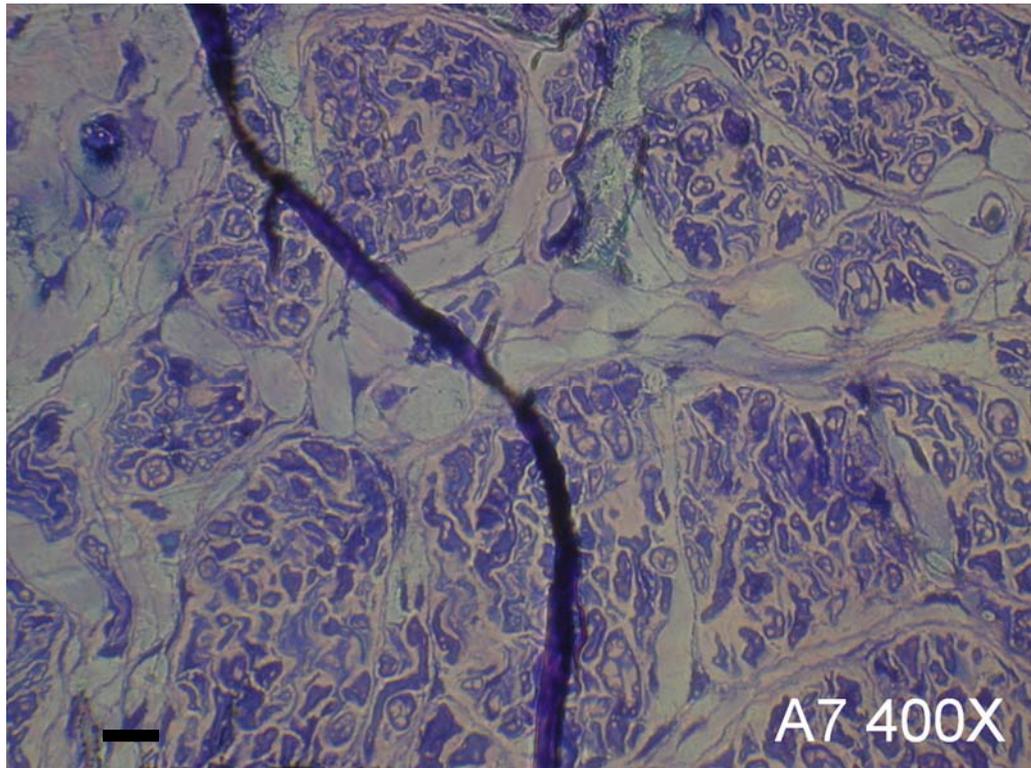


圖 4.29 對照組神經切片（橫切面, 400 倍）(scare bar=10 μ m)

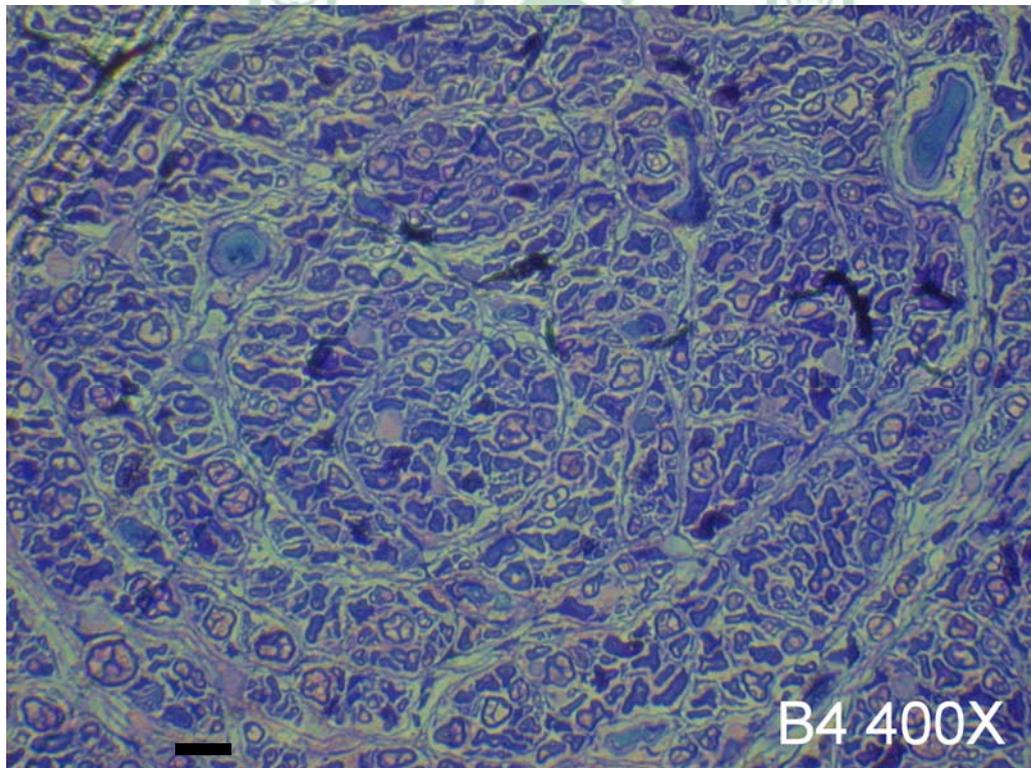
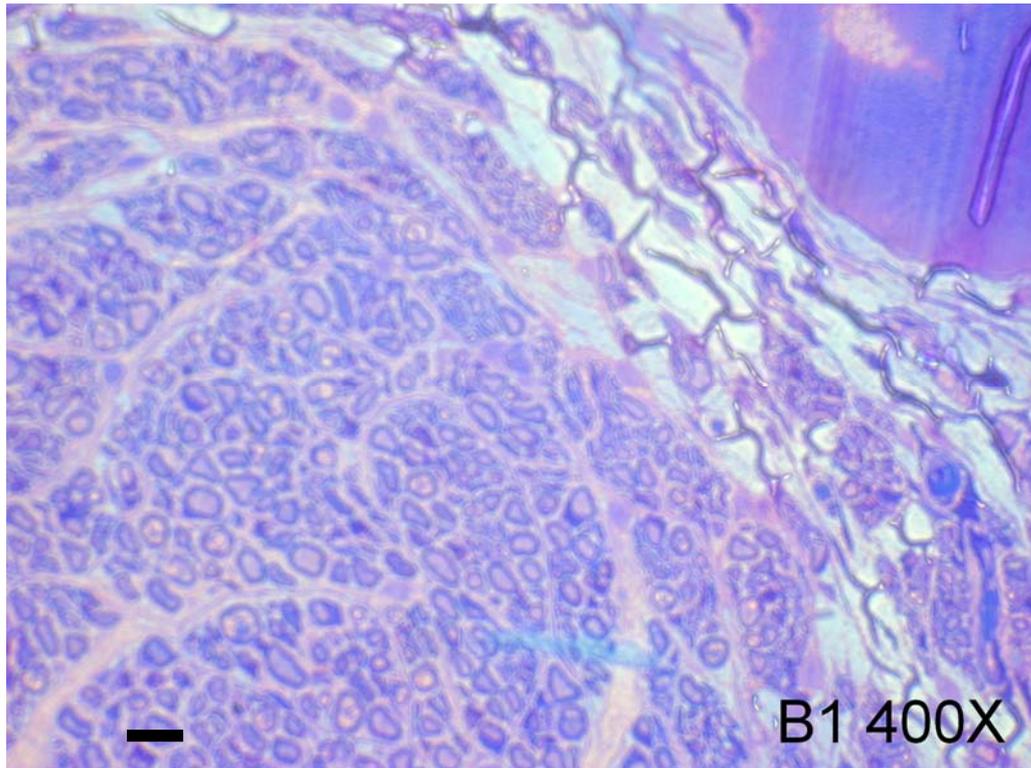


圖 4.30 實驗組神經切片（橫切面, 400 倍）(scale bar=10 μm)

4.6.4 光學顯微鏡 1000 倍鏡檢結果

在 1000 倍下做神經橫切面的鏡檢，能清楚觀察到有髓鞘及無髓鞘的神經纖維。約呈圓形的軸突染色較淺，在有髓鞘的軸突外圍，可見深染的圓環狀髓鞘。圖 4.31 為對照組神經橫切面的切片，圖 4.32 為實驗組神經橫切面的切片。兩組相較，實驗組的有髓鞘的軸突較多，軸突形狀也較大而圓。



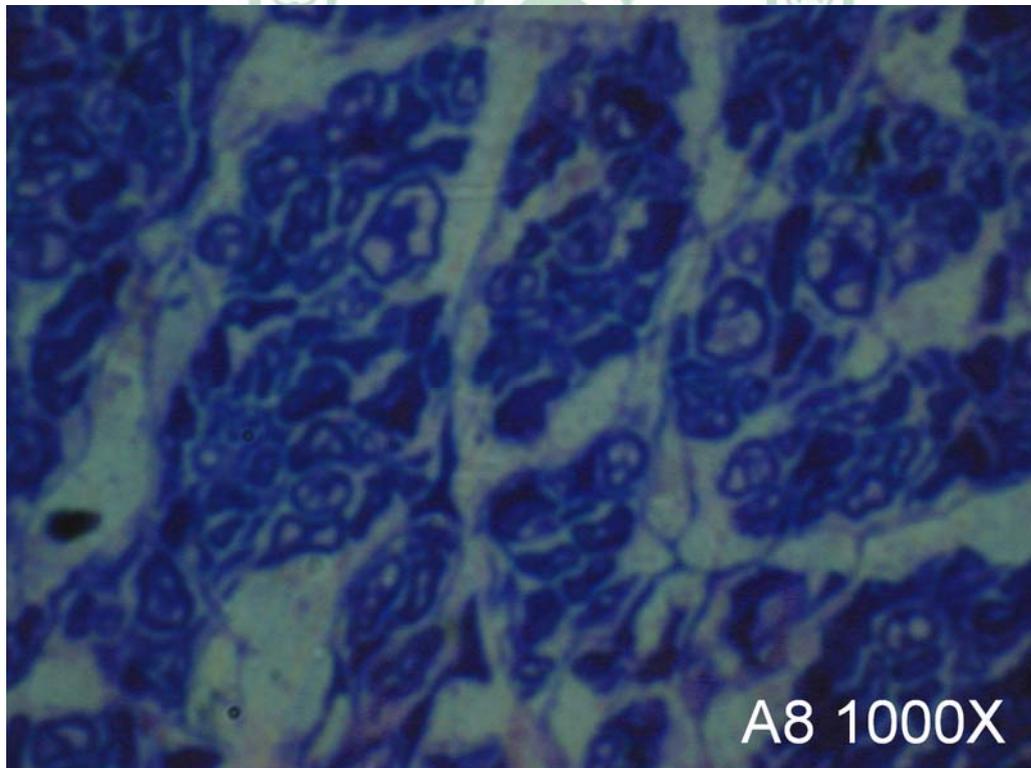
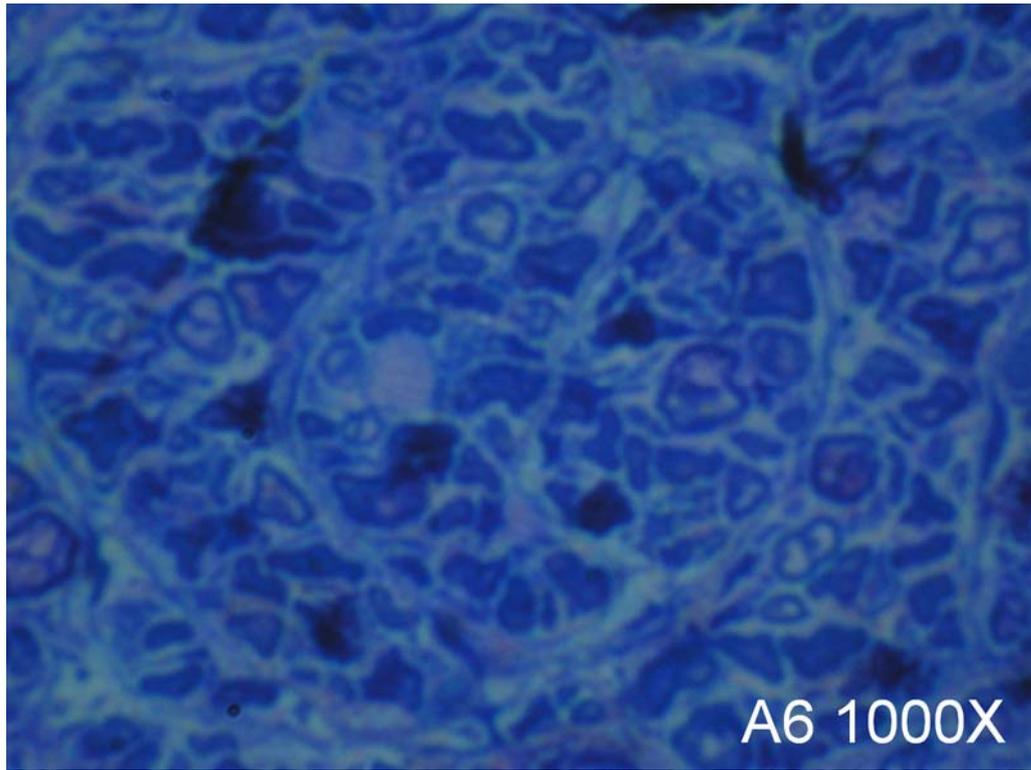


圖 4.31 對照組神經切片（橫切面, 1000 倍）(scale bar=10 μm)

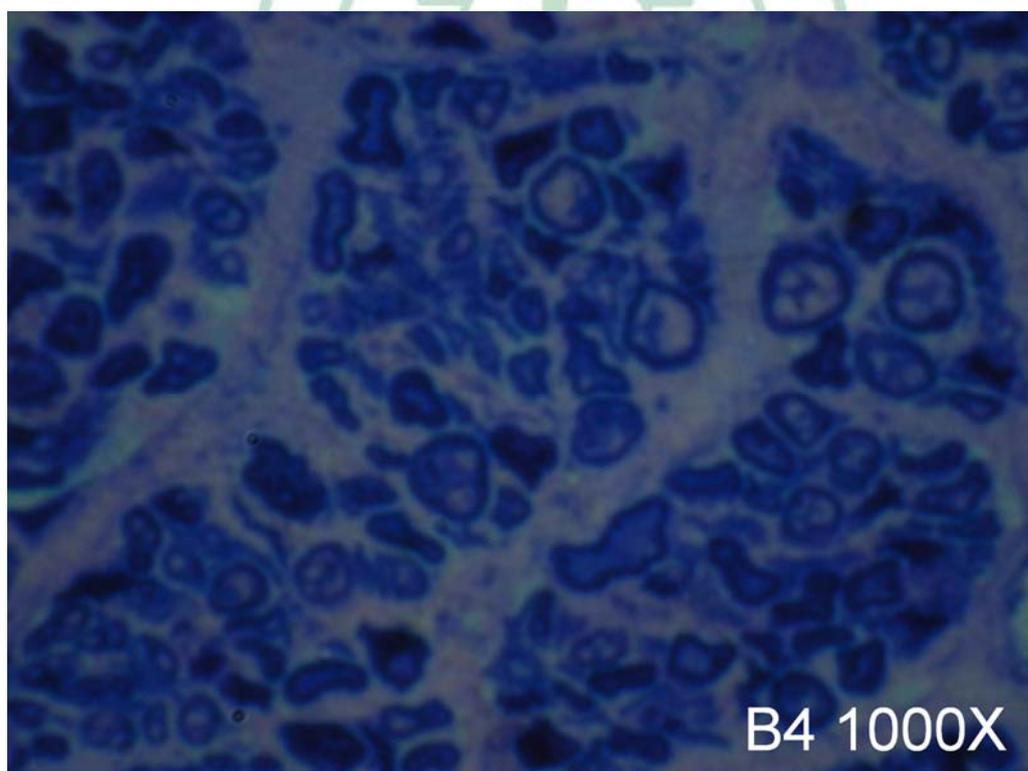
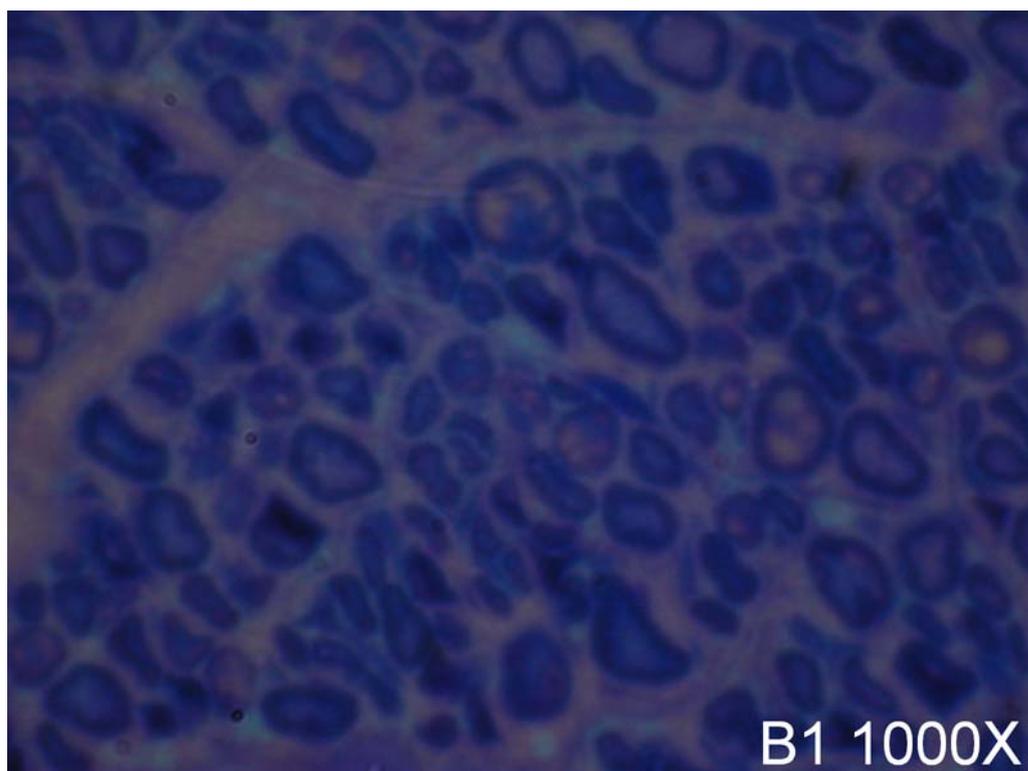


圖 4.32 實驗組神經切片（橫切面, 1000 倍）(scale bar=10 μ m)

第五章 討論

5.1 藥物

本研究所採用的藥物是臨床常用的中藥葛根。我們所以會對葛根感興趣，是因為葛根是自古以來中醫治療筋骨損傷疾患的常用藥物，例如張仲景『傷寒雜病論』中，就有以葛根湯治療「項背強几几」的記載。而且在近代的中醫臨床上，常使用葛根來治療糖尿病引發之周邊神經病變。如前面文獻回顧中所敘述，雖然葛根臨床上常用以治療周邊神經相關疾患，但並沒有文獻顯示葛根具有促進神經再生的作用。因此，我們使用葛根來作為本研究之標的藥物，來探討其對神經再生的影響。

如前面材料與方法所述，本研究所使用的葛根，是我們購買生藥材，自行經過實驗萃取濃縮而製成的粉末。我們並未採用直接將生藥材磨粉的方法。這是因為中醫傳統服藥方法，並非直接將生藥材研粉服用，而是將藥材經過浸泡、煎煮等過程，過濾後再飲用其藥湯。我們的製藥過程，也儘量模擬傳統的煎藥流程，經過浸泡、煎煮、過濾等製程，如此才能較為契合臨床上服藥的方法。

此外，我們並未直接使用科學中藥，而是自行製藥。臨床醫師都知道，不同藥廠的同一種藥物的療效，常會有頗大的差異；而且，同一家藥廠不同時期的同一種藥物，在療效上也會有所不同。這是因為各家藥廠的儀器設備不同、藥物製程不同、藥材原料來源不同，都會導致藥物療效的差異。即使是同一家藥廠，不同時期的藥材原料來源也常會因為藥價波動而改變，自然生產出來的藥物療效也會不盡穩定。況且，科學中藥中都添加了澱粉賦形劑，對實驗的影響很難評估。所以，我們為了要減少這些實驗上的變數，決定採用自行製藥的方法，而不採用現成的科學中藥粉末。

至於實驗所採用的葛根濃度，是我們經過多次製管預試驗所得的。

葛根本身富含澱粉質，與明膠兩者都有遇水後形成糊狀的特性，混合加水後黏稠度大增，會造成製管的困難。倘若葛根濃度高的話，會導致黏稠度過高，在以浸泡法製管時會產生不等的重力沉降現象，因而製出的導管會有不均勻的問題。而且，化學交聯程序也容易失敗，因為大量葛根分子將明膠分子隔開，大量減少了相鄰明膠分子間的鍵結，使得交聯度降低，導管容易在交聯過程中崩解，植入活體後也可能過快降解掉。反之，若葛根濃度太低，則不易達到促進神經生長的作用，而使實驗失去意義。於本實驗所採用之濃度，是我經過多次失敗的預試驗後，所測得的可能最佳藥物濃度。

5.2 神經導管的製備

如前面文獻回顧所敘述，膠原蛋白是最多文獻所採用的神經導管材料，因為它具有多種良好的生物特性。然而，本研究並未採用膠原蛋白，而是採用明膠為導管基本材料。這是因為明膠是膠原蛋白部分水解的產物，仍具有膠原蛋白的優點，但售價卻便宜許多。而且，如前所述，本實驗室之前的研究，已證實明膠神經導管對神經再生具有良好成效；因此我們的實驗繼續沿用明膠為神經導管的基本材料。

在交聯方法上，我們原先是使用等長交聯劑（zero-length crosslinkers）的 EDC，因為此種化學交聯劑是藉由活化明膠的 carboxyl group，提供 amino group 進行親核攻擊來發生交聯，交聯後並不會使明膠分子結構增大，而且幾乎不具毒性，可以減少交聯劑對實驗結果的干擾^[136,145]。然而，在製管過程中，我們卻遭受了挫敗。以 EDC/NHS 交聯的對照組明膠導管順利地製成了，但是實驗組的葛根明膠導管卻在交聯過程中溶解。在前面文獻回顧中指出，這是因為 EDC 本身的交聯力薄弱，而且機械強度並不會隨交聯劑劑量增加而增加，所以添加葛根後更無法有效強化材料的機械強度^[136,146]。為了解決這個問題，我們改用戊二醛作為化學交聯劑。這是因為戊二醛的交聯力很強，而且大多數的神經導管文獻係採用戊二醛來進行交聯^[25]。改用戊二醛後，神經導管順利

製造完成，但是我們起初有些擔心戊二醛的生物毒性會影響到再生神經的生長。實驗結果顯示，所有大鼠得到成功神經再生的結果，可知戊二醛的毒性效應在短期間（八週）內可能並不會顯著地表現出來，這與其他文獻採用戊二醛為交聯劑的結果相類似^[25,147]。我們起初也擔心戊二醛的毒性會加重發炎反應而對神經生長有所干擾；然而，搜尋文獻後，我們發現發炎反應對神經再生而言是有利的，這是因為巨噬細胞（macrophages）能刺激許旺細胞及纖維母細胞（fibroblasts）增殖，它們能分泌神經營養因子（neurotrophic factors）以促進神經生長^[171-174]。而且，巨噬細胞能釋出 interleukin-1 (IL-1)，IL-1 能促進神經生長因子（nerve growth factor, NGF）合成，並且增加許旺細胞上的神經生長因子接受器（NGF receptors）密度，進而促進神經再生^[175-176]。圖 5.1 為神經導管內神經再生機制的簡圖，可知發炎反應對神經再生具有誘發作用。

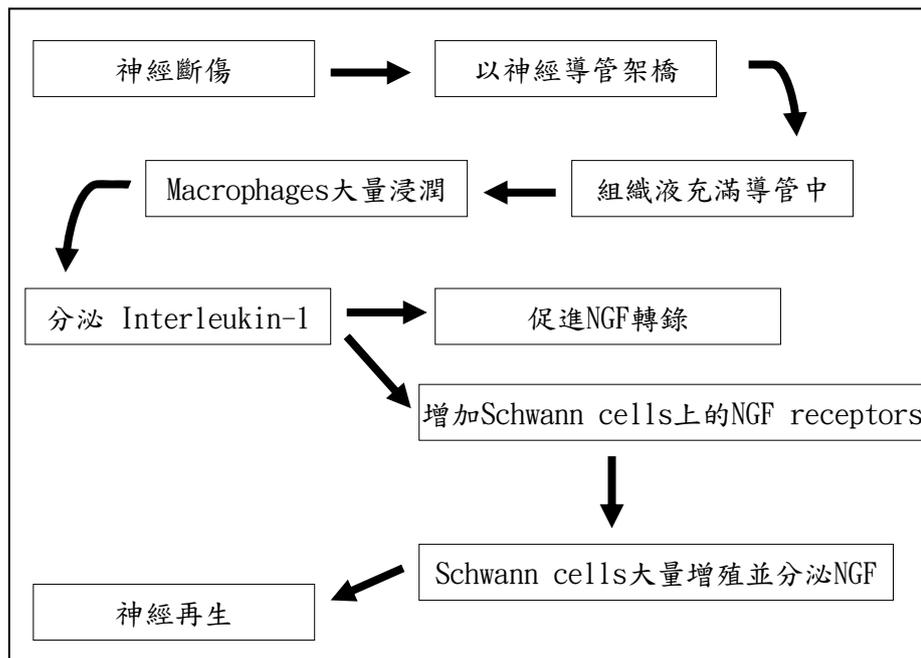


圖 5.1 神經導管內之神經再生機制圖

5.3 大鼠植管後 0~8 週的狀態觀察

在大鼠的厭食和自殘行為兩個變項上，實驗組與對照組間沒有出現統計上的差異，是可以預期的。兩組中，僅有一隻實驗組大鼠發生厭食行為，我們推測這可能是該鼠個別的體質問題，而非實驗所導致的。因為，如果是實驗導致厭食行為，應該會有更多的該組的大鼠出現這種厭食現象才對。在自殘行為上，實驗組比對照組略高一點，我們推測應與大鼠的習性有關，應該不是添加葛根所導致的影響。

在觀察導管的降解程度上，一般而言，實驗組的降解程度看起來要比對照組來的好。雖然兩組並未達到統計上的顯著差異，但在統計學上，樣本數少時本來就會比樣本數多時更不容易達到統計上的顯著差異。我們推測，由於實驗組導管添加葛根，其結構原本就不如對照組的明膠導管來的緻密；而且，進行化學交聯時，由於葛根分子卡在明膠分子間，使得兩明膠分子間的距離增加，結構較為分散，對戊二醛促使相鄰明膠分子產生交聯鍵結的作用較為不利；反之，對照組明膠分子結構較為接近而緊密，戊二醛能完全促使相鄰明膠分子產生鍵結，自然交聯後的機械強度會比實驗組良好。其結果，就是實驗組導管在大鼠體內會降解得比對照組來的快。如果觀察時間增長，或是大鼠數目增加，有可能就會出現統計上的顯著差異，但是否如此，尚需後續實驗驗證。

在再生神經的觀察上，所有大鼠均出現肉眼可見的再生神經，但其中有一隻對照組大鼠 A1 的再生神經特別細小，與他鼠截然不同。在將該鼠解剖時，我們發現在原先的兩神經斷端之間並沒有出現黃色的導管殘餘物，研判可能是在神經導管接合手術後發生縫線鬆脫的意外，大鼠術後活動致使導管鬆脫。雖然如此，我們觀察到在兩斷端間仍有極微細的神經相連，並能成功加以分離出來。此神經明顯較其餘大鼠的再生神經微細甚多，足見在沒有導管支持的情況下，仍會有神經再生的情況發生，但其神經生長情況則遠較有導管支持者來的不好。

5.4 神經電生理評估

神經電生理的檢測結果是值得振奮的。因為在潛期和神經傳導速率上，兩組間達到統計上的顯著差異。神經功能愈好，潛期應該愈短，波期、振幅、波下面積愈大，神經傳導速率愈快。我們的實驗結果顯示，實驗組的潛期小於對照組，波期、振幅、波下面積皆大於對照組，神經傳導速率也比對照組顯著地快。也就是說，添加葛根對神經的再生與功能恢復，是有幫助的。

波期、振幅、波下面積三個變項未能達到統計上的顯著差異，我們推測應與樣本數太少有關。理論上，樣本數少時較不容易達到統計上的顯著差異。如果樣本數增加，或者植管後飼養時間增長，或許就能達到顯著差異，但是否如此，尚需後續實驗驗證。

電生理評估中，最具代表性的指標為潛期和神經傳導速率^[15,44,100]，振幅^[100]及波下面積^[13]則具次要參考性，波期則較少使用。我們的研究在潛期和神經傳導速率上，已達到統計上的顯著差異。

在電生理的量測上，A1 大鼠也出現動作電位，足見其亦有神經再生，但其波形微小，與他鼠甚為不同。如圖 5.1 所示，有葛根的實驗組的動作電位，要比無葛根的對照組來的大；而對照組的其它大鼠動作電位，又比導管脫落的 A1 大鼠來的大。由此可見，在神經再生與功能恢復上，有神經導管者比無導管者具有明顯助益；而在有導管的情況下，添加葛根的導管又比無加藥的導管更有助益。

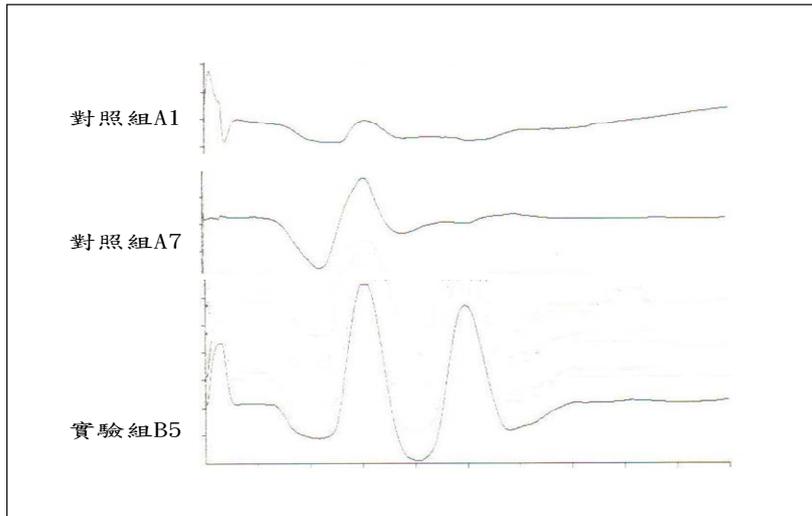


圖 5.2 動作電位比較圖

5.5 再生神經組織學切片評估

在第四章中，我們已經藉由鏡檢的照片，進行 40、100、400、1000 倍的橫切面、縱切面、斜切面等比較與分析。可以確定的是，對照組與實驗組皆觀察到明顯的再生神經組織，且皆能看到有髓鞘的軸突，證明兩組皆有橫跨斷面的成功神經再生。在低倍鏡檢上，可見實驗組的神經纖維束較對照組為緻密，對照組的神經組織則顯得較為鬆散。這是因為實驗組的神經纖維較多，因而壓迫周遭的結締組織，故觀察上較為緻密。對照組的再生神經較少，故結構顯得較為鬆散。在高倍鏡檢上，可見實驗組比對照組有較多的有髓鞘的軸突，形狀也較大而規則。

第六章 結論

我們的研究係以明膠為基本材料，加入葛根濃縮粉末，並以戊二醛來進行化學交聯，製成長度 12 mm，內徑約為 1.7 mm，外徑約為 2.5 mm 的可降解性實驗組葛根明膠神經導管。對照組則製備不含葛根的明膠神經導管。兩組各採用 10 隻雌性 SD 大鼠，截斷坐骨神經 10 mm，將導管植入後飼養八週，然後將大鼠犧牲收成，以解剖目測觀察、電生理、組織學方法評估神經再生情形。結果顯示，兩組皆可以肉眼觀察到橫跨斷面的成功神經再生，而且導管降解情況良好。在電生理評估上，實驗組在潛期及神經傳導速率上，比對組組有良好的表現，而且已達到統計上的顯著差異。在組織學評估上，可以觀察到實驗組的再生神經比對照組更為緻密，有髓鞘的軸突較多，軸突形狀也較大而圓。因此，我們的結論是，葛根明膠神經導管，比未加葛根的導管，更能促進神經的再生與神經功能的恢復。本研究尚有許多改善空間，葛根對神經再生的作用與機轉，仍需後續的研究來進一步加以探討。

參考文獻

- 1 National Institutes of Health (NIH). The working definition of bioengineering. July 24, 1997
- 2 Clemson University Advisory Board for Biomaterials “Definition of the word biomaterial”. The 6th Annual International Biomaterial Symposium. April 20-24, 1974
- 3 陳百萬：生物醫學工程學. 1st ed. 北京科學出版社. 1997
- 4 Tang CM, Lin FT, Chang CJ, Chen CY, Hsu SH. Evaluation of chitosan-polyvinyl alcohol guidance conduit for peripheral nerve regeneration. In: Anonymous 台灣生物醫學工程研討會. 2002
- 5 Nyilas E, Chiu TH, Sidman RL, Henry EW, Brushart TM, Dikkes P, Madison R. Peripheral nerve repair with bioabsorbable prosthesis. *Trans Am Soc Artif Intern Organs*. 1993;29:307-13
- 6 許富銀、鄭明鎮、王盈錦：膠原蛋白在醫學上的應用. *生物產業*. 1998;9:21-6
- 7 Mackinnon SE, Hudson AR, Bojanowski V, Hunter DA, Maraghi E. Peripheral nerve injection injury with purified bovine collagen—an experimental model in the rat. *Ann Plast Surg*. 1985;14:428-36
- 8 Malette WG. Chitosan effect in vascular surgery, tissue culture and tissue regeneration. In: Muzzarelli R ed. *Chitin in nature and technology*. New York. 1985;435
- 9 匡勇、侯春林、苟三懷：幾丁質及幾丁糖與雪旺氏細胞相容性的實驗研究. *中國修復重建外科雜誌*. 1998;12:90-4
- 10 Dillon GP, Yu X, Sridharan A, Ranieri JP, Bellamkonda RV. The influence of physical structure and charge on neurite extension in a 3D hydrogel scaffold. *J Biomater Sci Polym Ed*. 1998;9:1049-69
- 11 Bigi A, Cojazzi G, Panzavolta S, Roveri N, Rubini K. Stabilization of gelatin films by crosslinking with genipin. *Biomaterials*.

- 2002;23:4827-32
- 12 Yao CH, Liu BS, Chang CJ, Hsu SH, Chen YS. Preparation of networks of gelatin and genipin as degradable biomaterials. *Materials Chemistry and Physics*. 2004;83:204-8
 - 13 章如瑛：以綠梔子素交聯明膠製造降解性神經導管之研究評估。中國醫藥大學中國醫學研究所 碩士論文。2004
 - 14 葉宗樹：綠梔子素交聯明膠充填矽膠管於修復截斷大鼠坐骨神經再生影響之評估。中國醫藥大學中國醫學研究所 碩士論文。2002
 - 15 Chen YS, Chang JY, Cheng CY, Tsai FJ, Yao CH, Liu BS. An in vivo evaluation of a biodegradable genipin-cross-linked gelatin peripheral nerve guide conduit material. *Biomaterials*. 2005;26:3911-18
 - 16 Tu R, Lu C, Shen S, Wang E, Hata C, Lin D, Quijano RC. A preliminary study of the reaction mechanism of collagen fixation with a polyepoxy fixative. *Artif Organs*. 1992; 16:533-44
 - 17 Sung HW, Shen SH, Tu R, Lin D, Hata C, Noishiki Y, Tomizawa Y, Quijano RC. Comparison of cross-linking characteristics of porcine heart valves fixed with glutaraldehyde or epoxy compounds. *ASAIO J*. 1993; 39:532-36
 - 18 Tu R, Lu CL, Thyagarajan K, Wang E, Nguyen H, Shen S, Hata C, Quijano RC. Kinetic study of collagen with polyepoxy fixatives. *J Biomed Mater Res*. 1993;27:3-9
 - 19 Esposito E, Cortesi R, Nastruzzi C. Gelatin microspheres: Influence of preparation parameters and thermal treatment on chemico-physical and biopharmaceutical properties. *Biomaterials*. 1996; 17:2009-20
 - 20 Illum L, Davis SS. *Polymers in controlled drug delivery*. Wright Bristol. 1987;73-86
 - 21 梁晃千：以天然交聯劑 Genipin 交聯明膠的藥物釋放微粒載體體內與體外性質評估。中央大學化學工程研究所 碩士論文。2000
 - 22 Murayama Y, Satoh S, Oka T, Imanishi J, Noishiki Y. Reduction of the antigenicity and immunogenicity of xenografts by a new cross-linking

- reagent. *Trans Am Soc Artif Intern Organ.* 1988;34:546-9
- 23 Nimni ME, Cheung D, Strates B, Odama MK, Sheikh K. Bioprosthesis derived from cross-linked and chemically modified collagenous tissues. Nimni, M.E.ed *Collagen, Biotechnology.* Florida, CRC Press, Inc. 1988;3:1-37
- 24 Koo HJ, Song YS, Kim HJ, Lee YH, Hong SM, Kim SJ, Kim BC, Changbae J, Lim CJ, Park EH. Anti-inflammatory effects of genipin, a active principle of gardenia. *Eur J Pharmacol.* 2004;495:201-8
- 25 Young S, Wong M, Tabata Y, Mikos AG. Gelatin as a delivery vehicle for the controlled release of bioactive molecules. *J Control Release.* 2005; 256- 274
- 26 Goran Lundborg: *Nerve injury and repair.* 2nd ed. Elsevier Churchill livingstone. 2004
- 27 Liu BS, Yao CH, Hsu SH, Chen YS, Kao ST. A novel use of genipin-fixed gelatin as extracellular matrix for peripheral nerve regeneration. *J Biomater Appl.* 2004;19: 21-34
- 28 Jiang Bo, Bao YM, Li ZG, Cheng L, An LJ. Protection by puerarin against MPP+-induced neurotoxicity in PC12 cells mediated by inhibiting mitochondrial dysfunction and caspase-3-like activation. *Neurosci Res.* 2005;53:183-188
- 29 Sawatsri S, Yamkunthong W, Sidell N. Pueraria Mirifica initiative promotes the cellular mechanism of neuronal survival in neuron human neuroblastoma cells. Poster Session P3: Molecular Mechanisms of Neurodegeneration-Apoptosis S414
- 30 Seddon H. Three types of nerve injury. *brain.* 1943;66:237-88.
- 31 Seddon H. *Surgical disorders of the peripheral nerves.* 1st ed. Edinburgh: Churchill livingstone; 1972.
- 32 Seddon H. *Peripheral nerve injuries.* Medical research Council Special Report Series 282. London: Her Mafesty's Stationery Office; 1954

- 33 Sunderland S. Nerves and nerve injuries. 2nd ed. Edinburgh: Churchill livingstone; 1978.
- 34 Sunderland S. A classification of peripheral nerve injuries producing loss of function. *Brain*. 1951;74:491-516.
- 35 Chen YS. Development of a multiple-lumen nerve cuff utilizing growth stimulant patterns for controlled regeneration. Iowa State University, PHD dissertation 1998.
- 36 Terris DJ, Fee WE. Current issues in nerve repair. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1993;119(7):725-31
- 37 Millesi H. Interfascicular nerve grafting. *Orthop Clin North Am*. 1981;12(2):287-301
- 38 Cabaud HE, Rodkey WG, McCarroll HR. Peripheral nerve injuries: studies in higher nonhuman primates. *J Hand Surg Amer*. 1980;5(3):201-6
- 39 Narakas A. The use of fibrin glue in repair of peripheral nerves. *Orthop Clin North Am*. 1988;19(1):187-99
- 40 Nishihira S, McCaffrey TV. Repair of motor nerve defects: comparison of suture and fibrin adhesive techniques. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 1989;100(1):17-21
- 41 Maragh H, Hawn RS, Gould JD, Terzis JK. Is laser nerve repair comparable to microsuture coaptation? *J Reconstr Microsurg*. 1988;4(3):189-95
- 42 Bailes JE, Cozzens I, Hudson JW, Kline AR, Ciric DG, Gianaris P, Bernstein LP, Hunter D. Laser-assisted nerve repair in primates. *J Neurosurg*. 1989;71(2):266-72
- 43 Doolabh VB, Hertl MC, Mackinnon SE. The role of conduits in nerve repair: a review. *Rev Neurosci*. 1996;7(1):47-84
- 44 Kiyotani T, Teramachi M, Takimoto Y, Nakamura T, Shimizu Y, Endo K. Nerve regeneration across a 25-mm gap bridged by a polyglycolic acid-collagen tube: a histological and electrophysiological evaluation of regenerated nerves. *Brain Res*. 1996;740(1-2):66-74

- 45 Grace J, Daniel S, Stevens T, Shankar KK, Walker Z, Byrne EJ, Butler S, Wilkinson D, Woolford J, Waite J, McKeith IG. Long-term use of rivastigmine in patients with dementia with Lewy bodies: an open-label trial. *Int Psychogeriatr*. 2001;13(2):199-205
- 46 韓秀珍、朱兵：脈·經脈·經絡—細筋·系·神經：經絡概念的內涵演化與神經的聯繫. *中國針灸*. 2002;22(11):779-82
- 47 利瑪竇：西國記法. 原本篇第一. 臺灣學生書局. 1982
- 48 範行准：明季傳入之西洋醫學. 卷一. 中華醫史學會. 1943
- 49 張錫純：醫學衷中參西錄. 河北科學技術出版社
- 50 邱根全、王銳、劉映、何群英、孫喜才：中醫對腦的重新認識. *陝西中醫*. 1999;20(1):22-3
- 51 謝慶良：中國醫藥大學學士後中醫學系內經授課講義---中樞神經系統的五臟論.
- 52 勞紹賢：脾虛證候的現代研究概況. *新中醫*. 1985;(9):49.
- 53 張萬岱：加強脾虛證本質的研究. *中國中西醫結合脾胃雜誌*. 1996;4(1):3.
- 54 鄺安堃：陽虛（甲狀腺功能減退）和陰虛（甲狀腺功能亢進）病人血漿環核苷酸的對比. *中醫雜誌*. 1979;7:21
- 55 陳奇：CAMP CGMP與中醫陰陽學說. *江西中醫藥*. 1980;2:10
- 56 蔣大宗：對經絡實質的一種猜想及開展研究的建議. *中國醫療器械雜誌*. 2002;26(4):235-7
- 57 張友時、李瑞午：經絡實質探討：觸發點-細胞通訊-神經系統-細胞通訊假說. *科技導報*. 1999;11:13-5
- 58 宋繼美：肥大細胞與經絡現象. *遼寧中醫雜誌*. 1977; 4(2):59-61
- 59 李定宗、李秀章：經穴皮部挑治與深刺的fMRI對比研究. *中國針灸*. 2000;20(8):533
- 60 Davydov AS , Kislukha NJ. Solitary excitations in one-dimensional molecular chain. *Phys Stat Solb*. 1973; 59:465-70
- 61 羅玉輝、龐小峰、劉盛綱：生物能量傳遞新模型中的孤立子特性研究. *原子與分子物理學報*. 2001;18(3):278-80

- 62 葉建紅：非線性系統理論與經絡能量轉移. 西南國防醫藥. 2002; 12(2):109-10
- 63 胡翔龍、程莘農：金針之魂——經絡的研究. 湖南科學技術出版社, 1995
- 64 郭明霞：經絡的物質基礎、循經感傳及其作用機制研究與進展. 中國臨床康復. 2004;8(25):5353-5
- 65 費倫：經絡物質基礎及其功能性特徵的實驗探索和研究展望. 科學通報. 1998, 43(6):658-72
- 66 郭義、張艷軍、張克蘭：鈣離子是經絡活動的關鍵因素之一. 中國中醫基礎醫學雜誌. 1988;4(7):49
- 67 商成、樓宇偉、萬三：生物電化學振盪：一項可能對探索中醫機理有重要意義的研究. 科技導報. 1991;3:37-40
- 68 張燕華：經絡-神經-內分泌-免疫網絡. 華西醫學. 1998;13(3):316-7
- 69 趙晏、孫啟新、張世紅、賈軍、曹東元、郭媛：多種神經遞質參與外周跨節段資訊傳遞. 針刺研究. 2002; 27(4):298-302
- 70 張育文：針刺曲池、臂臑穴對人中、承漿穴區兒茶酚胺陽性神經的影響. 同濟醫科大學學報. 1998; 1:27
- 71 劉裏遠：針刺促進經線皮膚釋放兒茶酚胺的實驗研究. 上海針灸雜誌. 1997; 4:32
- 72 趙晏：神經激肽A與經絡資訊的傳遞. 西安醫科大學學報. 1997; 2:149
- 73 陳道亮、萬隆、謝建珍：家兔急性低氧耐受力的測定及在經絡研究中的初步應用. 福建中醫學院學報. 1999; 3:15
- 74 王戰朝：名老中醫李金明診療周圍神經損傷經驗. 中國中醫骨傷科雜誌. 2000;8(1):62-3
- 75 石關桐、石印玉、李義凱：補陽還五湯對神經損傷修復的實驗研究. 中國中醫骨傷科雜誌, 1997;5 (5): 1
- 76 高飛、王明喜、李新沁：足印測定法評價補陽還五湯對周圍神經再生的作用. 中醫正骨, 1997;9 (2): 20
- 77 陳德松：五種藥物對小鼠周圍神經再生影響的實驗研究. 手外科雜誌, 1989;5:159

- 78 聶小圃：周圍神經損傷從血痹論治. 湖北中醫雜誌, 1997;19(6): 32
- 79 孫忠人、梅晨健、宋春華：針刺對大鼠坐骨神經損傷模型組織形態學改變影響的實驗研究. 中國中醫藥科技. 1998;5 (1): 1
- 80 馬健、唐啟華、郭容經：電針、推拿和紅外線理療治療周圍神經損傷的比較實驗研究：對損傷神經影響的組織學、細胞學研究. 中國運動醫學雜誌, 1997;16 (1): 22
- 81 邵水金、單寶枝、余安勝：電針對大鼠坐骨神經損傷後軸突轉運的影響. 針刺研究, 1998;23 (1): 66
- 82 何建宜：不同頻率電針刺激經矽膠管修護之截斷大鼠坐骨神經再生影響. 中國醫藥大學中國醫學研究所碩士論文
- 83 Gerburg K, Felix S, Gerald W, Hisham F. Bio-compatibility of type I-III collagen matrix for peripheral nerve reconstruction. *Biomaterials*. 2003;24:2779-87
- 84 Midha R, Shoichet MS, Dalton PD, Cao X, Munro CA, Noble J, Wong MK. Tissue engineered alternatives to nerve transplantation for repair of peripheral nervous system injuries. *Transplant Proc*. 2001;33:612-5
- 85 Chamberlain LJ, Yannas IV, Hsu HP, Strichartz G, Spector M. Collagen-GAG substrate enhances the quality of nerve regeneration through collagen tubes up to level of autograft. *Exp Neurol*. 1998;154:315-29
- 86 McDaniel Jr. HE. Tissue engineered collagen nerve guidance channels. In: Stark GB, Horch R, Tanosz E, editors. *Biological matrices and tissue reconstruction*. Heidelberg: Springer. 1998;237-42
- 87 Yoshii S, Oka M. Collagen filaments as a scaffold for nerve regeneration. *J Biomed Mater Res*. 2001;5:400-5
- 88 Sieminski AL, Gooch KJ. Biomaterial-microvasculature interactions. *Biomaterials*. 2000;21:2233-41
- 89 Schmidt CE, Baier JM. Acellular vascular tissues: natural biomaterials for tissue repair and tissue engineering. *Biomaterials*. 2000;21:2215-31
- 90 Sieminski AL, Gooch KJ. Biomaterial - microvasculature interactions.

- Biomaterials. 2000;21:2233-41
- 91 Schmidt CE, Baier JM. Acellular vascular tissues: natural biomaterials for tissue repair and tissue engineering. *Biomaterials*. 2000;21:2215-31
 - 92 Chi H, Horie H, Hikawa N, Takenaka T. Isolation and age-related characterization of mouse Schwann cells from dorsal root ganglion explants in type I collagen gels. *J Neurosci Res*. 1993; 35:183-7
 - 93 Terzis JK, Sun DD, Thanos PK. History and basic science review: past, present, and future of nerve repair. *J Reconstr Microsurg*. 1997;13:215-25
 - 94 Fansa H, Keilhoff G, Wolf G, Schneider W. Tissue engineering of peripheral nerves: a comparison of venous and acellular muscle grafts with cultured Schwann cells. *Plast Reconstr Surg*. 2001;107:485-94
 - 95 Fansa H, Keilhoff G, Forster G, Seidel B, Wolf G, Schneider W. Acellular muscle with Schwann-cell implantation: an alternative biologic nerve conduit. *J Reconstr Microsurg*. 1999;15:531-7
 - 96 Fansa H, Dodic T, Wolf G, Schneider W, Keilhoff G. Tissue engineering of peripheral nerves — epineurial grafts with application of cultured Schwann cells. *Microsurgery*. 2003;23:72-7
 - 97 Felix S, Hisham F, Gerald W, Michael R, Gerburg K. Structural parameters of collagen nerve grafts influence peripheral nerve regeneration. *Biomaterials*. 2005;26:3083-91
 - 98 Tetsuya K, Masayoshi T, Yukinobu T, Tatsuo N. Nerve regeneration across a 25-mm gap bridged by a polyglycolic acid-collagen tube: a histological and electrophysiological evaluation of regenerated nerves. *Brain Research*. 1996;740:66-74
 - 99 Satoru Y, Masanori O, Mitsuhiro S, Ataru T, Masao A. 30 mm regeneration of rat sciatic nerve along collagen filaments. *Brain Research*. 2002;949:202-8
 - 100 Kazuya M, Katsunori O, Tetsuya K, Takashi S, Hiroki U, Tatsuo N, Katsuaki E, Yasuhiko S. Peripheral nerve regeneration across an 80 mm gap bridged by a polyglycolic acid (PGA)-collagen tube filled with

- laminin-coated collagen fibers: a histological and electrophysiological evaluation of regenerated nerves. *Brain Research*. 2000;868:315-28
- 101 Asghar A, Henrickson RL. Chemical, biochemical, functional, and nutritional characteristics of collagen in food systems. *Adv Food Res*. 1982;28:231-372
- 102 Farrugia CA, Farrugia IV, Groves MJ. Comparison of the molecular weight distribution of gelatin fractions by sizeexclusion chromatography and light scattering. *Pharm Pharmacol Commun*. 1998;4:559-62
- 103 Saddler JM, Horsey PJ. The new generation gelatins. A review of their history, manufacture and properties. *Anesthesiology*. 1987;42:998-1004
- 104 Courts A. The N-terminal amino acid residues of gelatin: 2. Thermal degradation. *Biochem J*. 1954;58:74-9
- 105 Simon Y, Mark W, Yasuhiko T, Antonios GM. Gelatin as a delivery vehicle for the controlled release of bioactive molecules. *J Controll Release*. 2005;109:256-74
- 106 David O, Chunlin Y, Michael B, Robert C, Scott L, Julio B, David C, Maritta P, Eija-Riitta H, Marko J, James P. Recombinant collagen and gelatin for drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*. 2003;55:1547-67
- 107 Kawai K, Suzuki S, Tabata Y, Ikada Y, Nishimura Y. Accelerated tissue regeneration through incorporation of basic fibroblast growth factor-impregnated gelatin microspheres into artificial dermis. *Biomaterials*. 2000;21:489-99
- 108 Balakrishnan B, Jayakrishnan A. Self-cross-linking biopolymers as injectable in situ forming biodegradable scaffolds. *Biomaterials*. 2005;26:3941-51
- 109 Yamamoto M, Ikada Y, Tabata Y. Controlled release of growth factors based on biodegradation of gelatin hydrogel. *J Biomater Sci. Polym Ed*. 2001;12:77-88
- 110 Kuijpers AJ, PB van Wachem, MJ van Luyn, Plantinga JA, Engbers GH, Krijgsveld J, Zaat SA, Dankert J, Feijen J. In vivo compatibility and

- degradation of crosslinked gelatin gels incorporated in knitted Dacron. *J Biomed Mater Res.* 2000;51:136-45
- 111 Yao CH, Liu BS, Hsu SH, Chen YS, Tsai CC. Biocompatibility and biodegradation of a bone composite containing tricalcium phosphate and genipin crosslinked gelatin. *J Biomed Mater Res.* 2004;69A:709-17
- 112 Kuijpers AJ, Engbers GH, Krijgsveld J, Zaat SA, Dankert J, Feijen J. Cross-linking and characterization of gelatin matrices for biomedical applications. *J Biomater Sci. Polym Ed.* 2000;11:225-43
- 113 Chenite A, Chaput C, Wang D, Combes C, Buschmann MD, Hoemann CD, Leroux JC, Atkinson BL, Binette F, Selmani A. Novel injectable neutral solutions of chitosan form biodegradable gels in situ. *Biomaterials.* 2000;21: 2155-61
- 114 Ouattara B, Simard RE, Piette G, Begin A, Holley RA. Inhibition of surface spoilage bacteria in processed meats by application of antimicrobial films prepared with chitosan. *Microbiology.* 2000;62:139-48
- 115 Kofuji K, Ito T, Murata Y, Kawashima S. The controlled release of a drug from biodegradable chitosan gel beads. *Chem Pharm Bull.* 2000;48: 579-81
- 116 Sato M, Maeda M, Kurosawa H, Inoue Y, Yamauchi Y, Iwase H. Reconstruction of rabbit Achilles tendon with three bioabsorbable materials: histological and biomechanical studies. *J Orthop Sci.* 2000;5: 256-67
- 117 Mi FL, Shyu SS, Wu YB, Lee ST, Shyong JY, Huang RN. Fabrication and characterization of a sponge-like asymmetric chitosan membrane as a wound dressing. *Biomaterials.* 2001;22:165-73
- 118 Sato M, Maeda M, Kurosawa H, Inoue Y, Yamauchi Y, Iwase H. Reconstruction of rabbit Achilles tendon with three bioabsorbable materials: histological and biomechanical studies. *J Orthop Sci.* 2000;5: 256-67

- 119 Mi FL, Shyu SS, Wu YB, Lee ST, Shyong JY, Huang RN. Fabrication and characterization of a sponge-like asymmetric chitosan membrane as a wound dressing. *Biomaterials*. 2001;22:165-73
- 120 Yamaguchi I, Tokuchi K, Fukuzaki H, Koyama Y, Takakuda K, Monma H, Tanaka J. Preparation and microstructure analysis of chitosan / hydroxyapatite nanocomposites. *J Biomed Mater Res*. 2001;55:20-7
- 121 Tomihata K, Ikada Y. In vitro and in vivo degradation of films of chitin and its deacetylated derivatives. *Biomaterials*. 1997;18:567-75
- 122 Knaul JZ, Hudson SM, Creber KAM. Improved mechanical properties of chitosan fibers. *J Appl Polym Sci*. 1999;72:1721-32
- 123 Taguchi T, Kishida A, Akashi M. Apatite formation on/in hydrogel matrices using an alternate soaking process. *Chem Lett*. 1998;8:711-12
- 124 Taguchi T, Kishida A, Akashi M. Apatite formation on/in hydrogel matrices using an alternate soaking process. II. Effect of swelling ratios of poly(vinyl alcohol) hydrogel matrices on apatite formation, *J Biomater Sci Polym Ed*. 1999;10: 331-39
- 125 Taguchi T, Kishida A, Akashi M. Apatite formation on/in hydrogel matrices using an alternate soaking process. III. Effect of physicochemical factors on apatite formation on/in poly(vinyl alcohol) hydrogel matrices. *J Biomater Sci Polym Ed*. 1999;10:795-804
- 126 Lee YL, Khor E, Ling CE. Effects of dry heat and saturated steam on the physical properties of chitosan. *J Biomed Mater Res Appl Biomater*. 1999;48:111-16
- 127 Lim LY, Wan LSC. Treatment of chitosan films. *Drug Dev Ind Pharm*. 1995;21: 839-46
- 128 Rao SB, Sharma CP. Sterilization of chitosan. *J Biomater Appl*. 1995;10:136-43
- 129 Soichiro I, Isamu Y, Kenichi S, Junzo T. Development of the chitosan tube prepared from crab tendon for nerve regeneration. *Science and Technology of Advanced Materials*. 2003;4:261-268

- 130 Isamu Y, Soichiro I, Masumi S, Akiyoshi O, Junzo T. The chitosan prepared from crab tendons: II. The chitosan / apatite composites and their application to nerve regeneration. *Biomaterials*. 2003;24:3285-92
- 131 Soichiro I, Isamu Y, Masumi S, Shizuko I, Kazuo T, Hisatoshi K, Kenichi S, Junzo T. Hydroxyapatite-coated tendon chitosan tubes with adsorbed laminin peptides facilitate nerve regeneration in vivo. *Brain Research*. 2003;993:111-23
- 132 Tabata Y, Nagano A, Ikada Y. Biodegradation of hydrogel carrier incorporating fibroblast growth factor. *Tissue Eng*. 1999; 5:127-38.
- 133 Yamazaki M, Chiba T. Neuritogenic effect of natural iridoid compounds on PC12h cells and its possible relation to signaling protein kinases. *Biol Pharm Bull*. 1996;19:791-5
- 134 Yamazaki M, Chiba K, Mohri T, Hatanaka H. Cyclic GMP-dependent neurite outgrowth by genipin and nerve growth factor in PC12h cells. *Eur J Pharmacol*. 2004;488:35-43
- 135 Tabata Y, Hijikata S, Ikada Y. Enhanced vascularization and tissue granulation by basic fibroblast growth factor impregnated in gelatin hydrogels. *J Control Release*. 1994;31:189-99
- 136 Damink O, Dijkstra LHH, Luyn PJ, MJA van Wachem, PB van Nieuwenhuis, Feijen J. Cross-linking of dermal sheep collagen using a water-soluble carbodiimide. *Biomaterials*. 1996;17:765-73
- 137 Soichiro I, Kazuo T, Sigenori K, Yu A, Kanae K, Hiroshi I, Kenichi S. Evaluation of cross-linking procedures of collagen tubes used in peripheral nerve repair. *Biomaterials*. 2002;23:4475-81
- 138 Lee H, Cheung DT, Nimni ME. Biochemical changes and cytotoxicity associated with the degradation of polymeric glutaraldehyde derived crosslinks. *J Biomed Mater Res*. 1990;24:1185-201
- 139 Nishi C, Nakajima N, Ikada Y. In vitro evaluation of cytotoxicity of diepoxy compounds used for biomaterial modification. *J Biomed Mater Res*. 1995;29:829-34

- 140 Lohre JM, Baclig L, Sagartz J, Guida S, Thyagarajan K, Tu R. Evaluation of two epoxy ether compounds for biocompatible potential. *Artif Organs*. 1992;16:630-3
- 141 Lohre J M, Baclig L, Wickham E, Guida S, Farley J, Thyagarajan K, Tu R, Quijano RC. Evaluation of epoxy ether fixed bovine arterial grafts for mutagenic potential. *ASAIO J*. 1993;39:106-13
- 142 Van Luyn MJA, Van Wachem PB, Olde Damink LHH, Dijkstra PJ, Feijen J, Nieuwenhuis P. Relations between in vitro cytotoxicity and crosslinked dermal sheep collagens. *J Biomed Mater Res*. 1992;26:1091-110.
- 143 Paul JN, David AT. Physical properties of artificial extracellular matrix protein films prepared by isocyanate crosslinking. *Biomaterials*. 2004;25:1261-7
- 144 Sung HW, Huang DM, Chang WH, Huang RN, Tsai CC, Liang IL. Gelatin-derived bioadhesives for closing skin wounds: An in vivo study. *J Biomater Sci Polymer Ed*. 1999;10:751-71
- 145 Sung HW, Huang DM, Chang WH, Huang RN, Hsu JC. Evaluation of gelatin hydrogel crosslinked with various crosslinking agents as bioadhesives: In vitro study. *J Biomed Mater Res*. 1999;520-30
- 146 Hsieh CY, Tsai SP, Ho MH, Wang DM, Liu CE, Hsieh CH, Tseng HC, Hsieh HJ. Analysis of freeze-gelation and cross-linking processes for preparing porous chitosan scaffolds. *Carbohydrate Polymers*. 2007;67:124-32
- 147 Park SN, Park JC, Kim HO, Song MJ, Suh H. Characterization of porous collagen-hyaluronic acid scaffold modified by 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide cross-linking. *Biomaterials*. 2002;23:1205-12
- 148 Charulatha V, Rajaram A. Influence of different crosslinking treatments on the physical properties of collagen membranes. *Biomaterials*. 2003;24:759-67

- 149 The Controlled Release Society (CRS) website : http://www.ukicrs.org/cr_tech_and_drug_delivery.htm. CR is the use of formulation components and devices to release a therapeutic at a predictable rate in vivo when administered by an injected or non-injected route.
- 150 The School of Polymers and High Performance Materials at the University of Southern Mississippi, The McCormick Research Group. Website: <http://www.psrc.usm.edu/~mccormic/index.html>.
- 151 王本祥：現代中藥藥理學. 天津科學技術出版社.
- 152 唐志民：葛根素注射液治療糖尿病周圍神經病變的療效觀察. 醫學文選. 2000;19(5):651-2
- 153 胡衛芬：葛根素治療糖尿病周圍神經病變40例分析. 中國中醫藥科技. 2000;7(5):329
- 154 于健：葛根素對糖尿病周圍神經病變患者肌電圖及血液流變學的影響. 四川中醫. 2002;20(2):7-8
- 155 李澤、汪賀媛、陳月華、郝志紅：葛根素治療突發性耳聾與神經性耳鳴的療效觀察. 現代中西醫結合雜誌. 2000;9(9):780-1
- 156 高唱、王景周、王琳、周紅傑、高東、張莉莉：葛根素對局灶性腦缺血-再灌注大鼠神經細胞凋亡的作用. 中國急救醫學. 2003;23(1):14-5
- 157 耿寶玉、華守明、管耘園、施海峰、謝曉謙：葛根素對壓力超負荷兔心力衰竭及神經內分泌激素的影響. 中國交通醫學雜誌. 2004;18(3):245-248
- 158 Jiang RW, Lau KM, Lam HM, Yam WS, Leung LK, Choi KL, Waye MY, Thomas CW, Woo KS, Fung KP. A comparative study on aqueous root extracts of *Pueraria thomsonii* and *Pueraria lobata* by antioxidant assay and HPLC fingerprint analysis. *J Ethnopharmacol.* 2005;96:133-8
- 159 Guerra MC, Speroni E, Broccoli M, Cangini M, Pasini P, Minghetti A, Crespi-Perellino, Mirasoli M, Cantelli-Forti G, Paolini M. Comparison between Chinese medical herb *Pueraria lobata* crude extract and its main

- isoflavone puerarin Antioxidant properties and effects on rat liver CYP-catalysed drug metabolism. *Life Sciences*. 2000;67:2997-3006
- 160 Mercer LD, Kelly BL, Horne MK, Beart PM. Dietary polyphenols protect dopamine neurons from oxidative insults and apoptosis: investigations in primary rat mesencephalic cultures. *Biochem Pharmacol*. 2005;69:339-45
- 161 Xiong FL, Sun XH, Gan L, Yang XL, Xu HB. Puerarin protects rat pancreatic islets from damage by hydrogen peroxide. *Eur J Pharmacol*. 2006;529:1-7
- 162 Kim IT, Park YM, Shin KM, Ha J, Choi J, Jung HJ, Park HJ, Lee KT. Anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of the extract from *Kalopanax pictus*, *Pueraria thunbergiana* and *Rhus verniciflua*. *J Ethnopharmacol*. 2004;94:165-73
- 163 Jiang B, Liu JH, Bao YM, An LJ. Hydrogen peroxide-induced apoptosis in pc12 cells and the protective effect of puerarin. *Cell Biol Int*. 2003;27:1025-31
- 164 Zengli Y, Wenjie L. Induction of apoptosis by puerarin in colon cancer HT-29 cells. *Cancer Letters*. 2006;238:53-60
- 165 Overstreet DH, Ma ZZ, Lee DYW. The isoflavone puerarin reduces anxiety symptoms induced by acute 5-HT_{2c} or inverse benzodiazepine agonists or alcohol withdrawal. P.3. *Anxiety disorders and anxiolytics*. S361
- 166 Overstreet DH, Kralic JE, Morrow AL, Ma ZZ, Zhang YW, Lee DYW. NPI-031G (puerarin) reduces anxiogenic effects of alcohol withdrawal or benzodiazepine inverse or 5-HT_{2C} agonists. *Pharmacol Biochem Behav*. 2003;75:619-25
- 167 Yana B, Wang DY, Xing DM, Ding Y, Wang RF, Lei F, Du L. The antidepressant effect of ethanol extract of radix puerariae in mice exposed to cerebral ischemia reperfusion. *Pharmacol Biochem Behav*. 2004;78:319-25
- 168 Shuihua Z, Guang J, Jianwen L. Reversal of chemical-induced liver

- fibrosis in Wistar rats by puerarin. *J Nutr Biochem*. 2006;17:485-91
- 169 Yan LP, Chan SW, Chan ASC, Chen SL, Ma XJ, Xu HX. Puerarin decreases serum total cholesterol and enhances thoracic aorta endothelial nitric oxide synthase expression in diet-induced hypercholesterolemic rats. *Life Sciences*. 2006;79:324-30
- 170 Yeung KY, Leung WS, Xu YC, Vanhoutte PM, Man YK. Puerarin, an isoflavonoid derived from *Radix puerariae*, potentiates endothelium-independent relaxation via the cyclic AMP pathway in porcine coronary artery. *Eur J Pharmacol*. 2006;552:105-11
- 171 Brown MC, Perry VH, Lunn ER, Gordon S, Heumann R. Macrophage dependence of peripheral sensory nerve regeneration: possible involvement of nerve growth factor. *Neuron*. 1991;6:359-70
- 172 Monaco S, Gehrmann J, Raivich G, Kreutzberg GW. MHC-positive ramified macrophages in the normal and injured rat peripheral nervous system. *J Neurocytol*. 1992;21:623-34
- 173 Dahlin LB, Miyauchi A, Danielsen N, Thomsen P, Kanje M. Stimulation of nerve regeneration by macrophages in granulation tissue. *Rest Neurol Neurosci*. 1996;9:141-9
- 174 Miyauchi A, Kanje M, Danielsen N, Dahlin LB. Role of macrophages in the stimulation and regeneration of sensory nerves by transposed granulation tissue and temporal aspects of the responses. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg*. 1997;31:17-23
- 175 Lindholm D, Heumann R, Meyer M, Thoenen H. Interleukin-1 regulates synthesis of nerve growth factor in non-neuronal cells of rat sciatic nerve. *Nature*. 1987;330:658-9
- 176 Heumann R, Hengerer B, Brown M, Perry H. Molecular mechanisms leading to lesion-induced increases in nerve growth factor synthesis. *Ann N Y Acad Sci*. 1991;633:581-2

Evaluation of Gelatin Nerve Conduits Containing Radix Puerariae on Nerve Regeneration

Lung-Shuo Wang

Major professor: Bih-Cheng Chen

Graduate Institute of Chinese Medical Science, China Medical University

We evaluated a biodegradable gelatin nerve conduit containing Radix Puerariae on peripheral nerve regeneration. In the experimental group, the Radix Puerariae-contained gelatin conduits were used to bridge a 10 mm sciatic nerve defect in 10 Sprague-Dawley rats. Gelatin conduits without Radix Puerariae added were considered as the controls. Histological and electrophysiological techniques were used to evaluate the nerve regeneration. At the conclusion of eight weeks, all rats in both groups acquired successful regeneration across gaps. However, the experimental group had a significantly better performance at peak latency and nerve conduction velocity than the control group. In addition, the experimental group revealed more condensed regenerated axons than the control group. These results indicated that Radix Puerariae could be a beneficial factor for nerve regeneration.

Key words: Radix Puerariae, nerve conduit, peripheral nerve regeneration

作者簡歷

作者：王隆碩 Lung-Shuo Wang

學歷：中國醫藥大學 中國醫學研究所 醫學碩士
中國醫藥大學 學士後中醫學系 醫學士
高雄醫學大學 公共衛生學系 理學士

經歷：台灣基督長老教會新樓醫院 中醫科主治醫師（現任）
奇美醫學中心 中醫部醫師
中國醫藥大學附設醫院 醫師
中華民國中醫眼科醫學會會員



謝 辭

碩士兩年，在風雨中顛簸走過，彷彿剛從實驗瓶頸的夢魘中驚醒，尚未回神，才一轉瞬，竟也走到驪歌高唱的畢業尾聲了。負笈異鄉，南北奔波，所得的成就非常微薄，卻背負了許多難以抹滅的恩情，內心的感謝太多，實非隻言片語可以道盡，只能勉強以筆墨儘量表達了。我要感謝指導教授陳必誠老師對我九年來的指導與照顧，不論在學術還是人生哲學上，您都像太陽般毫無吝惜地教導我，惠我良多。我要以最真誠的心感謝陳悅生老師，在實驗與研究方法上，您給了我最多的幫助，帶我走進了生物科技的神祕領域，使我窺見了再生醫學的堂奧。我要感謝蔡金川教授和姚俊旭教授，在碩士學位考試時給了我很多彌足珍貴的建議。謹以至誠之心，感謝四位老師的指導與教誨。

感謝王金裕醫師、章如瑛醫師、陳士哲醫師、黃彥廷醫師在實驗上給我的幫助，謝謝你們在我遭遇困難時毫不吝惜地雪中送炭。感謝台大醫院黎家銘醫師在資料統計上的協助，以及輔英科技大學王淑綺博士在組織學切片判讀上的協助。感謝台灣動物科技研究所游碧蓮小姐協助切片的製作。感謝其他所有曾經在研究上給予我協助的人們。

我要感謝我的父母親以及妻兒對我的支持，你們永遠是我心裡最大的精神支柱，我愛你們。

感謝在實驗中犧牲的大鼠，謝謝你們，願你們在天國得到神的照料。

最後，我要感謝上主耶和華及耶穌基督的指導與幫助，沒有神的大能與恩典，我無法在如此艱困的環境下完成碩士學位。我要感謝神，並將此論文的一切榮耀都歸給我敬愛的上帝！

2007-7-17 台南