

中國醫藥大學物理治療學系復健科學碩士班

碩 士 論 文

探討低能雷射治療對於周邊神經損傷之病理性疼痛及神經功能性恢復的影響及分生機制-以低氧誘發因子的觀點及大鼠坐骨神經慢性緊縮性損傷模式

**The Effects of Low-Level Laser Therapy on Recovery of Neuropathic Pain and Neural Function -Possible Involvement of HIF-1 $\alpha$  in Rats with Chronic Constriction Injury of the Sciatic Nerve**

研究生：張 佩 琳 (Pei-Lin Chang)

指導教授：謝 悅 齡 博士 (Yueh-Ling Heish, Ph.D.)

中 華 民 國 100 年 7 月

授權書編號：cmu-100-9842003-1

## 中國醫藥大學博碩士論文授權書

本授權書所授權之論文為立書人在 中國醫藥大學健康照護學院 物理治療學系復健科學碩士班，99 學年度第 2 學期取得碩士學位之論文。

論文題目：探討低能雷射治療對於周邊神經損傷之病理性疼痛及神經功能性恢復的影響及分生機制-以低氧誘發因子的觀點及大鼠坐骨神經慢性緊縮性損傷模式

指導教授：謝悅齡

授權事項：

- 一、立書人 張佩琳 同意無償授權 中國醫藥大學 將上列論文全文資料之以微縮、數位化或其他方式進行重製作為典藏之用。 中國醫藥大學 在上述範圍內得再授權第三人進行重製。
- 二、立書人張佩琳 同意有償授權 將前條典藏之資料收錄於資料庫，並以電子形式透過單機、網際網路、無線網路或其他傳輸方式授權用戶進行檢索、瀏覽、下載、傳輸、列印等。 中國醫藥大學得將上述權利再授權于第三者。
- 前兩條授權均為非專屬授權，立書人仍擁有上述授權著作之著作權。立書人擔保本著作為立書人所創作之著作，有權依本授權書內容進行各項授權，且未侵害任何第三人之智慧財產權。如有侵害他人權益及觸犯法律之情事，立書人願自行負責一切法律責任，被授權人一概無涉。

有償授權條件：享有權利金的回饋，權利金捐贈校務發展基金指定用於圖書館館務使用。

論文全文上載網路公開時間： 立即公開

立書人： 張佩琳

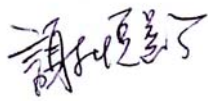
簽名：

中華民國 100 年 07 月 28 日

# 中國醫藥大學碩士班研究生

## 論文指導教授推薦書

物理治療學系復健科學碩士班：張佩琳君所提之論文探討低能雷射治療對於周邊神經損傷之病理性疼痛及神經功能性恢復的影響及分生機制-以低氧誘發因子的觀點及大鼠坐骨神經慢性緊縮性損傷模式，係由本人指導撰述，同意提付審查。

指導教授  (簽章)

中華民國 100 年 6 月 8 日

中國醫藥大學 物理治療學系復健科學碩士班

碩士候選人學位考試

論文題目

中文：探討低能雷射治療對於周邊神經損傷之病理性疼痛及神經功能恢復的影響及分生機制-以低氧誘發因子的觀點及大鼠坐骨神經慢性緊縮性損傷模式

英文：The Effects of Low-Level Laser Therapy on Recovery of Neuropathic Pain and Neural Function -Possible Involvement of HIF-1 $\alpha$  in Rats with Chronic Constriction Injury of the Sciatic Nerve

本論文係 張佩琳 於中國醫藥大學物理治療學系復健科學碩士班完成之碩士論文，經考試委員審查及口試合格，特此證明。

考試委員

洪章紅

周立偉

張曉新

系主任：

李昭達

中華民國 100 年 6 月 30 日

## 誌謝

在兩年的研究所生活中，我學習到相當多的未曾接觸過的事物，過程中經過不斷的嘗試、各種的訓練以及專業的知識涉入，讓我著實成長了許多，不管是在處理實驗相關技術，或是在學習新事物上都有別於從前的不成熟。對於研究生的生活，我感受到是相當充實的。

在這過程裡，我接受到太多人的幫忙以及照顧，首先，非常感謝指導教授謝悅齡老師這兩年來的指教與照顧，老師對我的包容也非常多。在進入研究所後對於實驗學習沒有經驗的我，老師都給予相當大的幫助以及意見討論，讓我建立起在各方面的事物敢於嘗試，以及對於失敗勇於面對，然後嘗試找出方法改善及解決的能力。感謝口試委員：洪章仁教授及周立偉醫師，在研究論文及實驗相關提供相當多寶貴的意見及指教，讓我可以了解自己的不足及需要改進的地方。也謝謝所內的所有老師：李信達老師、鄭宇容老師、吳柏蒼老師、歐秀中老師和彭瓊琦老師平時的指導及關心。

非常感謝時常給我鼓勵及意見的學長姐們，泳璉學長、昆霖學長、智超學長、凱玲學姊、曉玲學姊、憶帆學姊、碧玉學姊、凡妮學姊和緣緣學姊。也感謝實驗室的夥伴及學弟妹們，蕙賢、欣穎、群超、嘉隆、珮慈、利山、品文、舜安、佳秀、思全、蕙芳、麗怡、雨濃、廣文、嫻穎、舒涵和珮怡。不管是在課業或生活上大家互相切磋及照料，謝謝你們的幫助以及照顧讓我的研究所生活多采多姿，每天都過得非常開心，有你們真的很好。

最後感謝我的家人及男朋友，在我的研生活中給予我極大的支持及鼓勵，讓我再遇到困難時，能夠有勇氣去面對，讓我在念書的這條路上無後顧之憂，順利的完成學業，真的謝謝你們。

# 目錄

中文摘要.....	1
英文摘要.....	3
壹、緒論.....	6
貳、實驗目的 .....	21
參、實驗方法 .....	22
肆、結果 .....	35
表 1. Quantification of protein standard.. .....	31
表 2. The results of body weight in CL and CsL group.....	52
表 3. The results of pain threshold in CL and CsL group.....	53
表 4. The results of SFI in CL and CsL group .....	54
表 5. The results of TFI in CL and CsL group.....	55
表 6. The results of PFI in CL and CsL group.....	56
表 7. The results of SSI in CL and CsL group.....	57
表 8. The results of levels of TNF- $\alpha$ assessed by EISA in each group.....	58
表 9. The results of levels of IL-1 $\beta$ assessed by EISA in each group.....	59
表 10. The results of levels of BDNF assessed by EISA in each group.....	60
表 11. The results of levels of HIF-1 $\alpha$ assessed by western blotting in each group. ....	61
表 12.. The results of levels of iNOS assessed by western blotting in each group. ....	62
表 13. The results of levels of COX-2 assessed by western blotting in each group. ....	63

表 14. The results of levels of p53 assessed by western blotting in each group. ....	64
表 15. The results of levels of VEGF assessed by western blotting in each group. ....	65
表 16. The results of levels of NGF assessed by western blotting in each group. ....	66
圖 1. The serial changes of body weight in each group.....	67
圖 2. The serial changes of pain threshold in each group.....	68
圖 3. The serial changes of SFI in each group.....	69
圖 4. The serial changes of TFI in each group. ....	70
圖 5. The serial changes of PFI in each group.....	71
圖 6. The serial changes of SSI in each group.....	72
圖 7. The protein levels of TNF- $\alpha$ by ELISA in each group.....	73
圖 8. The protein levels of IL-1 $\beta$ by ELISA in each group .....	74
圖 9 The protein levels of BDNF by ELISA in each group. ....	75
圖 10. The levels of HIF-1 $\alpha$ by Western blotting in each group.....	76
圖 11. The levels of iNOS by Western blotting in each group. ....	77
圖 12. The levels of COX-2 by Western blotting in each group. ....	78
圖 13. The levels of p53 by Western blotting in each group. ....	79
圖 14. The levels of VEGF by Western blotting in each group.....	80
圖 15. The levels of NGF by Western blotting in each group. ....	81
圖 16. The examples in each group by H&E staining.....	82
圖 17. The examples in each group by HIF-1 $\alpha$ immunohistochemistry .....	83

圖 18. The examples in each group by iNOS immunohistochemistry. ....	84
圖 19. The examples in each group by COX-2 immunohistochemistry.....	85
圖 20. The examples in each group by p53 immunohistochemistry.....	86
圖 21. The examples in each group by ED1 immunohistochemistry .....	87
圖 22. The examples in each group by VEGF immunohistochemistry. ....	88
圖 23. The examples in each group by NGF immunohistochemistry .....	89
圖 24. The examples in each group by S100 immunohistochemistry .....	90
圖 25. The histogram and quantification of the results of H&E staining and immunohistochemistry.....	91
圖 26. The examples in CsL and CL group by HIF-1 $\alpha$ , ED1 double immunofluorescent staining.....	92
圖 27. The examples in CsL and CL group by iNOS, ED1 double immunofluorescent staining.....	95
<b>伍、討論.....</b>	<b>98</b>
<b>陸、結論.....</b>	<b>102</b>
<b>柒、參考文獻.....</b>	<b>103</b>
附錄一、實驗材料及儀器一覽表 .....	114



# 中文摘要

## 研究背景及動機

周邊神經損傷引發的神經發炎反應及神經病理性疼痛，不但會造成病人生理和心理上的不適，也會間接的影響生活品質。低能雷射治療(low level laser therapy, LLLT)常被使用於減低疼痛、發炎、幫助傷口癒合和加速組織再生，但是對於有關探討周邊神經損傷的影響及分子生物機轉的文獻甚少。另外，近年來有文獻探討關於低氧因子(hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ )在參與發炎的過程中也扮演了重要的角色，但在針對在周邊神經損傷所造成的發炎調控機轉，則尚未明確。所以研究利用慢性坐骨神經損傷緊縮性損傷的動物模式(chronic constriction injury, CCI)探討以低能雷射治療，對於周邊神經損傷的神經病理性疼痛及功能性恢復的影響。

## 研究目的

本研究的目的是為了探討 LLLT 是否在周邊神經傷害後，可以促進神經功能之恢復，以及 LLLT 在周邊神經病變上，是否可以藉由降低低氧誘發因子(hypoxia-inducible factor-1  $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ )、促發炎因子(tumor necrosis factor $\alpha$ , TNF- $\alpha$  和 interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )、一氧化氮合成酶(inducible nitric oxide synthases, iNOS)、還氧合酶(cyclooxygenase enzymes-2, COX-2)、腫瘤抑制蛋白(tumor suppressor protein p53, p53)及巨噬細胞的過度堆積，達到降低發炎反應及神經痛，並可促進生長因子血管內皮生長因子(vascular endothelial growth factor, VEGF),神經生長因子(nerve growth factor, NGF)和腦源性神經生長因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 和 S100 之表現，來促進 CCI 動物之功能性恢復。另外，亦加以探討 LLLT 的分子生物機制，是否有劑量依賴性(dose-dependent)的效果。

## 材料與方法

將 120 隻 SD 大鼠依據 CCI 手術、假性 CCI 手術(sham-operated CCI, sCCI)、LLLT 介入及假性 LLLT (sham-operated LLLT) 隨機分組，並進一步依治療時間的安排再作次分組(subgroup)。因此，本實驗的分組(共 12 組)如下：(1) CCI 手術與 LLLT 組 (CL group)：本組再分成 CCI + LLLT 治療一週(n=10)、兩週(n=10)及三週 (n=10); (2) CCI 手術與 sLLLT 組

(CsL group)：本組再分成 CCI+sLLLT治療一週(n=10)、兩週(n=10)及三週 (n=10); (3) sCCI手術與LLLT組 (sCL group)：本組再分成sCCI+LLLT治療一週(n=10)、兩週(n=10)及三週 (n=10);及(4) sCCI手術與sLLLT組 (sCsL group)：本組再分成sCCI+sLLLT治療一週(n=10)、兩週(n=10)及三週 (n=10)。以連續性 660-nm Ga-Al-As 低能雷射，輸出能力 (output power) 為 30 mW，在手術處的坐骨神經正上方，照射 60 秒，總計能量密度(energy densitie)為  $9\text{J}/\text{cm}^2$ ，連續照射一週、兩週和三週。我們會利用疼痛行為測試、坐骨神經功能指數 (sciatic function index, SFI)、脛神經功能指數(tibial function index, TFI)、腓神經功能指數(peroneal function index, PFI)及坐骨神經靜態指標 (sciatic static index, SSI)、組織切片染色型態分析(histopathological examination)、酵素聯結免疫吸附測試 (ELISA)和西方點墨法(Western blot)，來評估LLLT的治療效果。

## 結果

本實驗結果顯示，在 CCI 神經損傷後，LLLT 顯著提升機械性疼痛閾值、坐骨神經功能指數 SFI、TFI、PFI、SSI (CL vs. CsL:  $P<0.05$ )。LLLT 亦可以顯著降低 HIF-1 $\alpha$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、iNOS、COX-2、p53 及巨噬細胞的過度堆積 (CL vs. CsL:  $P<0.05$ )，並顯著促進生長因子 VEGF, NGF, 和 BDNF 的表現量及促進神經髓鞘生成(CL vs. CsL:  $P<0.05$ )。且 LLLT 對於這些發炎因子及生長因子的影響而言，並無劑量依賴性 (dose-dependent) 的效果 ( $P>0.05$ )。

## 結論

在 CCI 神經損傷後，LLLT 可以降低 HIF-1 $\alpha$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、iNOS、COX-2、p53 及巨噬細胞的過度堆積，來達到減低神經性病理性疼痛效果；並可促進生長因子 VEGF, NGF, 和 BDNF 的表現量及促進神經髓鞘生成，來達到功能性恢復的效果。

**關鍵字:**低能雷射治療、慢性緊縮性損傷、神經病理性疼痛、發炎、疼痛閾值、坐骨神經功能、功能性恢復、低氧誘發因子-1 $\alpha$

# Abstract

## Background

Peripheral nerve injury may induce nerve inflammation and neuropathic pain, and these phenomena not only cause physical and psychological discomfort of patients, but may also indirectly affect their quality of life. Low-energy laser treatment (low level laser therapy, LLLT) is often used to reduce pain, inflammation, wound healing and to help accelerate tissue regeneration, but the literatures and studies concerned about the therapeutic effects on the peripheral nerve injury and the molecular biological mechanism of LLLT were very few. In addition, in recent years, many researches explored that hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) involves in the process of inflammation, but its role and mechanism in regulation of peripheral nerve injury-induced inflammation was still not clear. Therefore, the animal model of sciatic chronic constriction injury (CCI) was used in this study for investigating the effects of LLLT on neuropathic pain and functional recovery.

## Purpose

The purposes of this study were to assess the suppressive effects of LLLT on nerve function, accumulation of hypoxia-inducible factor-1 alpha (HIF-1 $\alpha$ ), proinflammatory cytokines interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), tumor necrosis factor $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), inducible nitric oxide synthases (iNOS), cyclooxygenase enzymes-2 (COX-2), tumor suppressor protein p53 (p53) and macrophages for controlling neuropathic pain after peripheral injury. Moreover, the effects of LLLT on activation of vascular endothelial growth factor (VEGF), nerve growth factor (NGF), brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and repair of injured myelin sheath for promoting functional recovery were also assessed in CCI model.

## Methods

Totally 120 rats were divided randomly into four groups based on the surgical procedure of CCI (operated VS sham-operated) and the treatment (LLLT VS sham-operated LLLT). Each group was further divided into three subgroups according to the duration of LLLT treatment. The experimental groups in this study included (1) CCI + LLLT (CL group) included the 1-week (n=10), 2-week (n=10) and 3-week (n=10) of LLLT; (2) CCI+ sLLLT (CsL group) included the 1-week (n=10), 2-week (n=10) and 3-week (n=10) of sLLLT; (3) sCCI + LLLT (sCL group) included the 1-week (n=10), 2-week (n=10) and 3-week (n=10) of LLLT; (4) sCCI + sLLLT (sCsL group) : included the 1-week (n=10), 2-week (n=10) and 3-week (n=10) of sLLLT. Seven days after surgery, animals started using the continuous 660-nm Ga-Al-As diode laser, and the output power of the laser irradiation was 30 mW per session with irradiation time for 60 sec/ per spot. The energy densities were 9 J/cm<sup>2</sup>. Effects of LLLT in CCI animals were determined by the measurements of mechanical pain threshold, sciatic function index, (SFI), tibial function index (TFI), peroneal function index (PFI), sciatic static index (SSI), histopathological and immunohistochemical examination, ELISA and Western blot analysis.

Histopathological and immunological assessments included accumulation of hypoxia-inducible factor-1 alpha (HIF-1 $\alpha$ ), proinflammatory cytokines interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), tumor necrosis factor $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), inducible nitric oxide synthases (iNOS), cyclooxygenase enzymes-2 (COX-2), tumor suppressor protein p53 (p53) and macrophages for controlling neuropathic pain.

## Results

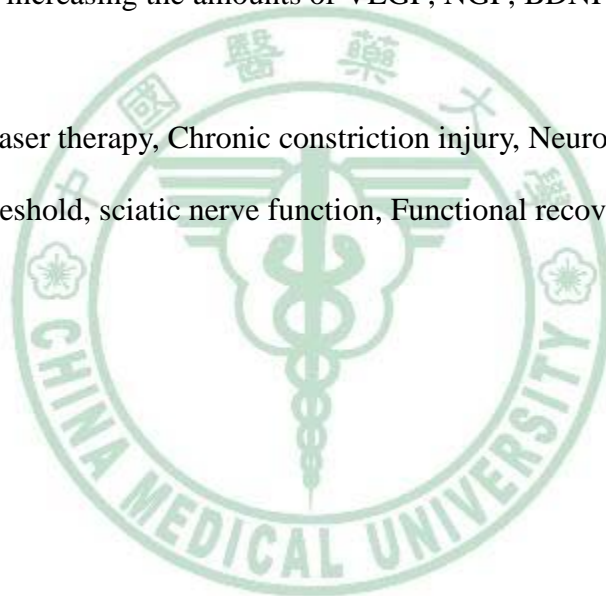
Our results demonstrated that LLLT significantly improved mechanical pain threshold, sciatic functional index SFI, TFI, PFI, SSI (CL vs. CsL: P <0.05) after CCI. LLLT can also significantly reduce overexpressions of HIF-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , iNOS, COX-2, p53, and the excessive macrophage accumulation (CL vs. CsL: P <0.05), and significantly promote the

amounts of VEGF, NGF, and BDNF and myelin sheath (CL vs. CsL:  $P < 0.05$ ). But there was no significant differences among 1-, 2- and 3-week of LLLT on the expression of these protein factors ( $P > 0.05$ ).

### **Conclusions**

After CCI nerve injury, LLLT can reduce neuropathic pain by suppressing the HIF-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , iNOS, COX-2, p53 accumulation and macrophages infiltration and promote functional recovery by increasing the amounts of VEGF, NGF, BDNF and myelin sheath.

Key word: Low level laser therapy, Chronic constriction injury, Neuropathic pain, Inflammation, Pain threshold, sciatic nerve function, Functional recovery, Hypoxia inducible factor-1 $\alpha$



# 壹、緒論

## 一、周邊神經病變

周邊神經病變(peripheral neuropathy)是指周邊神經系統遭到破壞或是傷害而造成的病變，造成發炎現象及神經病理性疼痛(Jaggi et al., 2011; Khajavi and Lupski, 2008)。一旦周邊神經損傷，也會造成神經支配區域的感覺異常或消失，同時伴隨肌肉無力、萎縮、喪失肢體功能，甚至造成肢體攣縮變形。引起周邊神經病變的原因大概有數十種之多，常見的有：代謝疾病、內分泌疾病、自體免疫疾病、急性及慢性神經根炎、家族性神經病變及周邊神經外傷(Hashimoto et al., 2008; Valsecchi et al., 2011)。

### 1. 周邊神經病變及神經病理性疼痛

神經病理性疼痛(neuropathic pain)是周邊神經病變的一種症狀(Valsecchi et al., 2011; White and Miller, 2010)。神經病理性疼痛的發生通常較難控制，常好發於晚間睡眠時刻，不但會造成病人生理的不適，長期下來也可能產生心理方面的不良影響，對於人類的生活品質而言，也會造成相當大的困擾(Gilron, 2006)。

就生理層面來說，痛覺的發生是因為體內的A $\beta$ 髓鞘纖維(myelinated A $\beta$ -afferent)被閾值較低的機械性刺激所活化，造成感覺神經的過敏感(hypersensitivity)。另一方面，體內的C髓鞘纖維(unmyelinated C-afferents)則會被多元的疼痛刺激(nociceptive polymodal stimuli)所活化，這些刺激包含冷、熱、化學性和壓力所誘發，而造成疼痛、麻木、無知覺、燒灼或刺痛之異常感覺(hyperalgesia and allodynia)(Khajavi and Lupski, 2008; Sato et al., 2008)。

對神經而言，對有傷害性的溫度、化學性及機械性刺激有反應的敏感性神經纖維，稱為多樣性傷害受體(polymodal nociceptor)，亦稱為疼痛接受器(nociceptor receptor)，其細胞體位於脊髓的背根神經節上。當疼痛接受器受刺激時，引發它的末端釋放神經胜肽物質(neuropeptides)產成神經性炎症的反應(neurogenic

inflammation)；在脊髓中樞端釋放麩氨酸鹽 (glutamate) 形成痛覺訊息往上級中樞傳遞，會誘發放出其他傷害性媒介 (mediators)，諸如 calcitonin gene-related peptide、substance P、neurokinin A 以及 somatostatin (Khajavi and Lupski, 2008; Ma, 2003; Ma and Quirion, 2008) 等神經胜肽物質，促使脊髓背根疼痛接受器活化。此外，當周邊初級感覺神經元，長期遭受傷害性刺激時，會導致脊髓形成中樞性痛覺過敏 (hyperalgesia) 及異常痛覺 (allodynia) 現象。這種現象的形成就是慢性炎症痛 (chronic inflammatory pain) 及神經病理性痛 (neuropathic pain) 的主要因素 (Jaggi et al., 2011; Suyama, 2004)。

## 2. 周邊神經病變及發炎反應

發炎 (inflammation) 是人體正常的免疫作用和防禦反應，是為了對抗外來的病原菌而產生的保護機制 (Spulber and Schultzberg, 2010)，現在也有許多研究指出文明病的產生與慢性發炎有很大的關係。對於神經損傷、神經發炎、衰退或變質而言，其症狀隨病因而有所不同。常指一條或多條神經發炎，會產生的症狀有疼痛感覺 (癢痛、觸痛和刺痛)、無力、反射受損、血液循環與出汗不正常，感染部分紅腫，以及嚴重的痙攣。

在中樞神經及周邊神經系統中，發炎反應和免疫機轉在神經病理性損傷及疼痛中扮演了很重要的影響 (Allan and Rothwell, 2003; Choi et al., 2009)。所以當神經組織遭到感染、缺血 (ischemia)、低氧 (hypoxia)、腫瘤生成、自體免疫的破壞、發炎細胞的浸潤，都會活化細胞的免疫作用，甚至誘發多種不同的發炎調控物質，參與調節神經損傷過程。

## 3. 周邊神經病變及低氧現象

神經損傷會造成發炎物質的生成、微血管喪失，引起組織的低氧、缺血。也有學者提出其實在慢性發炎的過程，構成的環境本身就是一種低氧和養分供給

不足的環境(Dehne and Brüne, 2009)，而血液循環不足或是皮膚含氧量不足，更會造成傷口部位的不易癒合，反而更進一步強化發炎反應，使組織的修補變慢，甚至組織結構逐漸纖維化。因此由這些觀點提出，我們可以知道低氧在神經發炎反應中扮演了重要的角色(Khajavi and Lupski, 2008; Oka et al., 2007; Vangeison, 2008)。

## 二、 周邊神經病變及慢性發炎中低氧誘發因子(HIF-1)參與的角色

在氧氣減少的狀況下，會誘發低氧誘發因子 (hypoxia-inducible factor-1, HIF-1) 生成，來參與調控氧氣濃度的平衡 (oxygen homeostasis)。所以，因體內細胞會活化 HIF-1 的產生，它可能影響並誘發其他相關的下游轉錄因子，來達到調控體內生物發育過程及生理機制，如：血管新生(angiogenesis)、紅血球生成(erythropoiesis)、葡萄糖轉運、醣解作用 (glycolysis)、鐵質代謝 (iron metabolism)、細胞存活(cell survival)或死亡(cell survival or death)等(Greijer, 2004; Honma, 2004; Oliver et al., 2009)。

除此之外，在動物研究的試驗中，有學者指出 HIF-1 會在缺血、發炎和癌症等疾病的傷害下，參與活動並產生相互的反應(Dehne and Brüne, 2009; Oliver et al., 2009; Olson and van der Vliet, 2011)。目前已有許多臨床及基礎研究指出，HIF-1 所調控的基因群亦會參與許多人類疾病，例如：心肌及腦部缺血、肺部高血壓、子癇前症、神經炎(Oka et al., 2007)及癌症等(Dehne and Brüne, 2009; Halterman, 1999; Wincewicz et al., 2007)。所以可以看出 HIF-1 在不同的病理現象中，扮演了重要的角色。

HIF-1 因應不同的層面，會扮演不同的角色。在 HIF-1 的表現量穩定的狀態下 (stabilization)，會調控細胞中的血氧濃度，來達到調節組織的氧氣平衡，使得細胞及組織得以存活。但是，若是病理狀態下，HIF-1 的穩定量會被破壞，則使得 HIF-1 大量堆積在細胞中，引發細胞破壞或死亡 (Fraisl et al., 2009)。因此，HIF-1



可為一決定性的轉錄因子，與低氧及發炎反應誘發的轉錄因子活化有關。

HIF-1包含了兩個次單元：HIF-1 $\alpha$  和 HIF-1 $\beta$ 。活化HIF-1主要可經由氧氣依賴型途徑(oxygen-dependent pathway)(Dehne and Brüne, 2009; Papandreou et al., 2006; Stroka, 2001)。在正常的氧氣環境下，HIF-1 $\alpha$  會被立即被 ubiquitin 蛋白酶體辨識，接著 HIF-1 $\alpha$  蛋白會被降解，而不能到細胞核中與 HIF-1 $\beta$  結合，因此使得下游的轉錄活動被抑制(Manolescu et al., 2009)。但是相反的，在低氧的狀況下，細胞的氧感應器 (oxygen sensor) 是一個含血紅素之蛋白質，低氧時誘導了此一蛋白質發生結構改變的現象，從而活化其下游的訊號通路，也就促使 HIF-1 $\alpha$  的磷酸化，進入細胞核並且與 HIF-1 $\beta$  結合而形成一個完整的HIF-1複合體，之後再與相對應於基因上的低氧反應元 (hormone response element, HRE) 結合，接著促進目標基因 (target genes)生成。目標基因則經由被 HIF-1 活化調控而產生作用，像是血管再生 (angiogenesis, 如：VEGF)(Tang, 2004)，能量代謝 (energy metabolism)，紅血球生成(erythropoiesis, 如：EPO)，細胞增生和生存 (cell proliferation and viability, 如：BNIP3和 bcl2)(Yang et al., 2009)，血管舒縮 (vasomotor control, 如：iNOS) 和細胞凋亡 (apoptosis, 如：p53)(Halterman, 1999)。

HIF-1 $\alpha$  的活化除了氧氣依賴型途徑(oxygen-dependent pathway)外，也可經由非氧氣依賴的途徑(oxygen-independent pathway)(Richard, 2000; Taylor, 2008)，例如：壓力(stress)、促發炎因子(pro-inflammatory cytokines)、缺血(ischemia)、發炎 (inflammation)、感染 (infection)、一氧化氮 (nitrogen oxide, NO) 和其他生長因子(other growth factors) (Oliver et al., 2009; Olson and van der Vliet, 2010)。

### 三、參與周邊神經病變中發炎之調控因子

周邊神經病變是一種發炎的過程，一些促發炎因子(pro-inflammatory cytokines)會參與反應(Allan and Rothwell, 2003; Cai, 2009; Dehne and Brüne, 2009)，

調控神經發炎的現象及造成神經的過敏感與疼痛感。發炎反應會根據不同的自然來源刺激，而不同的組織與細胞，會有不同的損傷反應。刺激源所誘發的發炎現象可能是急性的，也有可能是慢性的。急性期發炎(acute inflammation)的徵狀產生是快速的，是短時間內發生且立即性的效應。造成的現象包括：受損組織的組織液滲出，組織腫脹，大量的白血球(以嗜中性白血球為主)的徵召及移轉至受損部位。當急性發炎不能有效的在短時間內被控制或是抑制時，有可能逐漸演變成嚴重的慢性發炎(chronic inflammation)。慢性發炎所徵召的免疫細胞以淋巴細胞和巨噬細胞為主，會使受損部分組織血管的異常增生及組織纖維化，最後使得受損部位、周邊的相關組織及細胞走向凋亡或壞死的路徑。除了HIF-1可能會參與神經病變的病程外，一些參與慢性發炎的調控因子，如：促發炎因子、一氧化氮合成酶 (nitric oxide synthases, NOS)、環氧合酶(cyclooxygenase enzymes, COX) 、腫瘤抑制蛋白(tumor suppressor protein, p53)可能在神經病變及神經病理性疼痛也扮演重要角色。

### 1. 促發炎因子(TNF- $\alpha$ 和 IL-1 $\beta$ )

在臨床及基礎實驗上，有許多的研究證明指出當發炎反應產生時，生物體內會徵召不同的調控因子來參與不同的發炎階段，而這些調控因子在發炎中都扮演了重要的角色。在發炎反應的早期階段中，前趨的調控發炎的物質會產生，像是 histamine、5-hydroxytryptamine、bradykinin...等會被活化。接下來的時期，會徵召像是 prostaglandins、lipoxigenase products 和 pro-inflammatory cytokines(Allan, 2000; Matsui et al., 2009; Spulber and Schultzberg, 2010; Vessillier et al., 2005) Pro-inflammatory cytokines 又以 tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) interleukin-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )最常被徵召產生。它們不只會被參與發炎反應的巨噬細胞所活化，也常被一些內毒素、菌體毒素、微生物的產物或免疫物質誘導反應，甚至被不同的物理性傷害和發炎作用刺激，而大量產生和分泌(Norman et al., 2009;

Sabsovich et al., 2008)。

根據研究指出，在坐骨神經損傷處與其周邊組織處 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  的表現量會大量的增加 (Ignatowski, 1999; Leung; Martucci et al., 2008; Norman et al., 2009)，參與發炎反應，造成更嚴重神經的退化 (Allan, 2000; Norman et al., 2009)。所以我們可以知道調控 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  的表現，在治療神經性損傷上是重要的相當重要的途徑

## 2. 一氧化氮合成酶

NOS 在生物體內是一種蛋白酵素，負責將精氨酸 (Arginine) 中的氮原子，在氧氣 (O<sub>2</sub>) 及其他輔助因素，包括菸醯胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (NADPH)、黃素腺嘌呤二核苷酸 (FAD)、黃素單核苷酸 (FMN)、原血紅素及四氫生物蝶呤 (BH<sub>4</sub>) 的存在環境下，合成一氧化氮 (nitric oxide, NO)。NOS 可以參與神經間的傳導、訊號傳遞，在免疫系統或是血管中也有調控的作用。當細胞或是組織遭到破壞，我們發現到其中 NO 以及它的中間產物所扮演的角色，在參與發炎的病理變化過程中是相當重要的。也有文獻指出，利用 NOS 的抑制劑 (NOS inhibitors) 可以有效的改善神經 (Labuda et al., 2006; Martucci et al., 2008)、肌肉發炎的症狀 (De Alba et al., 2006)。

不同種類的 NO 被分類成以下的異構體：神經型一氧化氮合成 (neuronal NOS, nNOS or NOS1)、誘導型一氧化氮合成酶 (inducible NOS, iNOS or NOS2)、內皮型一氧化氮合成酶 (endothelial NOS, eNOS or NOS3) 和建構型一氧化氮合成酶 (cNOS) (Choi, 1993)。nNOS 作用於中樞神經系統及周圍神經系統，造成神經組織內產生 NO，並且協助細胞通訊及與原生膜聯合，nNOS 的活性會被特異性的 NPA (N-propyl-L-arginine) 影響和 7-nitroindazole 抑制。eNOS 則作用於血管內，產生 NO 來協助調節血管功能 (Chen, 2008)，是與原生膜所包圍的細胞及與細胞內的高基氏體膜聯合。iNOS 利用一氧化氮的氧化壓力 (自由基)，協助巨噬細胞

在免疫系統中對抗病原體 (Olson and van der Vliet)2010。它亦存在於心血管系統內。與建構型NOS不同，它只在細胞受到刺激，被激活後才發揮功效，所以所生成的一氧化氮數量也會比較多(MacNaul, 1993)。

許多的文獻提出的在發炎反應過程中，影響 iNOS 表現是很難以捉摸的，iNOS 也很有可能被其他因子誘導並活化，如：COX-2 和 NF- $\kappa$ B...等(Serbina, 2003; Surh, 2001; Yamasaki, 1998; Zoppo, 2000)。

### 3. 環氧合酶

環氧合酶(Cyclooxygenase enzymes, COX)是一種酶，是負責合成重要的生物激素：前列腺素家族的導介物質。當身體組織受到某種刺激如：外傷、感染等，會活化環氧合酶，使花生四烯酸 (arachidonic acid，一種 $\omega$ -6 多不飽和脂肪酸) 大量轉變為prostaglandin E<sub>2</sub>、 prostaglandin F<sub>2 $\alpha$</sub> 及thromboxane等。研究指出在發炎的部位上，發現有大量COX存在(Albertini et al., 2007; Amaya et al., 2009; Durrenberger, 2004)。抑制COX產生時，就可以減輕發炎反應中的疼痛症狀，這就是非固醇類抗發炎藥物 (Non-Steroid Anti-Inflammatory Drug, NSAIDs) 的藥理機轉。其中，COX-2 是一個誘導酶，在大多數正常組織都未能找到，功能在於活化巨噬細胞或其他細胞，充斥於炎症組織 (Durrenberger et al., 2006)。一些經過改進的COX-2 選擇性抗發炎藥，如：aspirin、ibuprofen、rofecoxib、celecoxib 和etoricoxib，目前則廣泛的使用在神經疼痛的止痛及抗發炎效果(Zhao, 2007)。

研究指出，在神經損傷的模式上 COX-2 會大量的表現(Amaya et al., 2009; Durrenberger, 2004; Ma, 2008)，參與調控發炎過程。而利用 COX-2 抑制劑，可以達到有效控制週邊神經損傷發炎所引起的疼痛(Suyama, 2004; Yaksh, 2001; Zhao et al., 2007)。

#### 4. 腫瘤抑制蛋白

p53為腫瘤抑制蛋白 (tumor suppressor protein p53, p53)，編碼於人類基因組之TP53基因。p53會藉由許多不同的壓力形式而激發其活性，造成細胞凋亡，包括：DNA損傷、紫外光、紅外光射線、過氧化氫 (hydrogen peroxide) 化學物質刺激、氧化壓力 (oxidative stress)、滲透壓力 (osmotic stress)、核糖核苷酸缺乏 (nucleotide depletion) (Eun; Liang et al., 2009; Wincewicz et al., 2007)

目前有許多研究指出，發炎疾病中也有參與的現象，例如：類風濕性關節炎、關節炎和神經發炎(Eun; Eun et al., 2010; Holtkamp, 2007; Mawrin et al., 2002)。因此，p53在發炎的過程中扮演了相當重要的角色，可參與調控發炎反應。

#### 四、促進周邊神經病變神經恢復之調控因子

##### 1. 血管內皮生長因子

血管內皮生長因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)，早期稱為血管通透因子 (vascular permeability factor)，可影響血管內皮細胞的分裂、生長和血管的通透性。所以，VEGF 是對血管內皮細胞具有特異性的生長因子 (endothelial cell-specific mitogen and angiogenic factor)。在生物體血管內皮細胞表面，分布著一定數量的 VEGF 受體 (VEGF-receptor，簡稱VEGF-R)，當血液中的 VEGF 與受體結合，因而激活胞內的酪氨酸激酶 (tyrosine kinase)，啟動下游細胞信號級聯，進而促使新脈管生長、誘導血管新生 (angiogenesis)。

有學者提出在糖尿病引起的視神經病、神經性疼痛及角膜炎病症上 (Carmeliet and Storkebaum, 2002; Murakami et al., 2006; Tavakkoly-Bazzaz et al., 2010)，可以觀察到 VEGF 參與增加受損組織週邊的血管再生，提供營養需要，達到組織修復的效果 (Kirchmair et al., 2007; Lin et al., 2010; Schratzberger, 2000)。

## 2. 神經生長因子

神經的可塑性 (neuronal plasticity) 的形成與神經營養因子 (neurotrophin factors) 有極密切的關係，其中之一便是神經生長因子 (Nerve growth factor, NGF)(Diamond, 1992; Semra et al., 2009)。NGF是神經生長必需物質，作用機轉是透過神經細胞表面特別的接受器，它能感受低濃度的NGF，當NGF和接受器互相結合時，能啟動一系列的生化反應，促使神經纖維向分泌NGF的細胞生長 (Diamond, 1992)。透過觀察及探究，許多臨床研究指出NGF會表現在一些心血管疾病和神經系統疾病上，例如：周邊神經病變和神經炎(Smeyne et al., 1994; Sun et al., 2009)。NGF不但可以達到減少神經系統的退化作用，也有研究指出NGF在大鼠的周邊神經上，有加速創傷癒合，達到促進再生的效果(Calza, 2001; Li et al., 2010; Sun et al., 2009)。

## 3. 腦源性神經滋長因子

腦源性神經滋長因子 (Brain-derived neurotrophic factor, BDNF)。BDNF的活化，會帶動幾種荷爾蒙的分泌(Zhao, 2003)。BDNF在中央神經系統和周圍神經系統的都有表現，它會幫助支持現有的神經元生存(Vögelin et al., 2006)，刺進新的神經元和染色體結合的成長和分化(Geremia, 2010; Liang et al., 2010)，也會參與調控神經性疼痛(Herradon et al., 2007; Marcol et al., 2007; Obata and Noguchi, 2006)。在神經系統的形成新的神經元的過程(neurogenesis)中，而BDNF是參與作用最直接的一個因子(Eberhardt et al., 2006)。因此，BDNF在刺激神經增長中也扮演了相當重要的角色(Vögelin et al., 2006)。

## 五、關於周邊神經病變的治療

### 1. 藥物治療

目前臨床上最主要在控制周邊神經病變及周邊神經疼痛的方式，是採取給予

不同的抗發炎或止痛的藥物治療(De Alba et al., 2006; Labuda et al., 2006; Zhao et al., 2007)，這些藥物治療是藉由調控慢性神經炎所造成的發炎過程，或是抑制疼痛受器的敏感性，大部分比較有效的作用在於控制周邊神經病變中所引發的神經病理性疼痛。其中包括：抗憂鬱劑 (antidepressants)，抗痙攣劑 (anticonvulsants)，選擇性的血清素再吸收抑制劑 (selective serotonin reuptake inhibitors)，麻醉止痛劑 (narcotic analgesics)，鴉片 (opioids)，非類固醇類的抗發炎藥 (NSAIDs) 和一些反應在局部部位上的藥劑 (topical agents)，如：辣椒素 (capsaicin) 和利德卡因麻醉劑 (lidocaine)。

雖然藥物治療可以控制神經病變、神經炎所引起的疼痛及發炎，但是藥物治療產生的副作用是不可小覷的。因此，物理治療因子等 (physical modality) 一些安全性較高的輔助性治療 (adjuncts therapy)，如：雷射，便開始受到注意。因是副作用較低的治療方式，所以近年來大家逐漸的開始重視物理因子的治療方式，並且將其列入神經病變的治療項目中。

## 2. 物理治療因子治療

神經物理治療可分為治療中樞神經系統損傷及周邊神經系統損傷。神經損傷的物理治療是利用光、電、水、冷、熱、力等物理因子，是種非傷害性、非侵入性、非藥物性的治療方式，目的在幫助病患減輕疾病或外傷引起的疼痛及不適感，盡速恢復身體機能，並且對於已經有功能障礙和動作失調的病患，協助他盡可能地恢復原有的運動功能。

主要治療方式包含儀器治療、徒手治療、運動治療、功能訓練、輔具矯正及預防性教育。目前在一些冷療、熱療、電療和超音波上，已經有研究證實可以有有效的控制神經損傷及神經疼痛(Lorenzini et al., 2010)。而近幾年來。低能雷射治療 (Low level laser therapy, LLLT) 常被用來促進神經損傷的恢復 (Baxter, 1991; Chen, 2008; Chen, 2005)，但是其藉由調控HIF-1的機轉還不是明確。所以本實驗

著重在探討LLLTT是否能經由調控發炎引發的HIF-1堆積，來降低周邊神經病變的神經痛，並促進神經功能再生。

## 五、雷射治療在周邊神經病變中可能的機轉

### 1. 低能雷射性質、特性與應用

雷射系統有3個必要的組成部分：雷射的媒介、能源的來源和雷射的機械結構。雷射光是單一色光的，且單一方向的，而低能雷射用範圍632 nm到1000 nm (範圍：由可見光到紅外光) 來治療疼痛及傷害症狀。低能雷射的媒介可能是氣體、液體，或者是固體晶體和半導體。低能雷射媒介的選擇是重要的，而決定雷射設備所輸出的波長長度，進而能決定能量輸出和穿透組織的深淺度，如：氦氖是雷射的氣體媒介，鎵-鋁-砷是半導體雷射的媒介。

由低能雷射的命名顯示出，其作用透過非輻射熱或是無熱產生的特性，不同於高能的熱雷射產生的燒灼、蒸發、凝結作用，是運用在切除身上的組織或異常的瘤，屬於較強侵入性的治療方式。低能雷射的功率都在1瓦特以下，因為考慮熱對流的效應，所以通常範圍在5 mW至100 mW之間。所以，LLLTT應用在更細微的組織上，做非侵入性且安全性較高的治療，如此不但能減少疼痛和發炎反應，也可以降低一連串的組織損壞(Chen, 2008)。

低能雷射光和組織的互動模式是透過吸收和反射這兩個作用產生的。吸收被認為是將光能量轉變成另外一種能量形式，組織吸收的特性是依據可以吸收光子的物質在組織裡面的濃度，例如：氨基、細胞色素、載色體(chromophores)和水。決定低能雷射穿透的深度取決於組織的類型和低能雷射光所發射出來的光譜波長。低能雷射光在穿透組織時，有重要的能量衰減。在低能雷射光的特性中，能量密度是最常表現在臨床上的研究報告中。以能量密度來測量雷射劑量，也就是將總能量除以被光照射到的總面積( $J/cm^2$ )。



$$\begin{aligned}\text{Energy density (J/cm}^2\text{)} &= \text{Power density (W/cm}^2\text{)} \times \text{Time (sec)} \\ &= \text{Probe output (W)} \div \text{Area of irradiation} \times \text{Time (sec)}\end{aligned}$$

研究指出， LLLT 在臨床使用上常用於健康檢查和復健治療，運用適當的劑量、波長、持續治療的時間、特異性的應用，就可以降低組織的疼痛反應(Hagiwara, 2008)，增加柔軟度，調控發炎過程(Albertini et al., 2008)，在受傷的組織中重新正常化它的循環流程，減少組織腫脹，並且增加傷口附近的組織癒合或是再生能力(Chen, 2008)。

## 2. 低能雷射治療在發炎反應、疼痛及傷口癒合作用

因為發炎、水腫和傷害所導致缺血性及低氧性的反應，會使受傷的組織，細胞中的載色體(chromophores)對於 LLLT 所發射出來的光子的反應更快速，表現也更明顯。因此，LLLT 對於受傷害的細胞和組織有很好的反應效果(Aimbire, 2005)，而在正常生物的細胞和組織所受到的影響也比較小。

雷射光可以增加好的酵素酶的活性，抑制有害的酵素酶的活性。在細胞的層次中，細胞色素 (Cytochrome) 是可傳送電子或是質子的蛋白質，扮演替人體生物功能提供能量的角色(Giuliani et al., 2009)。細胞色素氧化酵素酶 C 和氧化氮生成酶都被提出會和低能雷射光產生特定的反應，也就是說這些反應酵素酶對於低能雷射有著特殊的親和力(Giuliani et al., 2009)。LLLT 可加速促進三磷酸腺酐 (adenosine triphosphate) 和 NO 的增加，而促進體內的代謝循環、血液循環和神經傳導的功能，減少發炎反應及減少疼痛 (REFERENCE??)。

## 3. 低能雷射治療調控發炎反應

LLLT 可以調控細胞膜的穩定性，藉由影響在粒腺體膜上的鈣離子、鈉離子和鉀離子的濃度和質子濃度梯度，如：一些活性氧化物種類 (ROS) 產物參與

反應，活性氧化物細胞內的鈣離子濃度，會因雷射治療而改善粒腺體吸收鈣離子的能力。雷射治療使組織血管增加，並藉由氨、一氧化氮和血清素的增加，激發的血管舒張，並傳送更多的營養物質和氧氣到受傷的細胞，修復和移除細胞的碎屑，也可增進白血球的活性，加強移除不能發展的細胞和組織的構成物，加速修復和再生成的過程(Fillipin, 2005)，甚至增加前列腺素的生成，尤其是將前列腺素 PGG2 和前列腺素 PGH2 轉變成前列腺素 PGI2。前列腺素 PGI2 有增加血管舒張和抗發炎反應產生，和 COX-1、COX-2 抑制子的功能非常類似(Albertini, 2007a, b; Rizzi, 2006)。

#### 4. 低能雷射治療降低疼痛

LLLT 可促進了鈣離子、鈉離子和鉀離子等離子濃度的正常化，也減輕了因離子轉移所造成的疼痛感覺。LLLT 亦可以增加腦內啡產生，並且阻斷 C-纖維感覺神經纖維的去極化，尤其是發生在低速的神經傳導當中，可以達到抑制感覺傳入的路徑(Albertini, 2007b)。

另一方面，周邊神經病變造成神經組織的受損，所以病患感到的痛覺會被誇張的放大，而 LLLT 可以達到神經細胞的復原和再生，有助於減輕疼痛的知覺(Lorenzini et al., 2010)。LLLT 可藉由抑制 Bradykinin，而降低在皮膚和內臟的痛覺傳入感覺神經元，達到降低疼痛的作用(Bortone, 2008)。LLLT 亦可以有效增加乙醯膽鹼，使自律神經節傳遞的神經訊息正常化(Chavez, 2005)。

#### 5. 低能雷射治療促進組織癒合

傷口的癒合會經過發炎反應、增生、再造和成熟的程序，LLLT 可提供了每一個復元階段正面且有益的效果。因為 LLLT 可刺激增加噬中性球、單核球和淋巴球的活動力，也會刺激增加巨噬細胞的活動性，使得細胞活化、加強胞吞作用、生長因子的分泌和刺激軟骨的生成(Agaiby, 2000; Yasukawa, 2007)。

另外，LLLT 可促進新的血管的生成，同時也促進內皮細胞的生成，使表皮細胞再生能力的速度增快，促進傷口癒合、縮短結疤的時間、減少傷口被細菌或是病毒感染的機率(Hawkins, 2005; Yasukawa, 2007)。LLLT 可促進纖維母細胞、肌肉細胞、骨母細胞和黏膜表皮細胞的 DNA 合成，並增快至少二到五倍的速度，也增加血管表皮細胞生長因子 (VEGF) 和纖維母細胞生長因子 (FGF-2) (Chen, 2008; Fillipin, 2005)。因此，LLLT 可以增加傷口復原後的張力強度，一連串的效果和促進組織癒合相結合之後，使得傷口從受傷到完全復原痊癒的時間會大大的縮短。

## 七、周邊神經病變的動物模式 Animal models of peripheral neuropathy

近二十年來已經發展出許多不同的動物模式，是可以表現出周邊神經病變及神經病理性疼痛的現象。而以下說明的慢性緊縮性損傷模式(Chronic constriction injury, CCI) 就是常見的一種，也是本研究主要利用 CCI 動物模式來探討 LLLT 對於神經痛及功能性恢復的影響。

### 1. 慢性緊縮性損傷模式

在 1988 年由 Bennett 和 Xie 兩位學者所建立的 CCI 大鼠動物模式是一種疼痛性的單一性周邊神經病變(painful peripheral mononeuropathy)(Bennett, 1988)。CCI 已被證明可以作為慢性神經發炎及神經疼痛的動物模式。這個模式主要是利用手術縫線在坐骨神經處，綁出 4 個非完全性的拉緊或綁死的結。

經過 CCI 手術處理的大鼠，在動作行為上會表現出一些特別的症狀，像是因為疼痛現象，而產生輕微的、節制性自殘現象，動物的性格也會變的比手術前敏感，會對周邊環境的警戒性提高，出現舔吮患側腳掌的動作，也會避免將身體重量放置在患側肢體上，避免壓迫動作而產生疼痛(Klass et al., 2005; Obata, 2004)。在 CCI 模式中，動物容易因為一些有害的熱效應 (thermal)或是機械刺激

(mechanical stimuli)而引起痛覺過(hyperalgesia)和異常疼痛(allodynia)(Wang et al., 2010)，而這些疼痛的現象大約會持續約兩個月左右。在運動功能方面，初期動物可能會因為坐骨神經損傷所引起疼痛而有影響。但是後期左右，動物的運動功能會慢慢的恢復至正常(Klass et al., 2005; Naik et al., 2006)。



## 貳、實驗目的

因為 HIF-1 $\alpha$  可影響發炎的目標基因及調控因子，因此，HIF-1 $\alpha$  在發炎的狀況下，扮演了重要的角色。但是目前而言，尚未有學者提出 HIF-1 $\alpha$  在周邊神經病變及神經病理性疼痛上的角色。對於疼痛的治療，LLLT 是一種安全且有效的物理治療工具。其可以有效降低疼痛的敏感性及止痛、減少傷口腫脹、促進傷口癒合及調控發炎因子引發的傷害。因此，本實驗利用 CCI 動物模式，探討 LLLT 對於坐骨神經損傷所引起的神經病變及神經性疼痛的效果及分子生物機轉。評估 LLLT 是否可以降低 HIF-1 $\alpha$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、HIF-1 $\alpha$ 、iNOS、COX-2 及 p53 的在神經中的堆積表現，來降低神經痛，並經由促進及活化 VEGF、NGF 和 BDNF 表現量，來促進神經的功能性恢復。

### 實驗目的

#### 目的 1：

評估 LLLT 在周邊神經病變上，是否可以藉由降低 HIF-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , HIF-1 $\alpha$ , iNOS, COX-2 及 p53 的堆積以降低發炎反應及神經痛。

#### 目的 2：

評估 LLLT 在周邊神經病變上，是否可以促進 VEGF, NGF 和 BDNF 之表現，以促進 CCI 動物之功能性恢復。

#### 目的 3：

評估 LLLT 在周邊神經病變上，對於降低 HIF-1 $\alpha$  及 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , HIF-1 $\alpha$ , iNOS, COX-2 及 p53 的堆積與促進 VEGF、NGF 和 BDNF 生成，是否有劑量依 (dose-dependent) 的效果。

## 參、實驗方法

### 1. 實驗動物來源

本次實驗動物是購自樂斯科生物科技股份有限公司所出產的Sprague—Dawley 雄性大白鼠 (CD<sup>®</sup>(SD) IGS BR, purchased from BioLASCO Taiwan Co., Ltd)，約 5~7 週大，體重約 250 至 300g，飼養於中國醫藥大學實驗動物中心，維持在恆溫的大鼠動物室中 (22-24°C)，光照控制為日 12 小時：夜 12 小時，並維持一定的供水與飼料的給濟。所有的實驗過程會正確的依循中國醫藥大學實驗動物中心之規章。

### 2. 實驗動物分組設計

依有無神經損傷手術，將120隻 Sprague—Dawley 雄性大白鼠隨機分成兩組 (Fig.1)：坐骨神經慢性緊縮性損傷手術組 (手術實驗組, CCI, n=60)，坐骨神經緊縮性損傷假手術組 (假手術控制組, sCCI, n=60)。

在慢性緊縮性損傷手術後第7天，分別在實驗動物手術實驗組和坐骨神經緊縮性損傷假手術組組，介入LLLTT或是假性LLLTT (sham-operated LLLTT, sLLLTT)1 週(1W)、2週(2W)及3週(3W)。而關於sLLLTT的方式，在下文中有詳細的描述。

因此，依據有無CCI手術、有無LLLTT介入及治療時間的安排，本實驗的分組 (共12組)如下：

- (1) CL group：本組再分成CCI + LLLTT治療一週 (n=10)、CCI + LLLTT治療兩週 (n=10)及CCI + LLLTT治療三週 (n=10)
- (2) CsL group：本組再分成 CCI +sLLLTT治療一週 (n=10)、CCI +sLLLTT治療兩週 (n=10)及CCI +sLLLTT治療三週 (n=10)
- (3) sCL group：本組再分成sCCI + LLLTT治療一週 (n=10)、sCCI + LLLTT治療兩週 (n=10) 及sCCI + LLLTT治療三週 (n=10)
- (4) sCsL group：本組再分成sCCI + sLLLTT治療一週 (n=10)、sCCI + sLLLTT

治療一週 (n=10)及sCCI + sLLLT治療三週 (n=10)

### 3. 坐骨神經慢性緊縮性損傷動物模式

CCI的動物模式是由(Bennett and Xie, 1988)年時提出。實驗動物會先以麻醉藥品4%的 isofluran (AErrane, Baxter Healthcare of Puerto Rico, PR,) 麻醉，首先剔除大鼠大腿的部分毛髮，手術處經過酒精消毒殺菌後，用手觸摸髌骨上緣與股骨大轉子，找出兩者之間的連線中心，用手術器械開啟約一公分的手術口徑。將外層的皮膜及肌肉撥開，此時坐骨神經會在股二頭肌的下層處顯露出來。沿下找到坐骨神經的三個分支(the sural, common peroneal and the tibia nerves)起點後，在坐骨神經未分支前約1公分處，利用4/0的 black silk (Unik surgical sutures MFG. CO., 台灣) 以間距1mm的距離，綁上四個非綁死的結。爾後，將手術傷口用4-0及3-0的黑絲線將肌肉組織及皮膚組織縫合。術後會正常供應實驗動物飲水及食物，並密切觀察其癒合情況。sCCI手術控制組也會經過相同手術過程，但只將坐骨神經作挑開游離的動作，並放置相同長度的4-0黑絲線在坐骨神經旁，但並不綁結。處理及關合手術傷口，亦依循相同手法及步驟。

### 4. 雷射治療

利用連續性輸出、波長660-nm鎵-鋁-鉍低能雷射 (Aculas-Am series, Multi-channel LLLT system; Konftec Corporation, Taipei, Taiwan) 作為本次實驗的治療器材。本次實驗雷射器材 (output of the equipment) 常規以 Laser Check Power Meter (Coherent, Santa Clara, CA, USA) 進行校正。首先將雷射治療器材經過消毒後，將雷射探頭探點輕放於實驗動物之坐骨神經緊縮手術的四個綁結處正上方的表皮部位，依序做雷射治療。探頭點大小面積接近  $0.2 \text{ cm}^2$ 。雷射之輸出能量(output power of the laser irradiation)為30 mW及每一點照射60秒。雷射能量密度 (energy densities) 為  $9.0 \text{ J/cm}^2$ 。而sLLLT假性雷射組控制組則是以相同的照

射方式，但是輸出的能量(劑量)設定值為 0。

## 5. 疼痛行為測試

機械性疼痛行為測試是利用 von Frey filament 儀器 (Analgesia Meter, IITC life Science Instruments, Woodland Hills, CA) 刺激疼痛反應部位，進而偵測疼痛的閾值，了解疼痛反應表現。為了確保能精確的測得所需要的數值，針對實驗動物對於環境的適應性培養，對測試者的熟練度訓練，疼痛行為測試會在動物實驗前三天左右開始。疼痛行為測試在此次實驗中，依照實驗流程的作用時間，會在手術前(pre-)、手術後一天(post-)、手術後七天(7D post-)、治療後一週(1W)、治療後兩週(2W)和治療後三週(3W)的時間點進行測試，所有測試都在固定時間約下午二點至四點進行。

實驗動物之雄性大白鼠依序獨立放在透明的壓克力箱中 (22 cm 長 × 22 cm 寬 × 13.3 cm 高)，並置放在鐵架上 (50 cm 長 × 40 cm 寬)，電子的 von Frey filament 會測試在大白鼠的後腳腳底板上，靠近脛神經和腓神經的中間。觀察動物的後爪的收腳閾值使用的 von Frey filament 的克數由 1 克至 26 克範圍內，每次測試停留至少兩秒。動物的後爪收腳反應必須是在大白鼠的腳掌在接受刺激後，完全的伸起或是收回地面，此時的數據才是可以記錄的。這個機械性刺激會持續五次，每次間隔時間為五分鐘，最後才將分析數值做平均的統計處理。

## 6. 評估坐骨神經的運動功能

評估坐骨神經的運動功能損傷的嚴重度及功能性，利用坐骨神經功能指數 (sciatic function index, SFI)，脛神經功能指數 (tibial function index, TFI)，腓神經功能指數 (peroneal function index, PFI) (Hare, 1992) 及坐骨神經靜態指標 (sciatic static index, SSI) (Cobianchi, 2010) 來進行分析及評估。主要是利用步態研究 (Walking track) 方式進行，以壓克力板做成 84 cm 長 × 8.5 寬的步道，走道內層



底板鋪上白色影印紙，走到盡頭處為一黑暗的盒子，在走道正上方則以強烈燈光照射。在正式的測試之前，會先讓每隻大白鼠在走道中試走數回，以便受測鼠可以適應環境，並將大白鼠實驗之受測後肢分別抹上綠、紅顏料後開始測試。每次步態測試完畢之後，基於清楚性與完整性的原則，選擇連續的 3 組足印，用游標尺分別測量雙側受測後肢的三個變量，分別表示：

(1)足印長度 (print length, PL);(2)第一趾最前端中央至第五趾前端中央之距離 (toe spread, TS);(3)第二趾最前端中央至第四趾前端中央之距離 (intermediary toe spread, IT)。根據坐骨神經損傷的指標公式，由實驗肢(E)及正常肢(N)之三組數據 (EPL, ETS, EIT, NPL, NTS, NIT)分別計算出三個數值，分別為：

(1) 足印長度數值 (Print length factor, PLF) = (實驗側之足印長度 - 正常側之足印長度) ÷ 正常側之足印長度 (把上一次檔案中的原始英文方程式附上)

(2) 兩側腳趾延展數值 (Toe spread factor, TSF) = (實驗側第一趾至第五趾之距離 - 正常側第一趾至第五趾之距離) ÷ 正常側第一趾至第五趾之距離 (把上一次檔案中的原始英文方程式附上)

(3) 中間側腳趾延展數值 (Intermediary toe spread factor, ITF) = (實驗側第二趾至第四趾之距離 - 正常側第二趾至第四趾之距離) ÷ 正常側第二趾至第四趾之距離 (把上一次檔案中的原始英文方程式附上)

將這些數值代入下列公式，求得 SFI、TFI、PFI 及 SSI。當指數表現分數為 0 分時為最佳，而分數負值越大表神經功能越差，達到-100 分時，表現則為最差，這也表示損傷的嚴重程度最高。

公式如下：

$$SFI = -38.3(PLF) + 109.5(TSF) + 13.3(ITF) - 8.8$$

$$TFI = -37.2(PLF) + 104.4(TSF) + 45.6(ITF) - 8.8$$

$$PFI = 174.9(PLF) + 80.3(TSF) - 13.4$$

$$SSI = 101.3(TSF) - 54.03(PLF) - 9.5$$

## 7. 組織切片

摘取坐骨神經組織後，將其以 PBS 清洗乾淨，接著以 10% 福馬林 (Mallinckrode chemicals, KY, USA)。固定至少 24 小時，進行脫水處理，將坐骨神經組織樣本泡在 PBS 約 30 分鐘，再浸泡於 0.85% NaCl 30 分鐘，以不同濃度的酒精 (TG1438G, 慕容科技有限公司, 台中市, 台灣)，分別以 70%、85%、95%、100%，分別浸泡 15、30、30 及 30 分鐘，其中 70%、100% 濃度酒精步驟需要重複兩次，並使用新鮮的酒精使其充分脫水，再進行包埋。首先將坐骨神經樣本浸泡 100% xylene (XR-2250, TEDIA, OM, USA)，約 30 分鐘進行兩次，接著在浸泡於 1:1 (xylene/paraffin) 溶液中於 60°C 下處理 45 分鐘，最後在浸泡於 100% paraffin 於 60°C 下處理 20 分鐘 (此步驟重複三次)。將坐骨神經組織樣本進行組織蠟塊包埋 (Tissue-Tek® TEC™ 5 Tissue Embedding Console System)。以便組織切片使用。將組織蠟塊固定於切片機 (QP-3268, Histo-Line Laboratories)，並以每 4µm 的厚度做切片，利用流動冷水槽展開切片，貼在載玻片 (Thremo Scientific, CA, USA)，再以 45°C 熱水槽將組織完全展片，使之密合貼至載玻片上。

## 8. 蘇木素及伊紅染色

將組織切片利用蘇木素及伊紅染色 (hematoxylin and eosin, H&E) 以進行觀察。其方法將 4µm 厚度的組織切片，放置 60°C 烤箱烘烤 20 分鐘，來加速融蠟以及黏合組織，並以 100% xylene (XR-2250, TEDIA, OM, USA) 進行脫蠟 2 次，每次 5 分鐘後，再以 100%、95%、80%、70% 及 50% 酒精 (TG1438G, 慕容科技有限公司, 台中市, 台灣) 水化，每種濃度酒精各浸泡 1 分鐘，接著以 ddH<sub>2</sub>O 清洗組織玻片，靜置至玻片微乾，再以蘇木素 (Muto Pure Chemicals Co, LTD) 染 1 分鐘，以 ddH<sub>2</sub>O 清洗乾淨，接著浸泡至 0.5% 阿摩尼亞溶液中處理 30 秒 (Panreac, Barcelona, Spain)，以 ddH<sub>2</sub>O 做清洗動作，以伊紅 (Muto Pure Chemicals Co, LTD) 溶液染 1 分鐘。而後依次浸泡於 95% 及 100% 酒精脫水，每次 1 分鐘。最後將

組織玻片浸泡至xylene處理三次，每次各 1 分鐘後，把酒精置換出來後，晾乾玻片，並用封片膠 (Histokitt, Sondneim, Rhon, Germany) 進行組織封片的動作。將組織玻片放置顯微鏡 (AxioImager M1, ZEISS, Germany)下，使用照相系統(Axio Cam, ZEISS, Germany) ，以放大倍率 400 倍，單位尺標 200  $\mu$  m拍攝圖片。運用影像分析系統Color Deconvolution 9.0 (Aperio Technologies, CA, USA)，對組織玻片的影像進行型態學分析。利用影像軟體中所分析出屬於強度(strong positive)區域比例，計算出染色玻片之細胞核及細胞質的表現差異。

## 9. 免疫組織化學染色法

將組織切片利用免疫組織化學染色法(Immunohistochemistry stain, IHC)以進行觀察。其方法將 4 $\mu$ m厚度的組織切片，放置 60°C 烤箱烘烤 20 分鐘，來加速融蠟以及黏合組織，接下來準備做脫蠟和前處理 (antigen retrieval)動作，將玻片放入泡好的trilogy再放進高壓蒸氣爐約略 5 至 15 分鐘，或是用鋁箔紙封蓋trilogy溶液，並隔水加熱至 90 度，約 30 分鐘用PAP筆標記組織大小範圍，利用PBS溶液清洗組織，每次 5 分鐘共 2 次。再來利用內生性過氧化氫酶 (hydrogen peroxide solution, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 阻斷非特異性蛋白的作用。將組織玻片泡至 3% 過氧化氫溶液約 10 分鐘，浸至PBS溶液清洗組織，每次 5 分鐘共 2 次。再次利用非特異性蛋白質power block (1 : 10, Biogenex, San Ramon, CA, USA)，加入的量依照組織大小適當覆蓋，靜置約 10 分鐘，組織玻片不用清洗，直接甩乾或吸乾去除過多的溶液，接下來加入要反應的一級抗體，依一級抗體的不同，決定不同的作用時間，加入的量依照組織大小適當覆蓋。抗體使用如下：mouse monoclonal anti-HIF-1 $\alpha$  antibody (1:200, Thermo, CA, USA) 反應於常溫 2 至 3 小時、rabbit polyclonal anti-iNOS antibody (1:200, Thermo CA, USA) 隔夜 4°C 下反應、rabbit polyclonal anti-COX-2 antibody (1:200, Abbiotec, CA, USA) 隔夜 4°C 下反應，rabbit polyclonal anti-VEGF antibody (1:200, Abbiotec, CA, USA) 隔夜 4°C 下反應、rabbit

polyclonal anti-p53 antibody (1:200, Cell signaling, CA, USA) 隔夜 4°C 下反應、rabbit monoclonal anti-S100 antibody (1:200, Epitomic, CA, USA) 隔夜 4°C 下反應和 mouse monoclonal anti-rat monocytes/macrophages (ED1) antibody (1:200, Millipore, CA, USA) 隔夜 4°C 下反應。利用 PBS 溶液清洗組織，每次 5 分鐘共 2 次。接下來加入二級抗體，其中先加入 biotinylated goat anti-mouse and goat anti-rabbit IgG secondary antibody (Jackson ImmunoResearch, PA, USA) 作用 1 小時，再加入 streptavidin-horseradish peroxidase conjugate (Jackson ImmunoResearch, PA, USA) 1 小時。利用 PBS 溶液清洗組織，每次 5 分鐘共 2 次。呈色反應則是利用 3,3'-diaminobenzidine (DAB, 0.2 mg/ml, Pierce, Rockford, IL, USA)，時間依照組織種類判斷，約略 5 至 15 分鐘。利用 PBS 溶液清洗組織，每次 5 分鐘共 2 次。而後再利用 hematoxylin 作雙重染色(double stain)，利用 PBS 溶液清洗組織，每次 5 分鐘共 2 次。最後依序浸泡於 95% 及 100% 酒精脫水，每次 1 分鐘。最後將組織玻片浸泡至 xylene 處理三次，每次各 1 分鐘後，把酒精置換出來，晾乾玻片，並封片膠 (Histokitt, Sondheim, Rhon, Germany) 進行封片的動作。將組織玻片放置顯微鏡 (AxioImager M1, ZEISS, Germany) 下，使用照相系統 (Axio Cam, ZEISS, Germany) 以放大倍率 400 倍，單位尺標 200  $\mu$ m 拍攝圖片，運用影像分析系統 Color Deconvolution 9.0 (Aperio Technologies, CA, USA)，對組織玻片的影像進行分析。利用影像軟體中所分析出屬於強度(strong positive)、中度正向表現(medium positive)區域比例計算出染色玻片之蛋白表現。

## 10. 免疫螢光染色法

將組織切片利用免疫螢光染色法(immunofluorescence staining, IFC)以進行觀察。其方法將 4 $\mu$ m 厚度的組織切片，放置 60°C 烤箱烘烤 20 分鐘，來加速融蠟以及黏合組織，接下來準備做脫蠟和前處理 (antigen retrieval) 動作，將玻片放入泡好的 trilogy 再放進高壓蒸氣爐約略 5 至 15 分鐘，或是用鋁箔紙封蓋 trilogy 溶液，並

隔水加熱至90度，約30分鐘用PAP筆標記組織大小範圍，利用PBS溶液清洗組織，每次5分鐘共2次。再來利用內生性過氧化氫酶 (hydrogen peroxide solution,  $H_2O_2$ ) 阻斷非特異性蛋白的作用。將組織玻片泡至 3% 過氧化氫溶液約10分鐘，浸至PBS溶液清洗組織，每次5分鐘共2次。再次利用非特異性蛋白質power block (1:10, Biogenex, San Ramon, CA, USA)，加入的量依照組織大小適當覆蓋，靜置約10分鐘，組織玻片不用清洗，直接甩乾或吸乾去除過多的溶液，接下來加入要反應的一級抗體，依一級抗體的不同，決定不同的作用時間，加入的量依照組織大小適當覆蓋。抗體使用如下：rabbit monoclonal anti-HIF-1 $\alpha$  antibody (1:200, Santa Cruz, CA, USA) 反應於常溫2至3小時、rabbit polyclonal anti-iNOS antibody (1:200, Thermo CA, USA) 和 mouse monoclonal anti-rat monocytes/macrophages (ED1) antibody (1:200, Millipore, CA. USA) 隔夜4 $^{\circ}C$ 下反應。利用PBS溶液清洗組織，每次5分鐘共2次。接下來加入二級抗體，其中先加入其中先加入fluorescein (FITC)–conjugated affinipure goat anti-rabbit (1:1000,呈色為螢光綠色, Jackson ImmunoResearch, PA, USA)和 rhodamine (TRITC)–conjugated affinipure goat anti-mouse IgG secondary antibody (1:1000,呈色為螢光紅色, Jackson ImmunoResearch, PA, USA) 在常溫下作用1小時，利用PBS溶液清洗組織，每次5分鐘共2次。再加入streptavidin-horseradish peroxidase conjugate (Jackson ImmunoResearch, PA, USA) 常溫下加強訊號1小時。以PBS溶液清洗組織，每次5分鐘共2次。在避光環境下，利用含有DAPI的封片膠 (Dapi fluoromount G, SouthernBiotech, 太鼎生物科技, 台灣) 由於DAPI會使組織的細胞核呈現螢光藍色，利用此種封片膠不但可以達到雙染色的效果，也可以將組織密封。將組織玻片密封完成後，立即拿到螢光顯微鏡 (AxioImager M1, ZEISS, Germany)下，觀察玻片的反應，並以放大倍率400倍，單位尺標200  $\mu m$ 拍攝圖片。

## 11. 組織研磨萃取蛋白液

將存放-80°C 冰箱的坐骨神經組織，約以 0.1 克組織之重量加入以 1:100 比例混合的 protease inhibitor (P8340 cocktail Sigma, NY, USA) 和 T-PER™ Tissue Protein Extraction Reagent (Pierce Chemical Co., USA) 或 hemogenization buffer，再將磨取好的組織靜放置冰上約略 30 分鐘，接著以 12000 rpm 之轉速離心，離心至少 40 分鐘後，取出磨取完成之組織溶液的組織上清液，並存放於-80°C 冰箱隔夜等待雜質沉澱後，再用 12000 rpm 的轉速離心 40 分鐘後取出上清液，即為坐骨神經組織的蛋白萃取液。

## 12. 蛋白質濃度測定

蛋白質的定量採用 Lowry protein assay，其原理為蛋白質先與鹼性的銅離子作用，蛋白質中 tyrosine 及 tryptophan 再還原 phosphomolybdate 而形成有顏色之複合物，複合物顏色淺度與蛋白質中芳香族胺基酸的強度成正比。鹼性銅離子試劑會與蛋白質中少數肽鍵 (peptide bond) 反應，並且在 Folin-Ciocalteu phenol reagent 試劑加入後，與蛋白質中的 tyrosine 及 tryptophan 反應作用產生藍綠色的複合物。同時利用已知蛋白濃度的牛血清蛋白 (Bovine Serum Albumin, BSA) 為標準值蛋白對照組，調整配置蛋白的濃度梯度為 (Table 1)：0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 (mg/ml)，當成標準曲線，接著將樣品稀釋為 50 倍 (總體積為 50  $\mu$ l)，然後加入 250  $\mu$ l 的 Alkaline copper reagent，是以 2% Na-K tartrate、1%  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  和 2%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  在 0.1 N NaOH 中，三者以 1：1：98 之比例混合，並置於室溫下作用 10 分鐘；然後加入 25  $\mu$ l 的 Folin-Ciocalteu phenol reagent 混合，並置於室溫下作用 30 分鐘。最後，以 ELISA reader (Multiskan EX, Thermo, Finland) 以 595 nm 吸光值測定，得出組織樣本的吸光值，並利用這些數值帶入標準曲線中運算，得以分析蛋白質的濃度。

**Table 1 牛血清蛋白之標準蛋白濃度梯度**

mg/ml	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
BSA(0.5mg/ml)	0	10	20	30	40	50
ddH <sub>2</sub> O(μl)	50	40	30	20	10	0
Total(μl)	50	50	50	50	50	50

### 13. 酵素聯結免疫吸附測試

酵素連結免疫吸附法(Enzyme-linked immunosorbent assay)的原理是依據螢光抗體方法發展出來的，它是將酵素連接到抗原或抗體分子上來偵測抗原抗體反應，最後加上酵素的受質，依其呈色強弱來表示。ELISA 可以用來測抗原或抗體的量，例如要測定抗體，則將抗原連接到一固定物上，先加檢體後，再加酵素連接的免疫球蛋白，如此測得之酵素活性即代表抗體量之高低。

利用三明治法的DuoSet<sup>®</sup> ELISA Development kit測試蛋白激素：TNF- $\alpha$  (DY510, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)，IL-1 $\beta$  (DY501, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) 和BDNF (P23560, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)。依據DuoSet<sup>®</sup> ELISA Development kit的實驗步驟進行蛋白分析，首先先將capture antibody, TNF- $\alpha$  (Part840174, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)、IL-1 $\beta$  (Part840414, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) 和BDNF (Part840180, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) 與PBS混合，以 100 $\mu$ l的量放入 96 孔測試盤 (Molecular Device Spec 383, Sunnyvale, CA)中，靜置在室溫下隔夜，再以 0.05% PBS-Tween20 溶液，放置每個孔約 200 $\mu$ l的溶液，清洗兩至三次，清洗完成後倒掉溶液，並將孔盤內的殘餘溶液拍乾，再加入 300 $\mu$ l的reagent diluent (1% BSA in PBS, PH =7.2 至 7.4)，靜置在室溫下至少一小時。再加入 0.05% PBS-Tween20 溶液 200 $\mu$ l，清洗 2 至 3 次。加入standard 標準蛋白TNF- $\alpha$  (Part840175, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)、IL-1 $\beta$  (Part840415, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)和BDNF (Part840182, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)及組織蛋

白樣本到 96 孔的測試盤中(Costar)，室溫下靜置反應兩小時。再以 0.05% PBS-Tween20 溶液清洗 2 至 3 次後，清洗完成後倒掉溶液，並將孔盤內的殘餘溶液拍乾。接下來加入detection antibody, TNF- $\alpha$  (Part840176, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)、IL-1 $\beta$  (Part840416, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) 和 BDNF (Part840181, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)，室溫下反應兩小時。再以 0.05% PBS-Tween20 溶液清洗 2 至 3 次，清洗完成後倒掉溶液，並將孔盤內的殘餘溶液拍乾。再加入 100 $\mu$ l的streptavin-HRP，室溫下 20 分鐘。以 0.05% PBS-Tween20 溶液清洗 2 至 3 次，清洗完成後倒掉溶液，並將孔盤內的殘餘溶液拍乾。加入 100 $\mu$ l的NeA-blue tetramethylbenzidine substrate solution (Clinical, science products Inc., Mansfield, MA, USA)，需要在室溫下避光 20 分鐘，最後加入 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>混合均勻後停止作用。在 96 孔的測試盤上完成抗體與蛋白的聯合作用，並利用 ELISA reader (Multiskan EX, Thermo, Finland)儀器偵測，使用波長 450 nm的光波，去測試目標組織蛋白的吸光值。數據利用Ascent Software for iEMS Reader (Lab systems, Helsinki, Finland) 分析標準濃度曲線分配，使用內插法計算，畫出蛋白濃度的線性曲線。蛋白單位則是用 pg/mg protein來表示。

#### 14. 西方點墨法

利用西方點墨法(Western blot analysis)來分析取樣品蛋白 10-25 $\mu$ g 與 5 倍 loading dye 混合均勻，加熱至 100 $^{\circ}$ C 5 分鐘，再進行 SDS-聚丙烯胺電泳分析。SDS-聚丙烯胺板膠電泳之上層膠體為 3.75 % Stacking gel，下層膠體為 10% 或 12% 或 15 % 的 Separating gel。將做好之板膠固定到電泳裝置上，並將 Running buffer 注滿電泳槽，然後將處理過的蛋白樣品溶液，加入板膠上所形成的 U 型槽中，以 75 至 90V 進行電泳，約 2 至 3 小時。電泳結束後，進行蛋白轉移。將膠體取出，將膠體平鋪在一張浸濕的 Whatman 3M 濾紙上，此時將預先用甲醇(慕容科技有限公司,台中市,台灣)浸濕的 polyvinylidene difluoride(PVDF)膜 (Millipore,



Bedford, MA, 0.45 $\mu$ m pore size) 覆蓋在膠體上面，依次再覆蓋一張浸濕的 3M 濾紙，並以薄板輕推趕走濾紙與 PVDF 膜之間的氣泡後，裝入 Transfer Holder (Bio-rad, CA, USA)，然後置於 Electrotransfer Tank(內含 Transfer buffer)，於 4°C 下進行 85 至 100 伏特電壓轉移，電壓轉移 2 個半小時之後，取出 PVDF membrane 浸入含 5% (w/v) Blocking buffer，由脫脂牛奶(安佳脫脂奶粉, 台灣)混合 TBS buffer(20 mM Tris, 500 mM NaCl, and 0.1% Tween 20, pH7.5)，於室溫下搖動一個小時，再以 TBS buffer(20 mM Tris, 500 mM NaCl, and 0.1% Tween 20, pH7.5)清洗三次。接下來將 PVDF membrane 置於 4°C 冰箱中與一級抗體 mouse monoclonal anti-HIF-1 $\alpha$  primary antibody (1:500, Novus Biologicals, CA, USA), rabbit polyclone anti-iNOS antibody (1:2500, Millipore, CA, USA), rabbit polyclonal anti-COX-2 antibody (1:2500, Abbiotec, CA, USA), rabbit polyclonal anti-VEGF antibody (1:2500, Abbiotec, CA, USA)，rabbit polyclonal anti-p53 antibody (1:2500, Cell signaling, CA, USA) 和 rabbit monoclonal anti-NGF- $\beta$  antibody (1:2500, Millipore, CA, USA) 反應整夜，之後以 TBS buffer (20 mM Tris, 500 mM NaCl, and 0.1% Tween 20, pH7.5)清洗三次，每次 10 分鐘。之後再以二級抗體 horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse 和 anti-rabbit IgG secondary antibody (1:20000, Jackson ImmunoResearch, CA, USA)於室溫下反應 1 小時，以相同的方式清洗 PVDF 膜，再用 chemiluminescence ECL western Blotting luminal Reagent (Santa Cruz, CA, USA)藥劑呈色，最後以冷光儀 chemiluminescence detection system (Fujifilm, LAS-3000, Tokyo, Japan)作蛋白分析影像呈現。

## 15. 統計分析

敘述式統計的結果利用平均值  $\pm$  標準誤(mean  $\pm$ SEM)來呈現，統計分析利用 paired *t*-test 比較術前及術後介入雷射治療組別。利用重複量數ANOVA方法(repeated-measures ANOVA)來檢測各組動物的體重、疼痛閾值和神經功能指數

的，的顯著差異。利用單變量法(one-way ANOVA)來檢測各組老鼠坐骨神經上的 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、HIF-1 $\alpha$ 、iNOS、VEGF、COX-2、p53、NGF 和 BDNF的差異，並利用 Bonferroni事後檢定(Bonferroni post hoc test)來分析組間的差異。所有統計的計算均利用 SPSS for Windows(version 10.0, SPSS, Inc, Chicago, IL, USA)軟體來做分析。統計顯著意義設定為 $p < 0.05$ 。

## 肆、結果

### 體重量測

#### 1. 敘述性統計

大鼠體重(mean±SEM)在 CCI 手術前、術後及術後七天，分別是 250.27 ± 2.08 g、233.38 ± 1.15 g 及 247.03 ± 1.49 g。介入 LLLT 一週、兩週和三週的體重，分別是 267.05 ± 2.48 g、283.18 ± 2.48 g 和 303.30 ± 3.52 g。而介入 sLLLT 一週、兩週和三週的體重，則分別是 271.22 ± 3.39 g、301.63 ± 2.80 g 和 313.60 ± 6.96 g。請參閱圖 1 表 2。

#### 2. 各組間體重的差異

介入治療一週後，CL 與 CsL 組沒有顯著差異 (t-test, P=0.33)；治療兩週後，CL 與 CsL 組有顯著差異 (t-test, P=1.68×10<sup>-5</sup>)。但在治療三週後，CL 與 CsL 組亦沒有顯著差異 (t-test, P=0.20)。請參閱表 2。

#### 3. 比較不同週別體重的差異

在 CL group 中，其 CCI 手術前、術後、術後七天、治療一週、兩週及三週間的體重有顯著的差異 (repeated-ANOVA, F=95.77, P=0)。其中，治療一週與 CCI 手術前、術後、術後七天、治療兩週及三週的組別有顯著差異 (Bonferroni post hoc test, CL-1W v.s. pre- : P=1.14×10<sup>-7</sup> ; CL-1W v.s. post- : P<0.0001 ; CL-1W v.s. 7D post- : P<0.0001 ; CL-1W v.s. CL-2W : P=0.0002 ; CL-1W v.s. CL-3W : P=1.33×10<sup>-12</sup>)。而治療兩週與三週組亦有顯著差異 (Bonferroni post hoc test, CL-2W v.s. CL-3W : P=0.0007)。請參閱表 2。

### 疼痛行為測試

#### 1. 敘述性統計

大鼠的機械性疼痛閾值表現(mean±SEM)在 CCI 手術前、術後及術

後七天，分別是分別是  $18.78 \pm 0.09$  g、 $10.74 \pm 0.19$  和  $9.70 \pm 0.26$  g。而介入 LLLT 一週、兩週和三週的疼痛閾值，分別是  $12.43 \pm 0.20$  g、 $12.90 \pm 0.23$  g 和  $13.05 \pm 0.28$  g。而介入 sLLLTT 一週、兩週和三週的疼痛閾值，則分別是  $10.36 \pm 0.22$  g、 $10.57 \pm 0.29$  g 和  $10.10 \pm 0.26$  g。請參閱圖 2 表 3。

## 2. 各組間疼痛行為表現的差異

介入治療一週後，CL與CsL組別有顯著差異 (t-test,  $P=4 \times 10^{-9}$ )；治療兩週後，CL與CsL組有顯著差異 (t-test,  $P=2.94 \times 10^{-7}$ )；在治療三週後，CL與CsL組也有顯著差異 (t-test,  $P=3.86 \times 10^{-7}$ )。請參閱表 3。

## 3. 比較不同週別疼痛行為表現的差異

在CL group中，其CCI手術前、術後、術後七天、治療一週、兩週及三週間的疼痛行為有顯著的差異 (repeated-ANOVA,  $F=306.62$ ,  $P=0$ )。其中，治療一週與CCI手術前、術後、術後七天的組別有顯著差異 (Bonferroni post hoc test, CL-1W v.s. pre- :  $P<0.0001$  ; CL-1W v.s post- :  $P=1.93 \times 10^{-6}$  ; CL-1W v.s. 7D post- :  $P=6.66 \times 10^{-15}$ )。治療兩週與CCI手術後、術後七天的組別有顯著差異 (Bonferroni post hoc test, CL-2W v.s post- :  $P=1.08 \times 10^{-7}$  ; CL-2W v.s. 7D post- :  $P=3.33 \times 10^{-15}$ )。而在治療兩週與CCI手術後、術後七天的組別有顯著差異 (Bonferroni post hoc test, CL-3W v.s post- :  $P=3.26 \times 10^{-5}$  ; CL-2W v.s. 7D post- :  $P=3.33 \times 10^{-10}$ )。請參閱表 3。

## 評估坐骨神經功能指數(SFI)

### 1. 敘述性統計

大鼠的 SFI(mean $\pm$ SEM)在 CCI 手術前、術後及術後七天，分別是分別是  $-6.67 \pm 1.02$ 、 $-86.00 \pm 1.36$  和  $-82.42 \pm 1.31$ 。而介入 LLLT 一週、兩週和三週的 SFI，分別是  $-67.78 \pm 1.83$ 、 $-57.12 \pm 2.57$  和  $-37.45 \pm 1.38$ 。而介入 sLLLTT 一週、兩週和三週的 SFI，則分別是  $-80.18 \pm 3.03$ 、 $-72.87 \pm 2.59$  和  $-58.20 \pm 1.93$ 。請參閱圖 3 表 4。

## 2. 各組間坐骨神經功能指數的差異

介入治療一週後，SFI在CL與CsL組間有顯著差異 (t-test,  $P=0.01$ )；治療兩週後，CL與CsL組間有顯著差異 (t-test,  $P=1\times 10^{-4}$ )；在治療三週後，CL與CsL組間也有顯著差異 (t-test,  $P=6.74\times 10^{-8}$ )。請參閱表 4。

## 3. 比較不同週別坐骨神經功能指數的差異

在CL group中，其CCI手術前、術後、術後七天、治療一週、兩週及三週間的SFI有顯著的差異 (repeated-ANOVA,  $F=527.72$ ,  $P=0$ )。其中，治療一週與CCI手術前、術後、術後七天、治療兩週及三週的SFI有顯著差異 (Bonferroni post hoc test, CL-1W v.s. pre- :  $P<0.0001$  ; CL-1W v.s post- :  $P=6.33\times 10^{-14}$  ; CL-1W v.s. 7D post- :  $P=1.67\times 10^{-9}$  ; CL-1W v.s. CL-2W :  $P=0.0003$  ; CL-1W v.s. CL-3W :  $P=1.13\times 10^{-13}$ )。治療兩週與CCI手術前、術後、術後七天及三週的SFI有顯著差異 (Bonferroni post hoc test, CL-2W v.s. pre- 、CL-2W v.s post- 和CL-2W v.s. 7D post- :  $P<0.0001$  ; CL-2W v.s. CL-3W :  $P=5.98\times 10^{-5}$ )。而在治療三週與CCI手術前、術後和術後七天的SFI有顯著差異 (Bonferroni post hoc test, CL-3W v.s. pre- :  $P=3.33\times 10^{-15}$  ; CL-3W v.s post- 和CL-3W v.s. 7D post- :  $P<0.0001$ )。請參閱表 4。

## 評估脛神經功能指數 (TFI)

### 1. 敘述性統計

大鼠的TFI(mean $\pm$ SEM)在CCI手術前、術後及術後七天，分別是分別是-6.70 $\pm$ 0.79、-94.32 $\pm$ 1.11和-92.76 $\pm$ 1.51。而介入LLLT一週、兩週和三週的TFI，分別是-76.2 $\pm$ 2.97、-69.51 $\pm$ 2.81和-52.23 $\pm$ 1.56。而介入sLLLT一週、兩週和三週的TFI，則分別是-88.31 $\pm$ 3.13、-85.90 $\pm$ 2.90和-67.13 $\pm$ 2.73。請參閱圖 4 表 5。

### 2. 各組間脛神經功能指數的差異

介入治療一週後，TFI在CL與CsL組間有顯著差異 (t-test,  $P=0.01$ )；治療兩週後，CL與CsL組間有顯著差異 (t-test,  $P=2\times 10^{-4}$ )；在治療三週後，CL與CsL組間也有顯著差異 (t-test,  $P=1\times 10^{-4}$ )。請參閱表 5。

### 3. 比較不同週別脛神經功能指數的差異

在CL group中，其CCI手術前、術後、術後七天、治療一週、兩週及三週間的TFI有顯著的差異 (repeated-ANOVA,  $F=563.892$ ,  $P=0$ )。其中，治療一週與CCI手術前、術後、術後七天及治療三週的TFI有顯著差異 (Bonferroni post hoc test, CL-1W v.s. pre- :  $P<0.0001$  ; CL-1W v.s post- :  $P=3.9\times 10^{-12}$  ; CL-1W v.s. 7D post- :  $P=2.28\times 10^{-10}$  ; CL-1W v.s.CL-3W :  $P=2.37\times 10^{-8}$ )。治療兩週與CCI手術前、術後、術後七天及三週的TFI有顯著差異 (Bonferroni post hoc test, CL-2W v.s. pre- 、 CL-2W v.s post- :  $P<0.0001$  ; CL-2W v.s. 7D post- :  $P=1.33\times 10^{-14}$  ; CL-2W v.s. CL-3W :  $P=4\times 10^{-4}$ )。而在治療三週與CCI手術前、術後和術後七天的TFI有顯著差異 (Bonferroni post hoc test, CL-3W v.s. pre- 、 CL-3W v.s post- 和 CL-3W v.s. 7D post- :  $P<0.0001$ )。請參閱表 5。

## 評估腓神經功能指數(PFI)

### 1. 敘述性統計

大鼠的 PFI(mean±SEM)在 CCI 手術前、術後及術後七天，分別是分別是  $-14.56 \pm 3.38$ 、 $-80.67 \pm 3.22$  和  $-46.21 \pm 3.28$ 。而介入 LLLT 一週、兩週和三週的 PFI，分別是  $-60.15 \pm 3.89$ 、 $-53.16 \pm 4.08$  和  $-13.81 \pm 3.29$ 。而介入 sLLLT 一週、兩週和三週的 PFI，則分別是  $-49.23 \pm 5.19$ 、 $-53.35 \pm 5.99$  和  $-28.02 \pm 6.45$ 。請參閱圖 5 表 6。

### 2. 各組間腓神經功能指數的差異

介入治療一週、兩週和三週治療後，CL 與 CsL 組別皆沒有顯著差異 (t-test, CL-1W vs CsL-1W, CL-2W vs CsL-2W, CL-3W vs CsL-3W, all of  $P>0.05$ )。請參閱表 6。

### 3. 比較不同週別腓神經功能指數的差異

在CL group中，其CCI手術前、術後、術後七天、治療一週、兩週及三週間的PFI有顯著的差異 (repeated-ANOVA,  $F=51.08$ ,  $P=0$ )。其中，治療一週與CCI手術前、術後及治療三週的PFI有顯著差異 (Bonferroni post hoc test,

CL-1W v.s. pre- :  $P=4\times 10^{-4}$  ; CL-1W v.s. post- :  $P=0.003$  ; CL-1W v.s. CL-3W :  $P=4.6\times 10^{-4}$  )。治療兩週與與CCI手術前、術後及治療三週的PFI有顯著差異 (Bonferroni post hoc test, CL-2W v.s. pre- :  $P=3.58\times 10^{-8}$  ; CL-2W v.s. post- :  $P=2\times 10^{-4}$  ; CL-2W v.s. CL-3W :  $P=5.2\times 10^{-4}$  )。而在治療三週與CCI手術前、術後和術後七天的PFI有顯著差異 (Bonferroni post hoc test, CL-3W v.s. post- :  $P=3.66\times 10^{-13}$  ; CL-3W v.s. 7D post- :  $P=0.002$  )。請參閱表 6。

## 評估坐骨神經靜態指標 (SSI)

### 1. 敘述性統計

大鼠的 SSI(mean $\pm$ SEM)在 CCI 手術前、術後及術後七天，分別是分別是 -8.64  $\pm$  1.14、-70.73  $\pm$  1.42 和 -73.32  $\pm$  1.29。而介入 LLLT 一週、兩週和三週的 SSI，分別是 -59.24  $\pm$  1.60、-47.94  $\pm$  2.45 和 -31.43  $\pm$  1.33。而介入 sLLLT 一週、兩週和三週的 SSI，則分別是 -71.26  $\pm$  2.87、-63.00  $\pm$  2.39 和 -53.35  $\pm$  2.81。請參閱圖 6 表 7。

### 2. 各組間坐骨神經靜態指標的差異

介入治療一週後，SSI在CL與CsL組間有顯著差異 (t-test,  $P=0.001$ )；治療兩週後，CL與CsL組間有顯著差異 (t-test,  $P=8.48\times 10^{-5}$ )；在治療三週後，CL與CsL組間也有顯著差異 (t-test,  $P=1.39\times 10^{-6}$ )。請參閱表 7。

### 3. 比較不同週別坐骨神經靜態指標的差異

在CL group中，其CCI手術前、術後、術後七天、治療一週、兩週及三週間的SSI有顯著的差異 (repeated-ANOVA,  $F=350.56$ ,  $P=0$ )。其中，治療一週與CCI手術前、術後、術後七天、治療兩週及三週的SSI有顯著差異 (Bonferroni post hoc test, CL-1W v.s. pre- :  $P<0.0001$  ; CL-1W v.s. post- :  $P=4.7\times 10^{-6}$  ; CL-1W v.s. 7D post- :  $P=9.46\times 10^{-9}$  ; CL-1W v.s. CL-2W :  $P=0.001$  ; CL-1W v.s. CL-3W :  $P=2.99\times 10^{-12}$  )。治療兩週與與CCI手術前、術後、術後七天及治療三週的SSI有顯著差異 (Bonferroni post hoc test, CL-2W v.s. pre- :  $P<0.0001$ 、CL-2W v.s. post- :  $P<0.0001$ 、CL-2W v.s. 7D post- :  $P<0.0001$  ; CL-2W v.s. CL-3W :  $P=3.\times 10^{-4}$  )。而在治療三週與CCI手術前、術後和術後七天的SSI

有顯著差異 (Bonferroni post hoc test, CL-3W v.s pre- :  $P=1.05\times 10^{-9}$  ; CL-3W v.s post- :  $P<0.0001$ , CL-3W v.s. 7D post- :  $P<0.0001$ )。請參閱表 7。

## 酵素聯結免疫吸附測試

### TNF- $\alpha$ 的表現量

#### 1. 敘述性統計

在治療一週後,CL、CsL、sCL 及 CsL 各組的 TNF- $\alpha$  表現量(mean $\pm$ SEM)分別為  $5946.14 \pm 1401.31$  (pg/mg)、 $17048.43 \pm 3815.98$  (pg/mg)、 $907.40 \pm 183.81$  (pg/mg)及  $1202.39 \pm 70.86$  (pg/mg)。治療兩週後,CL、CsL、sCL 及 CsL 各組的表現量分別為  $3601.79 \pm 387.83$  (pg/mg)、 $9453.13 \pm 1146.64$  (pg/mg)、 $724.47 \pm 114.71$  (pg/mg)及  $1010.68 \pm 11.18$  (pg/mg)。治療三週後,CL、CsL、sCL 及 CsL 各組的表現量分別為  $2631.01 \pm 589.01$  (pg/mg)、 $9502.10 \pm 2317.18$  (pg/mg)、 $586.60 \pm 98.72$  (pg/mg)及  $898.64 \pm 36.45$  (pg/mg)。請參閱圖 7 表 8。

#### 2. 各組 TNF- $\alpha$ 表現量的差異

介入治療一週後,四組老鼠(sCsL、sCL、CsL和CL group)的TNF- $\alpha$ 表現量有顯著差異 (one-way ANOVA,  $F=12.04$ ,  $P=7.1\times 10^{-5}$ )。其中,CL與CsL組(Bonferroni post hoc test,  $P=0.008$ )、CsL和sCL組 (Bonferroni post hoc test,  $P=8.5\times 10^{-5}$ )及CsL和sCsL組(Bonferroni post hoc test,  $P=0.001$ )有顯著差異。請參閱表 8。

介入治療二週後,四組老鼠(sCsL、sCL、CsL和CL group)的TNF- $\alpha$ 表現量亦有顯著差異(one-way ANOVA,  $F=38.9235$ ,  $P=5.7\times 10^{-9}$ )。其中,CL與CsL組(Bonferroni post hoc test,  $P=9.1\times 10^{-6}$ )、CL與sCL組(Bonferroni post hoc test,  $P=0.019$ )、CsL與sCL組(Bonferroni post hoc test,  $P=6.9\times 10^{-9}$ )及CsL與sCsL組(Bonferroni post hoc test,  $P=3.5\times 10^{-7}$ )有顯著差異。請參閱表 8。

介入治療三週後,亦發現四組老鼠有顯著的差異 (one-way ANOVA,  $F=10.73$ ,  $P=1.5\times 10^{-4}$ )。其中,CL與CsL組 (Bonferroni post hoc test,  $P=0.01$ )、



CL 與sCsL組 (Bonferroni post hoc test,  $P= 2.51\times 10^{-3}$ )及CsL與 sCL組 (Bonferroni post hoc test,  $P=1.9\times 10^{-4}$ )有顯著差異。請參閱表 8。

### 3. 比較各組治療時間對 TNF- $\alpha$ 表現量的影響

在CL、CsL及sCL三組中，介入一週、兩週及三週治療，TNF- $\alpha$ 的表現量無顯著差異(one-way ANOVA, 分別為 $F=2.07, P=0.09$ ;  $F=3.54, P=0.05$ ;  $F=1.37, P=0.28$ )。只有在sCsL group, 在經過一週、兩週和三週後的表現量有顯著的差異 (one-way ANOVA,  $F=10.93, P=4\times 10^{-3}$ )。其中，在經過一週後和三週後時有顯著差異 (Bonferroni post hoc test,  $P= 4\times 10^{-3}$ )。請參閱表 8。

## IL-1 $\beta$ 的表現量

### 1. 敘述性統計

在治療一週後，CL、CsL、sCL 及 CsL 各組的 **IL-1 $\beta$**  表現量(mean $\pm$ SEM) 分別為  $7077.83 \pm 691.05$  (pg/mg)、 $18358.22 \pm 4570.76$  (pg/mg)、 $1999.14 \pm 594.65$  (pg/mg) 及  $2174.89 \pm 591.64$  (pg/mg)。治療兩週後，CL、CsL、sCL 及 CsL 各組的表現量分別為  $6369.17 \pm 668.91$  (pg/mg)、 $17392.95 \pm 3781.43$  (pg/mg)、 $1731.98 \pm 471.47$  (pg/mg)及  $1938.02 \pm 577.75$  (pg/mg)。治療三週後，CL、CsL、sCL 及 CsL 各組的表現量分別為  $4044.36 \pm 761.51$  (pg/mg)、 $18407.62 \pm 5368.96$  (pg/mg)、 $1360.16 \pm 358.40$  (pg/mg) 及  $1874.61 \pm 592.86$  (pg/mg)。請參閱圖 8 表 9。

### 2. 各組 IL-1 $\beta$ 表現量的差異

介入治療一週後，四組老鼠(sCsL、sCL、CsL 和 CL group)的 IL-1 $\beta$  表現量有顯著差異 (one-way ANOVA,  $F=7.59, P=0.002$ )。其中，CL 與 CsL 組(Bonferroni post hoc test,  $P=0.04$ )、CSL 和 sCL 組 (Bonferroni post hoc test,  $P=0.01$ )及 CSL 和 sCsL 組(Bonferroni post hoc test,  $P= 0.01$ )有顯著差異。請參閱表 9。

介入治療二週後，四組老鼠(sCsL、sCL、CsL和CL group)的IL-1 $\beta$ 表現量亦有顯著差異(one-way ANOVA,  $F= 10.08, P=1\times 10^{-4}$ )。其中，CL與CsL組

(Bonferroni post hoc test,  $P=0.01$ )、CsL與sCL組(Bonferroni post hoc test,  $P=0.002$ )及CsL與sCsL組(Bonferroni post hoc test,  $P=0.002$ )有顯著差異。請參閱表 9。

介入治療三週後，亦發現四組老鼠有顯著的差異 (one-way ANOVA,  $F=6.39$ ,  $P=0.005$ )。其中，CL 與 CsL 組 (Bonferroni post hoc test,  $P=0.03$ )、CL 與 sCsL 組 (Bonferroni post hoc test,  $P=0.02$ )及 CsL 與 sCL 組 (Bonferroni post hoc test,  $P=0.02$ )有顯著差異。請參閱表 9。

### 3. 比較各組治療時間對 IL-1 $\beta$ 表現量的影響

在 CsL、sCL 及 sCsL 三組中，介入一週、兩週及三週治療，IL-1 $\beta$  的表現量無顯著差異(one-way ANOVA, 分別為  $F=0.02$ ,  $P=0.098$ ； $F=0.44$ ,  $P=0.66$ ； $F=0.08$ ,  $P=0.92$ )。只有在 CL group，在治療後一週、兩週和三週的表現量有顯著的差異 (one-way ANOVA,  $F=5.02$ ,  $P=0.02$ )。其中，在治療一週和三週後時有顯著差異 (Bonferroni post hoc test,  $P=0.03$ )。請參閱表 9。

## BDNF 的表現量

### 1. 敘述性統計

在治療一週後，CL、CsL、sCL 及 CsL 各組的 BDNF 表現量(mean $\pm$ SEM)分別為  $3394.25 \pm 138.98$  (pg/mg)、 $2621.38 \pm 215.93$  (pg/mg)、 $386.59 \pm 55.28$  (pg/mg)及  $415.12 \pm 65.47$  (pg/mg)。治療兩週後，CL、CsL、sCL 及 CsL 各組的表現量分別為  $4188.56 \pm 104.52$  (pg/mg)、 $3122.22 \pm 180.54$  (pg/mg)、 $341.76 \pm 24.69$  (pg/mg) 及  $374.66 \pm 42.94$  (pg/mg)。治療三週後，CL、CsL、sCL 及 CsL 各組的表現量分別為  $4972.37 \pm 154.64$  (pg/mg)、 $3282.78 \pm 168.01$  (pg/mg)、 $369.74 \pm 6.62$  (pg/mg)及  $374.74 \pm 44.78$  (pg/mg)。請參閱圖 9 表 10。

### 2. 各組 BDNF 表現量的差異

介入治療一週後，四組老鼠(sCsL、sCL、CsL和CL group)的BDNF表現量有顯著差異 (one-way ANOVA,  $F=88.83$ ,  $P=3.4 \times 10^{-10}$ )。其中，CL與CsL組 (Bonferroni post hoc test,  $P=0.01$ )、CL和sCL組 (Bonferroni post hoc test,

$P=4\times 10^{-9}$ )、CL和sCsL組 (Bonferroni post hoc test,  $P=4.6\times 10^{-9}$ )、CSL和sCL組(Bonferroni post hoc test,  $P=2.8\times 10^{-7}$ )及CSL和sCsL組(Bonferroni post hoc test,  $P=3.3\times 10^{-7}$ )有顯著差異。請參閱表 10。

介入治療二週後，四組老鼠(sCsL、sCL、CsL和CL group)的BDNF表現量亦有顯著差異(one-way ANOVA,  $F=222.11$ ,  $P=3.0\times 10^{-13}$ )。其中，CL與CsL組(Bonferroni post hoc test,  $P=5.3\times 10^{-5}$ )、CL與sCL組(Bonferroni post hoc test,  $P=3.6\times 10^{-12}$ )、CL與sCsL組(Bonferroni post hoc test,  $P=4.1\times 10^{-12}$ )、CsL與sCL組(Bonferroni post hoc test,  $P=5.0\times 10^{-10}$ )及CsL與sCsL組(Bonferroni post hoc test,  $P=6.0\times 10^{-10}$ )有顯著差異。請參閱表 10。

介入治療三週後，亦發現四組老鼠有顯著的差異 (one-way ANOVA,  $F=255.98$ ,  $P=1\times 10^{-13}$ )。其中，CL與CsL組(Bonferroni post hoc test,  $P=4.6\times 10^{-7}$ )、CL與sCL組(Bonferroni post hoc test,  $P=8.5\times 10^{-13}$ )、CL與sCsL組(Bonferroni post hoc test,  $P=8.6\times 10^{-13}$ )、CsL與sCL組(Bonferroni post hoc test,  $P=9.2\times 10^{-10}$ )及CsL與sCsL組(Bonferroni post hoc test,  $P=9.4\times 10^{-10}$ )有顯著差異。請參閱表 10。

### 3. 比較各組治療時間對 BDNF 的表現量的影響

在CsL、sCL及sCsL三組中，介入一週、兩週及三週治療，BDNF的表現量無顯著差異(one-way ANOVA, 分別是 $F=3.32$ ,  $P=0.06$ ;  $F=0.41$ ,  $P=0.67$ ;  $F=0.02$ ,  $P=0.82$ )。只有在CL group, 在治療後一週、兩週和三週的表現量有顯著的差異(one-way ANOVA, 分別是  $F=3.32$ ,  $P=0.06$ ;  $F=0.41$ ,  $P=0.67$ ;  $F=0.20$ ,  $P=0.82$ )。其中，在治療一週和兩週後、一週和三週後及兩週和三週後有顯著差異 (Bonferroni post hoc test, 分別為 $P=0.002$ ;  $P=1.6\times 10^{-6}$ ;  $P=0.003$ )。請參表 10。

## 蛋白免疫分析之西方點墨法

### HIF-1 $\alpha$ 的表現量

#### 1. 敘述性統計

在治療一週後，HIF-1 $\alpha$  在 CL、CsL、sCL 及 CsL 各組的表現量 (mean $\pm$ SEM)分別為  $0.18 \pm 0.04$ 、 $0.34 \pm 0.05$ 、 $0.02 \pm 0.01$  和  $0.04 \pm 0.01$ 。治療兩週後，CL、CsL、sCL 及 CsL 各組的 HIF-1 $\alpha$  表現量分別為  $0.28 \pm 0.05$ 、

0.67 ± 0.13、0.03 ± 0.01 和 0.07 ± 0.03。治療三週後，CL、CsL、sCL 及 CsL 各組的 HIF-1 $\alpha$  表現量分別為 0.19 ± 0.05、0.61 ± 0.15、0.04 ± 0.01 和 0.08 ± 0.03。請參閱圖 10 表 11。

## 2. 各組 HIF-1 $\alpha$ 表現量的差異

介入治療一週後，四組老鼠(sCsL、sCL、CsL和CL group)的HIF-1 $\alpha$ 表現量有顯著差異(one-way ANOVA, F=17.50, P=1.3 $\times 10^{-6}$ )。在CL與CsL (Bonferroni post hoc test, P=0.01)、CSL和sCL組(Bonferroni post hoc test, P=3.48 $\times 10^{-6}$ ) 與CSL和sCsL組(Bonferroni post hoc test, P= 9.21 $\times 10^{-6}$ )有顯著差異。請參閱表 11。

介入治療二週後，四組老鼠(sCsL、sCL、CsL和CL group)的HIF-1 $\alpha$ 表現量亦有顯著差異(one-way ANOVA, F=17.18, P= 1.6 $\times 10^{-6}$ )。其中，CL與CsL (Bonferroni post hoc test, P=0.004)、CsL與sCL組(Bonferroni post hoc test, P=3.87 $\times 10^{-6}$ )及CsL與sCsL組(Bonferroni post hoc test, P= 1.06 $\times 10^{-5}$ )有顯著差異。請參閱表 11。

介入治療三週後，亦發現四組老鼠有顯著的差異 (one-way ANOVA, F=10.21, P=1.04 $\times 10^{-4}$ )。其中，CL與CsL組(Bonferroni post hoc test, P=0.01)、CsL與sCL組(Bonferroni post hoc test, P= 5 $\times 10^{-4}$ )及CsL與 sCsL組(Bonferroni post hoc test, P=2 $\times 10^{-4}$ ) 有顯著差異。請參閱表 11。

## 3. 比較各組治療時間對 HIF-1 $\alpha$ 表現量的影響

在 CL、CsL、sCL 及 sCsL 四組中，介入一週、兩週及三週治療，HIF-1 $\alpha$  的表現量無顯著差異 (one-way ANOVA, 分別是 F=2.07, P=0.15；F=2.17, P=0.14；F=1.54, P=0.24；F=0.92, P=0.41)。請參閱表 11。

## iNOS 的表現量

### 1. 敘述性統計

在治療一週後，CL、CsL、sCL 及 CsL 各組的 iNOS 表現量(mean $\pm$ SEM)

分別為  $0.05 \pm 0.01$ 、 $0.13 \pm 0.02$ 、 $0.12 \pm 0.01$  和  $0.04 \pm 0.01$ 。治療兩週後，CL、CsL、sCL 及 CsL 各組的表現量分別為  $0.09 \pm 0.03$ 、 $0.26 \pm 0.68$ 、 $0.03 \pm 0.01$  和  $0.03 \pm 0.01$ 。治療三週後，CL、CsL、sCL 及 CsL 各組的表現量分別為  $0.91 \pm 0.033$ 、 $0.27 \pm 0.09$ 、 $0.026 \pm 0.01$  和  $0.03 \pm 0.01$ 。請參閱圖 11 表 12。

## 2. 各組 iNOS 表現量的差異

介入治療一週後，四組老鼠(sCsL、sCL、CsL和CL group)的iNOS表現量有顯著差異(one-way ANOVA,  $24.56$ ,  $P=7.9 \times 10^{-9}$ )。在CL與CsL (Bonferroni post hoc test,  $P=0.1 \times 10^{-3}$ )、CsL和sCL組(Bonferroni post hoc test,  $P=2.7 \times 10^{-8}$ )與CsL和sCsL組(Bonferroni post hoc test,  $P=1.2 \times 10^{-7}$ )有顯著差異。請參閱表 12。

介入治療二週後，四組老鼠(sCsL、sCL、CsL和CL group)的iNOS表現量亦有顯著差異(one-way ANOVA,  $F=8.17$ ,  $P=2.8 \times 10^{-4}$ )。其中，CL與CsL (Bonferroni post hoc test,  $P=0.001$ )、CsL與sCL組(Bonferroni post hoc test,  $P=1 \times 10^{-3}$ )及CsL與sCsL組(Bonferroni post hoc test,  $P=1 \times 10^{-3}$ )有顯著差異。請參閱表 12。

介入治療三週後，亦發現四組老鼠有顯著的差異 (one-way ANOVA,  $F=10.21$ ,  $P=1.04 \times 10^{-4}$ )。其中，CL與CsL組(Bonferroni post hoc test,  $P=1.0 \times 10^{-4}$ )、CsL與sCL組(Bonferroni post hoc test,  $P=0.01$ )及CsL與 sCsL組(Bonferroni post hoc test,  $P=0.01$ ) 有顯著差異。請參閱表 12。

## 3. 比較各組治療時間對 iNOS 的表現量的影響

在 CL、CsL、sCL 及 sCsL 四組中，介入一週、兩週及三週治療，iNOS 的表現量無顯著差異 (one-way ANOVA, 分別是  $F=0.44$ ,  $P=0.65$ ； $F=1.37$ ,  $P=0.27$ ； $F=0.93$ ,  $P=0.41$ ； $F=0.93$ ,  $P=0.41$ ； $F=0.48$ ,  $P=0.63$ )。請參閱表 12。

## COX-2 的表現量

### 1. 敘述性統計

在治療一週後，CL、CsL、sCL 及 CsL 各組的 COX-2 表現量(mean±SEM) 分別為  $0.27 \pm 0.05$ 、 $0.51 \pm 0.08$ 、 $0.10 \pm 0.02$  和  $0.15 \pm 0.04$ 。治療兩週後，CL、CsL、sCL 及 CsL 各組的表現量分別為  $0.33 \pm 0.03$ 、 $0.57 \pm 0.07$ 、 $0.14 \pm 0.03$  和  $0.16 \pm 0.03$ 。治療三週後，CL、CsL、sCL 及 CsL 各組的表現量分別為  $0.28 \pm 0.04$ 、 $0.58 \pm 0.1$ 、 $0.026 \pm 0.01$  和  $0.15 \pm 0.02$ 。請參閱圖 12 表 13。

### 2. 各組 COX-2 表現量的差異

介入治療一週後，四組老鼠(sCsL、sCL、CsL和CL group)的COX-2 表現量有顯著差異(one-way ANOVA,  $F=13.16$ ,  $P=5.9 \times 10^{-6}$ )。其中，在CL與CsL (Bonferroni post hoc test,  $P=0.001$ )、CsL和sCL組(Bonferroni post hoc test,  $P=8.44 \times 10^{-6}$ ) 與CsL和sCsL組(Bonferroni post hoc test,  $P=8.47 \times 10^{-5}$ )有顯著差異。請參閱表 13。

介入治療二週後，四組老鼠(sCsL、sCL、CsL和CL group)的COX-2 表現量亦有顯著差異(one-way ANOVA,  $F=17.80$ ,  $P=3 \times 10^{-7}$ )。其中，CL與CsL (Bonferroni post hoc test,  $P=0.005$ )、CL 與 sCL組有統計上的顯著差異 (Bonferroni post hoc test,  $P=0.04$ )、CsL與sCL組(Bonferroni post hoc test,  $P=9.9 \times 10^{-7}$ )及CsL與sCsL組(Bonferroni post hoc test,  $2.84 \times 10^{-6}$ )有顯著差異。請參閱表 13。

介入治療三週後，亦發現四組老鼠有顯著差異 (one-way ANOVA,  $F=13.98$ ,  $P=3.3 \times 10^{-6}$ )。其中，CL與CsL組(Bonferroni post hoc test,  $P=0.003$ )、CL與sCsL組(Bonferroni post hoc test,  $P=2.27 \times 10^{-5}$ )及CsL與 sCL組 (Bonferroni post hoc test,  $P=8.83 \times 10^{-6}$ ) 有顯著差異。請參閱表 13。

### 3. 比較各組治療時間對 COX-2 的表現量的影響

在 CL、CsL、sCL 及 sCsL 四組中，介入一週、兩週及三週治療，COX-2 的表現量無顯著差異 (one-way ANOVA, 分別是  $F=0.47, P=0.63$  ;  $F=0.21, P=0.81$  ;  $F=0.58, P=0.56$  ;  $F=0.05, P=0.95$ )。請參閱表 12。

## p53 的表現量

### 1. 敘述性統計

在治療一週後，CL、CsL、sCL 及 CsL 各組的 p53 表現量(mean±SEM) 分別為  $0.37 \pm 0.08$ 、 $0.65 \pm 0.09$ 、 $0.08 \pm 0.02$  和  $0.09 \pm 0.02$ 。治療兩週後，CL、CsL、sCL 及 CsL 各組的表現量分別為  $0.30 \pm 0.06$ 、 $0.70 \pm 0.16$ 、 $0.11 \pm 0.03$  和  $0.11 \pm 0.03$ 。治療三週後，CL、CsL、sCL 及 CsL 各組的表現量分別為  $0.25 \pm 0.05$ 、 $0.87 \pm 0.21$ 、 $0.07 \pm 0.01$  和  $0.09 \pm 0.02$ 。請參閱圖 13 表 14。

### 2. 各組 p53 表現量的差異

介入治療一週後，四組老鼠(sCsL、sCL、CsL和CL group)的p53 表現量有顯著差異(one-way ANOVA,  $F=18.38, P=2.1 \times 10^{-7}$ )。其中，在CL與sCL (Bonferroni post hoc test,  $P=0.02$ )、CL與sCsL組(Bonferroni post hoc test,  $P=0.02$ )、CsL和sCL組(Bonferroni post hoc test,  $P=1.2 \times 10^{-6}$ )與CsL和sCsL組有顯著差異 (Bonferroni post hoc test,  $P=1.9 \times 10^{-6}$ )。請參閱表 14。

介入治療二週後，四組老鼠(sCsL、sCL、CsL和CL group)的p53 表現量亦有顯著差異(one-way ANOVA,  $F=9.95, P=6.5 \times 10^{-5}$ )。其中，CL與CsL (Bonferroni post hoc test,  $P=0.002$ )、CL 與 sCL組(Bonferroni post hoc test,  $P=0.04$ )、CsL與sCL組(Bonferroni post hoc test,  $P=0.2 \times 10^{-3}$ )及CsL與sCsL組 (Bonferroni post hoc test,  $P=2.84 \times 10^{-6}$ )有顯著差異。請參閱表 14。

介入治療三週後，亦發現四組老鼠有顯著的差異 (one-way ANOVA,  $F=11.93, P=1.4 \times 10^{-5}$ )。其中，CL與CsL組(Bonferroni post hoc test,  $P=2.0 \times 10^{-3}$ )、

CL與sCsL組(Bonferroni post hoc test,  $P=7.0\times 10^{-5}$ )及CsL與sCL組(Bonferroni post hoc test,  $P=4.9\times 10^{-5}$ )有顯著差異。請參閱表 14。

### 3. 比較各組治療時間對 p53 的表現量的影響

在 CL、CsL、sCL 及 sCsL 四組中，介入一週、兩週及三週治療，p53 的表現量無顯著差異 (one-way ANOVA, 分別是  $F=0.47, P=0.63$  ;  $F=0.48, P=0.44$  ;  $F=1.01, P=0.38$  ;  $F=0.07, P=0.4$ )。請參閱表 14。

## VEGF 的表現量

### 1. 敘述性統計

在治療一週後，CL、CsL、sCL 及 sCsL 各組的 VEGF 表現量(mean±SEM) 分別為  $0.22 \pm 0.03$ 、 $0.11 \pm 0.02$ 、 $0.03 \pm 0.01$  和  $0.04 \pm 0.01$ 。治療兩週後，CL、CsL、sCL 及 sCsL 各組的表現量分別為  $0.57 \pm 0.15$ 、 $0.21 \pm 0.07$ 、 $0.06 \pm 0.02$  和  $0.06 \pm 0.02$ 。治療三週後，CL、CsL、sCL 及 sCsL 各組的表現量分別為  $0.64 \pm 0.12$ 、 $0.27 \pm 0.06$ 、 $0.09 \pm 0.02$  和  $0.1 \pm 0.02$ 。請參閱圖 14 表 15。

### 2. 各組 VEGF 表現量的差異

介入治療一週後，四組老鼠(sCsL、sCL、CsL和CL group)的VEGF表現量有顯著差異(one-way ANOVA,  $F=17.61, P=2.9\times 10^{-6}$ )。其中，在CL與CsL組 (Bonferroni post hoc test,  $P=0.001$ )、CL與sCL組(Bonferroni post hoc test,  $P=8.44\times 10^{-6}$ ) 與CL和sCsL組(Bonferroni post hoc test,  $P=8.47\times 10^{-5}$ )有顯著差異。請參閱表 15。

介入治療二週後，四組老鼠(sCsL、sCL、CsL和CL group)的VEGF表現量亦有顯著差異(one-way ANOVA,  $F=8.82, P=4.1\times 10^{-4}$ )。其中，CL與CsL (Bonferroni post hoc test,  $P=0.028$ )、CsL與sCL組(Bonferroni post hoc test,  $P=0.001$ )及CsL與sCsL組(Bonferroni post hoc test,  $P=0.001$ )有顯著差異。請參閱表 15。



介入治療三週後，亦發現四組老鼠有顯著的差異 (one-way ANOVA,  $F=14.65$ ,  $P=1.2\times 10^{-5}$ )。其中，CL與CsL組(Bonferroni post hoc test,  $P=0.05$ )、CL與sCsL組(Bonferroni post hoc test,  $P=4.3\times 10^{-5}$ )及CsL與 sCL組 (Bonferroni post hoc test,  $P=3.5\times 10^{-5}$ ) 有顯著差異。請參閱表 15。

### 3. 比較各組治療時間對 VEGF 的表現量的影響

在 sCsL 組別中，在一週、兩週和三週 VEGF 的表現量有顯著的差異 (one-way ANOVA,  $F=4.65$ ,  $P=0.002$ )，其中，在一週後和三週後時有顯著差異 (Bonferroni post hoc test,  $P=0.002$ )。在 CL 組別中，在一週、兩週和三週後 VEGF 的表現量有顯著差異 (one-way ANOVA,  $F=4.17$ ,  $P=0.003$ )，其中，在治療一週後和三週後時有顯著差異 (Bonferroni post hoc test,  $P=0.046$ )。請參閱表 15。

## NGF 的表現量

### 1. 敘述式統計

在治療一週後，CL、CsL、sCL 及 CsL 各組 NGF 的表現量(mean±SEM) 分別為  $0.57 \pm 0.09$ ； $0.25 \pm 0.04$ 、 $0.07 \pm 0.03$  和  $0.05 \pm 0.02$ 。治療兩週後，CL、CsL、sCL 及 CsL 各組的表現量分別為  $0.65 \pm 0.12$ 、 $0.29 \pm 0.05$ 、 $0.12 \pm 0.04$  和  $0.08 \pm 0.03$ 。治療三週後，CL、CsL、sCL 及 CsL 各組的表現量分別為  $0.79 \pm 0.20$ 、 $0.34 \pm 0.10$ 、 $0.09 \pm 0.03$  和  $0.06 \pm 0.03$ 。請參閱圖 15 表 16。

### 2. 各組 NGF 表現量的差異

介入治療一週後，四組老鼠(sCsL、sCL、CsL和CL group)的NGF表現量有顯著差異(one-way ANOVA,  $F=20.20$ ,  $P=2.9\times 10^{-6}$ )。其中，在CL與CsL組 (Bonferroni post hoc test,  $P=0.002$ )、CL與sCL組(Bonferroni post hoc test,

$P=1.2\times 10^{-5}$ ) 與CL和sCsL組(Bonferroni post hoc test,  $P=6.7\times 10^{-6}$ )有顯著差異。請參閱表 16。

介入治療二週後，四組老鼠(sCsL、sCL、CsL和CL group)的NGF表現量亦有顯著差異(one-way ANOVA,  $F=13.76$ ,  $P=4.3\times 10^{-5}$ )。其中，CL與CsL (Bonferroni post hoc test,  $P=0.01$ )、CsL與sCL組(Bonferroni post hoc test,  $P=2.0\times 10^{-4}$ )及CsL與sCsL組(Bonferroni post hoc test,  $P=7.9\times 10^{-5}$ )有顯著差異。請參閱表 16。

介入治療三週後，亦發現四組老鼠有顯著的差異 (one-way ANOVA,  $F=13.32$ ,  $P=5.3\times 10^{-5}$ )。其中，CL與CsL組有顯著差異(Bonferroni post hoc test,  $P=0.005$ )、CL與sCsL組(Bonferroni post hoc test,  $P=1.0\times 10^{-4}$ ) 和CL與sCL組有顯著差異 (Bonferroni post hoc test,  $P=2.0\times 10^{-4}$ )。請參閱表 16。

### 3. 比較各組治療時間對 NGF 的表現量的影響

在 CL、CsL、sCL 及 sCsL 四組中，介入一週、兩週及三週治療，NGF 的表現量無顯著差異 (one-way ANOVA, 分別是  $F=0.48$ ,  $P=0.12$  ;  $F=0.48$ ,  $P=0.63$  ;  $F=0.43$ ,  $P=0.66$  ;  $F=0.33$ ,  $P=0.73$ )。請參閱表 16。

## 組織形態學

### 1. H&E 染色

隨機選取各組 3 隻老鼠進行型態學分析，以確認發炎位置及區域。根據在 H&E 染色結果，可以發現有進行 CCI 手術相對於 sCCI 的動物，在坐骨神經組織上的發炎細胞的細胞核表現量大幅增加。而在 CCI 手術後，進行 LLLT 治療一週、兩週和三週後(CL-1W, CL-2W 及 CL-3W groups)，可以觀察到發炎細胞的細胞核表現量降低。請參閱圖 16。

### 2. 免疫組織化學染色

免疫組織化學染色結果顯示，在 CCI 手術後相對於 sCCI 手術的動物中，其坐骨神經組織上 HIF-1 $\alpha$ 、iNOS、COX-2、P53 和 ED1 表現量顯著增加。而在 CCI 手術後，進行 LLLT 治療一週、兩週和三週後(CL-1W, CL-2W 及 CL-3W groups)，則發現 HIF-1 $\alpha$ 、iNOS、COX-2、P53 和 ED1 表現量有減少的情形。請參閱圖 17-21。

而對於可促進神經再生的因子而言，CCI 手術後相對於 sCCI 的動物，在神經組織上 VEGF 和 NGF 表現的有顯著的增加，介入 LLLT 治療一週、兩週和三週後(CL-1W, CL-2W 及 CL-3W groups)，則發現 VEGF 和 NGF 表現有更增加的趨勢。在 S100 表現上，CCI 手術後相對於 sCCI 的動物，S100 的表現是下降的，但是在進行 LLLT 治療一週、兩週和三週後(CL-1W, CL-2W 及 CL-3W groups)，可以發現 S100 有增多的趨勢。請參閱圖 22-24。關於 H&E 染色及免疫組織化學染色的初步統計趨勢，請參看圖 25。

### 3. 免疫螢光染色

根據免疫螢光雙抗體染色(double staining)的結果，發現，在 CCI 手術後 HIF-1 $\alpha$ 、iNOS 和 ED1 表現位置有部分顯現在組織相同的位置。進行 LLLT 治療一週、兩週和三週後(CL-1W, CL-2W 及 CL-3W groups)，這些 HIF-1 $\alpha$ 、iNOS 和 ED1 呈現雙染色位置的數量有降低的趨勢。請參閱 26-27。

**Table2. The results of body weight in CL and CsL group.**

	CL group	CsL group	P value (student t-test)
<b>Pre-</b>	250.27±2.08		
<b>Post-</b>	233.38±1.15		
<b>Post 7 Days</b>	247.03±1.49		
<b>1W</b>	267.05±2.48	271.22±3.39	0.33
<b>2W</b>	283.18±2.48	301.63±2.80	1.68×10 <sup>-5</sup>
<b>3W</b>	303.30±3.52	313.6±6.96	0.20
<b>F value (one-way ANOVA)</b>	95.77	123.13	
<b>P value</b>	0	0	
<b>Post-Hoc (Bonferroni)</b>	1W v.s. pre-, P=1.14×10 <sup>-7</sup>	1W v.s. pre-, P=1.82×10 <sup>-9</sup>	
	1W v.s. post-, P<0.0001	1W v.s. post-, P<0.0001	
	1W v.s.7Dpost-, P=1.6×10 <sup>-10</sup>	1W v.s.7Dpost-, P=3.37×10 <sup>-12</sup>	
	1W v.s.2W, P=1.9×10 <sup>-4</sup>	1W v.s.2W, P=1.21×10 <sup>-11</sup>	
	1W v.s.3W, P=1.33×10 <sup>-12</sup>	1W v.s.3W, P=8.99×10 <sup>-14</sup>	
	2W v.s. pre-, P<0.0001	2W v.s. pre-, P<0.0001	
	2W v.s. post-, P<0.0001	2W v.s. post-, P<0.0001	
	2W v.s.7Dpost-, P<0.0001	2W v.s.7Dpost-,P<0.0001	
	2W v.s.3W, P=7×10 <sup>-4</sup>	3W v.s. pre-, P<0.0001	
	3W v.s. pre-, P<0.0001	3W v.s. post-, P<0.0001	
	3W v.s. post-, P<0.0001	3W v.s.7Dpost-,P<0.0001	
	3W v.s.7Dpost-, P<0.0001		

**Table 3. The results of pain threshold measurement in CL and CsL group.**

	CL group	CsL group	P value (student t-test)
<b>Pre-</b>	18.78±0.09		
<b>Post-</b>	10.74±0.19		
<b>Post 7 Days</b>	9.7±0.26		
<b>1W</b>	12.43±0.20	10.36±0.22	4×10 <sup>-9</sup>
<b>2W</b>	12.90±0.23	10.57±0.29	2.94×10 <sup>-7</sup>
<b>3W</b>	13.05±0.28	10.10±0.26	3.86×10 <sup>-7</sup>
<b>F value (one-way ANOVA)</b>	306.62	326.94	
<b>P value</b>	0	0	
<b>Post-Hoc (Bonferroni)</b>	1W v.s. pre-, P<0.0001	1W v.s. pre-, P<0.0001	
	1W v.s. post-, P=1.93×10 <sup>-6</sup>	2W v.s. pre-, P<0.0001	
	1W v.s.7Dpost-, P=6.66×10 <sup>-15</sup>	3W v.s. pre-, P<0.0001	
	2W v.s. post-, P=1.08×10 <sup>-7</sup>		
	2W v.s.7Dpost-,P=3.33×10 <sup>-15</sup>		
	3W v.s. post-, P=3.26×10 <sup>-5</sup>		
	3W v.s.7Dpost-, P=3.33×10 <sup>-10</sup>		

**Table 4. The results of SFI measurement in CL and CsL group.**

	CL group	CsL group	P value (student t-test)
<b>Pre-</b>	-6.67±1.02		
<b>Post-</b>	-86.00±1.36		
<b>Post 7 Days</b>	-82.42±1.31		
<b>1W</b>	-67.78±1.83	-80.18±3.03	0.01
<b>2W</b>	-57.12±2.57	-72.87±2.59	0.0001
<b>3W</b>	-37.45±1.38	-58.20±1.93	6.74×10 <sup>-8</sup>
<b>F value (one-way ANOVA)</b>	527.72	440.48	
<b>P value</b>	0	0	
<b>Post-Hoc (Bonferroni)</b>	1W v.s. pre-, P<0.0001	1W v.s. pre-, P<0.0001	
	1W v.s. post-, P=6.33×10 <sup>-14</sup>	1W v.s.3W, P=9.59×10 <sup>-7</sup>	
	1W v.s.7Dpost-, P=1.67×10 <sup>-9</sup>	2W v.s. pre-, P<0.0001	
	1W v.s.2W, P=3×10 <sup>-4</sup>	2W v.s. post-, P=6.09×10 <sup>-5</sup>	
	1W v.s.3W, P=1.13×10 <sup>-13</sup>	2W v.s.7Dpost-,P=0.01	
	2W v.s. pre-, P<0.0001	2W v.s.3W, P=4×10 <sup>-4</sup>	
	2W v.s. post-, P<0.0001	3W v.s. pre-, P<0.0001	
	2W v.s.7Dpost-,P<0.0001	3W v.s. post-, P=4.52×10 <sup>-9</sup>	
	2W v.s.3W, P=5.98×10 <sup>-5</sup>	3W v.s.7Dpost-, P<0.0001	
	3W v.s. pre-, P=3.33×10 <sup>-15</sup>		
	3W v.s. post-, P<0.0001		
	3W v.s.7Dpost-, P<0.0001		

**Table 5. The results of TFI measurement in CL and CsL group.**

	CL group	CsL group	P value (student t-test)
Pre-	-6.70±0.79		
Post-	-94.32±1.11		
Post 7 Days	-92.76±1.51		
1W	-76.20±2.97	-88.32±3.13	0.007
2W	-69.21±2.81	-85.90±2.90	2×10 <sup>-4</sup>
3W	-52.23±1.56	-67.13±2.72	2×10 <sup>-4</sup>
<b>F value (one-way ANOVA)</b>	563.89	558.31	
<b>P value</b>	0	0	
<b>Post-Hoc (Bonferroni)</b>	1W v.s. pre-, P<0.0001	1W v.s. pre-, P<0.0001	
	1W v.s. post-, P=3.9×10 <sup>-12</sup>	1W v.s.3W, P=2.44×10 <sup>-6</sup>	
	1W v.s.7Dpost-, P=2.28×10 <sup>-10</sup>	2W v.s. pre-, P<0.0001	
	1W v.s.3W, P=2.37×10 <sup>-8</sup>	2W v.s. post-, P=0.04	
	2W v.s. pre-, P<0.0001	2W v.s.3W, P=1.5×10 <sup>-4</sup>	
	2W v.s. post-, P<0.0001	3W v.s. pre-, P<0.0001	
	2W v.s.7Dpost-,P=1.33×10 <sup>-14</sup>	3W v.s. post-, P=3.42×10 <sup>-11</sup>	
	2W v.s.3W, P=4×10 <sup>-4</sup>	3W v.s.7Dpost-, P=4.34×10 <sup>-10</sup>	
	3W v.s. pre-, P<0.0001		
	3W v.s. post-, P<0.0001		
	3W v.s.7Dpost-, P<0.0001		

**Table 6. The results of PFI measurement in CL and CsL group.**

	CL group	CsL group	P value (student t-test)
Pre-	-14.56±3.38		
Post-	-80.67±3.22		
Post 7 Days	-46.21±3.28		
1W	-60.15±3.89	-49.23±5.19	0.1
2W	-53.16±4.08	-53.35±5.99	0.97
3W	-13.81±3.29	-28.02±6.45	0.07
<b>F value (one-way ANOVA)</b>	51.08	40.76	
<b>P value</b>	0	0	
<b>Post-Hoc (Bonferroni)</b>	1W v.s. pre, $P=4\times 10^{-14}$	1W v.s. pre-, $P=1.08\times 10^{-7}$	
	1W v.s. post-, $P=0.003$	1W v.s. post-, $P=1.93\times 10^{-6}$	
	2W v.s. pre-, $P=4.58\times 10^{-6}$	2W v.s. pre-, $P=2.88\times 10^{-7}$	
	2W v.s. post-, $P=2\times 10^{-4}$	2W v.s. post-, $P=0.001$	
	3W v.s. post-, $P=3.66\times 10^{-13}$	3W v.s. post-, $P=1.29\times 10^{-7}$	
	3W v.s. 7Dpost-, $P=0.002$		



**Table 7. The results of SSI measurement in CL and CsL group.**

	CL group	CsL group	P value (student t-test)
<b>Pre-</b>	-3.45±0.79		
<b>Post-</b>	-86.89±1.49		
<b>Post 7 Days</b>	-91.21±1.44		
<b>1W</b>	-72.22±1.98	-88.49±2.98	0.001
<b>2W</b>	-63.60±3.03	-81.06±2.91	8.48×10 <sup>-5</sup>
<b>3W</b>	-48.68±1.97	166.74±2.70	1.39×10 <sup>-6</sup>
<b>F value (one-way ANOVA)</b>	350.56	292.92	
<b>P value</b>	0	0	
<b>Post-Hoc (Bonferroni)</b>	1W v.s. pre-, P<0.0001	1W v.s. pre, P<0.0001	
	1W v.s. post-, P=4.71×10 <sup>-6</sup>	1W v.s.2W, P=0.14	
	1W v.s.7Dpost-, P=9.46×10 <sup>-9</sup>	1W v.s.3W, P=1.54×10 <sup>-4</sup>	
	1W v.s.2W, P=0.001	2W v.s. pre-, P<0.0001	
	1W v.s.3W, P=2.99×10 <sup>-12</sup>	2W v.s.7Dpost-,P=0.004	
	2W v.s. pre-, P<0.0001	3W v.s. pre-, P<0.0001	
	2W v.s. post-, P<0.0001	3W v.s. post-, P=7.26×10 <sup>-5</sup>	
	2W v.s.7Dpost-,P<0.0001	3W v.s. 7Dpost-, P=2.76×10 <sup>-6</sup>	
	2W v.s.3W, P=3×10 <sup>-4</sup>		
	3W v.s. pre-, P=1.05×10 <sup>-9</sup>		
	3W v.s. post-, P<0.0001		
	3W v.s.7Dpost-, P<0.0001		

**Table 8. The results of levels of TNF- $\alpha$  assessed by EISA in each group.**

	sCsL group	sCL group	CsL group	CL group	F value*	P value	Post Hoc test (Bonferroni)	
<b>1W</b>	1202.39±70.86	907.40±183.81	17048.43±3815.98	5946.14±1401.31	12.04	7.1×10 <sup>-5</sup>	CL v.s.CsL	P=0.01
							CsL v.s. sCL	P=8.5×10 <sup>-5</sup>
							CsL v.s. sCsL	P=1×10 <sup>-9</sup>
<b>2W</b>	1010.68±11.18	724.47±114.71	9453.13±1146.64	3601.79±387.83	38.92	5.7×10 <sup>-9</sup>	CL v.s. CsL	P=9.1×10 <sup>-6</sup>
							CsL v.s. sCL	P=6.9×10 <sup>-9</sup>
							CsL v.s. sCsL	P=3.5×10 <sup>-7</sup>
							CL v.s. sCL	P=0.02
<b>3W</b>	898.64±36.45	586.60±98.72	9502.10±2317.18	2631.01±589.01	10.73	1.5×10 <sup>-4</sup>	CL v.s. CsL	P=4.7×10 <sup>-3</sup>
							CsL v.s.3sCL	P=2×10 <sup>-4</sup>
							CsL v.s.sCsL	P=3×10 <sup>-3</sup>
<b>F value*</b>	10.93	1.37	3.54	2.70				
<b>P value</b>	0.004	0.28	0.05	0.09				
<b>Post Hoc test (Bonferroni)</b>	1W v.s.3W, P=4×10 <sup>-3</sup>							

\*: tested with ANOVA.

**Table 9. The results of levels of IL-1  $\beta$  assessed by EISA in each group.**

	sCsL group	sCL group	CsL group	CL group	F value*	P value	Post Hoc test (Bonferroni)	
<b>1W</b>	2174.89±591.64	1999.014±594.65	18358.22±4570.76	7077.83±691.05	7.59	0.002	CL v.s.CsL	P=0.04
							CsL v.s. sCL	P=0.01
							CsL v.s. sCsL	P=0.01
<b>2W</b>	1938.02±577.75	1731.98±471.47	17392.95±3781.43	6369.17±668.91	10.08	0.001	CL v.s. CsL	P=0.01
							CsL v.s. sCL	P=0.002
							CsL v.s. sCsL	P=0.002
<b>3W</b>	1847.61±592.86	1360.16±358.40	18407.62±5368.96	4044.36±761.51	6.39	0.004	CL v.s. CsL	P=0.03
							CsL v.s. 3sCL	P=0.02
							CsL v.s.3sCsL	P=0.02
<b>F value*</b>	0.08	0.44	0.02	5.02				
<b>P value</b>	0.92	0.66	0.98	0.02				
<b>Post Hoc test (Bonferroni)</b>				1W v.s. 3W				P=0.03

\*: tested with ANOVA.

**Table 10. The results of levels of BDNF assessed by EISA in each group.**

	sCsL group	sCL group	CsL group	CL group	F value*	P value	Post Hoc test (Bonferroni)	
<b>1W</b>	415.12±65.47	386.59±55.28	2621.38±215.93	3394.25±138.98	88.83	3.45×10 <sup>-10</sup>	CL v.s. CsL	P=0.01
							CL v.s. sCL	P=4×10 <sup>-9</sup>
							CL v.s. sCsL	P=4.6×10 <sup>-9</sup>
							CsL v.s. sCL	P=2.8×10 <sup>-7</sup>
							CsL v.s. sCsL	P=3.3×10 <sup>-7</sup>
<b>2W</b>	374.66±42.94	341.76±24.69	3122.22±180.54	4188.56±104.52	222.11	3.02×10 <sup>-13</sup>	CL v.s. CsL	P=5.3×10 <sup>-5</sup>
							CL v.s. sCL	P=3.6×10 <sup>-12</sup>
							CL v.s. sCsL	P=4.1×10 <sup>-12</sup>
							CsL v.s. sCL	P=5×10 <sup>-10</sup>
							CsL v.s. sCsL	P=6×10 <sup>-10</sup>
<b>3W</b>	374.74±44.78	369.74±6.62	3282.78±168.01	4972.37±154.64	255.98	9.96×10 <sup>-14</sup>	CL v.s. CsL	P=4.6×10 <sup>-7</sup>
							CL v.s. sCL	P=8.5×10 <sup>-13</sup>
							CL v.s. sCsL	P=8.6×10 <sup>-13</sup>
							CsL v.s. sCL	P=9.2×10 <sup>-10</sup>
							CsL v.s. sCsL	P=9.4×10 <sup>-10</sup>
<b>F value*</b>	0.20	0.41	3.32	34.5				
<b>P value</b>	0.82	0.67	0.06	2.45				
<b>Post Hoc test (Bonferroni)</b>				1W v.s. 2W				
				1W v.s. 3W				
				2W v.s. 3W				

\*: tested with ANOVA.

**Table 11. The results of levels of HIF-1  $\alpha$  assessed by western blotting in each group.**

	sCsL group	sCL group	CsL group	CL group	F value*	P value	Post Hoc test(Bonferroni)	
<b>1W</b>	0.04±0.01	0.02±0.01	0.34±0.05	0.16±0.04	17.50	1.35×10 <sup>-6</sup>	CL v.s. CsL	P=0.006
							CsL v.s. sCL	P=3.48×10 <sup>-6</sup>
							CsL v.s. sCsL	P=9.21×10 <sup>-6</sup>
<b>2W</b>	0.07±0.03	0.03±0.01	0.67±0.13	0.28±0.05	17.18	1.6×10 <sup>-6</sup>	CsL v.s. CL	P=0.004
							CsL v.s. sCL	P=3.87×10 <sup>-6</sup>
							CsL v.s. sCsL	P=1.06×10 <sup>-5</sup>
<b>3W</b>	0.08±0.03	0.04±0.01	0.61±0.15	0.19±0.05	10.21	1×10 <sup>-4</sup>	CL v.s. CsL	P=0.006
							CsL v.s. sCL	P=2×10 <sup>-4</sup>
							CsL v.s. sCsL	P=0.001
<b>F value*</b>	0.92	1.54	2.17	2.07				
<b>P value</b>	0.42	0.24	0.14	0.15				

\*tested with ANOVA.

**Table 12. The results of levels of iNOS assessed by western blotting in each group.**

	sCsL group	sCL group	CsL group	CL group	F value*	P value	Post Hoc test(Bonferroni)
<b>1W</b>	0.02±0.01	0.01±0.01	0.13±0.02	0.05±0.01	24.56	7.94×10 <sup>-9</sup>	CL v.s. CsL P=1×10 <sup>-4</sup> CsL v.s. sCL P=2.7×10 <sup>-8</sup> CsL v.s. sCsL P=1.2×10 <sup>-7</sup>
<b>2W</b>	0.03±0.01	0.03±0.01	0.26±0.07	0.09±0.03	8.17	2.81×10 <sup>-4</sup>	CL v.s. CsL P=0.01 CsL v.s. sCL P=0.001 CsL v.s. sCsL P=0.001
<b>3W</b>	0.03±0.01	0.03±0.01	0.27±0.09	0.09±0.03	5.50	3.25×10 <sup>-3</sup>	CL v.s. CsL P=0.05 CsL v.s. sCL P=0.007 CsL v.s. sCsL P=0.009
<b>F value*</b>	0.48	0.93	1.37	0.44			
<b>P value</b>	0.63	0.41	0.27	0.65			

\*tested with ANOVA.

**Table 13. The results of levels of COX-2 assessed by western blotting in each group.**

	sCsL group	sCL group	CsL group	CL group	F value*	P value	Post Hoc test(Bonferroni)	
<b>1W</b>	0.15±0.04	0.10±0.02	0.51±0.08	0.27±0.05	13.16	5.88×10 <sup>-6</sup>	CL v.s. CsL	P=0.01
							CsL v.s. sCL	P=8.44×10 <sup>-6</sup>
							CsL v.s. sCsL	P=8.47×10 <sup>-5</sup>
<b>2W</b>	0.16±0.03	0.14±0.03	0.57±0.07	0.33±0.03	17.80	2.98×10 <sup>-7</sup>	CL v.s. CsL	P=0.005
							CL v.s. sCL	P=9.9×10 <sup>-7</sup>
							sCsL v.s.CsL	P=2.84×10 <sup>-6</sup>
							sCL v.s.CsL	P=0.04
<b>3W</b>	0.15±0.02	0.13±0.03	0.58±0.10	0.28±0.04	13.98	3.35×10 <sup>-6</sup>	CL v.s. CsL	P=0.003
							CsL v.s. sCL	P=8.83×10 <sup>-6</sup>
							CsL v.s.sCsL	P=2.27×10 <sup>-5</sup>
<b>F value*</b>	0.05	0.58	0.21	0.47				
<b>P value</b>	0.95	0.56	0.81	0.63				

\*tested with ANOVA.

**Table 14. The results of levels of p53 assessed by western blotting in each group.**

	sCsL group	sCL group	CsL group	CL group	F value*	P value	Post Hoc test(Bonferroni)	
<b>1W</b>	0.09±0.02	0.08±0.02	0.65±0.09	0.37±0.08	18.38	2.12×10 <sup>-7</sup>	CL v.s.CsL	P=0.02
							CL v.s. sCL	P=0.02
							CL v.s. sCsL	P=0.02
							CsL v.s.sCL	P=1.2×10 <sup>-6</sup>
							CsL v.s. sCsL	P=1.9×10 <sup>-6</sup>
<b>2W</b>	0.11±0.03	0.11±0.03	0.70±0.16	0.30±0.06	9.95	6.74×10 <sup>-5</sup>	CL v.s. CsL	P=0.02
							CsL v.s. sCL	P=2×10 <sup>-4</sup>
							CsL v.s. sCsL	P=2×10 <sup>-4</sup>
<b>3W</b>	0.09±0.02	0.07±0.01	0.87±0.21	0.25±0.05	11.93	1.43×10 <sup>-5</sup>	CL v.s. CsL	P=0.002
							CsL v.s. sCL	P=4.9×10 <sup>-8</sup>
							CsL v.s.sCsL	P=7×10 <sup>-5</sup>
<b>F value*</b>	0.69	1.01	0.48	0.84				
<b>P value</b>	0.37	0.38	0.62	0.44				

\*tested with ANOVA.



**Table 15. The results of levels of VEGF assessed by western blotting in each group.**

	sCsL group	sCL group	CsL group	CL group	F value*	P value	Post Hoc test(Bonferroni)
<b>1W</b>	0.04±0.01	0.03±0.01	0.11±0.02	0.22±0.03	17.61	2.93×10 <sup>-6</sup>	CL v.s. CSL P=0.009 CL v.s. sCL P=9.2×10 <sup>-6</sup> CL v.s. sCsL P=1.3×10 <sup>-5</sup>
<b>2W</b>	0.06±0.02	0.06±0.02	0.21±0.07	0.57±0.15	8.82	4.05×10 <sup>-4</sup>	CL v.s. CSL P=0.03 CL v.s. sCL P=0.001 CL v.s. sCsL P=0.001
<b>3W</b>	0.10±0.02	0.09±0.02	0.27±0.06	0.64±0.12	14.65	1.24×10 <sup>-5</sup>	CL v.s. CSL P=0.005 CL v.s. sCL P=3.5×10 <sup>-8</sup> CL v.s. sCsL P=4.3×10 <sup>-5</sup>
<b>F value*</b>	4.65	3.30	2.12	4.17			
<b>P value</b>	0.02	0.06	0.15	0.03			

\*tested with ANOVA.

**Table 16. The results of levels of NGF assessed by western blotting in each group.**

	sCsL group	sCL group	CsL group	CL group	F value*	P value	Post Hoc test(Bonferroni)
<b>1W</b>	0.05±0.02	0.07±0.03	0.25±0.04	0.57±0.09	20.20	2.88×10 <sup>-6</sup>	CL v.s. CsL P=0.002 CL v.s. sCL P=1.2×10 <sup>-5</sup> CL v.s. sCsL P=6.7×10 <sup>-6</sup>
<b>2W</b>	0.08±0.03	0.12±0.04	0.29±0.05	0.65±0.12	13.76	4.26×10 <sup>-5</sup>	CL v.s. CsL P=0.01 CL v.s. sCL P=2×10 <sup>-4</sup> CL v.s. sCsL P=7.9×10 <sup>-5</sup>
<b>3W</b>	0.06±0.03	0.09±0.03	0.34±0.10	0.79±0.2	13.32	5.28×10 <sup>-5</sup>	CL v.s. CsL P=0.005 CL v.s. sCL P=2×10 <sup>-4</sup> CL v.s. sCsL P=1×10 <sup>-4</sup>
<b>F value*</b>	0.33	0.43	0.48	2.48			
<b>P value</b>	0.73	0.66	0.63	0.12			

\*tested with ANOVA.

Figure 1. The serial changes of body weight in each group.

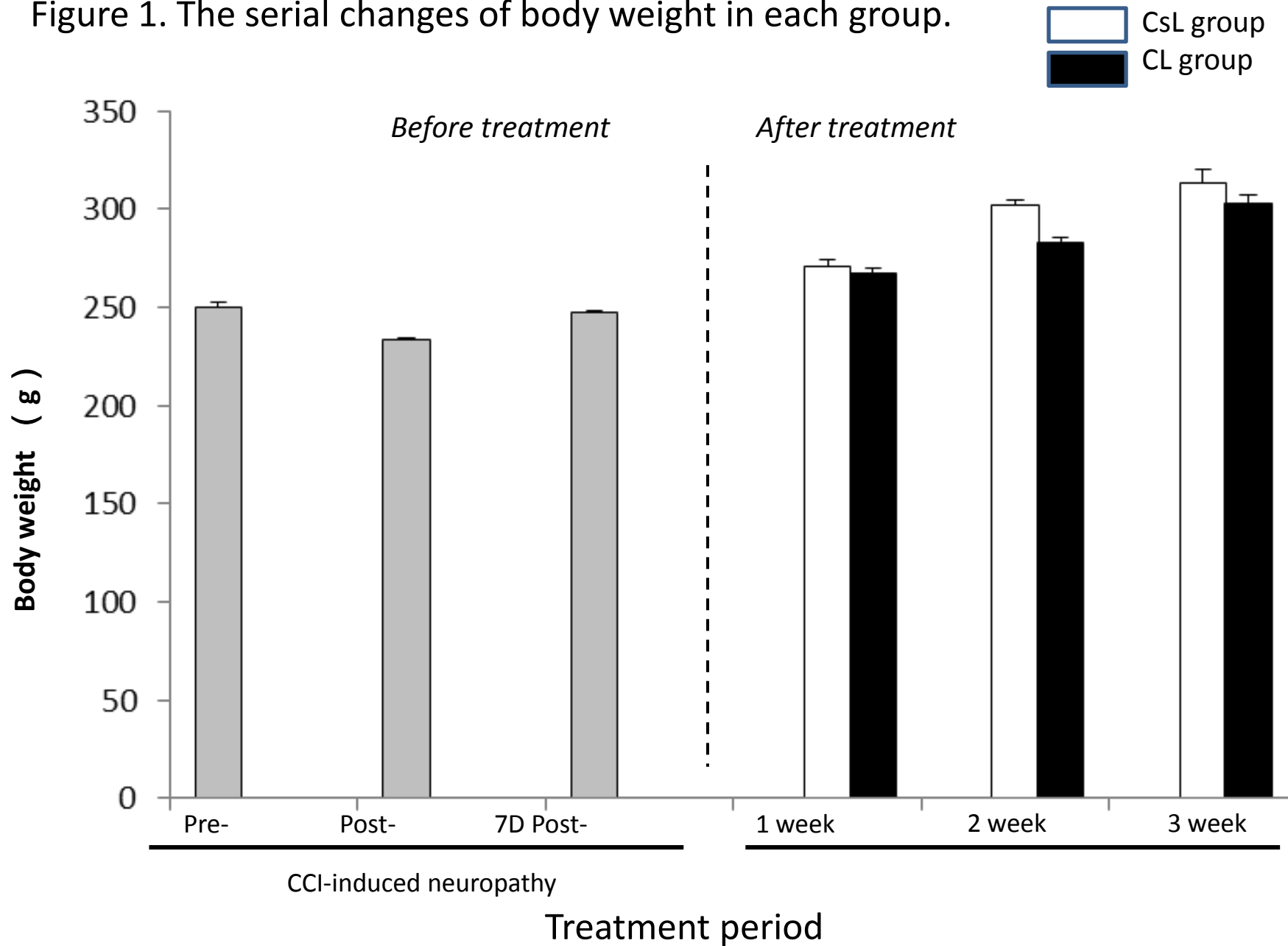


Figure 2. The serial changes of pain threshold in each group.

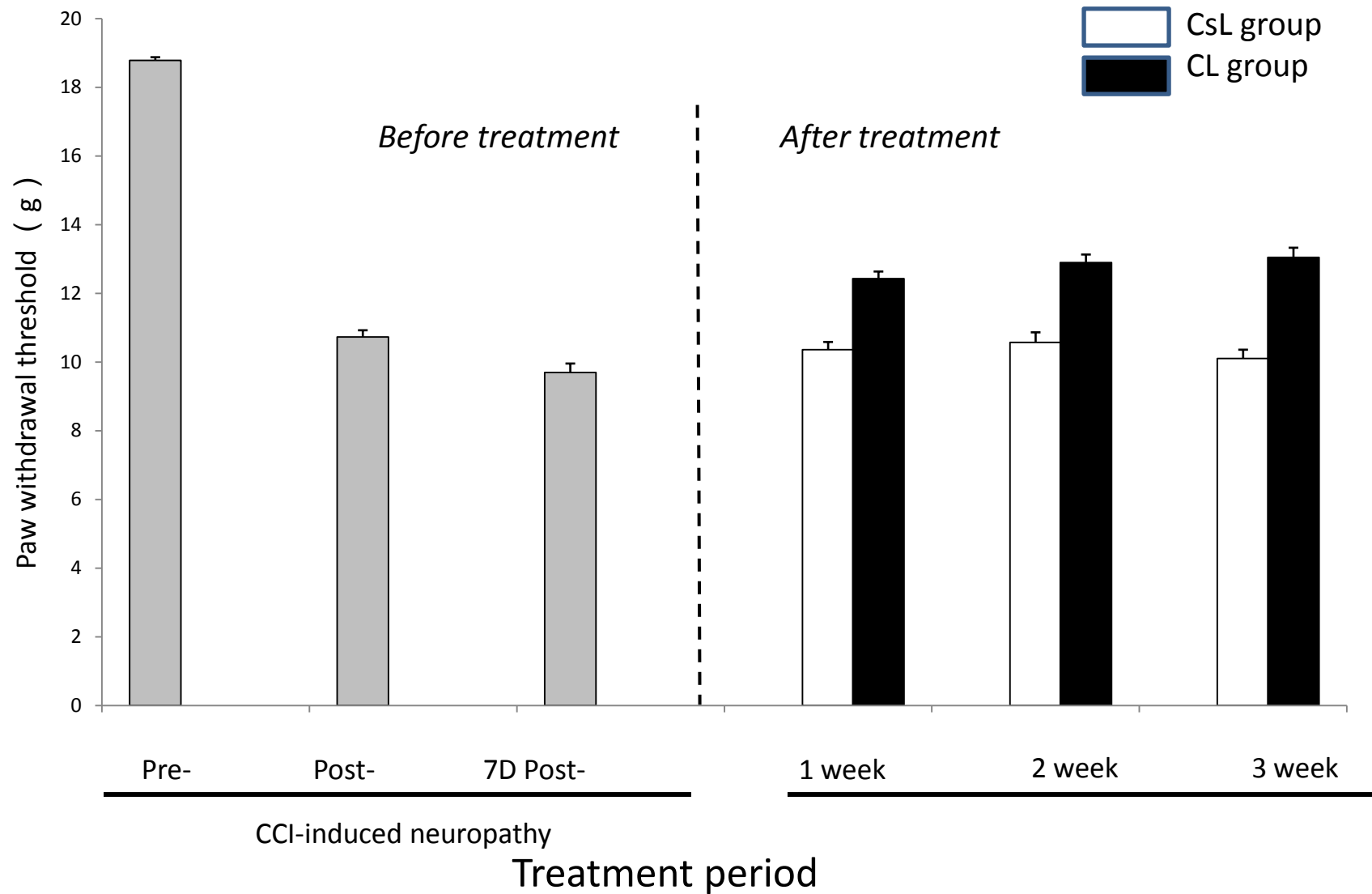


Figure 3. The serial changes of SFI in each group.

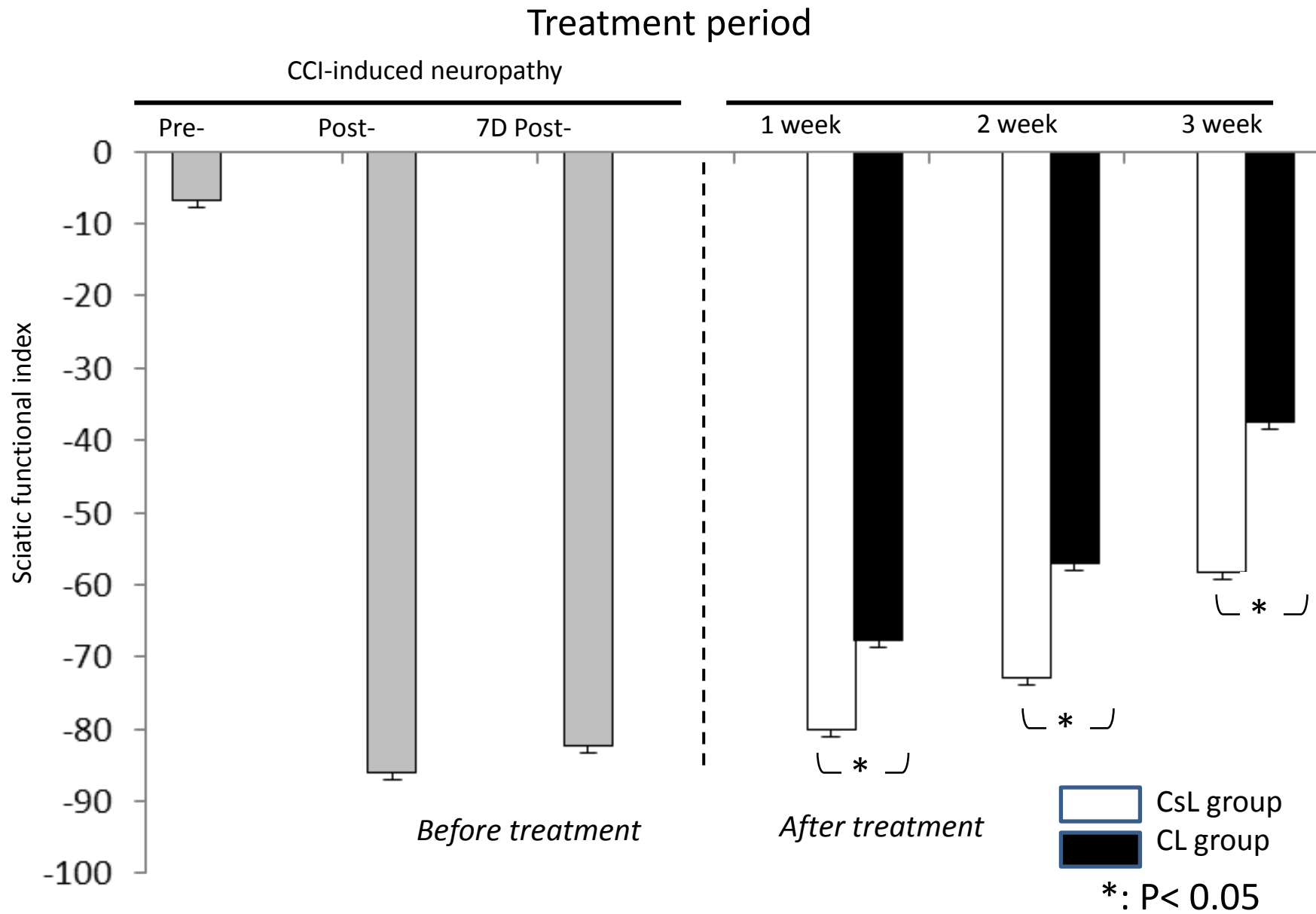


Figure 4. The serial changes of TFI in each group.

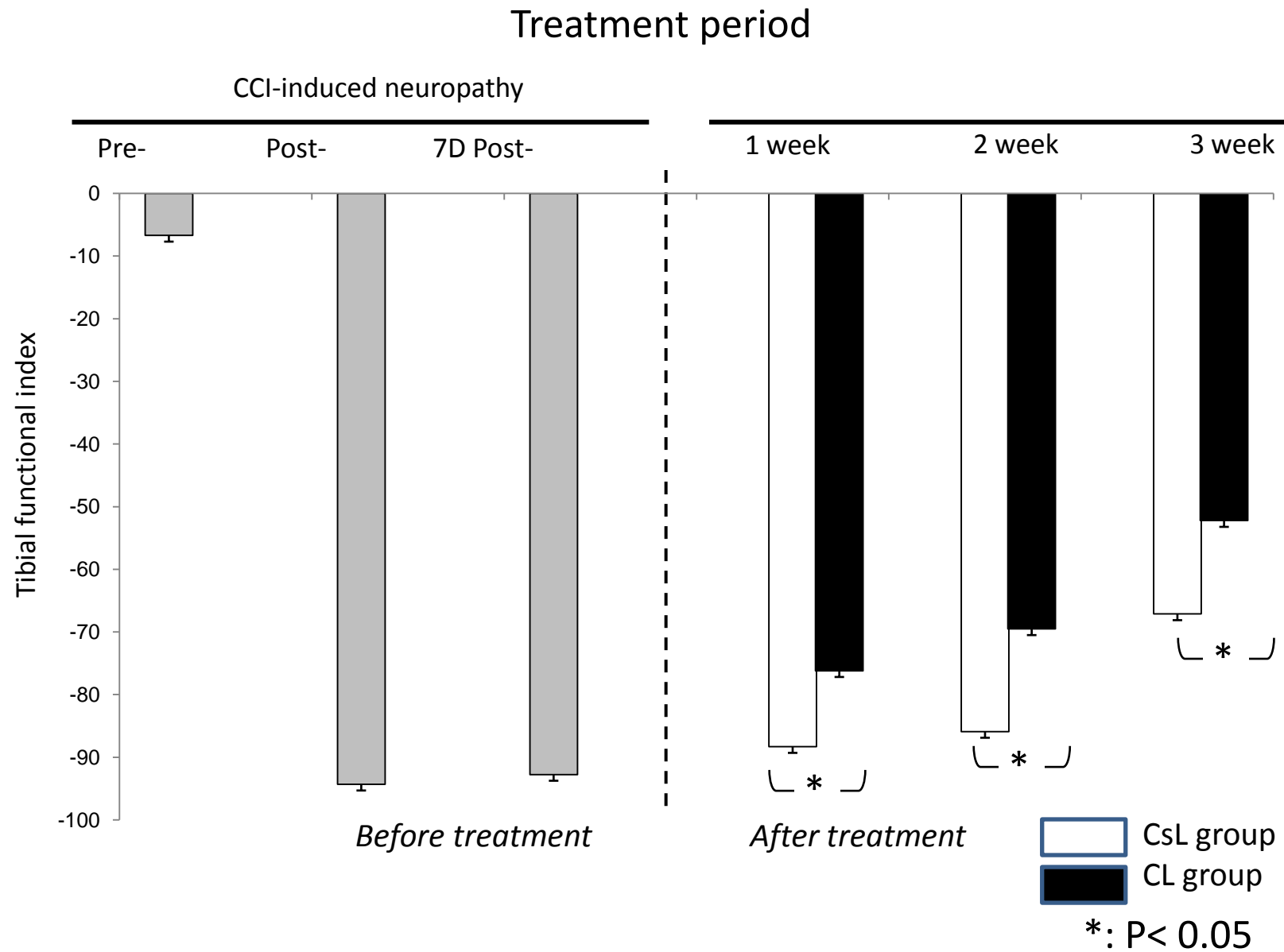


Figure 5. The serial changes of PFI in each group.

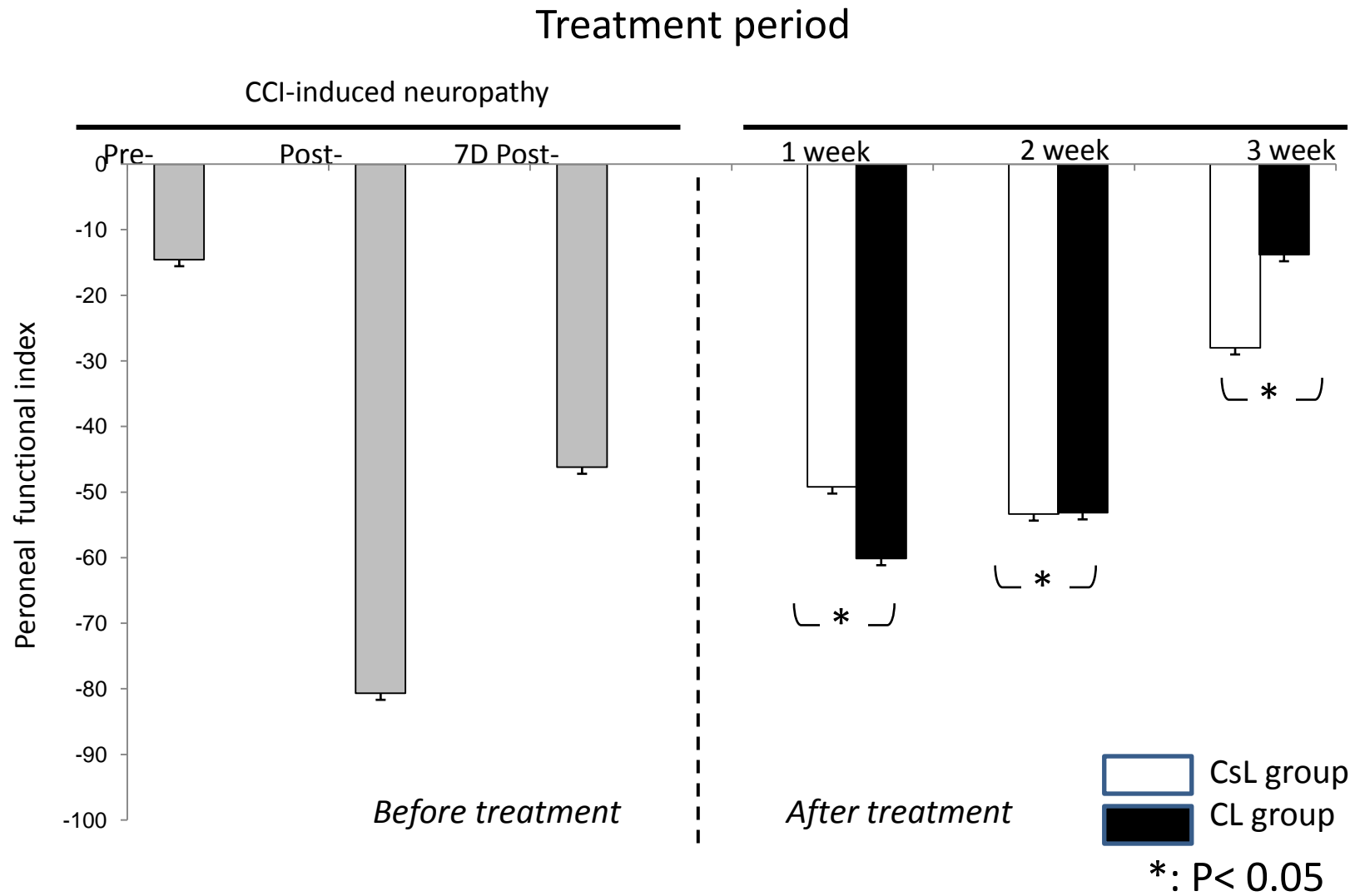


Figure 6. The serial changes of SSI in each group.

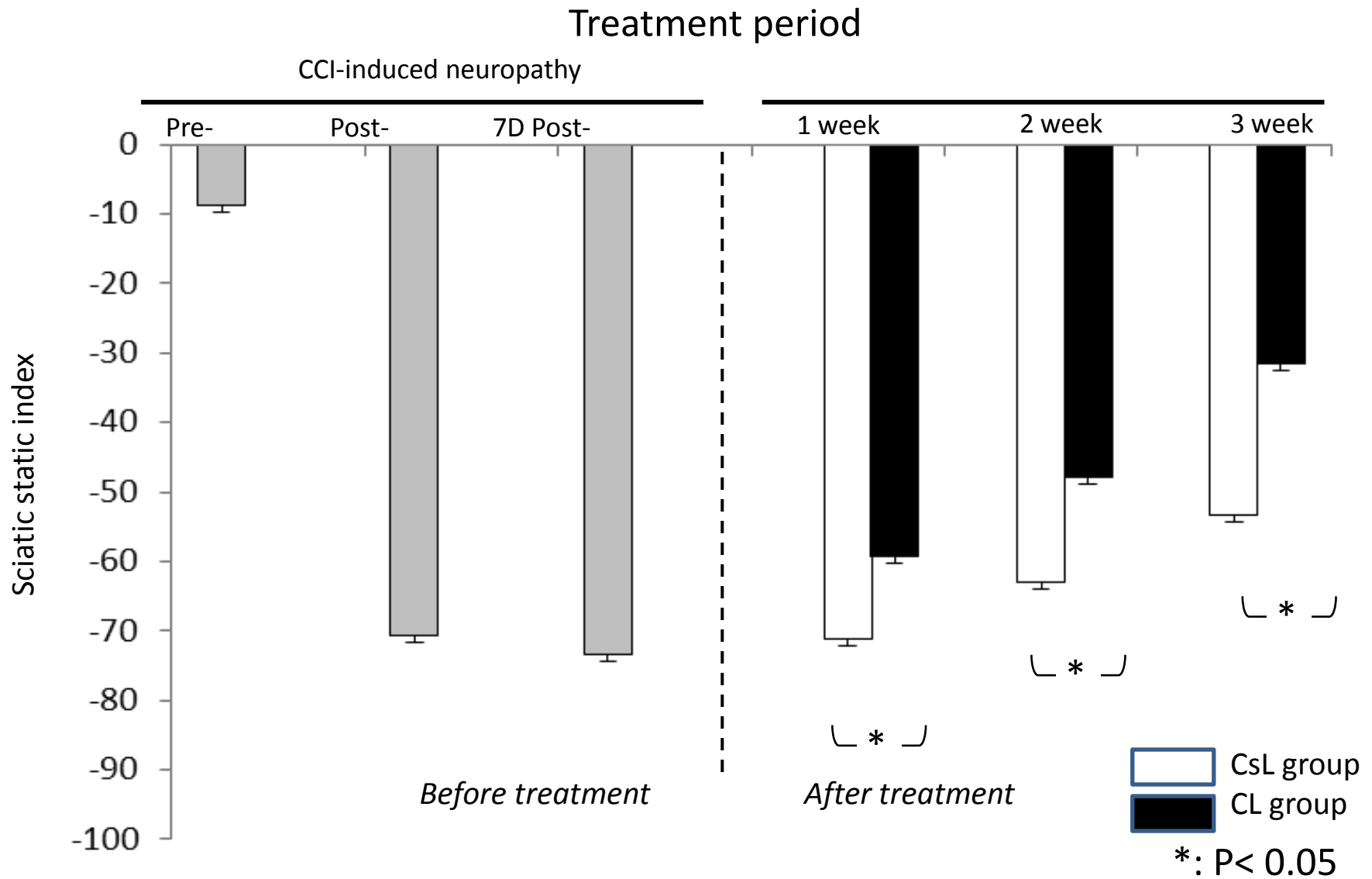




Figure 7. The protein levels of TNF- $\alpha$  by ELISA in each group.

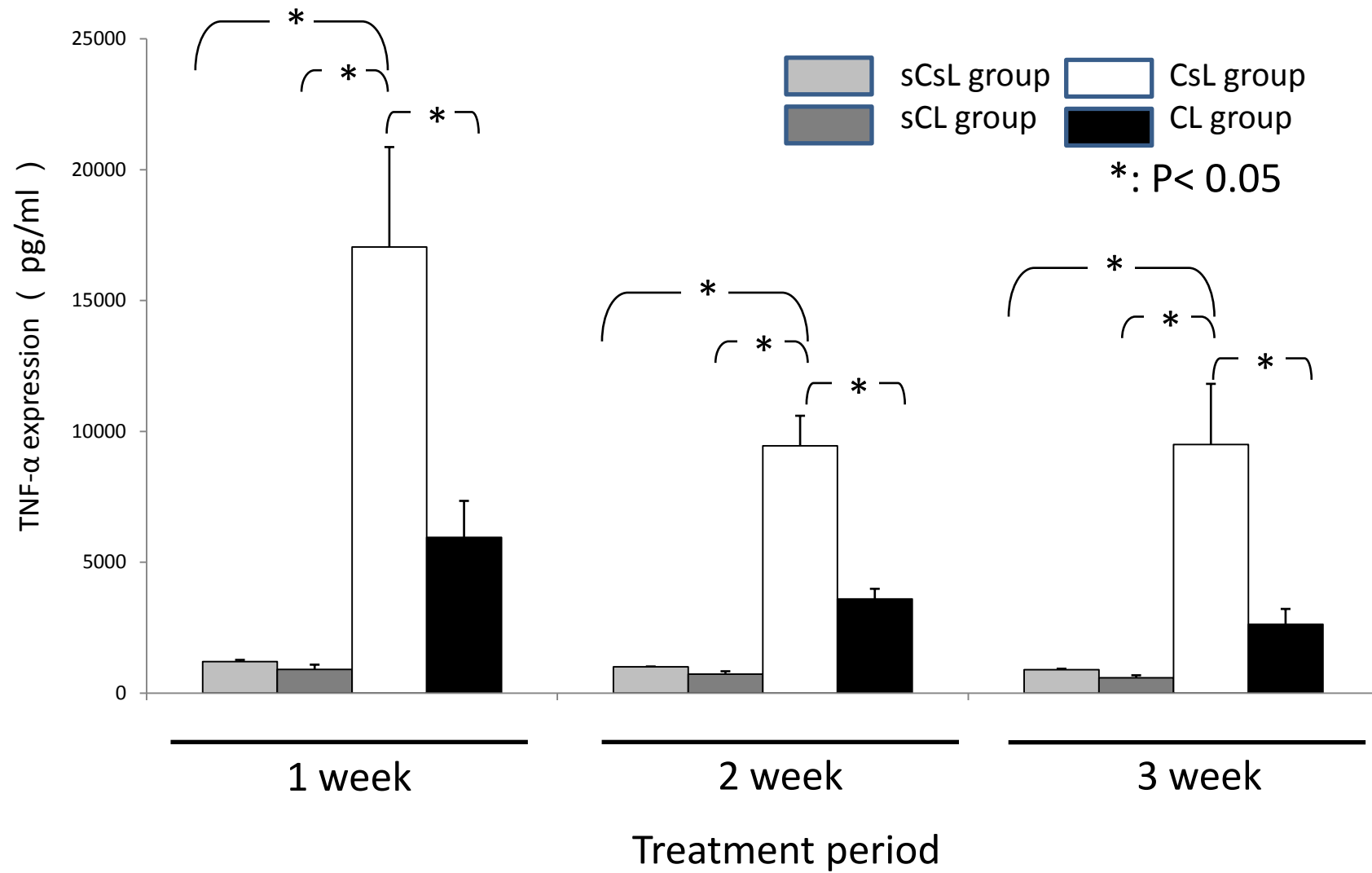


Figure 8. The protein levels of IL-1 $\beta$  by ELISA in each group.

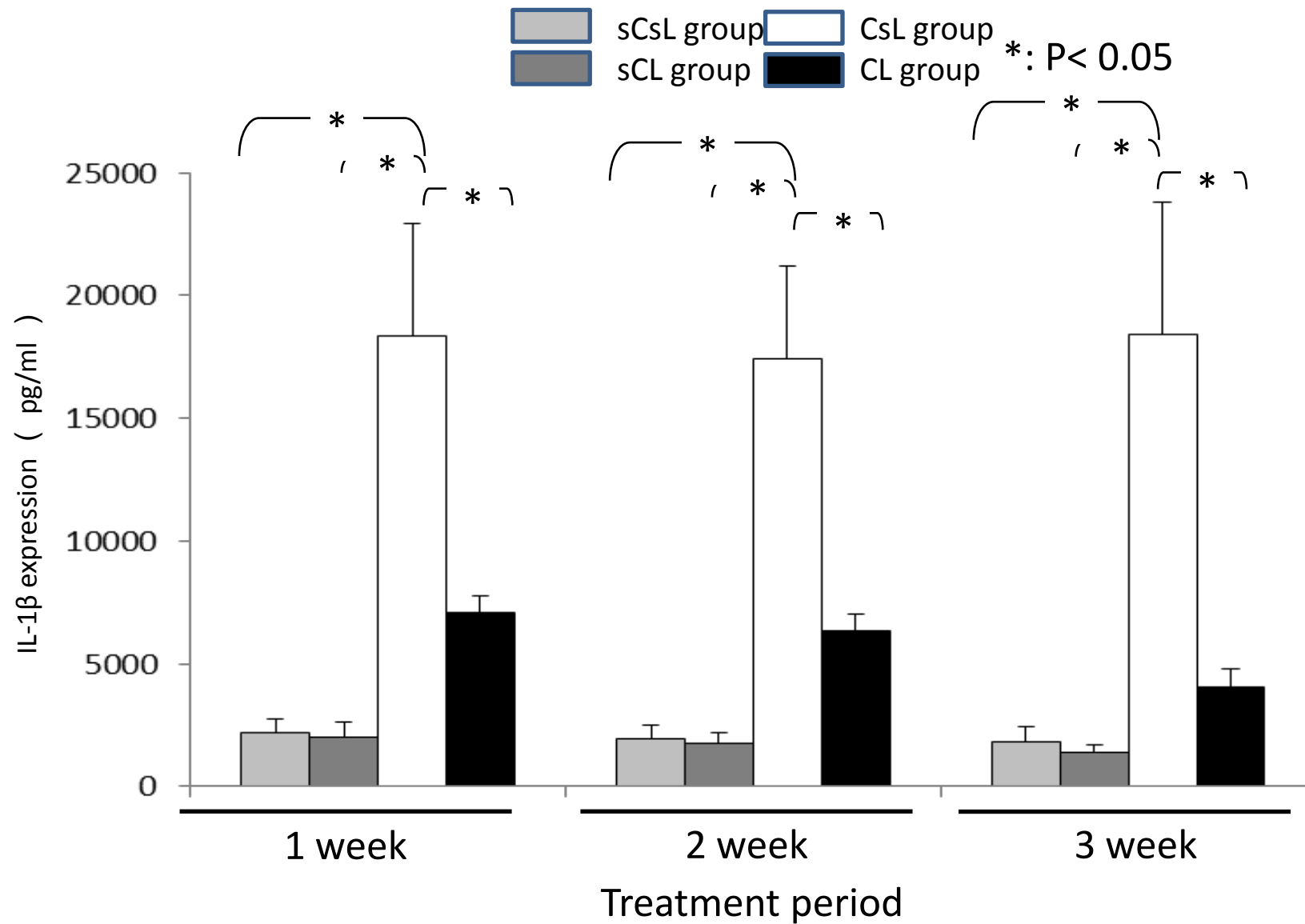


Figure 9. The protein levels of BDNF by ELISA in each group.

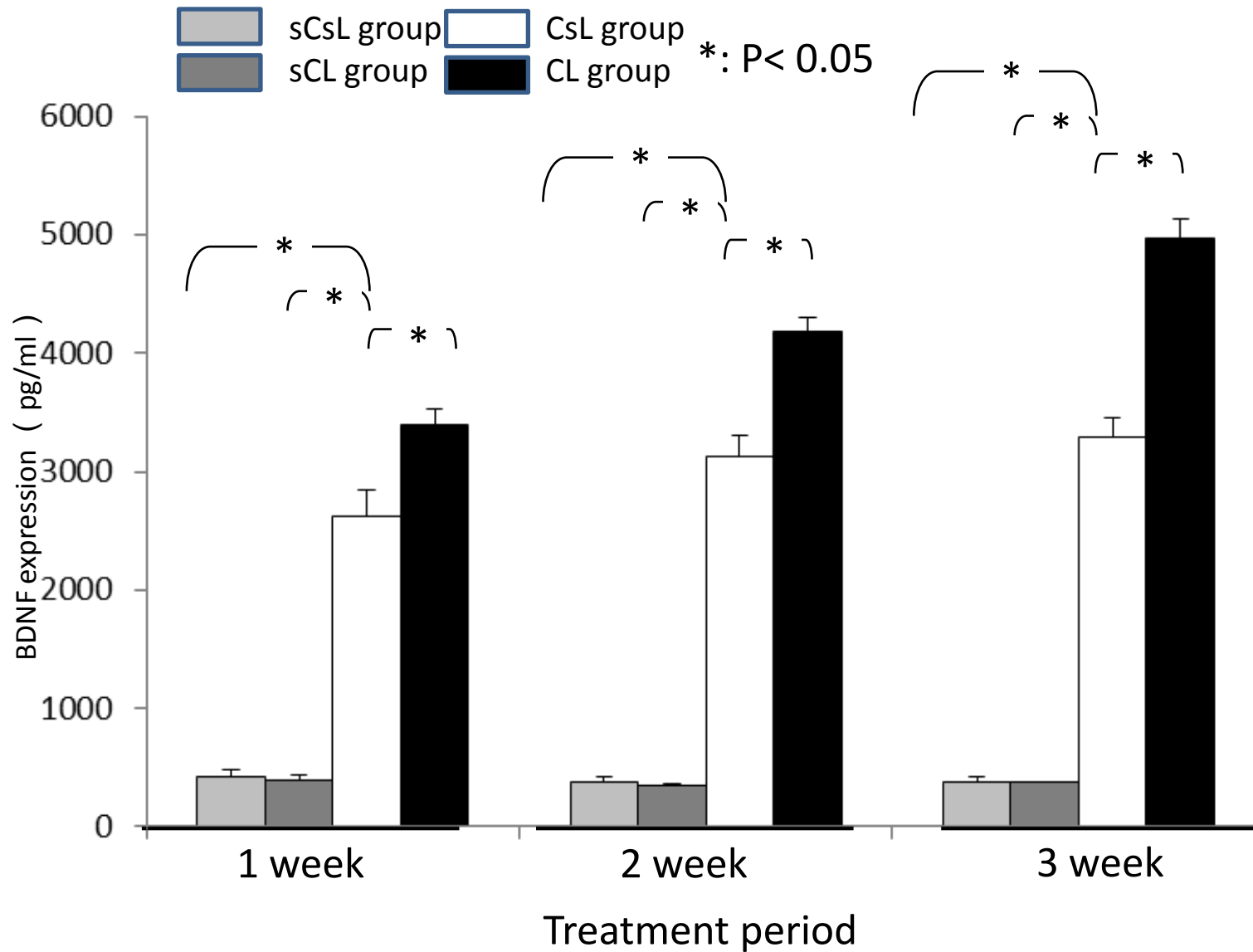


Figure 10. The levels of HIF-1 $\alpha$  by Western blotting in each group.

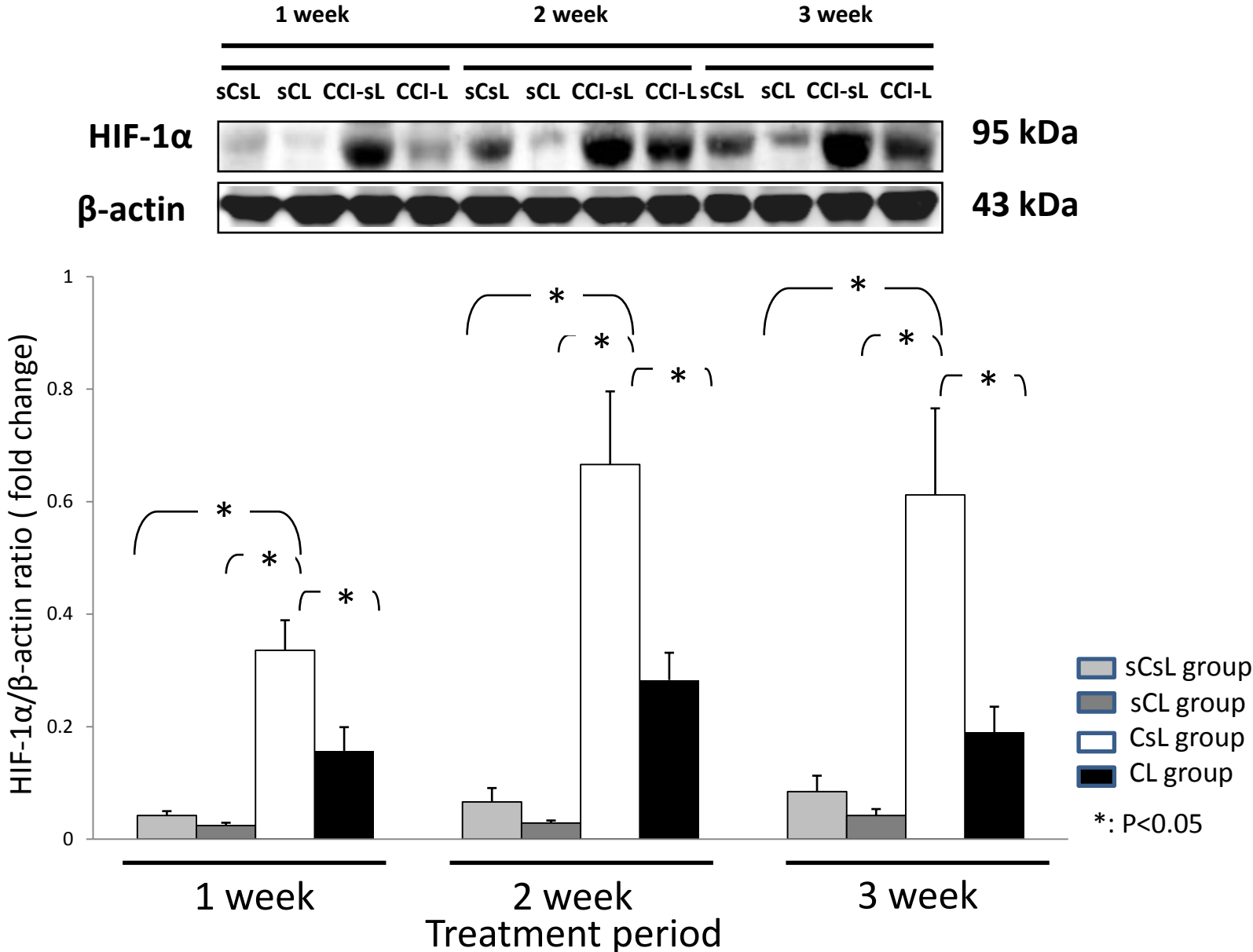


Figure 11. The levels of iNOS by Western blotting in each group.

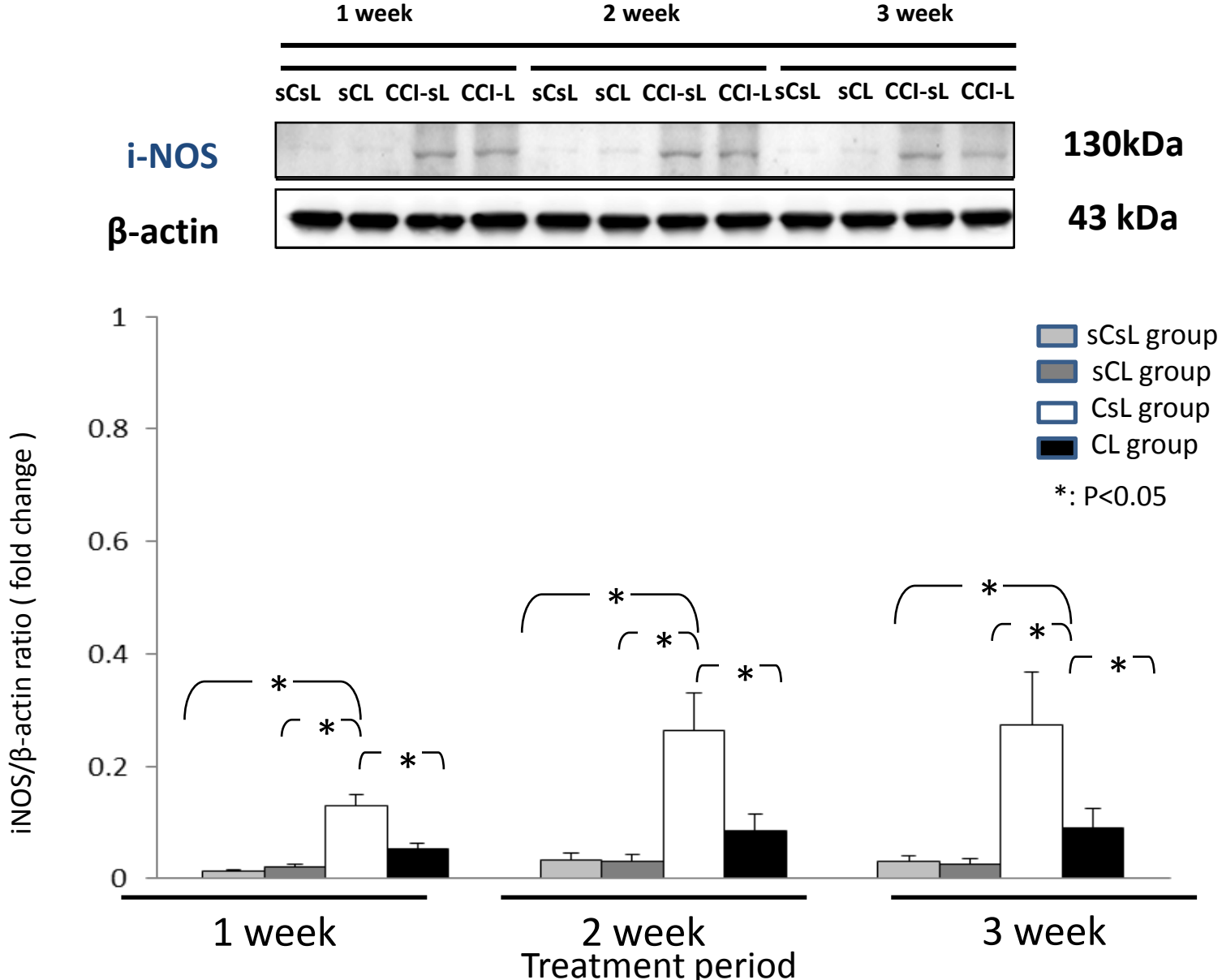


Figure 12. The levels of COX-2 by Western blotting in each group.

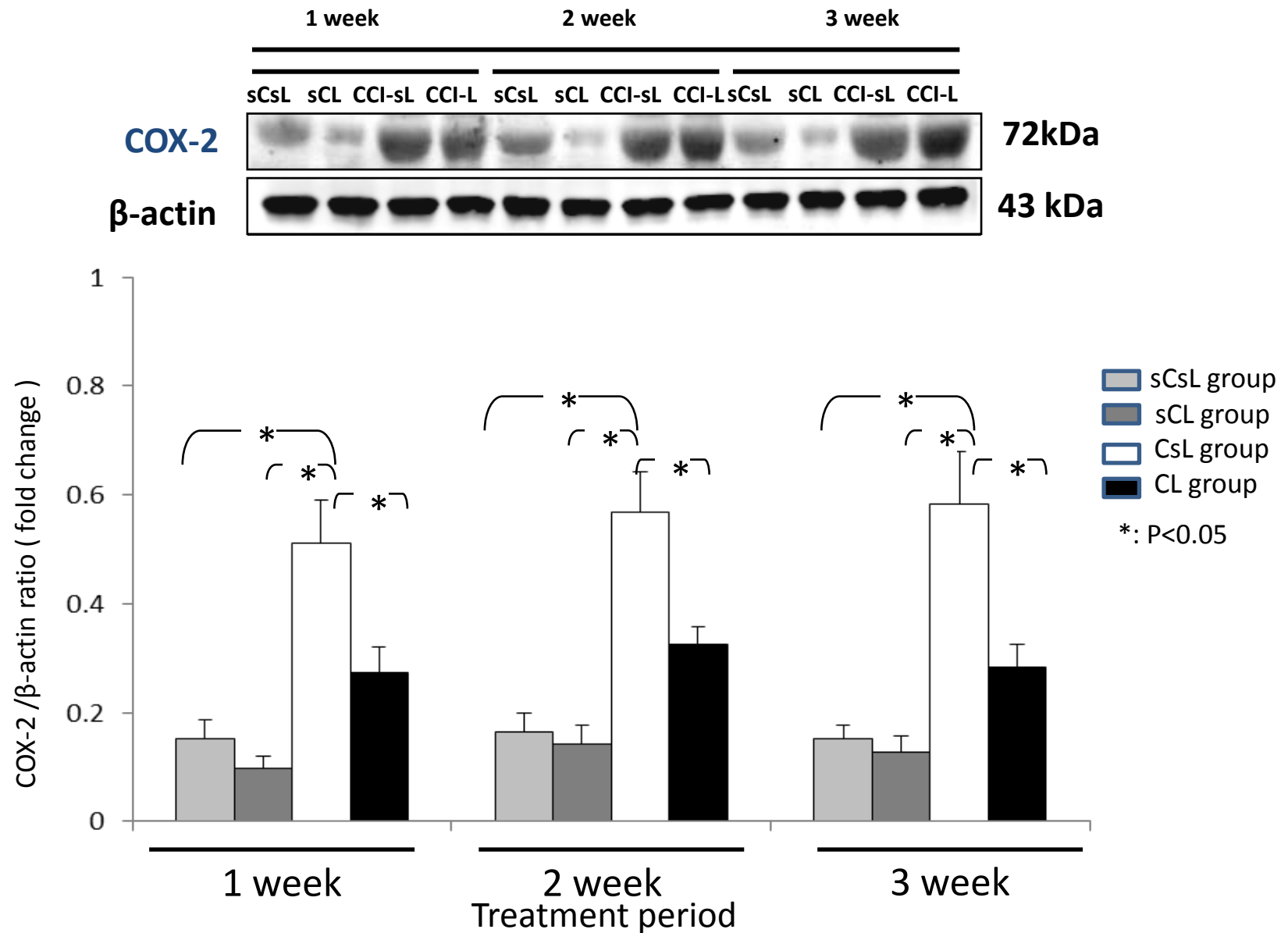


Figure 13. The levels of p53 by Western blotting in each group.

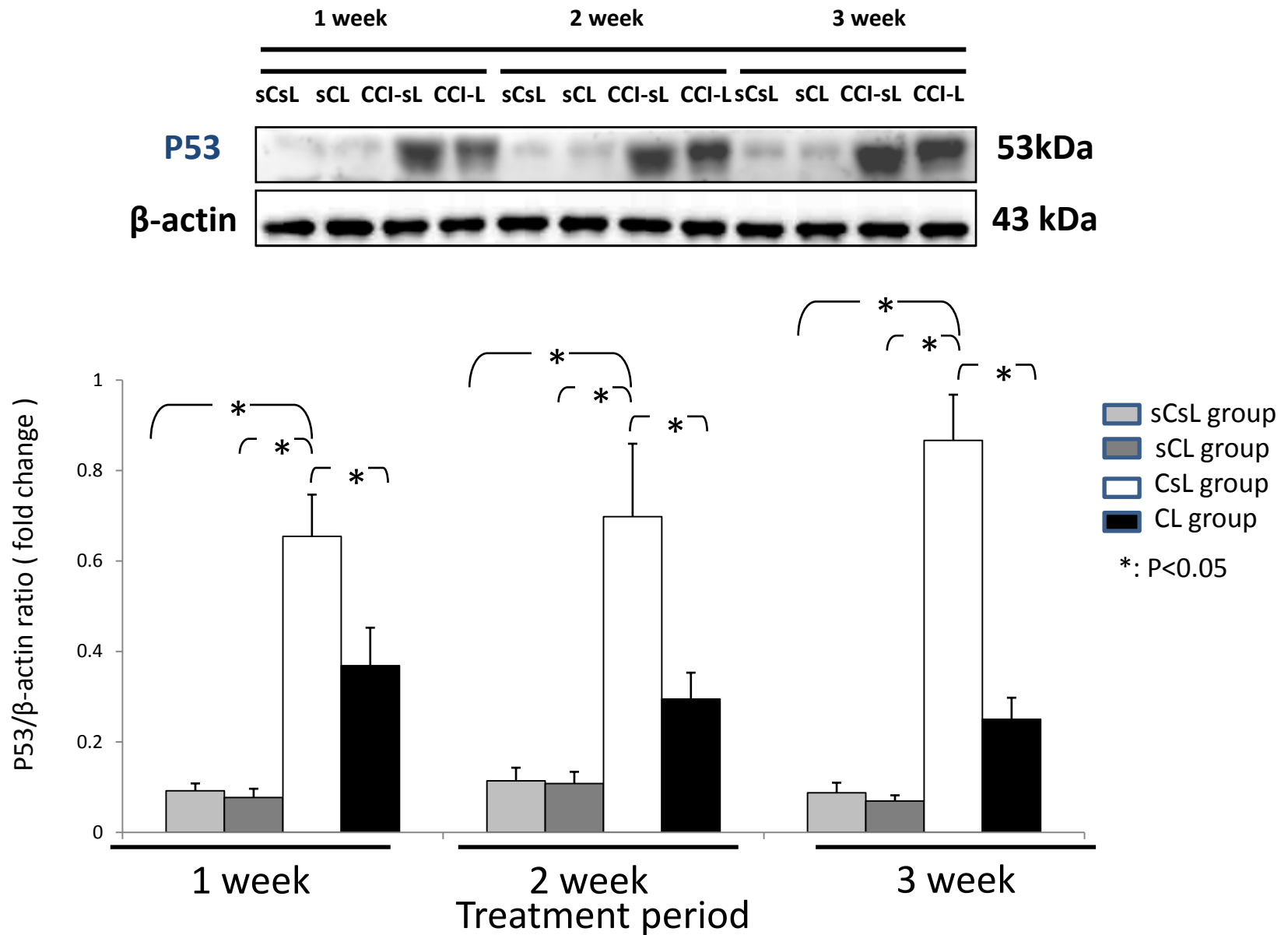


Figure 14. The levels of VEGF by Western blotting in each group.

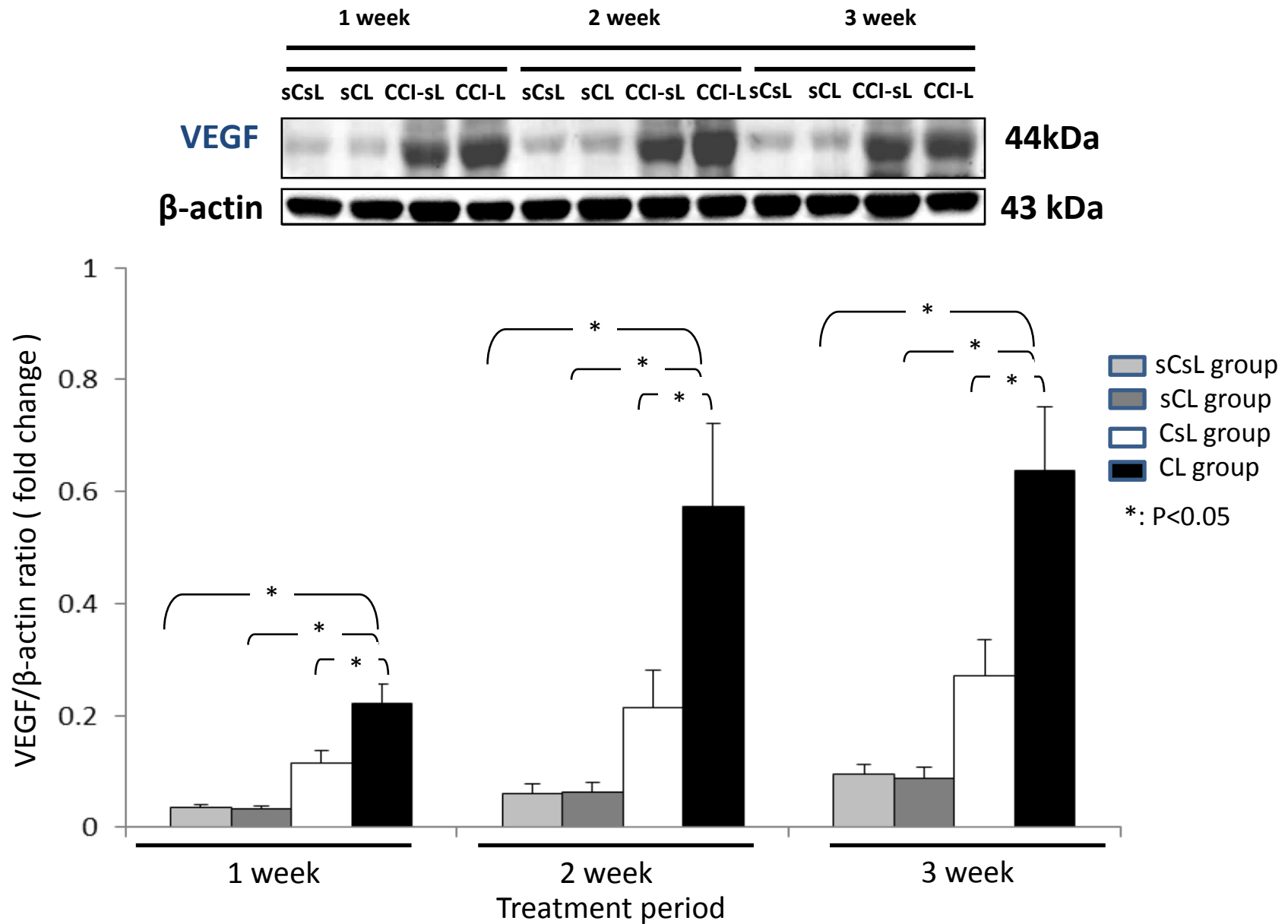




Figure 15 . The levels of NGF by Western blotting in each group.

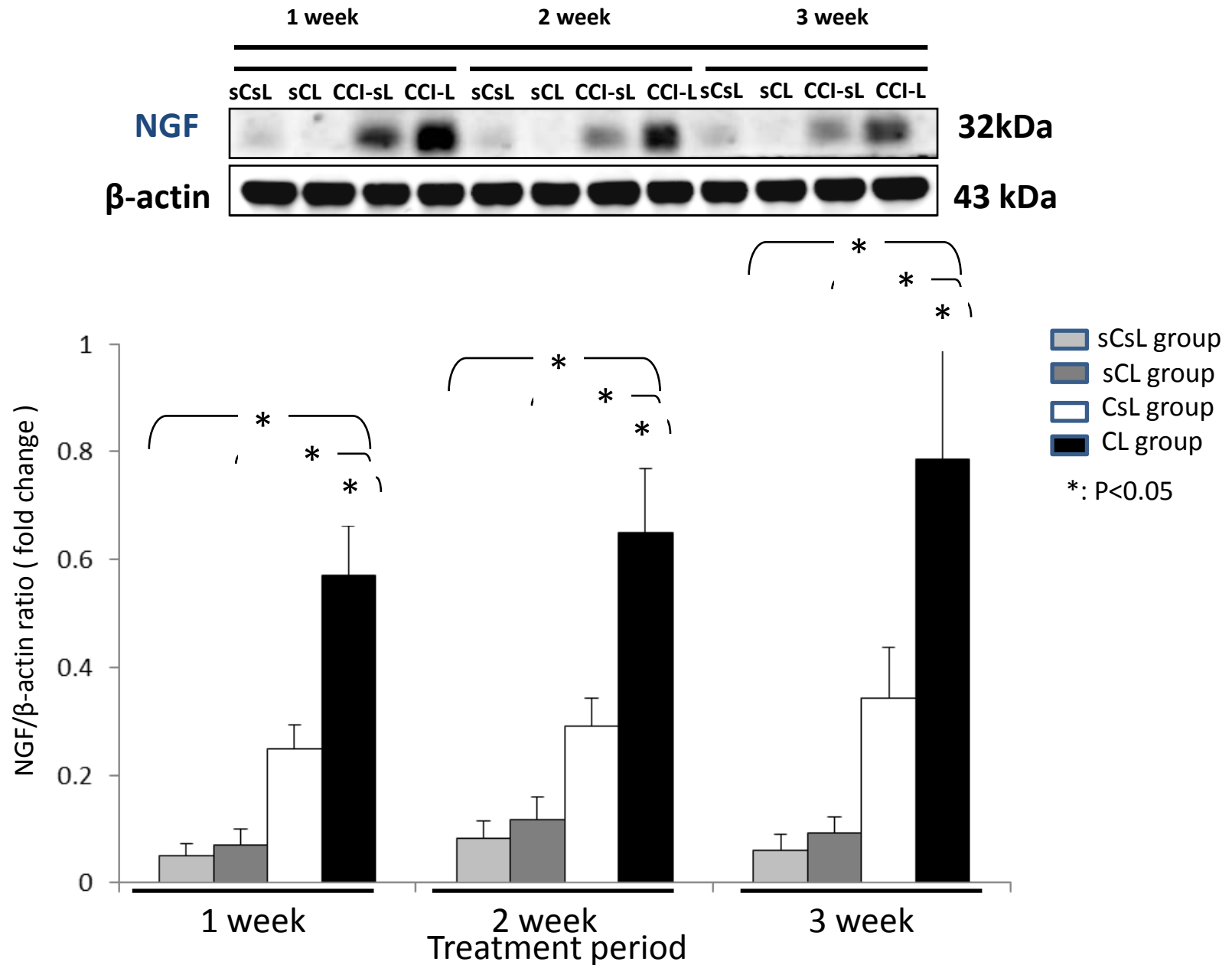


Figure 16. The examples in each group by H&E staining.

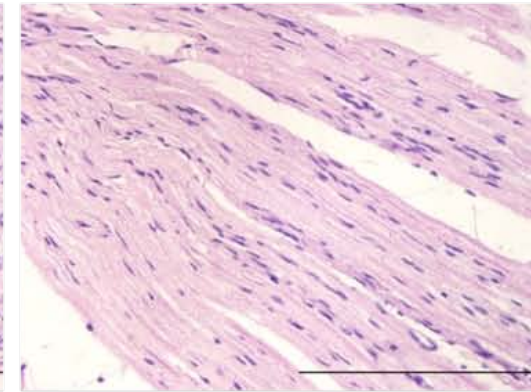
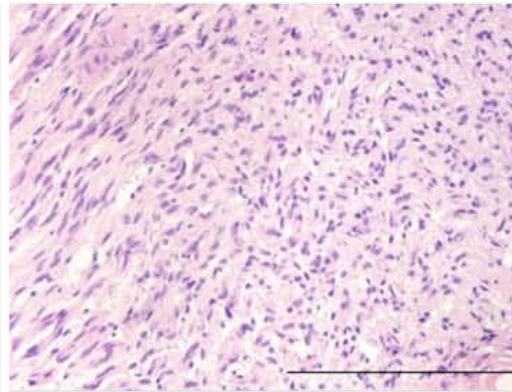
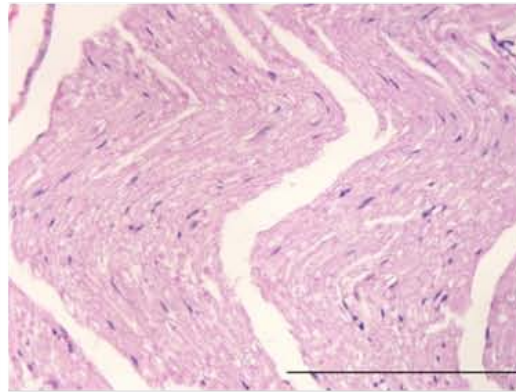
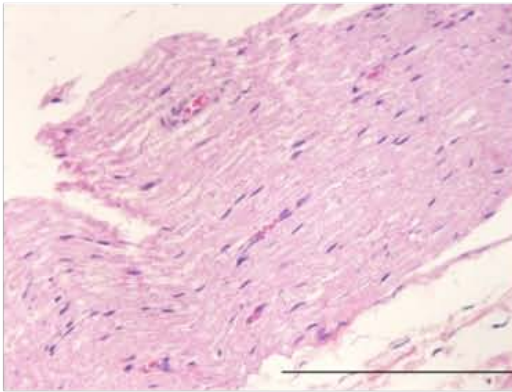
sCsL group

sCL group

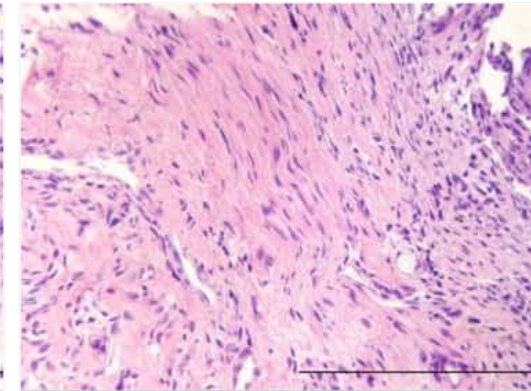
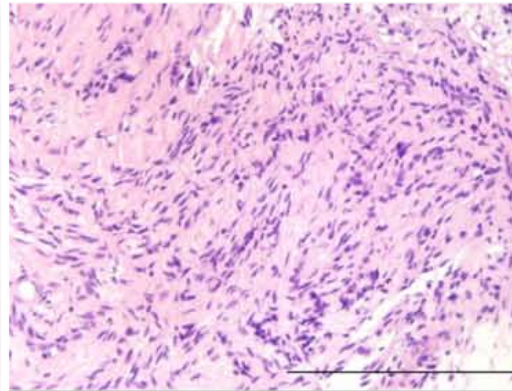
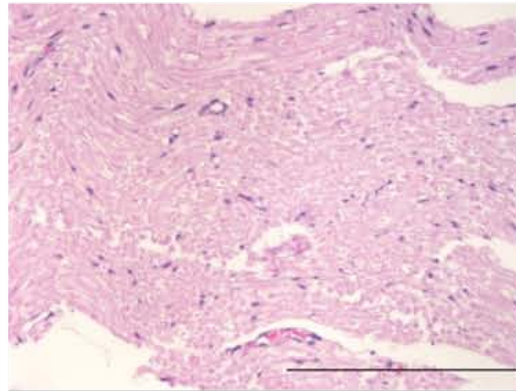
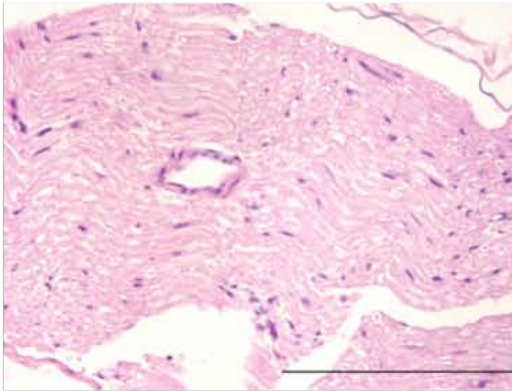
CsL group

CL group

1W



2W



3W

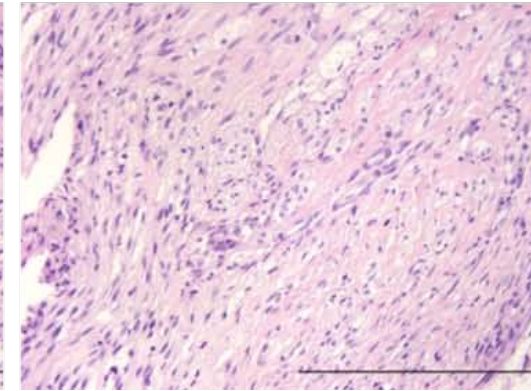
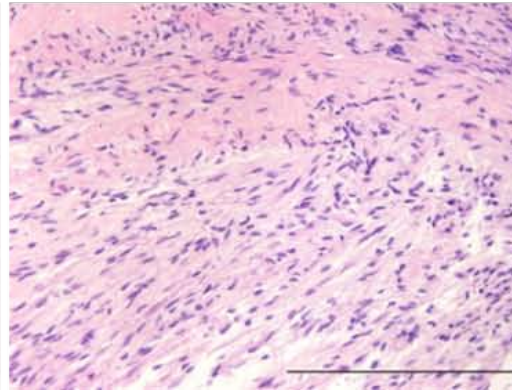
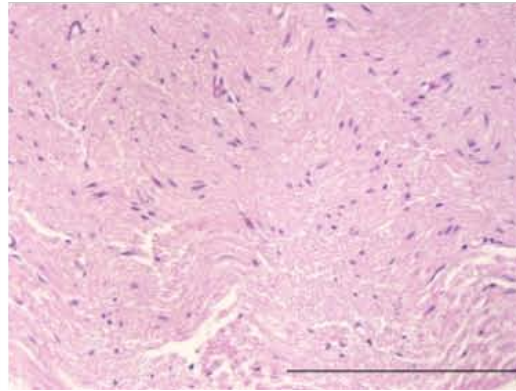
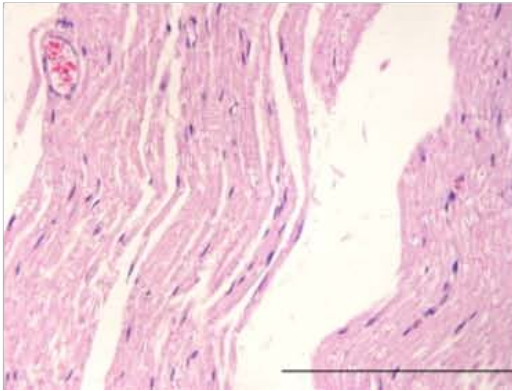


Figure 17. The examples in each group by HIF-1 $\alpha$  immunohistochemistry.

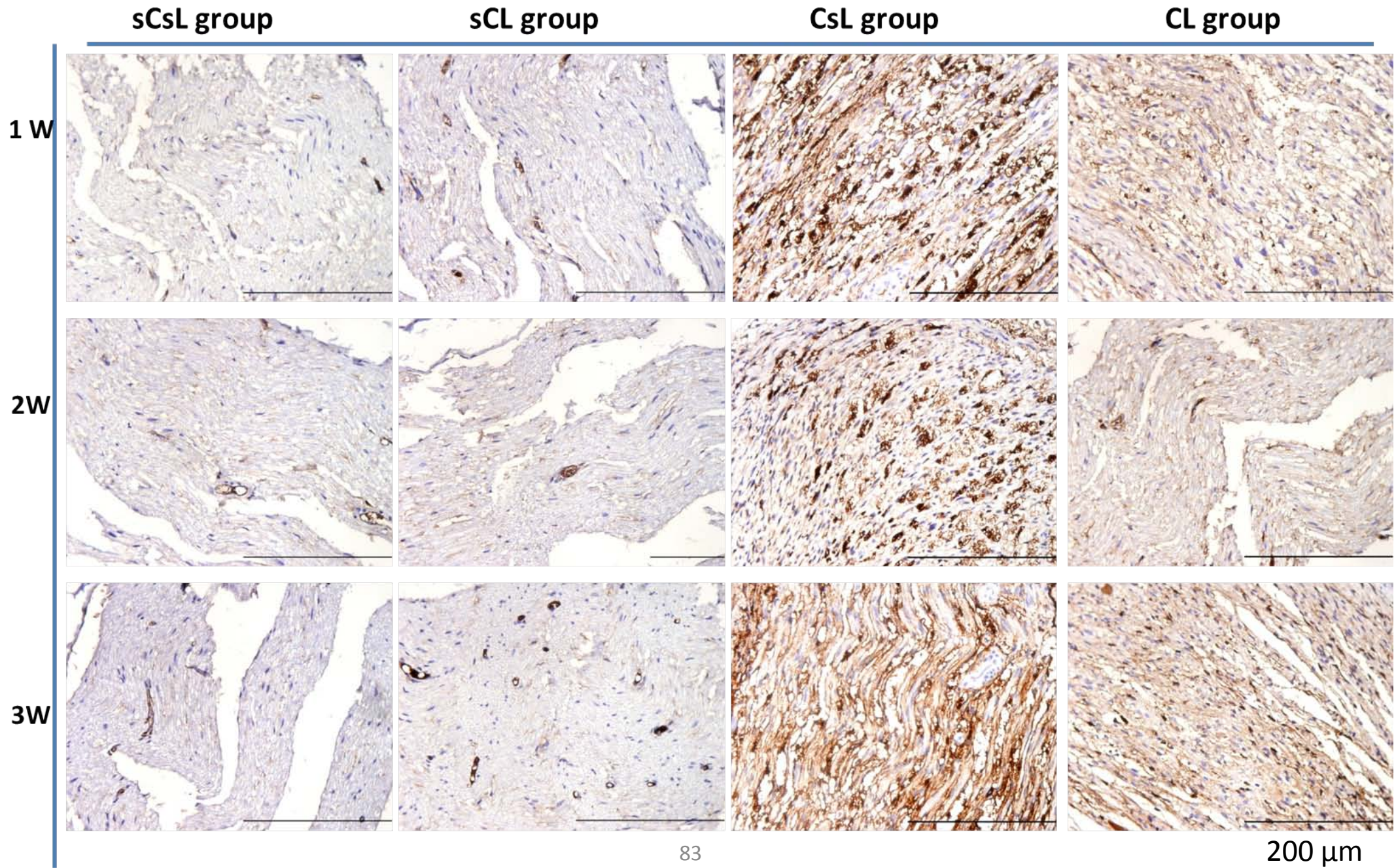
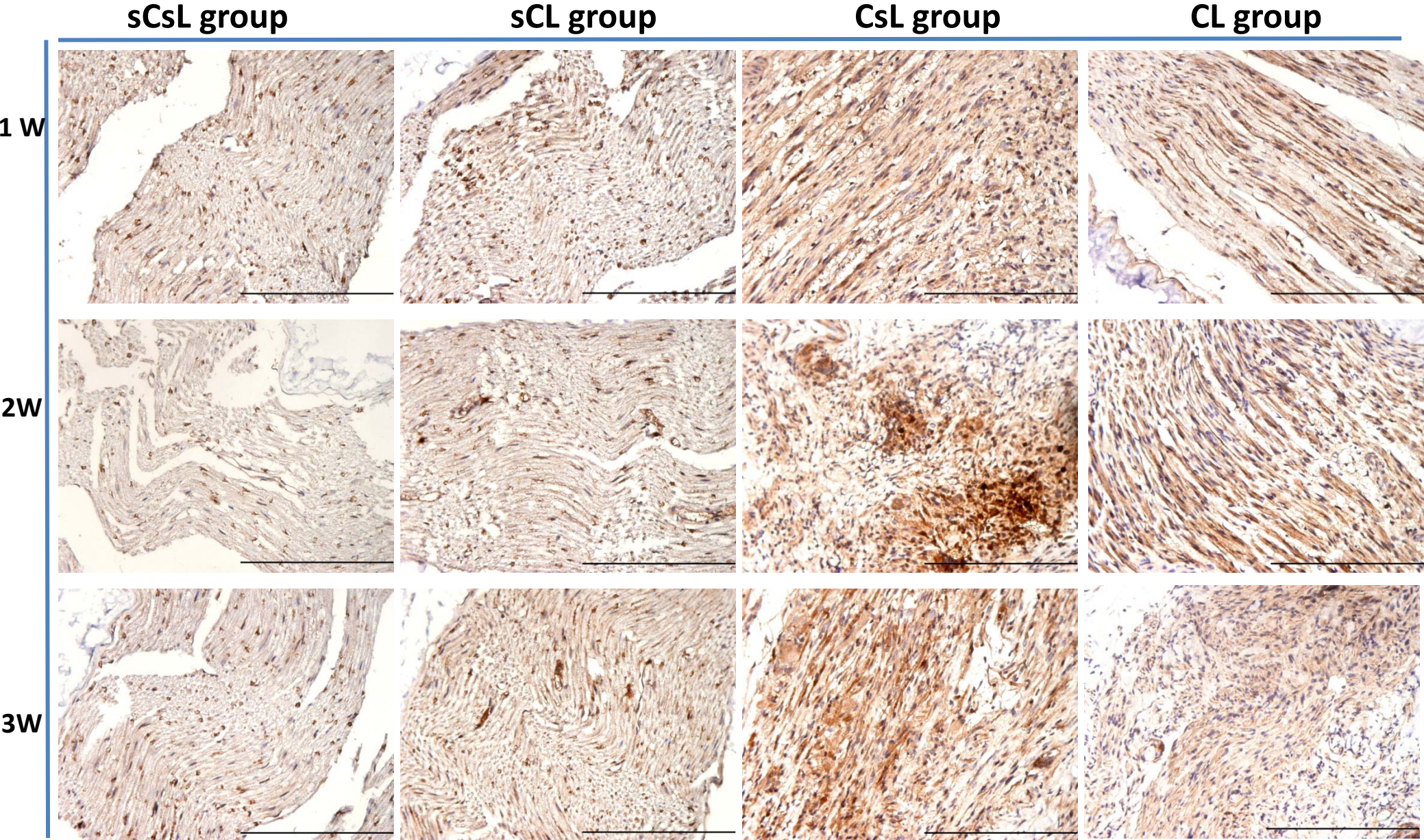


Figure 18. The examples in each group by iNOS immunohistochemistry.



200 μm

Figure 19. The examples in each group by COX-2 immunohistochemistry.

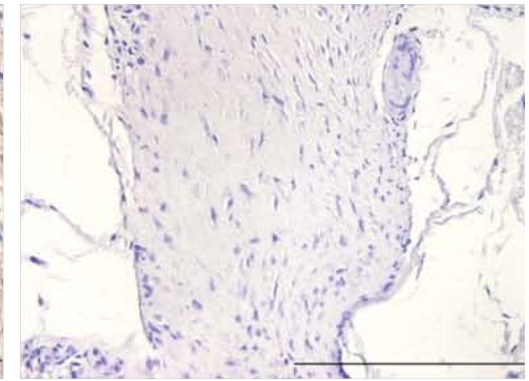
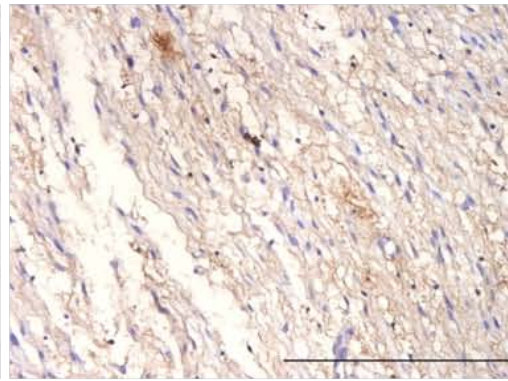
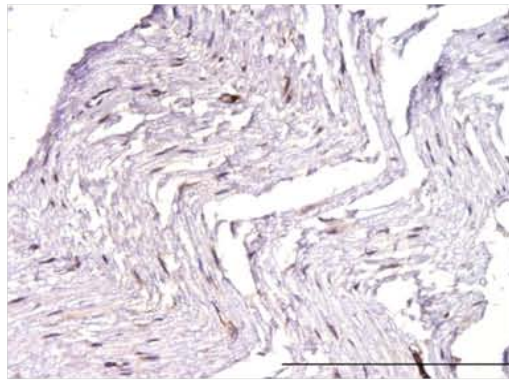
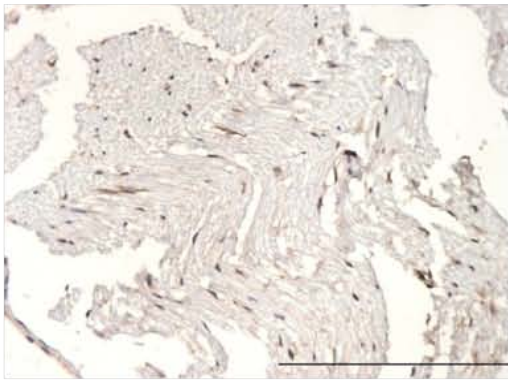
sCsL group

sCL group

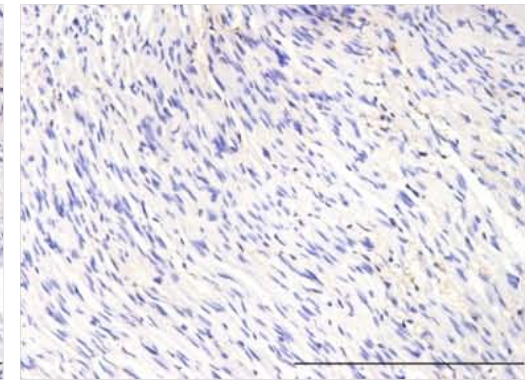
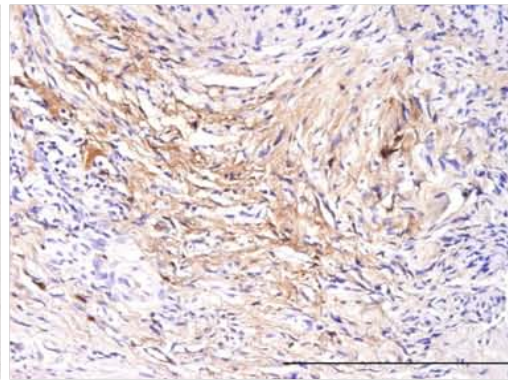
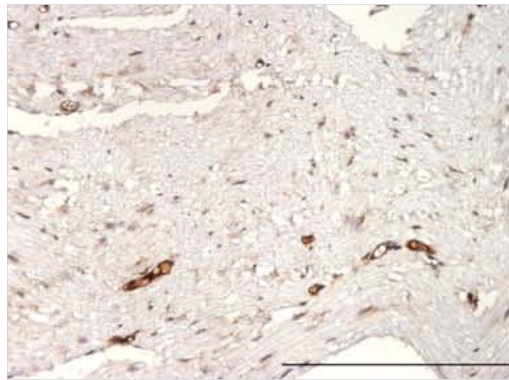
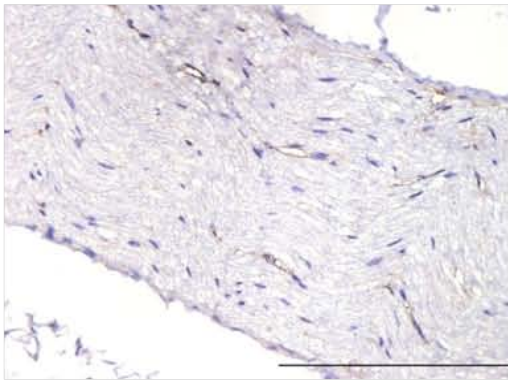
CsL group

CL group

1 W



2 W



3 W

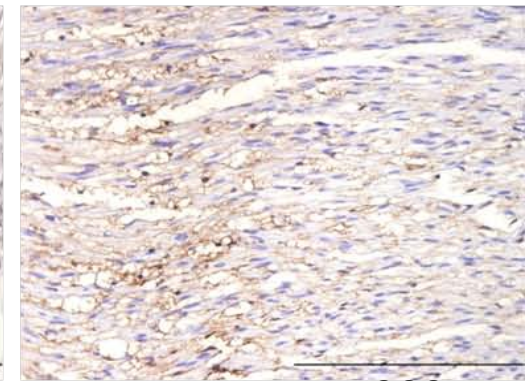
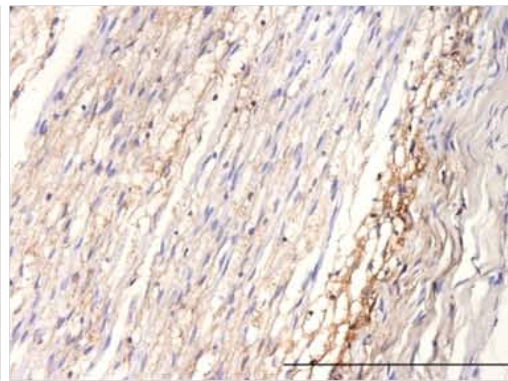
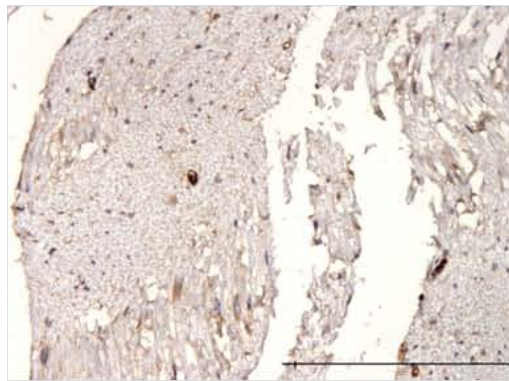
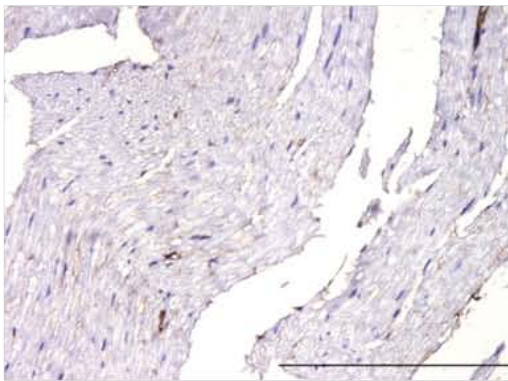


Figure 20. The examples in each group by p53 immunohistochemistry.

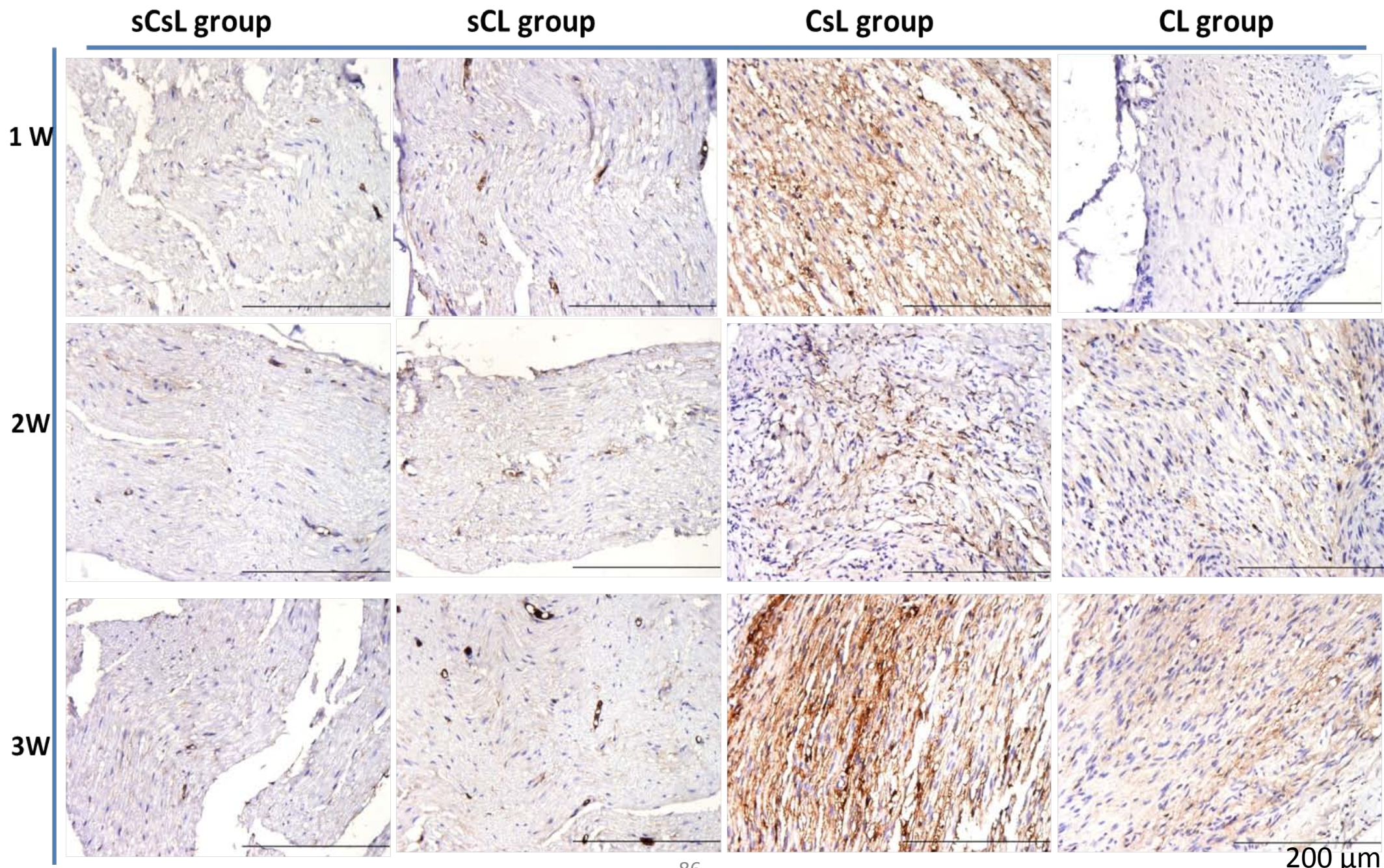


Figure 21. The examples in each group by ED1 immunohistochemistry.

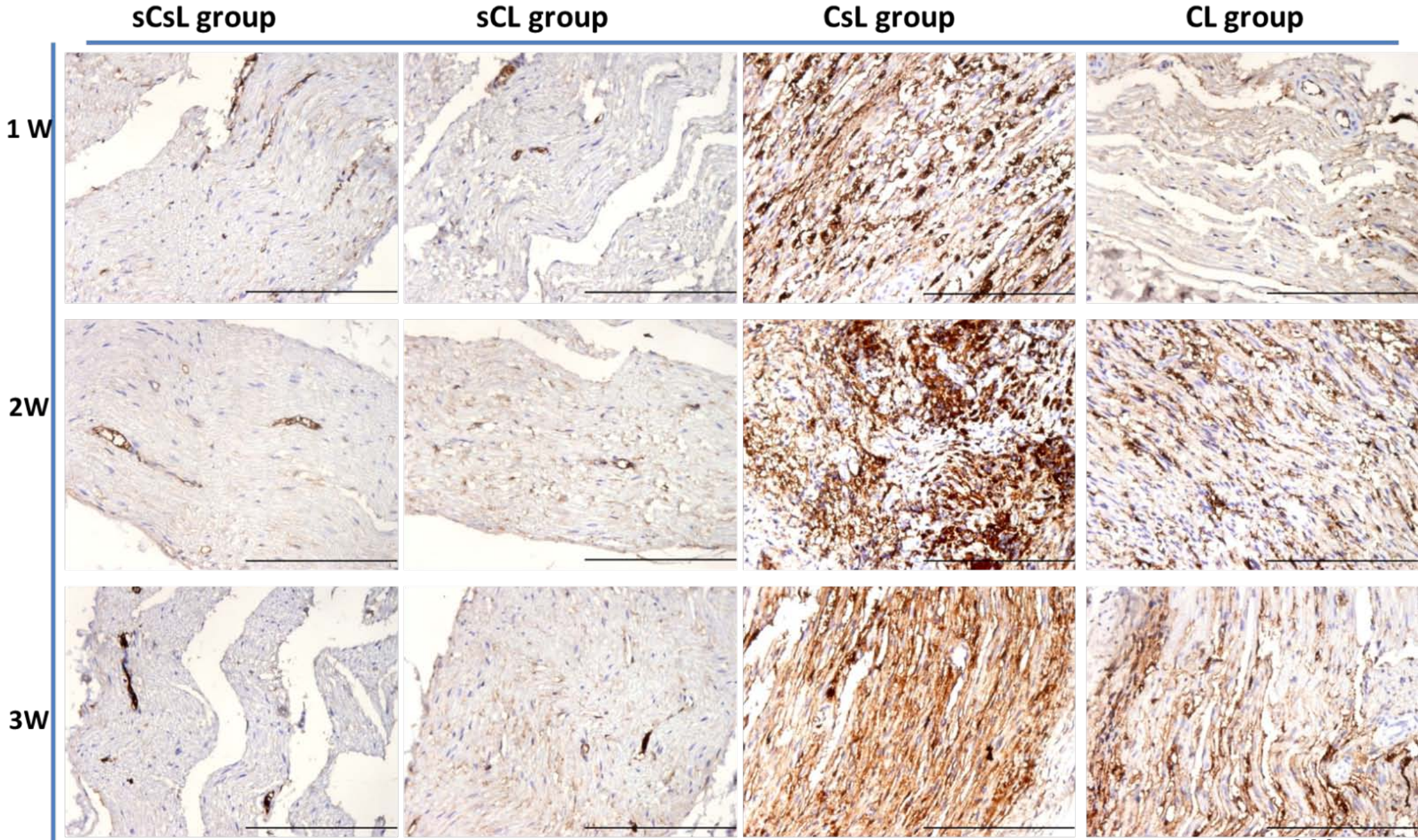


Figure 22. The examples in each group by VEGF immunohistochemistry.

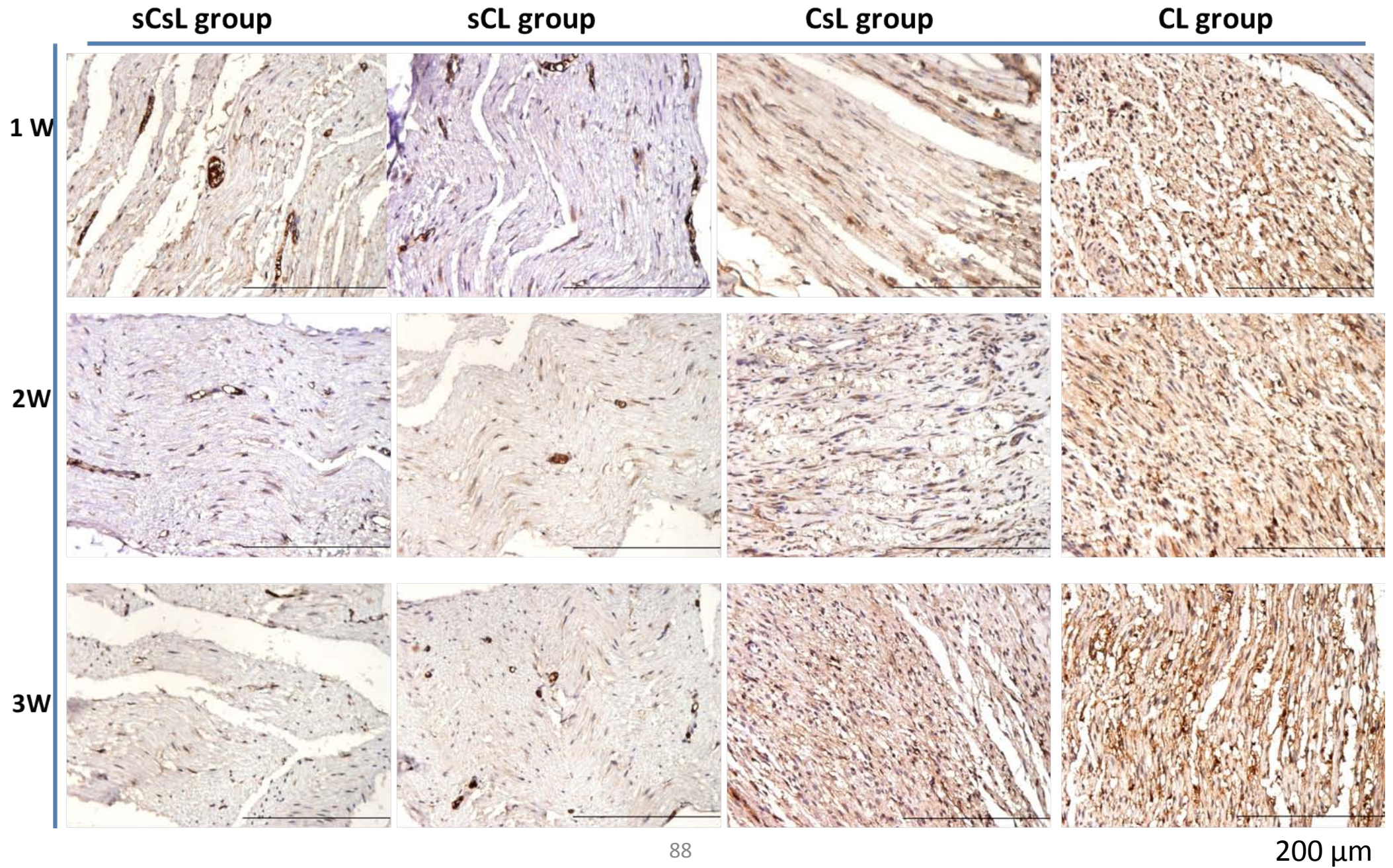




Figure 23. The examples in each group by NGF immunohistochemistry.

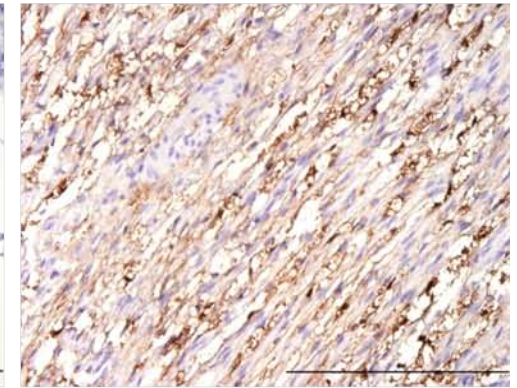
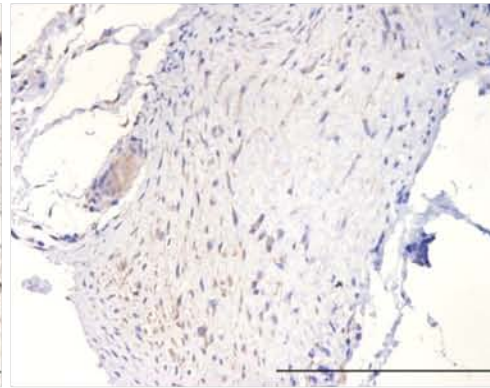
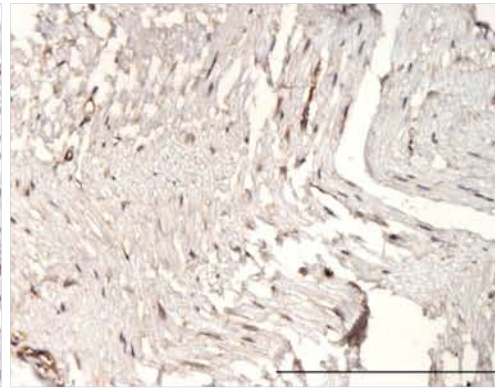
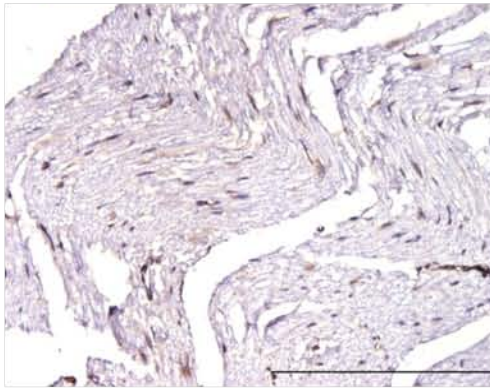
sCsL group

sCL group

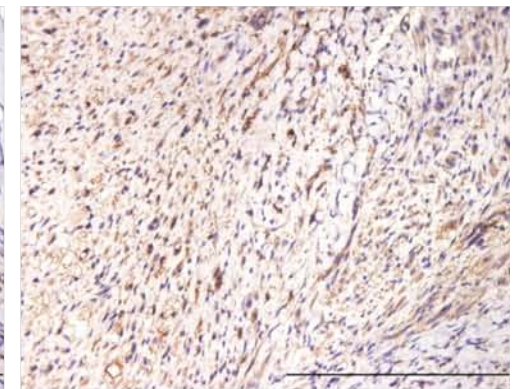
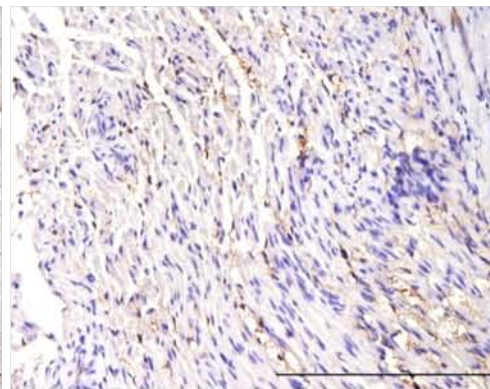
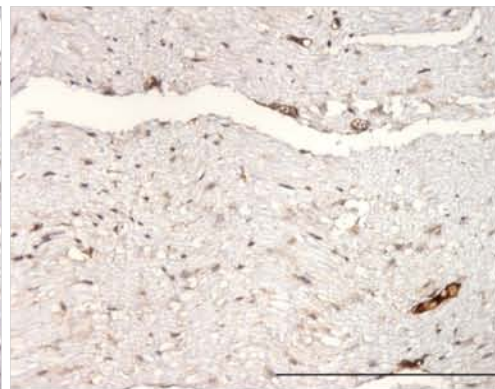
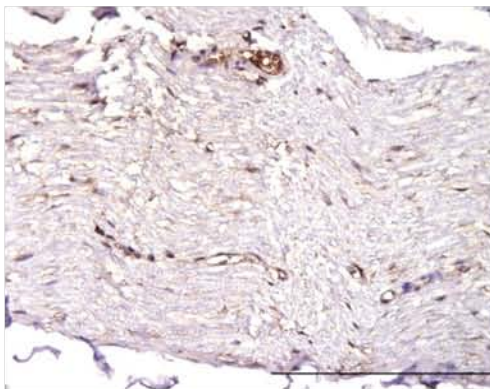
CsL group

CL group

1 W



2 W



3 W

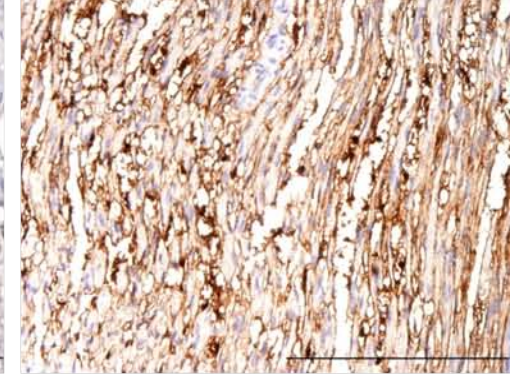
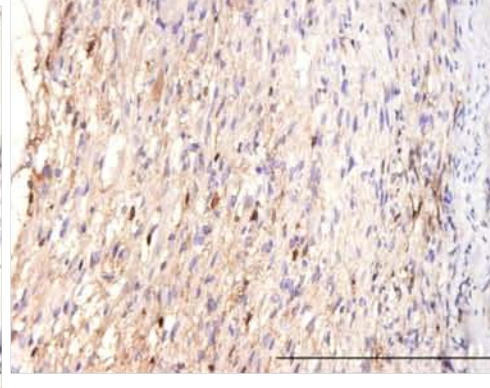
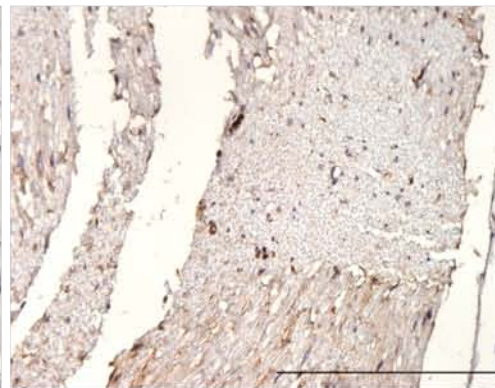
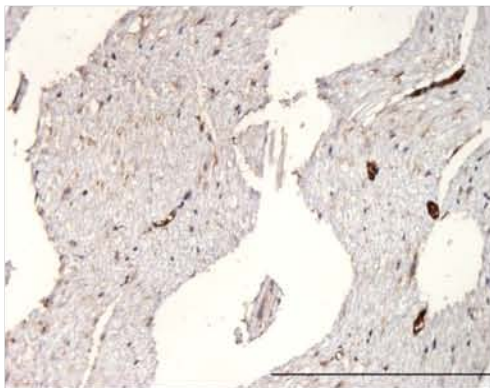
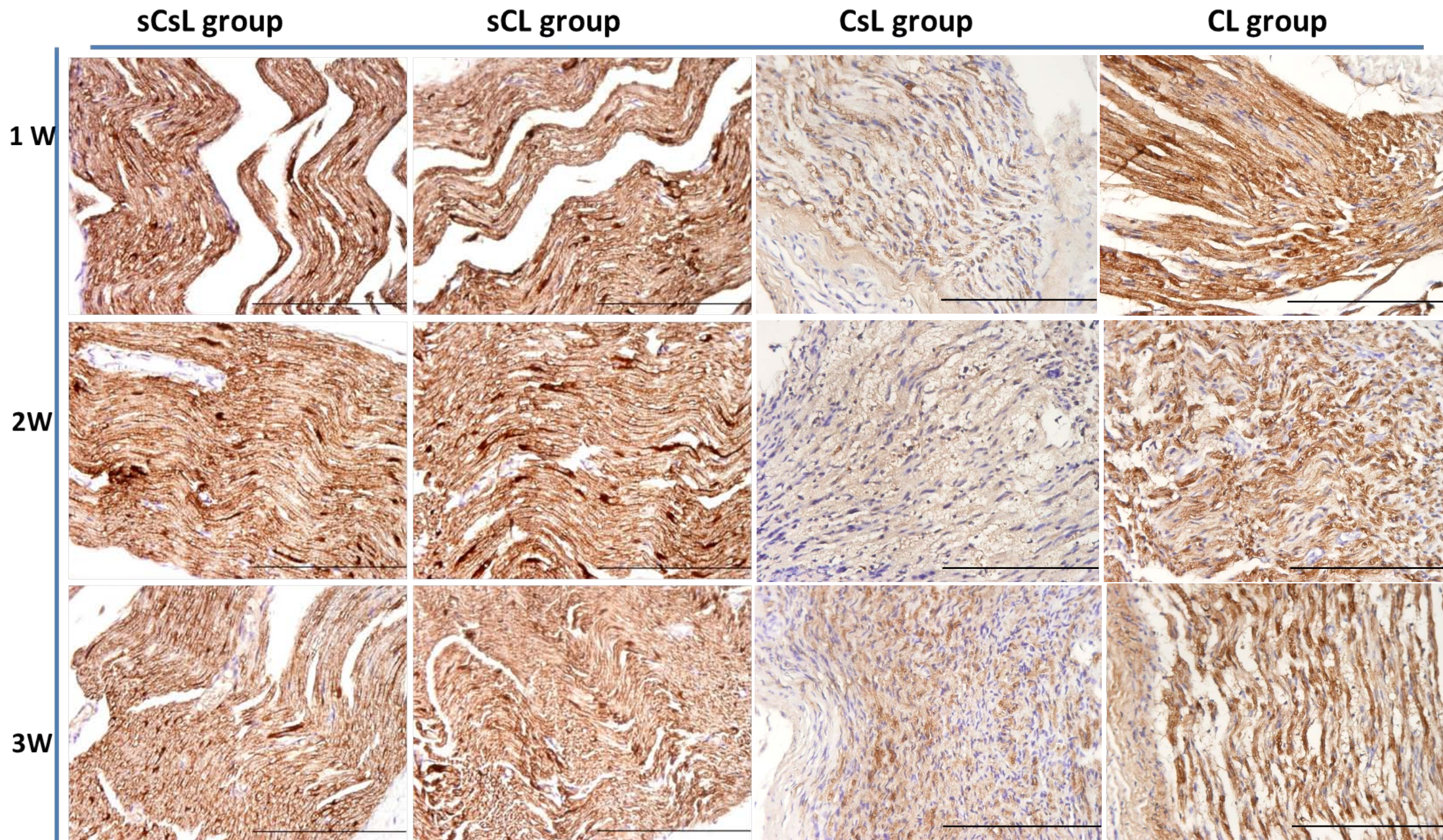


Figure 24. The examples in each group by S100 immunohistochemistry.



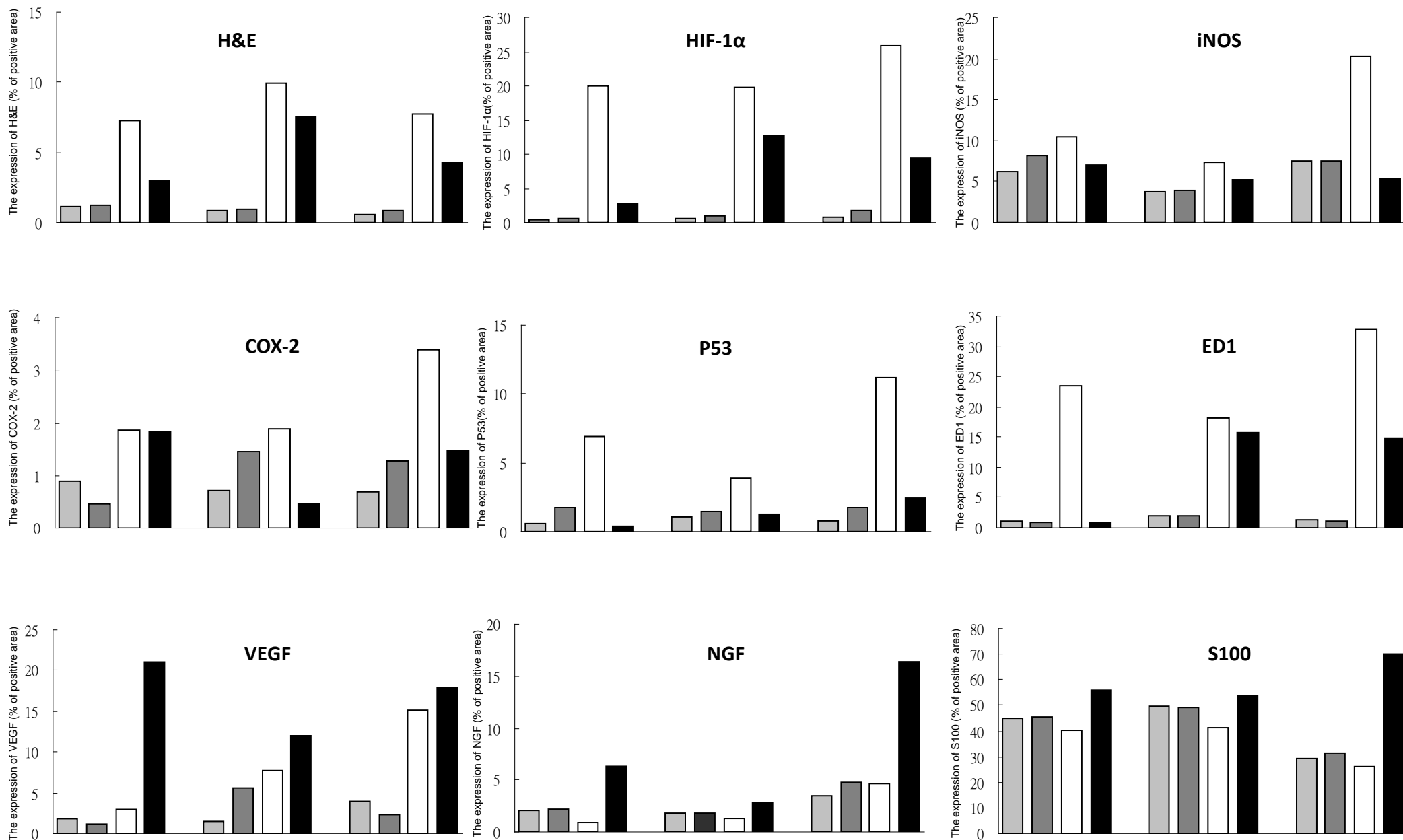


Figure 25. The histogram and quantification of the results of H&E staining and immunohistochemistry.

Figure 26. The examples in CsL and CL group by HIF-1 $\alpha$ , ED1 double immunofluorescent staining.

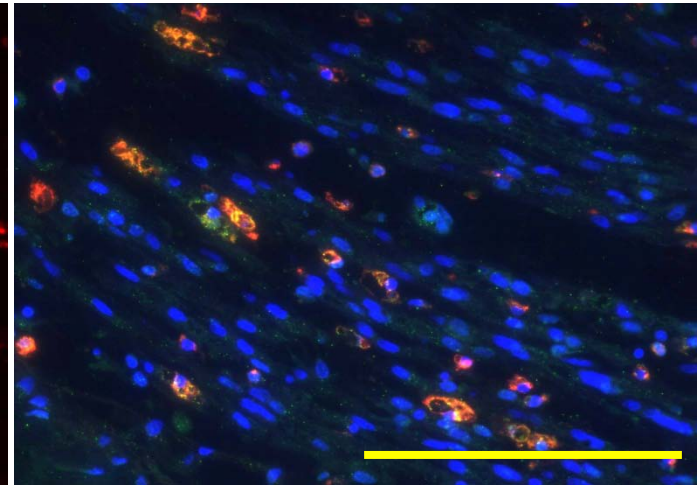
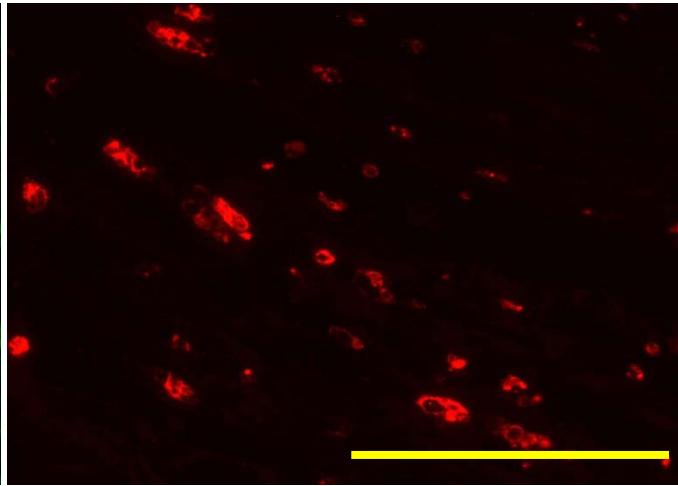
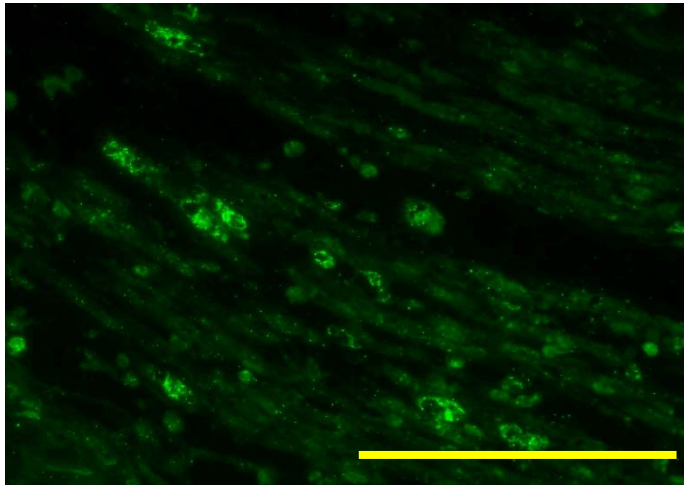
**A. 1 week**

**HIF-1a**

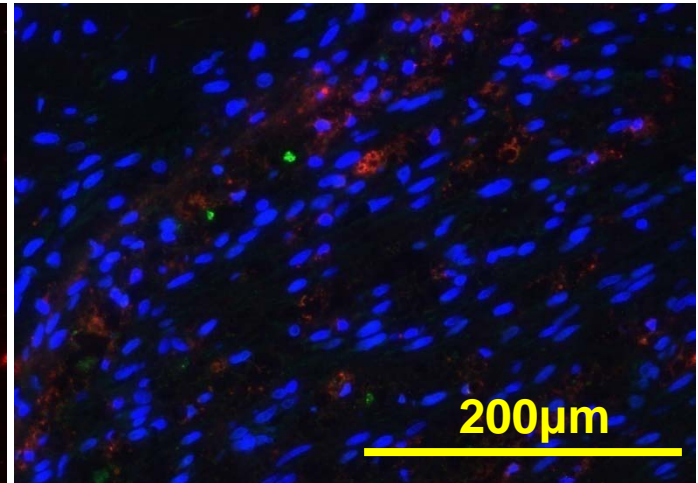
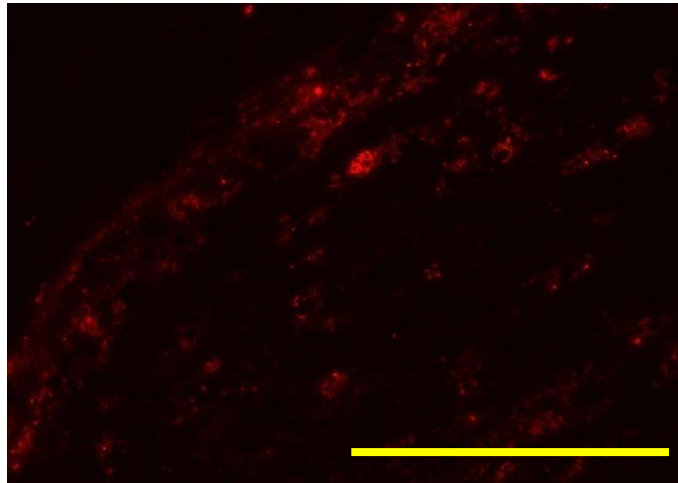
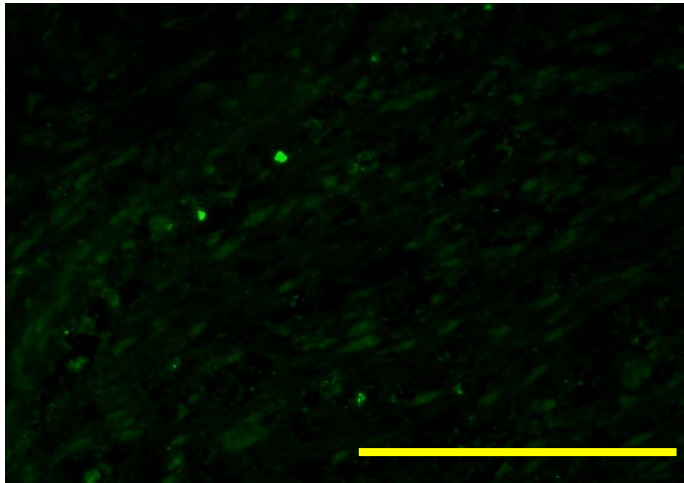
**ED1**

**DAPI+ HIF-1a + ED1**

CsL



CL



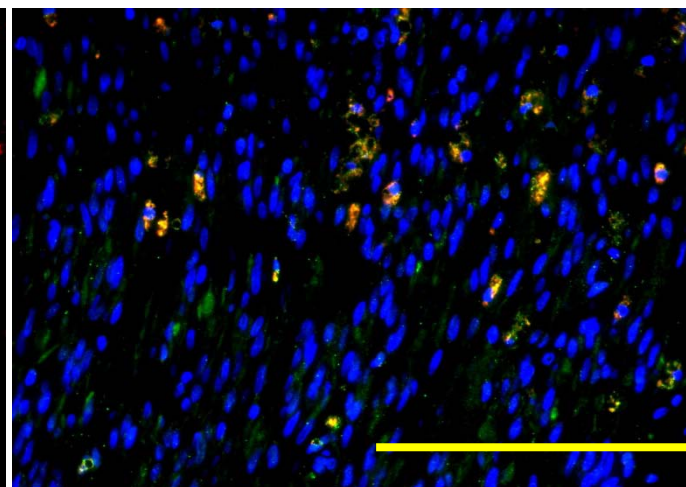
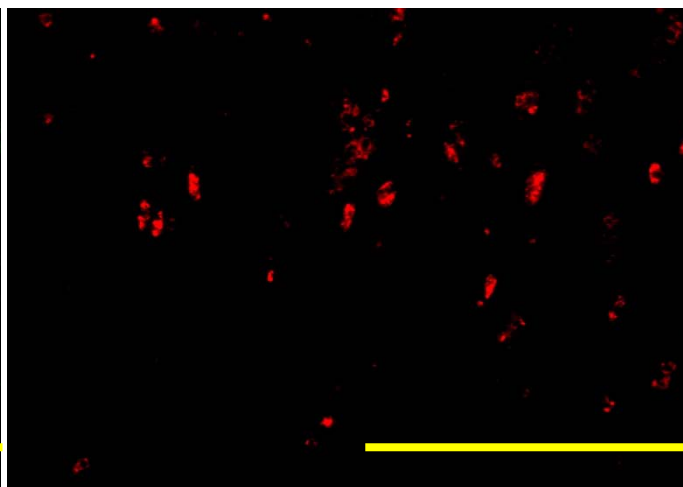
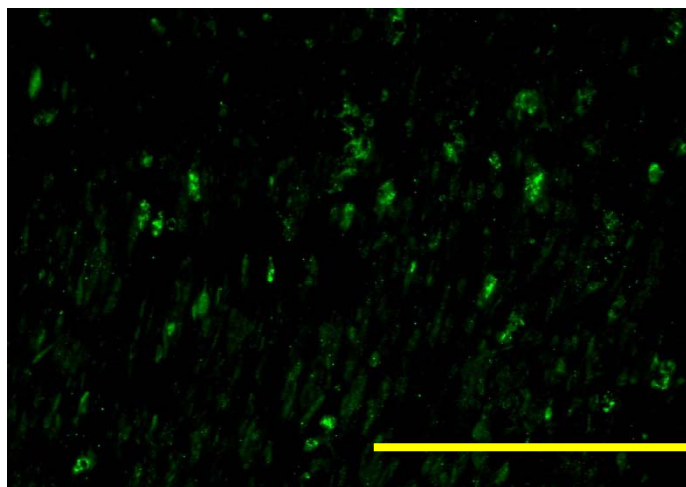
## B. 2-week treatment

HIF-1a

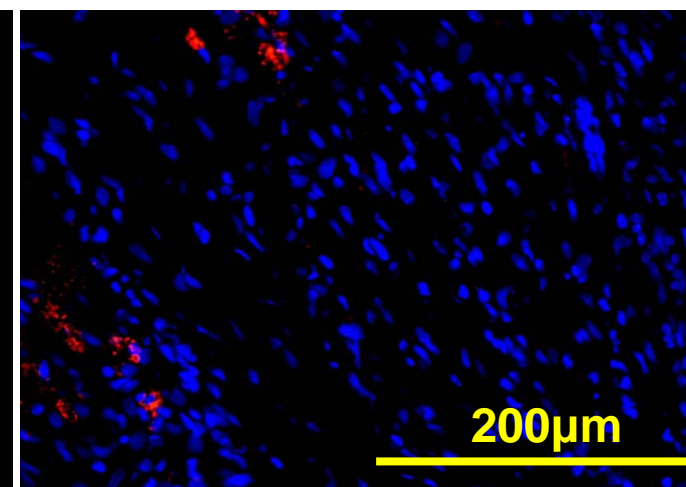
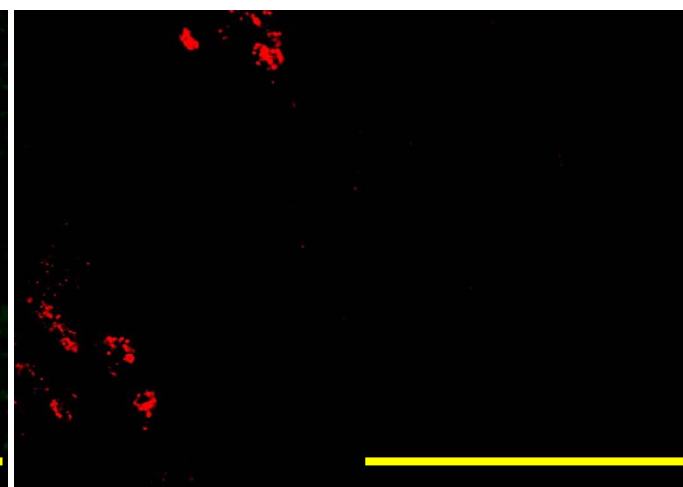
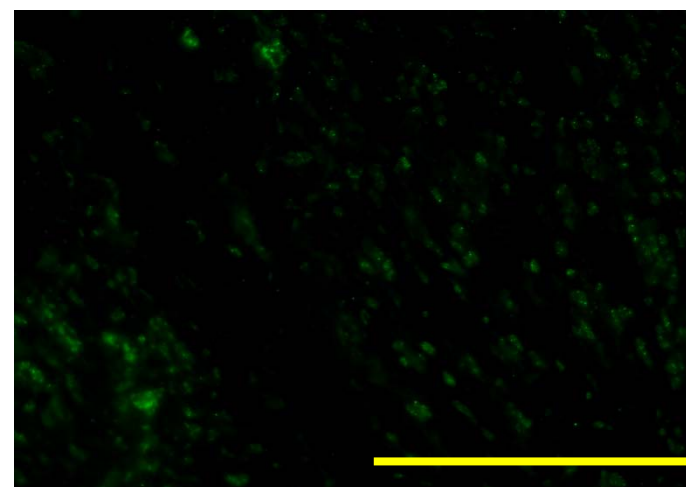
ED1

DAPI+ HIF-1a + ED1

CSL



CL



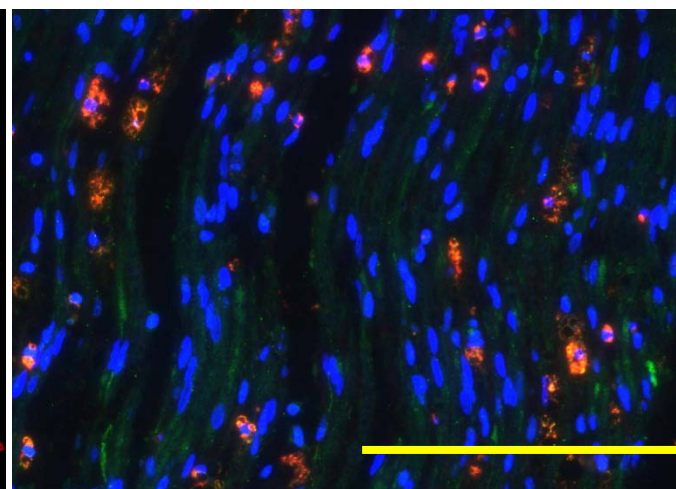
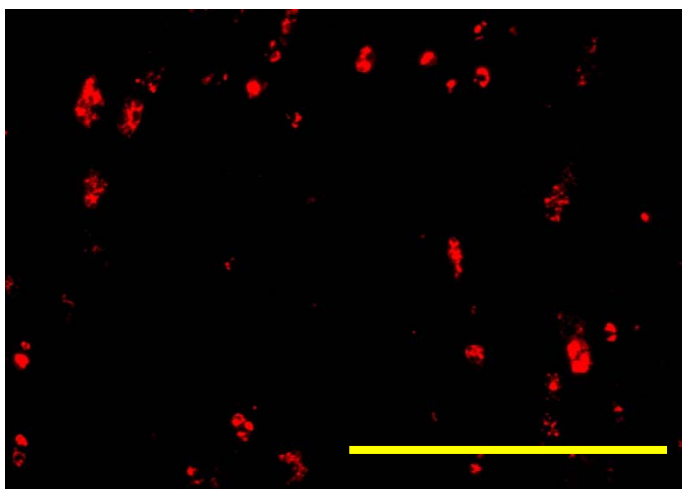
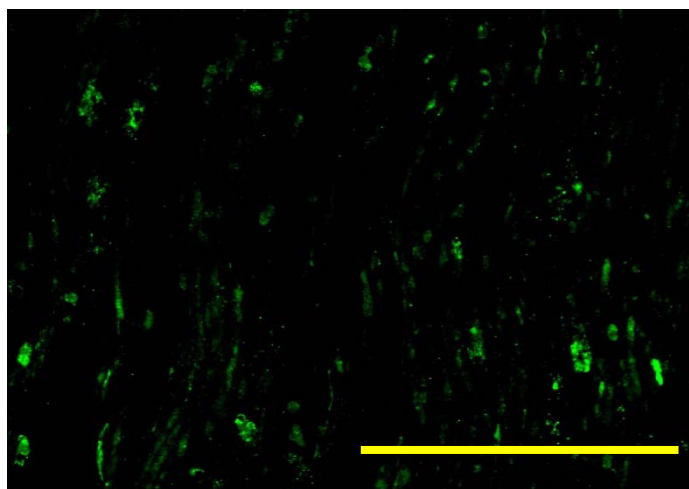
### C. 3-week treatment

HIF-1a

ED1

DAPI+ HIF-1a + ED1

CSL



CL

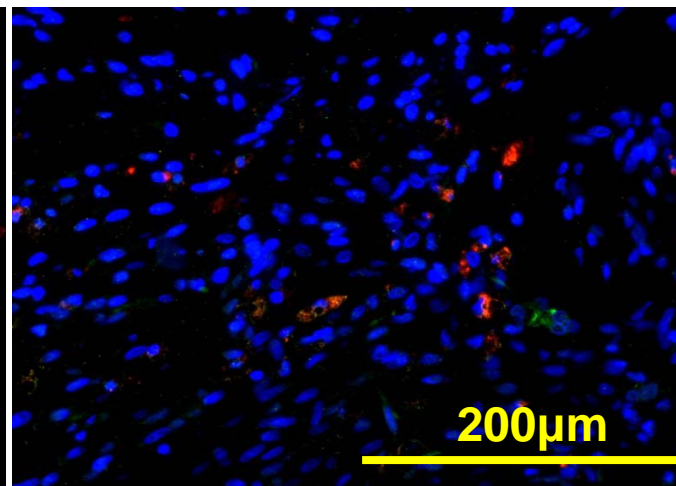
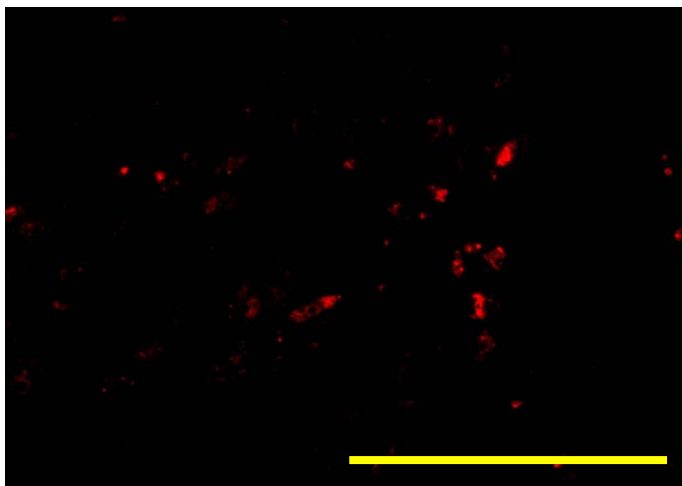
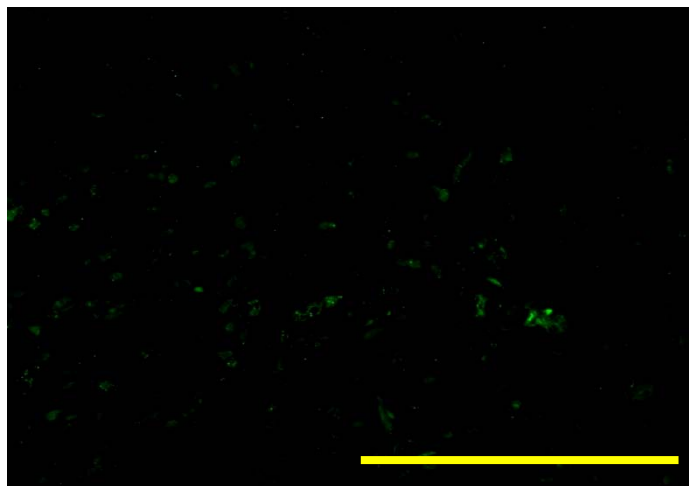
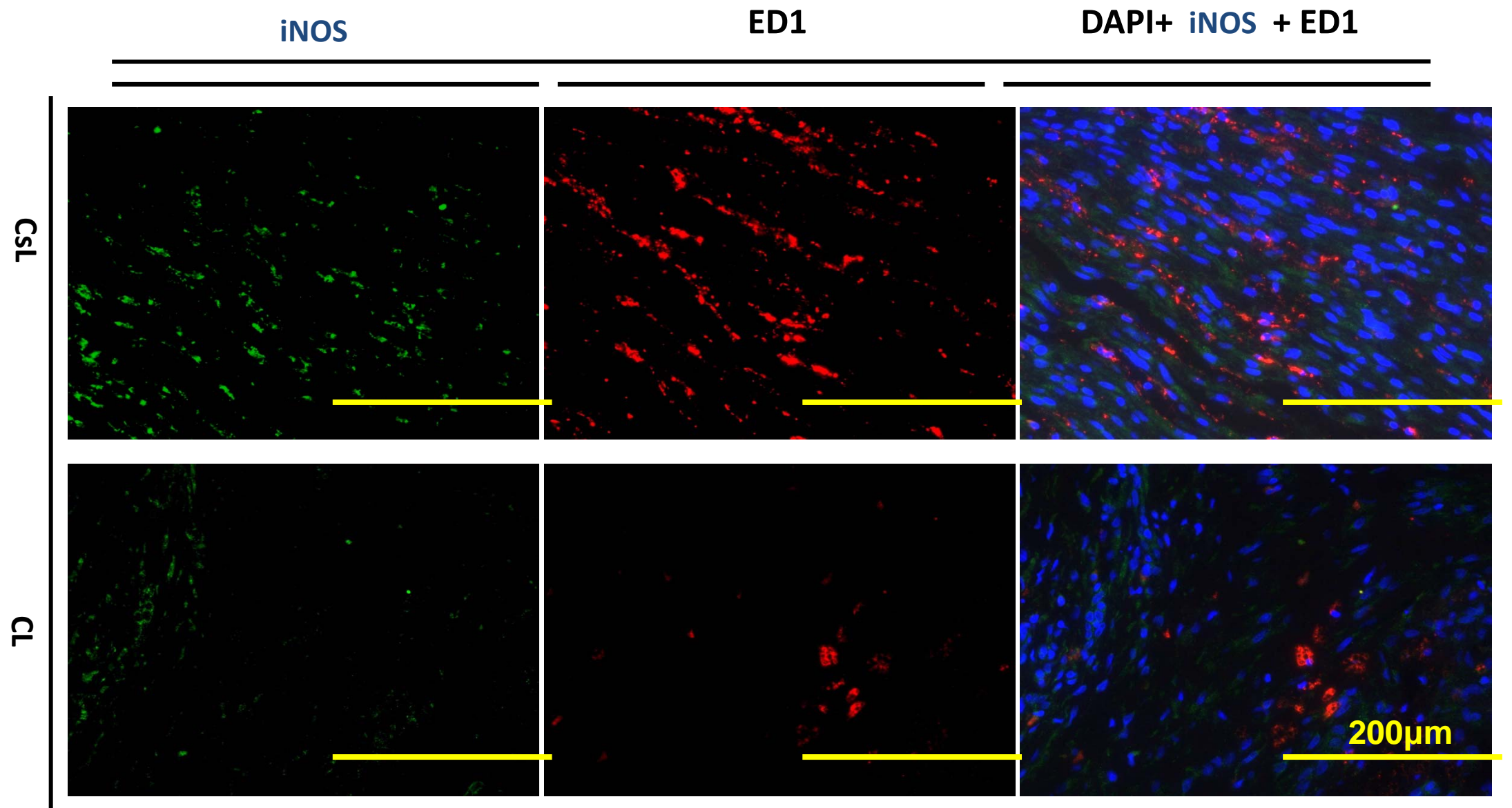


Figure 27. The examples in CsL and CL group by iNOS, ED1 double immunofluorescent staining.

**A. 1 week**



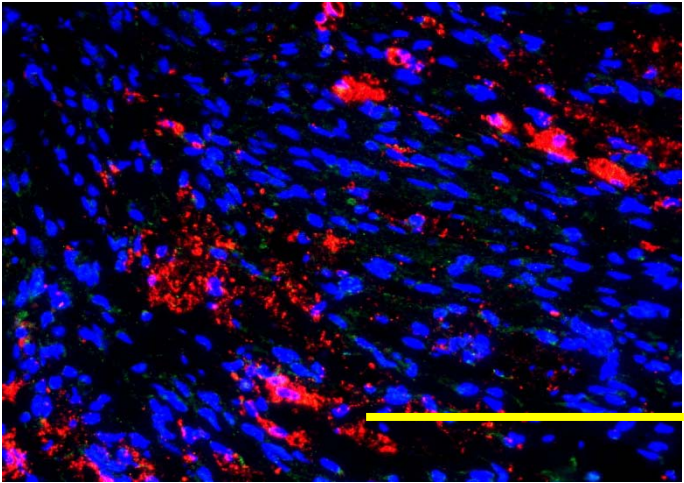
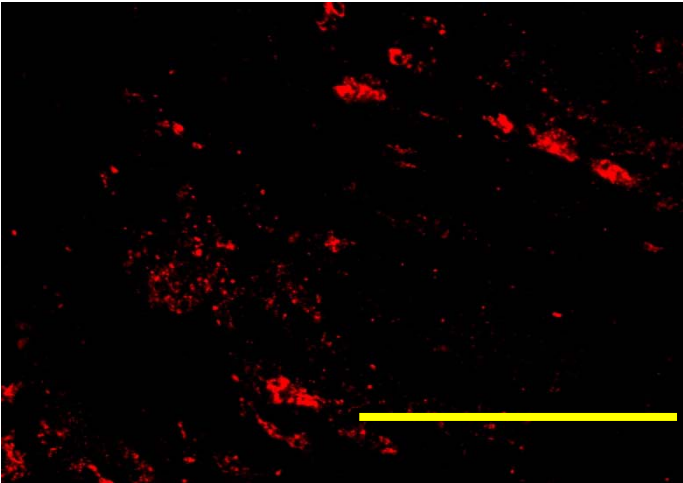
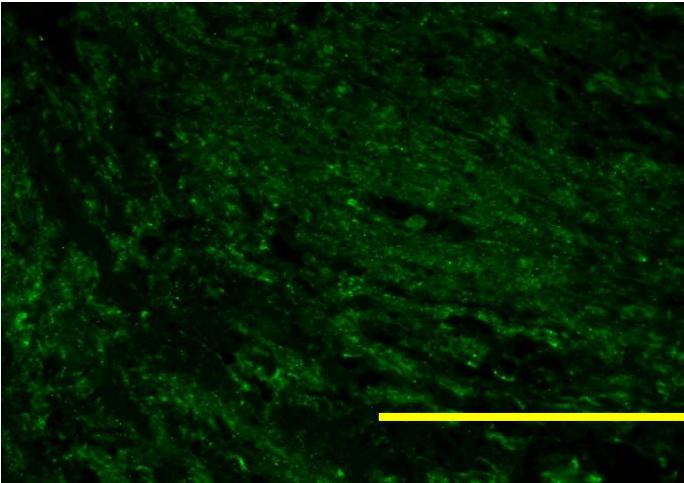
B. 2-week treatment

iNOS

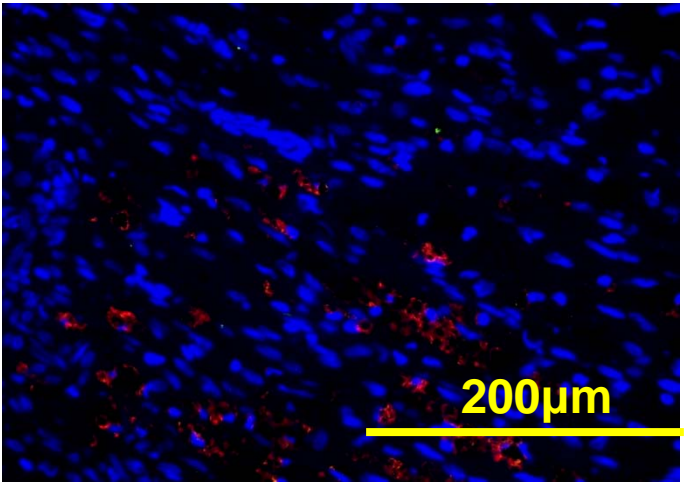
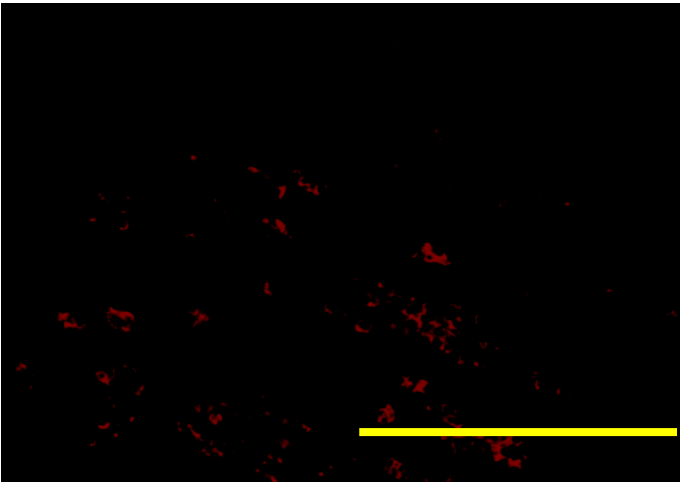
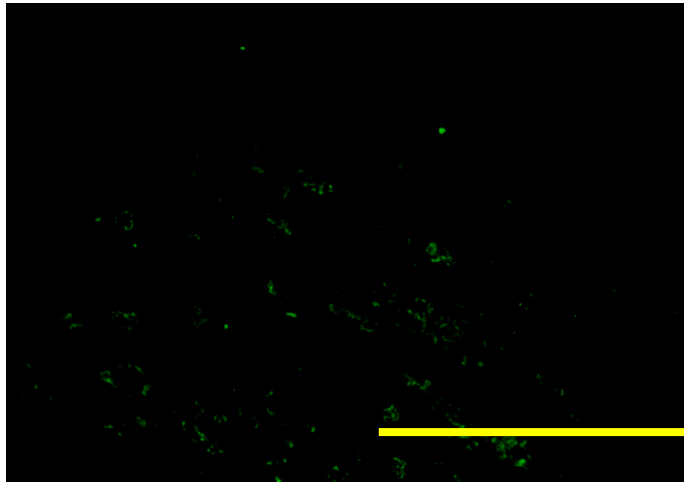
ED1

DAPI+ iNOS + ED1

CSL



CL





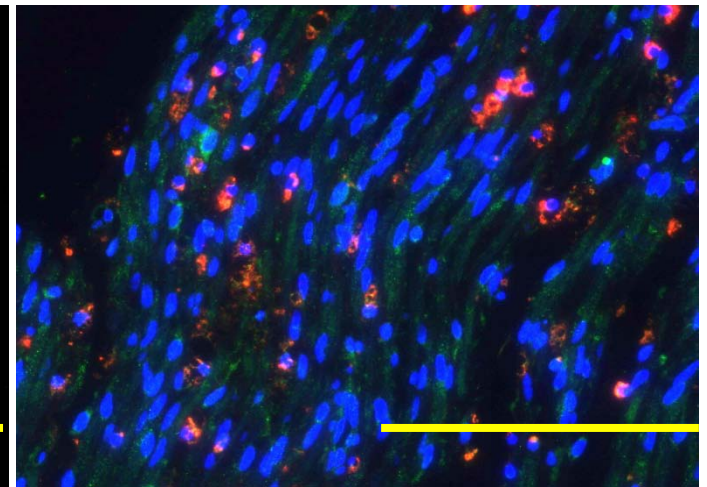
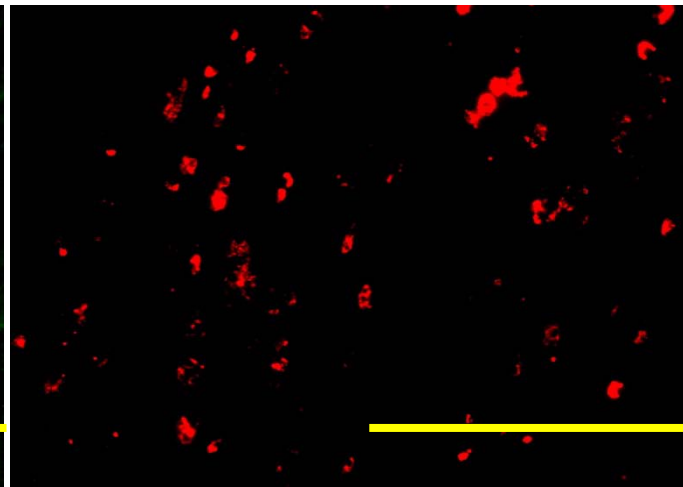
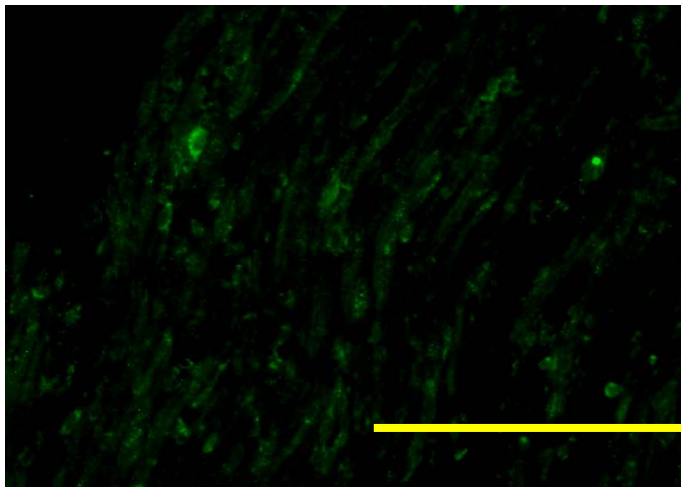
### C. 3-week treatment

iNOS

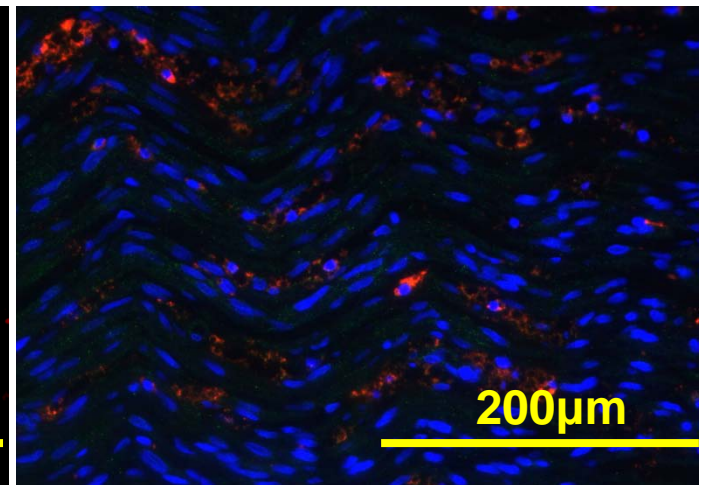
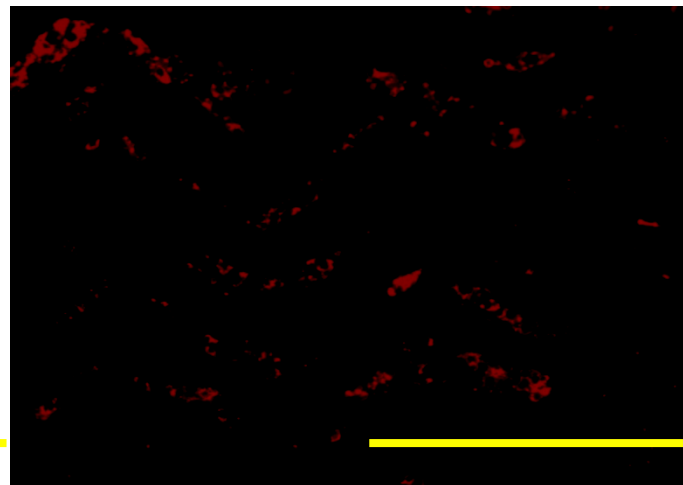
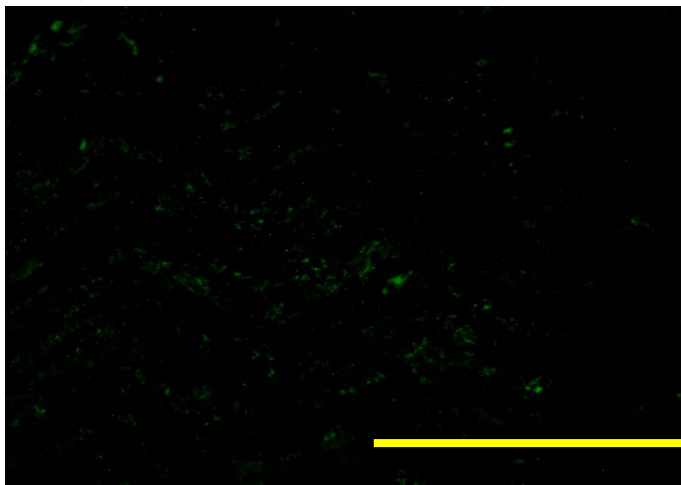
ED1

DAPI+ iNOS + ED1

CSL



CL



## 伍、討論

### 一、 LLLT 對於 CCI 的神經病理性疼痛有改善效果

藉由疼痛行為測試發現，當利用 von Frey filament 機械性感覺刺激儀器，去刺激 CCI 大鼠患側肢的腳底板，位置接近外側兩趾(約靠近脛神經和腓神經的地方)，發現大鼠在經過 CCI 手術後及術後七天，疼痛閾值顯著比術前下降，此結果顯示 CCI 手術可誘發疼痛閾值下降，證明我們建立的 CCI 動物模式符合神經病理性疼痛的症狀表現(Bennett, 1988; Klass et al., 2005; Wang et al., 2010)。在介入 LLLT 治療後(不論一週、兩週或三週的治療)，疼痛閾值均顯著的上升；顯示 LLLT 對於可增加機械性痛覺刺激的閾值來降低疼痛的敏感性。本研究結果與其他學者提出的 LLLT 改善關節炎及肌肉疼痛的結果相似，LLLT 可以降低神經損傷引起的神經病理性疼痛(Albertini et al., 2007b; Rizzi et al., 2006)。

### 二、 LLLT 對於 CCI 的功能性恢復有正向的助益

在 CCI 手術後，大鼠的行走動作可能會因為發炎引起的疼痛而受到影響(Cobianchi, 2010; Jou et al., 2004)。本實驗利用 SFI、TFI、PFI 及 SSI 功能性運動測試，觀察動物的坐骨神經功能。結果顯示大鼠的 SFI、TFI、PFI 及 SSI 在手術後及術後七天顯著的下降；介入 LLLT(不論一週、兩週或三週的治療)，SFI、TFI、PFI 及 SSI 的指數比無治療組(CsL)有顯著的回復現象。由此結果可推論，LLLT 可能可以經由降低動物的疼痛來促進功能性恢復。許多學者已經提出 LLLT 可以促進神經再生(nerve regeneration) (Chen, 2005; Rochkind et al., 2007)。這些結果可作為本實驗結果的依據。另外，加上本實驗 NGF、VEGF 及 BDNF 的分生結果，證明了 LLLT 可促進神經修復來達到功能性恢復的效果。

### 三、LLLT 可以降低 CCI 所誘發的發炎反應

許多學者已經證實周邊神經損傷所造成的瓦勒氏退化(Wallerian degeneration)，亦會造成免疫細胞的活化，誘發發炎因子TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 和IL-6的產生(Lee, 2009; Shamash, 2002)。在神經損傷的狀況下，TNF- $\alpha$ 與IL-1 $\beta$ 的增加會促進巨噬細胞對受損神經髓鞘的吞噬反應，加速神經組織的退化或壞死反應(Allan, 2000; Simi, 2007; Spulber, 2010)。本實驗利用ELISA分析CCI神經組織中TNF- $\alpha$ 和IL-1 $\beta$ 的表現量，結果顯示相較於sCCI的組別，CCI手術後的TNF- $\alpha$ 和IL-1 $\beta$ 的表現量有顯著上升。介入LLLT後(不論一週、兩週和三週)，TNF- $\alpha$ 和IL-1 $\beta$ 表現量顯著下降。以往的研究指出在肌肉發炎或是關節炎的動物模式中，經過LLLT治療後可以有效的降低TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6和IL-8的表現量，達到降低發炎的效果(Yamaura, 2009)此外，TNF- $\alpha$ 和IL-1 $\beta$ 除了會調控神經組織缺血及發炎，也參與神經病變的神經病理性疼痛發展過程(Lee, 2009; Sommer, 1999)。因此，本實驗結果與前述的研究結果相仿:LLLT可以降低神經損傷引起的TNF- $\alpha$ 和IL-1 $\beta$ 的表現量，加上本實驗形態學分析的結果(H&E, ED1 immunohistochemistry)顯示巨噬細胞亦因LLLT治療後而減少，我們推測LLLT可藉由改善發炎現象達到降低疼痛的效果。

### 四、LLLT 可降低 CCI 誘發的 HIF-1 $\alpha$ 、ED1、iNOS、COX-2 和 p53 堆積現象

#### 1. LLLT 降低 CCI 誘發的 HIF-1 $\alpha$ 堆積現象

HIF-1 $\alpha$  是一種轉錄因子，在缺氧、低氧及發炎環境下會被誘發(Webb et al., 2009)，除此之外，它也會誘發其他相關的下游轉錄因子，參與調控體內生理機制(Weidemann and Johnson, 2008)。研究指出在發炎的環境下，HIF-1 $\alpha$  會被誘發產生，藉以活化免疫細胞(如：巨噬細胞)(Zinkernagel et al., 2007)及相關因子(i-NOS 和 NF $\kappa$ B)來調控發炎的反應 (Bonello et al., 2007; Oliver et al., 2009)，但是當 HIF-1 $\alpha$  大量的堆積在細胞體時，可能會造成組織細胞的死亡(Guo et al., 2001; Halterman, 1999; Wincewicz et al., 2007)。因此，HIF-1 $\alpha$  在發炎的組織細胞中參予

了重要的角色(Cramer, 2003) ,但是目前在周邊神經損傷上, HIF-1 $\alpha$  參予的作用還尚未明確。本實驗的組織病理型態學和分生學結果顯示: 在 CCI 後引起的 HIF-1 $\alpha$  大量堆積現象, 在介入 LLLT 治療後, 神經組織及巨噬細胞上的 HIF-1 $\alpha$  的表現量有顯著降低。因此, 可以推測 LLLT 可降低 HIF-1 $\alpha$  大量堆積現象, 降低神經損傷的發炎反應。

## 2. LLLT 降低 CCI 誘發的 ED1 堆積現象

發炎(inflammation)是人體正常的免疫作用和防禦反應, 是為了對抗外來的病原菌而產生的保護機制, 所以當慢性發炎產生時, 大量的免疫細胞會被徵召至受傷的組織上, 如: 巨噬細胞(Dehne and Brüne, 2009)。ED1 是巨噬細胞的生物性指標。經由本實驗神經組織中的 ED1 免疫組織化學染色結果顯示: , LLLT 可以降低 CCI 誘發的 ED1 表現量; 進一步在 HIF-1 $\alpha$  與 ED1 雙抗體免疫螢光染色的中也顯示: 巨噬細胞中的 HIF-1 $\alpha$  表現量也會因 LLLT 的介入而降低。因此, 可以推測 LLLT 可降低 CCI 所誘發的 ED1 大量堆積, 降低神經損傷的發炎反應。此部分結果與本實驗中促發炎因子 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  的結果相符。

## 3. LLLT 降低 CCI 誘發的 iNOS, COX-2, p53 堆積現象

在神經損傷的情況下, iNOS(Serbina, 2003)、COX-2(Durrenberger, 2004; Surh, 2001), 和 p53(Halterman, 1999; Liang et al., 2009; Mawrin et al., 2002)會被誘發產生, 而這些因子與 HIF-1 $\alpha$  之間也會有互相的影響(Dehne and Brüne, 2009; Palmer et al., 1998; Wincewicz et al., 2007)。研究指出在發炎的疾病中, 會活化及誘發 NOS 的表現, 並且產生 NO (Zoppo, 2000), 而 NO 會參與低氧誘發途徑(hypoxia-induced signaling), 進而促進 HIF-1 $\alpha$  的堆積(Brune, 2003)。加上, HIF-1 $\alpha$  也會參與 NOS 的轉錄過程(Brune, 2003), 所以, NOS 與 HIF-1 $\alpha$  有雙向的調控關係。而當 HIF-1 $\alpha$  大量堆積時, 也會增加 COX-2(Sarwat and Al-Salam, 2008)及 p53 的活化(Halterman, 1999)。

經由本實驗 iNOS、COX-2 和 p53 免疫組織化學染色及電泳結果顯示，CCI 神經組織中的表現量會大幅增加。在介入 LLLT 後，iNOS、COX-2 和 p53 的表現量有顯著下降；加上 iNOS 與 ED1 雙抗體免疫螢光染色的結果顯示，介入 LLLT 後，巨噬細胞中的 iNOS 表現量亦有降低的情形。這部分結果與其他學者的實驗結果相符(Albertini et al., 2007a; Lorenzini, 2010; Surh, 2001; Tuby et al., 2006)。因此，我們推測 LLLT 可能可以藉由降低 CCI 誘發的 iNOS、COX-2 和 p53 堆積，達到止痛及抗發炎效果。

##### 五、LLLT 可以促進 VEGF、NGF 及 BDNF 表現量和髓鞘再生

對於神經損傷的修復，生長因子扮演重要的角色。周邊神經系統的損傷後，VEGF 可以參與神經修復的重要角色(Schratzberger, 2000)。因神經發炎所產生的缺血與缺氧的狀況下，VEGF 被徵召誘發來促進血管新生的作用，以提供受損部位的養分需求，達到加速組織再生、修復的效果(Carmeliet, 2002; Murakami et al., 2006)。另外，NGF 和 BDNF 可以藉由促進神經出芽、再生來達到組織修復效果(Diamond, 1987, 1992; Sun et al., 2009; Vögelin et al., 2006)。在神經損傷、發炎狀況下，許旺細胞組成的神經髓鞘會有空泡及數目減少的情形，因此，髓鞘的增加對於促進神經的再生及神經功能性的回復是相當重要的(Golden et al., 2007; Magnaghi et al., 2009; Sulaiman and Gordon, 2009)。研究指出，LLLT 可以增加 NGF、BDNF、VEGF 及髓鞘的再生，來促進神經損傷的恢復(Maiya et al., 2005; Schwartz et al., 2002; Silva et al., 2010)。本實驗中 VEGF、NGF 和 BDNF 的免疫組織化學及電泳結果顯示：LLLT 介入後，可以促進神經組織中 VEGF、NGF 和 BDNF 的表現量。加上 S100(髓鞘細胞的生物指標) 免疫組織化學染色結果顯示：介入 LLLT 後，S100 表現量亦有顯著上升。本實驗結果與以往學者所提出的結果相符 (Maiya et al., 2005; Schwartz et al., 2002; Silva et al., 2010)。所以，經由此實驗結果配合 SFI、TFI、PFI 及 SSI 等坐骨神經功能指數的結果推測：LLLT 可以經由促進 VEGF、NGF 及 BDNF 的生成，來增加神經髓鞘的修復，達到功能性恢復的效果。

## 陸、綜合結論

本實驗結果顯示，在 CCI 神經損傷後，LLLT 可以降低 HIF-1 $\alpha$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、iNOS、COX-2、p53 及巨噬細胞的過度堆積，來達到減低神經性病理疼痛效果；並可促進生長因子 VEGF、NGF 和 BDNF 的表現量及促進神經髓鞘生成，來達到功能性恢復的效果。且 LLLT 對於這些發炎因子及生長因子的影響而言，並無劑量依賴性(dose-dependent)的效果。因此，本實驗推測 LLLT 可以經由調控 HIF-1 $\alpha$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、iNOS、COX-2、p53、VEGF、NGF 和 BDNF 來改善周邊神經病變所引起的發炎反應及神經痛，並促進神經功能性恢復。



## 柒、參考資料

- Agaiby, A.D. (2000). Laser modulation of angiogenic factor production by T-lymphocytes. *Lasers in Surgery and Medicine* 26, 357.
- Aimbire, F. (2005). Effect of LLLT Ga–Al–As (685 nm) on LPS-induced inflammation of the airway and lung in the rat. *Lasers in Medical Science* 20, 11.
- Albertini, R. (2007a). Anti-inflammatory effects of low-level laser therapy (LLLT) with two different red wavelengths (660 nm and 684 nm) in carrageenan-induced rat paw edema. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 89, 50.
- Albertini, R. (2007b). COX-2 mRNA expression decreases in the subplantar muscle of rat paw subjected to carrageenan-induced inflammation after low level laser therapy. *Inflammation Research* 56, 228.
- Albertini, R., Aimbire, F., Villaverde, A.B., Silva, J.A., and Costa, M.S. (2007). COX-2 mRNA expression decreases in the subplantar muscle of rat paw subjected to carrageenan-induced inflammation after low level laser therapy. *Inflammation Research* 56, 228-229.
- Allan, S.M. (2000). The Role of Pro-and Antiinflammatory Cytokines in Neurodegeneration. *Annals of the New York Academy of Sciences* 917, 84.
- Allan, S.M., and Rothwell, N.J. (2003). Inflammation in central nervous system injury. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 358, 1669-1677.
- Amaya, F., Samad, T.A., Barrett, L., Broom, D.C., and Woolf, C.J. (2009). Periganglionic inflammation elicits a distally radiating pain hypersensitivity by promoting COX-2 induction in the dorsal root ganglion. *Pain* 142, 59-67.
- Baxter, G.D. (1991). Low level laser therapy: Current clinical practice in Northern Ireland. *Physiotherapy* 77, 171.
- Bennett, G.J. (1988). A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 33, 87.
- Bonello, S., Zahringer, C., BelAiba, R.S., Djordjevic, T., Hess, J., Michiels, C., Kietzmann, T., and Gorlach, A. (2007). Reactive Oxygen Species Activate the HIF-1 Promoter Via a Functional NF B Site. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 27, 755-761.
- Bortone, F. (2008). Low level laser therapy modulates kinin receptors mRNA expression in the subplantar muscle of rat paw subjected to carrageenan-induced inflammation. *International Immunopharmacology* 8, 206.
- Brune, B. (2003). The role of nitric oxide (NO) in stability regulation of hypoxia inducible factor-1alpha (HIF-1alpha). *Current Medicinal Chemistry* 10, 845.
- Cai, D. (2009). NFκB-mediated metabolic inflammation in peripheral tissues

versus central nervous system. *Cell Cycle* 8, 2542.

Calza, L. (2001). Nerve growth factor control of neuronal expression of angiogenic and vasoactive factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98, 4160-4165.

Carmeliet, P., and Storkebaum, E. (2002). Vascular and neuronal effects of VEGF in the nervous system: implications for neurological disorders. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 13, 39-53.

Chavez, J.C. (2005). Transient expression of hypoxia-inducible factor-1 alpha and target genes in peripheral nerves from diabetic rats. *Neuroscience Letters* 374, 179.

Chen, C.H. (2008). Low-Energy laser irradiation increases endothelial cell proliferation, migration, and eNOS gene expression possibly via PI3K signal pathway. *Lasers in Surgery and Medicine* 40, 46.

Chen, Y.S. (2005). Effect of low-power pulsed laser on peripheral nerve regeneration in rats. *Microsurgery* 25, 83.

Choi, D.W. (1993). Nitric oxide: foe or friend to the injured brain? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 9741.

Choi, S.-H., Aid, S., and Bosetti, F. (2009). The distinct roles of cyclooxygenase-1 and -2 in neuroinflammation: implications for translational research. *Trends in Pharmacological Sciences* 30, 174-181.

Cobianchi, S. (2010). Short-but not long-lasting treadmill running reduces allodynia and improves functional recovery after peripheral nerve injury. *Neuroscience* 168, 273.

Cramer, T. (2003). HIF-1 [alpha] is essential for myeloid cell-mediated inflammation. *Cell* 112, 645.

De Alba, J., Clayton, N.M., Collins, S.D., Colthup, P., Chessell, I., and Knowles, R.G. (2006). GW274150, a novel and highly selective inhibitor of the inducible isoform of nitric oxide synthase (iNOS), shows analgesic effects in rat models of inflammatory and neuropathic pain. *Pain* 120, 170-181.

Dehne, N., and Brüne, B. (2009). HIF-1 in the inflammatory microenvironment. *Experimental Cell Research* 315, 1791-1797.

Diamond, J. (1987). Evidence that endogenous beta nerve growth factor is responsible for the collateral sprouting, but not the regeneration, of nociceptive axons in adult rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84, 6596.

Diamond, J. (1992). Endogenous NGF and nerve impulses regulate the collateral sprouting of sensory axons in the skin of the adult rat. *Journal of Neuroscience* 12, 1454.

Durrenberger, P.F. (2004). Cyclooxygenase-2 (Cox-2) in injured human nerve and



a rat model of nerve injury. *Journal of the Peripheral Nervous System* 9, 15.

Durrenberger, P.F., Paul, F., Maria, A.C., Yiangos, Y., Roy, A.G., and Iain, P.C. (2006). Prostanoid receptor EP1 and Cox-2 in injured human nerves and a rat model of nerve injury: a time-course study. *BMC Neurology* 6.

Eberhardt, K.A., Irintchev, A., Al-Majed, A.A., Simova, O., Brushart, T.M., Gordon, T., and Schachner, M. (2006). BDNF/TrkB signaling regulates HNK-1 carbohydrate expression in regenerating motor nerves and promotes functional recovery after peripheral nerve repair. *Experimental Neurology* 198, 500-510.

Eun, B., Cho, B., Moon, Y., Kim, S.Y., Kim, K., Kim, H., and Sun, W. (2010). Induction of neuronal apoptosis by expression of Hes6 via p53-dependent pathway. *Brain Research* 1313, 1-8.

Fillipin, L.I. (2005). Low-level laser therapy (LLLT) prevents oxidative stress and reduces fibrosis in rat traumatized Achilles tendon. *Lasers in Surgery and Medicine* 37, 293.

Fraisl, P., Aragonés, J., and Carmeliet, P. (2009). Inhibition of oxygen sensors as a therapeutic strategy for ischaemic and inflammatory disease. *Nature Reviews Drug Discovery* 8, 139-152.

Geremia, N.M. (2010). Endogenous BDNF regulates induction of intrinsic neuronal growth programs in injured sensory neurons. *Experimental Neurology* 223, 128.

Gilron, I. (2006). Neuropathic pain: a practical guide for the clinician. *Canadian Medical Association Journal* 175, 265.

Giuliani, A., Lorenzini, L., Gallamini, M., Massella, A., Giardino, L., and Calzà, L. (2009). Low infra red laser light irradiation on cultured neural cells: effects on mitochondria and cell viability after oxidative stress. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 9, 8.

Golbar, H.M., Izawa, T., Yano, R., Ichikawa, C., Sawamoto, O., Kuwamura, M., Lamarre, J., and Yamate, J. (2011). Immunohistochemical Characterization of Macrophages and Myofibroblasts in  $\alpha$ -Naphthylisothiocyanate (ANIT)-Induced Bile Duct Injury and Subsequent Fibrogenesis in Rats. *Toxicol Pathol.*

Golden, K.L., Pearse, D.D., Blits, B., Garg, M.S., Oudega, M., Wood, P.M., and Bunge, M.B. (2007). Transduced Schwann cells promote axon growth and myelination after spinal cord injury. *Experimental Neurology* 207, 203-217.

Greijer, A.E. (2004). The role of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) in hypoxia induced apoptosis. *Journal of Clinical Pathology* 57, 1009-1014.

Guo, K., Searfoss, G., Krolikowski, D., Pagnoni, M., Franks, C., and Clark, K. (2001). Hypoxia induces the expression of the pro-apoptotic gene BNIP3. *Cell Death and Differentiation* 8, 367-376.

Hagiwara, S. (2008). Pre-irradiation of blood by gallium aluminum arsenide (830 nm) low-level laser enhances peripheral endogenous opioid analgesia in rats. *Anesthesia and Analgesia* 107, 1058.

Halterman, M.W. (1999). HIF-1 [alpha] and p53 promote hypoxia-induced delayed neuronal death in models of CNS ischemia. *Experimental Neurology* 159, 65.

Hare, G.M.T. (1992). Walking track analysis: a long-term assessment of peripheral nerve recovery. *Plastic and Reconstructive Surgery* 89, 251.

Hashimoto, M., Ishii, K., Nakamura, Y., Watabe, K., Kohsaka, S., and Akazawa, C. (2008). Neuroprotective effect of sonic hedgehog up-regulated in Schwann cells following sciatic nerve injury. *Journal of Neurochemistry*.

Hawkins, D. (2005). Low level laser therapy (LLLT) as an effective therapeutic modality for delayed wound healing. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1056, 486.

Herradon, G., Ezquerro, L., Nguyen, T., Wang, C., Siso, A., Franklin, B., Dilorenzo, L., Rossenfeld, J., Alguacil, L.F., and Silos-Santiago, I. (2007). Changes in BDNF gene expression correlate with rat strain differences in neuropathic pain. *Neuroscience Letters* 420, 273-276.

Holtkamp, N. (2007). MMP-13 and p53 in the progression of malignant peripheral nerve sheath tumors. *Neoplasia* 9, 671.

Honma, H. (2004). Hypoxia-induced apoptosis of dorsal root ganglion neurons is associated with DNA damage recognition and cell cycle disruption in rats. *Neuroscience Letters* 354, 95-98.

Ignatowski, T.A. (1999). Brain-derived TNF [alpha] mediates neuropathic pain. *Brain Research* 841, 70.

Jaggi, A.S., Jain, V., and Singh, N. (2011). Animal models of neuropathic pain. *Fundamental & Clinical Pharmacology* 25, 1-28.

Jou, I.M., Chang, P.J., Wu, H.H., Wang, P.J., Chu, K.S., Lin, R.M., and Tsai, Y.C. (2004). A long-term analysis of the spinal somatosensory evoked potential of rats with sciatic constriction injury. *Acta Anaesthesiol Taiwan* 42, 69-76.

Khajavi, M., and Lupski, J.R. (2008). Balancing between Adaptive and Maladaptive Cellular Stress Responses in Peripheral Neuropathy. *Neuron* 57, 329-330.

Kirchmair, R., Tietz, A.B., Panagiotou, E., Walter, D.H., Silver, M., Yoon, Y.-S., Schratzberger, P., Weber, A., Kusano, K., Weinberg, D.H., *et al.* (2007). Therapeutic Angiogenesis Inhibits or Rescues Chemotherapy-induced Peripheral Neuropathy: Taxol- and Thalidomide-induced Injury of Vasa Nervorum is Ameliorated by VEGF. *Molecular Therapy* 15, 69-75.

Klass, M., Hord, A., Wilcox, M., Denson, D., and Csete, M. (2005). A Role for

Endothelin in Neuropathic Pain After Chronic Constriction Injury of the Sciatic Nerve. *Anesthesia & Analgesia*, 1757-1762.

Labuda, C., Koblisch, M., Tuthill, P., Dolle, R., and Little, P. (2006). Antinociceptive activity of the selective iNOS inhibitor AR-C102222 in rodent models of inflammatory, neuropathic and post-operative pain. *European Journal of Pain* 10, 505-512.

Lee, K.M. (2009). Tumor necrosis factor receptor 1 induces interleukin-6 upregulation through NF-kappaB in a rat neuropathic pain model. *European Journal of Pain* 13, 794.

Leung, L. TNF-alpha and neuropathic pain-a review. *Journal of Neuroinflammation* 7, 27.

Li, B.C., Chen, J.M., Chu, Y.F., and Chen, J. (2010). Synergistic effects of NGF, CNTF and GDNF on functional recovery following sciatic nerve injury in rats. *Advances in Medical Sciences* 55, 32-42.

Liang, J., Parchaliuk, D., Medina, S., Sorensen, G., Landry, L., Huang, S., Wang, M., Kong, Q., and Booth, S.A. (2009). Activation of p53-regulated pro-apoptotic signaling pathways in PrP-mediated myopathy. *BMC Genomics* 10, 201.

Liang, W., Han, Q., Jin, W., Xiao, Z., Huang, J., Ni, H., Chen, B., Kong, J., Wu, J., and Dai, J. (2010). The promotion of neurological recovery in the rat spinal cord crushed injury model by collagen-binding BDNF. *Biomaterials* 31, 8634-8641.

Lin, J., Li, G., Den, X., Xu, C., Liu, S., Gao, Y., Liu, H., Zhang, J., Li, X., and Liang, S. (2010). VEGF and its receptor-2 involved in neuropathic pain transmission mediated by P2X2/3 receptor of primary sensory neurons. *Brain Research Bulletin* 83, 284-291.

Lorenzini, L., Giuliani, A., Giardino, L., and Calzà, L. (2010). Laser acupuncture for acute inflammatory, visceral and neuropathic pain relief: An experimental study in the laboratory rat. *Research in Veterinary Science* 88, 159-165.

Ma, W. (2003). Intraplantar injection of a cyclooxygenase inhibitor ketorolac reduces immunoreactivities of substance p, calcitonin gene-related peptide, and dynorphin in the dorsal horn of rats with nerve injury or inflammation. *Neuroscience* 121, 681-690.

Ma, W. (2008). Does COX2-dependent PGE2 play a role in neuropathic pain? *Neuroscience Letters* 437, 165.

Ma, W., and Quirion, R. (2008). Does COX2-dependent PGE2 play a role in neuropathic pain? *Neuroscience Letters* 437, 165-169.

MacNaul, K.L. (1993). Differential expression of iNOS and cNOS mRNA in human vascular smooth muscle cells and endothelial cells under normal and inflammatory conditions. *Biochemical and Biophysical Research Communications*

196, 1330.

Magnaghi, V., Procacci, P., and Tata, A.M. (2009). Chapter 15 Novel Pharmacological Approaches to Schwann Cells as Neuroprotective Agents for Peripheral Nerve Regeneration. *87*, 295-315.

Maiya, G.A., Kumar, P., and Rao, L. (2005). Effect of low intensity helium-neon (He-Ne) laser irradiation on diabetic wound healing dynamics. *Photomed Laser Surg* *23*, 187-190.

Manolescu, B., Oprea, E., Busu, C., and Cercasov, C. (2009). Natural compounds and the hypoxia-inducible factor (HIF) signalling pathway. *Biochimie* *91*, 1347-1358.

Marcol, W., Kotulska, K., Larysz-Brysz, M., and Kowalik, J.L. (2007). BDNF contributes to animal model neuropathic pain after peripheral nerve transection. *Neurosurgical Review* *30*, 235-243.

Martucci, C., Trovato, A., Costa, B., Borsani, E., Franchi, S., Magnaghi, V., Panerai, A., Rodella, L., Valsecchi, A., and Sacerdote, P. (2008). The purinergic antagonist PPADS reduces pain related behaviours and interleukin-1 $\beta$ , interleukin-6, iNOS and nNOS overproduction in central and peripheral nervous system after peripheral neuropathy in mice. *Pain* *137*, 81-95.

Matsui, T., Nakata, N., Nagai, S., Nakatani, A., Takahashi, M., Momose, T., Ohtomo, K., and Koyasu, S. (2009). Inflammatory Cytokines and Hypoxia Contribute to 18F-FDG Uptake by Cells Involved in Pannus Formation in Rheumatoid Arthritis. *Journal of Nuclear Medicine* *50*, 920-926.

Mawrin, C., Kirches, E., Boltze, C., Dietzmann, K., Roessner, A., and Schneider-Stock, R. (2002). Immunohistochemical and molecular analysis of p53, RB, and PTEN in malignant peripheral nerve sheath tumors. *Virchows Archiv* *440*, 610-615.

Murakami, T., Arai, M., Sunada, Y., and Nakamura, A. (2006). VEGF 164 gene transfer by electroporation improves diabetic sensory neuropathy in mice. *The Journal of Gene Medicine* *8*, 773-781.

Naik, A., Tandan, S., Kumar, D., and Dudhgaonkar, S. (2006). Nitric oxide and its modulators in chronic constriction injury-induced neuropathic pain in rats. *European Journal of Pharmacology* *530*, 59-69.

Norman, G.J., Karelina, K., Zhang, N., Walton, J.C., Morris, J.S., and DeVries, A.C. (2009). Stress and IL-1 $\beta$  contribute to the development of depressive-like behavior following peripheral nerve injury. *Molecular Psychiatry* *15*, 404-414.

Obata, K. (2004). Differential activation of MAPK in injured and uninjured DRG neurons following chronic constriction injury of the sciatic nerve in rats. *European Journal of Neuroscience* *20*, 2881.

Obata, K., and Noguchi, K. (2006). BDNF in sensory neurons and chronic pain.

Neuroscience Research 55, 1-10.

Oka, N., Kawasaki, T., Mizutani, K., Sugiyama, H., and Akiguchi, I. (2007). Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  may be a marker for vasculitic neuropathy. *Neuropathology* 27, 509-515.

Oliver, K.M., Taylor, C.T., and Cummins, E.P. (2009). Hypoxia. Regulation of NF $\kappa$ B signalling during inflammation: the role of hydroxylases. *Arthritis Research & Therapy* 11, 215.

Olson, N., and van der Vliet, A. Interactions between nitric oxide and hypoxia-inducible factor signaling pathways in inflammatory disease. *Nitric Oxide In Press, Corrected Proof*.

Palmer, L.A., Semenza, G.L., Stoler, M.H., and Johns, R.A. (1998). Hypoxia induces type II NOS gene expression in pulmonary artery endothelial cells via HIF-1. *Am J Physiol* 274, L212-219.

Papandreou, I., Cairns, R.A., Fontana, L., Lim, A.L., and Denko, N.C. (2006). HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metabolism* 3, 187-197.

Richard, D.E. (2000). Non-hypoxic pathway mediates the induction of hypoxia inducible factor 1 alpha (HIF-1 alpha) in vascular smooth muscle cells. *Journal of Biological Chemistry*.

Rizzi, C.F., Mauriz, J.L., Freitas Corrêa, D.S., Moreira, A.J., Zettler, C.G., Filippin, L.I., Marroni, N.P., and González-Gallego, J. (2006). Effects of low-level laser therapy (LLLT) on the nuclear factor (NF)- $\kappa$ B signaling pathway in traumatized muscle. *Lasers in Surgery and Medicine* 38, 704-713.

Rochkind, S., Leider-Trejo, L., Nissan, M., Shamir, M.H., Kharenko, O., and Alon, M. (2007). Efficacy of 780-nm Laser Phototherapy on Peripheral Nerve Regeneration after Neurotube Reconstruction Procedure (Double-Blind Randomized Study). *Photomedicine and Laser Surgery* 25, 137-143.

Kafousi, M., Vrekoussis, T., Tsenteliero, E., Pavlakis, K., Navrozoglou, I., Dousias, V., Sanidas, E., Tsiftsis, D., Georgoulas, V., and Stathopoulos, E.N. (2011). Immunohistochemical Study of the Angiogenic Network of VEGF, HIF1 $\alpha$ , VEGFR-2 and Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS) in Human Breast Cancer. *Pathol Oncol Res*.

Kopinova, J., Puzserova, A., and Bernatova, I. (2011). Biochemical aspects of nitric oxide synthase feedback regulation by nitric oxide. *Interdiscip Toxicol* 4, 63-68.

P.K., Langone, F., Lora, S., Melo, P.A., Borojevic, R., *et al.* (2011). Enhancement of sciatic-nerve regeneration after VEGF gene therapy. *Neuropathol Appl Neurobiol*.

Sabsovich, I., Guo, T.-Z., Wei, T., Zhao, R., Li, X., Clark, D.J., Geis, C., Sommer, C., and Kingery, W.S. (2008). TNF signaling contributes to the development of

nociceptive sensitization in a tibia fracture model of complex regional pain syndrome type I. *Pain* 137, 507-519.

Sarwat, A.M., and Al-Salam, S. (2008). Expression of HIF-1, galectin-3, cox-2 and Wilms tumor-1 protein in multiple schwannomas of the conus medullaris. *Journal of Neuro-Oncology* 92, 111-115.

Sato, C., Sakai, A., Ikeda, Y., Suzuki, H., and Sakamoto, A. (2008). The Prolonged Analgesic Effect of Epidural Ropivacaine in a Rat Model of Neuropathic Pain. *Anesthesia & Analgesia* 106, 313-320.

Schratzberger, P. (2000). Favorable effect of VEGF gene transfer on ischemic peripheral neuropathy. *Nature Medicine* 6, 405.

Schwartz, F., Brodie, C., Appel, E., Kazimirsky, G., and Shainberg, A. (2002). Effect of helium/neon laser irradiation on nerve growth factor synthesis and secretion in skeletal muscle cultures. *J Photochem Photobiol B* 66, 195-200.

Semra, Y.K., Sherif, S., and Lincoln, J. (2009). NGF protects paravertebral but not prevertebral sympathetic neurons against exposure to high glucose in vitro. *Brain Research* 1285, 164-173.

Serbina, N.V. (2003). TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection. *Immunity* 19, 59.

Shamash, S. (2002). The cytokine network of Wallerian degeneration: tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-1 $\alpha$ , and interleukin-1 $\beta$ . *Journal of Neuroscience* 22, 3052.

Silva, T.C., Oliveira, T.M., Sakai, V.T., Dionisio, T.J., Santos, C.F., Bagnato, V.S., and Machado, M.A. (2010). In vivo effects on the expression of vascular endothelial growth factor-A165 messenger ribonucleic acid of an infrared diode laser associated or not with a visible red diode laser. *Photomed Laser Surg* 28, 63-68.

Simi, A. (2007). Interleukin-1 and inflammatory neurodegeneration. *Biochemical Society Transactions* 35, 1122.

Smeyne, R.J., Klein, R., Schnapp, A., Long, L.K., Bryant, S., Lewin, A., Lira, S.A., and Barbacid, M. (1994). Severe sensory and sympathetic neuropathies in mice carrying a disrupted Trk/NGF receptor gene. *Nature* 368, 246-249.

Sommer, C. (1999). Neutralizing antibodies to interleukin 1-receptor reduce pain associated behavior in mice with experimental neuropathy. *Neuroscience Letters* 270, 25.

Spulber, S. (2010). Connection between inflammatory processes and transmitter function--Modulatory effects of interleukin-1. *Progress in Neurobiology* 90, 256.

Spulber, S., and Schultzberg, M. (2010). Connection between inflammatory processes and transmitter function—Modulatory effects of interleukin-1. *Progress in Neurobiology* 90, 256-262.

Stroka, D.M. (2001). HIF-1 is expressed in normoxic tissue and displays an organ-specific regulation under systemic hypoxia. *FASEB Journal* 15, 2445.

Sulaiman, O.A.R., and Gordon, T. (2009). Role of Chronic Schwann Cell Denervation in Poor Functional Recovery after Nerve Injuries and Experimental Strategies to Combat It. *Neurosurgery* 65, A105-A114.

Sun, W., Sun, C., Lin, H., Zhao, H., Wang, J., Ma, H., Chen, B., Xiao, Z., and Dai, J. (2009). The effect of collagen-binding NGF- $\beta$  on the promotion of sciatic nerve regeneration in a rat sciatic nerve crush injury model. *Biomaterials* 30, 4649-4656.

Surh, Y.J. (2001). Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF- $\kappa$ B activation. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 480, 243.

Suyama, H. (2004). Effect of etodolac, a COX-2 inhibitor, on neuropathic pain in a rat model. *Brain Research* 1010, 144-150.

Tang, K. (2004). HIF and VEGF relationships in response to hypoxia and sciatic nerve stimulation in rat gastrocnemius. *Respiratory Physiology & Neurobiology* 144, 71-80.

Tavakkoly-Bazzaz, J., Amoli, M.M., Pravica, V., Chandrasegaran, R., Boulton, A.J.M., Larijani, B., and Hutchinson, I.V. (2010). VEGF gene polymorphism association with diabetic neuropathy. *Molecular Biology Reports* 37, 3625-3630.

Taylor, C.T. (2008). Interdependent roles for hypoxia inducible factor and nuclear factor- $\kappa$ B in hypoxic inflammation. *The Journal of Physiology* 586, 4055-4059.

Tuby, H., Maltz, L., and Oron, U. (2006). Modulations of VEGF and iNOS in the rat heart by low level laser therapy are associated with cardioprotection and enhanced angiogenesis. *Lasers in Surgery and Medicine* 38, 682-688.

Valsecchi, A.E., Franchi, S., Panerai, A.E., Rossi, A., Sacerdote, P., and Colleoni, M. (2011). The soy isoflavone genistein reverses oxidative and inflammatory state, neuropathic pain, neurotrophic and vasculature deficits in diabetes mouse model. *European Journal of Pharmacology* 650, 694-702.

Vangeison, G. (2008). The good, the bad, and the cell type-specific roles of hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  in neurons and astrocytes. *Journal of Neuroscience* 28, 1988.

Vessillier, S., Adams, G., and Chernajovsky, Y. (2005). Latent cytokines: development of novel cleavage sites and kinetic analysis of their differential sensitivity to MMP-1 and MMP-3. *Protein Engineering Design and Selection* 17, 829-835.

Vögelin, E., Baker, J.M., Gates, J., Dixit, V., Constantinescu, M.A., and Jones, N.F. (2006). Effects of local continuous release of brain derived neurotrophic factor

(BDNF) on peripheral nerve regeneration in a rat model. *Experimental Neurology* 199, 348-353.

Wang, Y., Zhang, X., Guo, Q.-L., Zou, W.-Y., Huang, C.-S., and Yan, J.-Q. (2010). Cyclooxygenase inhibitors suppress the expression of P2X3 receptors in the DRG and attenuate hyperalgesia following chronic constriction injury in rats. *Neuroscience Letters* 478, 77-81.

Webb, J.D., Coleman, M.L., and Pugh, C.W. (2009). Hypoxia, hypoxia-inducible factors (HIF), HIF hydroxylases and oxygen sensing. *Cellular and Molecular Life Sciences* 66, 3539-3554.

Weidemann, A., and Johnson, R.S. (2008). Biology of HIF-1 $\alpha$ . *Cell Death and Differentiation* 15, 621-627.

White, F.A., and Miller, R.J. (2010). Insights into the regulation of chemokine receptors by molecular signaling pathways: Functional roles in neuropathic pain. *Brain, Behavior, and Immunity* 24, 859-865.

Wincewicz, A., Sulkowska, M., Koda, M., and Sulkowski, S. (2007). Cumulative expression of HIF-1-alpha, Bax, Bcl-xL and P53 in human colorectal cancer. *Pathology* 39, 334-338.

Yaksh, T.L. (2001). The acute antihyperalgesic action of nonsteroidal, anti-inflammatory drugs and release of spinal prostaglandin E2 is mediated by the inhibition of constitutive spinal cyclooxygenase-2 (COX-2) but not COX-1. *Journal of Neuroscience* 21, 5847.

Yamasaki, K. (1998). Reversal of impaired wound repair in iNOS-deficient mice by topical adenoviral-mediated iNOS gene transfer. *Journal of Clinical Investigation* 101, 967.

Yamaura, M. (2009). Low level light effects on inflammatory cytokine production by rheumatoid arthritis synoviocytes. *Lasers in Surgery and Medicine* 41, 282.

Yang, C.-C., Lin, L.-C., Wu, M.-S., Chien, C.-T., and Lai, M.-K. (2009). Repetitive Hypoxic Preconditioning Attenuates Renal Ischemia/Reperfusion Induced Oxidative Injury via Upregulating HIF-1 $\alpha$ -Dependent bcl-2 Signaling. *Transplantation* 88, 1251-1260.

Yasukawa, A. (2007). The effect of low reactive-level laser therapy (LLLT) with helium-neon laser on operative wound healing in a rat model. *Journal of Veterinary Medical Science* 69, 799.

Zhao, F.-Y., Spanswick, D., Martindale, J.C., Reeve, A.J., and Chessell, I.P. (2007). GW406381, a novel COX-2 inhibitor, attenuates spontaneous ectopic discharge in sural nerves of rats following chronic constriction injury. *Pain* 128, 78-87.



Zhao, X. (2003). Estrogen affects BDNF expression following chronic constriction nerve injury. *NeuroReport* *14*, 1627.

Zinkernagel, A.S., Johnson, R.S., and Nizet, V. (2007). Hypoxia inducible factor (HIF) function in innate immunity and infection. *Journal of Molecular Medicine* *85*, 1339-1346.

Zoppo, G. (2000). Inflammation and stroke: putative role for cytokines, adhesion molecules and iNOS in brain response to ischemia. *Brain Pathology* *10*, 95.

## 附錄一、實驗材料及儀器一覽表

### 實驗蛋白抗體

抗體名稱	序號	廠牌	使用
TNF- $\alpha$	DY510	R&D Systems, Minneapolis, MN DuoSet <sup>®</sup> ELISA Development kit	酵素免疫沉澱法
IL-1 $\beta$	DY501	R&D Systems, Minneapolis, MN DuoSet <sup>®</sup> ELISA Development kit	酵素免疫沉澱法
BDNF	P23560	R&D Systems, Minneapolis, MN DuoSet <sup>®</sup> ELISA Development kit	酵素免疫沉澱法
HIF-1 $\alpha$	MS-1164-P0	Thermo, CA, USA	免疫染色法
HIF-1 $\alpha$	NB100-105	Novus Biologicals, CA, USA	西方點墨法
HIF-1 $\alpha$	Sc-10790	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA	免疫螢光染色法
i-NOS	RB-9242-P0	Thermo, CA, USA	免疫染色法
i-NOS	250784	Abbiotec, CA, USA	西方點墨法
i-NOS	JC1650285	Millipore, CA, USA	西方點墨法
COX-2	250609	Abbiotec, CA, USA	西方點墨法
P53	9282	Cell signaling, CA, USA	西方點墨法
VEGF	25097	Abbiotec, CA, USA	西方點墨法
NGF	NG1810511	Millipore, CA, USA	西方點墨法
S100	5102-1	Epitomic, CA, USA	西方點墨法
ED1 (CD68)	NG1719691	Millipore, CA, USA	免疫染色法
$\beta$ -actin	NG1738985	Millipore, CA, USA	西方點墨法
Biotinylated goat anti-mouse antibody	86900	Jackson ImmunoResearch, CA, USA	免疫染色法
Biotinylated goat anti-rabbit antibody	86901	Jackson ImmunoResearch, CA, USA	免疫染色法
Peroxidase-conjugate streptavidin	87563	Jackson ImmunoResearch, CA, USA	免疫染色法
Peroxidase-conjugated affinipure goat anti-mouse IgG	89257	Jackson ImmunoResearch, CA, USA	西方點墨法
Peroxidase-conjugated affinipure goat anti-rabbit IgG	89368	Jackson ImmunoResearch, CA, USA	西方點墨法
Fluorescein (FITC) conjugated affinipure	89222	Jackson ImmunoResearch, CA, USA	免疫螢光染色法

goat anti-rabbit			
rhodamine (TRITC)– conjugated affinipure goat anti-mouse antibody	88687	Jackson ImmunoResearch, CA, USA	免疫螢光染色法
Pagerular prestained protein ladder	00045169	Fermentas, Life sciences	西方點墨法



### 實驗用品

	廠牌	使用
3/0, 4/0 black silk	Unik surgical sutures MFG. CO., Taiwan	CCI surgery
isoflurance	AErrane, Baxter Healthcare of Puerto Rico, PR	CCI surgery, 低能雷射治療
96 well microtiter plate	Costar	酵素免疫沉澱法, 蛋白定量
1% Eosin Y solution	Muto Pure Chemicals Co, LTD	H &E stain
1% Hematoxylin	Muto Pure Chemicals Co, LTD	H &E stain
DAB	Pierce, Rockford, IL, USA	免疫染色法
10% formaldehyde solution in aqueous phosphate buffer	Mallinckrode chemicals	H &E stain
甲醇	慕容科技有限公司, 台中市, Taiwan	西方點墨法
乙醇	慕容科技有限公司, 台中市, Taiwan	免疫染色法
Ammonia	Panreac, Barcelona, Spain	H &E stain
Chemiluminescence ECL western Blotting luminal Reagent	Santa Cruz, CA, USA	西方點墨法
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O	Fluka	PBS
NaCl	Sigma, St. Louis, MO	PBS
KCL	Sigma, St. Louis, MO	PBS
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Sigma, St. Louis, MO	PBS
PVDF 0.45µm pore size	Millipore, Bedford, MA	西方點墨法
Slides	Thremo Scientific	IHC, IFC, H &E stain
Skim milk	Difco, Detroit, MI, USA	西方點墨法
Tris Base	MD Bio, Inc., Taipei, Taiwan	西方點墨法
Glycine	MD Bio, Inc., Taipei, Taiwan	西方點墨法
APS-Ammonium persulfate	Pharmacia Biotech, Upsala, Sweden	西方點墨法
40% Acrylamide Bis	MD Bio, Inc., Taipei, Taiwan	西方點墨法

solution		
Tissue Protein Extraction Reagent (T-PER)	Pierce Chemical Co., USA	組織研磨
Protease inhibitor	P8340 cocktail Sigma, NY, USA	西方點墨法
BSA (Bovine serum albumin)	A-7906, Sigma, MO, USA	蛋白定量
Folin (Ciocalteu's phenol reagent)	F9252, Sigma, MO, USA	蛋白定量
Tween 20	Sigma, St. Louis, MO	酵素免疫沉澱法, 西方點墨法
Xylene	J.T. Baker	免疫染色法, H &E stain



### 實驗儀器

項目	廠牌	使用
660-nm Ga-Al-As diode laser	Aculas-Am series, Multi-channel LLLT system; Konftec Corporation, Taipei, Taiwan	低能雷射治療
Chemiluminescence detection system	Fujifilm, Tokyo, Japan	西方點墨法
Clear plexiglass chamber	Made in Taiwan	免疫染色法
Homogenization probe	Tissue Tearor, Polytron, Biospec Products, Inc.	組織研磨
iEMS Reader	Ascent Software	酵素免疫沉澱法, 蛋白定量
<b>Microscope</b>	Zeiss axiophot microscopes	免疫染色法
Plate reader	Molecular Device Spec 383	酵素免疫沉澱法, 蛋白定量
<b>Running system</b>	Bio-rad	西方點墨法
Transfer apparatus	Bio-rad	西方點墨法
Tissues embedding	Tissue-Tek® TEC™ 5 Tissue Embedding Console System, Japan	組織脫水封蠟包埋
組織切片機	QP-3268, Histo-Line Laboratories	組織蠟塊切片
von Frey filament	Analgesia Meter, IITC life Science Instruments, Woodland Hills, CA	疼痛行為測試
Wire mesh floor	Made in Taiwan	疼痛行為測試
Shaker	TKS	西方點墨法
Firefox Dry Bath 6100	PANTECH	西方點墨法
高壓蒸氣爐	Tomin TM322	高溫殺菌器具, 免疫染色法
PH meter	Microcomputer pH/mV/TEMP METER 617	校正溶液之酸鹼度
Hotplate stirrer	Lab TECH	混勻溶液
微量天平	METTLER TOIEDO	量秤藥劑
Fluorescence microscopy	Axiomager M1, ZEISS, Germany	觀察玻片