

國立臺灣大學生命科學院生命科學系



博士論文

Department of Life Science

College of Life Science

National Taiwan University

Doctoral Dissertation

觸感痛與gabapentin的止痛作用在神經損傷大鼠腦中的
活性變化

The brain activity changes of tactile allodynia and the
analgesic effect of gabapentin in the neuropathic rats

林校群

Hsiao-Chun Lin

指導教授：嚴震東 博士

Advisor: Chen-Tung Yen, Ph.D.

中華民國104年1月

January 2015

國立臺灣大學博士學位論文
口試委員會審定書

觸感痛與 gabapentin 的止痛作用在神經損傷大鼠
腦中的活性變化

The brain activity changes of tactile allodynia
and the analgesic effect of gabapentin
in the neuropathic rats

本論文係林校群君（學號：D95B41005）在國立臺灣大學
生命科學系、所完成之博士學位論文，於民國一〇四年一月二
十九日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：

嚴震東

（簽名）

（指導教授）

陳建璋

李元元

孫維仁

曾明宗

李樹川

周明源

生命科學系 系主任


周明源

（簽名）

致謝

這本論文的完成，首先要感謝我的指導教授嚴震東老師。跟老師相處這幾年來，有許多印象深刻的記憶。舉幾個例子來說，老師的辦公室從來沒有關上門，如果有什麼問題，不管是研究上的或生活上的，只要老師坐在裡面，隨時可以進去跟他討論。老師博覽群書，不管是專業或非專業的書籍，似乎有過目不忘的本事，常常跟他討論完還要私下翻書才知道剛剛老師說了什麼。最讓我佩服的是許多實驗技術的傳授，都是老師親自示範給我們看，而換我們自己上場時卻困難重重，即使筆記寫滿也想不透為什麼自己做不出來。此外還要感謝老師提供了多次機會，讓我能夠到國外參加課程及研討會。老師並不是緊迫盯人的教導，而是潛移默化的影響，這些記憶除非我得了阿茲海默症，不然應該是很難忘的吧。再來要感謝孫維仁教授及謝松蒼教授，你們多次給予我的研究意見，對我都是相當重要的提醒與指引。孫醫師經常在白板上整理問題並畫出論文的方向，這種化繁為簡的功力希望我也能學會。謝醫師及中山醫大的曾拓榮老師教我免疫組織染色的各種技巧及問題解決的方式，讓我了解如何用基本的生物學邏輯去處理複雜的問題。謝謝台大醫院核醫部曾凱元主任，提供優良的場地、正子造影設備與實驗指導，以及讓我可以優先排定實驗時程，並在我口試時還抽空前來參加。謝謝中研院生醫所的徐百川老師及陳建璋老師，以及台大腦心所的曾明宗老師，你們在口試的提問及討論讓我可以更清楚研究的方向。感謝生科系主任閔明源教授，閔老師的意見一向相當中肯明確，在動物所及現在的生科系這幾年也受到閔老師許多的幫助。我要感謝實驗室的陳瑞芬老師，陳老師對學生的關心總是讓人覺得溫暖，還有陳老師在安排我擔任助教的工作上也提供許多的幫助。謝謝常來實驗室的蔡孟利老師，蔡老師雖然在宜蘭，但幾乎每週都來實驗室協助大家的實驗及關心研究進度。謝謝實驗室的助理妍徵及舒婷，如果沒有你們，實驗室大概很難順利運作。感謝在我就讀博士班這幾年一起為研究努力的夥伴，從白峰學長、佳琦學姐、儀芳學姐，到同屆已畢業的琬婷與本立，還有已畢業的學弟妹們：建嘉、孟孜、王楹、慧馨、庭芳、旭偉、慶霖、智羽、郁昕、瑋辰、昕叡、奕君，以及還在研究路上前進的學弟妹們：玟誼、子豪、瀚元、婉婷、瀚雄、玟樺，和你們相處的日子很愉快，很難得有機會能和一群具備多樣優點與長才的人朝夕相處；特別要感謝郁昕及子豪，在本論文的第三章實驗分析上幫助許多。在這幾年的研究生活中，我的好友們也分擔了我的許多憂愁，感謝恆鍵、文彥、淑菁、鴻欣、柏衡、之瑋、雨暘，你們的陪伴與傾聽給了我許多鼓勵。最後要感謝我的父母，你們一直無條件的支持我做自己想做的事，這種無條件的愛給我很多啟發，希望我也可以像你們一樣。感謝我的老婆英辰，由於妳的包容與支持，讓我可以有力量完成這本論文。還有我們即將出生的女兒，希望妳將來能懂得妳爸媽對妳無條件的愛，是來自於我們生命中遇到的這一切幫助。感謝主，賜給我這一切，包括這本論文，還有貢獻生命於人類知識的大鼠。

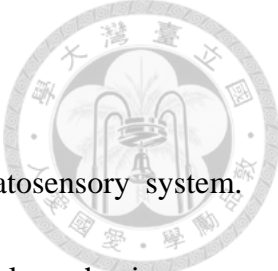
摘要




神經病變性疼痛為體感覺系統因疾病或損傷所產生的疼痛，在臨床上不易治療，因對其病理機制的了解仍有限。觸感痛是神經病變性疼痛的主要症狀，特徵為對正常人無痛的觸覺刺激卻會引發病人疼痛。目前對觸感痛的研究著重在周邊感覺神經及脊髓背角的功能性變化，而腦部在觸感痛時扮演的角色仍待了解。Gabapentin (GBP)是臨床上治療神經病變性疼痛的主要藥物，但其在腦中的作用位置還不清楚。本論文使用正子造影及免疫組織化學方法，研究神經損傷大鼠腦部在觸感痛狀態下的功能性變化，及 GBP 在腦部可能的作用位置。我們將大鼠坐骨神經的分支脛神經及腓總神經結紮後切斷，保留腓腸神經完整。神經損傷大鼠很快發展出自發性疼痛、觸感痛及痛覺過敏等現象。我們比較神經損傷大鼠在觸感痛狀態下腦部的葡萄糖代謝率及神經活化標誌的變化，以及給予 GBP 止痛後的改變。由正子造影的結果顯示，觸感痛會使神經損傷大鼠腦部的島狀皮質前側、丘腦及小腦的代謝率增加，而給予 GBP 止痛可回復丘腦及小腦的代謝率，並使前額葉皮質及前扣帶迴皮質代謝率降低。由免疫組織染色的結果顯示，磷酸化細胞外訊息調節激酶(pERK)及神經活化蛋白(c-Fos)在神經損傷大鼠的前額葉皮質、前扣帶迴皮質及島狀皮質前側等邊緣皮質有大量的表現。神經損傷大鼠腦中 pERK 細胞在前額葉皮質及島狀皮質前側較對照組有顯著增加，而 c-Fos 細胞則在前額葉皮質較對照組有顯著增加；經由給予 GBP 止痛後，這些大量表現的細胞顯著的減少。我們更進一步確認在腦中這些表現 pERK 或 c-Fos 的細胞是神經元，而非星狀膠細胞。由本研究的結果可知，觸感痛在神經損傷大鼠腦中主要改變了邊緣皮質的細胞活性，而 GBP 在腦部的作用位置可能就是在抑制邊緣皮質的細胞活性來達成止痛作用。

關鍵詞：觸感痛、Gabapentin、前額葉皮質、前扣帶迴皮質、島狀皮質

Abstract



Neuropathic pain is caused by injury or disease of the somatosensory system. Treating neuropathic pain is difficult because its pathophysiological mechanisms are understood limitedly. Tactile allodynia, the innocuous touch-evoked pain, is one of the major symptoms of neuropathic pain patients. So far the studies of tactile allodynia are focused on the functional alterations in the primary afferents and the spinal dorsal horn neurons, however, the role of brain in the tactile allodynia is still unclear. Gabapentin (GBP) is a first-line analgesic to treat neuropathic pain, but its action sites in the brain remains to be disclosed. In this thesis, we used positron emission tomography (PET) and immunohistochemical methods to investigate the functional alterations in the brain of neuropathic rats under allodynic state, and the action sites of GBP in the brain. We used the spared nerve injury (SNI) model of neuropathic pain. In the SNI model, the tibia and common peroneal nerves of the sciatic nerve were ligated and cut, and leaving the sural nerve intact. The nerve-injured rats developed spontaneous pain, tactile allodynia and thermal hyperalgesia. Then we compared the glucose metabolic rate and neuronal activation markers in the brain of neuropathic rats under allodynic state, and the effect of GBP. The PET results showed glucose metabolic rates increased in the anterior insular cortex (IC), thalamus and cerebellum after nerve-injury, and GBP treatment reversed the increases in the thalamus and cerebellum, and decreased the



glucose metabolism in the medial prefrontal cortex (mPFC) and anterior cingulate cortex (ACC). The immunostaining results showed an abundant expression of pERK and c-Fos in the mPFC, ACC and anterior IC. For pERK study, the pERK-positive cells in the neuropathic rats increased significantly in the mPFC and IC than control rats. For c-Fos study, the c-Fos-positive cells in the neuropathic rats increased significantly in the mPFC than control rats. After GBP treatment, the increased expression of pERK and c-Fos decreased significantly. We also demonstrated the pERK- or c-Fos-positive cells were neurons, not the astrocytes. According to our studies, the tactile allodynia affect the neuronal activities in the limbic cortices of neuropathic rats, and the effect of GBP was to suppress the activation of limbic cortices.

Key words: allodynia, gabapentin, medial prefrontal cortex, anterior cingulate cortex, insular cortex

目錄



論文口試委員會審定書	i
致謝	ii
摘要	iii
Abstract	iv
第一章、緒論	1
1.1 研究神經病變性疼痛的重要性	1
1.2 神經病變性疼痛	1
1.3 腦部對疼痛反應的功能性影像研究	11
1.4 疼痛的細胞分子標記	15
1.5 研究目的	16
第二章、神經損傷大鼠的疼痛行為指標與 gabapentin 的藥效測試	18
2.1 前言	18
2.2 材料與方法	19
2.3 結果	24
2.4 討論	25
第三章、神經損傷大鼠在觸感痛狀態下的腦部葡萄糖代謝率變化與 gabapentin 止痛的作用位置	29
3.1 前言	29
3.2 材料與方法	30
3.3 結果	36
3.4 討論	39
第四章、神經損傷大鼠在觸感痛狀態下的腦部神經活化標誌的變化與 gabapentin 的止痛反應	45
4.1 前言	45
4.2 材料與方法	46
4.3 結果	52
4.4 討論	55
第五章、綜合討論與結論	60
參考文獻	65
附表	81
附圖	85



第一章、緒論

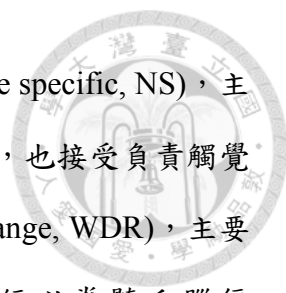
1.1 研究神經病變性疼痛的重要性

慢性痛(chronic pain)是臨床醫療上的重要問題。慢性痛的定義不易界定，一般認為持續超過三個月的疼痛就可診斷為慢性痛(Apkarian et al., 2009)。慢性痛的病人在受到長期疼痛的折磨下，不僅嚴重影響生活品質，也易導致焦慮及憂鬱等疾患(Asmundson and Katz, 2009; Doth et al., 2010; Fishbain et al., 2010; Gormsen et al., 2010)。在法國有個大規模的慢性痛流行病學調查，其中有 21.7%的慢性痛肇因於神經病變性疼痛(neuropathic pain) (Bouhassira et al., 2008)。美國有項調查估計，每年因神經病變性疼痛而就醫的直接醫療支出約有一億美元，而因疼痛發作而無法工作造成的產值下降也約有一億美元，可見神經病變性疼痛造成了嚴重的醫療及經濟負擔(McCarberg and Billington, 2006)。因此，研究神經病變性疼痛的病理機制，並找尋合適的藥物或治療方式，是刻不容緩的工作。

1.2 神經病變性疼痛


1.2.1 疼痛的生理機制

疼痛是一種主觀的經驗。國際疼痛研究協會(International Association for the Study of Pain, IASP)對痛的定義是：一種不愉快的感覺或情緒上的經驗，與實際上或潛在的組織傷害有關。當周邊組織受到傷害性刺激(noxious stimulus)時，會引起痛覺受器(nociceptor)的反應。痛覺受器為分布在表皮層的痛覺神經末梢的游離分支，與觸覺或壓覺具有的特殊受器形態不同。痛覺神經分為寡髓鞘的 A δ 神經及無髓鞘的 C 纖維神經，位於皮膚底下的痛覺受器是它們的周邊突起(peripheral process)的末梢，而其細胞本體則位在背根神經節(dorsal root ganglion, DRG)內；這些 A δ 及 C 纖維神經的中樞突起(central process)則伸入脊髓(spinal cord)的背角(dorsal horn)內，與第二級的痛覺神經細胞形成突觸。第二級的痛覺神經也分為兩種，一



種是單純接受第一級痛覺神經訊號的痛覺專一性神經(nociceptive specific, NS)，主要分布在脊髓背角的表淺層；另一種除了接受痛覺神經訊號外，也接受負責觸覺的A β 神經的訊號，因此稱為寬廣動態範圍神經(wide dynamic range, WDR)，主要分布在脊髓背角的較深層的區域。第二級的痛覺傳遞神經以脊髓丘腦徑(spinothalamic tract, STT)神經為主要投射路徑，它們的軸突會交叉到脊髓對側的方位，並一路上行直到丘腦內(Almeida et al., 2004)。來自頸部以下的痛覺訊號會在丘腦的腹後側核(ventral posterolateral nucleus, VPL)內，藉由第三級神經上傳到初級體感覺皮質(primary somatosensory cortex, S1)；而來自臉部的痛覺訊號則在丘腦的腹後中央核(ventral posteromedial nucleus, VPM)內，一樣透過第三級神經上傳到初級體感覺皮質。這個由脊髓背角經由腹後側核傳遞到初級體感覺皮質的痛覺路徑，又稱為外側痛覺路徑(lateral pain pathway)，主要可以傳遞疼痛的強度、定位及種類；另外由脊髓背角的神經還會傳遞到丘腦中線的核區，如背中央核區(Mediodorsal nucleus, MD)，並轉換第三級神經傳遞到前扣帶迴皮質(anterior cingulate cortex, ACC)，這條痛覺路徑稱為內側痛覺路徑(medial pain pathway)，與疼痛時的情緒與認知有關(Almeida et al., 2004)。


正常的疼痛是一種保護機制。當周邊組織受傷的時候，因其產生的疼痛，使我們避免使用或碰觸該受傷組織，如此可幫助組織修復及傷口癒合。痛覺神經除了傳遞疼痛訊息外，它們還具有敏感化的特性，使得疼痛訊息有放大的效果。痛覺神經的敏感化有兩種：周邊敏感化(peripheral sensitization)與中樞敏感化(central sensitization) (Cesare and McNaughton, 1997; Woolf, 2011)。周邊敏感化發生在周邊神經系統，也就是第一級的痛覺神經。當周邊組織受傷或發炎的時候，傷口周圍會聚集白血球及免疫細胞，它們會釋放一些發炎介質(inflammatory mediator)，如前列腺素(prostaglandin)、緩激肽(bradykinin)、組織胺(histamine)或神經生長因子(nerve growth factor, NGF)等，這些發炎介質會與痛覺神經上的專屬受器結合，使痛覺神



經改變原本的狀態，產生了更多的受器蛋白並移動到周邊突起的細胞膜上，最終使得痛覺神經更易興奮產生動作電位，也降低了疼痛的閾值。中樞敏感化發生在中樞神經系統，目前了解較多的是位在脊髓背角的第二級痛覺神經的變化。中樞敏感化是痛覺傳遞路徑上一個獨特的現象，當周邊的傷害性刺激以一定的強度且重複性出現時，即會誘發脊髓背角神經發展出中樞敏感化現象(Woolf, 1983)。中樞敏感化會使脊髓背角神經改變其原本的細胞膜興奮度(excitability)及突觸可塑性(synaptic plasticity)，造成脊髓背角神經更易產生動作電位，將傷害性訊息往腦部傳遞(Latremoliere and Woolf, 2009)。當第一級痛覺神經的軸突末端傳來了動作電位，不僅會釋放興奮性的傳導物質麩氨酸(glutamate)，也會釋放神經胜肽類如 P 物質(substance P)或 CGRP (calcitonin gene-related peptide)。P 物質或 CGRP 與第二級痛覺神經突觸上的專屬受器結合後，會活化一連串的細胞內訊號傳遞路徑，最終使得更多的 AMPA 及 NMDA 等麩氨酸受器移動到突觸，使第二級痛覺神經改變其可塑性而更易被興奮。痛覺神經具有的敏感化特性，經常讓疼痛訊息過度放大而使得病人難以忍受；若能夠減少這種敏感化的現象，在臨床上可用來作為止痛的方法。如白血球中的嗜中性球(neutrophil)，在受傷組織處活化時，會製造環氧化酶(cyclooxygenase-2, COX-2)，使得花生四烯酸(arachidonic acid)轉變為前列腺素，而增加了周邊敏感化的現象；非固醇類抗發炎藥(non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs)如阿斯匹靈等，會抑制 COX-2 製造，減少前列腺素的生成，因而在臨床上常用為消炎止痛藥(Seibert et al., 1994; Vane, 1971)。

1.2.2 神經病變性疼痛的定義


正常痛覺為當傷害性刺激或發炎反應消失之後，疼痛也會跟著消失；但若體感覺系統(somatosensory system)受到損傷，不管是外傷(如脊髓損傷)、病毒感染(如疱疹病毒)，或是代謝性疾病(如糖尿病)等，會使得痛覺神經產生異常生理變化，結果造成慢性的神經病變性疼痛(Costigan et al., 2009; Treede et al., 2008)。神經病變



性疼痛有三個主要的症狀，包括自發性的疼痛(spontaneous pain)、對痛覺刺激過度敏感(hyperalgesia)，以及對正常人不痛的觸覺或溫覺刺激卻感到疼痛(allodynia)等症狀(Baron, 2006)。由於這種疼痛在臨床上描述為像針刺的、撕裂的、燒灼的，或像被電擊了一般的疼痛，因此造成了病人在心理上的焦慮與壓力(Asmundson and Katz, 2009; Bair et al., 2003)。神經病變性疼痛在臨床上不易治療(Dray, 2008)，因為受傷的是神經而非一般軟組織，所以給予 NSAIDs 並無法止痛；即使進一步投予鴉片類藥物(如嗎啡)，其止痛效果也因病人的情況而異(Arner and Meyerson, 1988; Finnerup et al., 2005; Kalso et al., 2004)。由於神經病變性疼痛的來源為受傷的感覺神經產生了異常的活動，因此唯有建立類似的動物模式才有辦法藉由研究其病理機制，進而找出有效的止痛方式。

1.2.3 周邊神經病變性疼痛：動物模式

由於神經病變性疼痛的成因很多，臨床上的治療方式也相當複雜，且其治療效果也不一。以現在作為第一線治療神經病變性疼痛的抗痙攣藥(anticonvulsants)來說，同樣屬於抗痙攣藥的 carbamazepine 對三叉神經痛(trigeminal neuralgia)的止痛效果不錯，但對皰疹後神經痛(post-herpetic neuralgia)的效果就不佳；而另一種抗痙攣藥 gabapentin 則適合用來治療皰疹後神經痛(Finnerup et al., 2005)。由藥物的治療差異性也反映出，不同成因的神經病變性疼痛可能由不同的病理機制所產生。早期由於缺乏適當的疼痛動物模式，因此對於神經病變性疼痛的了解相當有限，直到 Bennett and Xie (1988)在大鼠的坐骨神經上用了四個可以壓迫神經卻不至於綁死的單結，製造出類似神經病變性疼痛病人的動物模式，自此才有合適的動物模式以供進一步研究。目前有關神經病變性疼痛的動物模式，大多採用手術造成周邊神經的部分損傷為主(Jaggi et al., 2011)。以坐骨神經的手術操作來說，除了上述所提的慢性壓迫性傷害模式(chronic constriction injury, CCI)外，常見的還有 Seltzer et al. (1990)的局部坐骨神經結紮模式(partial sciatic nerve ligation, PSL)，Kim




and Chung (1992)的脊神經結紮模式(spinal nerve ligation, SNL)，及 Decosterd and Woolf (2000)的分支選擇性傷害模式(spared nerve injury, SNI)等。其中 SNL 及 SNI 兩種模式，因為損傷的位置及程度很明確，近年來更是常用來研究神經病變性疼痛。SNL 模式為將老鼠的 L5 及 L6 脊神經分離後以手術縫線緊緊地結紮，而 SNI 模式為將坐骨神經三支中的脛神經(tibia nerve)及腓總神經(common peroneal nerve)分離後結紮並切斷遠心端的連結，只保留完整的腓腸神經(sural nerve)。本研究將採用 SNI 模式，因為它的手術簡單，當老鼠發展出神經病變性疼痛後，其觸感痛的行為可維持至半年(Decosterd and Woolf, 2000)，且老鼠也常表現出明顯的自發性疼痛行為(Lee et al., 2012)。

1.2.4 周邊神經病變性疼痛的機制

經由對神經病變性疼痛動物模式的研究了解，學者們提出一些造成神經病變性疼痛的可能機制，但目前仍未有一致的結論。本節以背根神經節及脊髓背角兩部分的變化簡要敘述。

1.2.4.1 背根神經節的變化

背根神經節的神經元屬於感覺神經，其細胞本體在神經節內，周邊突起分布在皮膚表層上，中樞突起則分布在脊髓背角的不同層(lamina)上。背根神經節裡的感觉神經元有三種，一種是負責觸覺訊息，體積較大，有較厚髓鞘包覆的 A β 細胞(神經傳導速率約 14~30 m/s)；另外兩種是負責傷害性訊息(nociceptive signal)，體積較小的細胞，依髓鞘的有無，可分為具有較薄髓鞘的 A δ 細胞(神經傳導速率約 2.2~8 m/s)，及無髓鞘的 C 纖維細胞(神經傳導速率約 < 1.4 m/s)。周邊神經損傷會刺激 A β 細胞的軸突萌芽(sprouting)，利用基因晶片的偵測，可發現此萌芽現象藉由活化與神經再生有關的基因來達成形態上的變化(Costigan et al., 2002)。神經病變性疼痛的一個特徵是有觸感痛(tactile allodynia)，即一般無痛的觸覺刺激在神經損



傷後會造成疼痛，這個可能與負責傳遞觸覺訊息的 A β 細胞，在周邊神經損傷之後，產生了形態上的變化，將其原本分布在 lamina III 到 V 層的軸突，延伸到了脊髓背角的 lamina I 及 II 位置，造成了觸覺訊息卻興奮了痛覺神經(Lekan et al., 1996; Soares et al., 2002; Woolf et al., 1992)。除了形態上的變化，A β 細胞原本不製造與痛覺有關的神經傳導物質 P 物質及 CGRP，但在周邊神經損傷後，卻能夠開始製造這些傳導物質，這種表型轉換(phenotypic switch)也會增強傷害性訊息的傳遞(Nitzan-Luques et al., 2011; Weissner et al., 2006)。

鈉離子通道(voltage-gated sodium channel)是形成動作電位的蛋白質通道之一，其構成的次單元有主要形成通道(pore)的 α 次單元，及附屬的 β 次單元。根據 α 次單元的胺基酸序列不同，鈉離子通道可以分為 Na $_v$ 1.1 ~ 1.9 九種異構體(isoform)。這九種鈉離子通道又可依據對河豚毒素(tetrodotoxin, 簡稱 TTX)的感受力分為 TTX 敏感型(TTX-sensitive)及 TTX 不敏感型(TTX-resistant)，其中 Na $_v$ 1.1 ~ 1.4 及 Na $_v$ 1.6 ~ 1.7 為 TTX 敏感型，Na $_v$ 1.5 及 Na $_v$ 1.8 ~ 1.9 為 TTX 不敏感型。在成年大鼠的背根神經節內，鈉離子通道具有 TTX 敏感型的 Na $_v$ 1.1 及 Na $_v$ 1.6 ~ 1.7，與 TTX 不敏感型的 Na $_v$ 1.8 ~ 1.9 (Rush et al., 2007)。不同鈉離子通道對疼痛形成的角色不同，利用基因剔除(gene knockout)的方式去掉 Na $_v$ 1.7 或 Na $_v$ 1.9 通道，可減低小鼠對多種發炎物質的疼痛行為(Amaya et al., 2006; Nassar et al., 2004)；利用基因弱化(gene knockdown)的方式去抑制 Na $_v$ 1.8 通道的表現，可改善神經病變性疼痛大鼠的觸感痛及痛覺過敏(Lai et al., 2002)。特別的是 Na $_v$ 1.3 通道，在正常成年大鼠的背根神經節並不具有此通道，但在發炎痛的情況下卻會明顯表現(Black et al., 2004)；而在脊髓損傷(spinal cord injury)造成的神經病變性疼痛，Na $_v$ 1.3 也會大量表現在脊髓的第二級痛覺神經上(Hains et al., 2003)。似乎這幾種鈉離子通道的異常表現會與神經病變性疼痛有關，但 Nassar et al.利用基因剔除的方式去掉 Na $_v$ 1.3、Na $_v$ 1.7 及 Na $_v$ 1.8，小鼠還是一樣會發展出神經病變性疼痛，因此這些鈉離子通道

的角色仍需要進一步研究(Nassar et al., 2005; Nassar et al., 2006)。




周邊神經損傷時通常在受傷處的神經會形成神經瘤(neuroma)，而會使得部份鈉離子通道大量表現(England et al., 1996)，像這類大量表現的鈉離子通道可能是造成異位性放電(ectopic discharge)的主要原因(Matzner and Devor, 1994)。除了神經瘤外，受傷的背根神經節細胞，甚至是相鄰的未受傷神經纖維也會具有異位性放電的現象；特別是不屬於痛覺神經的 A β 細胞的異位性放電，與神經病變性疼痛的引發有關(Amir et al., 2005; Devor, 2009; Wu et al., 2001)。周邊感覺神經的自發異位性放電除了與自發性疼痛有關，也與中樞敏感化現象有關，因為它的自發性放電行為提供了滿足中樞敏感化的要件，且在周邊組織缺少傷害性刺激時一樣會使周邊感覺神經傳遞傷害性訊息，並改變了第二級痛覺神經的特性，最終放大了疼痛訊號(Balasubramanyan et al., 2006; Coderre and Katz, 1997; Devor, 2009)。

1.2.4.2 脊髓背角的變化


周邊神經損傷使得脊髓背角處發生了最主要的變化，就是中樞敏感化現象。中樞敏感化指的是因周邊的傷害性刺激、組織損傷或神經損傷，造成了脊髓背角的體感覺神經改變了突觸可塑性，而這種改變是迅速發生的，結果使得第二級的痛覺神經增加了興奮度(Latremolier and Woolf, 2009)。神經病變性疼痛的症狀之一是痛覺過敏，痛覺過敏又可分為直接的痛覺過敏(primary hyperalgesia)，即受傷處的痛覺反應增大，與間接的痛覺過敏(secondary hyperalgesia)，即受傷處周圍位置也降低了疼痛閾值。中樞敏感化會使脊髓背角的痛覺神經擴大感受域(receptive field)，因此與間接的痛覺過敏有關(Campbell and Meyer, 2006)。

脊髓背角裡有一群 GABAergic 中間神經元，當周邊神經損傷時會導致這類神經元大量凋亡(apoptosis)，因而失去對痛覺神經的抑制作用(disinhibition)；若給予



caspase inhibitor 抑制細胞凋亡的現象，則可以降低動物觸感痛及痛覺過敏的現象 (Scholz et al., 2005)。在脊髓背角的第一層(lamina I)裡具有 GABA_A 受器的神經元，其細胞膜上表現有第二型鉀離子-氯離子共同輸送蛋白(K⁺-Cl⁻ cotransporter 2, KCC2)，這種蛋白的功能是將鉀離子及氯離子排出細胞外，以維持細胞內的離子濃度；當周邊神經損傷後，KCC2 的表現量下降，使得細胞內的氯離子濃度增加，因此當 GABA_A 受器因 GABA 活化而打開氯離子通道時，結果反而是氯離子向外流，造成這些在 lamina I 的具有 GABA_A 受器的神經元因去極化而產生動作電位，導致部分 GABAergic 細胞失去對痛覺神經的抑制作用，這也可能是神經病變性疼痛的原因之一(Coull et al., 2003)。

周邊神經損傷時會伴隨著瓦勒氏退化(Wallerian degeneration)，而活化大量的巨噬細胞(macrophage)來清除殘餘的細胞碎片。微膠細胞(microglia)是中樞神經系統裡的巨噬細胞，在周邊神經損傷後，損傷部位所對應的脊髓處也會活化大量的微膠細胞，並釋放許多免疫介質(如 TNF- α , IL-1 β 等)，此與神經病變性疼痛的誘發及維持有關(Beggs and Salter, 2007; Suter et al., 2007)。微膠細胞上有表現一種獨特的受器蛋白 P2X₄，是屬於 ATP 的受器(ionotropic ATP receptor)之一，這種受器蛋白並不顯現在神經元或星狀膠細胞(astrocyte)上。當周邊神經損傷的時候，P2X₄ 受器也會大量表現在脊髓背角處，若抑制這種受器的表現，可以減低觸感痛的程度 (Tsuda et al., 2003)。有一種細胞內的激酶 p38，只表現在脊髓背角的微膠細胞內，並不表現在神經元或星狀膠細胞內(但會表現在 DRG 神經元內) (Jin et al., 2003)；當周邊神經損傷後，會活化微膠細胞內的 p38 (磷酸化, phospho-p38)，而抑制 p38 的活化可防止觸感痛的發展(Tsuda et al., 2004)。除了微膠細胞外，星狀膠細胞的活化也和神經病變性疼痛有關。當周邊神經損傷後，星狀膠細胞的蛋白標誌 glial fibrillary acidic protein (GFAP)也會跟著增加，而這種增加是因為星狀膠細胞變形膨大(hypertrophy)，並不是因其數量增加或移動的結果(Garrison et al., 1991)；若給予



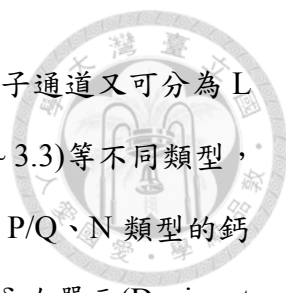
麩氨酸的 NMDA 受器的拮抗劑 MK-801，除了可減低觸感痛的現象，也能夠抑制 GFAP 的表現(Garrison et al., 1994)。星狀膠細胞的活化會晚於微膠細胞的活化，因此星狀膠細胞的變化可能與神經病變性疼痛的維持有關(Zhuang et al., 2005)。

由上述這些研究可知，周邊神經病變性疼痛的可能機制，與背根神經節細胞的活性增加，促成了脊髓背角的中樞敏化，加上中間神經元失去了抑制作用，還有神經膠細胞與神經元之間的交互關係，總總造成了痛覺訊息的不正常傳遞；但目前的研究多著重在脊髓背角處的變化，至於大腦的變化，目前仍有待釐清。

1.2.5 治療神經病變性疼痛的主要藥物：Gabapentin

Gabapentin (簡稱 GBP)的化學名為 1-(aminomethyl)cyclohexane acetic acid，它的化學結構類似於 γ -aminobutyric acid (GABA)，即抑制性的神經傳導物質，但 GBP 並不會作用於 GABA 受器(Taylor et al., 1998)。GBP 是鈣離子通道(voltage-gated calcium channel)上的 $\alpha_2\delta$ 次單元的配體(ligand) (Gee et al., 1996)，當它結合到 $\alpha_2\delta$ 次單元時，會抑制鈣離子經由鈣離子通道流入神經元，減少軸突末梢的興奮性神經傳導物質麩氨酸釋放(Fink et al., 2000)。GBP 原本作為治療癲癇的臨床用藥，但自從 Rosner et al. (1996)報告 GBP 可以用來作為神經病變性疼痛的止痛藥以來，GBP 及它的新型類似物 pregabalin (簡稱 PGB)目前已經是臨床上治療神經病變性疼痛的第一線用藥。

有關 GBP 的止痛機制目前還沒有明確的結論，比較被接受的論點是它可結合鈣離子通道上的 $\alpha_2\delta$ 次單元，以達成止痛的效果(Taylor, 2009)。鈣離子通道廣泛存在於體內的肌肉、神經與內分泌細胞上，其構成的次單元有主要形成通道的 α_1 次單元，及附屬的 β 、 γ 、 δ 、 α_2 等次單元；其中 α_2 次單元位於細胞膜外，透過雙硫鍵(disulfide bond)與 δ 次單元相連，因此常稱為 $\alpha_2\delta$ 次單元(Arikkath and Campbell,



2003; Catterall, 2000)。根據 α_1 次單元的胺基酸序列不同，鈣離子通道又可分為 L ($\text{Ca}_v1.1 \sim 1.4$)、P/Q ($\text{Ca}_v2.1$)、N ($\text{Ca}_v2.2$)、R ($\text{Ca}_v2.3$)、T ($\text{Ca}_v3.1 \sim 3.3$) 等不同類型，但並非所有類型的鈣離子通道都具有 $\alpha_2\delta$ 次單元，目前已知 L、P/Q、N 類型的鈣離子通道具有 $\alpha_2\delta$ 次單元，而 T 類型的鈣離子通道可能不具備 $\alpha_2\delta$ 次單元(Davies et al., 2007; Perez-Reyes, 2003)。不同類型的鈣離子通道分布在細胞上的位置也不一致，以神經元來說，L 類型的鈣離子通道主要分布在細胞本體，它的功能與鈣離子依賴(calcium-dependent)的基因轉錄(gene transcription)有關；而 P/Q 及 N 類型的鈣離子通道則分布在突觸前的神經末梢，它們的功能與鈣離子依賴的神經傳導物質釋放有關(Catterall, 2000; Gomez-Ospina et al., 2006; Jarvis and Zamponi, 2007; Reid et al., 2003)。Chaplan et al.利用脊髓腔內(intrathecal)給藥的方式，測試不同類型鈣離子通道的拮抗劑(antagonist)效果，發現只有給予 N 類型通道的拮抗劑，才能有效的減緩神經損傷大鼠的觸感痛(Chaplan et al., 1994b)。後續的研究顯示，N 類型鈣離子通道在神經病變性疼痛扮演重要的角色(Yaksh, 2006)。雖然不是所有的鈣離子通道都具有 $\alpha_2\delta$ 次單元，但 $\alpha_2\delta$ 次單元的存在可協助並促進 α_1 次單元由內質網運送(trafficking)到細胞膜上，以形成鈣離子通道(Arikkath and Campbell, 2003; Felix et al., 1997; Jarvis and Zamponi, 2007)。在神經病變性疼痛大鼠模式中，可發現周邊神經損傷在背根神經節及脊髓背角上有顯著的 $\alpha_2\delta$ 次單元大量表現，而這些增加的 $\alpha_2\delta$ 次單元也與大鼠的疼痛行為有關(Li et al., 2004; Li et al., 2006; Luo et al., 2001)。GBP 類藥物(gabapentinoid，包括 GBP 及 PGB)在周邊神經中可結合 $\alpha_2\delta$ 次單元，抑制 α_1 次單元的運送，減少鈣離子通道在突觸前的神經末梢形成，最終達成止痛的效果(Bauer et al., 2009; Field et al., 2006; Hendrich et al., 2008)。但 $\alpha_2\delta$ 次單元不只存在於背根神經節及脊髓背角，腦中一樣有大量的 $\alpha_2\delta$ 次單元存在(Cole et al., 2005)；GBP 也一樣會結合到腦中的許多位置(Hill et al., 1993; Thurlow et al., 1996)。當神經病變性疼痛病人服用 GBP 之後，由於 GBP 可以通過血腦屏障(blood-brain barrier)，它的止痛機制是否只影響脊髓處的神經活動，在腦中的影響



又是什麼，因此有關 GBP 的止痛機制仍待進一步研究。

1.3 腦部對疼痛反應的功能性影像研究

1.3.1 疼痛與腦

研究神經病變性疼痛，經常使用周邊神經損傷的動物模式(Jaggi et al., 2011)，而多數研究強調在脊髓背角處發生的變化，因為理論上由周邊神經上傳的疼痛訊息增加的情況下，病人本來就會感覺到異常的疼痛；相反地，研究腦部在疼痛狀態下的功能性變化卻不多，這可能歸因於難以取得合適的受試者。若想要直接記錄腦部不同神經元對疼痛刺激的反應，可藉由神經電生理記錄(electrophysiological recording)。電生理記錄是研究神經系統重要的實驗技術，但進行電生理記錄時需要侵入性的手術與麻醉，這也是要研究腦部神經對疼痛刺激反應的困難處之一。早期研究動物在接受疼痛刺激時的腦部功能性變化中，除了電生理記錄外，也常採用自體放射顯影法(autoradiography) (Kuhar et al., 1986)。自體放射顯影法是將不同的放射性追蹤劑注入動物體內，再給予周邊的疼痛刺激，觀察不同的實驗狀態下腦部各區域發生了什麼樣的變化。比如說可利用偵測局部腦血流(regional cerebral blood flow, rCBF)變化的放射性追蹤劑如 ^{99m}Tc -Exametazime 或 ^{14}C -Iodoantipyrine，分別針對不同的疼痛動物模式，觀察在給予疼痛刺激時，腦部的局部血流量有哪些改變(Paulson et al., 2007; Wang et al., 2008; Wang et al., 2009)；也有利用 2-DG (^{14}C -2-deoxyglucose)這個葡萄糖的類似物注入動物體內，觀察神經病變性疼痛的動物在休息狀態(可能有自發性疼痛)下，腦部各核區的葡萄糖代謝率發生了哪些變化(Mao et al., 1993)。但是高階的腦部可能不只是單純地對上傳的疼痛訊息做出回應，不同的腦區在中樞敏感化的情況下，也會改變神經元的可塑性，如杏仁核與前扣帶迴皮質等(Neugebauer et al., 2004; Shyu and Vogt, 2009)。我們假設大腦在神經病變性疼痛狀態下，可能也參與了疼痛訊息的放大或調控的角色，所以了解大腦對於神經病變性疼痛狀態下的變化是重要且值得探討


的問題。近年來，因為腦部功能性造影的技術有大幅度的發展，因此可藉由這些非侵入性的檢查來研究大腦對於疼痛的反應(Tracey, 2008)，而主要的技術有功能性磁振造影(functional magnetic resonance imaging, fMRI)及正子斷層造影(positron emission tomography, PET)。

1.3.2 功能性磁振造影

功能性磁振造影(fMRI)乃利用血氧濃度相依(blood-oxygenation level dependent, BOLD)的方式，來偵測腦組織中血氧濃度變化的程度(Ogawa et al., 1990)。當腦部受到某項刺激而反應時，活化的神經元會增加能量代謝的需求，造成局部腦組織血流容積與血流量的增加，使得活化區域有較多的含氧血紅素。含氧血紅素為逆磁性物質，而去氧血紅素為順磁性物質。利用功能性磁振造影即可量測到與血氧濃度差異相關的訊號，這些訊號的變化顯示出腦部功能性的改變。使用功能性磁振造影有下列的優點：它的檢查過程為非侵入性的掃描，且掃描過程不具放射性，病人可重複掃描而對身體無明顯的傷害，掃描所得的影像有好的軟組織對比，影像的空間解析度高，可同時取得大腦不同切面的影像等。功能性磁振造影在正常受試者或病人方面的檢查日益普及，在疼痛的研究上也提供了頗具潛力的工具(Davis, 2011)。

1.3.3 正子斷層造影

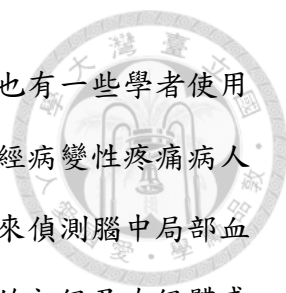
正子斷層造影(PET)為利用放射性核種(radioisotope)標定的核醫藥物，經由注入人體內血管，使這些藥物分布到標的組織，並由標的組織吸收與代謝，再藉由該放射性核種衰變過程中最終釋放的 γ 射線，透過正子斷層掃描儀的接收與影像重建，來偵測核醫藥物的吸收與分布情形(Phelps, 2000)。目前使用於正子斷層造影的放射性核種屬於人體內常見元素的同位素，比如碳-11 (^{11}C ，半衰期為 20 分鐘)、氮-13 (^{13}N ，半衰期為 10 分鐘)、氧-15 (^{15}O ，半衰期為 2 分鐘)，及氟-18 (^{18}F ，半衰



期為 110 分鐘)。這些放射性核種都會進行 β 衰變而放出正子。正子是一種與電子具有相同質量與電價的粒子，只是電子帶負電，而正子帶正電。正子在自然界中是不穩定的粒子，當它產生後，很快就會與電子碰撞產生互毀反應(annihilation)，而放射出兩條呈現 180 度走向，能量為 511 keV 的 γ 射線。使用正子斷層造影有下列優點：它的掃描過程為非侵入性，病人可進行多次掃描，可進行全身性的掃描，可使用具有不同生化標的核醫藥物來取得分子影像等。正子斷層造影本身即為功能性影像，現代的儀器多搭配電腦斷層掃描(computed tomography, CT)，使正子斷層造影的解剖位置更加精確。

1.3.4 神經病變性疼痛病人的功能性腦影像研究

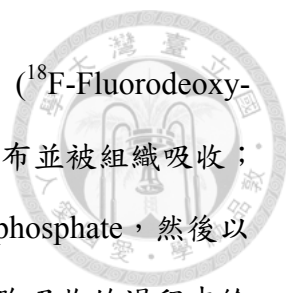
使用大腦影像技術，來偵測神經病變性疼痛病人的腦部有什麼異常的活動，可以提供了解腦部功能性改變的管道，甚至作為未來診斷與治療的基礎。以 fMRI 的研究來說，Peyron et al. (2004)針對多種神經損傷的神經病變性疼痛病人，包括周邊神經損傷，中樞的脊髓、腦幹、丘腦、紋狀體及大腦皮質損傷的病人進行 fMRI 掃描，他們在病人體表的敏感區域以毛刷或冰水刺激，可見初級及次級體感覺皮質、島狀皮質、初級運動皮質、運動輔助區、後頂葉皮質及前扣帶迴皮質等區域都有血氧濃度增加的情形。Schweinhardt et al. (2006)也針對多種的神經病變性疼痛病人來進行 fMRI 掃描，當他們以毛刷刺激病人的敏感區時，在前島狀皮質、後島狀皮質、前扣帶迴皮質、初級及次級體感覺皮質、前額葉皮質、下頂葉皮質、運動輔助區、丘腦、紋狀體及小腦等區域都可以看見血氧濃度增加，而前島狀皮質的後側與病人的觸感痛強度有關。Geha et al. (2008)針對疱疹後神經痛的病人進行掃描，在毛刷刺激敏感區的情況下，在病人腦中的中顳葉、島狀皮質、杏仁核、殼核、初級體感覺皮質、前扣帶迴皮質、運動輔助區、丘腦、導水管旁灰質及小腦等區域的血氧濃度有明顯增加。



除了利用 fMRI 來偵測神經病變性疼痛在腦部產生的變化，也有一些學者使用 PET 來研究這個問題。Petrovic et al. (1999)對下肢神經損傷的神經病變性疼痛病人的腦部進行 PET 掃描，他們使用 ^{15}O -butanol 這種放射性追蹤劑來偵測腦中局部血流量(rCBF)的變化，發現當用毛刷刺激病人的敏感區時，在雙側的初級及次級體感覺皮質、前扣帶迴皮質、運動皮質及丘腦，以及對側的後頂葉皮質、導水管旁灰質等區域有 rCBF 增加的現象。Witting et al. (2001)在正常人的前臂注射辣椒素 (capsaicin)而產生疼痛敏感的區域，接著對這些人的腦部進行 PET 掃描，他們使用的放射性追蹤劑是 H_2^{15}O ，也是用來偵測 rCBF 變化的追蹤劑，結果發現用毛刷刺激前臂敏感區時，對側的體感覺聯合皮質，及雙側的前額葉、島狀皮質等有 rCBF 上升的情形，但是在丘腦與初級體感覺皮質並未看到變化。Witting et al. (2006)後來又利用同樣的實驗方法來掃描肢體神經損傷的神經病變性疼痛病人，在毛刷的刺激之下，他們發現在對側的前額眼眶皮質及同側的島狀皮質有 rCBF 增加的情形，而丘腦及初級體感覺皮質仍舊沒有變化。

1.3.5 選擇正子斷層造影的理由

早期要研究疼痛動物模式的腦部功能性變化，自體放射顯影法提供一個解析度高的影像，但其操作需求複雜，顯影時間長，而更大的問題在於進行自動放射顯影法實驗時，動物必須犧牲，因此無法在同一隻動物上觀察到給予疼痛刺激前後，腦部發生了什麼變化。功能性磁振造影在研究病人的疼痛問題提供一個相當好的工具，但由於病人的疼痛種類、病史、年紀及受傷部位不易控制，使用動物模式可以解決來源複雜的問題；但動物在進行功能性磁振造影過程中需要麻醉，這限制了功能性磁振造影在疼痛動物模式的應用性。同樣可進行多次掃描的正子斷層造影，雖然其影像的解析度低於自體放射顯影法，但可比較同一隻動物在不同處理時的腦部功能性變化；此外正子斷層造影更大的優勢在於，動物可在清醒狀態下接受疼痛刺激，且腦部影像可反映不同處理下的功能性變化(Chen et al., 2010; Ohashi et al., 2008; Romero et al., 2011; Shih et al., 2008; Thompson et al.,




2014)。臨床上經常使用的核醫藥物為葡萄糖類似物 ^{18}F -FDG (^{18}F -Fluorodeoxy-glucose)。當 FDG 注射入動物血管內，需要大約 30 至 60 分鐘分布並被組織吸收；而細胞攝取 FDG 後，會經由 hexokinase 將 FDG 轉變為 FDG-6-phosphate，然後以此種形式的中間產物停留在細胞內。我們可在 FDG 分布及被細胞吸收的過程中給予動物刺激，而因刺激所活化的腦部神經元會吸收較多的 FDG (Chih et al., 2001)；當分布時間結束，動物雖然需要麻醉以進行掃描，但其細胞所攝取的 FDG 會停留在細胞內並不斷衰變產生正子，而透過掃描儀的接收訊號及影像重建即可建立三維的吸收影像。

1.4 疼痛的細胞分子標記

1.4.1 c-Fos

研究神經系統在疼痛刺激下的功能性變化，除了電生理記錄與影像學的分析，學者們也希望能找到與疼痛反應直接相關的分子標記(molecular marker)，但目前並無這樣的疼痛標記(pain marker)存在。生物體內有一些基因，平常並不表現其特定的蛋白，但在受到外界某些刺激之後，會很快的轉譯出調節蛋白，這些基因稱為迅速早發型基因(immediate early gene, IEG)。有一種原致癌基因(proto-oncogene)稱為 *c-fos*，也是屬於迅速早發型基因的一種，這個基因在受到適當刺激下數分鐘內就會產生 mRNA，約 30 分鐘後可產生 Fos 蛋白，而在刺激後兩小時達到蛋白量的高峰。Hunt et al. (1987)發現在脊髓背角的神經元，當接受傷害性刺激時，會大量表現出 c-Fos 蛋白，而在未刺激或接受觸覺刺激時則僅表現出少量 c-Fos 蛋白。Bullitt (1990)進一步證明 c-Fos 蛋白在脊髓背角的分布具有軀體定位的排列(somatotopic organization)。後續有更多報告指出脊髓背角的 c-Fos 蛋白在發炎性疼痛、神經病變性疼痛及內臟性疼痛中都有大量表現的情況(Bester et al., 2000; Catheline et al., 1999; DeLeo et al., 1991; Jin et al., 1999)。但 c-Fos 蛋白只是一種轉錄因子(transcription factor)，它的分布也不與疼痛路徑有關，比如說雖然脊髓背角的




神經元會在疼痛刺激下產生 c-Fos 蛋白，但背根神經節的神經元不管在什麼刺激下都不會產生 c-Fos 蛋白(Hunt et al., 1987)。儘管如此，在對照條件精確地控制之下，c-Fos 蛋白仍可在脊髓背角用來定量疼痛刺激的強度(Dai et al., 2001)。

1.4.2 pERK

Ji et al. (1999)最早發現當周邊給予傷害性刺激時，會使得脊髓背角細胞表現出 pERK (phosphorylated extracellular signal-regulated kinases)這種細胞內的激酶；若給予非傷害性刺激或一般的觸覺刺激，則不會引發 pERK 的表現。後來在不同的疼痛動物模式中，不管是發炎痛、內臟性疼痛或是神經病變性疼痛，都可以在脊髓背角細胞中看見 pERK 的表現(Galan et al., 2003; Ji et al., 2002; Zhuang et al., 2005)。特別是在慢性壓迫傷害造成的神經病變性疼痛中，若給予解除壓迫的處理，使動物恢復正常的痛覺時，也可見到 pERK 的表現回復到正常的情況(Tseng et al., 2007)。以往認為 c-Fos 蛋白的表現可作為痛覺神經活化的一種指標(Hunt et al., 1987)，但誘發 pERK 的表現比誘發 c-Fos 蛋白的表現還要迅速，並可作為中樞敏感化現象的生化指標(Gao and Ji, 2009)。近年來更發現 pERK 不僅在脊髓背角神經可作為中樞敏感化的指標外，在背根神經節也可以作為周邊敏感化的指標(Dai et al., 2002)；而在大腦的某些核區如前扣帶迴皮質(anterior cingulate cortex, ACC)、島狀皮質(insular cortex, IC)、杏仁體中央核(central nucleus of amygdala, CeA)等，其 pERK 的表現也與不同種類的疼痛有關(Alvarez et al., 2009; Carrasquillo and Gereau, 2007; Wei and Zhuo, 2008)。

1.5 研究目的

神經病變性疼痛的臨床症狀有自發性疼痛、觸感痛及痛覺過敏等現象，其中觸感痛造成病人生活極大的困擾，因為原本不會痛的輕觸覺刺激現在卻造成疼痛；而觸感痛使腦部產生了什麼變化，目前還沒有清楚的結論。我們假設觸感痛



會造成腦部神經的活動量產生變化，而使用 FDG 配合正子斷層造影，可以由葡萄糖代謝率的改變來推測腦部的功能性變化；我們另使用臨床上治療神經病變性疼痛的藥物 GBP，比較止痛後的腦部發生了什麼樣的功能性變化。除了影像學的方法外，我們也使用免疫組織化學的方法，來偵測輕觸覺刺激下腦中部分核區的神經活化分子標誌的變化，以及 GBP 止痛後對這些核區的影響。本論文的實驗可分為三個部分，第一部分為建立神經病變性疼痛的動物模式，並記錄疼痛的症狀以及找出合適的 GBP 止痛劑量。第二部分為對清醒神經損傷大鼠的腳掌給予輕觸覺刺激，比較觸感痛反應下大鼠腦中的功能性變化，以及給予 GBP 後，比較止痛後的腦部產生了什麼樣的功能性變化。第三部分為使用免疫組織化學來偵測輕觸覺刺激下神經損傷大鼠腦中的 pERK 及 c-Fos 變化，以及給予 GBP 止痛後，腦中的 pERK 及 c-Fos 產生什麼改變，是否與正子斷層造影的影像有相關性，以確定腦部哪個核區與觸感痛有關。

第二章、神經損傷大鼠的疼痛行為指標與 gabapentin 的藥效測試



2.1 前言

神經病變性疼痛的症狀有自發性及誘發性疼痛，誘發性疼痛又可區分為對原本不會產生疼痛的輕微刺激所導致的疼痛(如觸感痛)，以及對原本就會疼痛的刺激呈現更強烈的痛覺(稱為痛覺過敏)。以大鼠作為神經病變性疼痛動物模式，可藉由測定大鼠對於傷害性刺激的行為反應來推測大鼠具有痛覺(Sandkuhler, 2009)。但大鼠無法像人類一樣可透過言語表達是否有自發性疼痛，因此尋找合適的自發性疼痛行為指標是重要卻困難的工作。有關周邊神經損傷大鼠的自發性疼痛行為指標，早期常見的有疼痛處的保護行為(guarding behavior) (Mao et al., 1992)，或異常的抬腳行為(lifting behavior) (Choi et al., 1994)，但這些行為是否能代表自發性疼痛行為還有不少爭論。King et al. (2009)採用操作制約學習(operant conditioning)中的負增強(negative reinforcement)方法，利用可自由選擇的場所，提供神經病變性疼痛大鼠逃離持續性的自發性疼痛的嫌惡刺激(aversive stimulus)，是目前認為能代表自發性疼痛行為的指標(He et al., 2012; King et al., 2009; Qu et al., 2011)。本研究即採用這種位置偏好制約實驗(conditioned place preference, CPP)來測定神經損傷大鼠的自發性疼痛行為。

Gabapentin (GBP)為目前臨床上治療神經病變性疼痛病人的第一線藥物(Finnerup et al., 2005)。使用 GBP 作為神經病變性疼痛大鼠的止痛藥已有不少報告發表，但各篇報告的使用劑量及止痛效果存在差異(Abdi et al., 1998; Back et al., 2004; Erichsen and Blackburn-Munro, 2002; Field et al., 1999b; Hama and Borsook, 2005; Kayser and Christensen, 2000)。為了建立本研究所使用的最佳劑量及作用時效，我們測試了 GBP 不同劑量的止痛效果；此外為了解 GBP 的不同劑量是否會造成大鼠的運動失調(ataxia)的現象，我們也測試了大鼠在注射 GBP 後的平衡運動功

能。本章的研究乃為建立神經病變性疼痛的大鼠模式，其不同的疼痛行為指標與 GBP 的藥效測試，以作為後續研究的基本資料。



2.2 材料與方法

2.2.1 實驗動物


本研究使用的實驗動物均為雄性 Sprague-Dawley (SD) 品系大鼠。SD 大鼠購買自樂斯科(BioLASCO)生物科技股份有限公司。每隻大鼠自運抵實驗室後，即飼養在台灣大學生命科學館的動物房內，並至少經過一週的適應之後才開始進行實驗。每 2 至 3 隻大鼠飼養在同個鼠籠內，並充分提供食物及飲水。動物房的光暗週期各為 12 小時，恆溫控制在 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 。所有實驗動物操作均遵照台灣大學實驗動物管理與使用規範。

2.2.2 動物模式建立

本研究使用的神經病變性疼痛動物模式為大鼠的坐骨神經分支選擇性傷害(簡稱 SNI)模式(Decosterd and Woolf, 2000)。進行 SNI 手術前，以腹腔注射 65 mg/kg pentobarbital 誘導麻醉後，將大鼠的左後腳剃毛，固定在鼠板上。以 70% 酒精及優碘先後消毒後，切開皮膚與肌肉，暴露出坐骨神經及其分支。以玻璃鉤仔細分出脛神經及腓總神經，在遠心端處以 6-0 絲線結紮並切斷，保留腓腸神經完整。手術後依序縫合肌肉與皮膚，以優碘消毒後，將大鼠放在熱燈下維持體溫，等待其甦醒。將手術後大鼠送回動物房後，連續三天每日檢查傷口復原情況。我們另作假手術(Sham)的老鼠作為對照組，假手術的作法與 SNI 大致相同，惟在暴露坐骨神經後即縫合，並未傷害坐骨神經及其分支。

2.2.3 觸感痛行為測定

為了確定 SNI 大鼠是否具有觸感痛，我們使用購買自 North Coast Medical 公



司的 von Frey hairs 來測定大鼠的觸覺閾值。八週齡的雄性 SD 大鼠(體重約 300 克),隨機分配為 SNI 組(n=6)及 Sham 組(n=6)。我們選用 8 支不同克數的 von Frey 尼龍製細毛棒,分別為 0.4、0.6、1、2、4、6、8、15 克。行為測試前,大鼠先移至透明壓克力籠中,其底部為不鏽鋼製網格地板,可供細毛棒穿過並刺激大鼠的後腳掌外側部位,即腓腸神經支配的區域。為避免大鼠在測試籠中躁動,至少需在開始測試前 15 分鐘放入大鼠,使其適應環境並保持清醒靜止的狀態。行為測試開始時,先以 2 克的細毛棒接觸後腳掌,再使細毛棒彎曲以傳遞足夠的刺激強度,並保持彎曲狀態 6 至 8 秒,若大鼠快速地縮起後腳掌,間隔約 5 秒後則以 1 克的細毛棒刺激;若大鼠對 2 克的細毛棒刺激沒有反應,間隔約 5 秒後繼續以 4 克的細毛棒刺激;此即為 up-down 方式(Dixon, 1980)。當找出大鼠後腳掌對細毛棒刺激的縮腳克數時,在此克數刺激上下再反覆測試 4 次,可得到閾值刺激的反應模式,查 Chaplan et al. (1994a)的附表後將此模式的值帶入下述公式計算:

$$50\% \text{ g threshold} = (10^{[Xf + \kappa\delta]}) / 10000$$

Xf 為最後一次測試所使用的 von Frey hair 克數(換算為 log 表示);

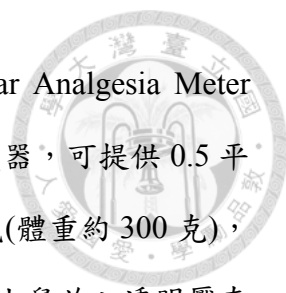
κ 為閾值刺激模式的查表值;

δ 為所選用 von Frey hairs 克數差的平均值(換算為 log 表示),在此為 0.225。

每隻大鼠的左右後腳掌各作三次測定,取其平均值作為 50%縮腳閾值的所需強度(克數)。為評估神經損傷疼痛的發展過程,不同處理組的大鼠皆在手術前 1 日,手術後第 3、5、7、14 日等測定機械性觸感痛程度。

2.2.4 熱痛覺過敏行為測定


為了確定 SNI 大鼠是否具有痛覺過敏的現象,我們使用輻射熱(radiant heat)刺



激來測定大鼠的熱痛覺過敏行為(Hargreaves et al., 1988)。Plantar Analgesia Meter (Model 390)購買自 IITC 公司，為一可調整輻射熱刺激強度的儀器，可提供 0.5 平方公分的橢圓形光斑產生穩定的熱刺激。八週齡的雄性 SD 大鼠(體重約 300 克)，隨機分配為 SNI 組(n = 6)及 Sham 組(n = 6)。在行為測試前，將大鼠放入透明壓克力籠中，其底部為恆溫控制的樹脂玻璃板，其溫度可控制在 30°C，與大鼠的腳掌溫度相同(Dirig et al., 1997)。為避免大鼠在籠內躁動，至少需在開始測試前 20 分鐘放入大鼠，使其適應環境並保持清醒靜止的狀態。行為測試開始時，令輻射熱的光斑刺激大鼠的後腳掌外側(腓腸神經支配部位)，記錄其縮腳的時間差(latency)，若此時間差超過 20 秒大鼠仍未縮腳，則儀器會自動切斷輻射熱刺激，以避免組織傷害；每次刺激的間隔時間至少 5 分鐘，以避免腳掌組織的傷害(Dirig et al., 1997)。每隻大鼠的左右後腳掌各作五次測定，取其平均值作為熱刺激縮腳的閾值時間。為評估神經損傷疼痛的發展過程，此熱痛覺過敏的測定日程如同觸感痛測定的日程。為避免熱痛覺過敏的結果影響觸感痛實驗，每次測定日程皆先完成觸感痛實驗，再進行熱痛覺過敏實驗。

2.2.5 自發性疼痛行為測定

為評估 SNI 大鼠是否有自發性疼痛現象，我們使用位置偏好制約(CPP)實驗來記錄大鼠的行為。CPP 實驗改良自 Sufka (1994)及 King et al. (2009)。CPP 行為箱為一長方形的壓克力箱，長 70 公分，寬 22 公分，高 30 公分，有兩個隔板，共分為三個區域。中間為灰色牆面的中性區(neutral room)，長 10 公分，並有兩扇拉門通往左右的選擇區。兩側的選擇區除了大小相同外(長均為 30 公分)，其牆面(黑白直條紋或橫紋)與地板(光滑或有均勻分布的孔洞)可將此二區域作一明顯的區別。八週齡的雄性 SD 大鼠(體重約 300 克)，隨機分配為 SNI 組(n = 6)及 Sham 組(n = 3)，大鼠在手術後 7 天進行 CPP 實驗。CPP 實驗包括連續三天的環境適應期，第四天的藥物與環境配對及第五天的位置偏好選擇。CPP 實驗皆在白天期間進行(上午 9




點至下午 4 點)。在前三天的環境適應期，每隻大鼠每天進入 CPP 行為箱中自由探索 30 分鐘，並無使用拉門阻擋。在第三天的自由探索中，前 15 分鐘記錄大鼠在不同區域的停留時間，作為制約前紀錄。若在此制約前紀錄中受測鼠有明顯的偏好某個區域(停留超過 80%時間，即 12 分鐘)，此受測鼠將排除不作後續實驗。在第四天的藥物與環境配對中，上午時受測鼠以腹腔注射生理食鹽水(vehicle，體積為 1 ml/kg)後，隨機放入某個選擇區中 30 分鐘，並將拉門關閉。4 小時後，受測鼠以腹腔注射 GBP (100 mg/kg)後，隨即放入另一個選擇區中 30 分鐘，並將拉門關閉。第五天，即注射 GBP 20 小時後，讓受測鼠在 CPP 行為箱中自由活動，並記錄 15 分鐘大鼠在不同選擇區中的停留時間。

2.2.6 GBP 藥效測試

為測試 GBP 的止痛效果，我們選用不同的劑量，並配合觸感痛行為測試，來確定 GBP 的止痛藥效。試藥級(純度 98%以上)的 GBP 購買自 TCI 公司(Tokyo Chemical Industry Co., Ltd; Japan)，使用前溶於無菌生理食鹽水中。我們以生理食鹽水、10 mg/kg、30 mg/kg、60 mg/kg 及 100 mg/kg 五種劑量測試 SNI 大鼠的縮腳閾值變化，每個劑量用 4 隻雄性 SNI 大鼠(體重約 300 ~ 400 克)為測試對象。測試的時程共 3 小時，分別在打藥前及打藥後 30、60、90、120、150 及 180 分鐘分別測試大鼠的縮腳閾值，每隻大鼠在每個時間點共測 3 次，每次測量間隔時間為 3 分鐘(Park et al., 2010)。

2.2.7 運動平衡感測試

為確認我們所使用的劑量是否會使大鼠有運動失調的現象，我們也測量了大鼠在滾筒式跑步機上的平衡感與動作協調性(Hamm et al., 1994)。滾筒式跑步機(single lane rotarod, MK-630B)購買自日本的 Muromachi Kikai 公司。我們一樣採用生理食鹽水、10 mg/kg、30 mg/kg、60 mg/kg 及 100 mg/kg 五種劑量來測試大鼠在



滾筒式跑步機上的停留時間，每個劑量用 4 隻雄性 SNI 大鼠(體重約 300~400 克)。測試的時間點如同 GBP 藥效測試，在給藥前及給藥後每隔 30 分鐘測試，一直到 3 小時後。滾筒式跑步機的測試條件為定速 15 rpm 的轉速，看大鼠能否在滾筒上維持 150 秒鐘而不掉落。若大鼠在 150 秒內掉落則記錄掉落時間；若大鼠持續跑步到 150 秒而不掉落，就停止測試並將大鼠放回籠子中。每個時間點每隻大鼠共測 3 次，每次測試間隔時間為 3 分鐘(Park et al., 2010)。

2.2.8 統計分析

本研究的統計分析，均使用 SigmaStat 3.1 的軟體進行計算。在觸感痛測定的結果分析，SNI 組及 Sham 組的同側(手術側)及對側腳掌的縮腳閾值分別以重複取樣單因子等級變異數分析(one-way repeated measures of ANOVA on ranks)進行統計分析，若結果顯示有差異時再進行事後(post hoc)檢定，事後檢定採用 Tukey 方式檢定，並設 $p < 0.05$ 為顯著差異。單側腳掌的閾值變化皆對手術前的基準值作比較。在熱痛覺過敏測定的結果分析，SNI 組及 Sham 組的同側(手術側)及對側腳掌的縮腳時間差分別以單因子重複取樣變異數分析(one-way repeated measures of ANOVA)進行統計分析，若結果顯示有差異時再進行事後檢定，事後檢定採用 Tukey 方式檢定，並設 $p < 0.05$ 為顯著差異。在自發性疼痛的結果分析，SNI 組及 Sham 組的不同環境配對結果以 paired t-test 檢定，並設 $p < 0.05$ 為顯著差異。在 GBP 藥效試驗的結果分析，同一劑量的不同時間縮腳閾值變化，採用與觸感痛測定的相同分析方法，而事後檢定為不同時間點對施打藥物前的基準值作比較，並設 $p < 0.05$ 為顯著差異。在運動平衡感的結果分析，以單因子重覆取樣變異數分析(one-way repeated measures of ANOVA)進行檢定，若有差異時再進行事後檢定，採用 Tukey 方式，以 $p < 0.05$ 設為顯著差異。統計分析之後的結果，若無特別註明，皆以平均值(mean) ± 標準差(standard deviation, SD)呈現。



2.3 結果

2.3.1 觸感痛行為

周邊神經病變性疼痛通常肇因於周邊神經受到傷害所產生的疼痛，SNI 模式乃利用手術結紮並切除坐骨神經的兩個分支，因此在 SNI 手術之後，大鼠的確表現出神經病變性疼痛的症狀。我們使用 von Frey hairs 測試大鼠的縮腳閾值變化。如圖 2-1，在 SNI 組中，手術側的後腳掌縮腳閾值，從手術前的 14.2 克，在手術後第三天就降到 2.7 克，並在手術後兩週內維持在 3 克以下；與手術前的閾值比較，這個降低的縮腳閾值具有顯著差異($p < 0.01$)。而在 SNI 組的手術對側腳掌，及 Sham 組的兩側腳掌縮腳閾值，在手術前後並沒有明顯變化，也沒有統計上的差異。可知 SNI 手術引發了穩定且明顯的觸感痛行為。

2.3.2 熱痛覺過敏行為

神經損傷大鼠除了觸感痛行為外，也會表現出痛覺過敏的行為。我們以輻射熱刺激來測試大鼠的縮腳反應。在調整適當的輻射熱強度下，讓正常大鼠的縮腳閾值時間約為 10 ~ 12 秒。如圖 2-2，在 SNI 組中，手術側的縮腳閾值時間，從手術前的 11.7 秒，在手術後第三天就降到 7.5 秒，並在手術後兩週內維持在 7.5 秒以下；與手術前的縮腳閾值時間比較，這個降低的閾值時間差(4 ~ 5 秒)具有顯著差異($p < 0.05$)。而在 SNI 組的手術對側腳掌，及 Sham 組的兩側腳掌縮腳閾值時間，在手術前後並沒有統計上的差異。可知 SNI 手術引發了穩定且明顯的熱痛覺過敏。

2.3.3 自發性疼痛行為

SNI 組及 Sham 組大鼠在藥物(GBP)與環境配對 20 小時後，讓大鼠自由選擇是否有環境偏好性行為。結果如圖 2-3 所示，SNI 組大鼠對 GBP 配對房間(選擇區)的停留時間(283 ± 77 s)比生理食鹽水配對房間的停留時間(100 ± 24 s)還長，並有統計上的顯著性($p < 0.05$)；而 Sham 組大鼠對 GBP 配對房間的停留時間(188 ± 38 s)



與生理食鹽水配對房間的停留時間(151 ± 39 s)相比並沒有明顯的差異。由 SNI 組大鼠偏好 GBP 配對房間的行為顯示 SNI 組大鼠具有自發性疼痛現象。

2.3.4 GBP 止痛效果

以腹腔注射不同劑量的 GBP 在 SNI 大鼠體內，可見 GBP 的止痛效果有劑量依賴性(dose-dependent)的結果，如圖 2-4 所示。在注射生理實驗水、10 mg/kg 及 30 mg/kg 的劑量下，GBP 並沒有止痛的效果。而注射了 60 mg/kg 的 GBP，在注射後 60 分鐘，其對 von Frey hairs 的縮腳閾值從注射前的 4.1 克上升到 9.2 克，具有顯著的差異($p < 0.05$)，並能維持到注射後 90 分鐘還有顯著的止痛效果。而注射 100 mg/kg GBP 的大鼠，其明顯的止痛效果也自注射後 60 分鐘開始，並一直維持到注射後 120 分鐘還是具有顯著的止痛效果。因此我們在後續的實驗將採用 100 mg/kg 的劑量來作為有效的止痛劑量。

2.3.5 運動平衡感

為了解 GBP 是否有明顯的副作用，如有運動失調的行為，我們也注射不同劑量的 GBP，來看大鼠在滾筒式跑步機上的維持時間。如圖 2-5，由實驗結果顯示，不同劑量的 GBP 並不會明顯影響大鼠在滾筒式跑步機上的維持時間，因此我們選用的 100 mg/kg 並不會對老鼠造成運動功能失調的副作用。

2.4 討論


周邊神經損傷會引發神經病變性疼痛。我們以大鼠的坐骨神經部分損傷為模式，在切斷脛神經及腓總神經三天後，神經損傷大鼠即表現出神經病變性疼痛的症狀，包括自發性疼痛、觸感痛及熱痛覺過敏等現象，且這些症狀至少可以穩定地持續兩週。給予神經損傷大鼠適當劑量的 GBP 止痛後，自發性疼痛及觸感痛的現象能暫時性緩解。由這些疼痛行為指標顯示，SNI 手術成功地引發大鼠神經病變



性疼痛。


觸感痛是神經病變性疼痛的主要症狀之一。觸感痛指的是原先不會引發疼痛的觸覺刺激，在周邊神經損傷之後，相同的刺激卻開始引發疼痛。由於疼痛在周邊神經系統，是由初級痛覺神經(A δ 及 C 纖維細胞)將傷害性訊息編碼(encode)而傳遞，因此觸感痛是因高閾值(high threshold)的初級痛覺神經改變了細胞特性變為低閾值，而開始將觸覺訊息編碼而傳遞？或是由負責觸覺訊息的低閾值的 A β 細胞，在中樞神經系統興奮了第二級的痛覺神經？目前的研究顯示觸感痛主要是由 A β 細胞傳遞的觸覺訊息，在周邊神經損傷造成中樞敏感化後，興奮了脊髓背角的痛覺神經(Campbell et al., 1988; Devor, 2009; Gracely et al., 1992; Liu et al., 2000; Ossipov et al., 1999; Shir and Seltzer, 1990)。A β 細胞如何將觸覺訊息興奮痛覺神經，目前的解釋包括 A β 細胞的中樞突起會萌生新的分支分布在脊髓背角表淺層的第二級痛覺神經，以及 A β 細胞的表型轉換等現象(Devor, 2009; Lekan et al., 1996; Noguchi et al., 1995; Weissner et al., 2006; Woolf et al., 1992; Woolf et al., 1995)；但因觸感痛反應可在神經損傷後 24 小時即明顯出現(Liu et al., 2000)，且有報告指出表型轉換的 A β 細胞並不會造成觸感痛(Hughes et al., 2007)，而破壞 A β 軸突上行的路徑(dorsal column tract)也能有效減輕觸感痛(Back et al., 2003; Sun et al., 2001)，因此有關 A β 細胞造成觸感痛的機制仍有待研究。由於觸感痛的發展快速，可穩定維持長時間，以及測試方便等原因，在本論文後續的實驗皆以測試觸感痛行為來確認大鼠是否具有神經病變性疼痛。

痛覺過敏也是神經病變性疼痛的主要症狀之一。我們以輻射熱刺激來測試神經損傷大鼠的痛覺過敏行為，結果神經損傷大鼠對固定強度的輻射熱刺激的反應時間變短，顯示大鼠有熱痛覺過敏現象。與 A β 細胞負責傳遞觸感痛訊息不同，熱痛覺過敏行為是由 C 纖維細胞負責傳遞(Field et al., 1999a; Ossipov et al., 1999; Shir



and Seltzer, 1990)。在新生鼠皮下注射辣椒素(capsaicin)，或在成年大鼠皮下注射神經毒素 resiniferatoxin (RTX，辣椒素受器 TRPV1 致效劑)，都能造成 C 纖維退化，且對傷害性熱刺激變得不敏感。由於 C 纖維退化使大鼠對熱痛刺激不敏感，卻仍保有觸感痛反應，可知 A β 細胞負責觸感痛反應(Field et al., 1999a; Ossipov et al., 1999; Shir and Seltzer, 1990)。Decosterd and Woolf (2000)建立了 SNI 模式，但他們在測試熱痛覺過敏反應時，卻宣稱 SNI 模式沒有熱痛覺過敏。我們在測試 SNI 模式時，結果有明顯的痛熱覺過敏反應，這之間的差異可能在於測試方法的不同。雖然 Decosterd and Woolf 及我們都使用輻射熱刺激的方法，但 Decosterd and Woolf 可能沒有調整輻射熱刺激的強度，因此大鼠的縮腳閾值時間都在 5 秒以內，這樣短的反應時間在 SNI 組及 Sham 組之間容易造成沒有統計上的差異；若將輻射熱強度調整到如 Hargreaves et al. (1988)測試的正常大鼠反應時間(約 10 ~ 12 秒)，較能夠清楚顯示熱痛覺過敏現象。

自發性疼痛是神經病變性疼痛病人的主訴症狀之一，但神經病變性疼痛的實驗動物模式卻無法表達自發性疼痛，只能由研究者依據一些異常的行為來推測動物具有自發性疼痛。CPP 實驗採用操作制約學習的方式，可以清楚表示動物具有自發性疼痛。我們使用 CPP 實驗來偵測 SNI 大鼠是否有自發性疼痛行為，由 SNI 大鼠偏好選擇與止痛藥 GBP 配對的房間，顯示神經損傷大鼠應具有自發性疼痛。藉由 CPP 實驗，除了可顯示神經損傷大鼠具有自發性疼痛(King et al., 2009)，還能夠顯示自發性疼痛來自於表現 TRPV1 的痛覺神經，而不是來自於 A β 細胞的異常活動(King et al., 2011)。破壞 ACC 的神經元可以去除自發性疼痛，顯示自發性疼痛與內側痛覺路徑有關(Qu et al., 2011)。在本研究中，我們的實驗設計與其它研究者的作法有部分不同。在 King et al. (2009)的實驗中，止痛藥物 clonidine (腎上腺素 α 2 受器致效劑)是以脊髓腔給藥的方式作用，我們則以腹腔注射 GBP 作為止痛方式。由我們的 GBP 藥效測試，在腹腔內注射 GBP 30 分鐘後觸覺閾值的變化尚未有顯



著差異，儘管我們只讓大鼠在注射 GBP 後與環境配對 30 分鐘，但結果仍顯示 SNI 大鼠明顯的偏好 GBP 配對的房間($p = 0.047$)，表示 GBP 可用來抑制自發性疼痛，這個結果與 Suzuki and Dickenson (2006)相符；若以脊髓腔給藥的方式注射 GBP，選擇偏好的行為應可更明顯。

我們測試不同劑量的 GBP 對觸感痛的止痛作用，結果顯示 60 mg/kg 及 100 mg/kg 可有效地抑制觸感痛反應，這個結果與其它報告的結果相符(Erichsen and Blackburn-Munro, 2002; Field et al., 1999b; Hama and Borsook, 2005)。由於 60 mg/kg 的 GBP 雖然在注射 1 小時後可顯著抑制觸感痛，但它的藥效只維持 30 分鐘(圖 2-4)，這段時間不足以提供正子造影前的 FDG 分布期間的止痛作用，因此我們選擇 100 mg/kg 為後續研究的劑量。但需注意的是，100 mg/kg 的 GBP 可能只適用於周邊神經損傷的成年大鼠，不同的實驗動物模式及不同週齡的大鼠可能會有不同的效果；最近我們嘗試給予 6~7 週齡的雄性 SD 大鼠(體重約 220 克)注射 100 mg/kg GBP，結果 GBP 的止痛作用在注射 30 分鐘後即有顯著效果，且維持 3 小時以上的作用時間，因此在實驗前應作確效(validation)試驗。臨床上接受 GBP 治療神經病變性疼痛的病人較常抱怨的副作用是頭暈及步態不穩(Gilron, 2007; Nicholson, 2000)，我們也測試了 SNI 大鼠在注射不同劑量的 GBP 後，其在滾筒式跑步機上的運動功能，結果顯示即使是 100 mg/kg 的劑量也不會明顯的影響大鼠的運動功能，因此我們使用 100 mg/kg 的劑量是合理的有效止痛劑量。

本章的工作在於建立神經病變性疼痛的大鼠模式，我們的結果顯示 SNI 大鼠具有自發性疼痛、觸感痛及熱痛覺過敏，而止痛藥 GBP 可有效緩解這三種症狀。由於觸感痛是臨床病人常抱怨的症狀，且目前對觸感痛在腦中引起的功能性變化還不清楚，因此在後續的研究中我們將聚焦在觸感痛對神經損傷大鼠腦部的影響。


第三章、神經損傷大鼠在觸感痛狀態下的腦部葡萄糖代謝率變化與 gabapentin 止痛的作用位置



3.1 前言

神經病變性疼痛的症狀包括自發性疼痛、觸感痛及痛覺過敏。觸感痛是指原先不會感到疼痛的觸覺刺激，但在周邊神經損傷之後，卻會對輕觸覺刺激感到疼痛。觸感痛嚴重的病人，例如患有皰疹後神經痛(postherpetic neuralgia)的病人，連日常生活中的穿衣服或吹到冷風都會感到疼痛(Schmader, 2001)。雖然觸感痛的機制與周邊感覺神經 A β 細胞的形態及功能轉變有關(Devor, 2009)，但觸感痛在腦中造成了什麼影響，目前的了解仍有限。Gabapentin (GBP)是治療神經病變性疼痛的第一線藥物，先前的研究指出 GBP 的止痛作用主要在中樞神經系統，特別是脊髓上位(supraspinal)的部分(Abdi et al., 1998; Kayser and Christensen, 2000)；但 GBP 在腦中能結合許多核區(Hill et al., 1993; Thurlow et al., 1996)，哪個核區與 GBP 的止痛作用有關，目前也沒有清楚的答案。

現代的大腦影像技術，如功能性磁振造影(fMRI)或正子造影(PET)，是研究疼痛在腦中運作方式的重要工具(Apkarian et al., 2005; Kupers and Kehlet, 2006; Thompson and Bushnell, 2012)，也可以用來篩選合適的止痛藥物(Governo et al., 2008; Hooker et al., 2014; Iannetti et al., 2005; Jones et al., 2009)。對疼痛動物模式進行臨床前研究(preclinical study)來說，功能性磁振造影雖然能提供較佳的時間及空間解析度，但由於掃描過程動物必須麻醉，若此時給予疼痛刺激，其腦中偵測到的訊號，如血氧濃度相依(BOLD)訊號，可能就無法反映出實際上的腦部反應；相反地，正子造影可以反映動物對於疼痛刺激的腦部反應，雖然在掃描過程動物一樣要麻醉，可是在核醫藥物注射到動物體內後，有一段時間動物是維持清醒的，並可以接受適當的刺激(Chen et al., 2010; Kobayashi et al., 2013; Ohashi et al., 2008; Ono et al., 2012; Romero et al., 2011; Shih et al., 2008; Thanos et al., 2013; Thompson



et al., 2014)。以 FDG 來說，FDG 是葡萄糖的類似物，可作為葡萄糖代謝率的功能性標誌；當 FDG 注射到動物體內，有 30 ~ 60 分鐘的時間讓組織吸收 FDG，這段期間可以給予動物疼痛刺激。當動物腦部因疼痛刺激而產生反應時，腦中局部的神經元會增加葡萄糖攝取作為能量來源(Chih et al., 2001)，因而可以吸收到更多的 FDG。因此使用 FDG 搭配正子造影(FDG-PET)，可以了解特定行為與腦部葡萄糖代謝率的關連性。

最近 Kim et al. (2014)及 Thompson et al. (2014)等學者利用 FDG-PET 偵測神經損傷大鼠腦中的局部葡萄糖代謝率，但他們的報告為自發性疼痛的腦部反應，關於觸感痛在神經損傷大鼠腦中的反應目前仍不清楚。為了解觸感痛在神經損傷大鼠腦中的葡萄糖代謝率有什麼變化，而在 GBP 止痛作用下，腦中又發生了什麼改變，我們使用 FDG-PET 來研究神經損傷大鼠在觸感痛狀態下的腦部活性變化，以及 GBP 止痛的可能作用位置。

3.2 材料與方法

3.2.1 動物模式

六週齡的雄性 SD 大鼠(體重約 200 g)購買自樂斯科公司，在動物房中飼養一週後進行實驗。本研究共使用 22 隻大鼠，隨機分配為實驗組(SNI, n = 12)及對照組(Sham, n = 10)。我們採用 SNI 模式(Decosterd and Woolf, 2000)為神經病變性疼痛模式(參考第二章)，作法概述如下：在 ketamine (75 mg/kg)及 xylazine (15 mg/kg)混合麻醉藥的誘導麻醉下，將大鼠左後腳的坐骨神經分支脛神經及腓總神經結紮並切斷，保留腓腸神經完整，而後分別縫合肌肉與皮膚；對照組則是暴露坐骨神經及分支後，維持完整並縫合肌肉與皮膚。

3.2.2 觸感痛測試

為確定 SNI 手術後，大鼠具有神經病變性疼痛，我們使用 von Frey hairs 測試大鼠的縮腳閾值。我們採用 up-down 方法(Dixon, 1980)進行測試，但使用的 von Frey hairs 有局部調整。我們選用 8 支不同克數的 von Frey 尼龍製細毛棒，分別為 0.6、1、2、4、6、8、15、26 克。行為測試由 2 克細毛棒開始，待找到會使大鼠縮腳的克數之後，再反覆測試四次。反應紀錄一樣經由計算得到大鼠的 50%縮腳閾值(Chaplan et al., 1994a)。每隻大鼠的左右後腳掌各作三次測定，取其平均值作為 50%縮腳閾值的克數。為評估神經損傷疼痛的發展過程，及避開正子造影的日期，不同處理組的大鼠皆在手術前 2 日，手術後第 3、5、8、14 日等測定機械性觸感痛程度(圖 3-1A)。

3.2.3 實驗設計

SNI 組及 Sham 組的大鼠皆進行相同的掃描程序。每一隻大鼠共接受 3 次掃描，分別為手術前 1 天、手術後(術後第 7 天)及施打 GBP 後(術後第 10 天)(圖 3-1A)。掃描的流程如圖 3-1B 所示，由尾靜脈打入 FDG 後，有 40 分鐘的時間讓 FDG 在大鼠體內分布吸收。打入 FDG 的時間設為起始時間，並將大鼠放置於透明壓克力製，底部是不鏽鋼網格的籠子中。10 分鐘後，我們給予大鼠 6 克 von Frey 細毛棒的機械性刺激，刺激的位置為手術側的左後腳掌外側，刺激頻率為每 5 秒鐘 1 次，每次維持約 1 秒鐘，共持續 20 分鐘，即總共刺激 240 次。選擇 6 克細毛棒的理由是大鼠經過 SNI 手術後，其神經損傷側(左側)後腳的縮腳閾值降到 4 克以下，因此給予 6 克細毛棒的刺激會引發 SNI 大鼠的觸感痛，但 6 克的刺激並不會使 Sham 手術的大鼠感到疼痛。刺激結束後仍讓大鼠在籠中自由活動 10 分鐘，接著即以 isoflurane 麻醉老鼠，開始正子斷層掃描。前兩次掃描，在 FDG 注射前 50 分鐘，大鼠接受腹腔注射生理實驗水；在第三次掃描，老鼠在打入 FDG 前 50 分鐘，即先在腹腔注射 100 mg/kg 的 GBP，由我們的藥效試驗結果(參考第二章)，在 FDG

分布老鼠體內的這段期間，GBP 可有效的維持其止痛效果。每次在掃描前所進行的機械性刺激，我們記錄了老鼠的縮腳次數，以推測其行為與正子斷層掃描結果的關係。




3.2.4 正子造影流程

動物正子斷層掃描使用的儀器為購買自奇異亞洲醫療設備股份有限公司的 eXplore Vista PET/CT 微型正子斷層掃描儀(圖 3-2A)，此正子造影儀器可提供大、小鼠正子斷層造影(PET)及 X 光電腦斷層掃描(computed tomography, CT)影像。正子斷層掃描儀的影像擷取範圍(field of view, FOV)為 4.7 公分，總切片數為 61 張，每張切片間隔 0.775 mm，每張切片含有 175×175 個立體像素(voxel)。造影後得到的原始影像數據利用 3D OSEM (orders subset expectation maximization)進行影像重建，其立體像素尺寸為 $0.387 \times 0.387 \times 0.775 \text{ mm}^3$ 。我們使用的核醫藥物為 ^{18}F -fluorodeoxyglucose (FDG)，此為葡萄糖的類似物，其標定的放射性核種 ^{18}F 乃由台大醫院核子醫學部小型迴旋加速器(cyclotron)所生產，半衰期為 109 分鐘。大鼠在進行正子造影前，先給予 10 至 16 小時左右的禁食，以增加 FDG 的利用率。待隔日掃描程序開始時，先以 5% isoflurane 使大鼠短暫麻醉，將放射活度約 2~2.5 mCi 的 FDG 經由尾靜脈進行靜脈注射，然後將大鼠放置於壓克力製的籠子內，待其清醒之後，依流程測定縮腳行為(圖 3-1B)。接著以 3% isoflurane 麻醉大鼠，將大鼠頭部安置於通有相同劑量麻醉氣體的頭部固定架(head folder)中(圖 3-2B)，以避免掃描過程中頭部晃動造成的影像模糊問題。之後進行 40 分鐘的正子造影，結束後又進行約 7 分鐘的 CT 掃描，以得到對應的頭骨影像，供之後影像位置調整使用(圖 3-3A)。

3.2.5 影像分析

正子造影的影像分析使用立體像素基準統計分析(voxel-based statistical



analysis)方法，此方法可以找出 SNI 及 Sham 組腦中有顯著差異的立體像素所在核區，概略步驟如圖 3-3 所示。立體像素基準統計分析需要有 PET 影像，以及磁振造影(magnetic resonance imaging, MRI)得到的腦部解剖影像。我們使用 Windows 作業系統的免費軟體 MIPAV (Medical Image Processing, Analysis and Visualization, version 4.1.2, Center for Information Technology, National Institutes of Health, USA)及 SPM (Statistical Parametric Mapping, version 8, Wellcome Trust Centre for Neuroimaging, Institute of Neurology, UCL, United Kingdom)作影像分析的前處理(圖 3-3B)。前處理步驟包括：(1) 將 PET 影像，CT 影像，以及 MRI 影像重新排列到一標準座標軸，此標準座標軸為 Schweinhardt et al. (2003)提供的大鼠腦部 MRI 模板(T2-weighted MRI template)。本研究所使用的大鼠腦部 MRI 影像取自本實驗室的資料庫，MRI 影像選取的方式為利用每隻大鼠的 CT 頭骨影像，與 MRI 的腦部解剖影像配對外形與大小，找出最契合的頭骨與腦部輪廓，以此作為後續影像前處理的依據。在影像重新排列過程，我們先找到每隻大鼠頭骨的 bregma 作為標記，而對應座標的 MRI 影像為前聯合(anterior commissure)纖維束，因 PET 的座標軸與 CT 的座標軸是相同的，所以我們據此將這三種影像重新排列到標準座標軸。(2) 我們使用 MIPAV 軟體及 MRI 影像，繪製大鼠腦部輪廓的面罩(mask image)，並藉面罩去除 MRI 及 PET 腦部外面的影像，以增加影像對位(image co-registration)的精確度。PET 的每個立體像素可得到 FDG 的標準吸收值(standardized uptake values, SUV)，SUV 值的計算方式如下：

$$SUV = FDG_{\text{voxel}} / (FDG_{\text{dose}} / WT)$$

其中 FDG_{voxel} 為衰減校正後的局部放射性活度(單位為 Bq/ml)；

FDG_{dose} 為注射的放射性活度(單位為 Bq)；

WT 為動物體重(單位為 kg)。



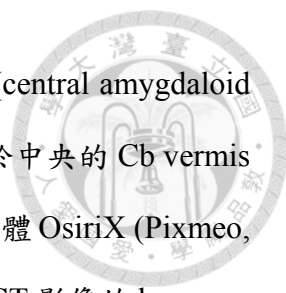
在進行最後的立體像素基準統計分析前，每一次掃描所得的立體像素 SUV 值會對全腦的 SUV 值作標準化(normalization)。標準化的計算方式如下：

$$\text{SUV(normalized)} = \text{SUV(original)} / \Sigma\text{SUV(original)} \times 10^8$$

標準化後的不同次掃描的 SUV 值即可作為統計分析的依據。(3) 最後我們將影像前處理後的 PET 影像，MRI 影像，以及大鼠腦部 MRI 模板，使用 SPM 軟體作影像對位，並重新切割(resliced)影像，使最後的 PET 立體像素尺寸為 $0.2 \times 0.2 \times 0.2 \text{ mm}^3$ 。標準化後的實驗組及對照組 SUV 值可再利用 SPM 軟體作立體像素基準的 t-test 或 ANOVA 檢定。我們以 $p < 0.05$ 作為統計上顯著差異的標準，並設定大於連續 30 個立體像素的影像才顯示分析結果。PET 影像經 SPM 軟體分析後，有顯著差異的影像，依 t-value 的大小以假色色帶(pseudo-color bar)呈現，並套疊(superimposed)在 MRI 影像上，由此可以顯示出哪些核區具有差異。紅色帶表示 FDG 代謝率增加的區域，藍色帶則表示 FDG 代謝率降低的區域。

3.2.6 感興趣區域分析

為了確認立體像素基準統計分析的正確性與一致性，我們另外分析感興趣區域(region of interests, ROIs)的 SUV 值的相對活性變化。選擇分析的 ROIs 為經 SPM 統計分析後影像有顯著差異的位置。這些位置包括屬於大腦皮質的前額葉皮質(medial prefrontal cortex, mPFC)、前扣帶迴皮質(anterior cingulate cortex, ACC)、後扣帶迴皮質(retrosplenial cortex, RSC)、島狀皮質(insular cortex, IC)、初級體感覺皮質的後腳區域(primary somatosensory cortex, hindlimb region, S1HL)、鬍鬚區域(barrel field, S1BF)、上唇區域(upper lip region, S1ULp)、次級體感覺皮質(secondary somatosensory cortex, S2)、初級運動皮質(primary motor cortex, M1)等，屬於丘腦(thalamus)的後側丘腦(posterior nuclear group, Po)、腹後側丘腦(ventral posterior



nuclei, VP), 以及紋狀體(caudate putamen, CPu)、杏仁體中央核(central amygdaloid nuclei, AMY), 與小腦蚓部(cerebellar vermis, Cb vermis)。除了位於中央的 Cb vermis 外, 其餘 ROIs 皆分為兩側分析。我們使用 Mac 作業系統的免費軟體 OsiriX (Pixmeo, Geneva, Switzerland) 圈選 ROIs, 並取得 ROIs 內的 SUV 值。藉由 CT 影像的 bregma, 及 MRI 影像的前聯合纖維束, 我們合併了 3D OSEM 處理的 PET 影像、CT 影像及 MRI 影像, 並依照大鼠腦圖譜(Paxinos and Watson, 2007)的核區位置描繪並圈選 ROIs。每個 ROI 的 SUV 值分別對全腦的平均 SUV 值作標準化, 可得到相對的活化指數(activation index, AI)。AI 的計算公式如下:

$$AI = (\text{sampled ROI SUVs} - \text{average total brain SUVs}) / \text{average total brain SUVs} \times 100\%$$

3.2.7 功能性連結分析

為了解 SNI 大鼠腦中不同的核區, 在 SNI 手術前、手術後及給予 GBP 後, 核區之間的葡萄糖代謝率相關性是否有改變, 我們進行功能性連結分析(functional connectivity) (Bifone et al., 2010)。我們先以大鼠腦圖譜(Paxinos and Watson, 2007)標示的核區來描繪 ROI 面罩, 以建立 ROI 面罩模板。之後將 SUV 值標準化後的 PET 影像, 利用 ROI 面罩模板提取(extracted)標準化後的 SUV 值, 此 SUV 值可代表該核區的 FDG 相對代謝率。不同核區間的 FDG 相對代謝率利用本實驗室發展的 MetLab 程式計算其交互關係矩陣圖(cross-correlation matrix), 主要是分別計算某核區的 FDG 相對代謝率與其它核區相對代謝率之間的皮爾森相關係數(Pearson's correlation coefficient), 與其統計上的顯著性。若兩核區之間有顯著相關性($p < 0.05$), 則會顯示在矩陣圖上, 紅色方塊表示正相關, 藍色方塊表示負相關, 而相關係數的數值(r value)則以假色色帶呈現; 若兩核區之間無顯著相關性, 矩陣圖上顯示為黑色方塊。我們描繪的 ROIs 可分為六個功能群(functional group): 感覺運動

區(sensorimotor area)、基底核區(basal ganglia)、杏仁核與海馬迴區(AMY/Hipp)、邊緣皮質區(limbic cortex)、丘腦區(thalamus)與導水管旁灰質區(PAG)。有關每個區塊詳細的核區順序，如表 3-1 所示。



3.2.8 統計分析

本研究的統計分析，均使用 SigmaStat 3.1 的軟體進行計算。在觸感痛測定的結果分析，SNI 組及 Sham 組的同側(手術側)及對側腳掌的縮腳閾值分別以重複取樣單因子等級變異數分析(one-way repeated measures of ANOVA on ranks)進行統計分析，若結果顯示有差異時再進行事後檢定，事後檢定採用 Tukey 方式檢定，並設 $p < 0.05$ 為顯著差異。單側腳掌的閾值變化皆對手術前的基準值作比較。在正子造影當天 FDG 分布期間進行的機械性刺激，我們將縮腳次數轉換為縮腳比率(withdrawal ratio)，SNI 組及 Sham 組的縮腳比率分別以單因子重複取樣變異數分析(one-way repeated measures of ANOVA)進行統計分析，若結果顯示有差異時再進行事後檢定，事後檢定採用 Tukey 方式檢定，並設 $p < 0.05$ 為顯著差異。在 PET 的影像分析，我們使用 SPM8 作立體像素基準的統計分析，手術前後(第一次及第二次掃描)與注射 GBP 前後(第二次及第三次掃描)分別使用軟體內建的 paired t-test 檢定，並設 $p < 0.05$ 為顯著差異。在 ROI 分析上，我們計算 ROIs 在不同次掃描的 AI 值，並以單因子重複取樣變異數分析(one-way repeated measures of ANOVA)進行統計分析，若結果顯示有差異時再進行事後檢定，事後檢定採用 Tukey 方式檢定，並設 $p < 0.05$ 為顯著差異。統計分析之後的結果，若無特別註明，皆以平均值(mean) ± 標準差(standard deviation, SD)呈現。

3.3 結果

3.3.1 觸感痛行為

為確定大鼠在 SNI 手術後，會顯示觸感痛的行為，我們使用 von Frey hairs 測


試大鼠的縮腳閾值變化。如圖 3-4，在 SNI 組中，手術側的後腳掌縮腳閾值，從手術前的 19.1 克，在手術後第三天就降到 3.3 克，並在手術後兩週內維持在 4 克以下；與手術前的閾值比較，這個降低的縮腳閾值具有顯著差異($p < 0.01$)。而在 SNI 組的手術對側腳掌，及 Sham 組的雙側腳掌縮腳閾值，在手術前後並沒有統計上的差異。可知 SNI 手術引發了穩定且明顯的觸感痛行為。

3.3.2 正子造影前機械性刺激的反應

在 PET 掃描前，由尾靜脈注射 FDG 後，有 40 分鐘的組織吸收時間，大鼠在這段時間內維持清醒，並可對輕觸覺刺激(6 克 von Frey hair)作出反應。如圖 3-5，在 SNI 組中，第一次掃描時(手術前)，大鼠的縮腳比率並不高($2.4 \pm 1.9\%$)；第二次掃描時(手術後第 7 天)，大鼠的縮腳比率明顯大幅增加($17.6 \pm 4.7\%$, $p < 0.01$)，這顯示 SNI 大鼠有明顯的觸感痛反應；第三次掃描時(手術後第 10 天)，當我們在刺激前 1 個小時給予 GBP 後，大鼠的縮腳比率大幅下降($1.4 \pm 1.1\%$, $p < 0.01$)，可知 GBP 的確有效的止痛。在 Sham 組中，這三次掃描前的縮腳比率並沒有明顯差異。

3.3.3 正子造影的結果

為了解觸感痛在神經損傷大鼠腦中的活性變化，以及 GBP 止痛後相關核區的活性改變，我們比較大鼠在觸感痛狀態下的腦中葡萄糖代謝率改變，以及給予 GBP 處理後，大鼠腦中的葡萄糖代謝率變化。神經損傷大鼠腦中的葡萄糖代謝率改變，經由 SPM 分析之後，結果如圖 3-6 所示。我們比較 SNI 手術前後，大鼠接受相同的輕觸覺刺激下的腦部葡萄糖代謝率變化，以及在 SNI 手術後，有無接受 GBP 止痛處理的大鼠腦中的葡萄糖代謝率變化。圖 3-6 為 SNI 組大鼠全腦相對於 bregma (A0) 的不同位置的葡萄糖代謝率改變結果，紅色塊為代謝率增加，藍色塊為代謝率降低。Sham 組大鼠的代謝率分析方式如同 SNI 組，其結果顯示為圖 3-7。



我們挑選部分相同位置且葡萄糖代謝率有明顯改變的冠狀切面圖，配合大鼠腦圖譜(Paxinos and Watson, 2007)的對應位置，比較這些代謝率改變的核區分布位置。在 SNI 組中，比較手術前後的差異(圖 3-8a)，在兩側的 IC (bregma 前 2 mm)、丘腦(bregma 後 3 ~ 4 mm)，及 Cb vermis (bregma 後 12 ~ 13 mm)的代謝率有明顯增加，而右側的 AMY (bregma 後 3 mm)及兩側的 RSC (bregma 後 4 mm)的代謝率有明顯下降。比較給予 GBP 止痛前後的差異(圖 3-8b)，在觸感痛下增加的丘腦及 Cb vermis 的代謝率都明顯下降，且 mPFC (bregma 前 3 mm)及 ACC (bregma 前 2 ~ 3 mm)的代謝率也明顯下降，而左側的 AMY (bregma 後 3 mm)的代謝率則是明顯增加；比較特別的是在 GBP 處理後，屬於體感覺皮質的兩側 S1ULp (bregma 前 2 mm ~ bregma)的葡萄糖代謝率有明顯的增加。在 Sham 組中，比較手術前後(圖 3-8c)或給予 GBP 前後(圖 3-8d)的差異，雖然局部有一些葡萄糖代謝率改變的區域，但大致上改變的範圍相當小。

3.3.4 感興趣區域分析

在 ROI 分析中，我們量化個別核區的相對活性改變，以 AI 值表示改變的百分比，表 3-2 及 3-3 呈現 SNI 組及 Sham 組 ROI 分析的結果。在 SNI 組(表 3-2)，手術前後的比較中，兩側的 IC、左側的 Po 及 VP，以及 Cb vermis 的 AI 值有顯著的增加，而右側的 AMY 及兩側的 RSC，其 AI 值有明顯的降低；在給予 GBP 止痛前後的比較中，兩側的 mPFC、左側的 ACC、兩側的 Po、右側的 VP，以及 Cb vermis 的 AI 值有顯著的下降，而兩側的 S1ULP、兩側的 S1BF、兩側的 S2，以及左側的 AMY，其 AI 值有明顯的增加。在 Sham 組(表 3-3)，雖然 SPM 的結果顯示在手術前後，及給予 GBP 處理前後，局部的腦區有一些葡萄糖代謝率的變化，但 ROI 分析顯示所有的核區 AI 值都沒有明顯的改變。




3.3.5 功能性連結分析

為了解在不同處理狀態下，SNI 組大鼠腦中不同核區的葡萄糖代謝率有無關聯，我們以交互關係矩陣圖呈現核區間的相關性(圖 3-9)。在大鼠未經過 SNI 手術前，輕觸覺刺激在腦中各核區間的相關性不明顯。在 SNI 手術後，輕觸覺刺激引發的觸感痛反應使許多核區之間出現明顯的相關性，特別集中在三個群集(cluster)內，分別是基底核區對邊緣皮質區、基底核區對丘腦區，及丘腦區對邊緣皮質區。在交互關係矩陣中，基底核區的紋狀體對丘腦區及邊緣皮質區的相關性最明顯。在丘腦區對邊緣皮質區的交互關係矩陣中，以 mPFC 對多數丘腦內的核區相關性最多，腹側眼框皮質(ventral orbital cortex, VO)對丘腦核區的相關性次之，而 ACC 對丘腦核區的相關性較少。在 SNI 手術後，並給予 GBP 止痛處理後，原先輕觸覺刺激引起的許多核區間的相關性變得不顯著，回復到大鼠未手術前的情形。

3.4 討論

在本章的實驗中，我們使用 FDG-PET 來偵測觸感痛狀態下，神經損傷大鼠腦中的神經活性變化。由於 PET 是非侵入性的造影方式，因此我們可以在同一隻大鼠上作三次 PET 掃描，分別在大鼠正常狀態、周邊神經損傷造成觸感痛狀態，以及使用 GBP 止痛狀態下。本研究的主要發現為：一、在觸感痛狀態下，神經損傷大鼠腦中的葡萄糖代謝率在兩側的 IC、丘腦，及 Cb vermis 有明顯的增加，而兩側 RSC 及右側的 AMY 則是代謝率降低。二、在 GBP 止痛下，丘腦、AMY 及 Cb vermis 的代謝率改變會回復到正常的狀態，而 mPFC 的代謝率則降低。三、功能性連結分析顯示丘腦與邊緣皮質的連結會在神經損傷後增強，而在注射 GBP 止痛後這些連結會消失。

觸感痛是神經病變性疼痛的主要症狀之一，但腦部在觸感痛狀態下的活性變化仍沒有明確的結論。目前認為疼痛在腦中可能會引起部分核區的活動改變，這



些核區包括 S1、S2、ACC、IC、mPFC 和丘腦(Apkarian et al., 2005; Treede et al., 1999)。在神經病變性疼痛病人的功能性腦影像研究中，這些核區經常可以在疼痛刺激時看到變化(Petrovic et al., 1999; Peyron et al., 2004; Peyron et al., 2013; Schweinhardt et al., 2006; Witting et al., 2006)，但並非所有的研究結果都是一致的，最主要的原因在於研究者對於受試者的招募，只能選擇醫院既有的病例，但這些病人的年紀、性別、診斷結果及病史可能變異很大，因而會影響腦部的活性表現。理想的情況是可以取得同一個病人在健康時及在罹患神經病變時腦部的功能性影像，但這種情況幾乎不可能發生；藉由動物模式的研究，我們可以長期記錄動物在神經損傷前後不同時期的功能性腦影像。透過我們的實驗設計，以 6 克 von Frey hair 刺激 SNI 大鼠的後腳掌，由其頻繁的縮腳行為來看，SNI 大鼠具有觸感痛的反應；我們也觀察到，除了頻繁的縮腳外，大鼠也經常伴隨著甩腳及舔腳的行為，可知這個縮腳行為不單只是反射動作而已。再由注射 GBP 止痛後，SNI 大鼠對於輕觸覺刺激的反應大幅降低，更可顯示縮腳行為可以作為觸感痛反應的指標。


Kim et al. (2014)及 Thompson et al. (2014)最近分別報告在休息狀態下神經損傷大鼠腦部的 FDG-PET 結果，Kim et al. (2014)採用右側 L5 脊神經結紮(SNL)模式，並與 Sham 組大鼠比較腦中葡萄糖代謝率的差異，他們發現 SNL 手術會造成神經損傷大鼠兩側的梨狀皮質(piriform cortex)、右側的 IC、基底核、視交叉前區(preoptic area)，及左側的下丘腦有葡萄糖代謝率增加的情形，而 RSC 及左側的 S2 則呈現代謝率下降；Thompson et al. (2014)使用 SNI 大鼠與 Sham 組大鼠比較休息狀態下的葡萄糖代謝率變化，但他們只發現在對側 S1 後腳區域有葡萄糖代謝率增加的情形。雖然這兩篇報告的結果並不一致，或許是實驗及分析方法不同的緣故，但他們報告了神經損傷大鼠可能在自發性疼痛狀態下的腦部活性變化。本研究則針對神經損傷大鼠觸感痛狀態下的腦部活性變化，我們發現兩側的 IC、丘腦及 Cb vermis 葡萄糖代謝率增加，而 RSC 及右側的 AMY 的代謝率則下降，這可能是觸感痛在



腦中代謝率變化的特徵。

對大腦皮質來說，IC 是屬於內側痛覺路徑上重要的核區，但它也接受部分來自外側痛覺路徑神經的投射，因此被認為是腦中整合感覺與情緒訊息的區域 (Jasmin et al., 2004; Treede et al., 1999)。在神經病變病人的正子造影結果已顯示，IC 在觸感痛的刺激下會有明顯的活性增加 (Peyron et al., 2013; Witting et al., 2006)；而我們引發神經損傷大鼠的觸感痛反應，也可看到兩側的 IC 有明顯的代謝率增加現象。RSC 在觸感痛反應下呈現葡萄糖代謝率下降，雖然 RSC 在疼痛訊息處理上的功能目前還不清楚，我們推測在 RSC 的活性變化，可能是因改變了休息狀態下的預設模式網絡 (default mode network) 的結果 (Lu et al., 2012; Upadhyay et al., 2011)。


對皮質下 (subcortical) 的核區來說，丘腦的葡萄糖代謝率增加可能是受到疼痛刺激的反應。先前的研究指出，當體感覺系統受到傷害時，會造成丘腦的神經元活性上升 (Gerke et al., 2003; Lenz et al., 1994)，以及葡萄糖代謝率增加 (Mao et al., 1993)。我們在 ROI 分析中發現，在丘腦中增加的葡萄糖代謝率主要是在左側 (手術側) 的 Po 及 VP，而不是右側 (手術對側) 的 Po 及 VP。由痛覺訊息的傳遞路徑來說，在左腳產生的痛覺訊息會投射到右側的丘腦，但由 SPM 及 ROI 分析結果卻與預期中的反應不一致。Iadarola et al. (1995) 在慢性神經病變性疼痛病人的腦部正子造影也有同樣的發現。我們認為對側丘腦代謝率變化不明顯，可能是來自於統計分析上的原因。根據 ROI 分析的結果 (表 3-2)，丘腦兩側的 Po 及 VP 在觸感痛反應下都增加了葡萄糖代謝率，而在比較兩側代謝率增加的比率上並沒有明顯差異，因此右側丘腦的確也增加了葡萄糖代謝率，只是在統計上未達到顯著水準。AMY 則呈現不同的趨勢，SNI 大鼠在觸感痛狀態下，右側 AMY 的葡萄糖代謝率明顯下降。AMY 是腦中處理情緒反應的重要核區，當然也包括疼痛的情緒 (Neugebauer et al., 2004)。一些功能性腦影像研究指出，AMY 在接受疼痛刺激時，神經活性會下降



(Becerra et al., 1999; Derbyshire et al., 1997; Petrovic et al., 1999)。雖然在 SPM 及 ROI 分析上顯示右側的 AMY 代謝率降低，但與丘腦的現象相似，兩側的 AMY 其實都呈現代謝率降低，只是左側變化未達到統計上的顯著水準。除了前腦的區域外，小腦(Cb vermis)在觸感痛下的反應相當明顯，其葡萄糖代謝率呈現上升的趨勢。小腦通常被認為與運動功能有關，而由於觸感痛狀態使得 SNI 大鼠頻繁的縮腳，因此小腦的活性增加也會提高葡萄糖代謝率。


在觸感痛狀態下，我們的結果顯示 SNI 大鼠在 S1，特別是後腳區域，並沒有葡萄糖代謝率增加的情形。不管是 SPM 分析或是 ROI 分析，S1 的代謝率都沒有明顯變化。在神經病變性疼痛病人的功能性腦影像實驗，S1 的活化也是不一致的 (Peyron et al., 2000)。有研究者利用毛刷刺激神經病變病人體表的敏感區域，觀察到不管是 rCBF 或 BOLD 訊號都會顯現在 S1 (Petrovic et al., 1999; Peyron et al., 2004; Peyron et al., 2013)，但 Witting et al. (2006) 等人使用相似的實驗方法，卻無法在 S1 觀察到明顯的訊號。在我們的實驗中，S1 代謝率沒有變化或許是實驗動物模式的特性，特別是丘腦呈現代謝率顯著增加的狀態下。Seminowicz et al. (2012) 報告了在脊髓損傷(spinal cord injury)的狀況下，大鼠在丘腦與 S1 的功能性連結會被打斷。由我們的功能性連結分析結果來看，丘腦與邊緣皮質的連結在觸感痛狀態下時增加，但丘腦與體感覺皮質的連結卻不明顯，這也可能是我們的結果 S1 沒有變化的原因。

當我們給予神經損傷大鼠 GBP 止痛後，可以看到部分核區的代謝率改變回到了正常狀態下的水準。最明顯的地方在於丘腦、AMY 及 Cb vermis，不管是葡萄糖代謝率增加的丘腦及 Cb vermis，或是代謝率降低的 AMY，在 GBP 止痛後都回到了手術前(正常狀態)的水準。丘腦的代謝率從觸感痛時的上升到 GBP 止痛後的下降，這個結果與 Takemura et al. (2011) 的發現類似，儘管我們所使用的造影工具



不同；我們使用 FDG-PET 偵測代謝率的變化，而 Takemura et al. (2011)則是使用 BOLD-fMRI 偵測血氧濃度變化。在給予 SNI 大鼠 GBP 止痛後，由 ROI 分析可見丘腦兩側的 Po 及右側的 VP 代謝率下降，這也反映了丘腦在疼痛訊息處理上的重要性。除了丘腦以外，小腦 vermis 的代謝率在 GBP 止痛下也明顯的下降，由正子造影前進行機械性刺激期間，SNI 大鼠在 GBP 止痛下的縮腳反應大幅下降，因此也顯示在小腦代謝率下降的結果。Hooker et al. (2014)使用 SNL 模式大鼠進行 fMRI 掃描，他們發現當注射 GBP 時，小腦的 BOLD 訊號增加；這個結果與我們使用 FDG-PET 看到的代謝率下降不一致，原因可能在於他們的動物在注射 GBP 時是麻醉狀態，而我們則是在大鼠清醒時注射 GBP。至於 AMY 在 GBP 作用下的代謝率轉變(由下降到上升)，也呈現了 GBP 止痛的影響。

在 GBP 的止痛作用下，較特別的是 mPFC 及 ACC 的葡萄糖代謝率下降。mPFC 的功能與注意力、計畫、執行決策及情感等高階認知功能有關(Treede et al., 1999)，在大鼠的 mPFC 研究中也發現其與疼痛訊息處理有關(Gibney et al., 2010; Metz et al., 2009; Zhang et al., 2004)。Jiang et al. (2014)利用運動皮質刺激術(motor cortex stimulation)產生的止痛作用下，觀察到神經損傷大鼠在 mPFC 的 BOLD 訊號會下降，可見 mPFC 的活性降低可能與止痛有關。ACC 則是負責處理疼痛訊息的情緒與認知方面的重要核區(Treede et al., 1999)。Takemura et al. (2011)報告在給予神經損傷大鼠 GBP 後，ACC 增加的 BOLD 訊號會回復到正常狀態。最近有研究指出在神經損傷後，ACC 的興奮性傳導物質麩氨酸有增加釋放的情況(Li et al., 2014; Niikura et al., 2011; Zhuo, 2014)，而 Bak et al. (2006)指出葡萄糖代謝率與 glutamatergic 細胞的活性有關。雖然在我們的實驗中，mPFC 及 ACC 在觸感痛狀態下並沒有顯示葡萄糖代謝率增加的情形，但在給予 GBP 後，這兩個核區的代謝率明顯的下降了；而 Sham 組大鼠一樣接受了相同劑量的 GBP 注射，mPFC 及 ACC 卻沒有明顯變化，顯示這兩個核區的代謝率降低與 GBP 的止痛作用有關。我們在



SNI 大鼠接受 GBP 處理後，觀察到在 SNI 大鼠 S1 的鬚鬚區域、上唇區域，及 S2 的位置有顯著的葡萄糖代謝率增加的現象；而在 Sham 組大鼠中雖然在 SPM 結果有一些增加的區域，但在 ROI 分析下卻沒有明顯的差異。雖然我們不知道這些核區代謝率增加的原因，但推測這些核區的變化可能跟藥物的副作用有關。

在本研究中有一些方法上的限制性，比如說 FDG-PET 是偵測葡萄糖代謝率的工具，但我們無法得知這些代謝率的變化是來自於興奮性或抑制性的神經元，因為對神經元來說，當細胞活性增加時就會消耗能量而增加代謝率；當代謝率降低時，我們也不知道是因興奮性的神經元減少活動，或是抑制性的神經元增強了抑制作用的結果，如果要了解這個問題需要進行電生理記錄細胞活性才有答案。我們使用的正子造影方式，是讓 FDG 在組織內累積一段時間後才掃描靜態(static)的影像，所以沒辦法得知掃描過程中不同時間點上的代謝率變化。還有我們使用的 GBP 止痛藥是全身性(systemic)的作用，因此這個止痛的結果可能是來自於脊髓或腦部的共同作用，並無法區分主要受到哪個部位的影響，但由於 GBP 在腦部的作用很明確(Abdi et al., 1998; Hill et al., 1993; Kayser and Christensen, 2000)，我們的結果可能顯示 GBP 在腦中止痛作用的位置。

FDG-PET 提供一個可以了解清醒大鼠腦部功能性變化的工具。利用 FDG-PET 偵測代謝率變化的特性，我們得以研究觸感痛在神經損傷大鼠腦中呈現的變化，也可以知道止痛藥在腦中造成了哪些改變。我們發現觸感痛會使神經損傷大鼠的 IC、丘腦及小腦的代謝率增加，而止痛藥 GBP 會回復丘腦及小腦的代謝率變化，並抑制 mPFC 及 ACC 的細胞活性。


第四章、神經損傷大鼠在觸感痛狀態下的腦部神經活化標誌的變化與 gabapentin 的止痛反應



4.1 前言

神經病變性疼痛是體感覺系統異常的結果，臨床上不易治療神經病變性疼痛，是因為對這種疼痛的機制了解仍有限，特別是腦部的反應。儘管臨床上有一些藥物可以用來緩解神經病變性疼痛，如 gabapentin (GBP)，但我們對 GBP 的作用位置也不是很確定。上一章我們使用正子造影(FDG-PET)來偵測觸感痛狀態下，神經損傷大鼠腦部的葡萄糖代謝率變化，以及 GBP 對腦中葡萄糖代謝率的影響。我們發現觸感痛會使神經損傷大鼠島狀皮質(IC)的葡萄糖代謝率增加，而 GBP 會抑制內側前額葉皮質(mPFC)及前扣帶迴皮質(ACC)的葡萄糖代謝率，卻不會抑制在 IC 增加的葡萄糖代謝率，這可能跟 GBP 的止痛效果有關；但 FDG-PET 的空間解析度較差，無法提供細胞層級的資訊，且這些核區的代謝率變化是來自於神經元或膠細胞的活性改變，這個問題需要用不同的方法來研究。

細胞外訊息調節激酶(extracellular-signal regulated kinases, ERK)是部分神經元細胞質裡存在的一種激酶，當神經元受到適當的外界刺激，這種激酶會活化(磷酸化, pERK)，既而進入細胞核啟動特定基因的轉錄作用。有研究指出 pERK 可以作為中樞神經系統裡的突觸可塑性標誌(Gao and Ji, 2009)。在神經損傷大鼠的腦中，當給予觸感痛刺激時，腹內側前額葉皮質(ventromedial PFC, vmPFC)、ACC 及 IC 都有顯著的 pERK 大量表現(Alvarez et al., 2009; Devoize et al., 2011; Wei and Zhuo, 2008)。除了 pERK 外，一種原致癌基因的蛋白質產物 c-Fos，在中樞神經系統內也可以作為神經元活化的標誌。當給予動物疼痛刺激時，腦中邊緣系統(limbic system)裡也有大量的 c-Fos 表現(Gibney et al., 2010; Lei et al., 2004; Zhang et al., 2014)。因此 pERK 及 c-Fos 等分子標誌，被認為與腦中處理痛覺訊息有關(Gao and Ji, 2009)。



ERK 是一種內生性(endogenous)的激酶，當神經元受到適當的外界刺激，即使時間短到只有 1 分鐘，活化的 pERK 即可表現(Ji et al., 1999)；這麼快速的活化也顯示 pERK 可以調節細胞的興奮度而不用等到基因表現出新蛋白。相較之下，c-Fos 蛋白的表現就要較長的時間，當神經元受到適當的外界刺激，最快要 30 分鐘後 c-Fos 蛋白才會表現，而在刺激後 1 到 2 小時間有最大的表現量(Hunt et al., 1987; Williams et al., 1990)。因此這兩種分子標誌可能顯示當動物受到疼痛刺激後，腦中神經元在不同時間序列(time course)上的反應。

為了解神經損傷大鼠在觸感痛狀態下，腦部的哪些區域細胞會活化，以及在 GBP 止痛作用下，這些活化的細胞有什麼變化，我們使用 pERK 及 c-Fos 來偵測腦中的神經元活性。如同上一章的實驗設計，我們先給予神經損傷大鼠觸感痛刺激，接著以免疫組織染色的方式標示 pERK 及 c-Fos 在腦中的表現，最後我們比較給予 GBP 止痛處理後，相關活化區域這兩種分子標誌的表現情形。

4.2 材料與方法

4.2.1 動物模式

六週齡的雄性 SD 大鼠(體重約 200 g)購買自樂斯科公司，在動物房中飼養一週後進行實驗。本研究共使用 32 隻大鼠，隨機分配為實驗組(SNI, n = 16)及對照組(Sham, n = 16)。我們採用 SNI 模式(Decosterd and Woolf, 2000)為神經病變性疼痛模式(參考第二章)，作法概述如下：在 50 mg/kg pentobarbital 誘導麻醉下，將大鼠左後腳的坐骨神經分支脛神經及腓總神經結紮並切斷，保留腓腸神經完整，而後分別縫合肌肉與皮膚；對照組則是暴露坐骨神經及分支後，維持完整並縫合肌肉與皮膚。



4.2.2 觸感痛測試

為確定 SNI 手術後，大鼠具有神經病變性疼痛，我們使用 von Frey hairs 測試大鼠的縮腳閾值。行為測試一樣採用 up-down 方法(Dixon, 1980)進行，我們選用 8 支不同克數的 von Frey 尼龍製細毛棒，分別為 0.4、0.6、1、2、4、6、8、15 克。行為測試由 2 克細毛棒開始，待找到會使大鼠縮腳的克數之後，再反覆測試四次。反應紀錄一樣經由計算得到大鼠的 50%縮腳閾值(Chaplan et al., 1994a)。每隻大鼠的左右後腳掌各作三次測定，取其平均值作為 50%縮腳閾值的克數。為評估神經損傷疼痛的程度，不同處理組的大鼠在手術前 1 日，手術後第 7 及第 14 日測定縮腳閾值(圖 4-1A)。

4.2.3 實驗設計

我們使用 32 隻大鼠進行免疫組織染色的實驗。這些大鼠固定在手術 14 天後給予機械性刺激，並於刺激後犧牲進行後續實驗。這 32 隻大鼠隨機分配為 pERK 實驗(n = 16)及 c-Fos 實驗(n = 16)，每個實驗又再隨機分配為 SNI 組(n = 8)及 Sham 組(n = 8)。SNI 組及 Sham 組的老鼠依照有無在腹腔施打 GBP (100 mg/kg)止痛，可分為 SNI、SNI+GBP、Sham 及 Sham+GBP 四組(每組 n = 4)，其中無施打 GBP 的組別，大鼠則接受相等體積的生理食鹽水注射。每隻大鼠在機械性刺激前 60 分鐘，依實驗分配接受 GBP 或生理食鹽水注射。在進行 von Frey 細毛棒刺激前，大鼠先在壓克力製的籠子中適應 20 分鐘。我們給予大鼠 6 克 von Frey 細毛棒的機械性刺激，刺激的位置為手術側的左後腳掌外側，刺激頻率為每 5 秒鐘 1 次，每次維持約 1 秒鐘，共持續 20 分鐘，即總共刺激 240 次。刺激結束後，進行 pERK 免疫染色實驗的大鼠隨即接受腹腔注射 65 mg/kg pentobarbital 麻醉，並放回飼養籠(home cage)中，10 分鐘後則進行心臟灌流；進行 c-Fos 免疫染色實驗的大鼠，在機械性刺激結束後，隨即放回飼養籠中，並於刺激結束 80 分鐘後接受腹腔注射 65 mg/kg pentobarbital 麻醉，然後繼續放回飼養籠中，10 分鐘(即刺激結束後 90 分鐘)後則

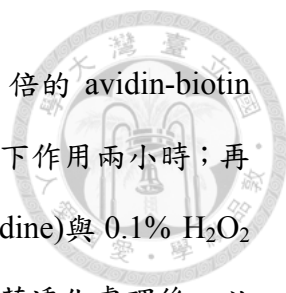


進行心臟灌流(圖 4-1B)。

4.2.4 免疫組織染色

大鼠在手術兩週後犧牲，鼠腦以心臟灌流法固定後取出進行免疫組織染色。大鼠在麻醉後，先以 4°C 的 100 ml 生理食鹽水將大鼠體內血液沖洗乾淨，為了加強血液(特別是紅血球)的沖洗效果，每 100 ml 生理實驗水另外加入 0.5 克檸檬酸鈉(sodium citrate，作為抗凝血劑)，及 0.5 克亞硝酸鈉(sodium nitrite，作為血管舒張劑)；再以 4°C 的 300 ml 4% paraformaldehyde 固定液(配置於 0.1 M phosphate buffer, PB)進行組織固定。待固定液灌流結束，取出鼠腦，置於相同的固定液中後固定 16 ~ 20 小時；接著將固定液置換為含 30% 蔗糖的 PB 溶液，待鼠腦沉至溶液下層，即可進行冷凍切片。取出鼠腦放置於冷凍切片機(sliding microtome)上，先在左腦皮質上以手術刀淺層的劃一刀，用來區分左右腦的位置；利用乾冰將鼠腦冷凍後，以厚度 50 μm 進行冠狀切片，並將切片置於抗凍劑中以 4°C 低溫儲存(Watson et al., 1986)，以延緩細胞內蛋白的降解(degrade)速度。


進行免疫組織染色時，以固定間隔 500 μm 的距離(即每 10 片挑選一片)，自 bregma 前 3 mm 開始，依序挑出鼠腦切片，至 bregma 後 3 mm 為止。腦切片先以 Tris buffer (0.5 M, pH 7.6)清洗 3 次後，浸入含 1% H_2O_2 的甲醇溶液中 30 分鐘，以去除內生性過氧化氫酶活性；接著以 Tris buffer 清洗 3 次後，置於 blocking solution (0.2% 安佳脫脂奶粉加 0.2% Triton X-100 的 Tris buffer)中 120 分鐘；再浸入稀釋 500 倍的一級抗體 pERK (Phospho-p44/42 MAP kinase antibody, rabbit polyclonal antibody, #9101, Cell Signaling Technology)中，或浸入稀釋 1000 倍的一級抗體 c-Fos (anti-c-Fos rabbit polyclonal antibody, #PC05, Calbiochem)中，於 4°C 冰箱中靜置 20 小時。取出靜置於一級抗體的腦切片後，以 Tris buffer 清洗 3 次，放入稀釋 200 倍的二級抗體(Biotinylated goat anti-rabbit IgG, #BA-1000, Vector Laboratories)中，於室



溫下作用兩小時；以 Tris buffer 清洗 3 次後，再放入稀釋 200 倍的 avidin-biotin complex (ABC kit, #PK-6100, Vector Laboratories) 溶液中，於室溫下作用兩小時；再以 Tris buffer 清洗 3 次後，即以含 0.1% DAB (3,3'-diaminobenzidine) 與 0.1% H₂O₂ 的 PB 溶液中呈色。呈色後的腦切片經過乾燥、序列脫水及二甲苯透化處理後，以 DPX 膠封片(註：已停產)，再進行顯微照相及細胞計數等步驟。為了確定一級抗體所染出的細胞的確為 pERK-positive 或 c-Fos-positive 細胞，在前述處理的切片相鄰位置，隨機挑選不同組別的鼠腦切片，進行陰性對照組(negative control)染色。操作方法皆如同免疫組織染色的程序，唯一差異為不加入一級抗體，觀察是否有細胞呈色。

4.2.5 免疫螢光染色

進行免疫螢光染色時，我們採用隨機挑選切片的方式進行染色。先以 Tris buffer 清洗 3 次後，直接置於 blocking solution 中 120 分鐘，之後依不同的抗體組合分為 4 組。第一組為稀釋 500 倍的一級抗體 pERK 加上稀釋 1000 倍的標示神經元細胞核的一級抗體 NeuN (Mouse anti-neuronal nuclei biotin-conjugated monoclonal antibody, #MAB377, Chemicon)，第二組為稀釋 500 倍的一級抗體 pERK 加上稀釋 1000 倍的標示星狀膠細胞蛋白質骨架的一級抗體 GFAP (Mouse anti-gial fibrillary acidic protein monoclonal antibody, #MAB360, Chemicon)，第三組為稀釋 1000 倍的一級抗體 c-Fos 加上稀釋 1000 倍的一級抗體 NeuN，第四組為稀釋 1000 倍的一級抗體 c-Fos 加上稀釋 1000 倍的一級抗體 GFAP。不同的切片在這 4 組抗體組合中於 4°C 冰箱中靜置 20 小時。之後取出腦切片，以 Tris buffer 清洗 3 次，放入稀釋 200 倍的螢光二級抗體(Cy3-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody, #AP132C, Chemicon)加上稀釋 200 倍的二級抗體(Biotinylated horse anti-mouse IgG antibody, #BA-2000, Vector Laboratories)組合中，於室溫下避光作用兩小時。以 Tris buffer 清洗 3 次後，再放入稀釋 200 倍的螢光三級抗體(Cy2-conjugated streptavidin,




#016-220-084, Jackson ImmunoResearch Laboratory)溶液中，於室溫下避光作用兩小時。以 Tris buffer 清洗 3 次後，即將腦切片貼於含膠載玻片上，以 DPX 封片膠(註：已停產)直接封片，並在螢光顯微鏡底下觀察。部分切片在共軛焦顯微鏡(Leica TCS SP5)下觀察並拍照記錄。

4.2.6 細胞計數

封片後的免疫組織染色結果，以體視學(stereology)的方法進行細胞計數。計數的範圍依據大鼠腦圖譜(Paxinos and Watson, 2007)描繪感興趣的區域(ROI)，包括 vmPFC、ACC、MCC (mid-cingulate cortex, 中扣帶迴皮質)、IC、S1HL (hindlimb region of primary somatosensory cortex, 初級體感覺皮質的後腳區域)、CeA (central nucleus of amygdala, 杏仁體中央核)。選擇這些核區是因為在免疫組織染色之後，這些核區有比較明顯的 pERK 及 c-Fos 表現。vmPFC 的計數範圍為+3.0 mm 到+2.5 mm。ACC 與 MCC 的邊界約在 bregma 處(Vogt and Paxinos, 2014)，所以 ACC 的計數範圍為+3.0 mm 到+0.5 mm，MCC 的計數範圍為 bregma 到-1.5 mm。IC 的計數範圍相當長，本研究將其分為前側(anterior part, aIC)及後側(posterior part, pIC)分別計數，aIC 的計數範圍為+3.0 mm 到+0.5 mm，pIC 的計數範圍為 bregma 到-2.5 mm。S1HL 的計數範圍為 bregma 到-2.0 mm。CeA 的計數範圍為-2.0 mm 到-3.0 mm。在進行細胞計數時，對 pERK-positive 細胞來說，只有清晰完整的細胞本體並有清楚細胞核的細胞才予以計數；對 c-Fos-positive 細胞來說，只有清晰完整的細胞核才予以計數。左右腦的核區則分別進行計數。

體視學量測系統包括光學顯微鏡(Olympus BX51)，具備即時顯示(Live View)功能的 CCD，軟體自動控制的載台雙向步徑馬達，以及 MicroBrightField 公司出版的 Stereo Investigator (Version 9.10, MBF Bioscience, Williston, USA)體視學軟體，其中的 Optical Fractionator Probe 程式提供無偏差(unbiased)的細胞計數方法。在計數



細胞時，先在 4 倍物鏡的視野下描繪 ROI，然後在 60 倍油鏡(N.A.值為 1.25)的視野下計數細胞。所有描繪的 ROIs 皆被程式隨機擺放的固定格線方塊(Grid, 150 μm \times 150 μm)切割為數量不一的區域，每一區域內有單一的計數框(counting frame, 75 μm \times 75 μm)，每個計數框為三維結構(厚度約為 16 μm)，只有細胞完全落入計數框及可採計邊框的範圍內才予以計數。當同一個鼠腦的左右皮質皆計數完成後，Stereo Investigator 軟體即透過公式計算得出估計的細胞總數，以及該估計值的誤差係數(coefficient of error, CE)。計算估計的細胞總數公式如下(West et al., 1991)：

$$N = \Sigma Q- \times t/h \times 1/asf \times 1/ssf$$

Q-為每一切片所計數的細胞數目；

t 為切片的厚度；

h 為計數框的厚度；


asf 為計數框佔格線方塊的比率；

ssf 為每隔多少切片挑選一片。

CE 值一般認定只要低於 0.1 即為具可信度的估計值，我們採用的是 Gundersen (m=1)公式計算的 CE 值(Gundersen et al., 1999)。

4.2.7 統計分析

本研究的統計分析，均使用 SigmaStat 3.1 的軟體進行計算。在觸感痛測定的結果分析，SNI 組及 Sham 組的手術側後腳縮腳閾值分別以重複取樣單因子等級變異數分析(one-way repeated measures of ANOVA on ranks)進行統計分析，若結果顯示有差異時再進行事後檢定，事後檢定採用 Tukey 方式檢定，並設 $p < 0.05$ 為顯著差異。縮腳閾值變化皆對手術前的基準值作比較。大鼠犧牲前進行的機械性刺激，



我們將縮腳次數轉換為縮腳比率，各處理組的縮腳比率以單因子變異數分析(one-way ANOVA)進行統計分析，若結果顯示有差異時再進行事後檢定，事後檢定採用 Tukey 方式檢定，並設 $p < 0.05$ 為顯著差異。在細胞計數的結果分析，對 pERK 及 c-Fos 的不同核區內各組的比較，以單因子變異數分析(one-way ANOVA)及 Tukey 事後檢定方式彼此比較，並設 $p < 0.05$ 為顯著差異。統計分析之後的結果，若無特別註明，皆以平均值(mean) \pm 標準誤(standard error of the mean, SEM)呈現。

4.3 結果

4.3.1 觸感痛行為

為確定大鼠在 SNI 手術後，會顯示觸感痛的行為，我們使用 von Frey hairs 測試大鼠的縮腳閾值變化。如圖 4-2，在 SNI 組中，手術側的後腳掌縮腳閾值，從手術前的 14.2 克，在手術後第 7 天降到 2.6 克，且在手術後 14 天仍維持在 3 克以下；與手術前的閾值比較，這個降低的縮腳閾值具有顯著差異($p < 0.001$)。而在 Sham 組的手術側腳掌縮腳閾值，在手術前後並沒有明顯的差異。可知 SNI 手術引發了穩定且明顯的觸感痛行為。

4.3.2 動物犧牲前機械性刺激的反應

在心臟灌流前，我們給予大鼠輕觸覺刺激，刺激方式如同大鼠在 PET 掃描前接受的刺激一樣。如圖 4-3，我們將大鼠分為四組進行刺激，SNI 組大鼠的縮腳比率為 $22.1 \pm 3.1\%$ ，而 Sham 組大鼠的縮腳比率為 $2.8 \pm 0.7\%$ ，兩者之間具顯著差異($p < 0.001$)，可見 SNI 大鼠有明顯的觸感痛反應。SNI+GBP 組大鼠的縮腳比率降為 $1.2 \pm 0.3\%$ ，其降低的幅度相較於 SNI 組有顯著差異($p < 0.001$)。Sham+GBP 組大鼠的縮腳比率為 $1.7 \pm 0.6\%$ ，與 Sham 組相較其縮腳比率並無明顯差異，可見 GBP 並不影響沒有神經病變性疼痛大鼠的行為。



4.3.3 免疫組織染色的結果

大鼠在機械性刺激後犧牲，我們取腦切片進行免疫組織染色，並以 pERK 及 c-Fos 為標的抗體。我們選取了範圍自 bregma 前 3 mm 到 bregma 後 3 mm 的切片，這些切片包含了大腦皮質、紋狀體(striatum)、丘腦、下丘腦(hypothalamus)，及杏仁核等核區。由染色結果顯示，pERK 及 c-Fos 並不是普遍的分布在所有核區，以大腦皮質來說，屬於邊緣皮質(limbic cortex)的部分像 vmPFC、ACC、IC，表現 pERK 及 c-Fos 的細胞較多，而體感覺皮質的 pERK 及 c-Fos 細胞數量就偏低；以丘腦來說，內側丘腦(medial thalamus)的 pERK 及 c-Fos 細胞較明顯，而外側丘腦(lateral thalamus)並沒有 pERK 及 c-Fos 的表現；杏仁核及下丘腦的部分核區有分布 pERK 及 c-Fos 細胞，而紋狀體並沒有這些細胞的表現。因此我們在分析 pERK 及 c-Fos 細胞時以 vmPFC、ACC (及 MCC)、IC、S1HL，及 CeA 為主。

以 pERK 細胞來說，如圖 4-4 所示，磷酸化的 ERK 激酶不僅存在於細胞本體的細胞質內，在細胞核內，以及神經突起(主要是樹突)都有明顯的 pERK 表現。而在不同處理組別的 pERK 細胞數量也有差異，以 SNI 組來說，vmPFC 及 IC 的 pERK 細胞數量比 SNI+GBP 組或 Sham 組明顯較多(圖 4-4)。以 c-Fos 細胞來說，c-Fos 蛋白只存在於細胞核內(圖 4-5)。而 c-Fos 細胞的分布，即使在同一處理組內也不一定有一致性，如圖 4-5 所示，一樣在 SNI 組內，vmPFC 的 c-Fos 細胞就比 IC 的數量還多。

4.3.4 不同核區細胞計數的結果

為了比較觸感痛在神經損傷大鼠腦中的細胞活性變化，我們以體視覺方法計算各核區的細胞數量。在細胞計數的部分，我們分別對左右兩側核區計算 pERK 及 c-Fos 的細胞數量，以 IC 來說，兩側的 pERK 或 c-Fos 細胞數量並沒有明顯的差異(圖 4-6 及 4-7)；而在 S1HL，對側(右側)的 pERK 或 c-Fos 細胞較同側的數量



略高(圖 4-8 及 4-9)，但在兩側細胞數量的統計分析上並沒有明顯差異。由於左右兩側大腦的 pERK 及 c-Fos 細胞數量並沒有統計上的差異，所以我們將左右兩側的細胞合併在一起分析。如圖 4-10 到 4-12 所示，以 pERK 細胞來說，表現出觸感痛反應的 SNI 組大鼠在 vmPFC、aIC、pIC 等核區，與 Sham 組相較有統計上顯著的增加；以 c-Fos 細胞來說，SNI 組大鼠在 vmPFC 及 S1HL 等核區，與 Sham 組相較有統計上顯著的增加。當給予 SNI 大鼠 GBP 止痛之後，以 pERK 細胞來說，SNI+GBP 組大鼠在 vmPFC、ACC、aIC、pIC 等核區，與 SNI 組相較有統計上顯著的減少；以 c-Fos 細胞來說，SNI+GBP 組大鼠在 vmPFC、ACC、S1HL 等核區，與 SNI 組相較有統計上顯著的減少。若給予 Sham 組大鼠 GBP 注射，Sham+GBP 組的 pERK 或 c-Fos 細胞數量與 Sham 組相較並沒有統計上的差異。有些核區如 MCC 及 CeA，不管是 pERK 或 c-Fos 細胞數量在不同處理組別中都沒有差異。

為進一步了解 pERK 及 c-Fos 細胞在不同處理組別中，在腦中空間分布的情形，我們以相對於 bregma 的前後位置來比較不同核區的細胞數量變化。在 vmPFC，不同位置的 SNI 組的 pERK 及 c-Fos 細胞數量較其它組別有明顯的增加(圖 4-13)。在 ACC，不同位置的 SNI 組的 c-Fos 細胞數量比其它組別的細胞稍多，但不同位置的 pERK 細胞數量只有在 bregma 前 1.5 mm 較多(圖 4-14)。相對於 ACC，MCC 的不同位置的 pERK 及 c-Fos 細胞數量在四個處理組別中沒有差異(圖 4-15)。在 IC，我們雖將 aIC 及 pIC 分開計算，但以 pERK 細胞來說，SNI 組的 pERK 細胞數量在 aIC 的不同位置都比其它組別有明顯增加(圖 4-16)，而 pIC 的 pERK 細胞數量在不同組別中就大幅減少(圖 4-17)，顯示 IC 的 pERK 細胞顯著地分布在前側。對 IC 的 c-Fos 細胞來說，雖然在 aIC 不同位置的 c-Fos 細胞比起 pIC 的細胞數量還多，但在 IC 不同位置的 c-Fos 細胞數量在不同組別中沒有差異。對屬於體感覺皮質的 S1HL 來說(圖 4-18)，儘管 SNI 組的 pERK 細胞數量在 bregma 後 2 mm 有統計上顯著的增加，但其它位置的 pERK 細胞在不同組別中沒有差異；不同位置的 c-Fos 細



胞在不同組別中也沒有差異。在 CeA，不同位置的 pERK 及 c-Fos 細胞分布在不同組別中沒有差異(圖 4-19)。


4.3.5 免疫螢光染色的結果

先前的研究指出，在脊髓背角處的 pERK 細胞不只表現在神經元，連星狀膠細胞及微膠細胞也會表現 pERK (Zhuang et al., 2005)。為了確定在腦中表現的 pERK 及 c-Fos 細胞是屬於神經元或膠細胞，我們以免疫螢光的雙重染色(double staining)來檢視這些細胞。除了 pERK 及 c-Fos 抗體外，我們使用兩種分子標誌來區分神經元(NeuN)及膠細胞(GFAP)。如圖 4-20 所示，pERK 與 NeuN 的染色能夠疊合(merged)，而 GFAP 不能和 pERK 疊合，顯示腦中的 pERK 細胞為神經元。圖 4-21 也顯示 c-Fos 細胞為神經元，而不是膠細胞。

4.4 討論


為了解觸感痛在神經損傷大鼠腦中細胞活性的變化，以及給予止痛藥 GBP 後細胞活性是否改變，我們以免疫組織染色的方式標定 pERK 及 c-Fos 兩種與疼痛反應有關的分子標誌。本研究的主要發現為：一、輕觸覺刺激會造成神經損傷大鼠的行為敏感化現象(觸感痛反應)，且腦中的 pERK 及 c-Fos 會大量表現在 vmPFC、ACC 及 aIC。二、pERK 及 c-Fos 表現的模式在 vmPFC 及 ACC 是相似的，而在 aIC 的表現則不一致。三、在 GBP 的止痛作用下，行為敏感性現象會明顯改善，且腦中增加的 pERK 及 c-Fos 表現量也會下降。

上一章我們使用 FDG-PET 來偵測神經損傷大鼠在觸感痛狀態下的腦中葡萄糖代謝率變化，由於代謝率變化為腦中核區內的整體細胞活性變化，並無法呈現單一細胞在觸感痛下的活性變化；在本研究中，我們以免疫組織染色的方式來偵測核區內單一細胞在觸感痛下的活性表現。我們使用 pERK 及 c-Fos 這兩種經常代表




疼痛反應的分子標誌，並預期可以在 FDG-PET 實驗中顯示有代謝率變化的核區裡，看到這兩種分子標誌的變化，但結果顯示這兩種分子標誌並不能完全反映葡萄糖代謝率的核區。以丘腦來說，SNI 組大鼠外側丘腦的葡萄糖代謝率在觸感痛狀態下有明顯增加，但 pERK 及 c-Fos 並沒有表現在這個位置；另一個代謝率明顯增加的小腦蚓部，一樣沒有 pERK 及 c-Fos 的蛋白表現。而在 SNI 組大鼠大腦皮質的分布上，邊緣皮質(vmPFC、ACC、aIC)的 pERK 及 c-Fos 表現量就很明顯，而體感覺皮質(S1HL)的表現偏少；另外在 CeA 也有明顯的 pERK 及 c-Fos 表現，只是與 Sham 組相較並沒有差異。為什麼在本研究中要使用兩種標誌來研究細胞活性變化？ERK 在短暫的刺激下即可誘發磷酸化表現(pERK)，而 c-Fos 則需要較長時間才能大量表現。根據我們的實驗設計，pERK 可代表觸感痛在短時間(10 分鐘)內的細胞活化結果，與觸感痛反應時的突觸可塑性改變有關；而 c-Fos 則是長時間(90 分鐘)下的細胞活化結果，與觸感痛反應導致的蛋白轉譯有關；因此 pERK 及 c-Fos 可能顯示在觸感痛狀態下，腦中神經元在不同時間序列上的反應。

mPFC 的功能與注意力、計畫、執行決策及情感等高階認知功能有關(Treede et al., 1999)。mPFC 在不同強度的疼痛刺激下也可記錄到神經元對應的反應，且在腦室內(intraventricular)給予嗎啡後，神經元的反應有劑量依賴性的變化(Zhang et al., 2004)；在神經病變性疼痛大鼠的 mPFC，可以記錄到形態及生理特性改變的神經元，顯示 mPFC 在神經病變性疼痛的影響下會改變其核區的功能(Metz et al., 2009)。利用功能性腦造影技術，可以發現不管在人類或大鼠，其 mPFC 在疼痛狀態下經常會活化(Apkarian et al., 2005; Thompson and Bushnell, 2012)。在本研究中，SNI 組大鼠在觸感痛反應下，vmPFC 的 pERK 細胞數量較 Sham 組大鼠有明顯的增加，這個結果與 Devoize et al. (2011)的發現類似。Devoize et al. (2011)報告了另一種神經病變性疼痛的模式，即以慢性壓迫性傷害臉部的眼眶下神經(chronic constriction injury of infraorbital nerve, ION-CCI)來模擬三叉神經痛，當他們給予



ION-CCI 大鼠臉部吹風刺激時(一種觸感痛刺激)，vmPFC 會表現出大量的 pERK。對 c-Fos 來說，目前在神經損傷大鼠的 mPFC 並沒有相關的研究，但在其它的疼痛模式，如利用直腸脹大引發的內臟性疼痛中，可以看到 c-Fos 會大量表現在 mPFC (Gibney et al., 2010)。我們的 c-Fos 結果則證明了神經損傷大鼠在觸感痛狀態下，c-Fos 蛋白也會明顯的增加。

ACC 是負責處理疼痛訊息的情緒與認知方面的重要核區(Treede et al., 1999)。利用功能性腦造影技術，可以發現不管在人類或大鼠，其 ACC 在疼痛狀態下經常會活化(Apkarian et al., 2005; Thompson and Bushnell, 2012)。Rainville et al. (1997) 利用催眠暗示的方式，使正常人類受試者在 47°C 熱水浴刺激下，降低對疼痛的不愉快感覺，結果在 ACC 的局部腦血流(rCBF)變化大幅降低，而 S1 的 rCBF 沒有改變，顯示 ACC 與疼痛的情緒處理有直接關係。在動物研究方面，利用福馬林引發的制約性位置迴避(formalin-induced conditioned place avoidance, F-CPA)實驗，有學者報告破壞 ACC 可以降低這個迴避的行為(Johansen et al., 2001)。研究也發現，利用 F-CPA 實驗，可以在 ACC 看到 pERK 或 c-Fos 大量表現的情形，顯示 ACC 的細胞活性增加與疼痛情緒有關(Cao et al., 2009; Lei et al., 2004)。在本研究中，SNI 組大鼠在觸感痛反應下，不管是 pERK 或 c-Fos 的細胞數量，在 ACC 比起 Sham 組大鼠都沒有顯著的增加，但 pERK (SNI vs. Sham, $p = 0.083$)及 c-Fos (SNI vs. Sham, $p = 0.099$)的細胞數量其實相較於 Sham 組都有增加的趨勢。似乎在觸感痛狀態下，神經損傷大鼠 ACC 的細胞活性並不會比對照組的活性還強，但我們提出另一個可能的解釋：在我們的實驗設計中，SNI 組及 Sham 組大鼠都同樣在清醒狀態下接受輕觸覺刺激，儘管由縮腳反應比率上，Sham 組大鼠並沒有 SNI 組大鼠那麼頻繁地縮腳，但這樣的連續刺激(共 240 次)可能對 Sham 組大鼠也是一種不愉快的感覺，造成 Sham 組大鼠有點焦慮(LaGraize et al., 2004)，所以其 ACC 內的細胞反應也稍微會增加。



IC 是屬於內側痛覺路徑上重要的核區，但它也接受部分來自外側痛覺路徑神經的投射，因此被認為是腦中整合感覺與情緒訊息的區域(Jasmin et al., 2004; Treede et al., 1999)。利用功能性腦造影技術，可以發現不管在人類或大鼠，其 IC 在疼痛狀態下經常會活化(Apkarian et al., 2005; Thompson and Bushnell, 2012)。在大鼠的研究中，前側的 IC 不管在解剖或生理反應上都顯示這個區域在疼痛訊息處理及調節上扮演重要的角色(Jasmin et al., 2003; Jasmin et al., 2004)；而破壞前側的 IC 則可減輕神經病變大鼠的疼痛行為(Coffeen et al., 2011)。在本研究中，SNI 組大鼠在觸感痛反應下，aIC 的 pERK 細胞數量較 Sham 組大鼠有明顯的增加，這個結果與 Alvarez et al. (2009)的發現類似。當給予 ION-CCI 大鼠臉部吹風刺激時，在 aIC 的 pERK 細胞數量會顯著增加(Alvarez et al., 2009)。比較特別的是，SNI 組大鼠在觸感痛反應下，aIC 的 c-Fos 表現跟 Sham 組並沒有明顯變化。對 vmPFC 及 ACC 來說，在觸感痛狀態下 pERK 與 c-Fos 的表現都一致性的增加，但在 aIC 裡這兩種分子標誌的表現卻不一致。有研究指出 pERK 會進入細胞核中啟動特定基因的轉錄作用，而這個過程可能會導致 c-Fos 表現，但也不必然有這個結果(Colombo et al., 2003; Ji and Rupp, 1997; Kawasaki et al., 2004; Lonze and Ginty, 2002)。儘管 SNI 組大鼠的 aIC 在觸感痛反應下會大量表現 pERK，但這裡的 pERK 大量表現並不會引發 c-Fos 的表現，這個結果也可能顯示 aIC 在不同時間序列上的細胞活性與其它核區不同。

當 SNI 組大鼠注射 GBP 止痛後，其行為敏感化的現象有明顯的改善，且 pERK 及 c-Fos 在不同核區的表現量大致上是下降的，但仍有一些差異。在 vmPFC 裡，不管是表現 pERK 或 c-Fos 的細胞數量在 GBP 止痛後皆有明顯的下降。在 ACC 裡，儘管 SNI 組與 Sham 組在表現 pERK 及 c-Fos 的細胞數量上沒有統計上的顯著差異，但在給予 GBP 止痛後，SNI+GBP 組表現 pERK 及 c-Fos 的細胞數量有明顯的下降，這可能是 GBP 的止痛反應所致；而 Sham+GBP 組的 pERK 及 c-Fos 細胞數

量也稍微下降，可能與 GBP 可以改善焦慮狀態有關(Singh et al., 1996)。在 IC 裡，GBP 的止痛作用會明顯的抑制 pERK 的表現，但不會影響原本就沒什麼變化的 c-Fos 表現量。



在本研究中仍有一些方法上的限制性，比如說我們使用了 pERK 及 c-Fos 這兩種與疼痛有關的神經活化標誌，但這兩種標誌在不同核區的表現上有些微差異；且在多數核區中，表現 c-Fos 的細胞數量多於表現 pERK 的細胞數量，這顯示 c-Fos 可由其它細胞內訊息傳遞路徑所引發，或許有其它的分子標誌，如 pCREB (phosphorylated cAMP response element-binding protein)，可用來代表細胞活性的變化(Ji and Rupp, 1997)。在本研究中，我們只使用單一劑量的 GBP，並於注射後一小時才對大鼠進行機械性刺激，或許使用不同劑量的 GBP，或是在注射 GBP 後不同的時間點給予刺激，可以看到 GBP 在不同核區裡的作用效果。此外，我們以腹腔注射 GBP 來產生止痛作用，並在部份核區看到 pERK 或 c-Fos 的細胞數量下降，如果直接在這些核區裡注射 GBP，更能夠確定 GBP 的止痛作用來自於影響這些核區的神經活性。


在本研究中，我們以輕觸覺刺激引發神經損傷大鼠的觸感痛反應，並在大鼠的邊緣皮質裡看到細胞活性增加的現象；在給予 GBP 止痛後，這些活性增加的細胞數量也明顯下降，我們更進一步指出這些改變活性的細胞是神經元，而不是膠細胞。我們的結果顯示觸感痛會改變邊緣皮質的神經元活性，而 GBP 的止痛反應可以調節這些神經元的活性。

第五章、綜合討論與結論



觸感痛是神經病變性疼痛的主要症狀(Baron, 2006)，但觸感痛在腦部造成了哪些核區的活性改變，目前仍沒有明確的結論。Gabapentin (GBP)是鈣離子通道的抑制劑，在臨床上可有效緩解神經病變性疼痛(Finnerup et al., 2005)，但其在腦中的作用位置仍不清楚。本研究使用正子造影(FDG-PET)及免疫組織染色兩種方法，探討神經損傷大鼠在觸感痛狀態下，腦部的葡萄糖代謝率及神經活化標誌的變化，並推測 GBP 在腦中可能的作用位置。在論文第二章的部分，我們根據 Decosterd and Woolf (2000)的方式建立神經病變性疼痛的大鼠模式。由第二章的實驗結果可知，坐骨神經分支選擇性傷害(SNI)可導致大鼠表現出自發性疼痛、觸感痛及熱痛覺過敏等行為；我們也測試了 GBP 的止痛效果，結果顯示 GBP 的止痛有劑量依賴性的現象，考量到後續實驗，我們選擇 100 mg/kg 作為止痛劑量。


在論文第三章的部分，我們以正子造影對同一隻大鼠在不同條件下進行三次腦部掃描。由第三章的實驗結果可知，在清醒的實驗組(SNI 組)大鼠中，若給予輕觸覺刺激，會導致 SNI 組大鼠的觸感痛反應，且在其腦中的島狀皮質(IC)、丘腦及小腦有明顯的葡萄糖代謝率增加的現象；在對照組(Sham 組)大鼠中，不管是對輕觸覺刺激的縮腳比率，或是腦中的葡萄糖代謝率都沒有明顯的差異。當給予 GBP 止痛後，SNI 組大鼠的觸感痛反應明顯降低，且其腦中的丘腦及小腦的葡萄糖代謝率回復到正常狀態，而前額葉皮質(mPFC)及前扣帶迴皮質(ACC)的葡萄糖代謝率有明顯的下降；在 Sham 組大鼠中，給予 GBP 並不影響其對輕觸覺刺激的縮腳比率，且腦中的葡萄糖代謝率也沒有明顯的差異。比較特別的是，給予 GBP 會造成 SNI 組大鼠的初級體感覺皮質鬚鬚(S1BF)及上唇(S1ULp)區域的葡萄糖代謝率大幅增加，而在 Sham 組大鼠沒有這個現象，這可能是 GBP 藥物的副作用。



在論文第四章的部分，我們以免疫組織染色法來分析神經損傷大鼠在觸感痛狀態下腦部細胞層級的變化。由第四章的實驗結果可知，觸感痛會使 SNI 組大鼠腦中部分核區的神經活化標誌表現增加，由磷酸化細胞外訊息調節激酶(pERK)的染色結果顯示，SNI 組大鼠的 pERK 細胞在 mPFC 及 IC 的數量較 Sham 組有明顯的增加；由神經活化標誌(c-Fos)的染色結果顯示，SNI 組大鼠的 c-Fos 細胞在 mPFC 的數量較 Sham 組有明顯的增加。當給予 GBP 止痛後，這些增加的神經活化標誌表現量也會明顯的下降。

在本論文中，我們使用了三種與細胞活性變化有關的分子標誌，在正子造影實驗是葡萄糖的放射性類似物 FDG，在免疫染色實驗是 pERK 及 c-Fos。ERK 是細胞內生性的激酶，在短暫的刺激下即可活化(pERK) (Ji et al., 1999)，而 c-Fos 是一種基因轉錄因子(transcription factor)，則需要較長時間才能大量表現(Hunt et al., 1987)。根據我們的實驗設計，pERK 可代表觸感痛在短時間(10 分鐘)內的細胞活化結果，與觸感痛反應時的突觸可塑性改變有關(Gao and Ji, 2009)；而 c-Fos 則是長時間(90 分鐘)下的細胞活化結果，與觸感痛反應導致的蛋白轉譯有關(Gao and Ji, 2009)。FDG-PET 則提供了觸感痛刺激 40 分鐘後的代謝率變化。儘管 FDG-PET 的結果不完全與免疫組織染色的結果一致，如在觸感痛狀態下，神經損傷大鼠的外側丘腦及小腦有顯著增加的葡萄糖代謝率，而在 pERK 及 c-Fos 的染色結果卻沒有任何表現這兩種分子標誌的細胞存在；但在神經損傷大鼠的 mPFC、ACC、IC，這三個核區的反應可以顯示細胞活化的時間序列變化。

當疼痛訊息傳遞到腦部時，由解剖學上的證據可以將神經纖維投射的路徑分為外側痛覺路徑及內側痛覺路徑(Almeida et al., 2004)。外側痛覺路徑在大腦皮質會投射到體感覺皮質(S1、S2)，內側痛覺路徑在大腦皮質會投射到屬於邊緣系統的皮質(ACC、IC)，並與 PFC 有大量連結(Almeida et al., 2004; Treede et al., 1999)。體感



覺皮質與疼痛的感覺區辨(sensory-discriminative)屬性有關，而邊緣皮質與疼痛的情緒動機(affective-motivational)屬性有關(Melzack and Casey, 1968; Treede et al., 1999)。在本論文中，由三種與細胞活性變化有關的分子標誌的研究結果顯示，mPFC、ACC、IC 等邊緣皮質在神經損傷大鼠的觸感痛狀態下呈現活性上升的情況，但屬於體感覺皮質的S1卻沒有明顯的活性變化，這可能顯示觸感痛這種不舒服的症狀，與疼痛的情緒動機屬性有較密切的關係。

在SNI組大鼠的vmPFC，表現pERK及c-Fos的細胞在觸感痛反應下都較Sham組大鼠有明顯的增加，儘管FDG-PET的代謝率變化在mPFC沒有明顯增加，但在給予GBP止痛後，這三種分子標誌都有明顯的下降。Apkarian et al. (2005)在回顧以人類為受試者的疼痛功能性腦影像研究中，發現當正常人受到痛刺激時，約有55%的報告顯示PFC有活化，但在有慢性痛的病人腦中，有81%的報告顯示PFC有活性，這個增加的比率有明顯的差異。由我們與其他研究者的結果顯示，PFC這個與認知及決策有關的核區，在慢性痛狀態下造成的功能性變化，或許是觸感痛的成因。


在SNI組大鼠的ACC，這三種分子標誌在觸感痛反應下都沒有明顯的增加，但在給予GBP止痛後，這三種分子標誌都呈現明顯的下降。對照於Sham組大鼠，在輕觸覺刺激下，Sham組大鼠並沒有觸感痛的反應，其腦中這三種分子標誌也沒有增加；而在給予GBP後，Sham組大鼠的行為沒有改變，且腦中這三種分子標誌一樣沒有降低。在正常人的功能性腦影像研究中，有87%的報告都指出當受試者接受疼痛刺激時，ACC會特別活化(Apkarian et al., 2005)。ACC也是處理疼痛的情緒動機屬性的主要核區(Price, 2000; Rainville et al., 1997; Treede et al., 1999)。雖然我們的研究結果顯示在觸感痛狀態下ACC的活性沒有顯著上升，但在上一章的討論裡，我們也指出ACC的活性沒改變可能是統計分析上的問題。值得注意的是，

Apkarian et al. (2005)在分析慢性痛病人的功能性腦影像研究，發現只有 45%的報告顯示 ACC 在疼痛刺激下有活化，與正常人 87%的報告有顯著差異，這也可能是慢性痛狀態下改變了 ACC 的正常功能所致。



比較特別的是在 SNI 組大鼠的 IC，表現 pERK 的細胞在觸感痛反應下較 Sham 組大鼠有顯著的增加，FDG-PET 的結果也顯示 IC 的葡萄糖代謝率有明顯上升，但表現 c-Fos 的細胞在觸感痛反應下卻沒有明顯的改變。這些顯著表現的 pERK 細胞集中在 IC 前側，特別是淺層(2 ~ 3 層)皮質的位置(圖 5-1 及 5-2)。當給予 GBP 止痛後，SNI 組大鼠 IC 的 pERK 細胞有顯著的減少，但 FDG-PET 的結果顯示 IC 的葡萄糖代謝率雖有降低的趨勢，卻沒有統計上的差異，而 c-Fos 細胞一樣沒有明顯的改變。由我們的研究結果顯示，神經損傷大鼠在觸感痛狀態下，IC 似乎只會呈現短時間的細胞活性改變，而長時間的細胞活性並沒有變化。由於 IC 的細胞活性在觸感痛狀態下有明顯不一致的變化，儘管目前的研究無法確認這個現象的機制，我們認為 IC 在觸感痛，或是在慢性痛的維持上扮演一個重要的角色。在正常人的功能性腦影像研究，有 94%的報告指出 IC 在疼痛刺激下會活化，儘管在慢性痛病人中只有 58%的報告有相同的結果，這顯示 IC 在疼痛的情緒動機屬性上的角色不亞於 ACC，但對於 IC 的了解卻不及 ACC 的研究(Apkarian et al., 2005; Treede et al., 1999; Zhuo, 2008)。

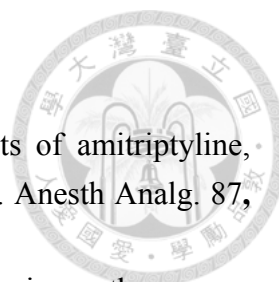
本論文使用三種不同時間序列上表現的分子標誌來探討神經損傷大鼠腦中的功能性變化，但我們只針對觸感痛造成的影響，而其它的神經病變性疼痛症狀如痛覺過敏現象，仍待進一步研究。觸感痛訊息在周邊是由 A β 細胞傳遞，而熱痛覺過敏是由 C 纖維細胞傳遞(Field et al., 1999a; Ossipov et al., 1999; Shir and Seltzer, 1990)，因此研究不同疼痛種類引發的腦部反應，可以了解神經病變性疼痛的中樞處理機制。儘管在本論文中，我們使用了三種與細胞活性變化有關的分子標誌來



研究觸感痛在腦中的變化，但每一種分子標誌都有其應用上的限制，以外側丘腦及小腦來說，儘管 FDG-PET 呈現明顯的葡萄糖代謝率增加，但 pERK 及 c-Fos 卻不表現在這些區域；而以 SIULp 來說，即使葡萄糖代謝率有顯著增加，但 pERK 及 c-Fos 細胞的表現量卻很少；這些狀況說明了分子標誌的限制性。雖然如此，透過 FDG-PET 及免疫染色的整體呈現，提供我們一個找出相關活化核區的篩選方式，如在觸感痛下只在短時間內活化的前側 IC，未來可以透過電生理或藥理實驗進一步研究其在神經病變性疼痛裡的角色。

在本研究中我們也嘗試找出 GBP 在腦中的作用位置，由於 GBP 在腦中結合到許多核區(Hill et al., 1993; Thurlow et al., 1996)，但與其止痛作用有關的核區並不清楚；由本研究的結果，給予神經損傷大鼠 GBP 後，邊緣皮質的細胞活性都有明顯的降低，意味著 GBP 在腦中的作用位置可能就在邊緣皮質；但由於我們是利用腹腔注射 GBP 產生止痛效果，因此 GBP 對邊緣皮質的作用並無法確定是直接或間接的效果，若能將 GBP 直接注射到這些腦區並測試動物的疼痛行為，則可確定 GBP 是否直接作用在邊緣皮質。除此之外，在本研究中我們只使用單一劑量(100 mg/kg)的 GBP 來止痛，使用不同的劑量，如止痛時間較短的 60 mg/kg，或許在腦中產生的變化也會不同。

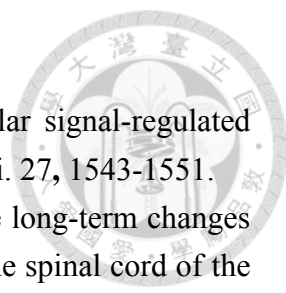
在本研究中，透過正子造影及免疫組織染色，對清醒神經損傷大鼠在觸感痛狀態下的腦部神經活性研究可知，觸感痛在神經損傷大鼠腦中主要改變了 mPFC、ACC 及 IC 等邊緣皮質的細胞活性，而 GBP 在腦部的作用位置可能就是在抑制邊緣皮質的細胞活性來達成止痛作用。



參考文獻：

- Abdi, S., Lee, D.H., Chung, J.M., 1998. The anti-allodynic effects of amitriptyline, gabapentin, and lidocaine in a rat model of neuropathic pain. *Anesth Analg.* 87, 1360-1366.
- Almeida, T.F., Roizenblatt, S., Tufik, S., 2004. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. *Brain Res.* 1000, 40-56.
- Alvarez, P., Dieb, W., Hafidi, A., Voisin, D.L., Dallel, R., 2009. Insular cortex representation of dynamic mechanical allodynia in trigeminal neuropathic rats. *Neurobiol Dis.* 33, 89-95.
- Amaya, F., Wang, H., Costigan, M., Allchorne, A.J., Hatcher, J.P., Egerton, J., Stean, T., Morisset, V., Grose, D., Gunthorpe, M.J., Chessell, I.P., Tate, S., Green, P.J., Woolf, C.J., 2006. The voltage-gated sodium channel $Na_v1.9$ is an effector of peripheral inflammatory pain hypersensitivity. *J Neurosci.* 26, 12852-12860.
- Amir, R., Kocsis, J.D., Devor, M., 2005. Multiple interacting sites of ectopic spike electrogenesis in primary sensory neurons. *J Neurosci.* 25, 2576-2585.
- Apkarian, A.V., Bushnell, M.C., Treede, R.D., Zubieta, J.K., 2005. Human brain mechanisms of pain perception and regulation in health and disease. *Eur J Pain.* 9, 463-484.
- Apkarian, A.V., Baliki, M.N., Geha, P.Y., 2009. Towards a theory of chronic pain. *Prog Neurobiol.* 87, 81-97.
- Arikath, J., Campbell, K.P., 2003. Auxiliary subunits: essential components of the voltage-gated calcium channel complex. *Curr Opin Neurobiol.* 13, 298-307.
- Arner, S., Meyerson, B.A., 1988. Lack of analgesic effect of opioids on neuropathic and idiopathic forms of pain. *Pain.* 33, 11-23.
- Asmundson, G.J., Katz, J., 2009. Understanding the co-occurrence of anxiety disorders and chronic pain: state-of-the-art. *Depress Anxiety.* 26, 888-901.
- Back, S.K., Kim, J.S., Hong, S.K., Na, H.S., 2003. Ascending pathways for mechanical allodynia in a rat model of neuropathic pain. *Neuroreport.* 14, 1623-1626.
- Back, S.K., Won, S.Y., Hong, S.K., Na, H.S., 2004. Gabapentin relieves mechanical, warm and cold allodynia in a rat model of peripheral neuropathy. *Neurosci Lett.* 368, 341-344.
- Bair, M.J., Robinson, R.L., Katon, W., Kroenke, K., 2003. Depression and pain comorbidity: a literature review. *Arch Intern Med.* 163, 2433-2445.
- Bak, L.K., Schousboe, A., Sonnewald, U., Waagepetersen, H.S., 2006. Glucose is necessary to maintain neurotransmitter homeostasis during synaptic activity in cultured glutamatergic neurons. *J Cereb Blood Flow Metab.* 26, 1285-1297.
- Balasubramanian, S., Stemkowski, P.L., Stebbing, M.J., Smith, P.A., 2006. Sciatic chronic constriction injury produces cell-type-specific changes in the

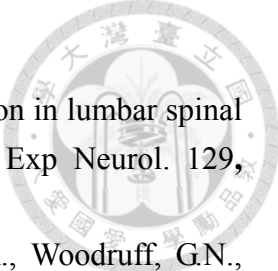
- electrophysiological properties of rat substantia gelatinosa neurons. *J Neurophysiol.* 96, 579-590.
- Baron, R., 2006. Mechanisms of disease: neuropathic pain - a clinical perspective. *Nat Clin Pract Neuro.* 2, 95-106.
- Bauer, C.S., Nieto-Rostro, M., Rahman, W., Tran-Van-Minh, A., Ferron, L., Douglas, L., Kadurin, I., Sri Ranjan, Y., Fernandez-Alacid, L., Millar, N.S., Dickenson, A.H., Lujan, R., Dolphin, A.C., 2009. The increased trafficking of the calcium channel subunit $\alpha_2\delta$ -1 to presynaptic terminals in neuropathic pain is inhibited by the $\alpha_2\delta$ ligand pregabalin. *J Neurosci.* 29, 4076-4088.
- Becerra, L.R., Breiter, H.C., Stojanovic, M., Fishman, S., Edwards, A., Comite, A.R., Gonzalez, R.G., Borsook, D., 1999. Human brain activation under controlled thermal stimulation and habituation to noxious heat: an fMRI study. *Magn Reson Med.* 41, 1044-1057.
- Beggs, S., Salter, M.W., 2007. Stereological and somatotopic analysis of the spinal microglial response to peripheral nerve injury. *Brain Behav Immun.* 21, 624-633.
- Bennett, G.J., Xie, Y.K., 1988. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain.* 33, 87-107.
- Bester, H., Beggs, S., Woolf, C.J., 2000. Changes in tactile stimuli-induced behavior and c-Fos expression in the superficial dorsal horn and in parabrachial nuclei after sciatic nerve crush. *J Comp Neurol.* 428, 45-61.
- Bifone, A., Gozzi, A., Schwarz, A.J., 2010. Functional connectivity in the rat brain: a complex network approach. *Magn Reson Imaging.* 28, 1200-1209.
- Black, J.A., Liu, S., Tanaka, M., Cummins, T.R., Waxman, S.G., 2004. Changes in the expression of tetrodotoxin-sensitive sodium channels within dorsal root ganglia neurons in inflammatory pain. *Pain.* 108, 237-247.
- Bouhassira, D., Lanteri-Minet, M., Attal, N., Laurent, B., Touboul, C., 2008. Prevalence of chronic pain with neuropathic characteristics in the general population. *Pain.* 136, 380-387.
- Bullitt, E., 1990. Expression of c-fos-like protein as a marker for neuronal activity following noxious stimulation in the rat. *J Comp Neurol.* 296, 517-530.
- Campbell, J.N., Raja, S.N., Meyer, R.A., Mackinnon, S.E., 1988. Myelinated afferents signal the hyperalgesia associated with nerve injury. *Pain.* 32, 89-94.
- Campbell, J.N., Meyer, R.A., 2006. Mechanisms of neuropathic pain. *Neuron.* 52, 77-92.
- Cao, H., Gao, Y.J., Ren, W.H., Li, T.T., Duan, K.Z., Cui, Y.H., Cao, X.H., Zhao, Z.Q., Ji, R.R., Zhang, Y.Q., 2009. Activation of extracellular signal-regulated kinase in the anterior cingulate cortex contributes to the induction and expression of

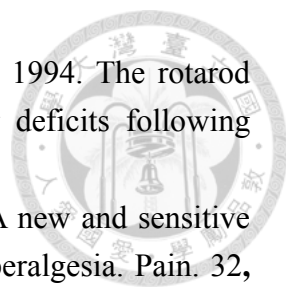
- 
- affective pain. *J Neurosci.* 29, 3307-3321.
- Carrasquillo, Y., Gereau, R.W., 2007. Activation of the extracellular signal-regulated kinase in the amygdala modulates pain perception. *J Neurosci.* 27, 1543-1551.
- Catheline, G., Guen, S.L., Honore, P., Besson, J.M., 1999. Are there long-term changes in the basal or evoked Fos expression in the dorsal horn of the spinal cord of the mononeuropathic rat? *Pain.* 80, 347-357.
- Catterall, W.A., 2000. Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 16, 521-555.
- Cesare, P., McNaughton, P., 1997. Peripheral pain mechanisms. *Curr Opin Neurobiol.* 7, 493-499.
- Chaplan, S.R., Bach, F.W., Pogrel, J.W., Chung, J.M., Yaksh, T.L., 1994a. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods.* 53, 55-63.
- Chaplan, S.R., Pogrel, J.W., Yaksh, T.L., 1994b. Role of voltage-dependent calcium channel subtypes in experimental tactile allodynia. *J Pharmacol Exp Ther.* 269, 1117-1123.
- Chen, Y.Y., Shih, Y.Y.I., Lo, Y.C., Lu, P.L., Tsang, S., Jaw, F.S., Liu, R.S., 2010. MicroPET imaging of noxious thermal stimuli in the conscious rat brain. *Somatosens Mot Res.* 27, 69-81.
- Chih, C.P., Lipton, P., Roberts, E.L., 2001. Do active cerebral neurons really use lactate rather than glucose? *Trends Neurosci.* 24, 573-578.
- Choi, Y., Yoon, Y.W., Na, H.S., Kim, S.H., Chung, J.M., 1994. Behavioral signs of ongoing pain and cold allodynia in a rat model of neuropathic pain. *Pain.* 59, 369-376.
- Coderre, T.J., Katz, J., 1997. Peripheral and central hyperexcitability: differential signs and symptoms in persistent pain. *Behav Brain Sci.* 20, 404-419.
- Coffeen, U., Ortega-Legaspi, J.M., Lopez-Munoz, F.J., Simon-Arceo, K., Jaimes, O., Pellicer, F., 2011. Insular cortex lesion diminishes neuropathic and inflammatory pain-like behaviours. *Eur J Pain.* 15, 132-138.
- Cole, R.L., Lechner, S.M., Williams, M.E., Prodanovich, P., Bleicher, L., Varney, M.A., Gu, G., 2005. Differential distribution of voltage-gated calcium channel alpha-2 delta subunit mRNA-containing cells in the rat central nervous system and the dorsal root ganglia. *J Comp Neurol.* 491, 246-269.
- Colombo, P.J., Brightwell, J.J., Countryman, R.A., 2003. Cognitive strategy-specific increases in phosphorylated cAMP response element-binding protein and c-Fos in the hippocampus and dorsal striatum. *J Neurosci.* 23, 3547-3554.
- Costigan, M., Befort, K., Karchewski, L., Griffin, R.S., D'Urso, D., Allchorne, A., Sitariski, J., Mannion, J.W., Pratt, R.E., Woolf, C.J., 2002. Replicate high-density rat genome oligonucleotide microarrays reveal hundreds of regulated genes in

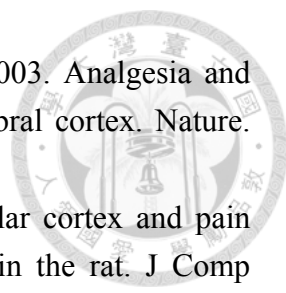
- the dorsal root ganglion after peripheral nerve injury. *BMC Neurosci.* 3, 16.
- Costigan, M., Scholz, J., Woolf, C.J., 2009. Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage. *Annu Rev Neurosci.* 32, 1-32.
- Coull, J.A., Boudreau, D., Bachand, K., Prescott, S.A., Nault, F., Sik, A., De Koninck, P., De Koninck, Y., 2003. Trans-synaptic shift in anion gradient in spinal lamina I neurons as a mechanism of neuropathic pain. *Nature.* 424, 938-942.
- Dai, Y., Iwata, K., Kondo, E., Morimoto, T., Noguchi, K., 2001. A selective increase in Fos expression in spinal dorsal horn neurons following graded thermal stimulation in rats with experimental mononeuropathy. *Pain.* 90, 287-296.
- Dai, Y., Iwata, K., Fukuoka, T., Kondo, E., Tokunaga, A., Yamanaka, H., Tachibana, T., Liu, Y., Noguchi, K., 2002. Phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase in primary afferent neurons by noxious stimuli and its involvement in peripheral sensitization. *J Neurosci.* 22, 7737-7745.
- Davies, A., Hendrich, J., Van Minh, A.T., Wratten, J., Douglas, L., Dolphin, A.C., 2007. Functional biology of the $\alpha_2\delta$ subunits of voltage-gated calcium channels. *Trends Pharmacol Sci.* 28, 220-228.
- Davis, K.D., 2011. Neuroimaging of pain: what does it tell us? *Curr Opin Support Palliat Care.* 5, 116-121.
- Decosterd, I., Woolf, C.J., 2000. Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. *Pain.* 87, 149-158.
- DeLeo, J.A., Coombs, D.W., McCarthy, L.E., 1991. Differential c-fos-like protein expression in mechanically versus chemically induced visceral nociception. *Brain Res Mol Brain Res.* 11, 167-170.
- Derbyshire, S.W.G., Jones, A.K.P., Gyulai, F., Clark, S., Townsend, D., Firestone, L.L., 1997. Pain processing during three levels of noxious stimulation produces differential patterns of central activity. *Pain.* 73, 431-445.
- Devoize, L., Alvarez, P., Monconduit, L., Dallel, R., 2011. Representation of dynamic mechanical allodynia in the ventral medial prefrontal cortex of trigeminal neuropathic rats. *Eur J Pain.* 15, 676-682.
- Devor, M., 2009. Ectopic discharge in Abeta afferents as a source of neuropathic pain. *Exp Brain Res.* 196, 115-128.
- Dirig, D.M., Salami, A., Rathbun, M.L., Ozaki, G.T., Yaksh, T.L., 1997. Characterization of variables defining hindpaw withdrawal latency evoked by radiant thermal stimuli. *J Neurosci Methods.* 76, 183-191.
- Dixon, W.J., 1980. Efficient analysis of experimental observations. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 20, 441-462.
- Doth, A.H., Hansson, P.T., Jensen, M.P., Taylor, R.S., 2010. The burden of neuropathic pain: a systematic review and meta-analysis of health utilities. *Pain.* 149,

338-344.

- Dray, A., 2008. Neuropathic pain: emerging treatments. *Br J Anaesth.* 101, 48-58.
- England, J.D., Happel, L.T., Kline, D.G., Gamboni, F., Thouron, C.L., Liu, Z.P., Levinson, S.R., 1996. Sodium channel accumulation in humans with painful neuromas. *Neurology.* 47, 272-276.
- Erichsen, H.K., Blackburn-Munro, G., 2002. Pharmacological characterization of the spared nerve injury model of neuropathic pain. *Pain.* 98, 151-161.
- Felix, R., Gurnett, C.A., De Waard, M., Campbell, K.P., 1997. Dissection of functional domains of the voltage-dependent Ca^{2+} channel $\alpha_2\delta$ subunit. *J Neurosci.* 17, 6884-6891.
- Field, M.J., Bramwell, S., Hughes, J., Singh, L., 1999a. Detection of static and dynamic components of mechanical allodynia in rat models of neuropathic pain: are they signalled by distinct primary sensory neurons? *Pain.* 83, 303-311.
- Field, M.J., McCleary, S., Hughes, J., Singh, L., 1999b. Gabapentin and pregabalin, but not morphine and amitriptyline, block both static and dynamic components of mechanical allodynia induced by streptozocin in the rat. *Pain.* 80, 391-398.
- Field, M.J., Cox, P.J., Stott, E., Melrose, H., Offord, J., Su, T.Z., Bramwell, S., Corradini, L., England, S., Winks, J., Kinloch, R.A., Hendrich, J., Dolphin, A.C., Webb, T., Williams, D., 2006. Identification of the $\alpha_2\delta$ -1 subunit of voltage-dependent calcium channels as a molecular target for pain mediating the analgesic actions of pregabalin. *Proc Natl Acad Sci USA.* 103, 17537-17542.
- Fink, K., Meder, W., Dooley, D.J., Gothert, M., 2000. Inhibition of neuronal Ca^{2+} influx by gabapentin and subsequent reduction of neurotransmitter release from rat neocortical slices. *Br J Pharmacol.* 130, 900-906.
- Finnerup, N.B., Otto, M., McQuay, H.J., Jensen, T.S., Sindrup, S.H., 2005. Algorithm for neuropathic pain treatment: an evidence based proposal. *Pain.* 118, 289-305.
- Fishbain, D.A., Cole, B., Lewis, J.E., Gao, J., 2010. What is the evidence for chronic pain being etiologically associated with the DSM-IV category of sleep disorder due to a general medical condition? A structured evidence-based review. *Pain Med.* 11, 158-179.
- Galan, A., Cervero, F., Laird, J.M.A., 2003. Extracellular signaling-regulated kinase-1 and -2 (ERK 1/2) mediate referred hyperalgesia in a murine model of visceral pain. *Brain Res Mol Brain Res.* 116, 126-134.
- Gao, Y.J., Ji, R.R., 2009. c-Fos or pERK, which is a better marker for neuronal activation and central sensitization after noxious stimulation and tissue injury? *Open Pain J.* 2, 11-17.
- Garrison, C.J., Dougherty, P.M., Kajander, K.C., Carlton, S.M., 1991. Staining of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in lumbar spinal cord increases following a

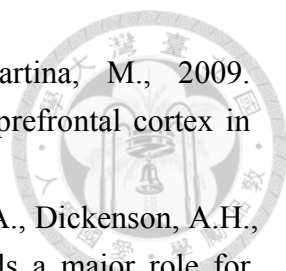
- 
- sciatic nerve constriction injury. *Brain Res.* 565, 1-7.
- Garrison, C.J., Dougherty, P.M., Carlton, S.M., 1994. GFAP expression in lumbar spinal cord of naive and neuropathic rats treated with MK-801. *Exp Neurol.* 129, 237-243.
- Gee, N.S., Brown, J.P., Dissanayake, V.U., Offord, J., Thurlow, R., Woodruff, G.N., 1996. The novel anticonvulsant drug, gabapentin (Neurontin), binds to the $\alpha_2\delta$ subunit of a calcium channel. *J Biol Chem.* 271, 5768-5776.
- Geha, P.Y., Baliki, M.N., Wang, X., Harden, R.N., Paice, J.A., Apkarian, A.V., 2008. Brain dynamics for perception of tactile allodynia (touch-induced pain) in postherpetic neuralgia. *Pain.* 138, 641-656.
- Gerke, M.B., Duggan, A.W., Xu, L., Siddall, P.J., 2003. Thalamic neuronal activity in rats with mechanical allodynia following contusive spinal cord injury. *Neuroscience.* 117, 715-722.
- Gibney, S.M., Gosselin, R.D., Dinan, T.G., Cryan, J.F., 2010. Colorectal distension-induced prefrontal cortex activation in the Wistar-Kyoto rat: implications for irritable bowel syndrome. *Neuroscience.* 165, 675-683.
- Gilron, I., 2007. Gabapentin and pregabalin for chronic neuropathic and early postsurgical pain: current evidence and future directions. *Curr Opin Anaesthesiol.* 20, 456-472.
- Gomez-Ospina, N., Tsuruta, F., Barreto-Chang, O., Hu, L., Dolmetsch, R., 2006. The C terminus of the L-type voltage-gated calcium channel $Ca_v1.2$ encodes a transcription factor. *Cell.* 127, 591-606.
- Gormsen, L., Rosenberg, R., Bach, F.W., Jensen, T.S., 2010. Depression, anxiety, health-related quality of life and pain in patients with chronic fibromyalgia and neuropathic pain. *Eur J Pain.* 14, 127.e1-8.
- Governo, R.J.M., Morris, P.G., Marsden, C.A., Chapman, V., 2008. Gabapentin evoked changes in functional activity in nociceptive regions in the brain of the anaesthetized rat: an fMRI study. *Br J Pharmacol.* 153, 1558-1567.
- Gracely, R.H., Lynch, S.A., Bennett, G.J., 1992. Painful neuropathy: altered central processing maintained dynamically by peripheral input. *Pain.* 51, 175-194.
- Gundersen, H.J.G., Jensen, E.B.V., Kieu, K., Nielsen, J., 1999. The efficiency of systematic sampling in stereology - reconsidered. *J Microsc.* 193, 199-211.
- Hains, B.C., Klein, J.P., Saab, C.Y., Craner, M.J., Black, J.A., Waxman, S.G., 2003. Upregulation of sodium channel $Na_v1.3$ and functional involvement in neuronal hyperexcitability associated with central neuropathic pain after spinal cord injury. *J Neurosci.* 23, 8881-8892.
- Hama, A.T., Borsook, D., 2005. Behavioral and pharmacological characterization of a distal peripheral nerve injury in the rat. *Pharmacol Biochem Behav.* 81, 170-181.

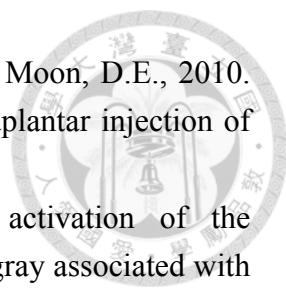
- 
- Hamm, R.J., Pike, B.R., O'Dell, D.M., Lyeth, B.G., Jenkins, L.W., 1994. The rotarod test: an evaluation of its effectiveness in assessing motor deficits following traumatic brain injury. *J Neurotrauma*. 11, 187-196.
- Hargreaves, K., Dubner, R., Brown, F., Flores, C., Joris, J., 1988. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain*. 32, 77-88.
- He, Y., Tian, X., Hu, X., Porreca, F., Wang, Z.J., 2012. Negative reinforcement reveals non-evoked ongoing pain in mice with tissue or nerve injury. *J Pain*. 13, 598-607.
- Hendrich, J., Van Minh, A.T., Hebllich, F., Nieto-Rostro, M., Watschinger, K., Striessnig, J., Wratten, J., Davies, A., Dolphin, A.C., 2008. Pharmacological disruption of calcium channel trafficking by the $\alpha_2\delta$ ligand gabapentin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 105, 3628-3633.
- Hill, D.R., Suman-Chauhan, N., Woodruff, G.N., 1993. Localization of [3 H]gabapentin to a novel site in rat brain: autoradiographic studies. *Eur J Pharmacol*. 244, 303-309.
- Hooker, B.A., Tobon, G., Baker, S.J., Zhu, C., Hesterman, J., Schmidt, K., Rajagovindan, R., Chandran, P., Joshi, S.K., Bannon, A.W., Hoppin, J., Beaver, J., Fox, G.B., Day, M., Upadhyay, J., 2014. Gabapentin-induced pharmacodynamic effects in the spinal nerve ligation model of neuropathic pain. *Eur J Pain*. 18, 223-237.
- Hughes, D.I., Scott, D.T., Riddell, J.S., Todd, A.J., 2007. Upregulation of substance P in low-threshold myelinated afferents is not required for tactile allodynia in the chronic constriction injury and spinal nerve ligation models. *J Neurosci*. 27, 2035-2044.
- Hunt, S.P., Pini, A., Evan, G., 1987. Induction of c-fos-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation. *Nature*. 328, 632-634.
- Iadarola, M.J., Max, M.B., Berman, K.F., Byas-Smith, M.G., Coghill, R.C., Gracely, R.H., Bennett, G.J., 1995. Unilateral decrease in thalamic activity observed with positron emission tomography in patients with chronic neuropathic pain. *Pain*. 63, 55-64.
- Iannetti, G.D., Zambreanu, L., Wise, R.G., Buchanan, T.J., Huggins, J.P., Smart, T.S., Vennart, W., Tracey, I., 2005. Pharmacological modulation of pain-related brain activity during normal and central sensitization states in humans. *Proc Natl Acad Sci USA*. 102, 18195-18200.
- Jaggi, A.S., Jain, V., Singh, N., 2011. Animal models of neuropathic pain. *Fundam Clin Pharmacol*. 25, 1-28.
- Jarvis, S.E., Zamponi, G.W., 2007. Trafficking and regulation of neuronal voltage-gated calcium channels. *Curr Opin Cell Biol*. 19, 474-482.

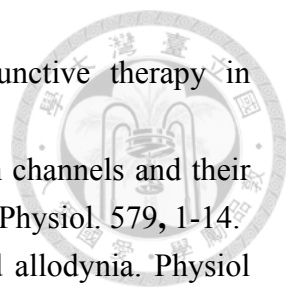
- 
- Jasmin, L., Rabkin, S.D., Granato, A., Boudah, A., Ohara, P.T., 2003. Analgesia and hyperalgesia from GABA-mediated modulation of the cerebral cortex. *Nature*. 424, 316-320.
- Jasmin, L., Granato, A., Ohara, P.T., 2004. Rostral agranular insular cortex and pain areas of the central nervous system: a tract-tracing study in the rat. *J Comp Neurol*. 468, 425-440.
- Ji, R.R., Rupp, F., 1997. Phosphorylation of transcription factor CREB in rat spinal cord after formalin-induced hyperalgesia: relationship to c-fos induction. *J Neurosci*. 17, 1776-1785.
- Ji, R.R., Baba, H., Brenner, G.J., Woolf, C.J., 1999. Nociceptive-specific activation of ERK in spinal neurons contributes to pain hypersensitivity. *Nat Neurosci*. 2, 1114-1119.
- Ji, R.R., Befort, K., Brenner, G.J., Woolf, C.J., 2002. ERK MAP kinase activation in superficial spinal cord neurons induces prodynorphin and NK-1 upregulation and contributes to persistent inflammatory pain hypersensitivity. *J Neurosci*. 22, 478-485.
- Jiang, L., Ji, Y., Voulalas, P.J., Keaser, M., Xu, S., Gullapalli, R.P., Greenspan, J., Masri, R., 2014. Motor cortex stimulation suppresses cortical responses to noxious hindpaw stimulation after spinal cord lesion in rats. *Brain Stimul*. 7, 182-189.
- Jin, S.X., Lei, L.G., Wang, Y., Da, D.F., Zhao, Z.Q., 1999. Endomorphin-1 reduces carrageenan-induced Fos expression in the rat spinal dorsal horn. *Neuropeptides*. 33, 281-284.
- Jin, S.X., Zhuang, Z.Y., Woolf, C.J., Ji, R.R., 2003. p38 mitogen-activated protein kinase is activated after a spinal nerve ligation in spinal cord microglia and dorsal root ganglion neurons and contributes to the generation of neuropathic pain. *J Neurosci*. 23, 4017-4022.
- Johansen, J.P., Fields, H.L., Manning, B.H., 2001. The affective component of pain in rodents: direct evidence for a contribution of the anterior cingulate cortex. *Proc Natl Acad Sci USA*. 98, 8077-8082.
- Jones, K.L., Finn, D.P., Governo, R.J.M., Prior, M.J., Morris, P.G., Kendall, D.A., Marsden, C.A., Chapman, V., 2009. Identification of discrete sites of action of chronic treatment with desipramine in a model of neuropathic pain. *Neuropharmacology*. 56, 405-413.
- Kalso, E., Edwards, J.E., Moore, R.A., McQuay, H.J., 2004. Opioids in chronic non-cancer pain: systematic review of efficacy and safety. *Pain*. 112, 372-380.
- Kawasaki, Y., Kohno, T., Zhuang, Z.Y., Brenner, G.J., Wang, H., Van Der Meer, C., Befort, K., Woolf, C.J., Ji, R.R., 2004. Ionotropic and metabotropic receptors, protein kinase A, protein kinase C, and Src contribute to C-fiber-induced ERK

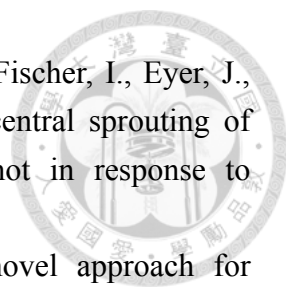
- activation and cAMP response element-binding protein phosphorylation in dorsal horn neurons, leading to central sensitization. *J Neurosci.* 24, 8310-8321.
- Kayser, V., Christensen, D., 2000. Antinociceptive effect of systemic gabapentin in mononeuropathic rats, depends on stimulus characteristics and level of test integration. *Pain.* 88, 53-60.
- Kim, C.E., Kim, Y.K., Chung, G., Im, H.J., Lee, D.S., Kim, J., Kim, S.J., 2014. Identifying neuropathic pain using ¹⁸F-FDG micro-PET: a multivariate pattern analysis. *Neuroimage.* 86, 311-316.
- Kim, S.H., Chung, J.M., 1992. An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain.* 50, 355-363.
- King, T., Vera-Portocarrero, L., Gutierrez, T., Vanderah, T.W., Dussor, G., Lai, J., Fields, H.L., Porreca, F., 2009. Unmasking the tonic-aversive state in neuropathic pain. *Nat Neurosci.* 12, 1364-1366.
- King, T., Qu, C., Okun, A., Mercado, R., Ren, J., Brion, T., Lai, J., Porreca, F., 2011. Contribution of afferent pathways to nerve injury-induced spontaneous pain and evoked hypersensitivity. *Pain.* 152, 1997-2005.
- Kobayashi, M., Cui, Y., Sako, T., Sasabe, T., Mizoguchi, N., Yamamoto, K., Wada, Y., Kataoka, Y., Koshikawa, N., 2013. Functional neuroimaging of aversive taste-related areas in the alert rat revealed by positron emission tomography. *J Neurosci Res.* 91, 1363-1370.
- Kuhar, M.J., De Souza, E.B., Unnerstall, J.R., 1986. Neurotransmitter receptor mapping by autoradiography and other methods. *Annu Rev Neurosci.* 9, 27-59.
- Kupers, R., Kehlet, H., 2006. Brain imaging of clinical pain states: a critical review and strategies for future studies. *Lancet Neurol.* 5, 1033-1044.
- LaGraize, S.C., Labuda, C.J., Rutledge, M.A., Jackson, R.L., Fuchs, P.N., 2004. Differential effect of anterior cingulate cortex lesion on mechanical hypersensitivity and escape/avoidance behavior in an animal model of neuropathic pain. *Exp Neurol.* 188, 139-148.
- Lai, J., Gold, M.S., Kim, C.S., Bian, D., Ossipov, M.H., Hunter, J.C., Porreca, F., 2002. Inhibition of neuropathic pain by decreased expression of the tetrodotoxin-resistant sodium channel, NaV1.8. *Pain.* 95, 143-152.
- Latremoliere, A., Woolf, C.J., 2009. Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. *J Pain.* 10, 895-926.
- Lee, K.S., Huang, Y.H., Yen, C.T., 2012. Periaqueductal gray stimulation suppresses spontaneous pain behavior in rats. *Neurosci Lett.* 514, 42-45.
- Lei, L.G., Zhang, Y.Q., Zhao, Z.Q., 2004. Pain-related aversion and Fos expression in the central nervous system in rats. *Neuroreport.* 15, 67-71.
- Lekan, H.A., Carlton, S.M., Coggeshall, R.E., 1996. Sprouting of Abeta fibers into

- lamina II of the rat dorsal horn in peripheral neuropathy. *Neurosci Lett.* 208, 147-150.
- Lenz, F.A., Kwan, H.C., Martin, R., Tasker, R., Richardson, R.T., Dostrovsky, J.O., 1994. Characteristics of somatotopic organization and spontaneous neuronal activity in the region of the thalamic principal sensory nucleus in patients with spinal cord transection. *J Neurophysiol.* 72, 1570-1587.
- Li, C.Y., Song, Y.H., Higuera, E.S., Luo, Z.D., 2004. Spinal dorsal horn calcium channel $\alpha_2\delta$ -1 subunit upregulation contributes to peripheral nerve injury-induced tactile allodynia. *J Neurosci.* 24, 8494-8499.
- Li, C.Y., Zhang, X.L., Matthews, E.A., Li, K.W., Kurwa, A., Boroujerdi, A., Gross, J., Gold, M.S., Dickenson, A.H., Feng, G., Luo, Z.D., 2006. Calcium channel $\alpha_2\delta_1$ subunit mediates spinal hyperexcitability in pain modulation. *Pain.* 125, 20-34.
- Li, W., Wang, P., Li, H., 2014. Upregulation of glutamatergic transmission in anterior cingulate cortex in the diabetic rats with neuropathic pain. *Neurosci Lett.* 568, 29-34.
- Liu, C.N., Wall, P.D., Ben-Dor, E., Michaelis, M., Amir, R., Devor, M., 2000. Tactile allodynia in the absence of C-fiber activation: altered firing properties of DRG neurons following spinal nerve injury. *Pain.* 85, 503-521.
- Lonze, B.E., Ginty, D.D., 2002. Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron.* 35, 605-623.
- Lu, H., Zou, Q., Gu, H., Raichle, M.E., Stein, E.A., Yang, Y., 2012. Rat brains also have a default mode network. *Proc Natl Acad Sci USA.* 109, 3979-3984.
- Luo, Z.D., Chaplan, S.R., Higuera, E.S., Sorkin, L.S., Stauderman, K.A., Williams, M.E., Yaksh, T.L., 2001. Upregulation of dorsal root ganglion $\alpha_2\delta$ calcium channel subunit and its correlation with allodynia in spinal nerve-injured rats. *J Neurosci.* 21, 1868-1875.
- Mao, J., Price, D.D., Coghill, R.C., Mayer, D.J., Hayes, R.L., 1992. Spatial patterns of spinal cord [^{14}C]-2-deoxyglucose metabolic activity in a rat model of painful peripheral mononeuropathy. *Pain.* 50, 89-100.
- Mao, J., Mayer, D.J., Price, D.D., 1993. Patterns of increased brain activity indicative of pain in a rat model of peripheral mononeuropathy. *J Neurosci.* 13, 2689-2702.
- Matzner, O., Devor, M., 1994. Hyperexcitability at sites of nerve injury depends on voltage-sensitive Na^+ channels. *J Neurophysiol.* 72, 349-359.
- McCarberg, B.H., Billington, R., 2006. Consequences of neuropathic pain: quality-of-life issues and associated costs. *Am J Manag Care.* 12, S263-S268.
- Melzack, R., Casey, K.L., 1968. Sensory, motivational, and central control determinants of pain. In: *The skin senses.* D.R. Kenshalo, ed. C.C. Thomas, Springfield, pp. 423-439.

- 
- Metz, A.E., Yau, H.J., Centeno, M.V., Apkarian, A.V., Martina, M., 2009. Morphological and functional reorganization of rat medial prefrontal cortex in neuropathic pain. *Proc Natl Acad Sci USA*. 106, 2423-2428.
- Nassar, M.A., Stirling, L.C., Forlani, G., Baker, M.D., Matthews, E.A., Dickenson, A.H., Wood, J.N., 2004. Nociceptor-specific gene deletion reveals a major role for Na_v1.7 (PN1) in acute and inflammatory pain. *Proc Natl Acad Sci USA*. 101, 12706-12711.
- Nassar, M.A., Levato, A., Stirling, L.C., Wood, J.N., 2005. Neuropathic pain develops normally in mice lacking both Na_v1.7 and Na_v1.8. *Mol Pain*. 1, 24.
- Nassar, M.A., Baker, M.D., Levato, A., Ingram, R., Mallucci, G., McMahon, S.B., Wood, J.N., 2006. Nerve injury induces robust allodynia and ectopic discharges in Na_v1.3 null mutant mice. *Mol Pain*. 2, 33.
- Neugebauer, V., Li, W., Bird, G.C., Han, J.S., 2004. The amygdala and persistent pain. *Neuroscientist*. 10, 221-234.
- Nicholson, B., 2000. Gabapentin use in neuropathic pain syndromes. *Acta Neurol Scand*. 101, 359-371.
- Niikura, K., Furuya, M., Narita, M., Torigoe, K., Kobayashi, Y., Takemura, Y., Yamazaki, M., Horiuchi, H., Enomoto, T., Iseki, M., Kinoshita, H., Tomiyasu, S., Imai, S., Kuzumaki, N., Suzuki, T., Narita, M., 2011. Enhancement of glutamatergic transmission in the cingulate cortex in response to mild noxious stimuli under a neuropathic pain-like state. *Synapse*. 65, 424-432.
- Nitzan-Luques, A., Devor, M., Tal, M., 2011. Genotype-selective phenotypic switch in primary afferent neurons contributes to neuropathic pain. *Pain*. 152, 2413-2426.
- Noguchi, K., Kawai, Y., Fukuoka, T., Senba, E., Miki, K., 1995. Substance P induced by peripheral nerve injury in primary afferent sensory neurons and its effect on dorsal column nucleus neurons. *J Neurosci*. 15, 7633-7643.
- Ogawa, S., Lee, T.M., Kay, A.R., Tank, D.W., 1990. Brain magnetic resonance imaging with contrast dependent on blood oxygenation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 87, 9868-9872.
- Ohashi, K., Ichikawa, K., Chen, L., Callahan, M., Zasadny, K., Kurebayashi, Y., 2008. MicroPET detection of regional brain activation induced by colonic distention in a rat model of visceral hypersensitivity. *J Vet Med Sci*. 70, 43-49.
- Ono, Y., Lin, H.C., Tzen, K.Y., Chen, H.H., Yang, P.F., Lai, W.S., Chen, J.H., Onozuka, M., Yen, C.T., 2012. Active coping with stress suppresses glucose metabolism in the rat hypothalamus. *Stress*. 15, 207-217.
- Ossipov, M.H., Bian, D., Malan, T.P., Lai, J., Porreca, F., 1999. Lack of involvement of capsaicin-sensitive primary afferents in nerve-ligation injury induced tactile allodynia in rats. *Pain*. 79, 127-133.

- 
- Park, H.J., Joo, H.S., Chang, H.W., Lee, J.Y., Hong, S.H., Lee, Y., Moon, D.E., 2010. Attenuation of neuropathy-induced allodynia following intraplantar injection of pregabalin. *Can J Anaesth.* 57, 664-671.
- Paulson, P.E., Wiley, J.W., Morrow, T.J., 2007. Concurrent activation of the somatosensory forebrain and deactivation of periaqueductal gray associated with diabetes-induced neuropathic pain. *Exp Neurol.* 208, 305-313.
- Paxinos, G., Watson, C., 2007. The rat brain in stereotaxic coordinates. Vol., Academic Press, China.
- Perez-Reyes, E., 2003. Molecular physiology of low-voltage-activated t-type calcium channels. *Physiol Rev.* 83, 117-161.
- Petrovic, P., Ingvar, M., Stone-Elander, S., Petersson, K.M., Hansson, P., 1999. A PET activation study of dynamic mechanical allodynia in patients with mononeuropathy. *Pain.* 83, 459-470.
- Peyron, R., Laurent, B., Garcia-Larrea, L., 2000. Functional imaging of brain responses to pain. A review and meta-analysis. *Neurophysiol Clin.* 30, 263-288.
- Peyron, R., Schneider, F., Faillenot, I., Convers, P., Barral, F.G., Garcia-Larrea, L., Laurent, B., 2004. An fMRI study of cortical representation of mechanical allodynia in patients with neuropathic pain. *Neurology.* 63, 1838-1846.
- Peyron, R., Faillenot, I., Pomares, F.B., Le Bars, D., Garcia-Larrea, L., Laurent, B., 2013. Mechanical allodynia in neuropathic pain. Where are the brain representations located? A positron emission tomography (PET) study. *Eur J Pain.* 17, 1327-1337.
- Phelps, M.E., 2000. PET: the merging of biology and imaging into molecular imaging. *J Nucl Med.* 41, 661-681.
- Price, D.D., 2000. Psychological and neural mechanisms of the affective dimension of pain. *Science.* 288, 1769-1772.
- Qu, C., King, T., Okun, A., Lai, J., Fields, H.L., Porreca, F., 2011. Lesion of the rostral anterior cingulate cortex eliminates the aversiveness of spontaneous neuropathic pain following partial or complete axotomy. *Pain.* 152, 1641-1648.
- Rainville, P., Duncan, G.H., Price, D.D., Carrier, B., Bushnell, M.C., 1997. Pain affect encoded in human anterior cingulate but not somatosensory cortex. *Science.* 277, 968-971.
- Reid, C.A., Bekkers, J.M., Clements, J.D., 2003. Presynaptic Ca²⁺ channels: a functional patchwork. *Trends Neurosci.* 26, 683-687.
- Romero, A., Rojas, S., Cabanero, D., Gispert, J.D., Herance, J.R., Campillo, A., Puig, M.M., 2011. A ¹⁸F-fluorodeoxyglucose microPET imaging study to assess changes in brain glucose metabolism in a rat model of surgery-induced latent pain sensitization. *Anesthesiology.* 115, 1072-1083.

- 
- Rosner, H., Rubin, L., Kestenbaum, A., 1996. Gabapentin adjunctive therapy in neuropathic pain states. *Clin J Pain*. 12, 56-58.
- Rush, A.M., Cummins, T.R., Waxman, S.G., 2007. Multiple sodium channels and their roles in electrogenesis within dorsal root ganglion neurons. *J Physiol*. 579, 1-14.
- Sandkuhler, J., 2009. Models and mechanisms of hyperalgesia and allodynia. *Physiol Rev*. 89, 707-758.
- Schmader, K., 2001. Herpes zoster in older adults. *Clin Infect Dis*. 32, 1481-1486.
- Scholz, J., Broom, D.C., Youn, D.H., Mills, C.D., Kohno, T., Suter, M.R., Moore, K.A., Decosterd, I., Coggeshall, R.E., Woolf, C.J., 2005. Blocking caspase activity prevents transsynaptic neuronal apoptosis and the loss of inhibition in lamina II of the dorsal horn after peripheral nerve injury. *J Neurosci*. 25, 7317-7323.
- Schweinhart, P., Fransson, P., Olson, L., Spenger, C., Andersson, J.L.R., 2003. A template for normalization of MR images of the rat brain. *J Neurosci Methods*. 129, 105-113.
- Schweinhart, P., Glynn, C., Brooks, J., McQuay, H., Jack, T., Chessell, I., Bountra, C., Tracey, I., 2006. An fMRI study of cerebral processing of brush-evoked allodynia in neuropathic pain patients. *Neuroimage*. 32, 256-265.
- Seibert, K., Zhang, Y., Leahy, K., Hauser, S., Masferrer, J., Perkins, W., Lee, L., Isakson, P., 1994. Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. *Proc Natl Acad Sci USA*. 91, 12013-12017.
- Seltzer, Z., Dubner, R., Shir, Y., 1990. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain*. 43, 205-218.
- Seminowicz, D.A., Jiang, L., Ji, Y., Xu, S., Gullapalli, R.P., Masri, R., 2012. Thalamocortical asynchrony in conditions of spinal cord injury pain in rats. *J Neurosci*. 32, 15843-15848.
- Shih, Y.Y.I., Chiang, Y.C., Chen, J.C., Huang, C.H., Chen, Y.Y., Liu, R.S., Chang, C., Jaw, F.S., 2008. Brain nociceptive imaging in rats using ¹⁸F-fluorodeoxyglucose small-animal positron emission tomography. *Neuroscience*. 155, 1221-1226.
- Shir, Y., Seltzer, Z., 1990. A-fibers mediate mechanical hyperesthesia and allodynia and C-fibers mediate thermal hyperalgesia in a new model of causalgiform pain disorders in rats. *Neurosci Lett*. 115, 62-67.
- Shyu, B.C., Vogt, B.A., 2009. Short-term synaptic plasticity in the nociceptive thalamic-anterior cingulate pathway. *Mol Pain*. 5, 51.
- Singh, L., Field, M.J., Ferris, P., Hunter, J.C., Oles, R.J., Williams, R.G., Woodruff, G.N., 1996. The antiepileptic agent gabapentin (Neurontin) possesses anxiolytic-like and antinociceptive actions that are reversed by D-serine. *Psychopharmacology*. 127, 1-9.

- 
- Soares, S., von Boxberg, Y., Lombard, M.C., Ravaille-Veron, M., Fischer, I., Eyer, J., Nothias, F., 2002. Phosphorylated MAP1B is induced in central sprouting of primary afferents in response to peripheral injury but not in response to rhizotomy. *Eur J Neurosci.* 16, 593-606.
- Sufka, K.J., 1994. Conditioned place preference paradigm: a novel approach for analgesic drug assessment against chronic pain. *Pain.* 58, 355-366.
- Sun, H., Ren, K., Zhong, C.M., Ossipov, M.H., Malan, T.P., Lai, J., Porreca, F., 2001. Nerve injury-induced tactile allodynia is mediated via ascending spinal dorsal column projections. *Pain.* 90, 105-111.
- Suter, M.R., Wen, Y.R., Decosterd, I., Ji, R.R., 2007. Do glial cells control pain? *Neuron Glia Biol.* 3, 255-268.
- Suzuki, R., Dickenson, A.H., 2006. Differential pharmacological modulation of the spontaneous stimulus-independent activity in the rat spinal cord following peripheral nerve injury. *Exp Neurol.* 198, 72-80.
- Takemura, Y., Yamashita, A., Horiuchi, H., Furuya, M., Yanase, M., Niikura, K., Imai, S., Hatakeyama, N., Kinoshita, H., Tsukiyama, Y., Senba, E., Matoba, M., Kuzumaki, N., Yamazaki, M., Suzuki, T., Narita, M., 2011. Effects of gabapentin on brain hyperactivity related to pain and sleep disturbance under a neuropathic pain-like state using fMRI and brain wave analysis. *Synapse.* 65, 668-676.
- Taylor, C.P., Gee, N.S., Su, T.Z., Kocsis, J.D., Welty, D.F., Brown, J.P., Dooley, D.J., Boden, P., Singh, L., 1998. A summary of mechanistic hypotheses of gabapentin pharmacology. *Epilepsy Res.* 29, 233-249.
- Taylor, C.P., 2009. Mechanisms of analgesia by gabapentin and pregabalin - calcium channel $\alpha_2\delta$ [$\text{Ca}_v\alpha_2\delta$] ligands. *Pain.* 142, 13-16.
- Thanos, P.K., Robison, L., Nestler, E.J., Kim, R., Michaelides, M., Lobo, M.K., Volkow, N.D., 2013. Mapping brain metabolic connectivity in awake rats with μ PET and optogenetic stimulation. *J Neurosci.* 33, 6343-6349.
- Thompson, S.J., Bushnell, M.C., 2012. Rodent functional and anatomical imaging of pain. *Neurosci Lett.* 520, 131-139.
- Thompson, S.J., Millecamps, M., Aliaga, A., Seminowicz, D.A., Low, L.A., Bedell, B.J., Stone, L.S., Schweinhardt, P., Bushnell, M.C., 2014. Metabolic brain activity suggestive of persistent pain in a rat model of neuropathic pain. *Neuroimage.* 91, 344-352.
- Thurlow, R.J., Hill, D.R., Woodruff, G.N., 1996. Comparison of the autoradiographic binding distribution of [^3H]-gabapentin with excitatory amino acid receptor and amino acid uptake site distributions in rat brain. *Br J Pharmacol.* 118, 457-465.
- Tracey, I., 2008. Imaging pain. *Br J Anaesth.* 101, 32-39.
- Treede, R.D., Kenshalo, D.R., Gracely, R.H., Jones, A.K.P., 1999. The cortical

- representation of pain. *Pain*. 79, 105-111.
- Treede, R.D., Jensen, T.S., Campbell, J.N., Cruccu, G., Dostrovsky, J.O., Griffin, J.W., Hansson, P., Hughes, R., Nurmikko, T., Serra, J., 2008. Neuropathic pain: Redefinition and a grading system for clinical and research purposes. *Neurology*. 70, 1630-1635.
- Tseng, T.J., Hsieh, Y.L., Hsieh, S.T., 2007. Reversal of ERK activation in the dorsal horn after decompression in chronic constriction injury. *Exp Neurol*. 206, 17-23.
- Tsuda, M., Shigemoto-Mogami, Y., Koizumi, S., Mizokoshi, A., Kohsaka, S., Salter, M.W., Inoue, K., 2003. P2X₄ receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. *Nature*. 424, 778-783.
- Tsuda, M., Mizokoshi, A., Shigemoto-Mogami, Y., Koizumi, S., Inoue, K., 2004. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase in spinal hyperactive microglia contributes to pain hypersensitivity following peripheral nerve injury. *Glia*. 45, 89-95.
- Upadhyay, J., Baker, S., Chandran, P., Miller, L., Lee, Y., Marek, G.J., Sakoglu, U., Chin, C.L., Luo, F., Fox, G.B., Day, M., 2011. Default-mode-like network activation in awake rodents. *PLoS ONE*. 6, e27839.
- Vane, J.R., 1971. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol*. 231, 232-235.
- Vogt, B.A., Paxinos, G., 2014. Cytoarchitecture of mouse and rat cingulate cortex with human homologies. *Brain Struct Funct*. 219, 185-192.
- Wang, Z., Bradesi, S., Maarek, J.M., Lee, K., Winchester, W.J., Mayer, E.A., Holschneider, D.P., 2008. Regional brain activation in conscious, unrestrained rats in response to noxious visceral stimulation. *Pain*. 138, 233-243.
- Wang, Z., Guo, Y., Bradesi, S., Labus, J.S., Maarek, J.M., Lee, K., Winchester, W.J., Mayer, E.A., Holschneider, D.P., 2009. Sex differences in functional brain activation during noxious visceral stimulation in rats. *Pain*. 145, 120-128.
- Watson, R.E., Wiegand, S.J., Clough, R.W., Hoffman, G.E., 1986. Use of cryoprotectant to maintain long-term peptide immunoreactivity and tissue morphology. *Peptides*. 7, 155-159.
- Wei, F., Zhuo, M., 2008. Activation of Erk in the anterior cingulate cortex during the induction and expression of chronic pain. *Mol Pain*. 4, 28.
- Weissner, W., Winterson, B.J., Stuart-Tilley, A., Devor, M., Bove, G.M., 2006. Time course of substance P expression in dorsal root ganglia following complete spinal nerve transection. *J Comp Neurol*. 497, 78-87.
- West, M.J., Slomianka, L., Gundersen, H.J.G., 1991. Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. *Anat Rec*. 231, 482-497.

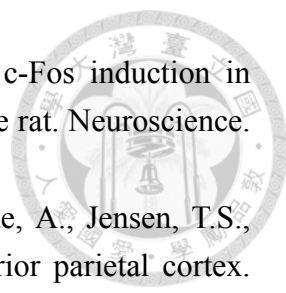
- 
- Williams, S., Evan, G.I., Hunt, S.P., 1990. Changing patterns of c-Fos induction in spinal neurons following thermal cutaneous stimulation in the rat. *Neuroscience*. 36, 73-81.
- Witting, N., Kupers, R.C., Svensson, P., Arendt-Nielsen, L., Gjedde, A., Jensen, T.S., 2001. Experimental brush-evoked allodynia activates posterior parietal cortex. *Neurology*. 57, 1817-1824.
- Witting, N., Kupers, R.C., Svensson, P., Jensen, T.S., 2006. A PET activation study of brush-evoked allodynia in patients with nerve injury pain. *Pain*. 210, 145-154.
- Woolf, C.J., 1983. Evidence for a central component of post-injury pain hypersensitivity. *Nature*. 306, 686-688.
- Woolf, C.J., Shortland, P., Coggeshall, R.E., 1992. Peripheral nerve injury triggers central sprouting of myelinated afferents. *Nature*. 355, 75-78.
- Woolf, C.J., Shortland, P., Reynolds, M., Ridings, J., Doubell, T., Coggeshall, R.E., 1995. Reorganization of central terminals of myelinated primary afferents in the rat dorsal horn following peripheral axotomy. *J Comp Neurol*. 360, 121-134.
- Woolf, C.J., 2011. Central sensitization: implications for the diagnosis and treatment of pain. *Pain*. 152, S2-S15.
- Wu, G., Ringkamp, M., Hartke, T.V., Murinson, B.B., Campbell, J.N., Griffin, J.W., Meyer, R.A., 2001. Early onset of spontaneous activity in uninjured C-fiber nociceptors after injury to neighboring nerve fibers. *J Neurosci*. 21, RC140.
- Yaksh, T.L., 2006. Calcium channels as therapeutic targets in neuropathic pain. *J Pain*. 7, S13-S30.
- Zhang, M.M., Liu, S.B., Chen, T., Koga, K., Zhang, T., Li, Y.Q., Zhuo, M., 2014. Effects of NB001 and gabapentin on irritable bowel syndrome-induced behavioral anxiety and spontaneous pain. *Mol Brain*. 7, 47.
- Zhang, R., Tomida, M., Katayama, Y., Kawakami, Y., 2004. Response durations encode nociceptive stimulus intensity in the rat medial prefrontal cortex. *Neuroscience*. 125, 777-785.
- Zhuang, Z.Y., Gerner, P., Woolf, C.J., Ji, R.R., 2005. ERK is sequentially activated in neurons, microglia, and astrocytes by spinal nerve ligation and contributes to mechanical allodynia in this neuropathic pain model. *Pain*. 114, 149-159.
- Zhuo, M., 2008. Cortical excitation and chronic pain. *Trends Neurosci*. 31, 199-207.
- Zhuo, M., 2014. Long-term potentiation in the anterior cingulate cortex and chronic pain. *Phil Trans R Soc B*. 369, 20130146.

表 3-1、功能性連結分析的核區順序

Order		Structure	Abbreviation
Sensorimotor area			
1		cerebellar vermis	Cb vermis
2	left	primary motor cortex	M1
3	right		
4	left	secondary motor cortex	M2
5	right		
6	left	primary somatosensory cortex, forelimb region	S1FL
7	right		
8	left	primary somatosensory cortex, hindlimb region	S1HL
9	right		
10	left	secondary somatosensory cortex	S2
11	right		
Basal ganglia			
12	left	caudate putamen (striatum)	CPu
13	right		
14	left	nucleus accumbens	NAc
15	right		
16	left	ventral pallidum	VP
17	right		
AMY/Hipp			
18	left	basolateral amygdaloid nucleus	BLA
19	right		
20	left	central amygdaloid nucleus	CeA
21	right		
22	left	hippocampus	Hipp
23	right		
Limbic cortex			
24	left	medial prefrontal cortex	mPFC
25	right		
26	left	lateral orbital cortex	LO
27	right		
28	left	ventral orbital cortex	VO
29	right		
30	left	anterior cingulate cortex	ACC
31	right		

表 3-1 (續)

Order		Structure	Abbreviation
(Limbic cortex)			
32	left	mid cingulate cortex	MCC
33	right		
34	left	retrosplenial cortex	RSC
35	right		
36	left	insular cortex, posterior part	PIC
37	right		
38	left	insular cortex, anterior part	AIC
39	right		
Thalamus			
40	left	ventral posterior thalamic nucleus	VP
41	right		
42	left	posterior thalamic nuclei	Po
43	right		
44	left	mediodorsal thalamic nucleus	MD
45	right		
46	left	submedius thalamic nucleus	Sub
47	right		
PAG			
48		dorsal periaqueductal gray	DPAG
49	left	ventrolateral periaqueductal gray	VLPAG
50	right		
51	left	dorsal lateral periaqueductal gray	DLPAG
52	right		

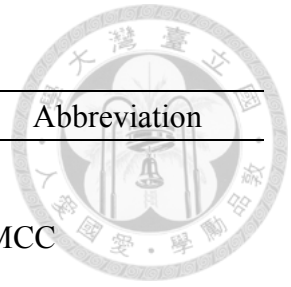


表 3-2、SNI 組大鼠腦中感興趣區域的活化指數(AI, %)

ROIs	SNI group (n = 12)		
	Naïve	SNI	GBP
mPFC i	36.5 ± 2.1	35.2 ± 2.0	* 29.6 ± 1.1
mPFC c	37.9 ± 1.8	35.0 ± 2.0	* 29.7 ± 1.2
ACC i	36.9 ± 1.7	37.4 ± 2.6	* 31.4 ± 1.3
ACC c	34.7 ± 1.4	35.6 ± 2.6	32.3 ± 1.4
RSC i	20.0 ± 1.7	# 14.8 ± 2.4	14.5 ± 2.1
RSC c	20.2 ± 1.6	# 14.8 ± 2.3	13.7 ± 2.2
IC i	1.4 ± 1.5	# 4.8 ± 1.4	3.6 ± 1.8
IC c	1.3 ± 1.4	# 5.1 ± 1.5	3.6 ± 1.6
S1HL i	14.7 ± 1.3	15.7 ± 1.3	15.1 ± 2.0
S1HL c	15.3 ± 1.6	15.7 ± 1.6	15.2 ± 1.1
S1BF i	18.7 ± 0.9	18.0 ± 1.6	** 25.0 ± 1.0
S1BF c	18.6 ± 1.0	18.7 ± 1.5	** 25.7 ± 1.0
S1ULp i	19.4 ± 1.6	19.7 ± 1.5	*** 27.2 ± 1.2
S1ULp c	17.9 ± 1.5	19.3 ± 1.6	** 27.1 ± 1.4
S2	9.8 ± 1.9	10.4 ± 1.7	* 16.4 ± 1.9
S2	10.4 ± 2.2	10.8 ± 1.8	** 20.1 ± 1.4
M1 i	14.1 ± 2.3	15.2 ± 1.5	15.5 ± 0.8
M1 c	13.9 ± 2.9	13.3 ± 1.8	16.1 ± 1.1
CPu i	31.8 ± 1.6	28.6 ± 1.9	28.6 ± 1.3
CPu c	33.7 ± 1.2	28.8 ± 1.9	29.7 ± 1.4
Po i	21.4 ± 1.1	# 26.2 ± 1.6	** 21.0 ± 1.3
Po c	24.5 ± 1.0	27.8 ± 1.7	** 22.3 ± 1.4
VP i	8.4 ± 1.1	## 13.2 ± 1.2	9.5 ± 1.1
VP c	9.3 ± 1.0	12.3 ± 0.9	* 9.2 ± 1.1
AMY i	-9.3 ± 1.2	-11.3 ± 1.3	* -7.9 ± 1.2
AMY c	-5.3 ± 1.2	# -7.0 ± 1.1	-5.8 ± 1.4
Cb vermis	4.7 ± 1.7	## 12.0 ± 1.2	** 6.9 ± 1.2

手術後(SNI)與手術前(Naïve)的比較使用 one-way repeated measures ANOVA。符號「#」代表 SNI 組與 Naïve 組的比較結果。# p < 0.05, ## p < 0.01。給予 gabapentin 後(GBP)與手術後的比較使用 one-way repeated measures ANOVA。符號「*」代表 SNI 組與 GBP 組的比較結果。* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001。i: ipsilateral; c: contralateral。數據以 mean ± SEM 呈現。

表 3-3、Sham 組大鼠腦中感興趣區域的活化指數(AI, %)

ROIs	Sham group (n = 10)		
	Naïve	SNI	GBP
mPFC i	34.6 ± 2.2	35.9 ± 1.3	31.5 ± 1.6
mPFC c	33.1 ± 2.2	33.5 ± 1.5	28.6 ± 2.0
ACC i	37.3 ± 1.8	37.9 ± 1.5	34.1 ± 2.8
ACC c	34.5 ± 1.8	35.8 ± 1.9	32.2 ± 2.8
RSC i	18.9 ± 1.7	15.1 ± 2.3	15.4 ± 2.4
RSC c	18.8 ± 1.9	15.0 ± 2.8	15.0 ± 2.8
IC i	1.3 ± 2.1	0.3 ± 2.1	1.6 ± 3.1
IC c	1.4 ± 2.0	0.5 ± 2.1	1.5 ± 3.0
S1HL i	15.3 ± 1.6	12.3 ± 1.5	13.0 ± 3.1
S1HL c	13.5 ± 2.3	12.5 ± 1.6	13.0 ± 3.0
S1BF i	18.5 ± 1.3	18.5 ± 1.1	21.5 ± 2.4
S1BF c	18.5 ± 1.3	17.6 ± 0.8	22.6 ± 2.4
S1ULp i	21.8 ± 1.3	22.6 ± 1.8	25.9 ± 2.0
S1ULp c	22.3 ± 2.0	21.1 ± 0.9	24.0 ± 2.2
S2	11.9 ± 1.4	10.4 ± 1.8	15.2 ± 2.0
S2	14.3 ± 1.7	10.8 ± 1.3	13.6 ± 2.1
M1 i	16.2 ± 1.8	15.3 ± 2.0	16.7 ± 3.1
M1 c	14.6 ± 1.7	15.3 ± 2.1	15.2 ± 2.8
CPu i	28.6 ± 1.5	28.9 ± 1.4	28.7 ± 2.2
CPu c	30.4 ± 1.4	28.9 ± 1.5	29.5 ± 2.2
Po i	22.2 ± 1.2	23.9 ± 1.2	21.8 ± 2.3
Po c	23.7 ± 1.2	25.0 ± 1.4	23.3 ± 2.1
VP i	11.1 ± 1.3	10.0 ± 1.2	8.2 ± 1.8
VP c	10.1 ± 1.3	11.0 ± 1.2	8.5 ± 1.7
AMY i	-10.9 ± 0.9	-13.0 ± 1.4	-10.4 ± 0.9
AMY c	-8.1 ± 0.6	-10.0 ± 1.3	-9.3 ± 1.0
Cb vermis	5.2 ± 1.7	5.6 ± 1.7	7.2 ± 2.0

手術後(Sham)與手術前(Naïve)的比較使用 one-way repeated measures ANOVA。給予 gabapentin 後(GBP)與手術後的比較使用 one-way repeated measures ANOVA。

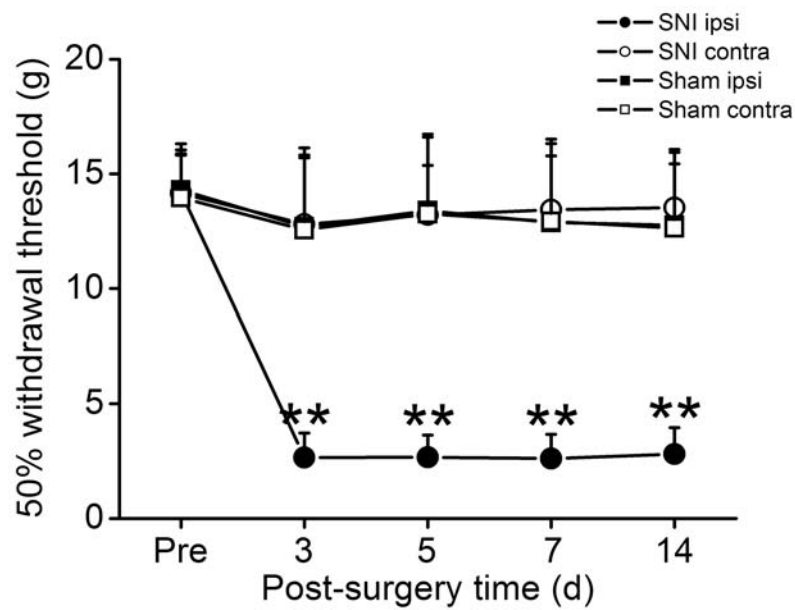


圖 2-1、神經損傷大鼠的觸覺閾值變化。以 von Frey hairs 刺激大鼠後腳掌外側，記錄手術前後大鼠因疼痛縮腳的克數變化。手術後 3 天 SNI 組大鼠即顯著的降低縮腳閾值，並維持至 14 天，顯示其有穩定的觸感痛反應。Sham 組大鼠的觸覺閾值沒有明顯變化。**：p < 0.01 對比於手術前(Pre)；ipsi：手術側，contra：手術對側；SNI 組(n = 6)，Sham 組(n = 6)。

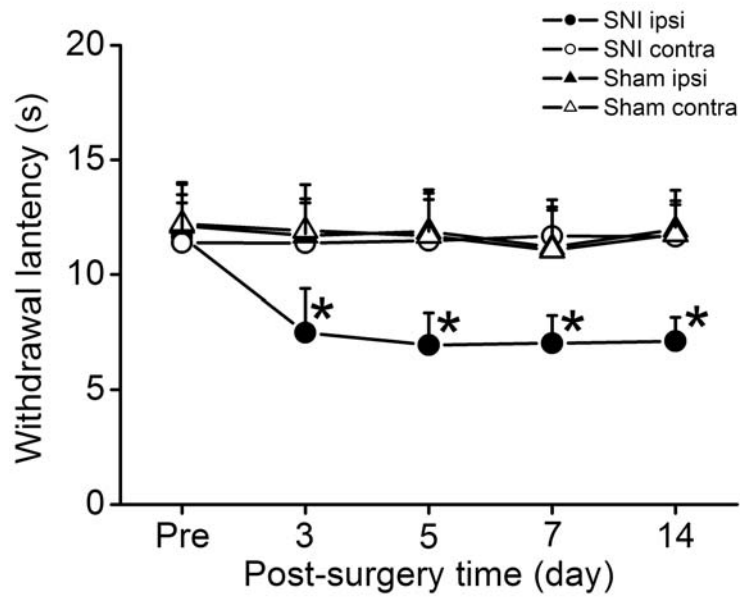
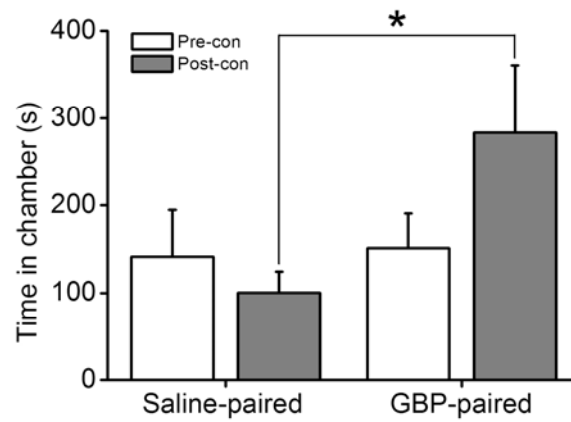


圖 2-2、神經損傷大鼠在熱痛刺激下的反應時間。以輻射熱刺激大鼠後腳掌外側，記錄手術前後大鼠因熱痛縮腳的反應時間變化。手術後 3 天 SNI 組大鼠即顯著的降低反應時間，並維持至 14 天，顯示其有穩定的熱痛覺過敏反應。Sham 組大鼠的熱痛反應時間沒有明顯變化。*: $p < 0.05$ 對比於手術前(Pre); ipsi: 手術側, contra: 手術對側; SNI 組($n = 6$), Sham 組($n = 6$)。



(A) SNI



(B) Sham

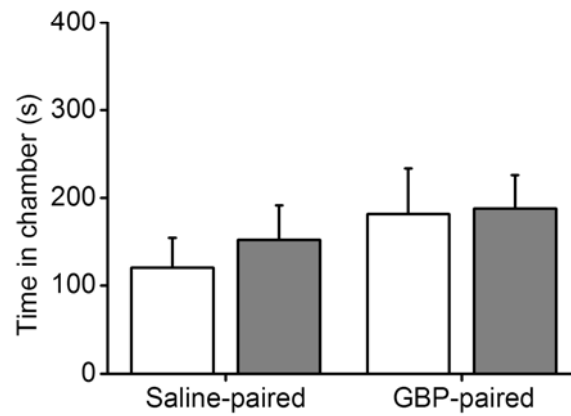


圖 2-3、GBP 抑制 SNI 手術引起的自發性疼痛。(A) SNI 組及(B) Sham 組大鼠在位置偏好制約實驗的表現，可見 SNI 組大鼠偏好有 GBP 配對的房間，顯示 SNI 大鼠會產生自發性疼痛。Sham 組並沒有位置偏好性。*： $p < 0.05$ ；pre-con：藥物配對前反應，post-con：藥物配對後反應；SNI 組($n = 6$)，Sham 組($n = 3$)。

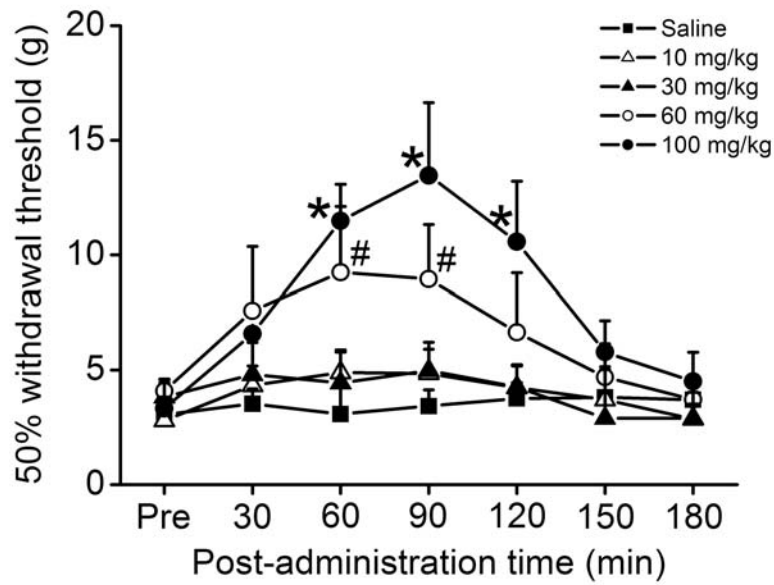


圖 2-4、GBP 的藥效測試結果。不同劑量的 GBP 在給藥前及給藥後每 30 分鐘記錄 SNI 組大鼠的觸覺閾值，直到給藥後 3 個小時。可見 GBP 止痛有劑量依賴效應，30 mg/kg 以下的劑量無止痛效果，60 mg/kg 劑量在注射後 60 ~ 90 分鐘有明顯止痛作用，而 100 mg/kg 劑量在注射後 60 ~ 120 分鐘有明顯止痛作用。*、#：p < 0.05 對比於給藥前(Pre)；每個劑量 n = 4。

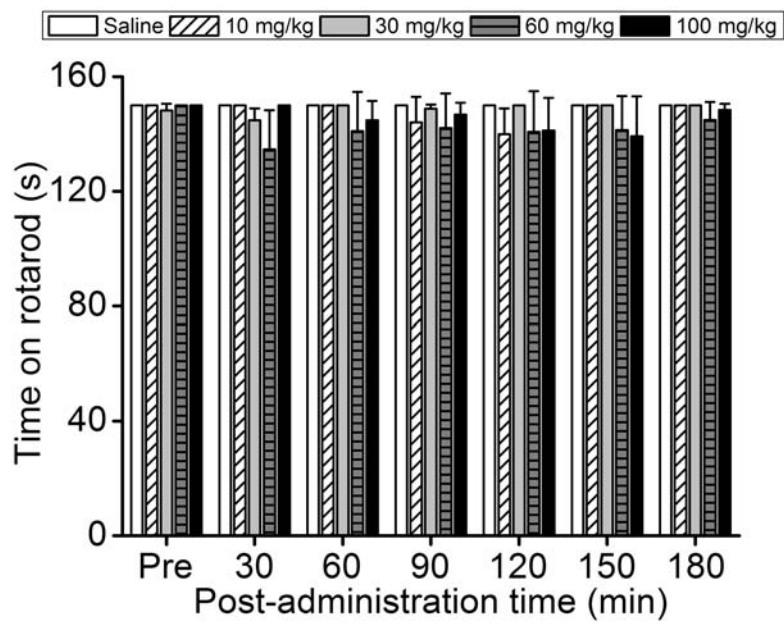


圖 2-5、GBP 作用下的運動平衡感測試。SNI 組大鼠在注射不同劑量 GBP 後在滾筒式跑步機上的停留時間。在給藥前及給藥後每 30 分鐘記錄大鼠停留時間，直到給藥後 3 個小時。不同劑量的 GBP 並不會影響 SNI 組大鼠的運動平衡感。每個劑量 $n = 4$ 。

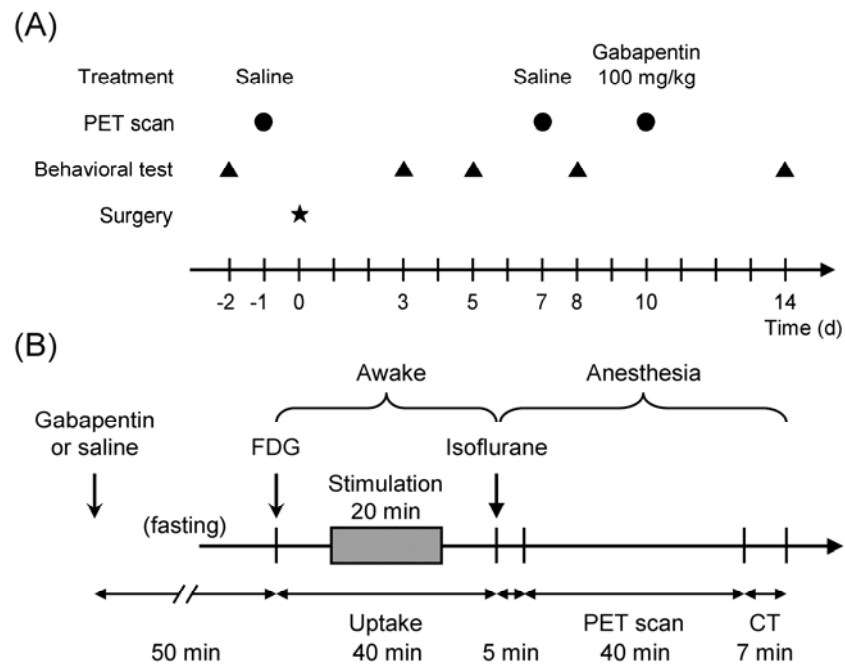


圖 3-1、PET 實驗設計圖。(A) 實驗的整體時程圖，每隻大鼠在手術前 1 天，手術後第 7 天及第 10 天接受 PET 掃描；(B) PET 掃描流程，在 FDG 注射後大鼠有 40 分鐘吸收時間，其中有 20 分鐘接受機械性刺激；PET 掃描共 40 分鐘，接著 CT 掃描 7 分鐘。



(A)



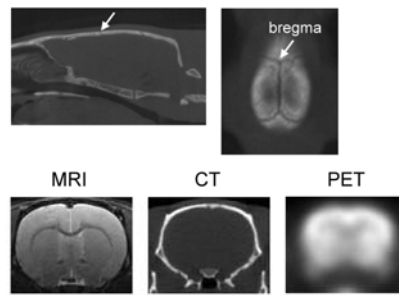
(B)



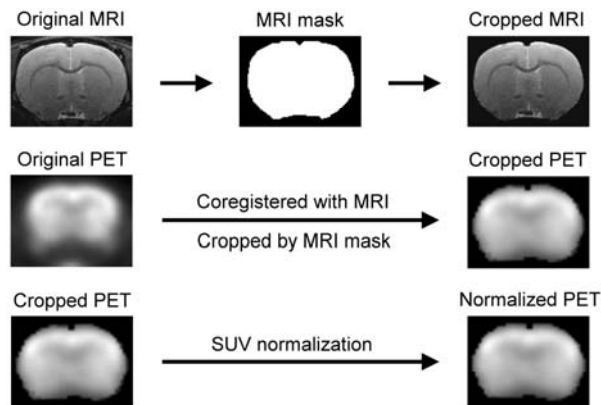
圖 3-2、PET 掃描儀器。(A) 外觀；(B) 大鼠在掃描時放在頭部固定架上。



(A) Images alignment



(B) Images preprocessing



(C) SPM analysis

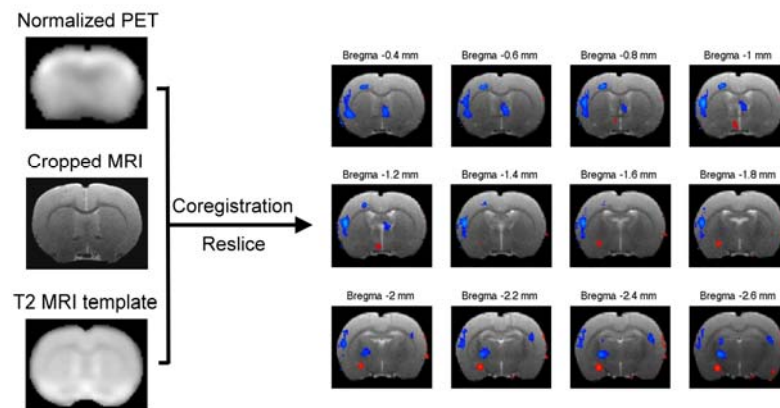


圖 3-3、影像分析流程。(A) 大鼠先以 bregma 調整影像位置，並將 MRI、PET 及 CT 影像重新排列位置；(B) 去除 MRI 及 PET 腦外的影像，將 PET 影像標準化；(C) 將標準化後的 PET 影像、MRI 及與圖譜座標一致的 T2 模板共同對位後重新切片，並將 SPM 統計分析後有差異的部分以假色呈現在 MRI 影像上。

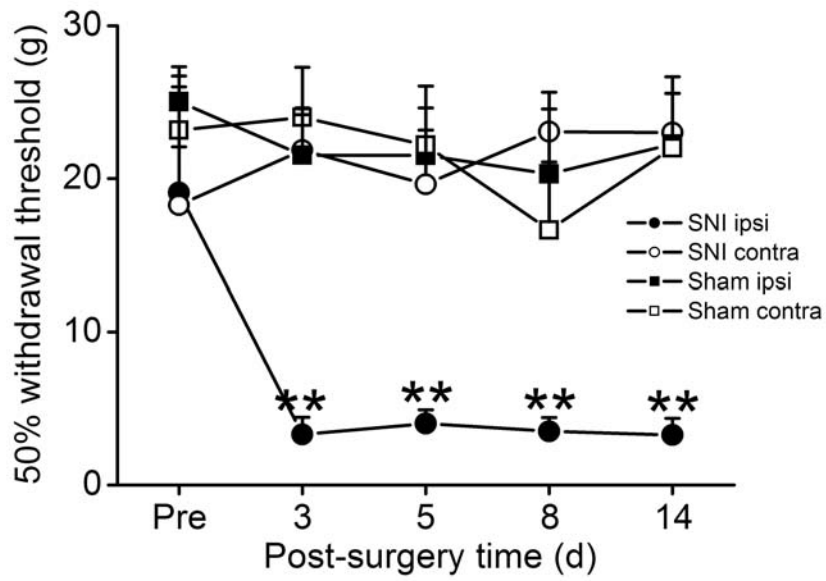


圖 3-4、神經損傷大鼠的觸覺閾值變化。以 von Frey hairs 刺激大鼠後腳掌外側，記錄手術前後大鼠因疼痛縮腳的克數變化。手術後 3 天 SNI 組大鼠即顯著的降低縮腳閾值，並維持至 14 天，顯示其有穩定的觸感痛反應。Sham 組大鼠的觸覺閾值沒有明顯變化。**：p < 0.01 對比於手術前(Pre)；ipsi：手術側，contra：手術對側；SNI 組(n = 12)，Sham 組(n = 10)。

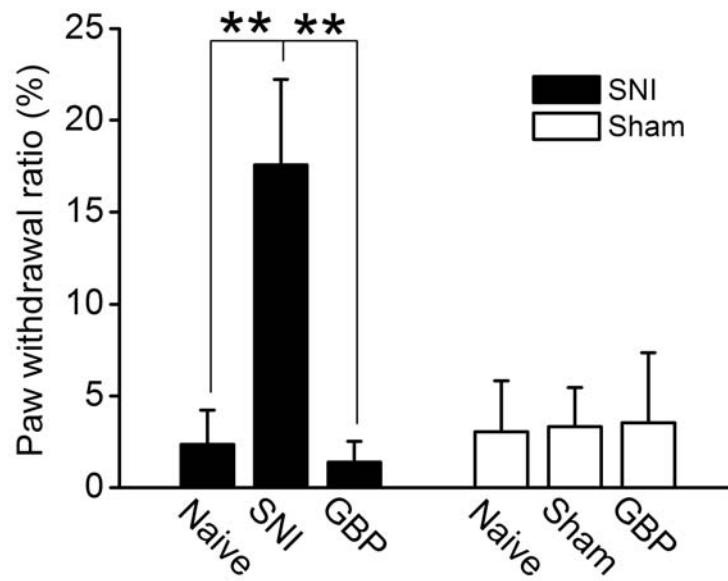


圖 3-5、輕觸覺刺激引起不同狀態下縮腳比率變化。在 SNI 組大鼠，手術前(Naive)對 6 克 von Frey hair 刺激縮腳比率不高，但手術後(SNI)的縮腳比率有顯著增加，而給予 GBP 止痛後縮腳比率又大幅下降。在 Sham 組大鼠，手術前後及給 GBP 前後縮腳比率變化不大。**：p < 0.01；SNI 組(n = 12)，Sham 組(n = 10)。

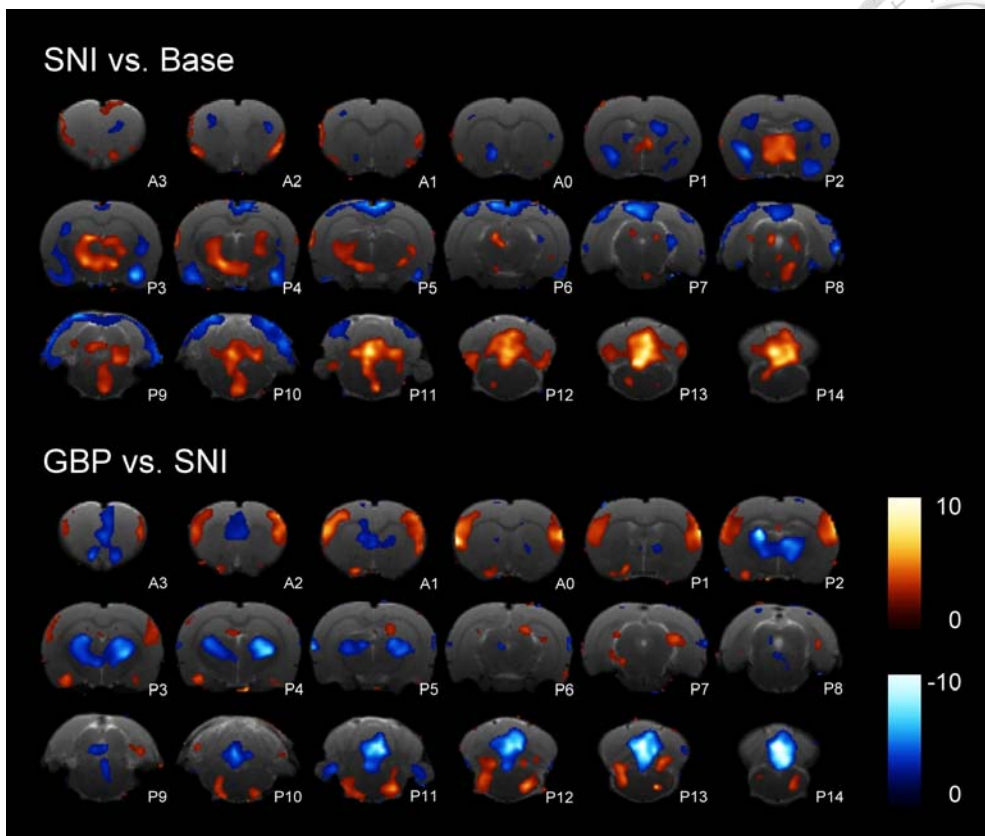


圖 3-6、SNI 組大鼠正子造影結果。此圖顯示葡萄糖代謝率的差異套疊在 MRI 解剖影像上，不同的冠狀切面顯示相對於 bregma (A0) 位置的前後距離(單位：mm)。A：前端；P 後端。SNI vs. Base：手術前後的比較；GBP vs. SNI：給予 GBP 止痛前後的比較。彩色色帶的值为 t value，紅色表示代謝率增加，藍色表示代謝率降低。SNI 組(n = 12)。

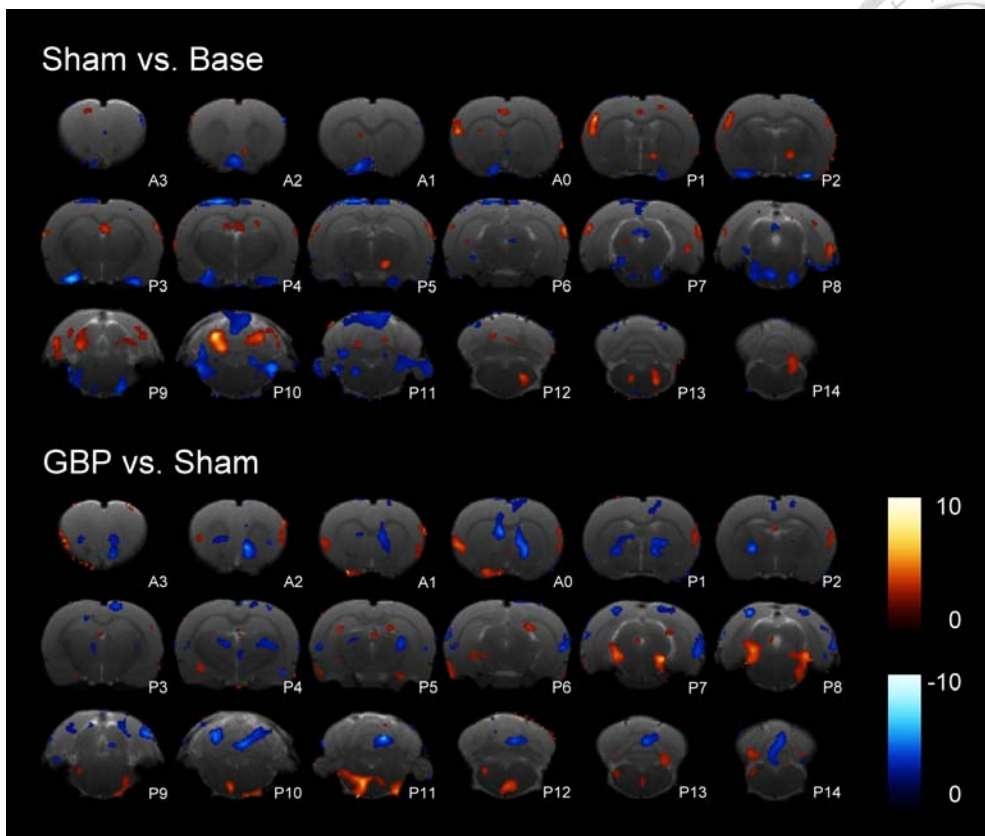


圖 3-7、Sham 組大鼠正子造影結果。此圖顯示葡萄糖代謝率的差異套疊在 MRI 解剖影像上，不同的冠狀切面顯示相對於 bregma (A0) 位置的前後距離(單位：mm)。A：前端；P 後端。Sham vs. Base：手術前後的比較；GBP vs. Sham：給予 GBP 止痛前後的比較。彩色色帶的值为 t value，紅色表示代謝率增加，藍色表示代謝率降低。Sham 組(n = 10)。

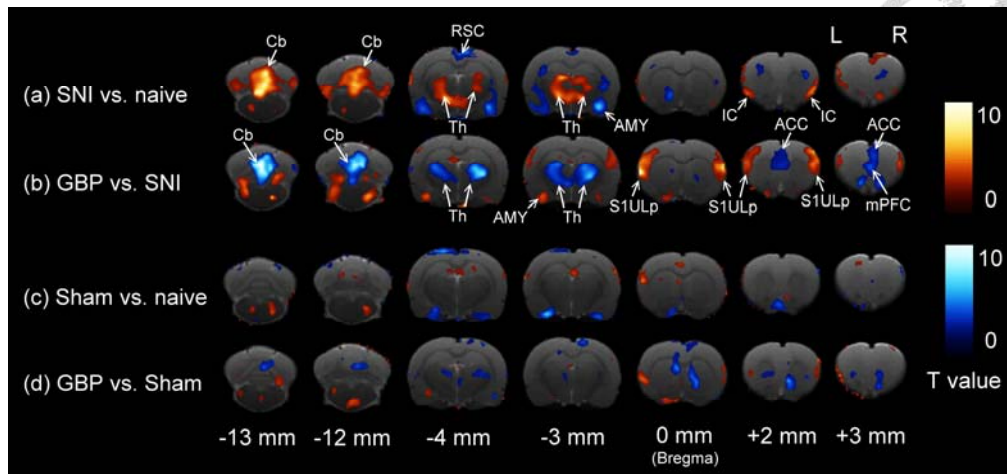


圖 3-8、SNI 組與 Sham 組在不同狀態下的正子造影比較。此圖將圖 3-6 及 3-7 有明顯代謝率變化的切面擷取出來，並對照大鼠腦圖譜後將明顯代謝率變化的核區標示在相對位置。核區的縮寫詳見材料與方法一節。SNI 組(n = 12)，Sham 組(n = 10)。

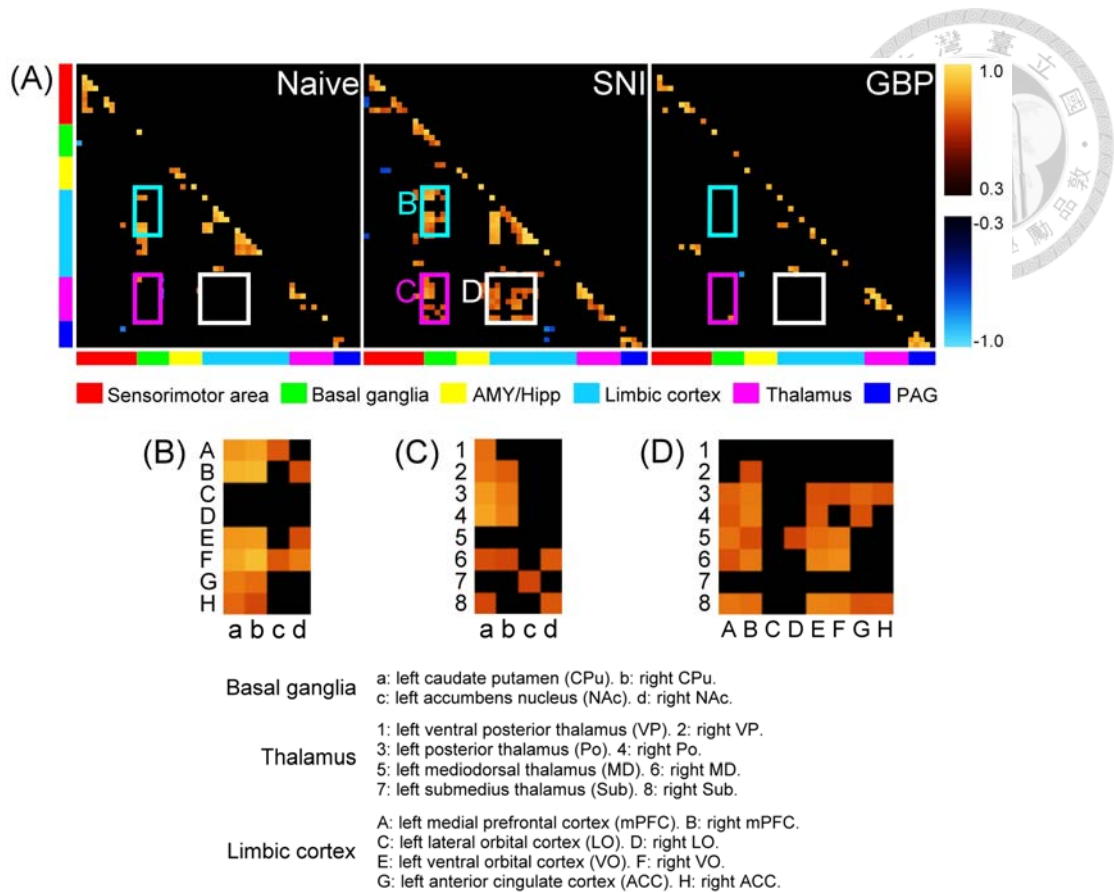


圖 3-9、功能性連結分析在 SNI 組大鼠的變化。(A) SNI 組大鼠在手術前(Naive)、手術後(SNI)，及注射 GBP 後的腦中各核區交互關係矩陣圖，紅色表示正相關，藍色表示負相關，相關係數未達顯著者($p > 0.05$)則為黑色。其中基底核區對邊緣皮質區(B)、基底核區對丘腦區(C)，及丘腦對邊緣皮質區(D)在手術後有強烈的正相關。SNI 組($n = 12$)。

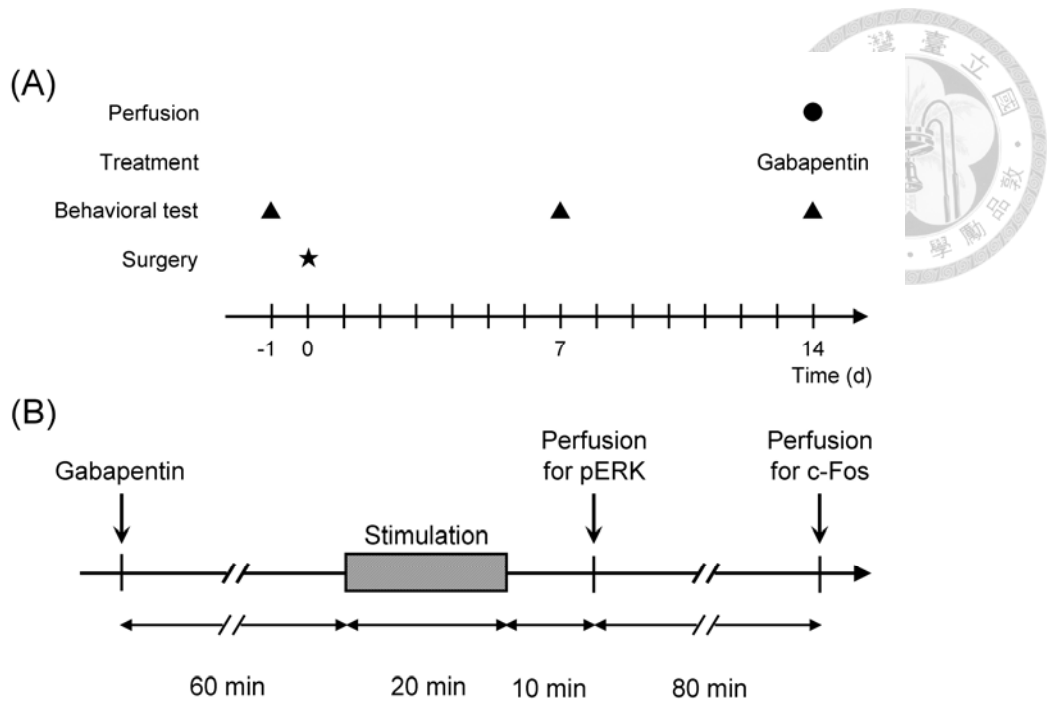


圖 4-1、免疫組織染色實驗設計圖。(A) 實驗的整體時程圖，每隻大鼠在手術前 1 天，手術後第 7 天及第 14 天測定觸感痛反應，並於手術後第 14 天犧牲進行染色實驗；(B) 大鼠在犧牲前給予 20 分鐘輕觸覺刺激，若進行 pERK 染色，於刺激後 10 分鐘灌流；若進行 c-Fos 染色，則於刺激後 90 分鐘灌流。

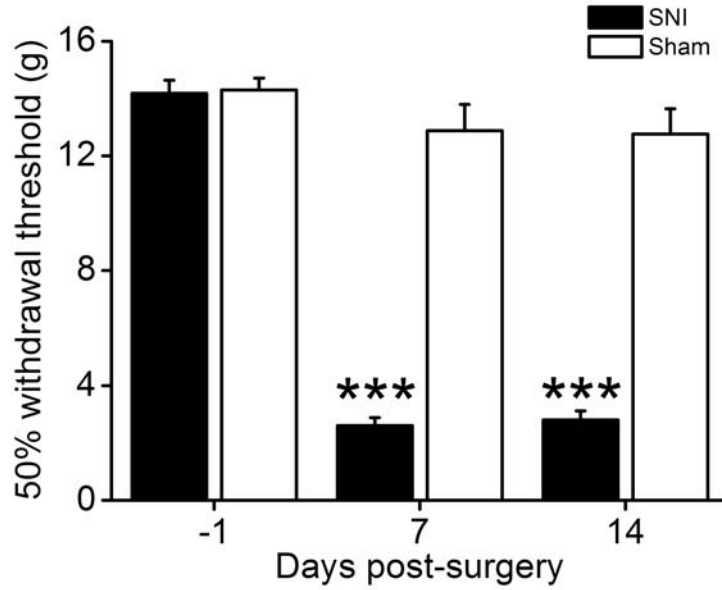


圖 4-2、神經損傷大鼠的觸覺閾值變化。以 von Frey hairs 刺激大鼠左後腳掌外側，記錄手術前後大鼠因疼痛縮腳的克數變化。手術後 7 天及 14 天 SNI 組大鼠有顯著的降低縮腳閾值，顯示其有穩定的觸感痛反應。Sham 組大鼠的觸覺閾值沒有明顯變化。符號「*」代表 SNI 組手術前後的比較結果。***： $p < 0.001$ 對比於手術前 1 天；SNI 組($n = 16$)，Sham 組($n = 16$)。

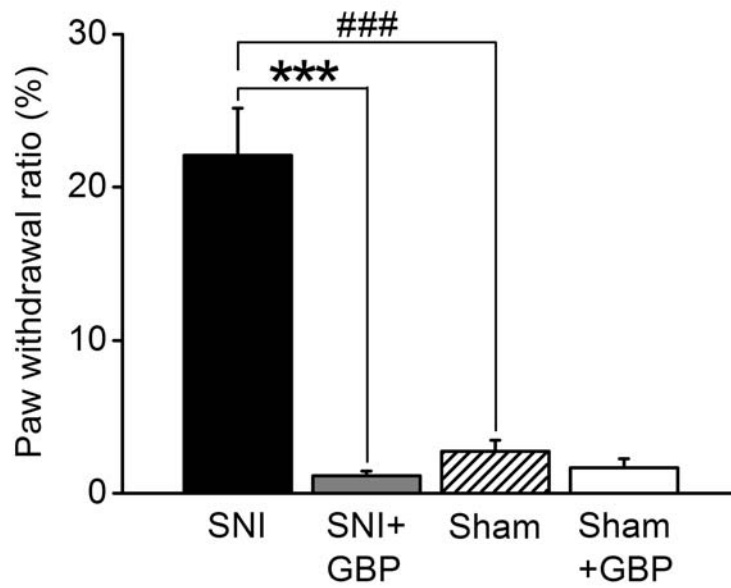


圖 4-3、輕觸覺刺激引起不同處理組別縮腳比率變化。符號「*」代表 SNI 組與 SNI+GBP 組的比較結果，符號「#」代表 SNI 組與 Sham 組的比較結果。***、###： $p < 0.001$ ；每一組別(n = 8)。

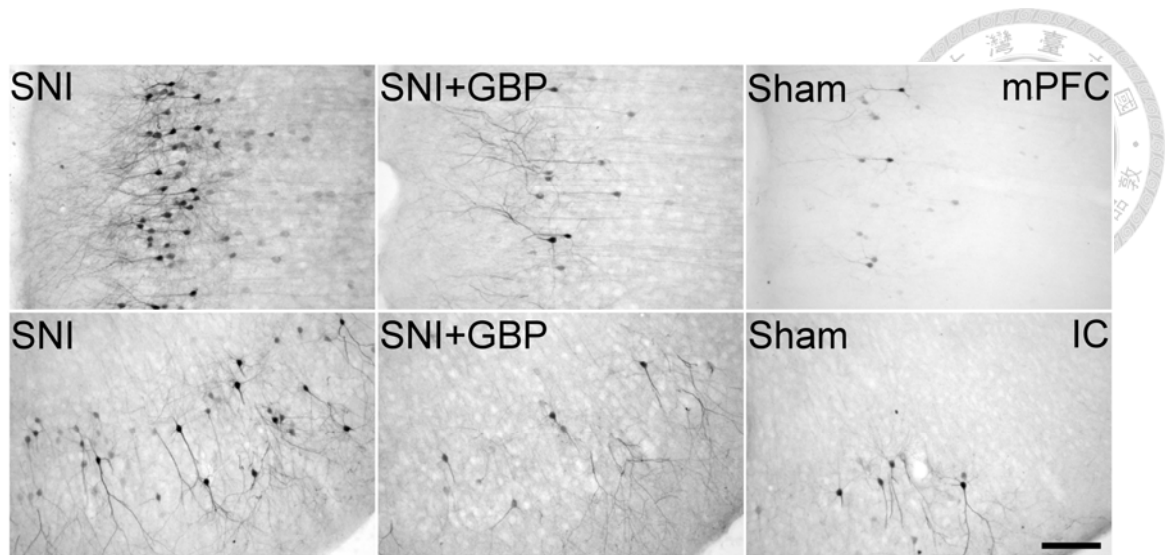


圖 4-4、不同處理組別腦中 pERK 的免疫組織染色結果。上排為內側前額葉皮質 (mPFC)，下排為島狀皮質(IC)。pERK 染色結果不只在細胞本體，在神經突起(主要是樹突)的染色也相當明顯。比例尺：100 μm 。

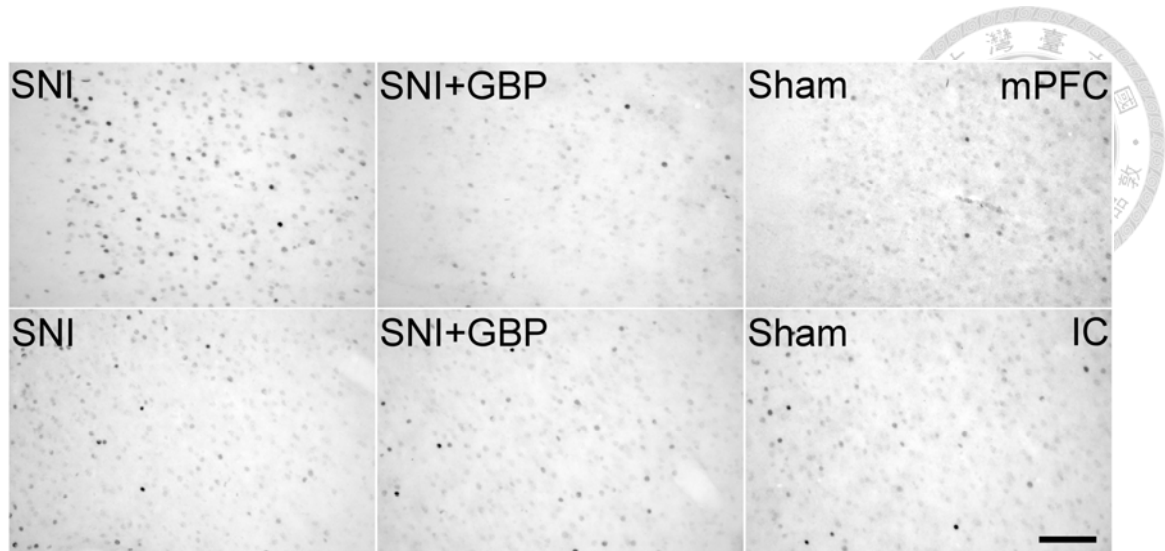


圖 4-5、不同處理組別腦中 c-Fos 的免疫組織染色結果。上排為內側前額葉皮質 (mPFC)，下排為島狀皮質(IC)。c-Fos 的染色結果只出現在細胞核內。比例尺：100 μm 。

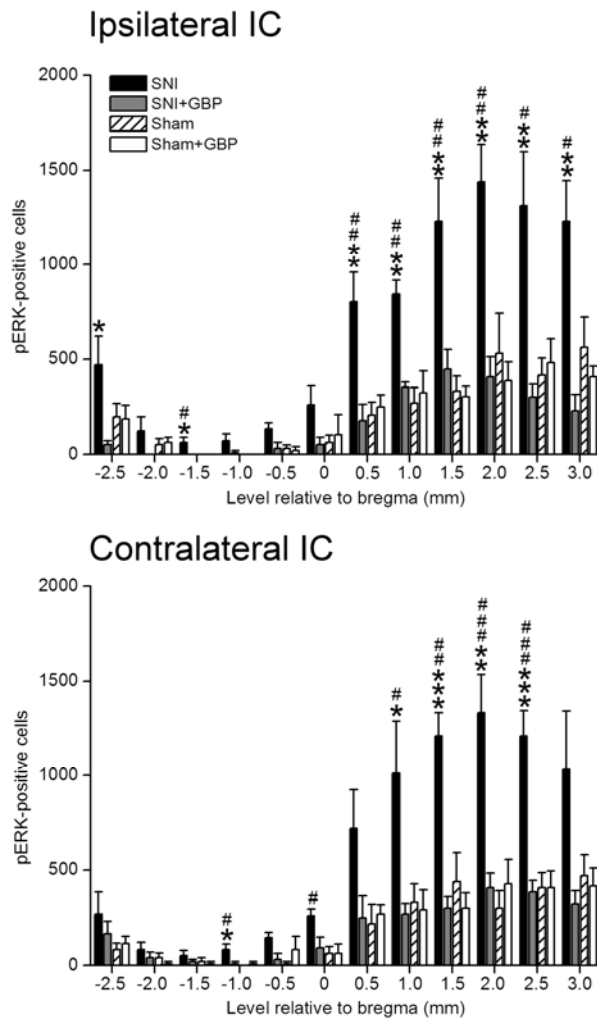


圖 4-6、pERK 細胞在兩側 IC 中不同前後位置的細胞分布情形。符號「*」代表 SNI 組與 SNI+GBP 組的比較結果，符號「#」代表 SNI 組與 Sham 組的比較結果。*、#：p < 0.05；**、##：p < 0.01；***、###：p < 0.01。

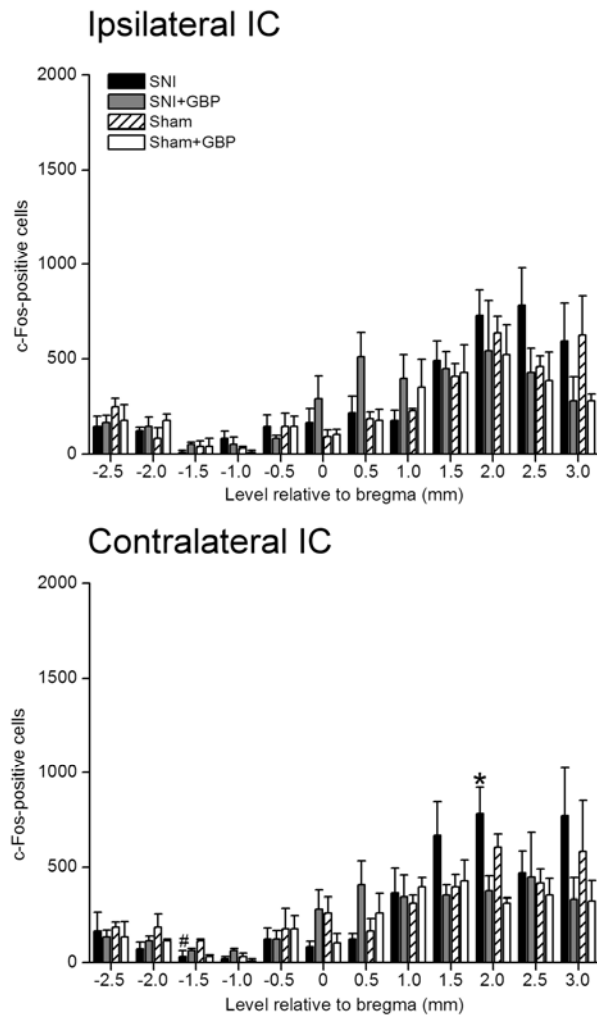


圖 4-7、c-Fos 細胞在兩側 IC 中不同前後位置的細胞分布情形。符號「*」代表 SNI 組與 SNI+GBP 組的比較結果。*：p < 0.05。

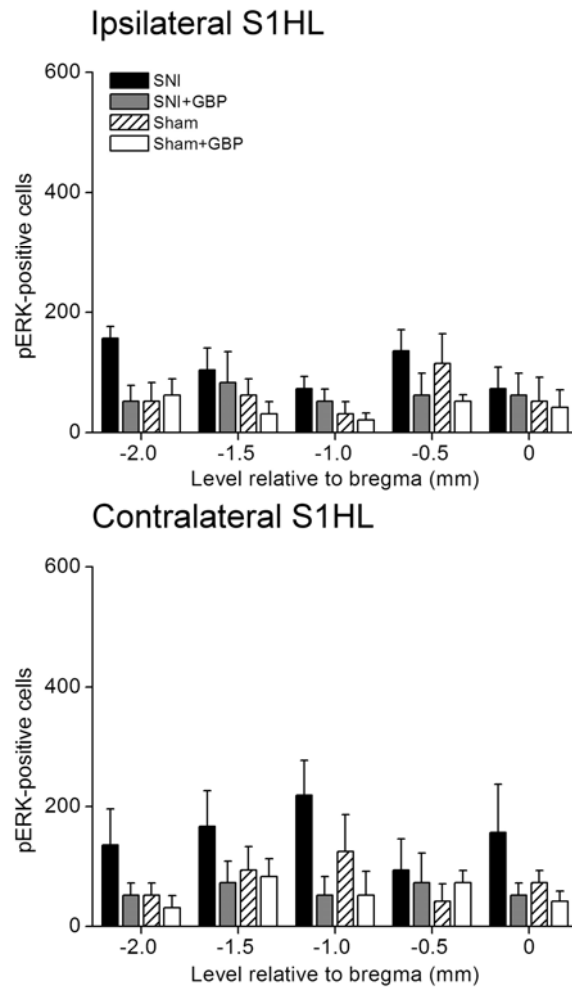


圖 4-8、pERK 細胞在兩側 S1HL 中不同前後位置的細胞分布情形。

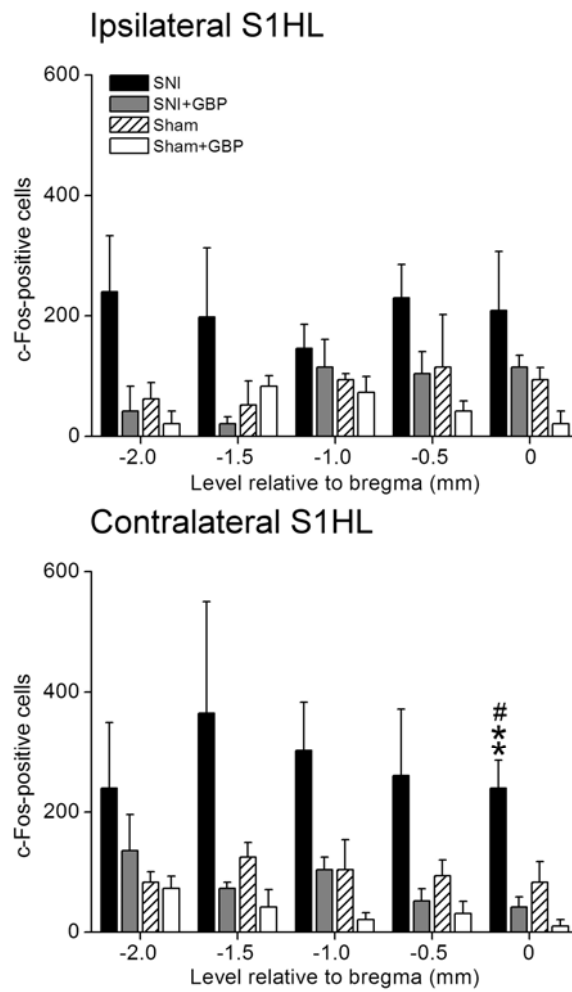


圖 4-9、c-Fos 細胞在兩側 S1HL 中不同前後位置的細胞分布情形。符號「*」代表 SNI 組與 SNI+GBP 組的比較結果，符號「#」代表 SNI 組與 Sham 組的比較結果。
: $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$ 。

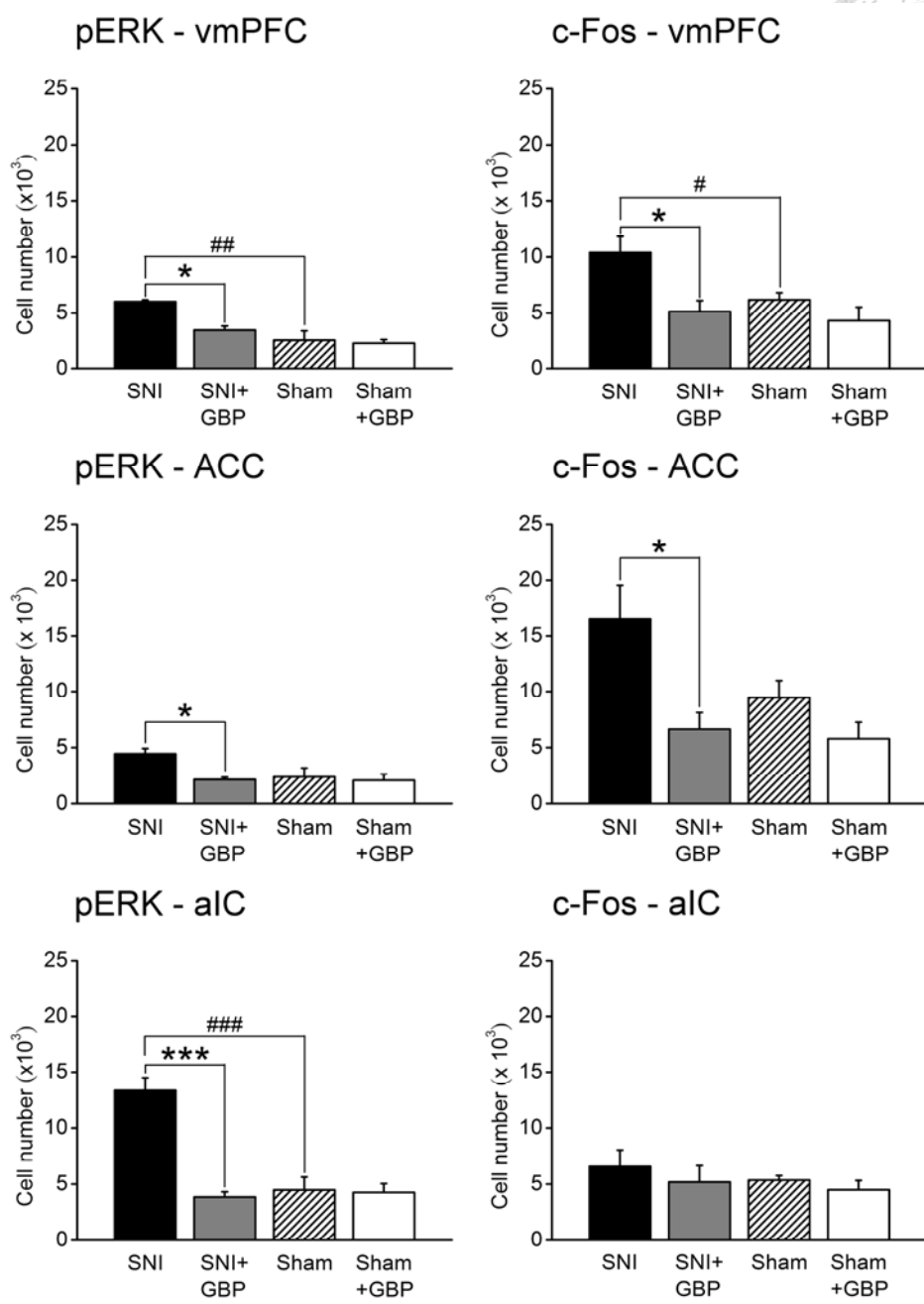


圖 4-10、vmPFC、ACC 及 aIC 的 pERK 及 c-Fos 細胞總數比較。我們以體視覺方法計算不同核區的細胞總數，左右兩側腦的細胞總數合併計算。符號「*」代表 SNI 組與 SNI+GBP 組的比較結果，符號「#」代表 SNI 組與 Sham 組的比較結果。*、#：p < 0.05；##：p < 0.01；***、###：p < 0.001。

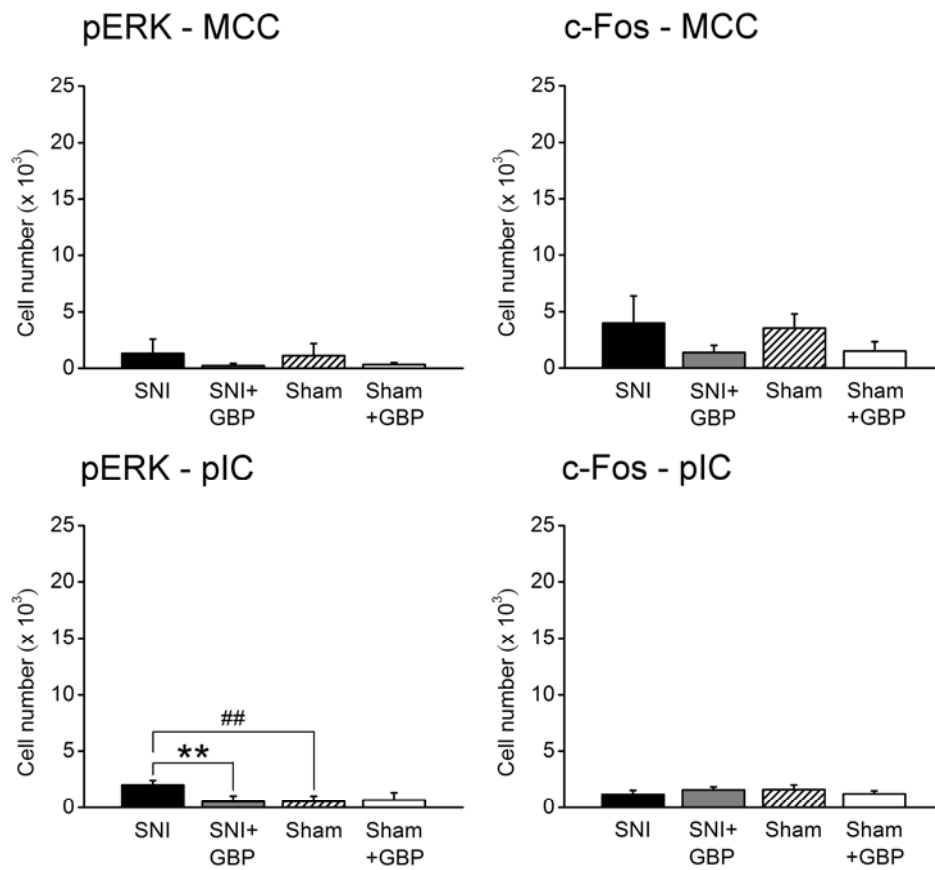


圖 4-11、MCC 及 pIC 的 pERK 及 c-Fos 細胞總數比較。我們以體視覺方法計算不同核區的細胞總數，左右兩側腦的細胞總數合併計算。符號「*」代表 SNI 組與 SNI+GBP 組的比較結果，符號「#」代表 SNI 組與 Sham 組的比較結果。**、##：p < 0.01。

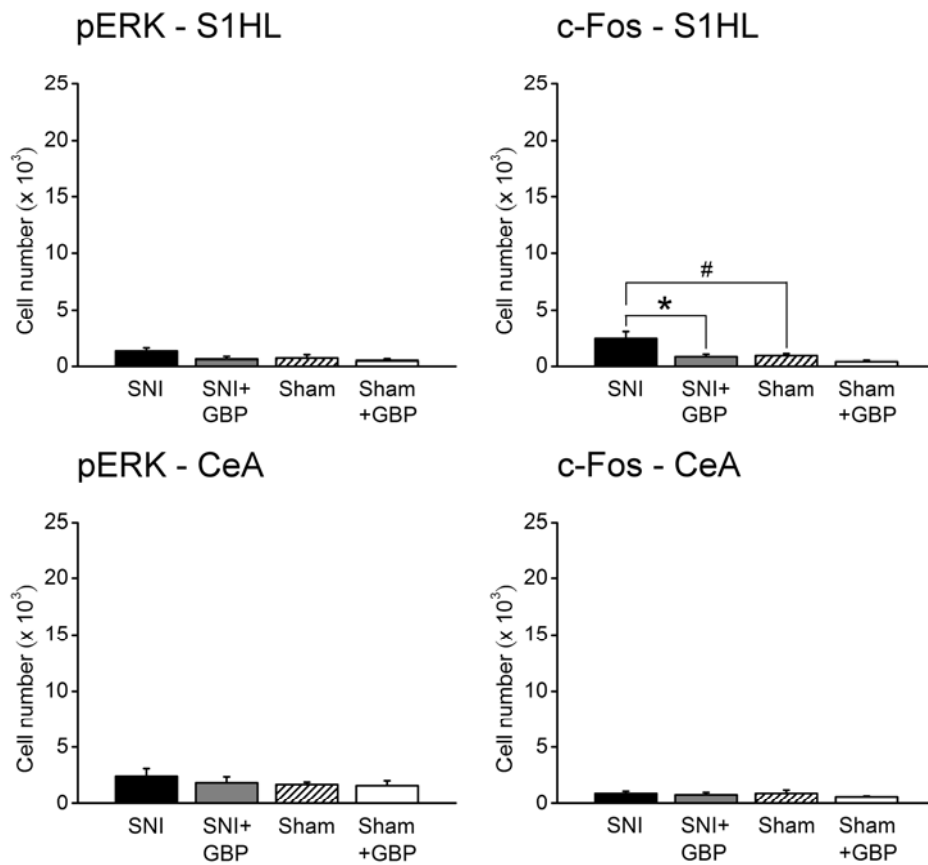


圖 4-12、S1HL 及 CeA 的 pERK 及 c-Fos 細胞總數比較。我們以體視覺方法計算不同核區的細胞總數，左右兩側腦的細胞總數合併計算。符號「*」代表 SNI 組與 SNI+GBP 組的比較結果，符號「#」代表 SNI 組與 Sham 組的比較結果。*、#：p < 0.05。

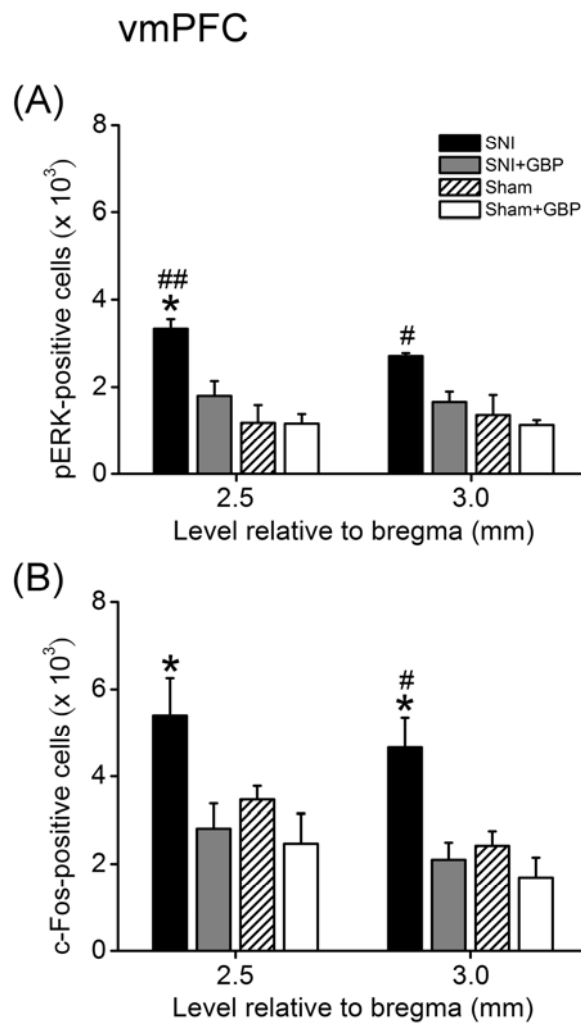


圖 4-13、vmPFC 中不同前後位置的細胞分布情形。(A) pERK 的分布；(B) c-Fos 的分布。符號「*」代表 SNI 組與 SNI+GBP 組的比較結果，符號「#」代表 SNI 組與 Sham 組的比較結果。*、#： $p < 0.05$ ；##： $p < 0.01$ 。

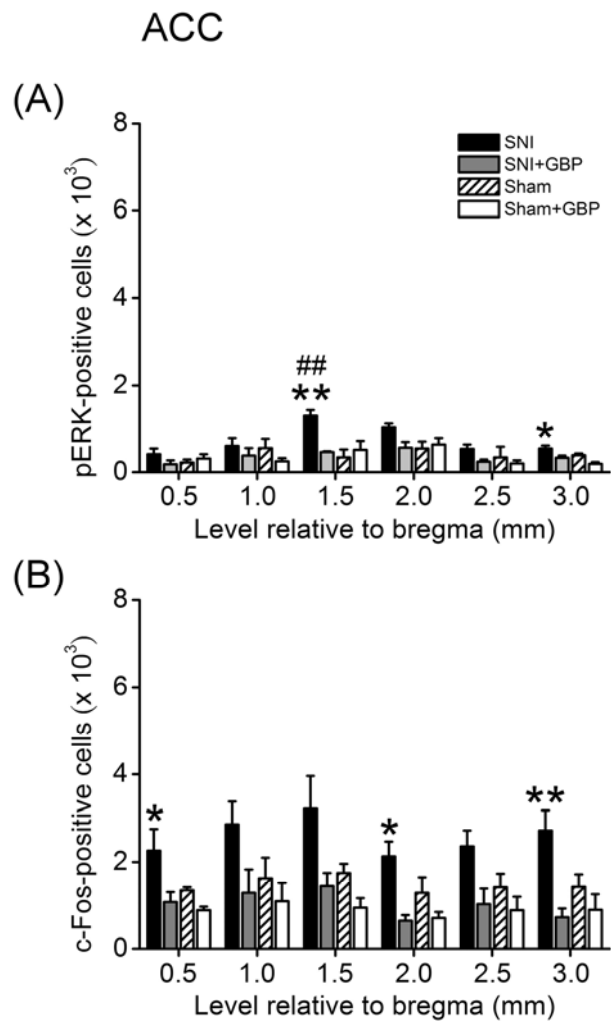


圖 4-14、ACC 中不同前後位置的細胞分布情形。(A) pERK 的分布；(B) c-Fos 的分布。符號「*」代表 SNI 組與 SNI+GBP 組的比較結果，符號「#」代表 SNI 組與 Sham 組的比較結果。*： $p < 0.05$ ；**、##： $p < 0.01$ 。

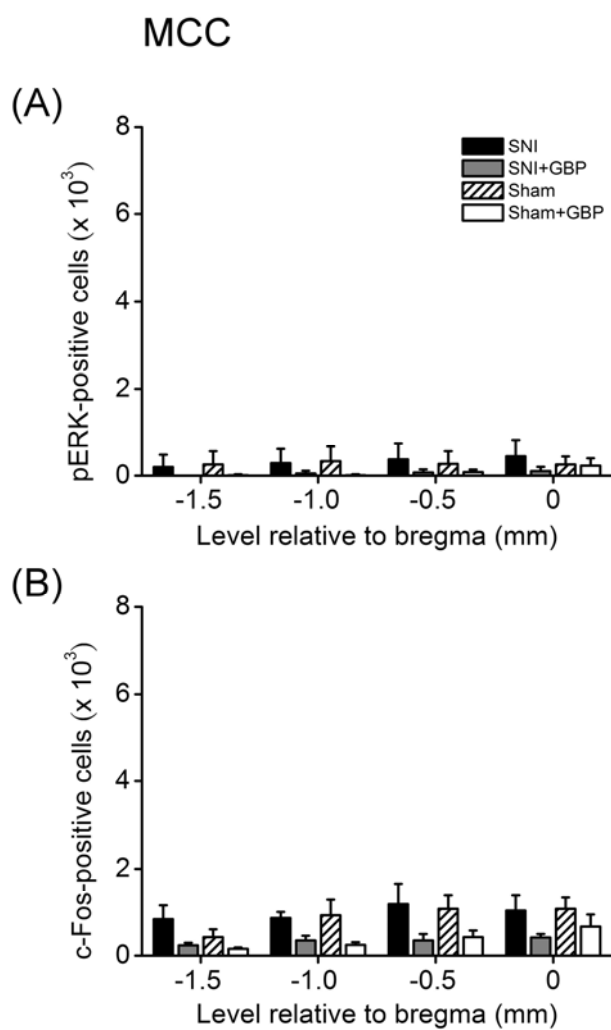


圖 4-15、MCC 中不同前後位置的細胞分布情形。(A) pERK 的分布；(B) c-Fos 的分布。

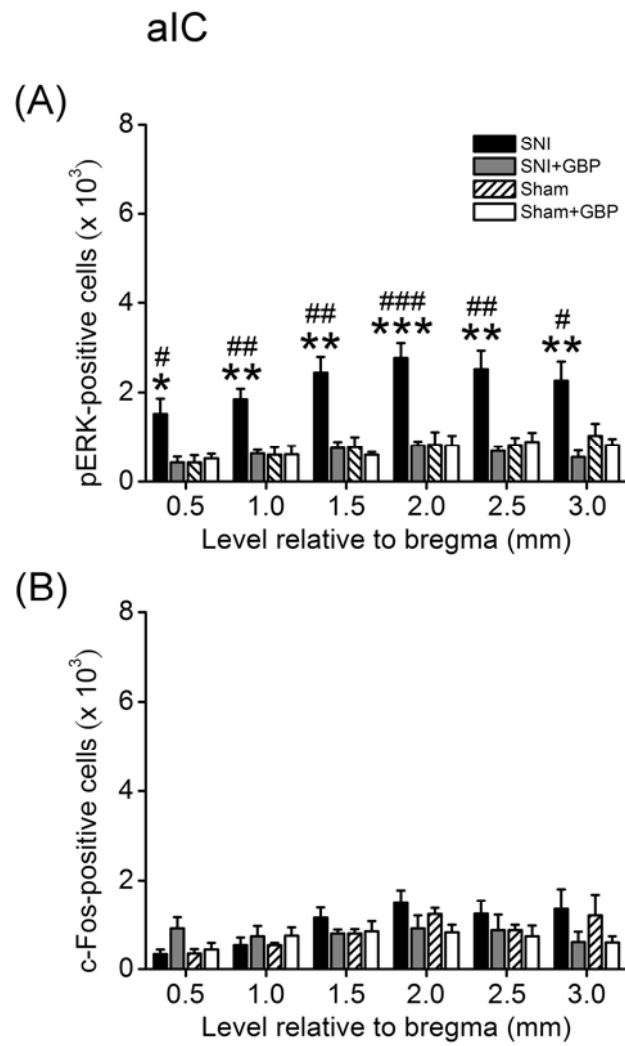


圖 4-16、aIC 中不同前後位置的細胞分布情形。(A) pERK 的分布；(B) c-Fos 的分布。符號「*」代表 SNI 組與 SNI+GBP 組的比較結果，符號「#」代表 SNI 組與 Sham 組的比較結果。*、#： $p < 0.05$ ；**、##： $p < 0.01$ ；***、###： $p < 0.001$ 。

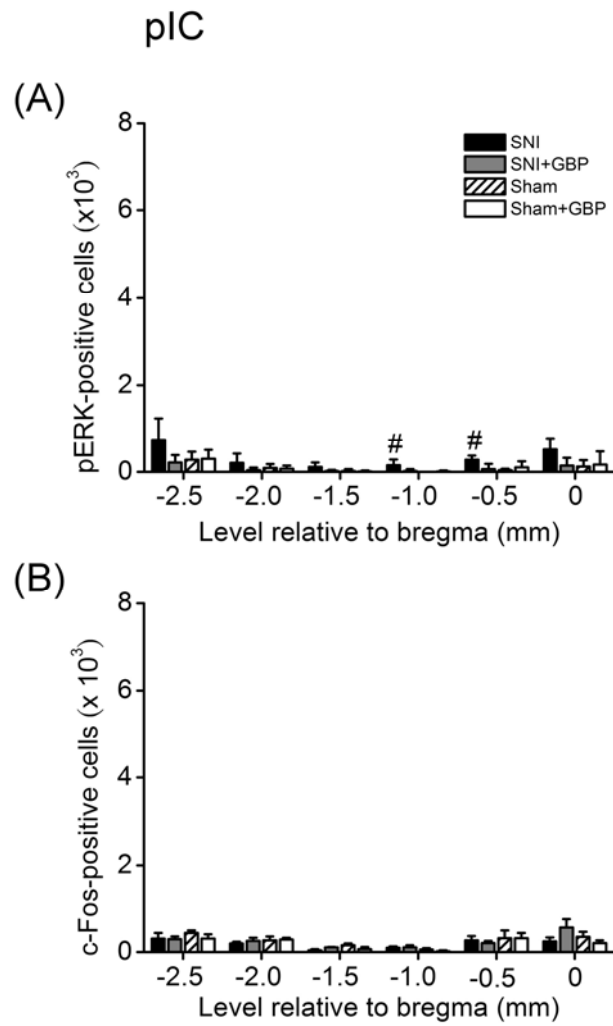


圖 4-17、pIC 中不同前後位置的細胞分布情形。(A) pERK 的分布；(B) c-Fos 的分布。符號「#」代表 SNI 組與 Sham 組的比較結果。#： $p < 0.05$ 。

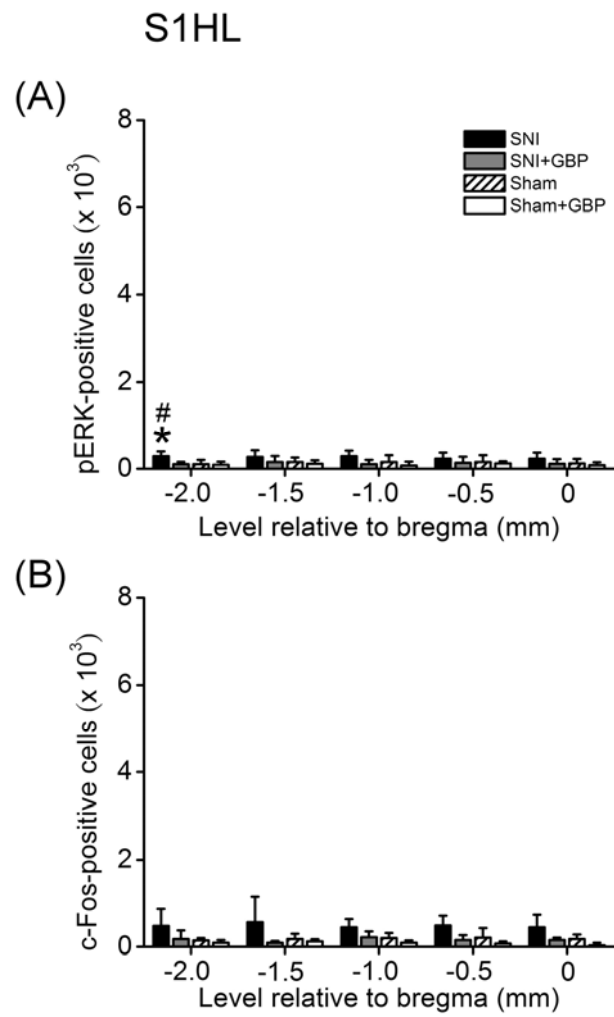


圖 4-18、S1HL 中不同前後位置的細胞分布情形。(A) pERK 的分布；(B) c-Fos 的分布。符號「*」代表 SNI 組與 SNI+GBP 組的比較結果，符號「#」代表 SNI 組與 Sham 組的比較結果。*、#：p < 0.05。

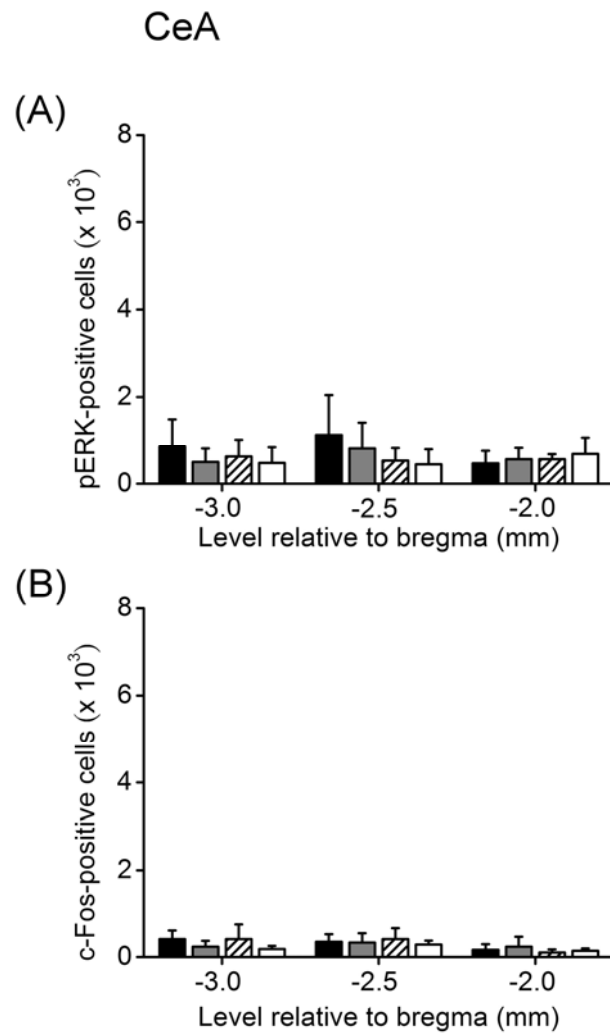


圖 4-19、CeA 中不同前後位置的細胞分布情形。(A) pERK 的分布；(B) c-Fos 的分布。

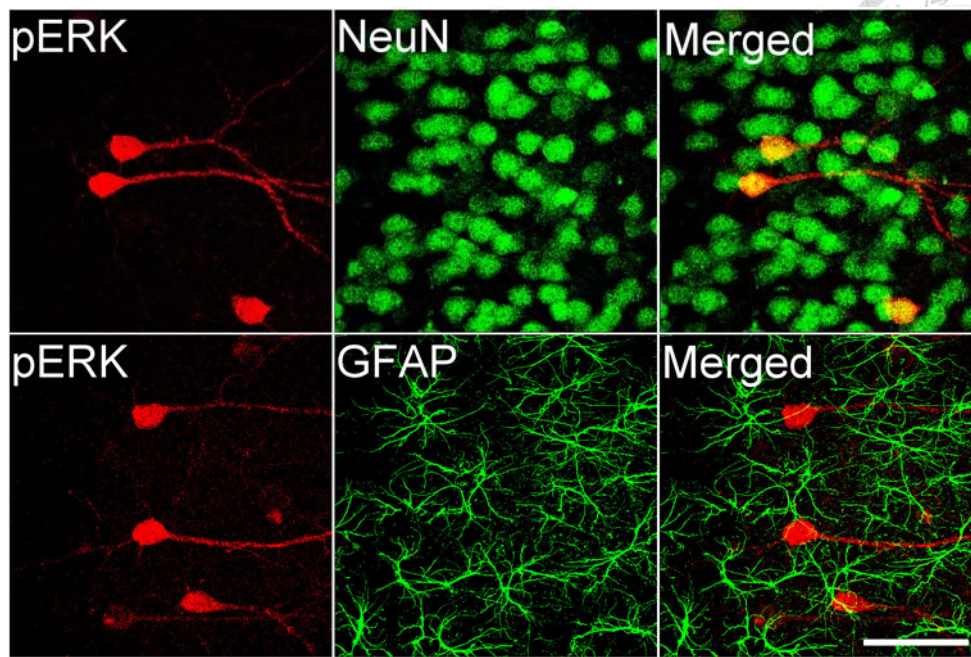


圖 4-20、pERK 的免疫螢光染色結果。我們使用神經元分子標誌 NeuN 及星狀膠細胞分子標誌 GFAP 進行免疫螢光染色，結果顯示腦中的 pERK 細胞為神經元，不是星狀膠細胞。比例尺：50 μm 。

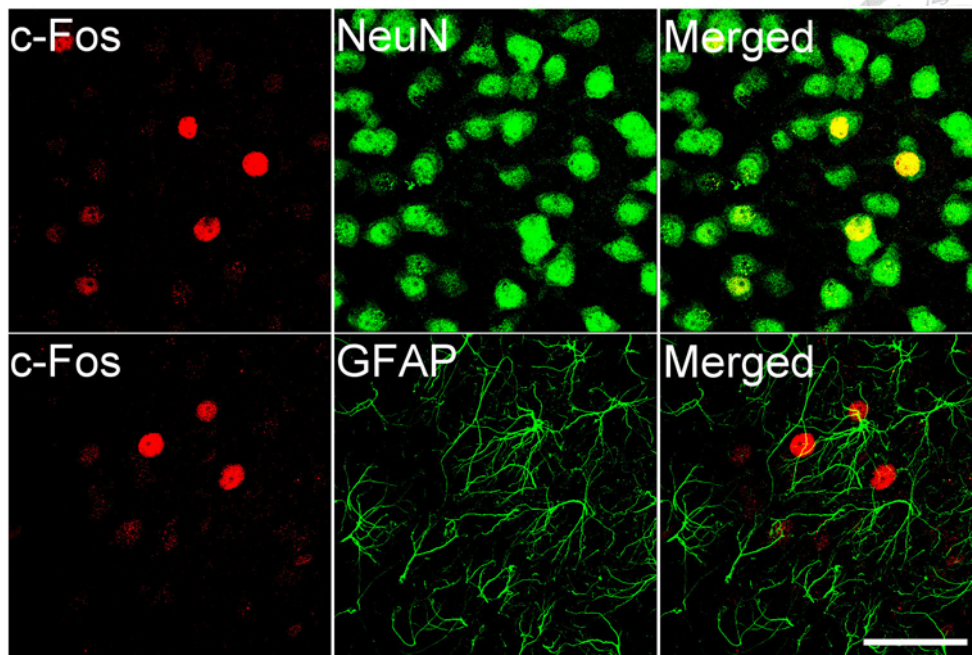


圖 4-21、c-Fos 的免疫螢光染色結果。我們使用神經元分子標誌 NeuN 及星狀膠細胞分子標誌 GFAP 進行免疫螢光染色，結果顯示腦中的 c-Fos 細胞為神經元，不是星狀膠細胞。比例尺：50 μm 。

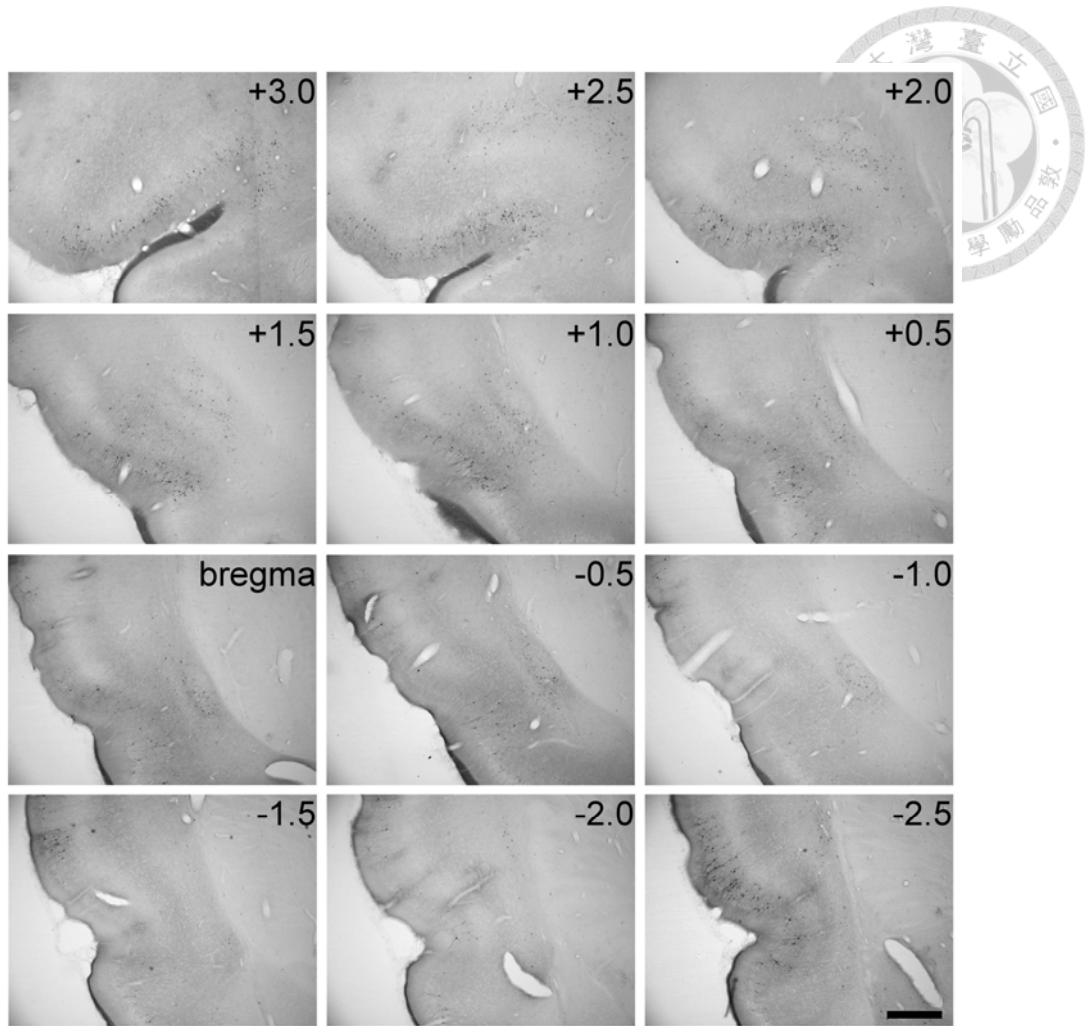


圖 5-1、pERK 細胞在 SNI 組大鼠左側 IC 中不同前後位置的細胞分布情形。圖片
右上角數字標示與 bregma 的距離(單位：mm)。比例尺：500 μ m。

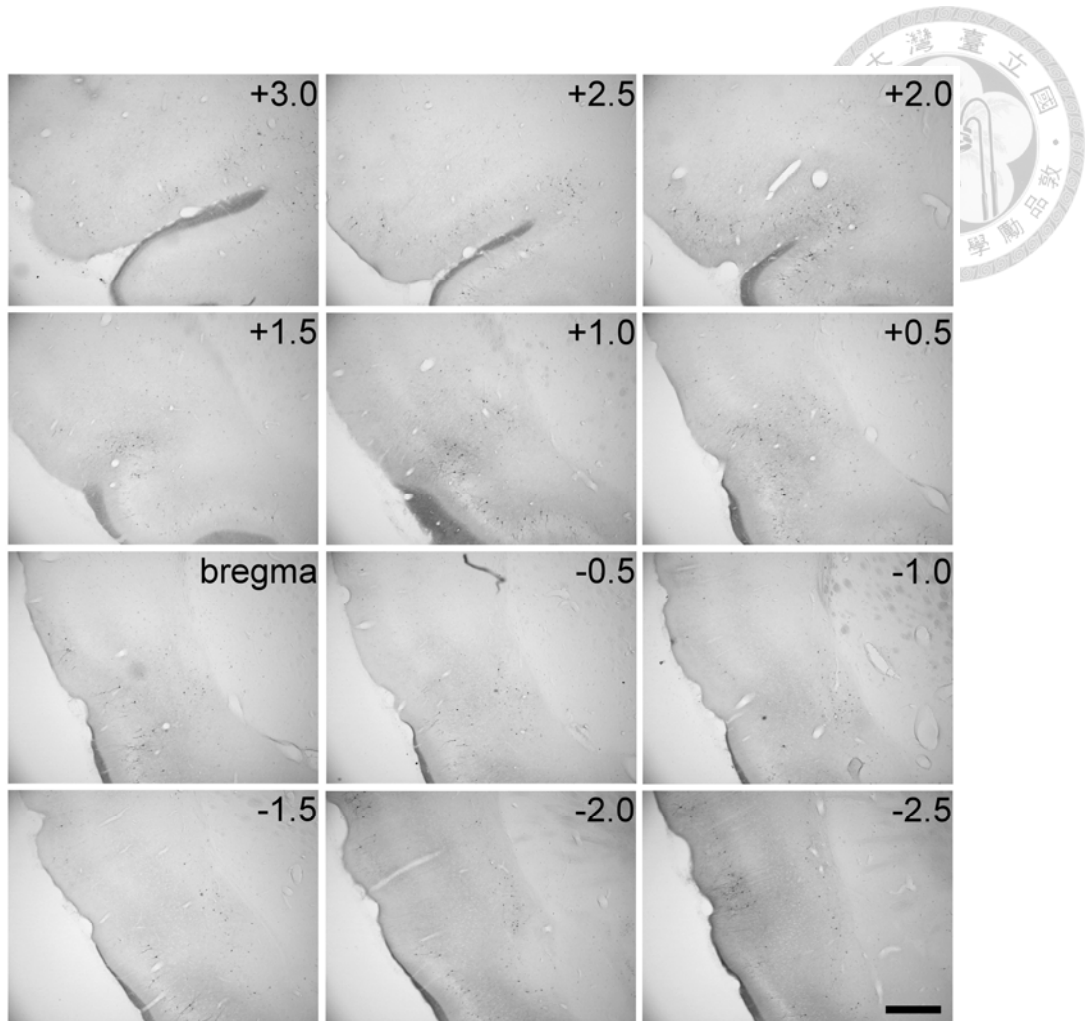


圖 5-2、pERK 細胞在 Sham 組大鼠左側 IC 中不同前後位置的細胞分布情形。圖片
右上角數字標示與 bregma 的距離(單位：mm)。比例尺：500 μ m。