國立台灣大學醫學院解剖學暨細胞生物學研究所

博士學位論文

術前局部麻醉劑處理及糖尿病對大白鼠正中神經損傷後之影響

Effects of Pre-emptive Lidocaine Treatment and Diabetes on Rats Following Median Nerve Injury

研究生：林至德

指導教授：呂俊宏 博士

中華民國九十九年七月

目　錄

口試委員會審定書…… 3

誌謝與感言…….4

Part 1.　術前局部麻醉劑處理對大白鼠正中神經損傷後之影響

中文摘要…… 5

英文摘要…….8

第一章　文獻回顧……10

第二章　　術前給予局部麻醉劑對大白鼠正中神經截斷後異位性放電的影響。

前言……15

材料方法……16

結果……18

討論……20

第三章　　術前給予局部麻醉劑對大白鼠正中神經截斷後楔狀神經核內神經胜肽 Y 與 c-Fos 表現量的變化。

前言……23

材料方法……24

結果……28

討論……30

第四章　大白鼠正中神經截斷後楔狀內神經胜肽 Y 與 c-Fos 表現量之相互關係。

前言……33

材料方法……34

結果……35

討論……36

第五章　術前給予局部麻醉劑對大白鼠正中神經慢性纏繞傷害動物模式神經病變疼痛行為之影響。
前言……38
材料方法……40
結果……42
討論……44

Part 2.　誘發糖尿病對大白鼠正中神經截斷之影響。
中文摘要……46
英文摘要……48

第六章　大白鼠誘發糖尿病合併正中神經截斷後神經胜肽 Y 與 c-Fos 在不同存活時程的表現情形。
前言……50
材料方法……51
結果……54
討論……56

第七章　大白鼠誘發糖尿病合併正中神經截斷後背根神經節中神經滋養素-3 在不同存活時程的表現情形。
前言……59
材料方法……59
結果……63
討論……64

參考文獻…… 67
圖表與說明…… 76

國立臺灣大學博士學位論文
口試委員會審定書

術前局部麻醉劑處理及糖尿病對大白鼠正中神經
損傷後之影響

Effects of Pre-emptive Lidocaine Treatment and Diabetes on Rats Following Median Nerve Injury

本論文係林至德（學號 F90446003）在國立臺灣大學解剖暨細胞生物學研究所、所完成之博士學位論文，於民國 99 年 7 月 12 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：

呂俊宏（簽名）

（指導教授）

梁柏傑　尹相姝

蔡怡汝　戴安修

系主任、所長　葛國賢（簽名）

誌謝與感言

光陰似箭轉眼就過了九個年頭，終於能畢業了。依稀還記得剛考上解剖所碩士班時那種興奮，到現在要離開了心情十分複雜，有開心、有不捨、也有對日後工作的沉重壓力。回想博士班的時光，首先要感謝我的恩師呂俊宏老師，當研究上遇到問題時對我的指導，當犯錯時能適時的糾正我，當懈怠時對我及時的提醒，當實驗上遇到瓶頸時能不計代價的讓我訂購所需的藥品。另外，也要感謝王淑美老師、盧國賢老師、吳建春老師、謝松蒼老師在我任職助教時給予我的指導，讓我學習到許多日後教學上的知識與技巧。也感謝尹相姝老師、錢宗良老師、戴安修醫師、蔡怡汝老師在實驗上給予我的協助使我能夠順利的完成論文。而實驗室的許多的學弟妹們也感謝你們讓我過著充實而開心的實驗室生活。

最後要感謝我的父母對我念博士班的全力支持，無論是經濟上或是精神上從無埋怨的默默支持著我，讓我能無後顧之憂的完成學業。

林至德 2010.7.23

Part 1. 術前局部麻醉劑處理對大白鼠正中神經損傷後之影響

中文摘要

由前人的研究已經證實在周邊神經損傷後，對於受損的神經給予局部麻醉劑利路卡因鹽酸鹽(lidocaine)可有效的抑制因傷害所造成的異位性放電(ectopic discharges)。然而關於術前給予局部麻醉劑 lidocaine 對神經傷害所造成的異位性放電的影響仍沒有充分的研究。因此本實驗利用正中神經截斷或是慢性纏繞傷害動物模式，並配合活體紀錄複合性動作電位、電刺激、免疫組織化學染色以及給予拮抗性藥物、動物行為測試等實驗方式來探討術前給予局部麻醉劑對於：(1) 正中神經截斷前後與電刺激前後異位性放電(cetopic discharges) 的影響；(2) 截斷正中神經同側之楔狀神經核（cuneate nucleus，CN）內，神經胜肽 Y (neuropeptide Y，NPY)免疫反應陽性神經纖維與 c-Fos 免疫反應陽性神經元表現量的變化；(3) 若神經胜肽 Y 免疫反應陽性神經纖維與 c-Fos 免疫反應陽性神經元在楔狀神經核中的表現量受到術前給予局部麻醉劑的影響，接著再以拮抗劑處理來探討神經胜肽 Y 與 c-Fos 表現量之間的相互關係；(4) 利用慢性纏繞傷害動物模式檢測術前給予局部麻醉劑可否對動物神經病變疼痛產生緩解。

首先我們在正中神經上局部給予生理食鹽水以及不同濃度的 lidocaine (1%, 5%, or 10%)，藥物處理 15 分鐘後再將正中神經截斷。並以電生理方式分別記錄各組別在藥物注射後、神經截斷後與電刺激前後不同時間點的複合性動作電位，

來比較異位性放電的變化。結果顯示生理食鹽水實驗組異位性放電的頻率（frequency）相較於注射後、神經截斷後與電刺激前後都有顯著的增加，並且在神經截斷後達到最高峰。但在 lidocaine 處理的組別中，因正中神經截斷所誘發異位性放電頻率，則會隨著 lidocaine 濃度的增加而有減少的趨勢。

接著以免疫組織化學染色偵測楔狀神經核中神經胜肽 Y 免疫反應陽性神經纖維與 c-Fos 免疫反應陽性神經元的表現量。神經胜肽 Y 免疫反應陽性神經纖維的表現量在電刺激後受損正中神經同側楔狀神經核中，相較於未給予電刺激的對側，在各實驗組別中都有顯著的減少；而比較不同藥物實驗組間的差異可發現，術前給予 lidocaine 處理可隨濃度增加而減少神經胜肽 Y 免疫反應陽性神經纖維在同側楔狀神經核中的表現。另一方面，在正中神經未受損傷或是正中神經損傷後未受到電刺激的組別，都無法以免疫染色的方式偵測到 c-Fos 免疫反應陽性神經元；而比較各術前處理實驗組，c-Fos 免疫反應陽性神經元表現量在生理食鹽水實驗組顯著高於其他組別，且 c-Fos 免疫反應陽性神經元在楔狀神經核中的表現量也隨 lidocaine 濃度增加而減少。

在發現神經胜肽 Y 免疫反應陽性神經纖維與 c-Fos 免疫反應陽性神經元在術前給予 lidocaine 處理後，兩者在楔狀神經核中的表現量都會隨 lidocaine 濃度增加而減少。我們以線性迴歸分析發現在各實驗組楔狀神經核中因電刺激而減少的神經胜肽 Y 免疫反應陽性神經纖維百分比與 c-Fos 免疫反應陽性神經元兩者間有明顯的正相關（$r = 0.77$, $P<0.005$）。接著以神經胜肽 Y 受體的拮抗劑([D-Tyr27,

36 D-Thr32]-NPY (27-36))來檢測神經胜肽 Y 釋放與 c-Fos 之間的關係。結果發現在楔狀神經核吻端使用[D-Tyr27, 36 D-Thr32]-NPY (27-36)處理後，電刺激雖可使楔狀神經核中神經胜肽 Y 免疫反應陽性神經纖維下降，但電刺激所誘發之 c-Fos 免疫反應陽性神經元相較於未給予拮抗劑處理的組別明顯下降($p<0.05$)。最後利用慢性纏繞傷害動物模式檢測術前給予局部麻醉劑是否可對正中神經損傷後所產生的神經病變疼痛有所影響，並評估神經病變疼痛行為與楔狀神經核中 c-Fos 的表現量是否有所關聯，結果發現術前給予局部麻醉劑可延緩並降低機械性痛覺敏感（mechanical allodynia）的產生，並且楔狀神經核中 c-Fos 的數量與機械性刺激的閾值呈顯著負相關($r = -0.80$, $P < 0.005$)，這樣的結果暗示或許楔狀神經核中 c-Fos 的數量可作為評估正中神經損傷後對機械性刺激痛覺敏感的指標。

ABSTRACT

Following peripheral nerve injury, lidocaine application has been demonstrated to suppress injury discharges. However, there is very little information about the effects of lidocaine pre-treatment. The aim of the present study was to examine the effects of pre-treatment with lidocaine on injury discharges of the nerve, and neuropeptide Y (NPY) and c-Fos expression in the cuneate nucleus (CN) after median nerve transection (MNT). Rats received either saline or 1%, 5%, or 10% lidocaine applied topically to the median nerve before nerve transection. Electrophysiological recording was used to examine the changes in injury discharges of the nerve at post-injection, transection, pre- and post-electrical stimulation stages in the different groups. Sequential immunohistochemistry was also used to identify the number of NPY-like immunoreactive (NPY-LI) fibers and c-Fos-LI cells in the corresponding CN. An increasing frequency of injury discharges was observed at all stages in the pre-saline group, which were suppressed by lidocaine pre-treatment in a dose-dependent manner. Lidocaine pre-treatment also attenuated the number of injury-induced NPY-LI fibers and c-Fos-LI neurons within the CN in a dose-dependent manner. Furthermore, expression of c-Fos-LI neurons in the CN was significantly reduced by an NPY receptor antagonist, indicating that NPY modulated c-Fos expression following MNT.

In chronic constriction injury (CCI) model, lidocaine pre-treatment dose

dependently delayed and attenuated the development of mechanical allodynia within a 28-day period and also reduced the number of c-Fos-LI neurons within the CN. In addition, the mean number of c-Fos-LI neurons in the CN was significantly negative correlated to the sign of mechanical allodynia following CCI. These data suggest that suppressing injury discharges with lidocaine pre-treatment effectively prevent morphological changes in the CN and attenuate neuropathic pain following median nerve injury. Furthermore, the expression of c-Fos in the CN may be regarded as the scale of mechanical allodynia in rat treated with median nerve injury.

第一章　文獻回顧

術前麻醉 (Pre-emptive analgesia)

術前麻醉是目前廣泛使用於臨床上的一種麻醉方式，可以有效的避免手術後疼痛 (post-operation pain)與後續發生的神經病變疼痛 (neuropathic pain) (Wong et al., 1997; Palmes et al., 2007)。術前麻醉的概念最早由 Crile 於 1913 年提出，主要內容是手術時除了全身性的麻醉以外，在造成組織傷害之前再額外給予局部麻醉處理阻斷傷害時所產生的訊息。雖然術前麻醉在避免手術所造成的神經病變疼痛所扮演的腳色仍不是十分清楚，部份研究指出其機制或許是經由抑制神經傷害時，受損傷神經或是背根神經節所產生的異位性放電(ectopic discharge) (Wall et al., 1974a; Devor et al., 1992; Matzner et al., 1994)。而 Woolf 在 1993 的報告中指出，過度的傷害性或是不正常的異位放電傳入脊髓，可能會造成細胞因過度興奮而死亡(excitotoxic death)，進而產生中樞致敏(central sensitization)或是突觸的重新聯結(reorganization of the synaptic connections)，可能是造成神經病變疼痛的主要原因。另外有研究指出，術前給予 MK-801 或是 nociceptin 可以緩解坐骨神經慢性纏繞傷害所造成的神經病變疼痛 (Munglani et al., 1999; Yamamoto et al., 2000)。 另外也有研究指出，術前給予 lidocaine 或 fentanyl 處理也可減少脊髓背角中 c-Fos 的表現 (Sun et al., 2004; Nakamura and Takasaki, 2001)。 因此我們知道術前麻醉可能是藉由避免中樞神經產生形態上的改變，來抑制神經病變疼痛的產生，但是術前麻醉

處理後對傷害性放電會產生怎樣的影響仍不是十分明確。

異位性放電 (ectopic discharges)

回顧文獻，許多種的周邊神經傷害模式都會引發神經異位性放電的產生，包括神經截斷(transection, Wall and Gutnick, 1974a)、慢性纏繞傷害(chronic constriction injury, Bennett and Xie, 1988)和脊神經緊束傷害(spinal nerve ligation, Kim and Chung, 1992)，異位性放電成因是鈉離子通道(sodium channel)不正常興奮所造成，發生的位置可能是受損的神經、背根神經節或是神經截斷所產生的神經瘤(neuroma)。而異位性放電持續的時間從數小時到數天不等(Wall and Gutnick, 1974b; Chabal et al., 1989; Kajander et al., 1992; Abdi et al., 1998; Stebbing et al., 1999)。異位性放電對神經病變疼痛的產生扮演極重要的角色， Seltzer 等人在1991年的研究指出，使用局部麻醉劑阻斷異位性放電可以減緩神經病變疼痛的產生，相反的若是以人為方式加強異位性放電，則會加重神經病變疼痛的行為。 Yoon等人於1996年發表的文章指出， 使用背根截斷(dorsal rhizotomy)來阻止異位性放電傳入脊髓， 也可以有效的抑制神經病變疼痛。

由於異位性放電是鈉離子通道不正常興奮所造成，因此可藉由鈉離子通道的阻斷劑(lidocaine)來抑制異位性放電(Chabal et al., 1989; Devor et al., 1992; Sotgiu et al., 1994)。但是否可以利用lidocaine術前麻醉的方式來阻斷異位性放電產生還沒有很深入的研究。

利路卡因鹽酸鹽(lidocaine)

Lidocaine 又名 xylocaine 或是 lignocaine，屬於 amide-type 的麻醉劑。在臨床上被廣泛使用，藥物的半衰期為 90-120 分鐘，主要由肝臟進行代謝(Thomson et al., 1973)。一般的使用劑量為 1-2%，可用於局部或是經由靜脈注射作用於全身;但是需要注意的是當全身性使用時，太高劑量的 lidocaine 會對心臟或是神經系統產生嚴重的副作用(Mao and Chen, 2000)。而另外有研究指出，高劑量的 lidocaine 可用於緩解疱疹或是三叉神經所引起的神經痛(Rowbotham et al., 1996; Comer and Lamb, 2000)。由此可知在局部施予高劑量的 lidocaine，並不會造成全身性的附作用，因此我們選擇 lidocaine 作為術前局部麻醉劑。

楔狀神經核 (cuneate nucleus)

楔狀神經核位於腦幹(brainstem) 背側，靠近第四腦室的尾端的位置;外型為長約 3mm 的梭形核區。與薄束神經核(gracile nucleus) 及外側楔狀神經核(external cuneate nucleus) 合稱背柱神經核 (dorsal column nuclei)。楔狀神經核主要接受同側初級感覺神經元(primary afferent neurons)，A / 神經纖維傳入上肢非傷害性輕觸覺(tactile)與本體感覺(proprioception)訊息(Andersen et al., 1964; Berkley et al., 1986)。由接轉神經元投射至對側丘腦 (Fyffe et al.,1986; Hirai et al.,1988)，再向上傳至大腦初級體知覺區(primary sensory cortex)。而本實驗室先前已證實證，正中神經截斷後在同側的楔狀神經核中會有大量的神經胜肽 Y 免疫反應陽性的神經纖維表現，並在截斷

後四週達到高峰(Tsai et al., 2004)。而這些神經胜肽 Y 免疫反應陽性的神經纖維的來源，主要是由中大型背根神經元所產生，並經由初級感覺神經(primary afferent fibers)投射至同側的楔狀神經核(Tsai et al., 2007)。神經胜肽 Y 直接注射於腦脊髓膜腔(intrathecal)，可使神經傷害所造成的痛覺過敏加劇(White 1997)。這可能是由於神經胜肽 Y 與其興奮性 Y2 受體結合所導致(Tracey et al., 1995)。 因此，楔狀神經核中神經胜肽 Y 的表現可能與疼痛感覺相關。

而在正中神經損傷後不論給予 A / 或 C fiber 強度的電刺激，都會使楔狀神經核中表現 c-Fos 免疫反應陽性神經元(Day et al.,2001a,b; Lue et al.,2002)。利用螢光金(Fluorogold,FG)逆向傳遞標誌楔狀丘腦接轉神經元，發現楔狀神經核中 c-Fos 免疫反應陽性神經元 78% 屬於楔狀丘腦接轉神經元，而這些受電刺激誘發所表現的 Fos 屬於原始致癌基因 c-fos (proto-oncogene c-fos)的產物，被廣泛用以檢測神經元是否受到傷害性刺激所活化，並且認為是痛覺的神經標示(Hunt et al., 1987; Harris, 1998)。 因此楔狀神經核中 c-Fos 免疫反應陽性神經元，可能與參與痛覺的向上傳遞。綜合以上幾點，我們知道正中神經損傷後楔狀神經核在形態上會有明顯的改變，而這些形態上的變化又極有可能與痛覺的向上傳遞有關，所以我們選用楔狀神經核來作為研究術前麻醉的素材。

正中神經傷害模式

本實驗所選用的周邊神經損傷動物模式，包括神經截斷的神經瘤模式(neuroma model) (Wall et al.,1979) 和慢性纏繞損傷模式 (chronic

constriction injury model) (Bennett and Xie,1988)兩種。前者可即刻對神經給予同等的截斷傷害，較易觀察因截斷所引發的異位性放電，但缺點是神經截斷後無法進行神經病變疼痛的行為測試。而後者雖傷害產生的較慢，但可進行神經病變疼痛的行為測試。因此本實驗先利用神經瘤模式來檢測術前麻醉對異位性放電的影響，再使用慢性纏繞損傷模式來測試術前麻醉對神經病變疼痛的行為的影響。

第二章 術前給予局部麻醉劑對大白鼠正中神經截斷後異位性放電的影響。

前言

許多電生理相關的研究指出對坐骨神經施予截斷傷害（transection）、慢性纏繞傷害(chronic constriction injury，CCI)或是脊神經緊束傷害(spinal nerve ligation)會在神經損傷處或是背根神經節(DRG)引發傷害性的異位放電(injury discharges)，而這樣的異位性放電可維持數分鐘至數天之久（Wall and Gutnick, 1974a；Bennett and Xie, 1988；Kim and Chung, 1992)。另外，其他學者的研究也指出傷害性的異位放電在神經病變疼痛（neuropathic pain）產生過程中的中樞致敏（central sensitization）步驟扮演極重要的角色（Seltzer et al., 1991)，在脊神經緊束傷害（spinal nerve ligation）模式中若合併施予背根神經截斷術（dorsal rhizotomy）來阻斷傷害性刺激傳入脊髓則可明顯消除實驗動物神經病變疼痛行為的產生（Yoon et al., 1996; Abdi et al., 1998; Han et al., 2000）。除此之外，經由循環系統或是直接給予神經局部麻醉劑（lidocaine）也可減少異位性放電的產生（Wall and Gutnick, 1974b; Devor et al., 1992)。Seltzer 等人在1991年的研究更指出降低神經損傷時所產生的異位性放電可以明顯地抑制和延後動物自殘行為(autotomy，一種神經病變疼痛的指標)的產生。而在臨床方面的研究也證實在因外傷所引起的疼痛患部給予局部麻醉劑可以有效的緩解神經病變疼痛（Gracely et al., 1992)。 綜合以上文獻可知，在周邊神經

損傷之前以術前局部麻醉處理或許可經由事先阻斷神經傷害異位性放電的產生，達到減緩神經損傷後神經病變疼痛的發生。雖然已有相關文獻討論此部分的研究，但大都侷限於以坐骨神經傷害模式的範圍。此外，大部分的研究雖有提及術前局部麻醉具有降低神經傷害異位性放電的作用，但仍缺乏術前麻醉對神經傷害異位性放電影響的實際神經電生理研究。因此這個部份的實驗將以正中神經截斷的神經瘤模式作為實驗主軸，並且在神經截斷前１５分鐘先進行術前局部麻醉，分別於藥物注射後、神經截斷後與電刺激前後的時間點以電生理方式紀錄複合式動作電位的變化並加以分析，進而探討術前局部麻醉對神經傷害異位性放電的影響。

材料方法

本實驗經由國科會與台大醫學院暨公衛學院動物實驗小組審查與核准 （核准編號：IACUCA Approval No. 20030114），實驗動物倫理則依據國際疼痛研究學會（International Association for the Study of Pain）Zimmermann 於 1983 年所發表的內容。動物飼養於日夜各１２小時循環的環境並提供充足的食物及飲水。本實驗以雄性大白鼠作為實驗材料(Sprague-Dawley 品系)，體重約在 176-200 公克之間。實驗動物分為五組：第一組為控制組（假手術，三隻），第二到五組為術前局部麻醉實驗組（分別為：生理食鹽水、1%、5%與 10% lidocaine 實驗組，生理食鹽水組四隻，其餘每組各五隻）。

一、　紀錄複合式動作電位

動物以體重每100公克腹腔注射0.45毫升的７％水合氯醛（chloral hydrate）進行麻醉，動物麻醉後以仰躺方式固定於軟木板。隨後以電鬍刀將前肢毛髮剔除乾淨，再以手術刀將肘窩至腋下的皮膚切開，在手術顯微鏡的視野下將皮膚與胸大肌分離，之後將胸大肌剪開至臂神經叢完全暴露；辨認正中神經的位置並小心將其與周圍組織游離至少７ｍｍ，在避免拉扯到神經的狀況下將游離的神經掛載於白金電極鉤上，電極鉤下方襯以石蠟紙以避免電極鉤接觸到神經以外的組織，再以石蠟油浸潤神經以避免乾燥。電極鉤連接到 Xction View Data Acquisition System (Model XD-04; Singa, Tao Yuan, Taiwan)，神經電訊號以 2000 倍放大後分別紀錄藥物注射後（神經截斷前 5 分鐘，post-injection）與神經截斷（神經截斷後 10 分鐘，transection）過程中的複合式動作電位，控制組則以相對應的時間長度作為不同時間點的區隔，紀錄完成後移除電極鉤並將肌肉與皮膚依序分層縫合。待動物存活 4 週後，於同樣的位置再次進行手術並紀錄電刺激前(pre-ES) 與電刺激後 (post-ES) 各5分鐘的複合式動作電位。

二、　術前局部麻醉與正中神經截斷的動物模式

動物依前步驟麻醉固定後，在手術顯微鏡的視野下在肘窩處將正中神經周圍組織清除並將正中神經游離出約７ｍｍ長度，接著以U-100 insulin syringe (1/2 cc，TERUMO, ELKTON, USA）分別以１００ｕｌ生理食鹽水或是不同濃度的 lidocaine（1%、5%和 10%，Sigma, St. Louis, MO, USA）直接注射於神經，靜置１５分鐘

之後以生理食鹽水將多餘的藥物沖洗並以棉花棒吸乾。接著用 5-0 型號的手術縫線在游離的正中神經兩端間隔 5 mm 處各綁一個結，再將兩個結中間的神經截斷移除，用以誘發神經瘤產生(圖 1-1,Wall et al., 1979; Lue et al., 2002; Tsai et al., 2004, 2007, 2008）。之後仔細縫合皮膚。另外取三隻大白鼠將正中神經以手術方式暴露但不進行截斷或術前局部麻醉，電生理紀錄完成後隨即縫合皮膚作為控制組。

三、 定量分析

以 Xction View Data Acquisition System 分別收集控制組與實驗組給藥後(神經截斷前 5 分鐘)、神經截斷後與電刺激前後 5 分鐘，各時間區段的電生理紀錄。再以 Xction view software 計算各組的複合式動作電位次數並除以時間，得到各組不同時間點的放電頻率(frequency)並以平均值± 平均值之標準差(mean ± SEM)方式呈現。為比較不同組間以及不同時間點之間的差異，數據以二因子變異數分析(two-way ANOVA) 與 Newman-Keuls post-hoc test 進行分析，$P<0.05$ 則認定為具有顯著差異。

結果

神經異位性放電之平均數值與分析比較列於表 1-1。由電生理記錄顯示控制組(未進行正中神經截斷處理)整個紀錄過程中只有少數微弱的放電尖峰(spikes)出現，並且未能觀察到傷害異位性放電的產生(post-injection：8.2±0.5 Hz, transection：6.4±2.1 Hz, pre-ES：7.5±1.2 Hz, post-ES：6.2±0.9

Hz，圖 1-2A)，而在其他所有實驗組未進行生理食鹽水或是藥物注射前也可觀察到類似的結果。二因子變異數分析顯示複合式動作電位在各實驗組間(F=117.1, P<0.0001)與各個時間點間(F=18.4, P<0.0001)均存在顯著差異。生理食鹽水組在注射後的時間點與控制組相比傷害異位性放電明顯增加（post-injection：90.7±7.7 Hz, transection：132.3±14.5Hz, pre-ES：68.5±14.3 Hz, post-ES：84.6±7.9 Hz，圖 1-2B 和圖 1-3）。相較之下，術前給予 1% lidocaine 組(pre-1% lido，post-injection：30.8±8.0 Hz, transection：111.8±13.6 Hz, pre-ES：47.9±7.7 Hz, post-ES:78.7±10.9 Hz)、術前給予 5% lidocaine 組(pre-5% lido, post-injection：18.8±4.1 Hz, transection：48.7±11.3 Hz, pre-ES：17.8±4.6 Hz, post-ES：23.6±7.7 Hz)與術前給予 10% lidocaine 組(pre-10% lido, post-injection: 9.9±2.3 Hz , transection：18.9±1.2 Hz, pre-ES：5.2±2.3 Hz, post-ES：5.1±2.7 Hz）在各記錄時間點所產生的傷害異位性放電均低於生理食鹽水實驗組。此外只有術前給予 1% lidocaine 組在給藥後所產生的傷害異位性放電高於控制組(圖 1-2 和圖 1-3）。正中神經截斷後，生理食鹽水實驗組中可以觀察到傷害異位性放電在截斷的神經上強烈的表現(圖 1-2B)；待存活 4 週之後進行電刺激，給予電刺激前(pre-ES)的傷害異位性放電頻率與神經截斷時相比有減少的趨勢，但在給予電刺激後(post-ES)則又會增加(圖 1-3)。傷害異位性放電在神經截斷與電刺激前後所產生的變化，在不同濃度 lidocaine 處理的組別也有相似的表現模式。但是傷害異位性放電的頻率隨著 lidocaine 術前局部麻醉的

濃度提高而顯著的減低，並且當 lidocaine 術前處理的濃度提高到 10%時，在不同時間點傷害異位性放電的頻率則與控制組十分相近。

討論

先前的研究指出多種周邊神經傷害後都會產生異位性放電(ectopic discharges)(Wall and Gutnick, 1974a; Bennett and Xie, 1988; Kim and Chung, 1992)，此部份的實驗我們證實術前給予局部麻醉劑處理，可以隨劑量增加顯著抑制因正中神經截斷所產生的傷害異位性放電。這部份的實驗顯示，生理食鹽水注射進正中神經後，會產生傷害異位性放電。這樣的結果暗示注射動作本身可能就會對神經造成損傷而使得傷害異位性放電的增加。

Gentili (1980a) 與 Hudson (1984)等學者先後指出，對神經進行注射的動作會造成包括軸突(axon)和髓鞘(myelin)退化等神經損傷的現象。而我們實驗室先前的研究也指出，以螢光金(fluorogold)神經追蹤劑注射到未受損傷的正中神經，於頸椎第六節的背根神經節中少部分被螢光金標示的神經元也會同時表現因神經損傷所誘發的神經胜肽Y，此一結果也可佐證注射的動作會對神經造成損傷。

過去許多研究結果指出傷害異位性放電在神經損傷的瞬間開始，並且可持續數分鐘到數日之久(Wall and Gutnick, 1974b; Seltzer et al., 1991a; Kajander et al., 1992; Liu et al., 1999)；此點也與我們的實驗結果，傷害異位性放電的頻率在神經截斷時達到最高峰相符合。除此之外，Seltzer等人(1991a, b)的研究也指出，傷害異位性放電可藉由在神經傷害前給予額外的電刺激來加以延長，並且因為神經傷害所造成的自殘行為(autotomy)也會因此而加劇。而在本篇實驗

中，在正中神經截斷 4 週後給予電刺激，同樣也會使得傷害異位性放電的頻率相較於電刺激前增加。綜合以上結果可以得知，神經截斷是影響神經後續發展傷害異位性放電的關鍵時間點。

本篇研究的結果發現，術前局部麻醉處理 lidocaine 的濃度在 5%以及 10%的組別才會顯著的抑制因神經截斷所產生的傷害異位性放電。這樣的現象十分相似於在神經損傷後給予 lidocaine (Tanelian and Maclver, 1991)或是 tetrodotoxin (Omana-Zapata et al., 1997)可降低受損神經所產生的傷害異位性放電。而術前給予 1% lidocaine 對傷害異位性放電無法產生明顯的抑制作用的結果，也相似於 Abdi 等人(2000)在坐骨神經給予 2% lignocaine 術前麻醉處理，無法對動物的神經病變疼痛行為產生抑制的作用。Lidocaine 一般在臨床上所使用的濃度為 1-2%，而當全身性給予高濃度的 lidocaine 則會對心臟以及神經系統產生顯著的副作用(Mao and Chen, 2000)。然而，有許多研究卻指出在局部給予濃度高於 5%的 lidocaine 可緩解疱疹所造成的神經痛(Rowbotham and Fields, 1989; Rowbotham et al., 1996; Comer and Lamb, 2000) 或是三叉神經痛(Han et al., 2008)。至於為何 lidocaine 濃度須要達到 5%才會對傷害異位性放電或是神經痛產生抑制的作用，可由鈉離子通道的性質來解釋。相較於 TTX 敏感性鈉離子通道(TTX-sensitive sodium channels)，TTX 耐受性鈉離子通道(TTX-resistant sodium channels)需要更高濃度的 lidocaine 來抑制其作用。Roy 和 Narahashi (1992) 指出, TTX 耐受性鈉離子通道對於 lidocaine 的感受性只有 TTX 敏感性鈉離子通道的

四分之一，而 lidocaine 濃度需要高於 760 μM（大約 1.8%）才可使 TTX 耐受性鈉離子通道所產生的動作電位振幅減少（Scholz and Vogel, 2000）。因此，我們推測當使用 1% lidocaine 進行術前麻醉時，無法完全抑制 TTX 耐受性鈉離子通道的作用，因此傷害異位性放電還是會產生。而在 5%與 10% lidocaine 實驗組中，推測因為濃度高於 1.8%，所以全部的鈉離子通道都會產生抑制，進而降低傷害異位性放電的產生。

第三章 術前給予局部麻醉劑對大白鼠正中神經截斷後楔狀神經核內神經胜肽 Y 與 c-Fos 表現量的變化。

前言

楔狀神經核（Cuneate nucleus，CN）在一般周邊神經未受損傷的情況下，主要是接受同側初級感覺神經元（primary afferent neurons）傳入上肢支配區域非傷害性輕觸覺（tactile）與本體感覺（proprioception）訊息；接著將訊息向上傳遞至對側的丘腦（thalamus）(Andersen et al., 1964; Berkley et al., 1986; Day et al., 2001; Lue et al., 2002)。而在正中神經截斷後，受損神經同側的楔狀神經核中可偵測到神經胜肽 Y 免疫反應陽性的神經纖維(neuropeptide Y-like immunoreactive， NPY-LI fibers)(Tsai et al., 2004, 2007, 2008)。而若是給予損傷的神經合併電刺激處理，則可在同側的楔狀神經核中偵測到明顯的 c-Fos 免疫反應陽性的神經元(c-Fos-like immunoreactive，c-Fos-LI cells)(Day et al., 2001; Lue et al., 2002; Tsai et al., 2008)。這些受電刺激誘發所表現的Fos屬於原始致癌基因 c-fos (proto-oncogene c-fos)的產物，被廣泛用以檢測神經元是否受到傷害性刺激所活化，並且認為是痛覺的神經標示（Hunt et al., 1987; Harris, 1998)。近期相當多的研究指出術前給予藥物處理包括 MK-801(Munglani et al., 1999)、 nociceptin (Yamamoto et al., 2000）或是 fentanyl（Nakamura and Takasaki, 2001）都可有效的減少因周邊神經損傷後在脊髓背角中所表現的 Fos。而 lidocaine 雖然在臨床上被廣泛的使

用(Rowbotham et al., 1991; Nagaro et al., 1995; Ferrante et la., 1996)；但是關於術前給予 lidocaine 處理，對正中神經損傷後楔狀神經核中神經胜肽 Y 免疫反應陽性的神經纖維與 c-Fos 免疫反應陽性的神經元之影響仍缺少相關的研究。由本實驗室先前的研究結果得知，正中神經截斷後楔狀神經核中所表現的神經胜肽 Y 免疫反應陽性的神經纖維，主要是由背根神經元所產生並由初級感覺神經(primary afferent terminal) 投射至楔狀神經核 (Tsai et al., 2007)。而背根神經元在正中神經損傷後開始表現神經胜肽 Y 的原因，可能是過度的異位性放電傳入(Munglani et al., 1995) 或是背根神經元過度去極化 (Rao et al., 1992)所造成。上一部份的研究已經證實術前給予 lidocaine 局部麻醉處理，可以有效的隨劑量增加而抑制傷害異位性放電，但是抑制傷害性異位放電後對正中神經截斷後楔狀神經核中形態學上的影響仍不是很清楚。本部份的研究希望釐清在術前同樣給予局部麻醉劑處理，對於正中神經截斷後楔狀神經核中神經胜肽 Y 免疫反應陽性的神經纖維與 c-Fos 免疫反應陽性的神經元在形態學上是否會有所影響。

材料方法

本實驗經由國科會與台大醫學院暨公衛學院動物實驗小組審查與核准（核准編號：IACUCA Approval No. 20030114），實驗動物倫理則依據國際疼痛研究學會（International Association for the Study of Pain）Zimmermann 於 1983 年所發表的內容。動物飼養於日夜各１２小時循環的環境並提供充足的食物及飲

水。

一、 術前局部麻醉與正中神經截斷的動物模式

本實驗以雄性大白鼠作為實驗材料（Sprague-Dawley 品系），體重約在 176-200 公克之間，控制組（假手術，三隻）、生理食鹽水實驗組(四隻)、術前局部麻醉處理實驗組(1%、5%與 10% lidocaine 組各五隻)，總共 22 隻。進行兩側正中神經術前麻醉處理與截斷，方法依前部分實驗部驟二，手術後讓所有組別的動物存活 4 週。

二、 電刺激

動物存活 4 週之後以 7%水合氯醛麻醉，將右側正中神經在手術顯微鏡下操作再次游離出來並掛於電極鈎上，下方襯以石蠟紙以避免電極鈎接觸到神經以外的組織，再以石蠟油浸潤神經以避免乾燥。電刺激輸出依照 Molander 等學者所提出（1992,1994）激發 A 神經纖維強度，由刺激器（S88 DUAL OUTPUT SQUARE PULSE STIMULATOR, USA）產生電流經過穩流器（CCU1 CONSTANT CURRENT UNIT, USA）再連接到電極鈎以 10Hz、0.1ms、0.1mA 進行 10 分鐘。刺激完畢後兩小時再次以水合氯醛麻醉接著犧牲灌流。

三、 灌流固定

實驗動物在 7%水合氯醛麻醉下灌流犧牲，將胸腔打開後先以 100ml Ringer’s solution（內含抗凝血劑：sodium citrate, 0.02gram/kg 與血管擴張劑：sodium nitrite, 0.02gram/kg）由左心室灌流清洗血液，接著以固定液

(4% paraformaldehyde in 0.1M phosphate buffer, pH=7.4) 進行固定。取出腦幹包含楔狀神經核的區域，再以相同固定液後固定兩小時。接著將組織進行蔗糖抗凍處理，先放入含有 10%蔗糖與 5%甘油的磷酸緩衝溶液 (0.1M pH7.4)於 4℃冰箱中過夜，再換入含有 30%蔗糖與 10%甘油的磷酸緩衝溶液(0.1M,pH=7.4) 保存於 4℃冰箱中至少 12 小時或待組織下沉至底部。

四、 抗神經胜肽 Y 與 c-Fos 免疫組織化學反應

將蔗糖抗凍處理過後的腦幹組織以冷凍切片機 (Leica, Nussloch, Germany)切成 30μm 厚度的薄片，楔狀神經核中段區域定義為 obex 往尾端推算 0.3-0.7 mm 的區域 (Maslany et al., 1991; Day et al., 2001; Lue et al., 2002; Tsai et al., 2004, 2008) 在楔狀神經核中段區域每四片取一片分別進行抗神經胜肽 Y 或 c-Fos 免疫組織化學反應，步驟如下：

.1. 以含 1% 硼氫化鈉(Sodium Borohydride, Sigma, S-9125, St Louis, USA) 的磷酸緩衝溶液 (0.1M,pH=7.4) 處理 20 分鐘。

2. 以磷酸緩衝溶液 (0.1M,pH=7.4) 清洗三次，每次 10 分鐘。

3. 以含 0.5% H_2O_2 的酸緩衝溶液 (0.1M,pH=7.4) 處理 30 分鐘。

4. 以磷酸緩衝溶液 (0.1M,pH=7.4) 清洗三次，每次 10 分鐘。

5. 為避免非專一性反應發生，以含有 5% 羊血清 (normal goat serum GibcoBRL, NY, USA) 與 0.2% Triton-X 100 的酸緩衝溶液 (0.1M,pH=7.4)進行遮蓋處理。

6. 以抗神經胜肽 Y (1:2000, 4℃, 16 小時, DiaSorin, MN, USA) (Tsai et al., 2004, 2007, 2008) 或抗 c-Fos (1:2000, 4℃, 48 小時, Calbiochem, San Diego, CA) (Day et al., 2001; Lue et al., 2002; Tsai et al. 2008) 初級抗體進行免疫反應。

7. 以磷酸緩衝溶液 (0.1M, pH=7.4) 清洗六次，每次 10 分鐘。

8. Biotinylated goat anti-rabbit IgG 次級抗體(1:200, Vector, Burlingame, CA) 以步驟 5 之遮蓋反應溶液稀釋後室溫下反應 2 小時。

9. 以磷酸緩衝溶液 (0.1M, pH=7.4) 清洗三次，每次 10 分鐘。

10. 以 avidin-biotin-HRP complex (1:200, ABC kit, Vector) 室溫下反應 1 小時。

11. 以磷酸緩衝溶液 (0.1M, pH=7.4) 清洗三次，每次 10 分鐘。

12. 清洗完畢後以 Vector SG Kit chromogen and substrate regent 進行呈色反應。

13. 呈色完畢以磷酸緩衝溶液 (0.1M, pH=7.4) 清洗三次，每次 10 分鐘。

14. 將切片以 1%的動物明膠 (gelatin) 溶液依順序貼於載玻片上，靜置乾燥一晚。

15. 切片經脫水、蓋片後於光學顯微鏡下觀察

五、神經胜肽 Y 免疫反應陽性纖維與 c-Fos 免疫反應陽性神經元定量分析

蓋片完成的組織切片使用 Zeiss 光學顯微鏡觀察，並在 200 倍放大倍率下使用數

位相機（D1X; Nikon, Tokyo, Japan）擷取影像。影像以電腦影像分析系統（computer-based image analysis system, MGDS）與影像分析軟體 Image Pro-Plus software（Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA）進行分析與定量。我們分別計算楔狀神經核所佔區域的面積與神經胜肽 Y 免疫反應陽性纖維在楔狀神經核中面積之總和,後者除以前者便得到神經胜肽 Y 免疫反應陽性纖維在楔狀神經核中面積所佔之百分比(圖 2-2)(Tsai et al., 2004, 2009)。 而神經胜肽 Y 免疫反應陽性纖維在楔狀神經核平均面積所佔之百分比以二因子變異數分析（two-way ANOVA)，分別比較各術前組間與各組之內（電刺激側與未電刺激側）是否存在差異，並以進行 Newman-Keuls post-hoc test 測試(圖 2-2)。 c-Fos 免疫反應陽性神經元的計算方式是以每隻動物組織切片中所計算到的 c-Fos 免疫反應陽性神經元總數除以切片數目，得到平均切片之 c-Fos 免疫反應陽性神經元數(圖 2-4)。因為 c-Fos 免疫反神經元只會在電刺激側的楔狀神經核中表現，因此使用單因子變異數分析（one-way ANOVA）比較術前各組間的差異。 而為了瞭解楔狀神經核中 c-Fos 免疫反應陽性神經元的表現是否與神經胜肽 Y 免疫反應陽性纖維有所相關，我們將電刺激後神經胜肽 Y 免疫反應陽性纖維減少的百分比(未電刺激側所佔面積之百分比減掉電刺激側所佔面積之百分比)與 c-Fos 免疫反應陽性神經元的平均數目進行線性迴歸分析(linear regression)（圖 2-5)。

結果

雙因子變異數分析結果顯示,神經胜肽 Y 免疫反應陽性的神經纖維在楔狀神經核中所佔面積百分比在各組別間（$F=177.9$, $P<0.0001$）與各組別內（電刺激

與未給予電刺激)(F=216.3, P<0.0001) 均存在顯著差異。神經胜肽 Y 免疫反應陽性的神經纖維在控制組中無論有無給予電刺激都幾乎無法偵測到(0.1±0.01%，圖 2-1A-B 和 圖 2-2) 。在術前給予生理食鹽水處理的組別中神經胜肽 Y 免疫反應陽性的神經纖維佔楔狀神經核面積百分比在電刺激同側(16.3±0.6%)或是未電刺激側(35.6±1.1%)的楔狀神經核都明顯增加(圖 2-1C-D 和 圖 2-2)。神經胜肽 Y 免疫反應陽性的神經纖維佔楔狀神經核面積百分比在術前給予 lidocaine 處理後於未電刺激側 (pre-1% lido： 25.0±1.7%; pre-5% lido：19.6±0.6%; and pre-10% lido：11.3±1.0%) 與電刺激側(pre-1% lido：9.6±0.7%; pre-5% lido：6.4±0.5%; and pre-10% lido： 5.6±1.1%) 相較於生理食鹽水實驗組則隨 lidocaine 處理濃度提高而降低 (圖 2-1E-J 和圖 2-2)。而在各術前實驗組中電刺激側的神經胜肽 Y 免疫反應陽性陽性神經纖維在楔狀神經核中所佔面積百分比(圖 2-1C, E, G, I 和圖 2-2)都顯著低於未電刺激的對側(圖 2-1D, F, H, J 和圖 2-2) 。

c-Fos 免疫反應陽性神經元在正中神經未受損傷的控制組無論有沒有電刺激在楔狀神經核中幾乎都無法偵測其表現 (圖 2-3A 和圖 2-4)。而在正中神經截斷的各術前麻醉實驗組 c-Fos 免疫反應陽性神經元在電刺激側的楔狀神經核都有明顯的表現，且主要分布於楔狀神經核中段腹側區域。術前麻醉處理 5% (34.8±2.7 cells) 和 10% lidocaine (23.8±1.4 cells) 都能明顯的降低 c-Fos 在楔狀神經核中的表現量，但是 1% lidocaine 實驗組 (68.8±2.3 cells) 相較

於生理食鹽水實驗組（72.3±2.6 cells，圖 2-4）則沒有顯著的差異。

而為了探討楔狀神經核中 c-Fos 的表現是否為因電刺激受損傷的正中神經造成楔狀神經核中神經胜肽 Y 釋放所誘發，我們將每隻動物 c-Fos 免疫反應陽性神經元數目與神經胜肽 Y 因電刺激所減少的百分比(未電刺激側的神經胜肽 Y 百分比減去電刺激側的神經胜肽 Y 百分比）進行線性迴歸分析，結果發現 c-Fos 免疫反應陽性神經元數目與電刺激所減少神經胜肽 Y 百分比呈顯著正相關（r = 0.77, P<0.05，圖 2-5)。

討論

正中神經截斷後四週在截斷神經同側的楔狀神經核中可發現大量神經胜肽Y免疫反應陽性纖維表現，但在控制組則無發法偵測到神經胜肽Y免疫反應陽性纖維。這樣的結果與我們實驗室先前的研究相同（Tsai et al., 2004, 2007; Yeh et al., 2008)。而楔狀神經核中神經胜肽Y免疫反應陽性纖維的來源，全部是由受損傷的中、大型背根神經元所產生，再經由初級感覺神經（primary afferent fiber）投射至同側的楔狀神經核（Tsai et al., 2007)。至於背根神經元為何會表現神經胜肽Y則還沒有很明確的定論，但經由一些相關研究或許可以加以解釋。早期關於神經細胞表現神經胜肽Y的研究，是在 1992 年由Rao等人提出，他們發現使用交感神經元（sympathetic neurons）進行細胞培養，若是提高鉀離子濃度促使神經細胞產生去極化的反應（depolarization)，則細胞中的神經胜肽Y表現量就會增加。而之後的研究也指出使用MK-801 來抑制神經損傷後所產生的傷害性放電，可

以減少脊髓背角內神經胜肽Y免疫反應陽性纖維的數量(Munglani, 1995)。因此傷害異位性放電的傳入可能是背根神經元神經胜肽Y的重要因素。我們本部分的實驗證實了，術前給予局部麻醉劑處理可以有效的抑制神經截斷所引起的傷害性異位放電，同時也能減少楔狀神經核中神經胜肽Y免疫反應陽性纖維所占面積百分比，這樣的結果符合前面所假設背根神經元表現神經胜肽Y是由於傷害性異位放電大量傳入所造成。我們另外也觀察到電刺激截斷的正中神經會使得同側楔狀神經核中神經胜肽Y免疫反應陽性纖維所占面積百分比下降，我們先前的研究也指出電刺激可能促使神經胜肽Y由神經纖維中釋放，進而促使c-Fos在楔狀神經核中表現(Tsai et al., 2008)。

在本實驗中我們也發現，術前給予局部麻醉劑處理可隨劑量增加而減少楔狀神經核中 c-Fos 免疫反應陽性神經元的數量。有許多研究也指出傷害性異位放電會誘發脊髓背角中的 c-Fos 免疫反應陽性神經元，而以 lidocaine 前處理抑制傷害性異位放電也可減少脊髓背角中的c-Fos 免疫反應陽性神經元的數量 (Feng et al., 2002; Sun et al., 2004; Stenberg et al., 2005)，但 lidocaine 前處理抑制傷害性異位放電以減少脊髓背角中的 c-Fos 免疫反應陽性神經元表現的時效大約只能在傷害後維持兩天 (Chi et al., 1993; Sun et al., 2004)。 在本實驗中術前給予局部麻醉劑處理減少楔狀神經核中 c-Fos 免疫反應陽性神經元表現的效果可維持到神經截斷後四週；在此同時，術前給予局部麻醉劑處理減少楔狀神經核中神經胜肽 Y 免疫反應陽性纖維的時效也可維持至神經截斷後四週。線性

迴歸分析也指出 c-Fos 免疫反應陽性神經元數目與電刺激所減少神經胜肽 Y 百分比呈顯著正相關，因此楔狀神經核中 c-Fos 免疫反應陽性神經元可能是由電刺激所釋放的神經胜肽 Y 誘發，但是否真如我們所假設仍需更直接的實驗數據來支持。

第四章 大白鼠正中神經截斷後楔狀神經核內神經胜肽 Y 與 c-Fos 表現量之相互關係

前言

我們已經證實，術前給予局部麻醉劑處理可以有效的抑制傷害性異位放電的產生；且在正中神經截斷四週後，隨 lidocaine 濃度增加而減少楔狀神經核中神經胜肽 Y 免疫反應陽性纖維與 c-Fos 免疫反應陽性神經元表現的數量。先前學者在形態方面的研究結果，可得知脊髓背角中神經胜肽 Y 免疫反應陽性纖維有圍繞在 c-Fos 免疫反應陽性神經元周圍的現象 (Minson et al., 2002)。而在大腦側腦室 (Intracerebroventricular) 中直接給予神經胜肽 Y，也會誘發腦室周圍核區 (paraventricular nucleus) 大量表現 c-Fos 免疫反應陽性神經元 (Li et al., 1994; Lambert et al., 1995)。除此之外，Yang 等人 (1995) 在與楔狀神經核同樣位於腦幹的孤立束神經核給予神經胜肽 Y，結果有誘發孤立束神經核中大量表現 c-Fos 免疫反應陽性神經元表現。相當多的研究指出 c-Fos 免疫反應陽性神經元的表現是受神經胜肽 Y 所誘發，可是我們仍想釐清，楔狀神經核中 c-Fos 免疫反應陽性神經元是否直接受神經胜肽 Y 所誘發。

由於前部分的實驗已知正中神經截斷後楔狀神經核中會有大量神經胜肽 Y 免疫反應陽性纖維表現；而在給予電刺激後，同側楔狀神經核中神經胜肽 Y 免疫反應陽性纖維則會因電刺激而減少。因此，我們在電刺激前給予大白鼠神經胜肽 Y 受體拮抗劑處理，來檢測 c-Fos 免疫反應陽性神經元是否直接受經胜肽 Y 所誘發。

材料方法

本實驗經由國科會與台大醫學院暨公衛學院動物實驗小組審查與核准 （核准編號：IACUCA Approval No. 20030114)，實驗動物倫理則依據國際疼痛研究學會（International Association for the Study of Pain）Zimmermann 於 1983 年所發表的內容。動物飼養於日夜各１２小時循環的環境並提供充足的食物及飲水。

一、 正中神經截斷的動物模式

本實驗以雄性大白鼠作為實驗材料（Sprague-Dawley 品系），體重約在 176-200 公克之間共 10 隻。進行單側正中神經截斷，方法依第二章實驗步驟二，手術後讓所有組別的動物存活 4 週。

二、 神經胜肽 Y 受體拮抗劑注射

大白鼠單側正中神經截斷四週後以 7%水合氯醛麻醉，之後架設於立體定位儀上先割開後頸的皮膚，接著將以骨鉗撥除腦幹上方的枕骨。下方的硬腦膜以眼科剪小心剪開避免傷害腦幹，待腦幹與部分第四腦室暴露出來後使用立體定位儀依 Pellegrino 等人所描述(1979)，於 AP, ML, H: -6.4, 1.4, -6.4 (System A) 的位置經由顯微注射玻璃針於楔狀神經核吻端 (rostral portion) 分別注射 1 ul 2%的神經胜肽 Y 受體拮抗劑 (n=4, [D-Tyr27, 36 D-Thr32]-NPY (27-36); Sigma, St. Louis, MO, USA) (Myers et al., 1995) 或是生理食鹽水(n=3)。利用擴散方式作用中段區域 30 分鐘後進行電刺激，兩小時後犧牲灌流。另外額外一組注射生理食鹽水後不進行電刺激直接犧牲灌流 (n=3)。

三、 電刺激

神經胜肽 Y 受體拮抗劑(n=4)或是生理食鹽水(n=3)注射 30 分鐘後，進行電刺激。方法如第三章步驟二所述。

四、 灌流固定

方法如第三章步驟三所述。

五、 抗神經胜肽 Y 與 c-Fos 免疫細胞化學反應

方法如第三章步驟四

六、c-Fos 免疫反應陽性神經元定量分析

定量步驟如第三章步驟五，c-Fos 免疫反應陽性神經元在注射神經胜肽 Y 受體拮抗劑或是注射生理食鹽水的組別以 Student’s t-test 進行分析(圖 3-2)

結果

正中神經截斷四週後，楔狀神經核中神經胜肽Y免疫反應陽性纖維與c-Fos免疫反應陽性神經元的數量，因電刺激與否及是否注射神經胜肽Y受體拮抗劑而有所不同 (圖3-1)。在注射生理食鹽水但沒有電刺激的組別可偵測到大量神經胜肽Y免疫反應陽性纖維，但偵測不到c-Fos免疫反應陽性神經元的表現(圖3-1A,B)。注射生理食鹽水之後電刺激的組別(圖3-1C,D)，神經胜肽Y免疫反應陽性纖維相較於未電刺激的組別明顯下降，而且 c-Fos免疫反應陽性神經元也大量表現。注射神經胜肽Y受體拮抗劑之後進行電刺激的組別(圖3-1E,F)，神經胜肽Y免疫反應陽性纖維因電刺激而明顯減少，但c-Fos免疫反應陽性神經元表現的數量較注射生理食鹽水之後電刺激的組別少。將c-Fos免疫反應陽性神經元進行定量分析，結果顯示注

射神經胜肽Y受體拮抗劑的組別（27.9±2.9 cells，圖3-2）楔狀神經核中c-Fos免疫反應陽性神經元的表現量，顯著低於注射生理食鹽水之後電刺激的組別(66.8±2.7 cells，圖3-2)。

討論

我們可以由結果得知，楔狀神經核中c-Fos免疫反應陽性神經元的表現是由電刺激後所釋放的神經胜肽Y經由其受體的作用而誘發。藉由阻斷神經胜肽Y受體的作用，可以避免神經胜肽Y釋放後所誘發的c-Fos免疫反應陽性神經元表現。

神經胜肽Y受體屬於G-protein coupled receptor，在與神經胜肽Y結合後其 β subunit 會活化下游的Protein lipase C (PLC)，接著經由PKC、ERK路徑最後使得細胞產生c-Fos。之前學者研究神經胜肽Y與c-Fos免疫反應陽性神經元間的相互關係，大多直接給予神經胜肽Y來觀察是否可以因此誘發c-Fos免疫反應陽性神經元表現(Li et al., 1994; Lambert et al., 1995; Yang et al., 1995)。而本部分實驗使用神經胜肽Y受體拮抗劑來阻斷神經胜肽Y作用，進而達到減少c-Fos免疫反應陽性神經元的效果。本部分所選用的神經胜肽Y受體拮抗劑屬於非專一性的拮抗劑 (Myers et al., 1995)，無法選擇性地阻斷神經胜肽Y受體種類，因此無法分辨神經胜肽Y是經由興奮性受體 (NPY-Y2 receptor) 或是抑制性受體(NPY-Y1 receptor)的作用來誘發c-Fos表現。而最近的研究指出目前已有神經胜肽Y受體專一性的拮抗劑(1229U91, NPY-Y1 receptor antagonist, Nedungadi and Briski, 2010)(SF-22, NPY-Y2 receptor antagonist, Brothers et al., 2010)，

將來可使用以作更進一步探討神經胜肽Y的作用機轉。

第五章 術前給予局部麻醉劑對大白鼠正中神經慢性纏繞傷害動物模式神經病變疼痛行為之影響

前言

先前部分的實驗已得知，術前給予局部麻醉劑可有效的抑制傷害異位性放電的產生，並且可以減少正中神經截斷後楔狀神經核中神經胜肽 Y 免疫反應陽性纖維的數量。而楔狀神經核中 c-Fos 免疫反應陽性神經元又是因電刺激所釋放的神經胜肽 Y 所誘發，所以術前給予局部麻醉劑可藉由減少楔狀神經核中神經胜肽 Y 免疫反應陽性纖維的數量，而達到減少 c-Fos 免疫反應陽性神經元的作用。

楔狀神經核位於上肢感覺訊息傳遞的路徑上，可將感覺訊息上傳至對側丘腦(Andersen et al., 1964; Berkley et al., 1986; Day et al., 2001; Lue et al., 2002)。而楔狀神經核中表現的 c-Fos 被視為疼痛的神經指標 (Harris JA. 1998; Hunt SP. 1987)。除此之外，楔狀神經核中 c-Fos 免疫反應陽性神經元 78% 屬於會將訊息向上傳遞的 cuneothalamic projection neurons。綜合以上論點，推測術前給予局部麻醉劑可以減少疼痛訊息在正中神經截斷後經由楔狀神經核向上傳遞，但我們仍缺乏直接的數據證實，術前給予局部麻醉劑可以減緩神經損傷後所產生的神經病變疼痛 (neuropathic pain)。

因此我們選用了慢性纏繞傷害(chronic constriction injury, CCI)(Bennett and Xie 1988) 來進行實驗。

前人的研究指出，慢性纏繞傷害後 3 天會出現傷害異位性放電(Kajander and

Bennett, 1992)，並且持續到手術後 28 天(Xie et al., 2005)。動物實驗也證實術前給予 MK-801 (NMDA receptor antagonist, Munglani et al., 1999)、nociceptin (opioid receptor-like 1 receptor agonist) (Yamamoto et al., 2000) 或是 lidocaine (Jasmin et al., 1998; Sotgiu et al., 1995) 可減緩慢性纏繞傷害所造成的神經病變疼痛。在形態學方面的研究也指出，在神經傷害前給與 MK-801(Munglani et al., 1999)、nociceptin (Yamamoto et al., 2000)、 fentanyl (Nakamura and Takasaki, 2001) 或是 lidocaine (Chi et al., 1993; Feng et al., 2002; Sun et al., 2004 ; Stenberg et al., 2005) 可減少脊髓背角中 c-Fos 免疫反應陽性神經元的表現數量。但在正中神經慢性纏繞傷害模式中，減緩神經病變疼痛是否也是經由抑制傷害異位性放電產生，進而影響楔狀神經核中 c-Fos 免疫反應陽性神經元數量仍不是十分清楚。另一方面，楔狀神經核中 c-Fos 免疫反應陽性神經元表現的數量與動物神經病變疼痛行為是否相關 也有待釐清。

因此本部分實驗使用正中神經慢性纏繞傷害，並在纏繞傷害前給予術前局部麻醉處理來探討: (1)術前局部麻醉是否可以延遲或減緩機械刺激痛覺敏感 (mechanical allodynia) ；(2)正中神經慢性纏繞傷害存活四週後，給與電刺激並觀察電刺激前後神經異位性放電的情形；(3)術前局部麻醉對楔狀神經核中 c-Fos 免疫反應陽性神經元數量的影響；(4)以線性迴歸分析楔狀神經核中 c-Fos 免疫反應陽性神經元與機械刺激痛覺敏感間的相互關係。

材料方法

本實驗經由國科會與台大醫學院暨公衛學院動物實驗小組審查與核准 （核准編號：IACUCA Approval No. 20030114 and No. 20080267），實驗動物倫理則依據國際疼痛研究學會（International Association for the Study of Pain）Zimmermann 於 1983 年所發表的內容。動物飼養於日夜各１２小時循環的環境並提供充足的食物及飲水。

一、 術前局部麻醉與正中神經慢性纏繞傷害動物模式

本實驗以雄性大白鼠作為實驗材料（Sprague-Dawley 品系），體重約在 176-200 公克，實驗動物分為四組：第一組為控制組（假手術，三隻），第二到四組為術前局部麻醉實驗組（分別為：生理食鹽水、1%、5% lidocaine 實驗組，每組各五隻）。共 18 隻。術前局部麻醉方法依第二章 實驗部驟二 處理 15 分鐘後，進行單側正中神經慢性纏繞傷害，手術方式依照 Bennett 和 Xie 於 1988 年所發表的步驟。大致步驟如下: 將正中神經在肘窩的位置以手術方式與周圍組織游離，使用 4-0 型號的鉻化羊腸線（chromic gut）在游離的正中神經綁上四個鬆的結（以不壓迫神經為原則）（圖 4-1），接著縫合皮膚。手術後讓所有組別的動物存活四週。

二、 動物行為測試

行為測試的時間固定在每天 9:00-17:00，分別在手術前一天(-1)與手術後 3, 7, 14, 21, 28 天進行測試。機械刺激痛覺敏感使用 Von Frey filament (Somedic

Sales AB, Hörby, Sweden）進行測試，依 Tal 和 Bennett 1994 年所發表的步驟，包含 0.145, 0.32, 0.39, 1.1, 1.7, 3.3, 5.1, 8.3, 17 和 24 g 刺激克數連續增加的塑膠纖維，由最小克數開始逐漸增加強度。刺激大白鼠正中神經慢性纏繞傷害同側的前掌面五次，五次中有三次回縮反應的克數則認定為該動物機械刺激痛覺敏感的閥值。將同一實驗組的結果平均並以平均值± 標準差（mean ± S.E.M.）方式呈現，並以 Student’s *t*-test 對各測試時間點進行分析， $P < 0.05$ 則視為具有顯著差異。

三、 電刺激與紀錄複合式動作電位

在手術後第 29 天將動物以體重每 100 公克腹腔注射 0.45 毫升７％的水合氯醛（chloral hydrate）進行麻醉，之後進行電刺激並分別紀錄電刺激前後複合式動作電位。方法如第二章 步驟一與第三章 步驟二。

四、 灌流固定

方法如第三章 步驟三

五、 抗 c-Fos 免疫組織化學反應

方法如第三章 步驟四

六、 定量分析

動物行為測試完成後，將同一實驗組的結果平均。以平均值± 標準差（mean ± S.E.M.)方式呈現，並以 Student’s *t*-test 對各測試時間點不同組別進行分析，$P < 0.05$ 則視為具有顯著差異。

以 Xction View Data Acquisition System 分別收集各實驗組電刺激前後 5 分鐘複合式動作電位的電生理紀錄。之後以 Xction view software 計算各組的複合式動作電位次數並除以時間，得到各實驗組不同時間點的放電頻率(frequency)並以平均值 ± 平均值之標準差(mean ± SEM)方式呈現（表 4-1)。為比較不同實驗組以及不同時間點之間的差異，數據以 two-way ANOVA 與 Newman-Keuls post-hoc test 進行分析，P<0.05 則認定為具有顯著差異(圖 4-4)。

c-Fos 免疫反應陽性神經元定量分析步驟如第三章 步驟五，c-Fos 免疫反應陽性神經元在各術前麻醉實驗組的平均數值以平均值± 標準差（mean ± S.E.M.）方式呈現，並使用使用單因子變異數分析（one-way ANOVA）進行分析，P<0.05 則認定為具有顯著差異(圖 4-6)。

為釐清楔狀神經核中 c-Fos 免疫反應陽性神經元與機械刺激痛覺敏感間的相互關係，我們將動物 c-Fos 免疫反應陽性神經元數量與機械性刺激閾值(以 10 為底取對數）使用線性迴歸分析，P<0.05 則認定為具有顯著相關(圖 4-7)。

結果

行為測試的結果顯示，手術前一天各實驗組間沒有顯著的差異，而控制組在整個實驗過程的 28 天中，機械刺激閾值也沒有明顯變化（圖 4-2)。但生理食鹽水處理的組別，機械性刺激的閾值由手術前（18.4±1.4 g）至手術後三天便明顯的下降（0.75±0.20 g)，並持續製 28 天。顯示慢性纏繞傷害造成了機械性刺激痛覺敏感，然而術前給予局部麻醉劑處理，有效地隨劑量增加而延遲或減緩機械性刺

激痛覺敏感的發生(圖 4-2)。

在手術後第 29 天，我們將正中神經再次游離出來進行電刺激並紀錄複合式動作電位在電刺激前後 (pre-ES 和 post-ES)的變化(表 4-1, 圖 4-3)。二因子變異數分析(two-way ANOVA) 顯示，在各實驗組之間 (F=47.98, P<0.0001) 與電刺激前後 (F=15.09, P<0.05) 都存在顯著的差異。控制組在電刺激前後都沒有明顯的異位性放電(圖 4-3A)，但在其他進行慢性纏繞傷害的組別，電刺激前後都有異位性放電的產生(圖 4-3, B-D)。相較於生理食鹽水實驗組，術前給予局部麻醉劑處理有效的隨劑量增加而降低異位性放電的產生(圖 4-4)。 而比較電刺激前後的放電情形，可以發現除了控制組，所有的組別在電刺激後(post-ES)異位性放電都有明顯高於電刺激前(pre-ES)的現象(表 4-1)。

楔狀神經核中 c-Fos 免疫反應陽性的神經元在控制組幾乎無法偵測到，在生理食鹽水實驗組卻可發現大量的表現(圖 4-5)。術前給予局部麻醉劑處理後，c-Fos 免疫反應陽性的神經元表現量有降低的趨勢。定量分析結果顯示，c-Fos 免疫反應陽性的神經元在生理食鹽水實驗組 (42.9±2.8 cells)顯著高於其他組別(control: 0, pre-1% lido: 26.6±1.6 cells; pre-5% lido: 18.5±1.4 cells)，並隨劑量增加而降低 c-Fos 免疫反應陽性的神經元的表現量(圖 4-6)。

線性迴歸分析的結果顯示，楔狀神經核中 c-Fos 免疫反應陽性神經元的表現量與機械性刺激閥值呈顯著負相關 (圖 4-7, r = 0.59, P<0.05)。

討論

這個部分的實驗結果可以得知，正中神經慢性纏繞傷害後會產生機械性刺激痛覺敏感並持續至少 28 天，而機械性刺激痛覺敏感可藉由術前局部麻醉劑處理來達到延遲或是減緩的效果。Sotgiu等人在 1995 年發表的文章指出，先用lidocaine進行術前局部神經麻醉，再對坐骨神經施予慢性纏繞傷害，可以有效減緩熱痛覺敏感(thermal hyperalgesia)的現象，並且效果至少可以持續三週。 雖然lidocaine處理的位置與行為測試的種類有所不同，但是依然可以支持術前局部麻醉處理對神經病變疼痛有長期緩解的效果。然而，也有文獻指出在脊神經緊束傷害(spinal nerve ligation)的模式(Abdi et al., 2000) 術前使用lidocaine局部麻醉，僅能使機械性刺激痛覺敏感緩解 24 小時。這樣的差異可能是由於傷害程度(慢性纏繞傷害僅造成部分傷害；而脊神經緊束傷害造成脊神經全部損傷)或是使用lidocaine濃度不同(2% vs. 5%)所造成。

慢性纏繞傷害 29 天後，除了控制組，所有的實驗組都有異位性放電的產生，但術前局部麻醉劑處理後異位性放電的情形明顯的被抑制。異位性放電被認為是造成神經病變疼痛的重要因子(Woolf, 1993)，而抑制異位性放電傳入脊髓則可減緩神經病變疼痛 (Yoon et al., 1996)。因此，本部分實驗經由術前局部麻醉處理減緩機械性痛覺敏感，或許是藉由抑制慢性纏繞傷害所產生的異位性放電所達成。

這部分的實驗也證實了在慢性纏繞傷害四週後，楔狀神經核中 c-Fos 免疫反

應陽性神經元的表現量也可藉由術前局部麻醉處理達到減少的效果。這樣的結果也十分類似於我們先前的研究 (Lin et al., 2009)，而 c-Fos 免疫反應陽性神經元雖然被視為疼痛的神經指標 (Harris JA. 1998; Hunt SP. 1987)，先前學者的實驗主要是給予傷害性刺激後，觀察到脊髓背角會有大量的 c-Fos 免疫反應陽性神經元表現，因此認為 c-Fos 的表現與痛覺相關，但 c-Fos 免疫反應陽性神經元在更高層的感覺傳遞路徑上是否也能同樣代表痛覺則不是十分明確。我們在這部分實驗中利用線性迴歸分析也證實了，楔狀神經核中 c-Fos 免疫反應陽性神經元表現的數量與機械性刺激閾值(機械性痛覺敏感的指標)呈顯著負相關，也就是說當楔狀神經核中 c-Fos 免疫反應陽性神經元表現越多時，機械性痛覺敏感就越嚴重。而日後或許可以利用楔狀神經核中 c-Fos 的數量，作為評估正中神經損傷後對機械性刺激痛覺敏感的指標。

Part 2. 誘發糖尿病對大白鼠正中神經截斷後之影響。

中文摘要

在本研究中，我們利用鏈佐菌素（streptozotocin，STZ）誘導的糖尿病大白鼠來檢測正中神經截斷對神經胜肽 Y（NPY）在背根神經節（DRG）與楔狀神經核（cuneate nucleus，CN）中表現的影響。在糖尿病組無法偵測到神經胜肽 Y 免疫反應，但在糖尿病合併正中神經截斷後，背根神經節與楔狀神經核中分別可以偵測到大量的神經胜肽 Y 免疫反應陽性神經元與神經纖維。除此之外，糖尿病合併正中神經截斷(DMNT)，神經胜肽 Y 在背根神經節與楔狀神經核中的表現趨勢十分一致，都是在正中神經截斷後兩週達到最高峰。

在電刺激截斷正中神經之後，同側楔狀神經核中的神經胜肽 Y 免疫反應纖維會減少並出現大量的 c-Fos 免疫反應神經元。c-Fos 免疫反應神經元在糖尿病合併正中神經截斷後楔狀神經核中表現量同樣在兩週達到高峰，與神經胜肽 Y 免疫反應纖維在楔狀神經核中的表現趨勢相同。但這樣的結果與我們實驗室先前所發表，非糖尿病大白鼠背根神經節中神經胜肽 Y 免疫反應陽性神經元，楔狀神經核中神經胜肽 Y 免疫反應陽性神經纖維與 c-Fos 免疫反應陽性神經元，在正中神經截斷後四週達到高峰，有顯著的差異。

接著我們分析神經滋養素-3 在正中神經截斷後背根神經節中表現的情形，非糖尿病大白鼠背根神經節中，神經滋養素-3 免疫反應陽性神經元

(neurotrophin-3 like immunoreactivity neurons，NT-3-LI neurons)所占百分比在正中神經截斷後開始降低，並在正中神經截斷後四週達到最低點。而糖尿病大白鼠背根神經節中，神經滋養素-3 免疫反應陽性神經元所占百分比在正中神經截斷後也開始下降，但所占百分比最低點提前於正中神經截斷後兩週，之後開始逐漸回升。緊接著我們選定非糖尿病與糖尿病大白鼠，正中神經未截斷與正中神經截斷後神經滋養素-3 免疫反應陽性神經元所占百分最低的時間點(非糖尿病四週 糖尿病兩週)，以免疫螢光雙重標誌方式分析神經滋養素-3 免疫反應陽性神經元在背根神經節中細胞大小分佈的情形，結果發現正中神經截斷後無論在非糖尿病或是糖尿病組，神經滋養素-3 免疫反應陽性在中大型的神經元(A-type) 所佔比例均顯著下降。我們先前的研究已指出神經胜肽 Y 在背根神經節中只會在中大型的神經元表現，而是否因為神經截斷後神經滋養素-3 免疫反應陽性神經元佔中大型神經元比例下降而誘發神經胜肽 Y 在背根神經節中大量表現？是我們下一步需要釐清的。我們使用螢光雙重標示偵測正中神經截斷四週、糖尿病正中神經截斷兩週在背根神經節中神經滋養素-3與神經胜肽Y是否會雙重標誌於背根神經元，結果發現只有極低比例的背根神經元現神經滋養素-3與神經胜肽Y雙重標誌。

綜合以上結果，我們可以推測在糖尿病大白鼠正中神經截斷後，背根神經節中神經胜肽 Y 免疫反應陽性神經元提早大量表現，或許是因為誘發糖尿病後神經滋養素-3 在背根神經節中中大型神經元表現量下降所導致。

ABSTRACT

In this study we examined the temporal changes in neuropeptide Y (NPY) expression in dorsal root ganglion (DRG) neurons and cuneate nucleus (CN) in streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats with or without median nerve transection (MNT). Numerous NPY-like immunoreactive (NPY-LI) neurons and fibers were detected in the DRG and CN in the diabetic MNT (DMNT) rats respectively, but not in those with diabetes alone. Following MNT, the time-course of NPY expression pattern in the diabetic DRG and CN was similar and both peaked at 2 weeks, which was earlier than that in the non-diabetic MNT rats. Consequently, the expression of neurotrophin-3 (NT-3) immunoreactivity in DRG neurons was coincidentally decreased and reached the nadir at 2 weeks in the diabetic MNT rats, which was also earlier than that in the non-diabetic MNT rats. Following electrical stimulation of the transected nerve, the number of NPY-LI fibers became attenuated and the induced c-Fos-LI cells concurrently appeared in the ipsilateral CN. In the diabetic CN, the number of c-Fos-LI cells also peaked at 2 weeks after MNT, which was consistent with the temporal pattern of changes in NPY expression. The results suggest that in diabetes, MNT induced NPY expression via the reduction of NT-3, and electrical stimulation of the injured median nerve evoked the release of NPY and accordingly more c-Fos-LI cells were identified in the CN. Furthermore, this study demonstrated

early NPY and c-Fos expression in the diabetic rats after MNT, suggesting that the development of neuropathic signs may be advanced in hyperglycemic rats.

第六章 大白鼠誘發糖尿病合併正中神經截斷神經胜肽 Y 與 c-Fos 在不同存活時程的表現情形

前言

糖尿病神經病變是一種在已開發國家十分普遍的周邊神經病變，目前實驗動物模式大都是以注射 streptozotocin (STZ)，破壞胰臟中的 β 細胞使得胰島素無法生成，造成類似糖尿病病人的高血糖症狀(Schein et al., 1971)。STZ 誘發糖尿病的大白鼠，在誘發四週後會類似糖尿病患者對溫熱覺或是輕觸覺的痛覺過敏 (hyperalgesia and allodynia) (Stevens et al., 1994)。然而 STZ 誘發的糖尿病大白鼠卻不會像糖尿病患一樣出現軸突萎縮 (axonal atrophy)、髓鞘損傷 (demyelination) 或是神經數目減少 (loss of nerve fibers) 等，因高血糖所引發的週邊神經損傷 (Yasuda et al., 1989; Zochodne, 2001)。因此，我們試圖使用 STZ 誘發糖尿病合併給予正中神經截斷，以更接近人類因糖尿病所引起的神經病變。

本實驗室先前的研究指出，正中神經損傷後會在損傷側的背根神經節與楔狀神經核中大量表現神經胜肽 Y，但在未受神經損傷的對側背根神經節與楔狀神經核中便則偵測不到神經胜肽 Y (Tsai et al., 2004, 2007)。 這些神經損傷後在楔狀神經核中所表現的神經胜肽 Y 免疫反應陽性纖維的來源，主要是受損傷的背根神經元經由初級感覺神經所投射 (primary afferent fibers) (Tsai et al., 2007)。 若是對受損傷的正中神經施予電刺激，則可在同側楔狀神經核中偵測到

大量的 c-Fos 免疫反應陽性神經元，而這些 c-Fos 免疫反應陽性神經元 78% 屬於會將訊息往丘腦向上傳遞的 cuneothalamic projection neurons (Day et al., 2001; Lin et al., 2009; Lue et al., 2002)。脊髓背角中表現的 c-Fos 被認為是神經受到興奮，並且為痛覺的神經標示 (Hunt et al., 1987; Harris, 1998)。超微結構方面的研究也指出，神經胜肽 Y 免疫反應陽性神經纖維的軸突會與楔狀神經核中投射至丘腦的神經元樹突形成突觸聯結 (Yeh et al., 2008)。綜合以上幾點，損傷所誘發的神經胜肽 Y 可能誘發 cuneothalamic projection neurons 表現 c-Fos 蛋白，可能與神經病變疼痛經由丘腦向上傳遞相關。相當多前人的研究也指出神經胜肽 Y 會使神經損傷所造成的神經病變疼痛加劇 (Ossipov et al., 2002; Taylor et al., 2007; Tsai et al., 2009)。

在這部份的實驗我們首先希望釐清，在糖尿病或糖尿合併正中神經節斷後，背根神經節與楔狀神經核中會不會誘發神經胜肽 Y？此外楔狀神經核中 c-Fos 免疫反應陽性的神經元，在糖尿病或糖尿合併正中神經截斷後是否會表現？

材料方法

本實驗經由國科會與台大醫學院暨公衛學院動物實驗小組審查與核准 （核准編號：IACUCA Approval No.20050199），實驗動物倫理則依據國際疼痛研究學會（International Association for the Study of Pain）Zimmermann 於 1983 年所發表的內容。動物飼養於日夜各１２小時循環的環境並提供充足的食物及飲

水。

一、 實驗動物準備

體重 176-200 克的大白鼠(Sprague-Dawley) 隨機分為三組：

組別一（控制組）： 大白鼠不進行任何神經損傷，直接對正常的正中神經進行電刺激(n=3)。

組別二（糖尿病組）： 大白鼠以 STZ 注射至外頸靜脈誘發糖尿病（65 mg/kg，Sigma, St Louis, MO, USA)。STZ 以 0.02M 檸檬酸鈉（sodium citrate，pH 4.5）配製。在注射後三天於尾靜脈採血測試血糖濃度（OneTouch II blood glucose monitoring system， LifeScan, Milpitas, CA, USA)，血糖濃度高於 15 mmol/L 則認為有誘發糖尿病，並用於實驗。在誘發糖尿病後存活至 9，10，11，12 週的時間點時，進行單側正中神經電刺激(每一時間點 n=3)。

組別三（糖尿病合併正中神經截斷)：大白鼠誘發糖尿病存活至第八週時進行正中神經截斷方法依第二章實驗部驟二，手術後存活 1，2，3，4 週，即對應前組的 9，10，11，12 週時間點(每個時間點 n=10)，每個時間點再分為給予電刺激(n=5)或是不給予電刺激(n=5)的組別。

二、 電刺激

除了有特別說明外，動物都進行電刺激，方法如第三章 步驟二。

三、 灌流固定

電刺激後兩小時進行灌流固定，方法如第三章 步驟三。

四、 組織製備

灌流過後收取含有楔狀神經核的腦幹、第六頸髓背根神經節與糖尿病合併正中神經截斷組不同存活週數的正中神經(距截斷處近心端 5mm 的位置，取 3mm 長度)。神經以鋨酸(Osmium tetroxide)後固定，之後以酒精梯度脫水，最後以樹脂(Epoxy resin) 包埋，包埋好的組織用超薄切片機(Reichert-Jung Ultracut E Ultramicrotome, Vienna, Austria)切成薄片(Semi-thin sections) 貼於玻片，最後以甲苯胺藍(toluidine blue)染色。

背根神經節以石蠟包埋，之後切成 7um 的薄片以六取一的方式貼於載玻片上，免疫反應前以二甲苯(xylene)脫蠟，接著水合(rehydrated)並以 0.01 M sodium citrate buffer (pH 6.0)，100°C 反應 7 分鐘進行抗原性還原(antigen retrival) (Milestone RHS-1 vacuum microwave，Milestone, Bergamo, Italy)。

腦幹組織經蔗糖抗凍處理(第三章 步驟三)後，以冷凍切片機 (Leica, Nussloch, Germany). 切成 30um 切片以四取一的方式進行後續的免疫染色。

五、 免疫細胞染色

背根神經節進行抗神經胜肽 Y 與抗神經滋養素-3 細胞化學反應，腦幹切片

進行抗神經胜肽 Y 與抗 c-Fos 免疫細胞化學反應，方法依第三章步驟四。

六、 定量分析

免疫細胞染色以 Zeiss light microscope + Nikon D1X 數位相機（Nikon, Tokyo, Japan）擷取影像。影像以電腦影像分析系統（computer-based image analysis system, MGDS）與影像分析軟體 Image Pro-Plus software (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA）進行分析與定量。

神經胜肽 Y 在背根神經節中所佔百分比，算法為神經胜肽 Y 免疫反應陽性細胞除以各背根神經節切片的細胞量。神經胜肽 Y 定量的結果以單因子變異數分析(one-way ANOVA)並進行 Newman-Keuls post hoc test（圖 5-4)。正中神經截斷後，神經胜肽 Y 和 c-Fos 在楔狀神經核中定量與統計方式依照第三章 步驟五(圖 5-6，5-8)。

結果

大白鼠誘發糖尿病後體重、血糖與神經之變化

在實驗剛開始時控制組（214.4±6.4 g）與糖尿病組（214.1±4.3 g）體重上沒有明顯的差異，在 STZ 注射三天後開始出現高血糖的現象(plasma glucose concentration > 15 mmol/L)，並持續到實驗結束。在飼養八週的時間點測試控制組體重增加為 425±6.0 g，血糖數值為 8.3±1.1 mmol/L。而糖尿病組體重為 304.4±9.0 g，同時高血糖持續維持(23.3±1.6 mmol/L)（圖 5-1)。 糖尿病組的神經與控制組沒有明顯的差異，都十分完整(圖 5-2A)，但在糖尿病合併神經截斷

的組別，可以觀察到許多退化的軸突內含深染物質(圖 5-2，B-D)。

糖尿病合併正中神經截斷後，背根神經節中神經胜肽 Y 的表現情形

神經胜肽 Y 免疫細胞化學染色的結果顯示，控制組和糖尿病組無論有沒有電刺激，在背根神經節與楔狀神核中都無法偵測到神經胜肽 Y 的免疫反應(圖 5-3A，圖 5-5A，B)。神經胜肽 Y 免疫反應陽性背根神經元只會出現在截斷正中神經的同側，而不會出現在神經未截斷的對側背根神經節。在糖尿病合併正中神經截斷 1-4 週的時程內，可偵測到大量的神經胜肽 Y 免疫陽性細胞在背根神經節中表現，而其表現似乎隨著神經截斷時程的不同而有所變化(圖 5-3)。定量結果顯示在神經截斷兩週後的平均神經胜肽 Y 免疫陽性背根神經元百分比為 33.2±2.6 %，顯著高於其他神經截斷的時間點(圖 5-4)。

糖尿病合併正中神經截斷後，楔狀神經核中神經胜肽 Y 的表現情形

而在楔狀神經核的部份，糖尿病組無論有沒有電刺激都幾乎偵測不到神經胜肽 Y (圖 5-5，A，B)，但糖尿病合併正中神經截斷後在截斷神經同側的楔狀神經核中則可發現神經胜肽 Y 的表現(圖 5-5，C-H)。而定量分析發現糖尿病動物楔狀神經核中神經胜肽 Y 所佔面積百分比在正中神經截斷後兩週達到最高峰(13.9±0.7%)，顯著高於其他神經截斷後的時間點 (圖 5-6)。相似於我們之前實驗的結果，電刺激後楔狀神經核中神經胜肽 Y 所佔百分比都低於未電刺激側(圖 5-5，D，F，H)。影像定量分析結果也顯示電刺激後楔狀神經核中神經胜肽 Y 所佔百分比在截斷後各時間點都低於未電刺激側(圖 5-6)。

糖尿病合併正中神經截斷後，楔狀神經核中 c-Fos 的表現情形

在糖尿病組給予電刺激或是糖尿病合併正中神經截斷不給予電刺激，楔狀神經核中都偵測不到c-Fos免疫反應陽性神經元(圖 5-7)。正中神經截斷後給予電刺激，同側楔狀神經核中便可發現大量的c-Fos免疫反應陽性神經元(圖 5-7，B-D)，而定量分析的結果顯示在糖尿病合併正中神經截斷後兩週，c-Fos免疫反應陽性神經元表現量顯著高於其他截斷後的時間點（平均數目=53.9±3.5）(圖 5-8)。

討論

本篇實驗的結果顯示，誘發糖尿病合併正中神經截斷後會引起初級感覺神經元與背柱神經核中大量表現神經胜肽 Y，十分類似於前人研究的結果（Ma and Bisby, 1998; 1999; Ohara et al., 1994; Tsai et al., 2004; Tsai et al., 2007; Wakisaka et al., 1991; Yeh et al., 2008; Zhang et al., 1993)。。Burnand (2004)與 Chottova Dvorakova (2008)等學者的報告也指出，在只有誘發糖尿病的狀況下，即使糖尿病時程長達 8 週在背根神經節中也不會偵測到神經胜肽 Y 的 mRNA 與蛋白。此外本篇報告也首先指出，在誘發糖尿病的大白鼠除了背根神經節外，在楔狀神經核中也無法偵測到神經胜肽 Y。

探討正中神經結構上的變化也發現，大白鼠誘發糖尿病在沒有額外神經傷害的情況下，並不會造成正中神經損傷。這樣的結果也和前人的研究一致（Thomas and Tomlinson, 1992; Yasuda et al., 1989; Zochodne, 2001）。我們實驗室最近的研究也證實，背根神經節中神經胜肽 Y 免疫反應陽性的神經元屬於中大型

且受到損傷的神經元，而非未受傷的神經元 (Tsai et al., 2007)。因此我們推測誘發糖尿病對背根神經元可能並沒有造成損傷，或者是損傷程度不足以引發神經胜肽 Y 表現。我們的結果也發現經胜肽 Y 免疫反應陽性背根神經元，在正中神經截斷後 1-4 週的時程內以兩週表現量最高，並且顯著高於其他時間點。趨勢與正中神經截斷後楔狀神經核中經胜肽 Y 免疫反應陽性神經纖維所佔面積百分比十分一致，都是在截斷後兩週達到高峰。在受損的神經給予電刺激，可在同側的核區中偵測到 c-Fos 免疫反應陽性神經元。 在誘發糖尿病合併正中神經截斷的動物模式中，楔狀神經核中 c-Fos 免疫反應陽性神經元表現量與神經胜肽 Y 免疫反應陽性神經纖維的表現時程十分一致，都是在神經截斷後 2 週達到高峰。

然而這樣的結果顯然與非糖尿病動物正中神經截斷後，神經胜肽 Y 與 c-Fos 的表現量在四週達到高峰有所不同(Lue et al., 2002；Tsai et al., 2004，2007)。雖然在前部份的實驗結果已經證實楔狀神經核中 c-Fos 的表現數量是受到神經胜肽 Y 所調控；但在糖尿病合併正中神經截斷後，神經胜肽 Y 在背根神經節與楔狀神經核中表現量高峰於神經截斷後兩週，相較於一般動物神經胜肽 Y 於背根神經節與楔狀神經核中表現量高峰於神經截斷後四週，明顯提早。

造成這樣差異的原因還不是很明確，但前人的研究發現誘發糖尿病後，周邊神經會產生異位性放電(Burchiel and Russell, 1985; Morgado and Tavares, 2007)，而我們前面第二章與第三章的實驗指出異位性放電極可能是神經胜肽 Y 生成的重要原因，而以術前麻醉減緩或抑制異位性放電則可減少神經胜肽 Y 在楔狀

神經核的表現 (Lin et al., 2009)。此外也有學者研究指出，周邊神經損傷所誘發神經胜肽 Y 可藉由額外給予神經滋養素-3 來加以抑制 (Ohara et al., 1995; Sterne et al., 1998)，因此在下個部份的實驗，我們想探討在誘發糖尿病與未誘發糖尿病動物正，神經滋養素-3 在正中神經截斷後的表現量變化。

第七章 大白鼠誘發糖尿病合併正中神經截斷後背根神經節中神經滋養素-3 在不同存活時程的表現情形。

前言

前部份的實驗結果證實，在誘發糖尿病合併正中神經截斷的動物模式中，楔狀神經核中 c-Fos 免疫反應陽性神經元表現量與神經胜肽 Y 在背根神經節與狀神經核中表現時程十分一致，都是在神經截斷後 2 週達到高峰。顯著早於非糖尿病動物正中神經截斷的組別（Lue et al., 2002；Tsai et al., 2004，2007）。研究指出，周邊神經損傷所誘發神經胜肽 Y 可藉由額外給予神經滋養素-3 來加以抑制（Ohara et al., 1995; Sterne et al., 1998），而誘發糖尿病後肌肉組織中神經滋養素-3 mRNA 的表現量顯著下降(Ihara et al., 1996)，但是目前對於誘發糖尿病合併正中神經截斷的動物模式，背根神經節中神經滋養素-3 表現量的變化還不是很明確，此外我們也想釐清在非糖尿病動物與糖尿病動物正中神經截斷後，背根神經節中神經滋養素-3 在不同存活時程細胞大小分佈的變化。最後我們想檢測正中神經截斷後神經胜肽 Y 與神經滋養素-3 在背根神經節是否會有共表現的情況發生。

材料方法

本實驗經由國科會與台大醫學院暨公衛學院動物實驗小組審查與核准 （核准編號：IACUCA Approval No.20050199），實驗動物倫理則依據國際疼痛研究學會（International Association for the Study of Pain）Zimmermann 於 1983

年所發表的內容。動物飼養於日夜各１２小時循環的環境並提供充足的食物及飲水。

七、 實驗動物準備

體重 176-200 克的大白鼠(Sprague-Dawley) 隨機分為四組：

組別一（控制組，naive)： 大白鼠不進行任何神經損傷 (n=3)。

組別二（糖尿病組，diabetic)： 大白鼠以 STZ 注射至外頸靜脈誘發糖尿病 (65 mg/kg，Sigma)。誘發方式依第七章步驟一， 在誘發糖尿病後存活 8 週後進行犧牲灌流 (n=3)。

組別三（糖尿病合併正中神經截斷，DMNT)：大白鼠誘發糖尿病存活至第八週時進行正中神經截斷方法依第二章實驗部驟二，手術後存活 1，2，3，4 週，之後於各時間點進行犧牲灌流 (每個時間點 n=3)。

組別四（非糖尿病正中神經截斷)：選用年紀符合糖尿病組的動物進行單側正中神經截斷，存活 1，2，3，4 週，之後於各時間點進行犧牲灌流 (每個時間點 n=3)。

八、 灌流固定

實驗動物於各對應時間點進行犧牲灌流，方法如第三章 步驟三。

九、 組織製備

灌流過後收取各組別動物之第六頸髓背根神經節，背根神經節以石蠟包埋，之後切成 7um 的薄片以六取一的方式貼於載玻片上，免疫反應前以二

甲苯（xylene）進行脫蠟，接著以酒精梯度進行水合反應（rehydrated），最後以 0.01 M sodium citrate buffer（pH 6.0），100˚C 反應 7 分鐘進行抗原性還原(antigen retrival)（Milestone RHS-1 vacuum microwave，Milestone, Bergamo, Italy）。

十、 免疫細胞染色

背根神經節進行抗神經滋養素-3 細胞化學反應，方法依第三章步驟四。

但初級抗體換為：rabbit polyclonal anti-NT-3（1:800, Millipore），4℃培養 48 小時。

次級抗體為：biotinylated goat anti-rabbit IgG（1:200, Vector）

室溫反應兩小時，avidin-biotin-HRP complex（1:200, ABC kit, Vector）

室溫下反應 1 小時。清洗完畢後以 Vector DAB Kit 進行呈色反應。

十一、免疫螢光染色

步驟類似第三章步驟四，但初級抗體換為：

guinea pig polyclonal anti-NPY（1:50, NEUROMICS, Edina, MN, USA）

rabbit polyclonal anti-NT-3（1:100, Millipore）

mouse monoclonal anti-neurofilament 200 kD（NF200, 1:200, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO）

4℃培養 48 小時

次級抗體為：

FITC-conjugated goat anti-mouse IgG (1:100, Jackson)

Cy3-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:100, Jackson)

biotinylated goat anti-rabbit IgG (1:200, Vector)

室溫反應兩小時，

以 biotinylated anti-rabbit IgG (1:200, Vector)，反應的組別再接著與 fluorescence streptavidin (1:100, Vector) 室溫反應一小時。

染色完成的切片以 Fluoro-Gel (EMS, Hatfield, PA, USA)蓋片，之後以 LEICA TCS SP5-laser scanning confocal microscope 擷取影像，分別擷取 NT-3+NF200 or NT-3+NPY 雙重染色的影像。

十二、定量分析

免疫細胞染色與螢光染色分別以 Zeiss light microscope + Nikon D1X 數位相機 (Nikon, Tokyo, Japan)或 Leica TCS SP5-laser scanning confocal microscope 擷取影像。影像以電腦影像分析系統 (computer-based image analysis system, MGDS) 與影像分析軟體 Image Pro-Plus software (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA) 進行分析與定量。

神經滋養素-3 在背根神經節中所佔百分比，算法為神經滋養素-3 免疫反應陽性細胞除以染色切片的總細胞量。正中神經截斷後，背根神經節中神經滋養素-3 在非糖尿病與糖尿病表現的變化，以雙因子變異數分析

(two-way ANOVA)，並進行 Newman-Keuls post-hoc test(圖 6-3)。雙重螢光染色算法為(NT-3+NF200/NT-3 and NPY+NT-3/NPY)，而雙重營螢光染色定量的結果以單因子變異數分析(one-way ANOVA)並進行 Newman-Keuls post hoc test (圖 6-5，6-7)。

結果

糖尿病合併正中神經截斷後，背根神經節中神經滋養素-3 的表現情形

神經滋養素-3 免疫陽性背根神經元在背根神經節中，無論是非糖尿病(non-diabetic)或是糖尿病(diabetic)，正中神經截斷前都佔有非常高的比例(圖 6-2A，D)。除此之外糖尿病 (non-MNT diabetic)組神經滋養素-3 免疫陽性背根神經元在背根神經節中所佔百分比也高於控制組(non-MNT non-diabetic)(圖 6-3)。正中神經截斷後，非糖尿病組神經滋養素-3 免疫陽性背根神經元在背根神經節中所佔百分比，截斷後四週達到最低點 (平均百分比 = 10.24±1.8 %)。但糖尿病組神經滋養素-3 免疫陽性背根神經元在背根神經節中所佔百分比的最低點，卻提早到正中神經截斷後兩週 (平均百分比 = 16.88±1.0 %) (圖 6-3)。

神經胜肽 Y 與 NF200 在背根神經節中雙重標誌的情形

除此之外，我們也想了解神經滋養素-3 在背根神經節細胞分佈的情形，因此使用 NF200(一種中大型神經元的標幟)與神經滋養素-3 進行免疫螢光雙重染色(圖 6-4)。結果發現 NF200 與神經滋養素-3 雙重標誌的比例，在未進行正中神經截斷時非糖尿病的組別顯著高於糖尿病的組別，而在進行正中神經斷後，無論是

在非糖尿病或是糖尿病的組別都顯著低於未截斷的組別 (Naïve vs MNT4w = 61.2±5.0 % vs. 33.7±3.5 % and diabetic vs DMNT2w = 32.8±4.1 % vs. 18.6±2.3 %)(圖 6-5)。由結果可知神經滋養素-3 在中大型背根神經元表現的比例在誘發糖尿病後會明顯下降，此外正中神經截斷後神經滋養素-3 在中大型背根神經元中表現的比例都會顯著降低。

神經胜肽 Y 與神經滋養素-3 在背根神經節中雙重標誌的情形

接著我們想探討神經滋養素-3 與神經胜肽 Y 在背根神經節中，是否會在神經元上雙重標誌？我們選擇正中神經截斷四週 (MNT4w) 與糖尿病正中神經截斷兩週 (DMNT2w) 的組別，進行免疫螢光雙重染色，分別偵測神經滋養素-3 與神經胜肽 Y (圖 6-6)。結果顯示在這兩組中神經滋養素-3 與神經胜肽 Y 都只有非常低的雙重標誌比例 (MNT4w = 3.6±1.2 %; DMNT2w = 3.9±0.3 %)(圖 6-6，C、F，圖 6-7)。由結果可知在正中神經截斷四週與糖尿病正中神經截斷兩週的組別中，大約 97% 的神經胜肽 Y 免疫反應陽性神經元都不會與神經滋養素-3 免疫反應具有雙重標誌。

討論

本部分實驗同時也觀察了正中神經截斷後，在非糖尿病動物與糖尿病動物背根神經節內神經滋養素-3 的表現情形。神經滋養素-3 在正中神經截斷後，非糖尿病動物與糖尿病動物背根神經節內，其表現量分別於四週以及兩週達到最低點。神經滋養素-3 是由神經所支配的組織(肌肉、皮膚)所產生，與其高親合性的受體 TrkC 結合後，由軸突逆向運送(retrograde transport)回神經細胞本體

(Funakoshi et al., 1993), 而當周邊神經損傷造成神經滋養素-3 減少或完全喪失時，則可能誘發神經胜肽 Y 在背根神經節中表現(Ohara et al., 1995)。此外，在損傷的周邊神經局部給予額外的神經滋養素-3，也可以抑制的神經胜肽 Y 在背根神經節中表現量上升 (Ohara et al., 1995; Sterne et al., 1998) 。

我們的實驗結果也指出，神經截斷後無論在非糖尿病或是糖尿病動物的背根神經節中，只有極少數的神經胜肽 Y 會與神經滋養素-3 雙重標誌(大約 3%)，也可以支持這樣的說法。當我們以免疫細胞染色偵測神經滋養素-3 免疫陽性神經元數量時發現，在進行正中神經截斷前，糖尿病組的神經滋養素-3 數量顯著高於非糖尿病組；因此我們又以免疫螢光雙重標定的方式來了解神經滋養素-3 在背根神經節中細胞分佈的情形。結果顯示誘發糖尿病後，神經滋養素-3 在中大型神經元(A-type)表現的比例顯著下降，顯示小型神經元表現神經滋養素-3 的比例上升。神經滋養素-3 在中大型神經元(A-type)表現的比例下降的原因可能是因誘發糖尿病後骨骼肌中神經滋養素-3 表現量下降,或是神經滋養素-3 高親合性的受體 TrkC 表現量與軸突內逆向運送能力降低所導致(Ihara et al. 1996; Fernyhough et al. 1998)。

而小型神經元表現神經滋養素-3 的比例上升，可能是因為誘發糖尿病後，神經滋養素-3 mRNA 在感覺神經 (sural nerve) 中相較於非糖尿病大白鼠會顯著增加 52% (Cai et al., 1999)，意味著在誘發糖尿病後，感覺神經內 schwann cells 可能也會開始產生神經滋養素-3，來回饋因糖尿病所造成的神經滋養素-3 下降。

臨床的研究也指出由無髓鞘小型神經元所支配的 suprabasal epidermis 區域，糖尿病後神經滋養素-3 的表現量會增加 (Kennedy et al., 1998)。綜合以上結果，誘發糖尿病後神經滋養素-3 在中大型神經元(A-type)表現的比例顯著下降，在小型神經元表現比例明顯上升；而我們先前的研究指出神經胜肽 Y 主要表現在中大型的背根神經元，因此誘發糖尿病合併正中神經截斷後，背根神經元中神經胜肽 Y 或許是因為神經滋養素-3 在中大型神經元中表現比例下降而提早大量表現。

參考文獻

Abdi, S., D. H. Lee, and J. M. Chung. "The anti-allodynic effects of amitriptyline, gabapentin, and lidocaine in a rat model of neuropathic pain." Anesth.Analg. 87.6 (1998): 1360-66.

Abdi, S., et al. "Lack of pre-emptive analgesic effects of local anaesthetics on neuropathic pain." Br.J.Anaesth. 85.4 (2000): 620-23.

Andersen, P., et al. "Mechanisms of synaptic transmission in the cuneate nucleus." J.Neurophysiol. 27 (1964): 1096-116.

Bennett, G. J. and Y. K. Xie. "A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man." Pain 33.1 (1988): 87-107.

Berkley, K. J., et al. "Output systems of the dorsal column nuclei in the cat." Brain Res. 396.3 (1986): 199-225.

Brothers, S. P., et al. "Selective and brain penetrant neuropeptide y y2 receptor antagonists discovered by whole-cell high-throughput screening." Mol.Pharmacol. 77.1 (2010): 46-57.

Burchiel, K. J., et al. "Spontaneous activity of primary afferent neurons in diabetic BB/Wistar rats. A possible mechanism of chronic diabetic neuropathic pain." Diabetes 34.11 (1985): 1210-13.

Burnand, R. C., et al. "Expression of axotomy-inducible and apoptosis-related genes in sensory nerves of rats with experimental diabetes." Brain Res.Mol.Brain Res. 132.2 (2004): 235-40.

Cai, F., D. R. Tomlinson, and P. Fernyhough. "Elevated expression of neurotrophin-3 mRNA in sensory nerve of streptozotocin-diabetic rats." Neurosci.Lett. 263.2-3 (1999): 81-84.

Chabal, C., L. C. Russell, and K. J. Burchiel. "The effect of intravenous lidocaine, tocainide, and mexiletine on spontaneously active fibers originating in rat sciatic neuromas." Pain 38.3 (1989): 333-38.

Chi, S. I., J. D. Levine, and A. I. Basbaum. "Effects of injury discharge on the persistent expression of spinal cord fos-like immunoreactivity produced by sciatic nerve transection in the rat." Brain Res. 617.2 (1993): 220-24.

Chottova, Dvorakova M., et al. "Expression of neuropeptide Y and its receptors Y1 and Y2 in the rat heart and its supplying autonomic and spinal sensory ganglia in experimentally induced diabetes." Neuroscience 151.4 (2008): 1016-28.

Comer, A. M. and H. M. Lamb. "Lidocaine patch 5%." Drugs 59.2 (2000): 245-49.

Crile, G. W. "II. The Identity of Cause of Aseptic Wound Fever and So-called Post-Operative Hyperthyroidism and Their Prevention." Ann.Surg. 57.5 (1913): 648-52.

Day, A. S., et al. "A beta-fiber intensity stimulation of chronically constricted median nerve induces c-fos expression in thalamic projection neurons of the cuneate nucleus in rats with behavioral signs of neuropathic pain." Brain Res. 895.1-2 (2001): 194-203.

Day, A. S., et al. "Somatic noxious mechanical stimulation induces Fos expression in the postsynaptic dorsal column neurons in laminae III and IV of the rat spinal dorsal horn." Neurosci.Res. 40.4 (2001): 343-50.

Devor, M., P. D. Wall, and N. Catalan. "Systemic lidocaine silences ectopic neuroma and DRG discharge without blocking nerve conduction." Pain 48.2 (1992): 261-68.

Feng, Y. P., K. Yang, and Y. Q. Li. "Activation of capsaicin receptors on the sciatic nerve induces FOS expression in the spinal dorsal horn of adult rats." Neurosignals. 11.3 (2002): 151-57.

Fernyhough, P., L. T. Diemel, and D. R. Tomlinson. "Target tissue production and axonal transport of neurotrophin-3 are reduced in streptozotocin-diabetic rats." Diabetologia 41.3 (1998): 300-06.

Ferrante, F. M., et al. "The analgesic response to intravenous lidocaine in the treatment of neuropathic pain." Anesth.Analg. 82.1 (1996): 91-97.

Funakoshi, H., et al. "Differential expression of mRNAs for neurotrophins and their receptors after axotomy of the sciatic nerve." J.Cell Biol. 123.2 (1993): 455-65.

Fyffe, R. E., et al. "Intracellular staining study of the feline cuneate nucleus. II. Thalamic projecting neurons." J.Neurophysiol. 56.5 (1986): 1284-96.

Gentili, F., et al. "Nerve injection injury with local anesthetic agents: a light and electron microscopic, fluorescent microscopic, and horseradish peroxidase study."

Neurosurgery 6.3 (1980): 263-72.

Gracely, R. H., S. A. Lynch, and G. J. Bennett. "Painful neuropathy: altered central processing maintained dynamically by peripheral input." Pain 51.2 (1992): 175-94.

Han, K. R., et al. "Efficacy and safety of high concentration lidocaine for trigeminal nerve block in patients with trigeminal neuralgia." Int.J.Clin.Pract. 62.2 (2008): 248-54.

Harris, J. A. "Using c-fos as a neural marker of pain." Brain Res.Bull. 45.1 (1998): 1-8.

Hirai, T., et al. "Morphology of physiologically characterized medial lemniscal axons terminating in cat ventral posterior thalamic nucleus." J.Neurophysiol. 60.4 (1988): 1439-59.

Hudson, A. R. "Nerve injection injuries." Clin.Plast.Surg. 11.1 (1984): 27-30.

Hunt, S. P., A. Pini, and G. Evan. "Induction of c-fos-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation." Nature 328.6131 (1987): 632-34.

Ihara, C., et al. "Decreased neurotrophin-3 expression in skeletal muscles of streptozotocin-induced diabetic rats." Neuropeptides 30.4 (1996): 309-12.

Jasmin, L., et al. "The cold plate as a test of nociceptive behaviors: description and application to the study of chronic neuropathic and inflammatory pain models." Pain 75.2-3 (1998): 367-82.

Kajander, K. C., S. Wakisaka, and G. J. Bennett. "Spontaneous discharge originates in the dorsal root ganglion at the onset of a painful peripheral neuropathy in the rat." Neurosci.Lett. 138.2 (1992): 225-28.

Kennedy, A. J., et al. "Neurotrophin-3 is increased in skin in human diabetic neuropathy." J.Neurol.Neurosurg.Psychiatry 65.3 (1998): 393-95.

Kim, S. H. and J. M. Chung. "An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat." Pain 50.3 (1992): 355-63.

Lambert, P. D., et al. "c-fos expression in the paraventricular nucleus of the hypothalamus following intracerebroventricular infusions of neuropeptide Y." Brain Res. 670.1 (1995): 59-65.

Li, B. H., et al. "c-fos expression in the rat brain following central administration of neuropeptide Y and effects of food consumption." Brain Res. 665.2 (1994): 277-84.

Lin, C. T., et al. "Pre-treatment with lidocaine suppresses ectopic discharges and attenuates neuropeptide Y and c-Fos expressions in the rat cuneate nucleus following median nerve transection." Journal of Chemical Neuroanatomy 38.1 (2009): 47-56.

Liu, X., K. Chung, and J. M. Chung. "Ectopic discharges and adrenergic sensitivity of sensory neurons after spinal nerve injury." Brain Res. 849.1-2 (1999): 244-47.

Lue, J. H., et al. "Changes in c-Fos protein expression in the rat cuneate nucleus after electric stimulation of the transected median nerve." J.Neurotrauma 19.7 (2002): 897-907.

Ma, W. and M. A. Bisby. "Ultrastructural localization of increased neuropeptide immunoreactivity in the axons and cells of the gracile nucleus following chronic constriction injury of the sciatic nerve." Neuroscience 93.1 (1999): 335-48.

Ma, W. and M. A. Bisby. "Increased activation of nuclear factor kappa B in rat lumbar dorsal root ganglion neurons following partial sciatic nerve injuries." Brain Res. 797.2 (1998): 243-54.

Mao, J. and L. L. Chen. "Systemic lidocaine for neuropathic pain relief." Pain 87.1 (2000): 7-17.

Matzner, O. and M. Devor. "Hyperexcitability at sites of nerve injury depends on voltage-sensitive Na+ channels." J.Neurophysiol. 72.1 (1994): 349-59.

Minson, J. B., L. F. Arnolda, and I. J. Llewellyn-Smith. "Neurochemistry of nerve fibers apposing sympathetic preganglionic neurons activated by sustained hypotension." J.Comp Neurol. 449.4 (2002): 307-18.

Molander, C., J. Hongpaisan, and G. Grant. "Changing pattern of c-FOS expression in spinal cord neurons after electrical stimulation of the chronically injured sciatic nerve in the rat." Neuroscience 50.1 (1992): 223-36.

Molander, C., J. Hongpaisan, and J. K. Persson. "Distribution of c-fos expressing dorsal horn neurons after electrical stimulation of low threshold sensory fibers in the chronically injured sciatic nerve." Brain Res. 644.1 (1994): 74-82.

Morgado, C. and I. Tavares. "C-fos expression at the spinal dorsal horn of streptozotocin-induced diabetic rats." Diabetes Metab Res.Rev. 23.8 (2007): 644-52.

Munglani, R., et al. "Changes in neuronal markers in a mononeuropathic rat model relationship between neuropeptide Y, pre-emptive drug treatment and long-term mechanical hyperalgesia." Pain 63.1 (1995): 21-31.

Munglani, R., et al. "Effect of pre-emptive NMDA antagonist treatment on long-term Fos expression and hyperalgesia in a model of chronic neuropathic pain." Brain Res. 822.1-2 (1999): 210-19.

Myers, R. D., et al. "Anorexic action of a new potential neuropeptide Y antagonist [D-Tyr27,36, D-Thr32]-NPY (27-36) infused into the hypothalamus of the rat." Brain Res.Bull. 37.3 (1995): 237-45.

Nagaro, T., et al. "[The efficacy of intravenous lidocaine on various types of neuropathic pain]." Masui 44.6 (1995): 862-67.

Nakamura, T. and M. Takasaki. "Intrathecal pre-administration of fentanyl effectively suppresses formalin evoked c-Fos expression in spinal cord of rat." Can.J.Anaesth. 48.10 (2001): 993-99.

Nedungadi, T. P. and K. P. Briski. "Effects of intracerebroventricular administration of the NPY-Y1 receptor antagonist, 1229U91, on hyperphagic and glycemic responses to acute and chronic intermediate insulin-induced hypoglycemia in female rats." Regul.Pept. 159.1-3 (2010): 14-18.

Ohara, S., et al. "Transganglionic neuropeptide Y response to sciatic nerve injury in young and aged rats." J.Neuropathol.Exp.Neurol. 53.6 (1994): 646-62.

Ohara, S., et al. "Exogenous NT-3 mitigates the transganglionic neuropeptide Y response to sciatic nerve injury." Brain Res. 699.1 (1995): 143-48.

Omana-Zapata, I., et al. "Tetrodotoxin inhibits neuropathic ectopic activity in neuromas, dorsal root ganglia and dorsal horn neurons." Pain 72.1-2 (1997): 41-49.

Ossipov, M. H., et al. "Selective mediation of nerve injury-induced tactile hypersensitivity by neuropeptide Y." J.Neurosci. 22.22 (2002): 9858-67.

Palmes, D., et al. "Randomized clinical trial of the influence of intraperitoneal local anaesthesia on pain after laparoscopic surgery." Br.J.Surg. 94.7 (2007): 824-32.

Rao, M. S., et al. "Effects of ciliary neurotrophic factor (CNTF) and depolarization on neuropeptide expression in cultured sympathetic neurons." Dev.Biol. 150.2 (1992): 281-93.

Rowbotham, M. C., et al. "Lidocaine patch: double-blind controlled study of a new treatment method for post-herpetic neuralgia." Pain 65.1 (1996): 39-44.

Rowbotham, M. C. and H. L. Fields. "Topical lidocaine reduces pain in post-herpetic neuralgia." Pain 38.3 (1989): 297-301.

Rowbotham, M. C., L. A. Reisner-Keller, and H. L. Fields. "Both intravenous lidocaine and morphine reduce the pain of postherpetic neuralgia." Neurology 41.7 (1991): 1024-28.

Roy, M. L. and T. Narahashi. "Differential properties of tetrodotoxin-sensitive and tetrodotoxin-resistant sodium channels in rat dorsal root ganglion neurons." J.Neurosci. 12.6 (1992): 2104-11.

Schein, P. S., K. G. Alberti, and D. H. Williamson. "Effects of streptozotocin on carbohydrate and lipid metabolism in the rat." Endocrinology 89.3 (1971): 827-34.

Scholz, A. and W. Vogel. "Tetrodotoxin-resistant action potentials in dorsal root ganglion neurons are blocked by local anesthetics." Pain 89.1 (2000): 47-52.

Seltzer, Z., et al. "The role of injury discharge in the induction of neuropathic pain behavior in rats." Pain 46.3 (1991): 327-36.

Seltzer, Z., et al. "Modulation of neuropathic pain behavior in rats by spinal disinhibition and NMDA receptor blockade of injury discharge." Pain 45.1 (1991): 69-75.

Sotgiu, M. L., et al. "Different time-courses of i.v. lidocaine effect on ganglionic and spinal units in neuropathic rats." Neuroreport 5.8 (1994): 873-76.

Sotgiu, M. L., et al. "Pre-injury lidocaine treatment prevents thermal hyperalgesia and cutaneous thermal abnormalities in a rat model of peripheral neuropathy." Pain 61.1 (1995): 3-10.

Stebbing, M. J., et al. "Changes in the action potential in sensory neurones after peripheral axotomy in vivo." Neuroreport 10.2 (1999): 201-06.

Stenberg, C., et al. "Effect of local anaesthesia on neuronal c-fos expression in the spinal dorsal horn and hypothalamic paraventricular nucleus after surgery in rats." Basic Clin.Pharmacol.Toxicol. 96.5 (2005): 381-86.

Sterne, G. D., et al. "NT-3 modulates NPY expression in primary sensory neurons following peripheral nerve injury." J.Anat. 193 (Pt 2) (1998): 273-81.

Stevens, E. J., A. L. Carrington, and D. R. Tomlinson. "Nerve ischaemia in diabetic rats: time-course of development, effect of insulin treatment plus comparison of streptozotocin and BB models." Diabetologia 37.1 (1994): 43-48.

Sun, X., et al. "The effects of pretreatment with lidocaine or bupivacaine on the spatial and temporal expression of c-Fos protein in the spinal cord caused by plantar incision in the rat." Anesth.Analg. 98.4 (2004): 1093-8, table.

Tal, M. and G. J. Bennett. "Extra-territorial pain in rats with a peripheral mononeuropathy: mechano-hyperalgesia and mechano-allodynia in the territory of an uninjured nerve." Pain 57.3 (1994): 375-82.

Tanelian, D. L. and M. B. MacIver. "Analgesic concentrations of lidocaine suppress tonic A-delta and C fiber discharges produced by acute injury." Anesthesiology 74.5 (1991): 934-36.

Taylor, B. K., et al. "Neuropeptide Y acts at Y1 receptors in the rostral ventral medulla to inhibit neuropathic pain." Pain 131.1-2 (2007): 83-95.

Thomson, P. D., et al. "Lidocaine pharmacokinetics in advanced heart failure, liver disease, and renal failure in humans." Ann.Intern.Med. 78.4 (1973): 499-508.

Thomas, P.K., Tomlinson, D.R., 1993. Diabetic and hypoglycemic neuropathy. In: Dyck, P.J., Thomas, P.K., Griffin, J.W., Low, P.A., Poduslo, J.F. (Eds.), Peripheral Neuropathy, 3rd ed. WB Saunders, Philadelphia, pp. 1219-50.

Tracey, D. J., M. A. Romm, and N. N. Yao. "Peripheral hyperalgesia in experimental neuropathy: exacerbation by neuropeptide Y." Brain Res. 669.2 (1995): 245-54.

Tsai, Y. J., et al. "A time course analysis of the changes in neuropeptide Y immunoreactivity in the rat cuneate nucleus following median nerve transection." Neurosci.Res. 48.4 (2004): 369-77.

Tsai, Y. J., et al. "Neuropeptide Y Modulates c-Fos Protein Expression in the Cuneate Nucleus and Contributes to Mechanical Hypersensitivity following Rat Median

Nerve Injury." J.Neurotrauma (2009).

Tsai, Y. J., C. T. Lin, and J. H. Lue. "Characterization of the induced neuropeptide Y-like immunoreactivity in primary sensory neurons following complete median nerve transection." J.Neurotrauma 24.12 (2007): 1878-88.

Wakisaka, S., K. C. Kajander, and G. J. Bennett. "Increased neuropeptide Y (NPY)-like immunoreactivity in rat sensory neurons following peripheral axotomy." Neurosci.Lett. 124.2 (1991): 200-03.

Wall, P. D. and M. Gutnick. "Ongoing activity in peripheral nerves: the physiology and pharmacology of impulses originating from a neuroma." Exp.Neurol. 43.3 (1974a): 580-93.

Wall, P. D. and M. Gutnick. "Properties of afferent nerve impulses originating from a neuroma." Nature 248.5451 (1974b): 740-43.

White, D. M. "Intrathecal neuropeptide Y exacerbates nerve injury-induced mechanical hyperalgesia." Brain Res. 750.1-2 (1997): 141-46.

Wong, C. S., et al. "Pre-emptive analgesia with ketamine, morphine and epidural lidocaine prior to total knee replacement." Can.J.Anaesth. 44.1 (1997): 31-37.

Woolf, C. J. "The pathophysiology of peripheral neuropathic pain--abnormal peripheral input and abnormal central processing." Acta Neurochir.Suppl (Wien.) 58 (1993): 125-30.

Xie, W., et al. "Neuropathic pain: early spontaneous afferent activity is the trigger." Pain 116.3 (2005): 243-56.

Yamamoto, T., S. Ohtori, and T. Chiba. "Effects of pre-emptively administered nociceptin on the development of thermal hyperalgesia induced by two models of experimental mononeuropathy in the rat." Brain Res. 871.2 (2000): 192-200.

Yasuda, H., et al. "Chronically streptozocin-diabetic monkey does not closely mimic human diabetic neuropathy." Exp.Neurol. 104.2 (1989): 133-37.

Yeh, J. H., et al. "Synaptic relationships between induced neuropeptide Y-like immunoreactive terminals and cuneothalamic projection neurons in the rat cuneate nucleus following median nerve transection." J.Chem.Neuroanat. 36.1 (2008): 27-32.

Yoon, Y. W., H. S. Na, and J. M. Chung. "Contributions of injured and intact afferents to neuropathic pain in an experimental rat model." Pain 64.1 (1996): 27-36.

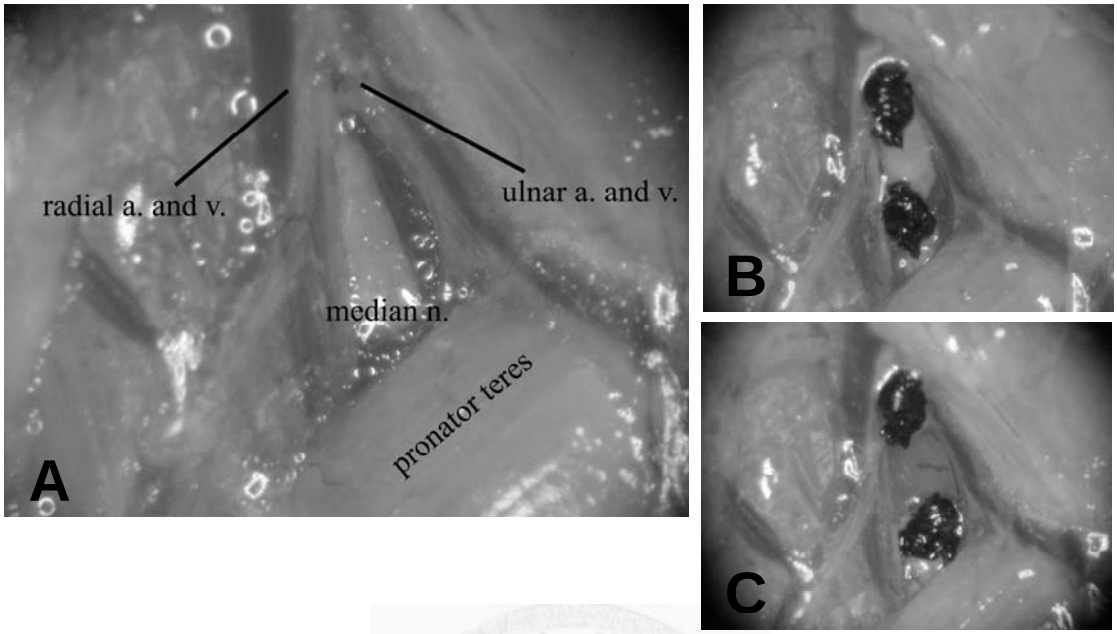
Zhang, X., et al. "Large calibre primary afferent neurons projecting to the gracile nucleus express neuropeptide Y after sciatic nerve lesions: an immunohistochemical and in situ hybridization study in rats." Eur.J.Neurosci. 5.11 (1993): 1510-19.

Zimmermann, M. "Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals." Pain 16.2 (1983): 109-10.

Zochodne, D.W., 2001. Peripheral nerve disease. In: Gerstein, H.C., Haynes, R.B. (Eds.), Evidence-Based Diabetes Care. BC Decker, Hamilton, ON, pp. 466–487.

圖表與說明

圖 1-1



正中神經截斷模式圖

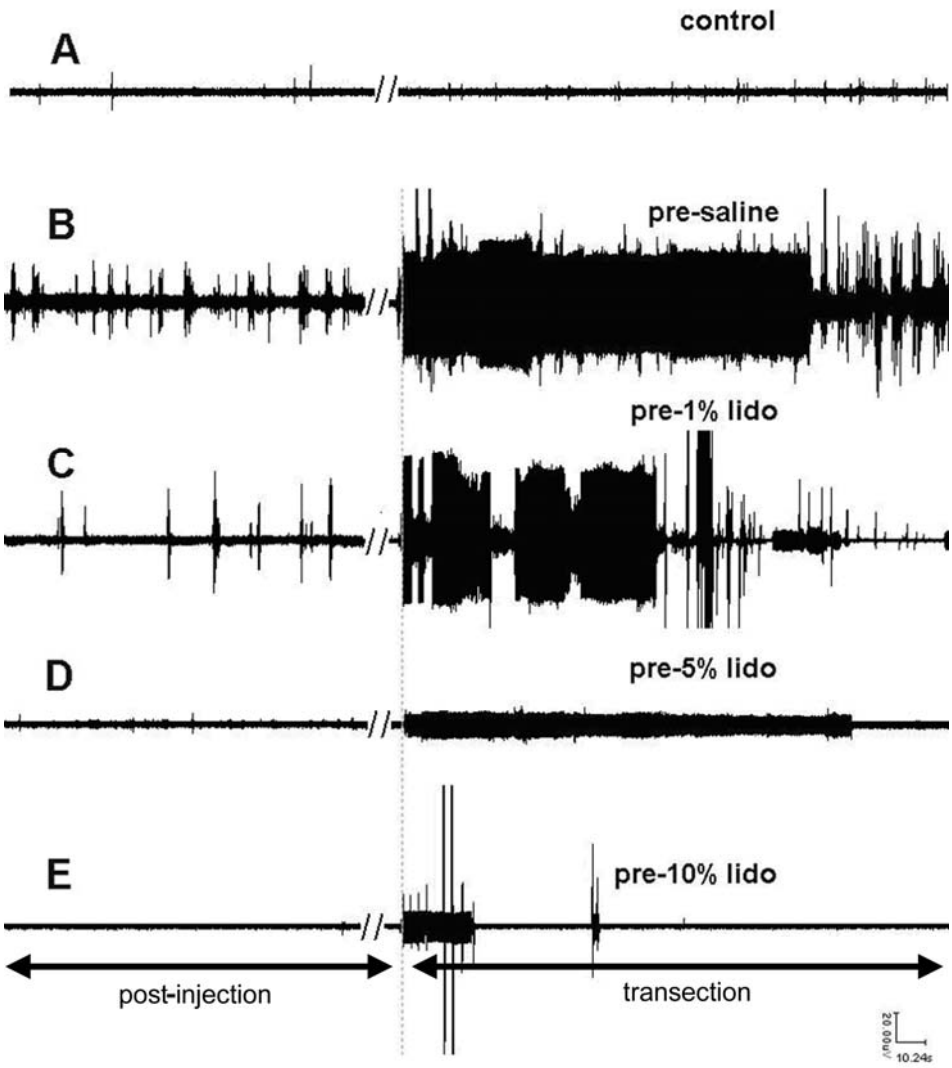
本部分實驗所使用之神經傷害動物模式參照 Wall 等學者在 1979 年所發表的神經瘤（neuroma）誘發模式。

(A) 於肘窩位置將皮膚切開,正中神經位於 radial a.和 ulnar a.間的分岔處,並會穿入 pronator teres muscle 下方。

(B) 將游離出來的正中神經兩端打結,中間至少間隔 5mm。

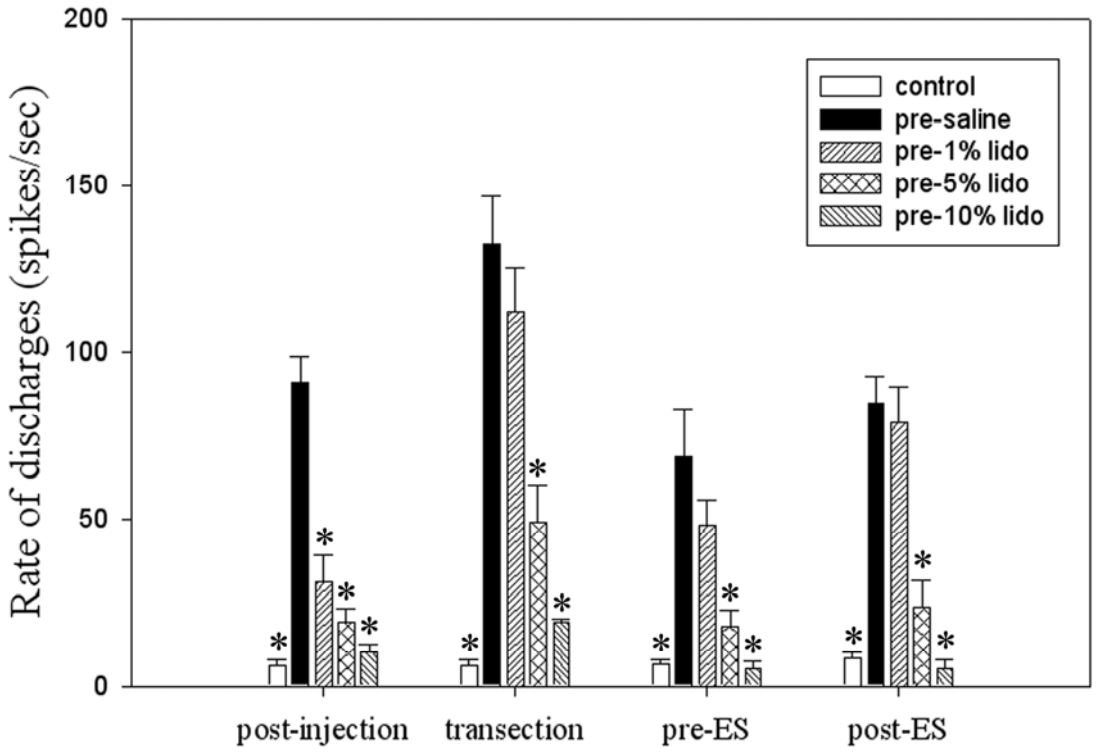
(C) 將繩結中間部分的神經剪斷移除,以避免神經再生或接觸。

圖 1-2



正中神經在藥物注射後(post-injection)與神經截斷後(transection)的神經傷害性異位放電電生理紀錄圖,虛線標示為神經截斷的時間點。各組別分別為控制組(control, A), 生理食鹽水處理組(pre-saline, B), 1% lidocaine 處理組(pre-1% lido, C), 5% lidocaine 處理組(pre-5% lido, D) 和 10% lidocaine 處理組(pre-10% lido, E)。 神經截斷所引起的劇烈異位性放電(B),隨著 lidocaine 術前麻醉處理的濃度提高而被抑制(C-E)。

圖 1-3



各處理組在藥物注射後(post-injection), 神經截斷後(transection)與電刺激前後(pre-ES/post-ES)不同時期異位性放電頻率(spikes/sec)的變化。在藥物注射後生理食鹽水處理組的放電頻率顯著高於控制組, 而放電頻率隨著 lidocaine 術前麻醉處理的濃度提高而降低。在神經截斷後, 相較於生理食鹽水處理組, 5% and 10% lidocaine 處理組顯著的降低了異位性放電頻率(＊P<0.05 相較於生理食鹽水處理組)。

表1-1. 神經異位性放電之平均數值與分析比較

Group	Stage	Mean±SEM	Newman-Keuls test		
Control	post-injection	8.2±0.5 Hz	post-injection		
	transection	6.4±2.1 Hz	ns	transection	
	pre-ES	7.5±1.2 Hz	ns	ns	pre-ES
	post-ES	6.2±0.9 Hz	ns	ns	ns
Pre-saline	post-injection	90.7±7.7 Hz	post-injection		
	transection	132.3±14.5Hz	P<0.05	transection	
	pre-ES	68.5±14.3 Hz	ns	P<0.05	pre-ES
	post-ES	84.6±7.9 Hz	ns	P<0.05	ns
Pre-1% lido	post-injection	30.8±8.0 Hz	post-injection		
	transection	111.8±13.6 Hz	P<0.05	transection	
	pre-ES	47.9±7.7 Hz	ns	P<0.05	pre-ES
	post-ES	78.7±10.9 Hz	P<0.05	P<0.05	P<0.05
Pre-5% lido	post-injection	18.8±4.1 Hz	post-injection		
	transection	48.7±11.3 Hz	P<0.05	transection	
	pre-ES	17.8±4.6 Hz	ns	P<0.05	pre-ES
	post-ES	23.6±7.7 Hz	ns	P<0.05	ns
Pre-10% lido	post-injection	9.9±2.3 Hz	post-injection		
	transection	18.9±1.2 Hz	P<0.05	transection	
	pre-ES	5.2±2.3 Hz	ns	P<0.05	pre-ES
	post-ES	5.1±2.7 Hz	ns	P<0.05	ns

數據以平均值±標準差（mean±SEM）方式呈現

控制組：只進行相對於藥物注射神經截斷或是電刺激各時間點的神經電生理紀錄。

ES：電刺激(electrical stimulation)

ns：無顯著差異（P>0.05）

圖 2-1

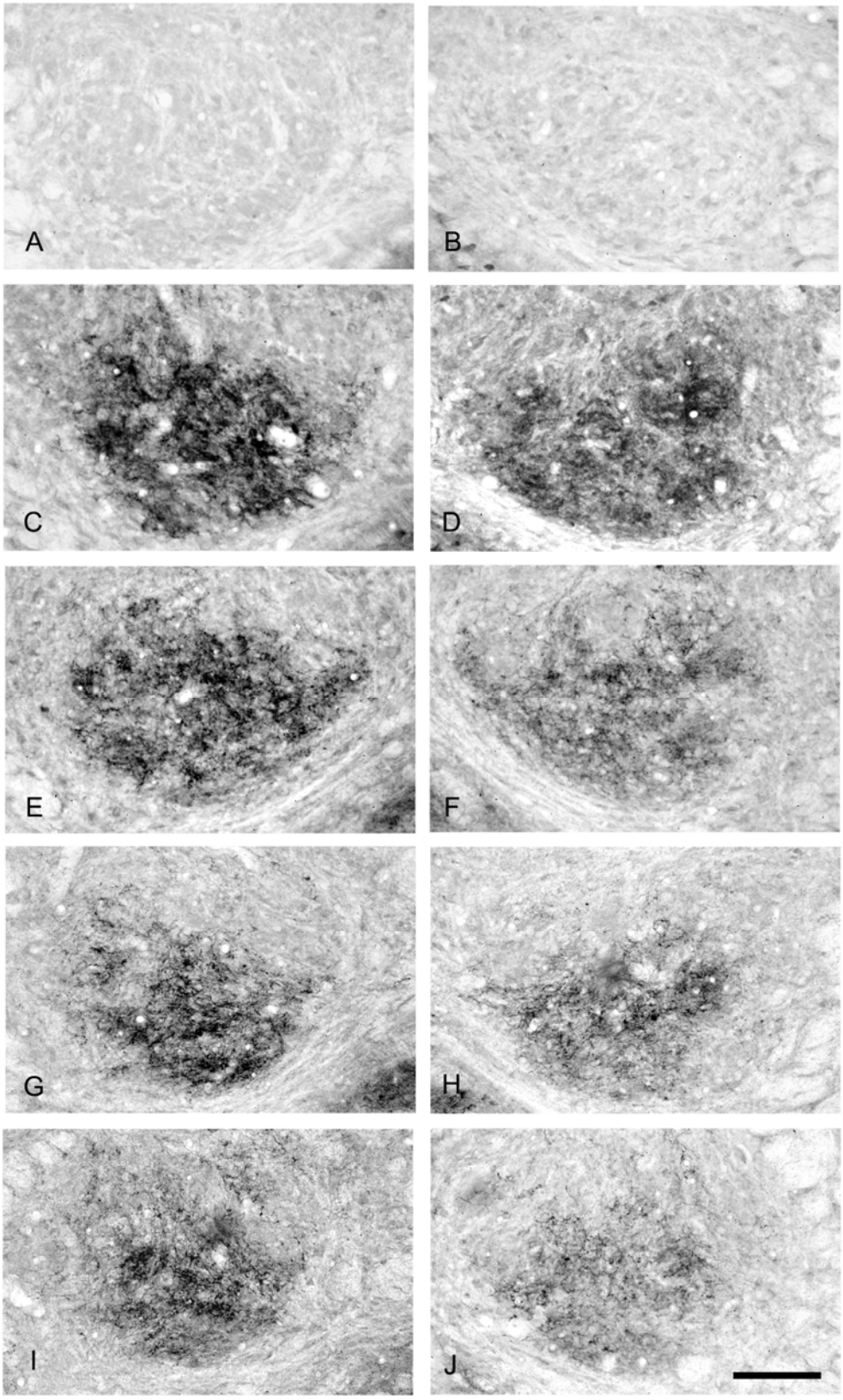
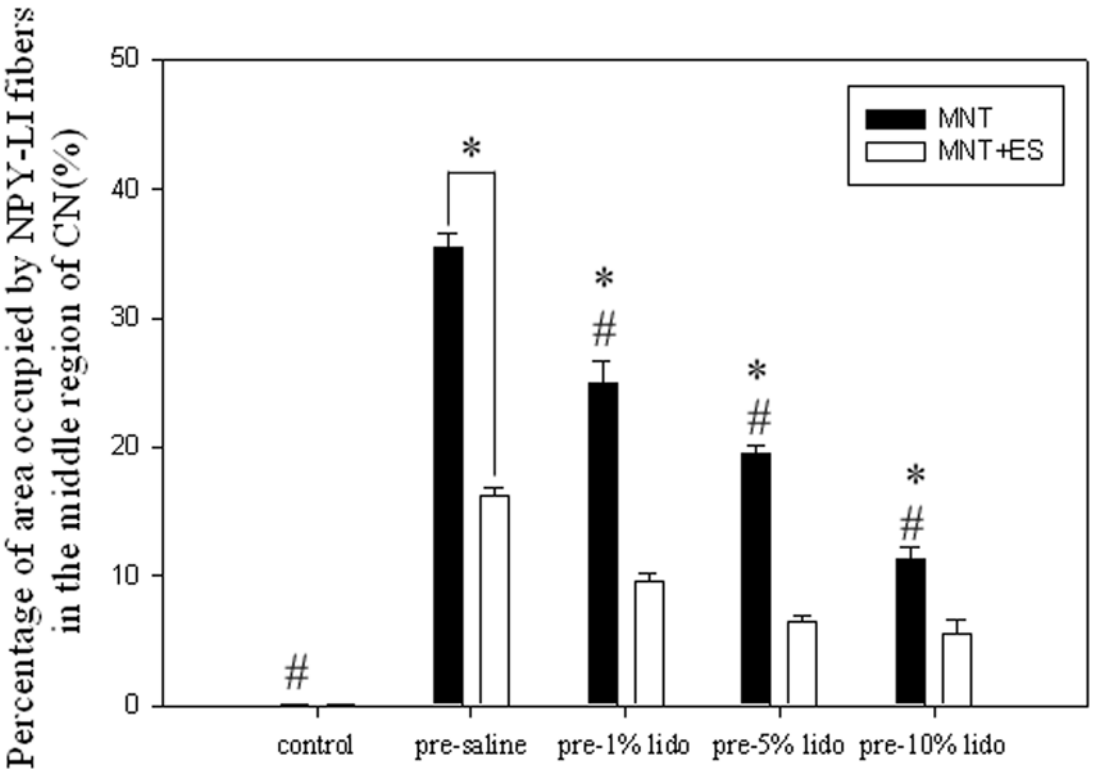


圖 2-1

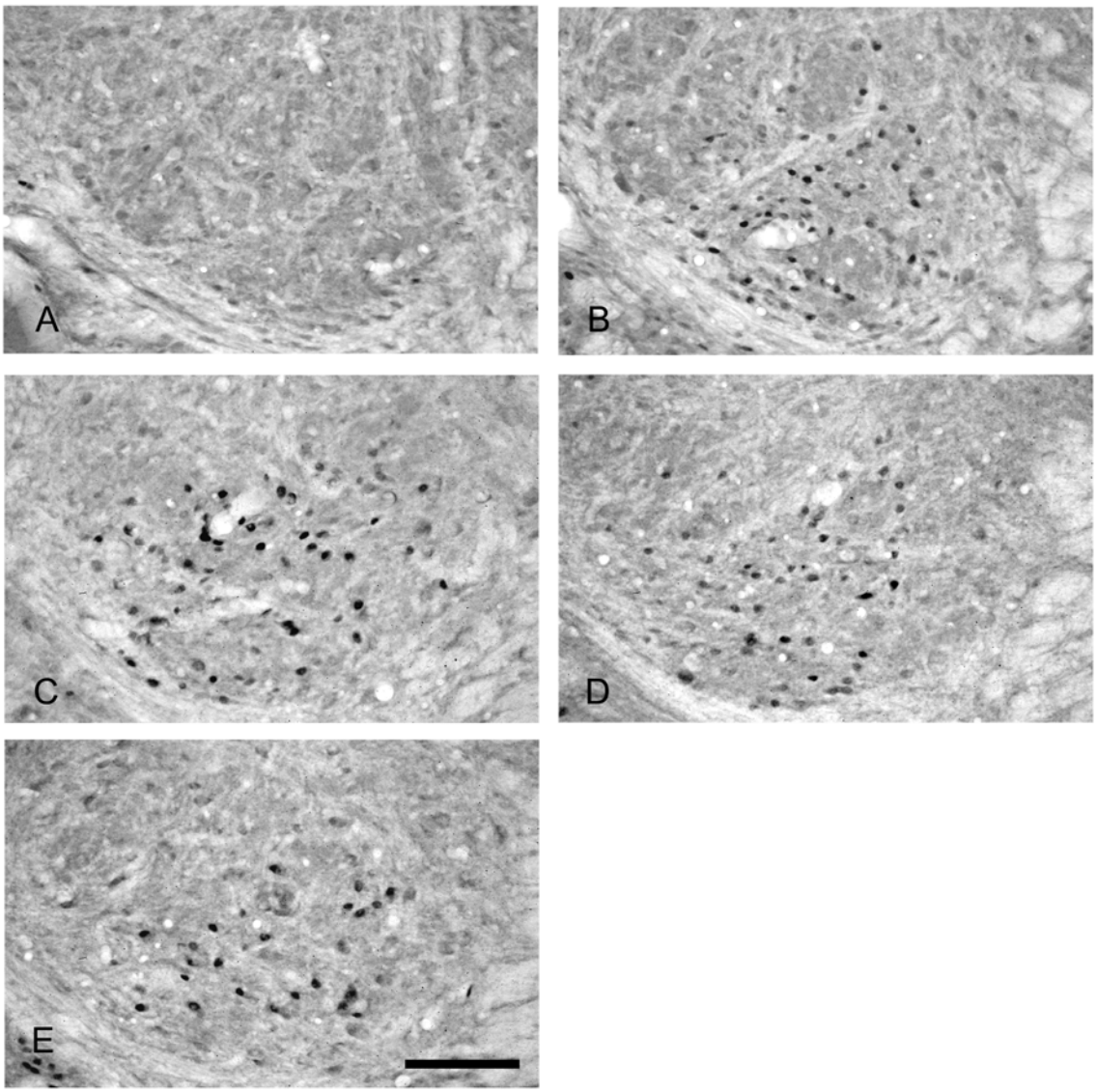
照片顯示神經胜肽 Y 免疫反應纖維在楔狀神經核中段區域的表現情形。控制組(A, B)與正中神經截斷後四週未給予電刺激(左側圖片)或是給予電刺激(右側圖片)分別在生理食鹽水處理組(C, D), 1% lidocaine 處理組(E, F), 5% lidocaine 處理組(G, H) 和 10% lidocaine 處理組(I, J) 神經胜肽 Y 免疫反應纖維的表現情形。 (游標尺 = 100 μm)

圖 2-2



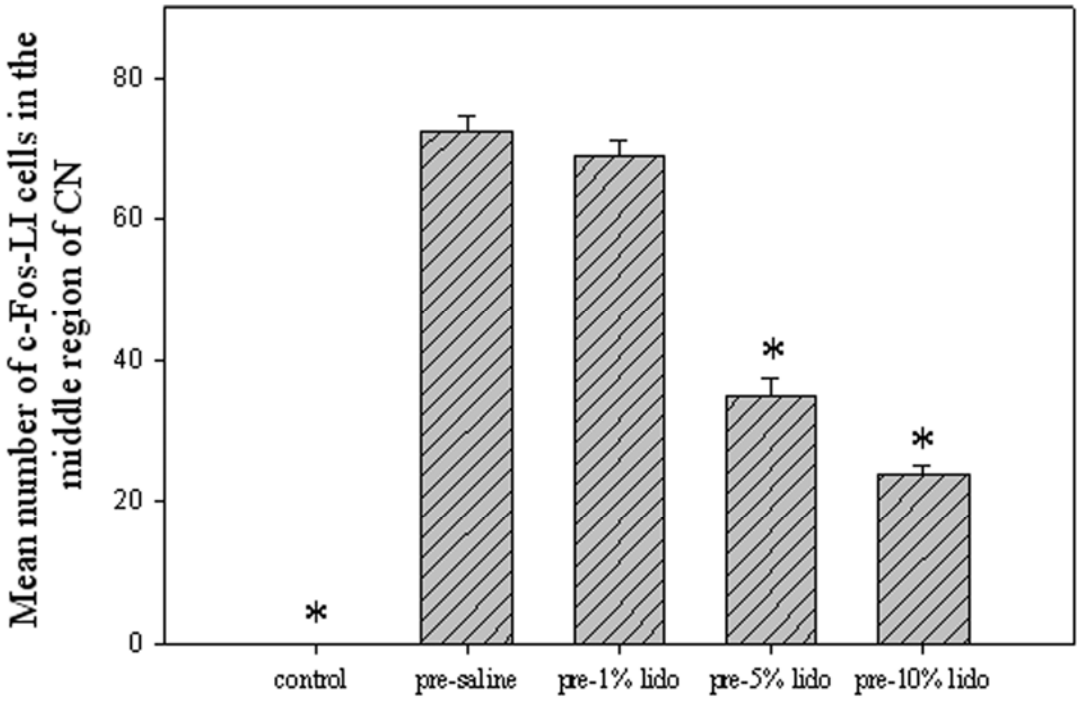
柱狀圖表示進行影像分析定量後，神經胜肽 Y 免疫反應纖維所佔楔狀神經核面積的百分比。黑色和白色條柱分別代表正中神經截斷四週後未給予電刺激(MNT)，或是給予電刺激(MNT+ES)的組別。神經胜肽 Y 免疫反應纖維所佔楔狀神經核面積的百分比除控制組外，在未給予電刺激的組別都顯著高於電刺激的組別。控制組無論有沒有進行電刺激都沒有顯著差異 (* P<0.05)。與生理食鹽水處理組相比無論有沒有電刺激，lidocaine 術前麻醉都能減少神經胜肽 Y 免疫反應纖維所佔楔狀神經核面積的百分比 (# P<0.05 相較於生理食鹽水處理組)。

圖 2-3



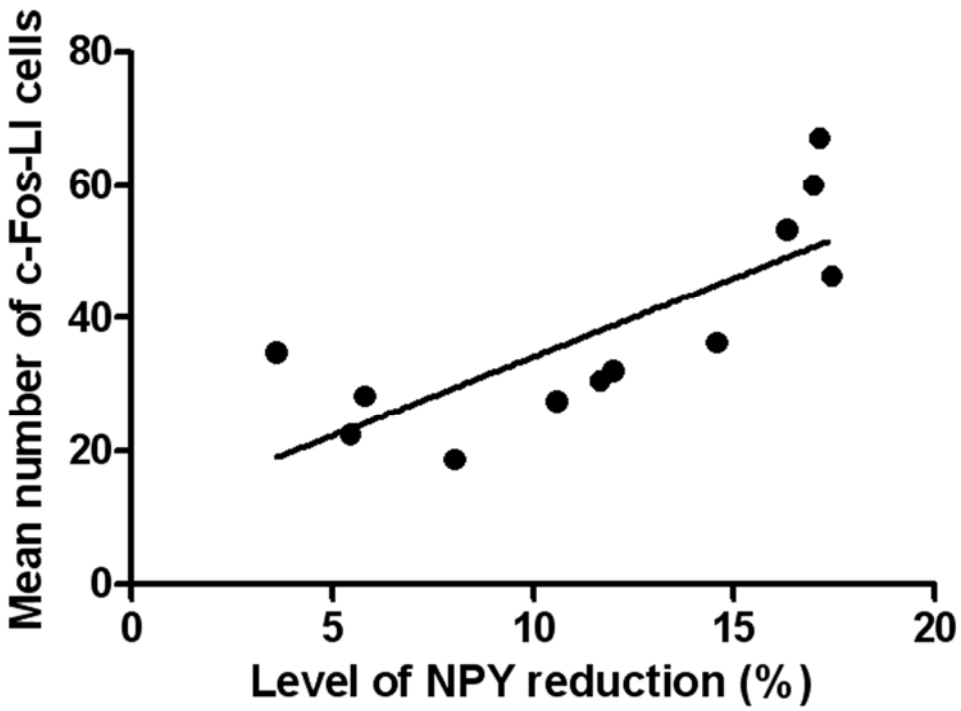
照片顯示 c-Fos 免疫反應神經元於正中神經截斷後給予電刺激同側之楔狀神經核中段區域在控制組(A)，生理食鹽水處理組(B)，1% lidocaine 處理組(C), 5% lidocaine 處理組(D) 和 10% lidocaine 處理組(E)的表現情形。(游標尺 = 100 μm)

圖 2-4



柱狀圖表示定量分析控制組與各處理組(生理食鹽水處理組, 1%, 5%,和 10% lidocaine 處理組),在神經截斷四週後給予電刺激, 同側楔狀神經核中 c-Fos 免疫反應神經元表現的數量。在 5% 和 10% lidocaine 處理組中 c-Fos 免疫反應神經元表現的數量顯著低於生理食鹽水處理組 (* P<0.05 相較於生理食鹽水處理組)。

圖 2-5



楔狀神經核中 c-Fos 免疫反應神經元與電刺激後所減少神經胜肽 Y 免疫反應纖維所佔面積百分比之線性回歸分析。每點代表各別實驗動物之數值(r = 0.77, P<0.05) 。

圖 3-1

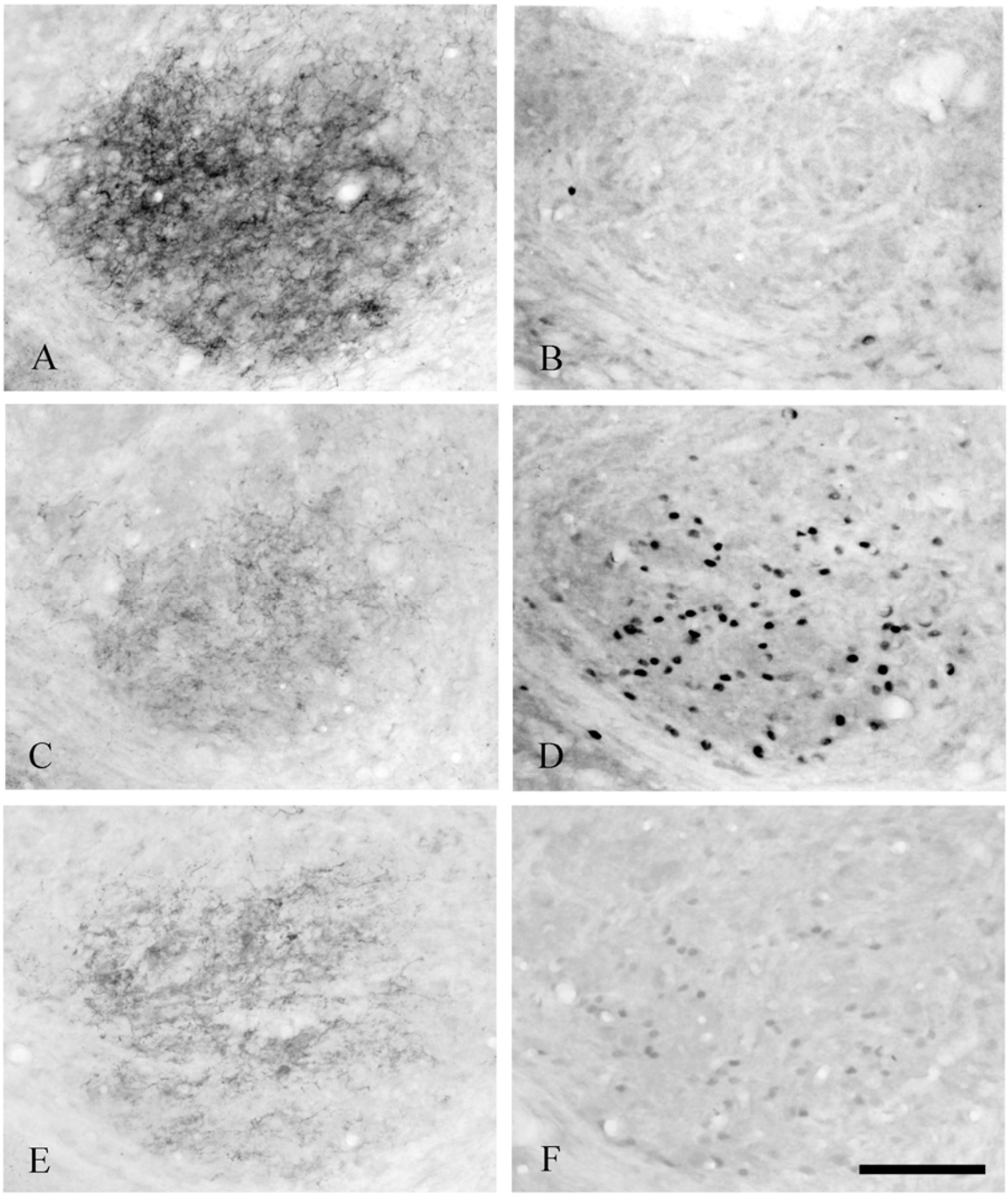
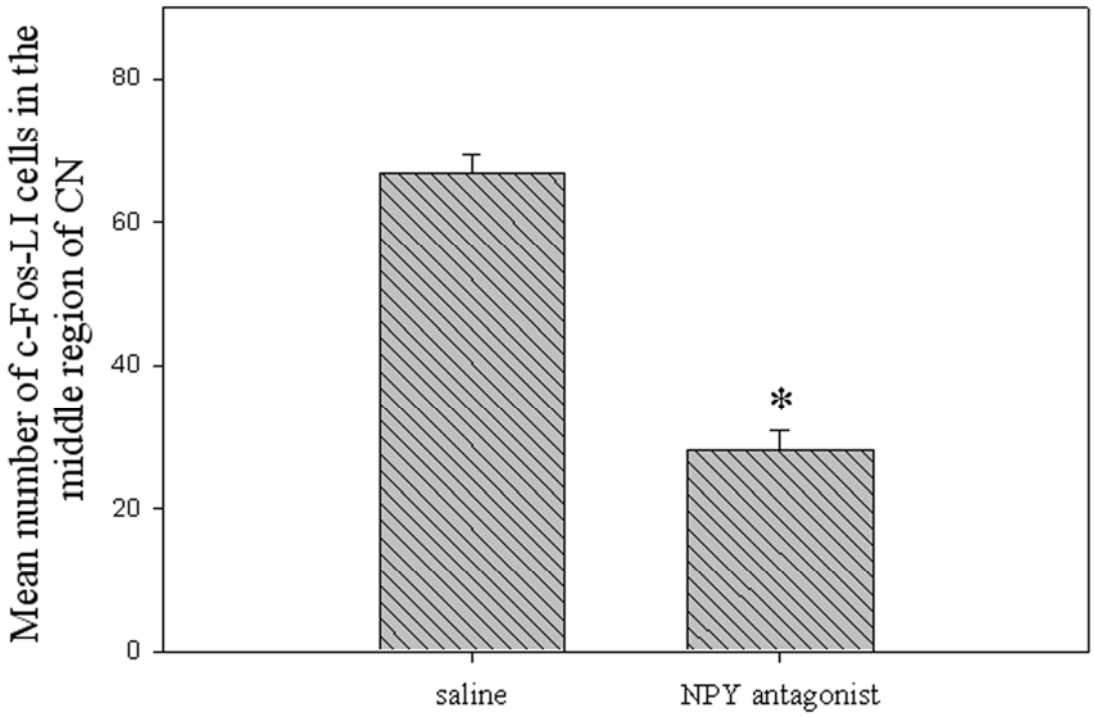


圖 3-1

照片顯示楔狀神經核中段區域神經胜肽 Y 免疫反應纖維(A, C, E)與 c-Fos 免疫反應神經元(B, D, F)，正中神經截斷四週後，使用立體定位儀在楔狀神經核吻端注射生理食鹽水處理(A-D)或是神經胜肽 Y 受體拮抗劑(E, F)，之後分別給予電刺激(C-F)或是不給予電刺激(A, B)處理。結果顯示神經胜肽 Y 免疫反應纖維在電刺激後(C, E)，相較於沒有電刺激處理的組別(A)顯著的減少。在此同時 c-Fos 免疫反應神經元只會表現在有電刺激處理的組別(D, F)，而 c-Fos 免疫反應神經元的表現量則因神經胜肽 Y 受體拮抗劑處理(F)而低於生理食鹽水組(D)。

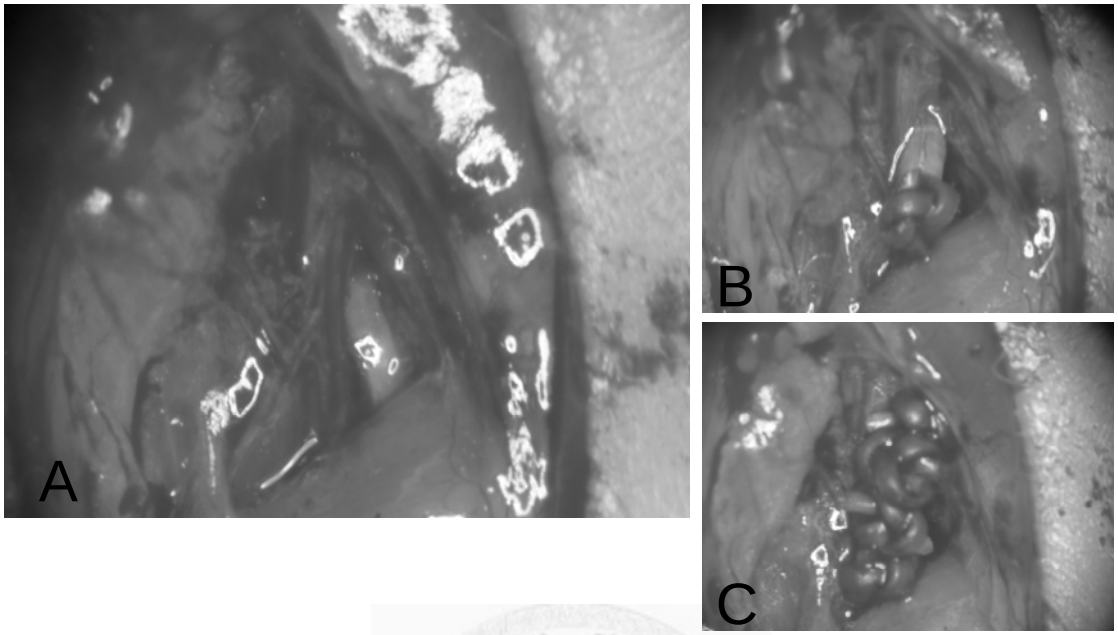
(游標尺= 100 μm)

圖 3-2



柱狀圖表示電刺激前給予生理食鹽水或是神經胜肽 Y 受體拮抗劑，楔狀神經核中 c-Fos 免疫反應陽性神經元數量的比較。 結果顯示神經胜肽 Y 受體拮抗劑處理後 c-Fos 免疫反應神經元相較於生理食鹽水處理組顯著下降(＊P<0.05 相較於生理食鹽水處理組)。 由此可知楔狀神經核中 c-Fos 免疫反應神經元之表現, 受到電刺激所釋放出的神經胜肽 Y 所誘發。

圖 4-1



正中神經慢性纏繞傷害模式圖

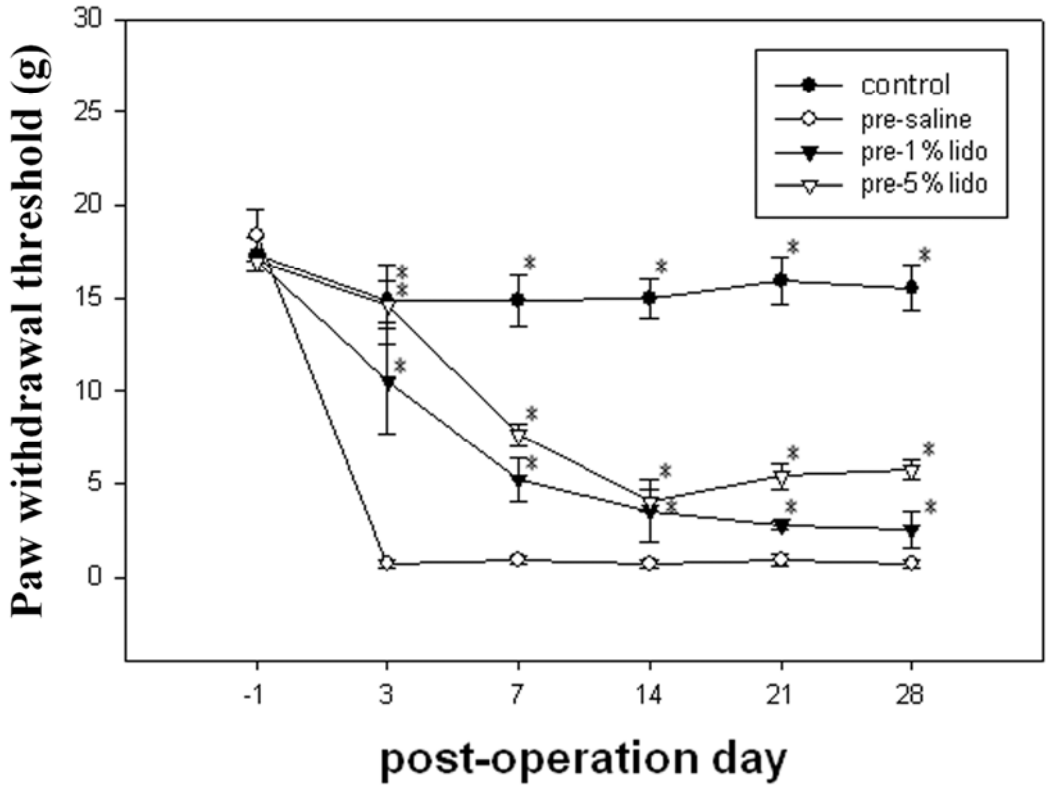
本部分實驗所使用之神經傷害動物模式參照 Bennett 等學者在 1988 年所發表的慢性纏繞傷害（chronic constriction injury）誘發模式。

(A) 於肘窩位置將皮膚切開,正中神經位於 radial a.和 ulnar a.間的分岔處,並會穿入 pronator teres muscle 下方。

(B) 將游離出來的正中神經以 4-0 型號的鉻化羊腸線打上鬆的節兩端打結。

(C) 最終在正中神經打上四個結。

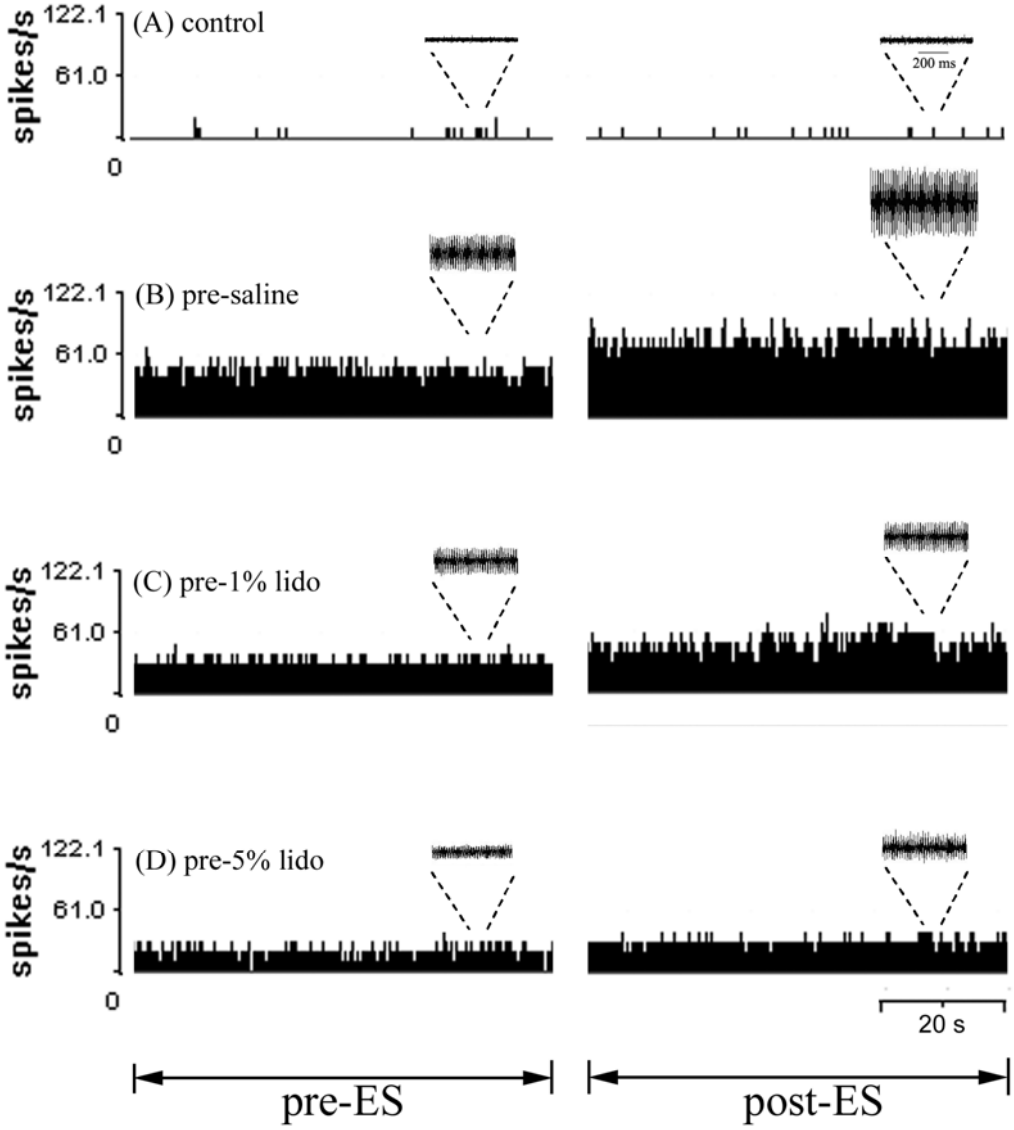
圖 4-2



術前給予生理食鹽水或是不同濃度 lidocaine 處理, 對於正中神經慢性纏繞傷害後機械性刺激腳掌回縮閾值 (paw withdrawal threshold) 的影響。動物在慢性纏繞傷害前一天與手術後不同時間點進行行為測試, 測試結果發現控制組的動物在 28 天的實驗時程中, 其腳掌回縮閾值都沒有顯著的變化。而生理食鹽水處理組在手術後三天, 其腳掌回縮閾值明顯降低產生了機械刺激痛覺過敏(mechanical allodynia), 並持續到 28 天。術前給與 lidocaine 處理,可隨劑量增加而延遲並減緩後機械刺激痛覺過敏現象的發生。

(* P<0.05 在各個不同測試時間點相較於生理食鹽水處理組)

圖 4-3



正中神經在電刺激前(pre-ES)與電刺激後(post-ES)的神經傷害性異位放電電生理紀錄圖。各組別分別為控制組(control, A), 生理食鹽水處理組(pre-saline, B), 1% lidocaine 處理組(pre-1% lido, C), 5% lidocaine 處理組(pre-5% lido, D)。 慢性纏繞傷害後所引起的劇烈異位性放電(B),隨著 lidocaine 術前麻醉處理的濃度提高而被抑制(C-D)。

表 4-1　　神經異位性放電之平均數值與分析比較

Group	Pre-ES	Post-ES
Control	8.21±0.48 Hz	7.65±0.95 Hz
Pre-saline	91.86±4.39 Hz	137.39±23.90 Hz *
Pre-1% lido	50.31±2.90 Hz	56.86±2.97 Hz *
Pre-5% lido	23.76±0.57 Hz	32.86±2.10 Hz *

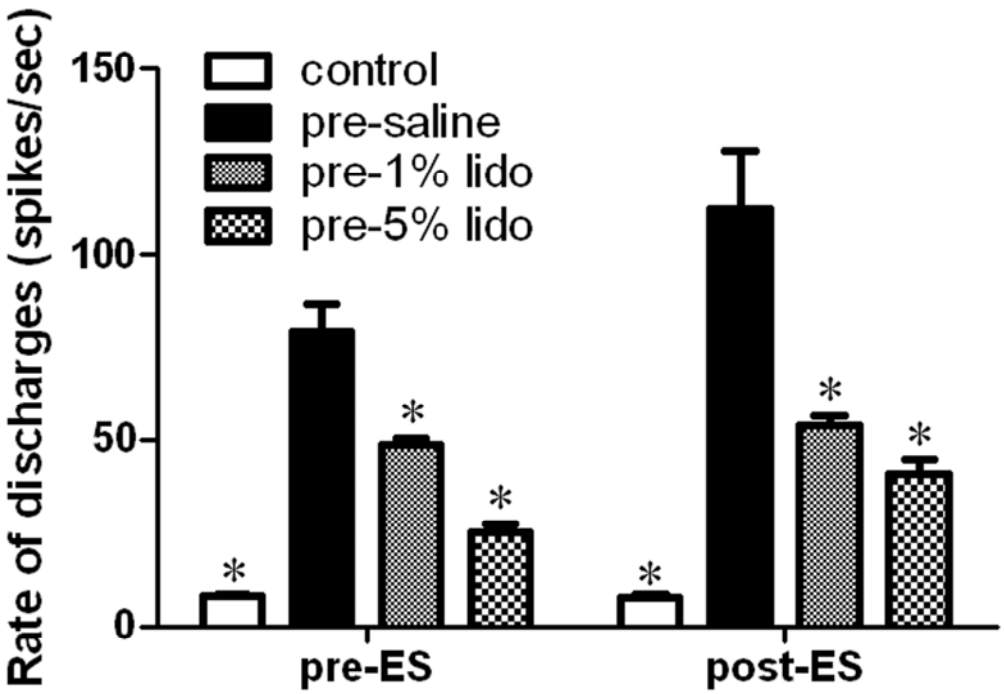
數據以平均值±標準差（mean±SEM）方式呈現

控制組: 只進行電刺激前後各時間點的神經電生理紀錄。

ES: 電刺激(electrical stimulation)

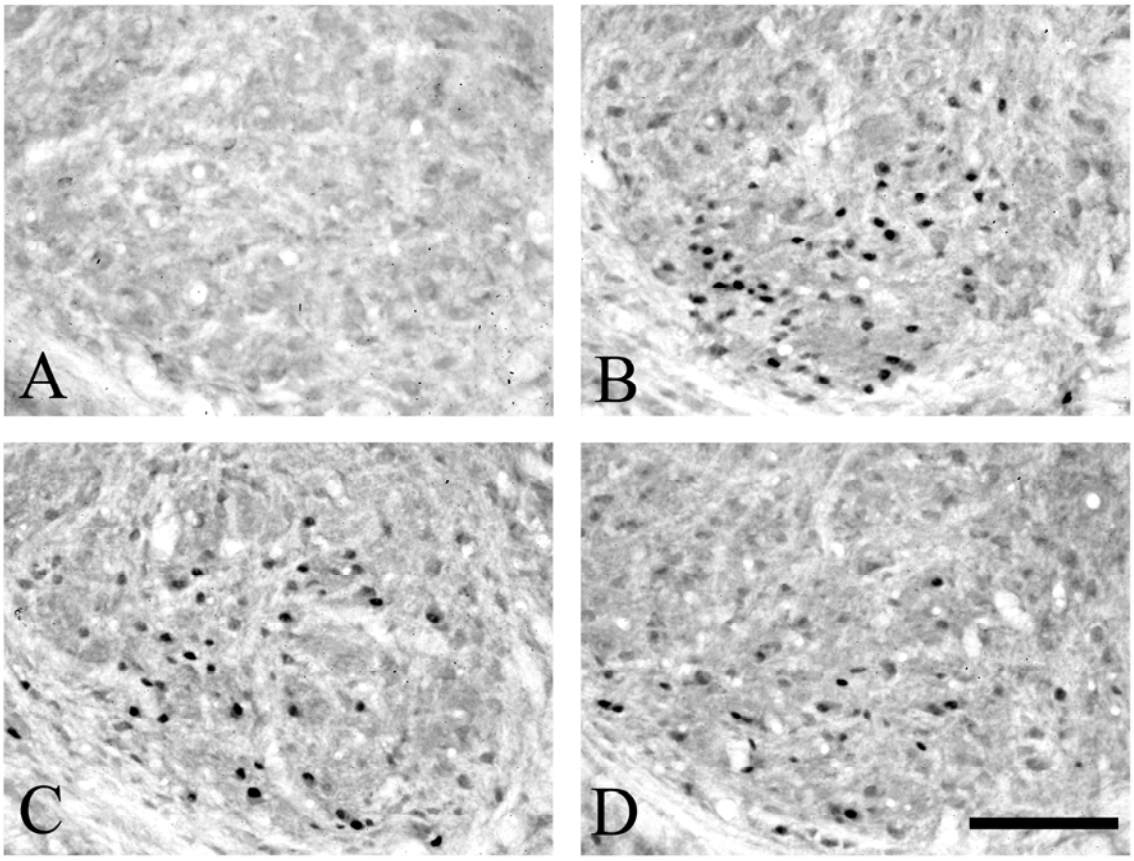
* P<0.05 相較於電刺激前（Pre-ES）

圖 4-4



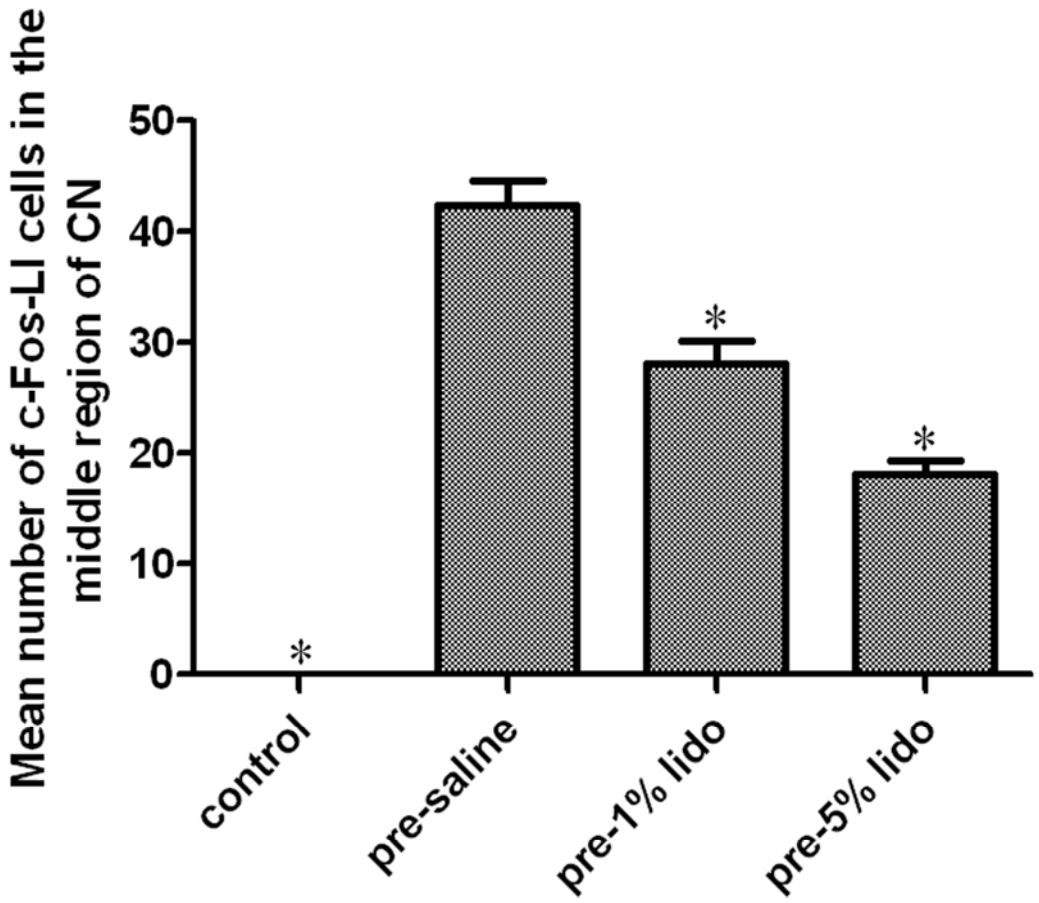
各處理組在電刺激前後(pre-ES/post-ES)異位性放電頻率(spikes/sec)的變化。生理食鹽水處理組的放電頻率顯著高於控制組，而放電頻率隨著 lidocaine 術前麻醉處理的濃度提高而降低。相較於生理食鹽水處理組, lidocaine 處理組顯著的降低了異位性放電頻率(* P<0.05 相較於生理食鹽水處理組)。

圖 4-5



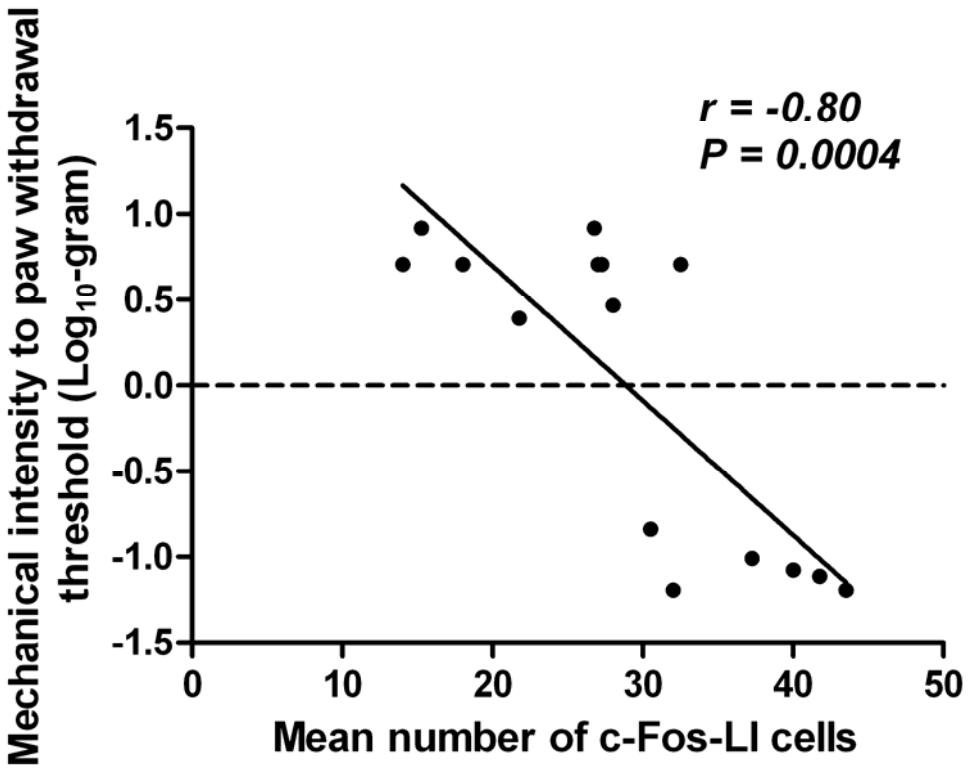
照片顯示正中神經慢性纏繞傷害四週後給予電刺激, c-Fos 免疫反應神經元位於纏繞傷害同側之楔狀神經核中段區域在控制組(A)，生理食鹽水處理組(B)，1% lidocaine 處理組(C)和 5% lidocaine 處理組(D)的表現情形。(游標尺 = 100 μm)

圖 4-6



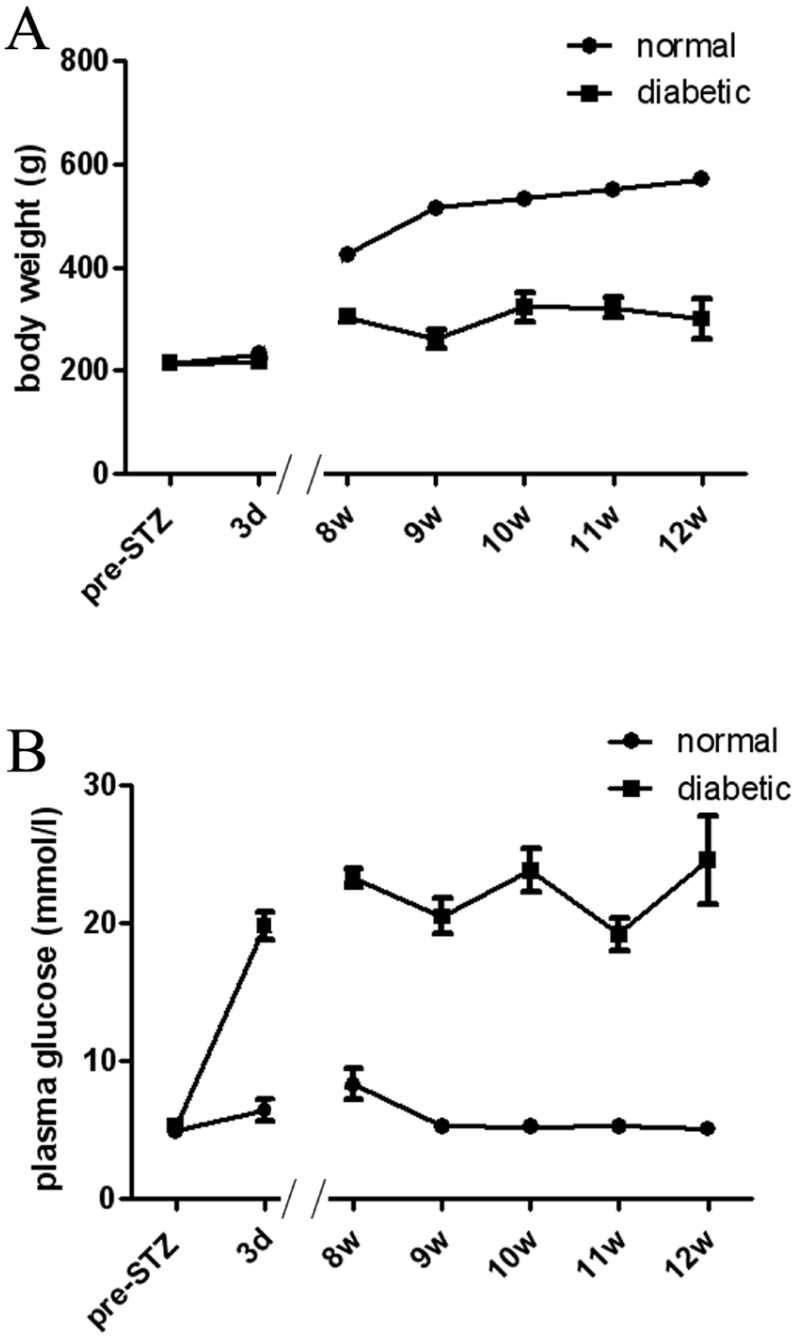
柱狀圖表示定量分析控制組(control), 生理食鹽水處理組(pre-saline), 1% lidocaine 處理組 (pre-1% lido)和 5% lidocaine 處理組(pre-5% lido),在神經慢性纏繞傷害四週後給予電刺激, 同側楔狀神經核中 c-Fos 免疫反應神經元表現的數量。在控制組, 1% 和 5% lidocaine 處理組中 c-Fos 免疫反應神經元表現的數量顯著低於生理食鹽水處理組 (* P<0.05 相較於生理食鹽水處理組)。

圖 4-7



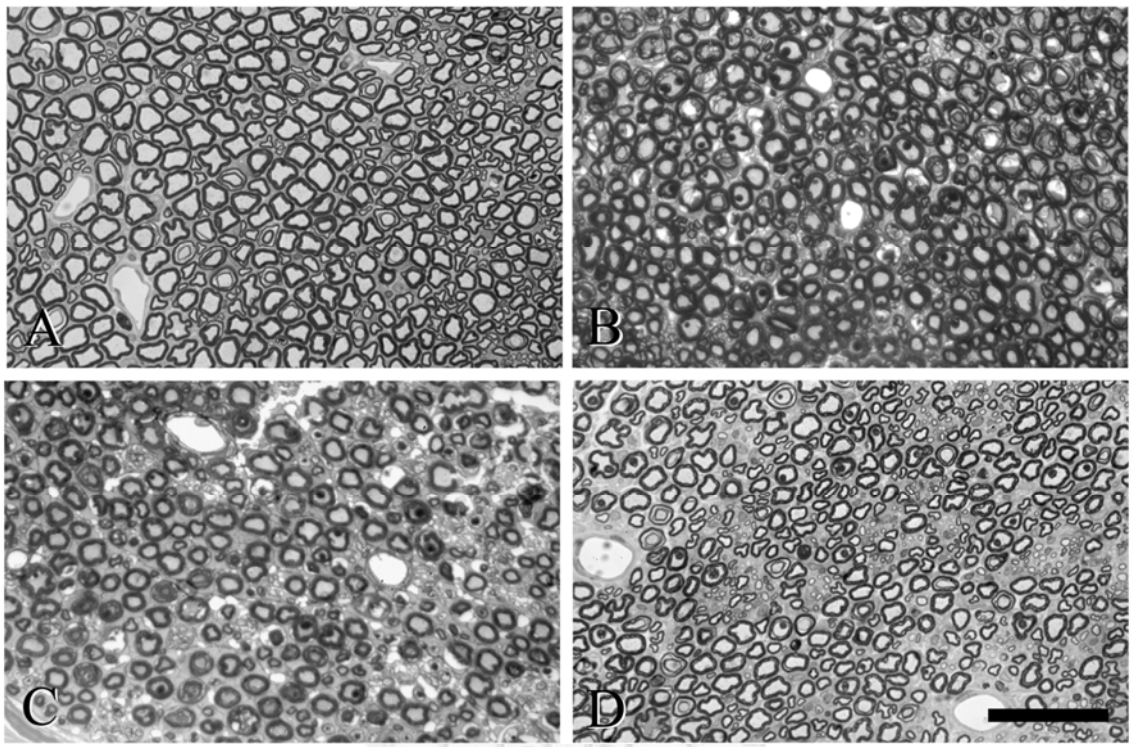
慢性纏繞傷害四週後，將個別動物楔狀神經核中 c-Fos 免疫反應神經元數量與腳掌回縮閾值(以 10 為底取對數)進行線性迴歸分析。結果顯示 c-Fos 免疫反應神經元數量與腳掌回縮閾值呈顯著負相關（r = -0.80, P<0.005)。

圖 5-1



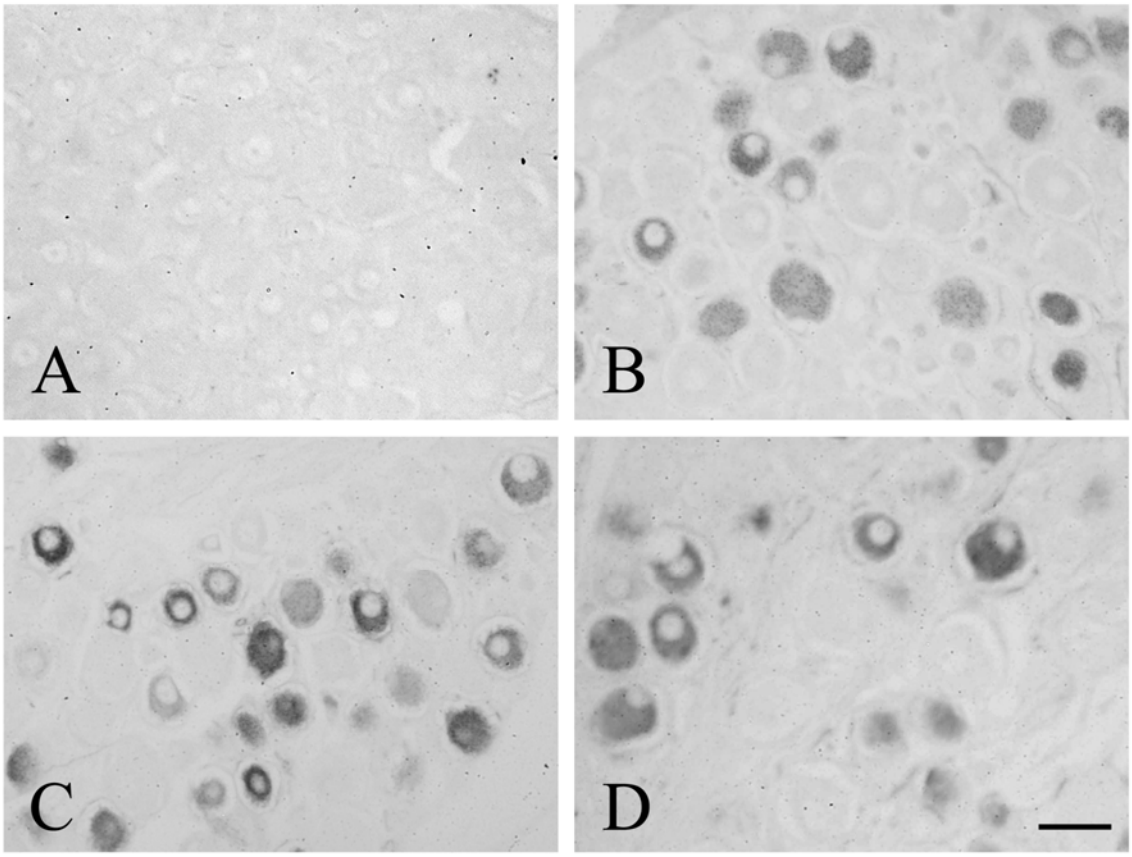
實驗過程中糖尿病與非糖尿病大白鼠其體重(A)與血糖(B)在不同測試時間點表現的變化量。

圖 5-2



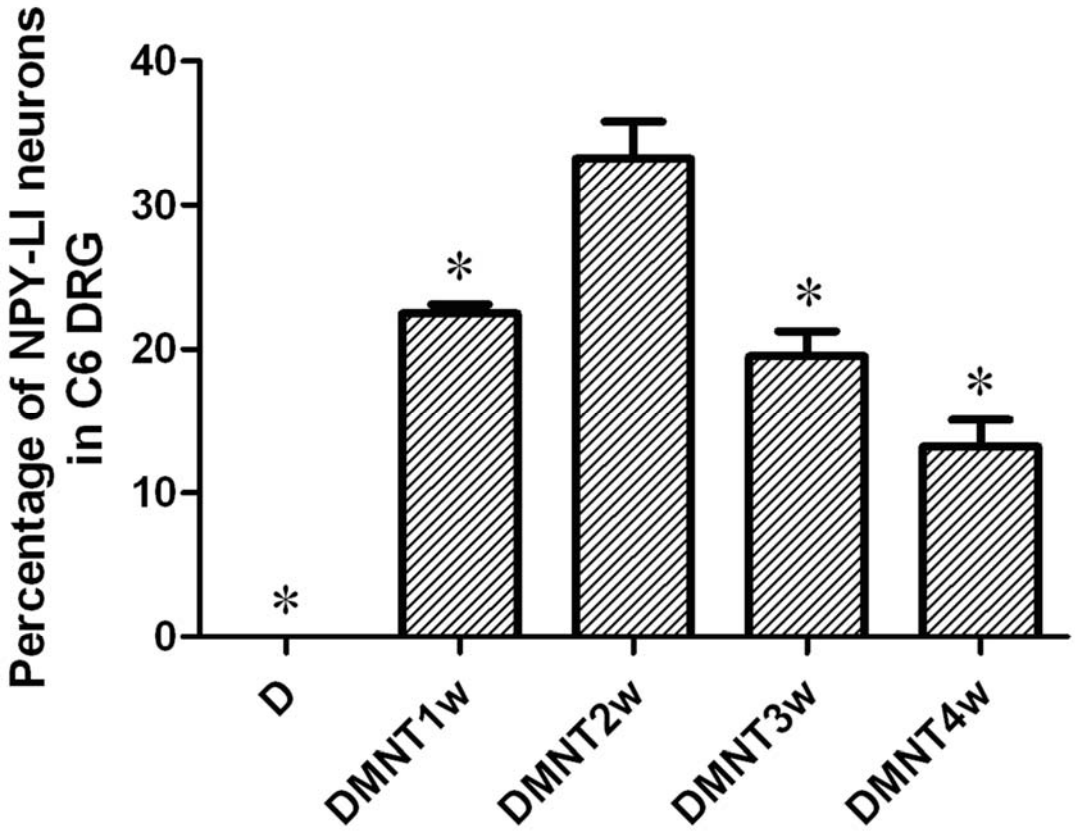
照片所示為糖尿病大白鼠未受神經截斷（A）或是神經截斷後一週(B)，兩週（C）以及四週（D)的神經，經過樹脂包埋切薄片後，以甲苯胺藍（toluidine blue）染色的結果。在神經截斷的組別可觀察到許多退化的神經纖維(B，C，D)，但在糖尿病大白鼠沒有神經截斷的組別(A)則無法觀察到神經纖維退化的現象。（游標尺 = 50μm）

圖 5-3



照片所示為糖尿病大白鼠未受正中神經截斷（A）或是正中神經截斷後一週（B），兩週（C）以及四週（D)第六頸髓背根神經節中神經胜肽 Y 的表現情形。在糖尿病大白鼠沒有神經截斷的組別(A)，幾乎無法偵測到神經胜肽 Y 免疫反應的神經元，但在糖尿病合併正中神經截斷不同存活週數的組別，則可觀察到許多明顯的神經胜肽 Y 免疫反應神經元(B，C，D)。(游標尺 = 50 μm)

圖 5-4



柱狀圖所示為糖尿病大白鼠合併正中神經截斷後,第六頸髓背根神經節中神經胜肽 Y 的定量分析結果。在糖尿病大白鼠沒有神經截斷的組別(D), 幾乎無法偵測到神經胜肽 Y 免疫反應的神經元, 但在糖尿病大白鼠合併正中神經截斷後, 第六頸髓背根神經節中神經胜肽 Y 免疫反應的神經元開始大量增加,並在正中神經截斷後兩週(DMNT2w)達到最高峰, 之後開始逐漸下降 (＊P<0.05 相較於正中神經截斷後兩週)。

圖 5-5

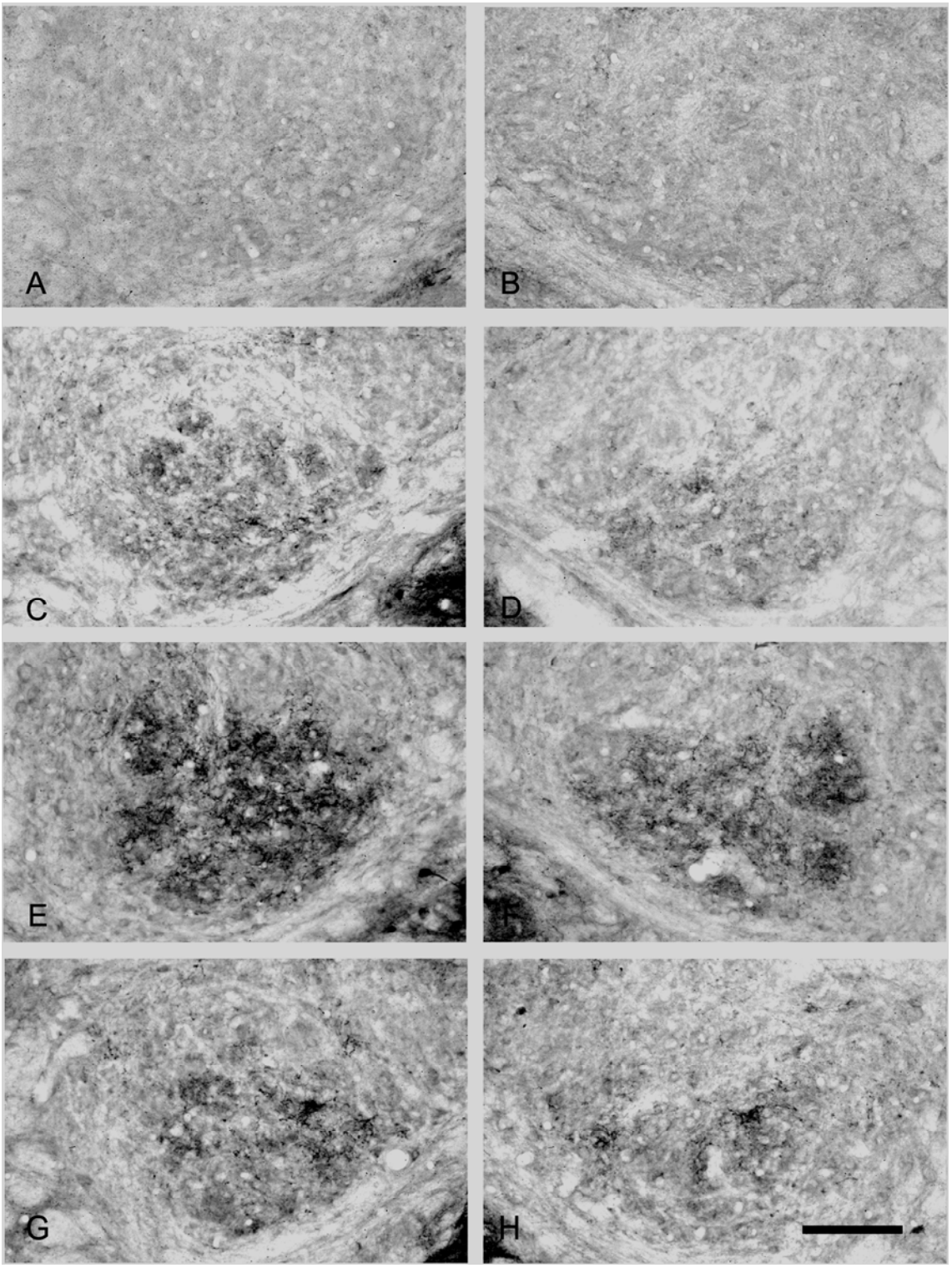
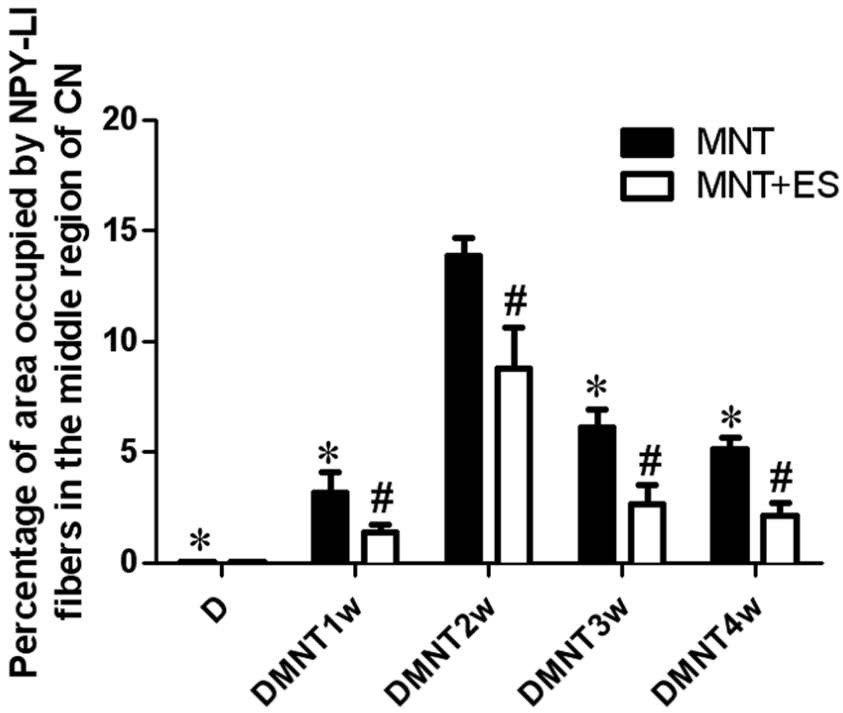


圖 5-5

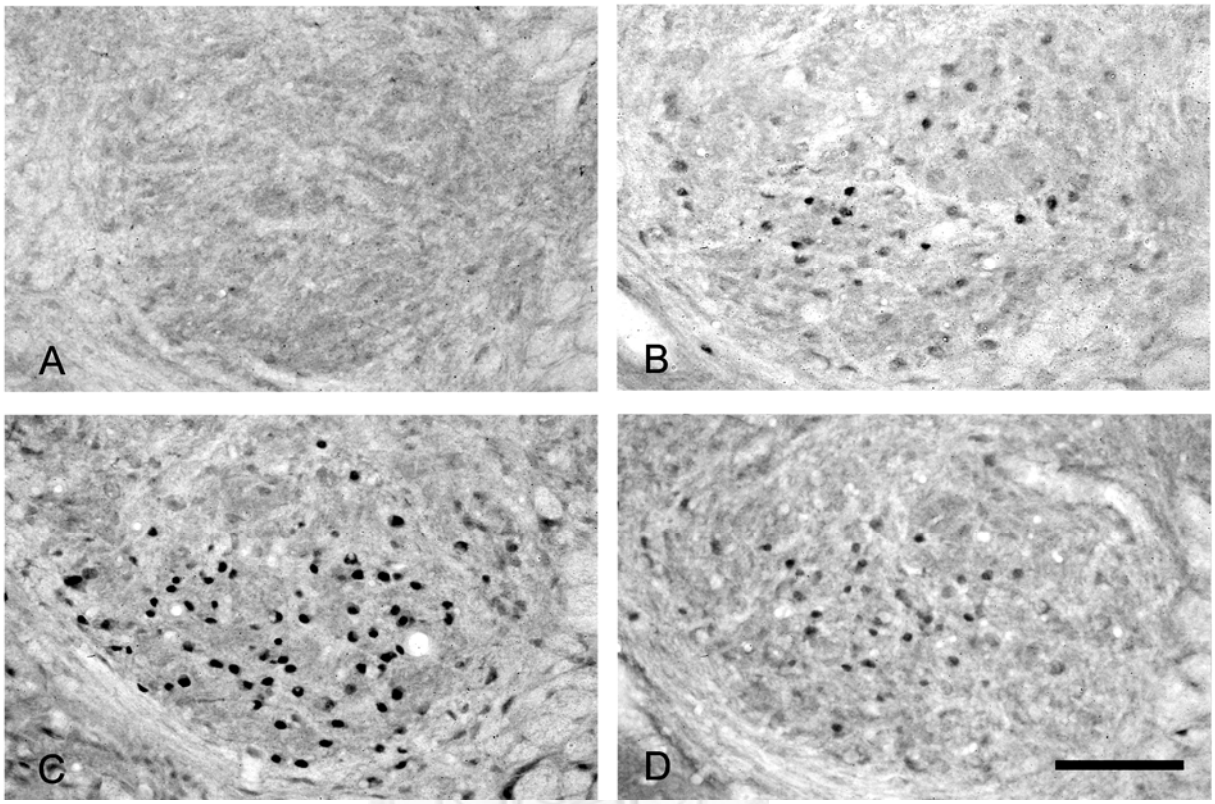
照片顯示糖尿病大白鼠合併正中神經截斷後神經胜肽 Y 免疫反應纖維在楔狀神經核中段區域的表現情形。糖尿病組(未進行正中神經截斷, A, B)與糖尿病大白鼠合併正中神經截斷未給予電刺激(左側圖片)或是給予電刺激(右側圖片)分別在正中神經截斷一週(C, D), 兩週(E, F) 與四週 (G, H) 神經胜肽 Y 免疫反應纖維的表現情形 (游標尺 = 100 μm)。

圖 5-6



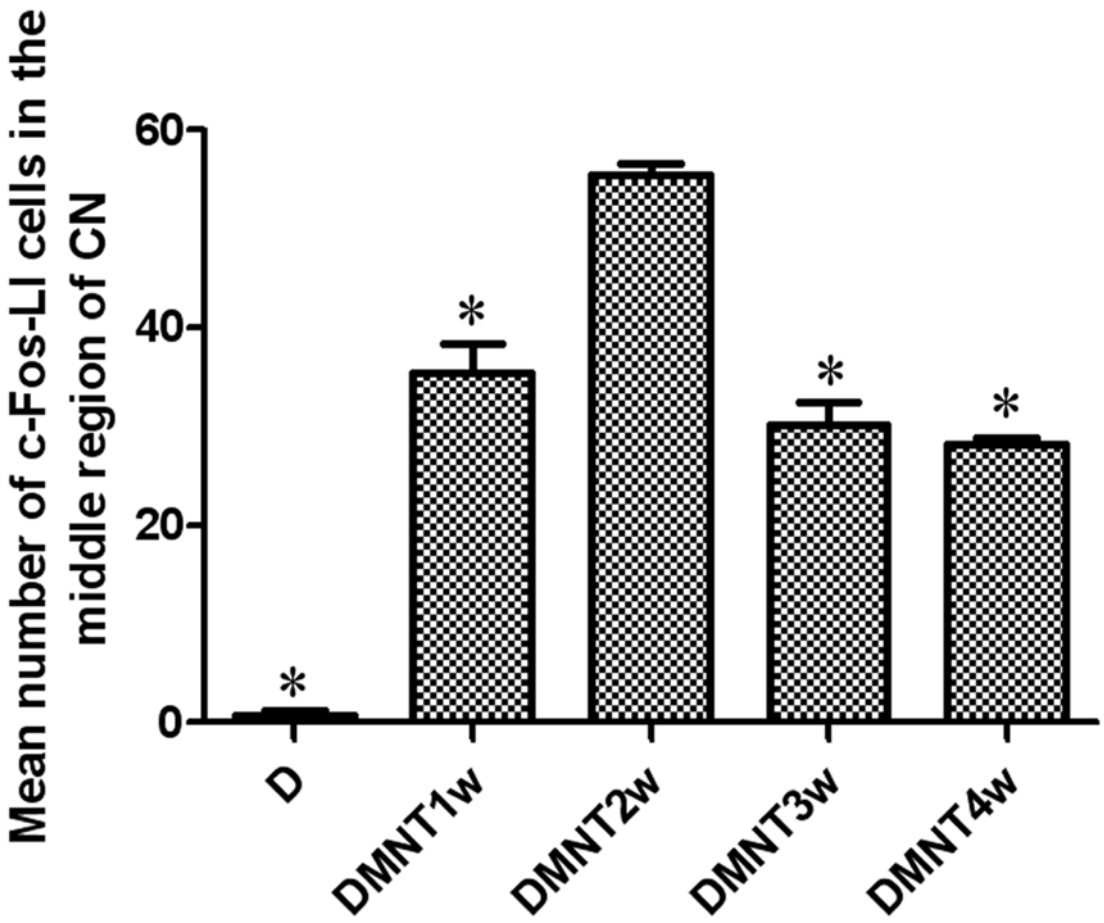
柱狀圖表示進行形態分析定量後，神經胜肽 Y 免疫反應纖維所佔楔狀神經核面積的百分比。黑色和白色條柱分別代表糖尿病組(未進行正中神經截斷)與糖尿病合併正中神經截斷 1-4 週後, 未給予電刺激(MNT)，或是給予電刺激(MNT+ES)的組別。神經胜肽 Y 免疫反應纖維所佔楔狀神經核面積的百分比, 除糖尿病組外，在未給予電刺激的組別都顯著高於電刺激的組別(# P<0.05 相較於未給予電刺激的組別)。而控制組無論有沒有進行電刺激都無顯著差異。神經胜肽 Y 免疫反應纖維佔楔狀神經核面積的百分比, 在糖尿病合併正中神經截斷後兩週(DMNT2w)達到最高峰, 之後開始逐漸下降 (* P<0.05 相較於正中神經截斷後兩週) 。

圖 5-7



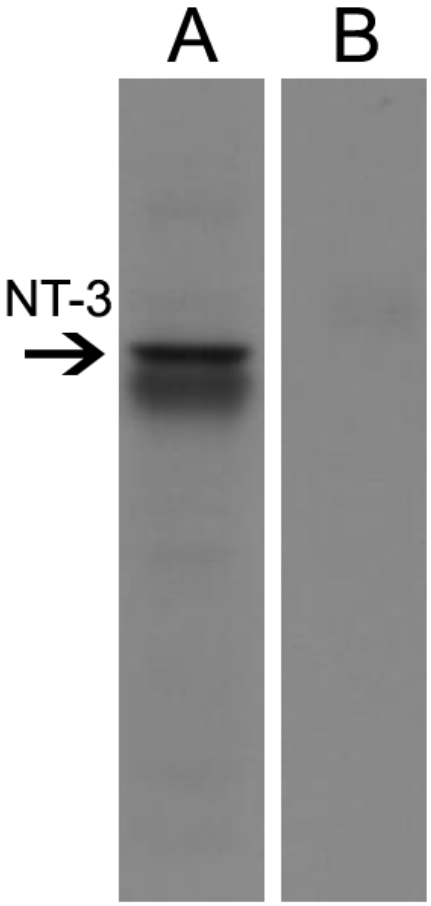
照片顯示 c-Fos 免疫反應神經元於正中神經截斷後給予電刺激同側之楔狀神經核中段區域在糖尿病組(A)，糖尿病正中神經截斷一週(B)，糖尿病正中神經截斷兩週(C), 糖尿病正中神經截斷四週(D)的表現情形。(游標尺 = 100 μm)

圖 5-8



柱狀圖表示定量分析糖尿病組(D)與糖尿病正中神經截斷不同週數組(DMNT1w-DMNT4w),在神經截斷後給予電刺激, 同側楔狀神經核中 c-Fos 免疫反應神經元表現的數量。在糖尿病正中神經截斷兩週組別(DMNT2w)，c-Fos 免疫反應神經元表現的數量顯著高於其他組別 (* P<0.05 相較於糖尿病正中神經截斷兩週組)。

圖 6-1



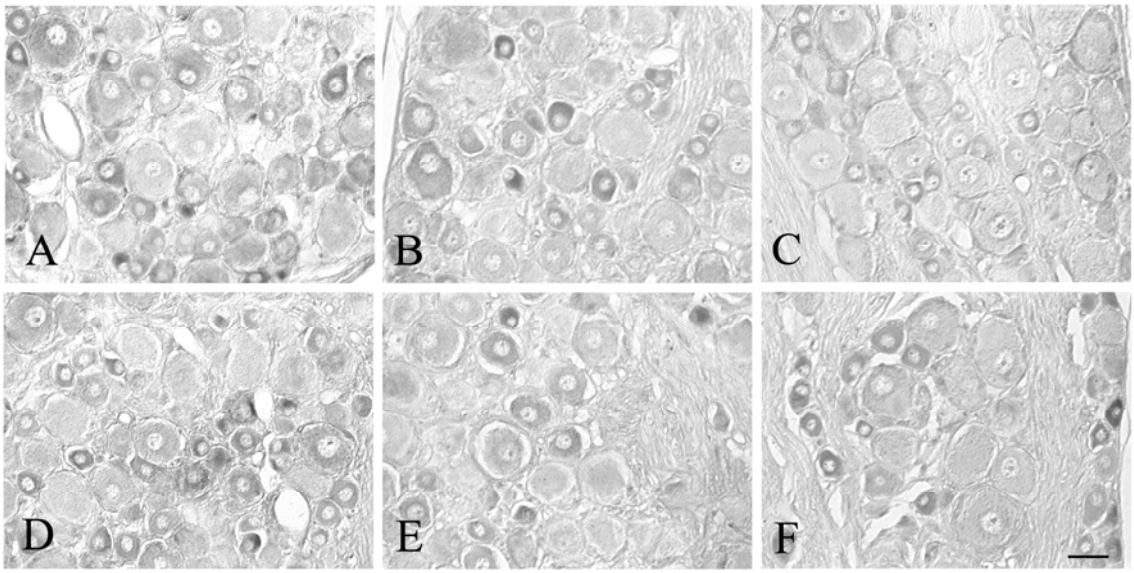
神經滋養素-3(NT-3)初級抗體免疫專一性分析

使用西方墨點法分析神經滋養素-3 初級抗體之專一性,

Lane A: 使用背根神經節組織,進行電泳後與神經滋養素-3 初級抗體進行反應, 可偵測到神經滋養素-3 之表現。

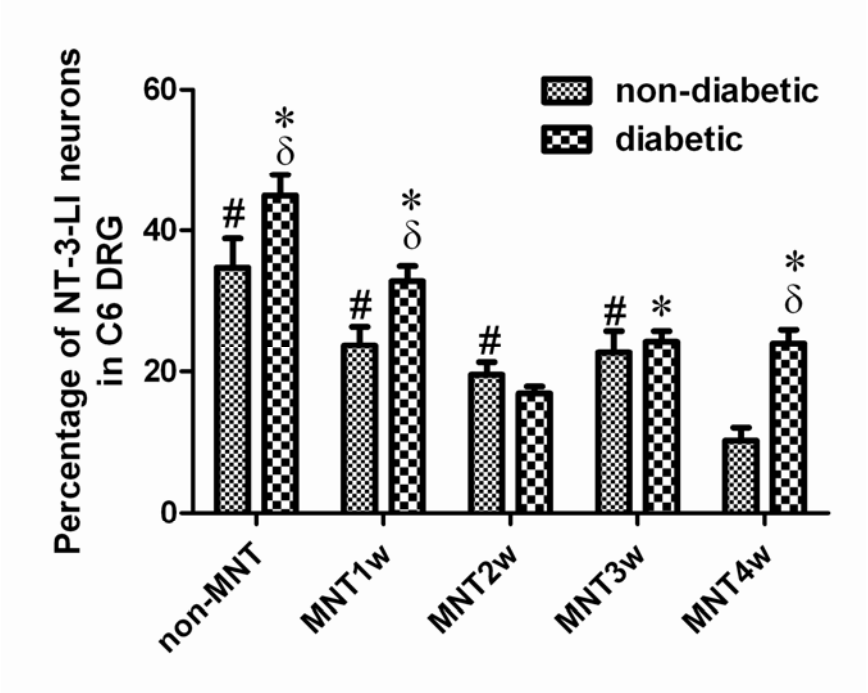
Lane B: 神經滋養素-3 初級抗體先與專一性之遮蔽胜肽(blocking peptide)作用,之後再與電泳後背根神經節組織進行反應。由於神經滋養素-3 初級抗體已經先與遮蔽胜肽結合,便無法再偵測到神經滋養素-3 的表現。

圖 6-2



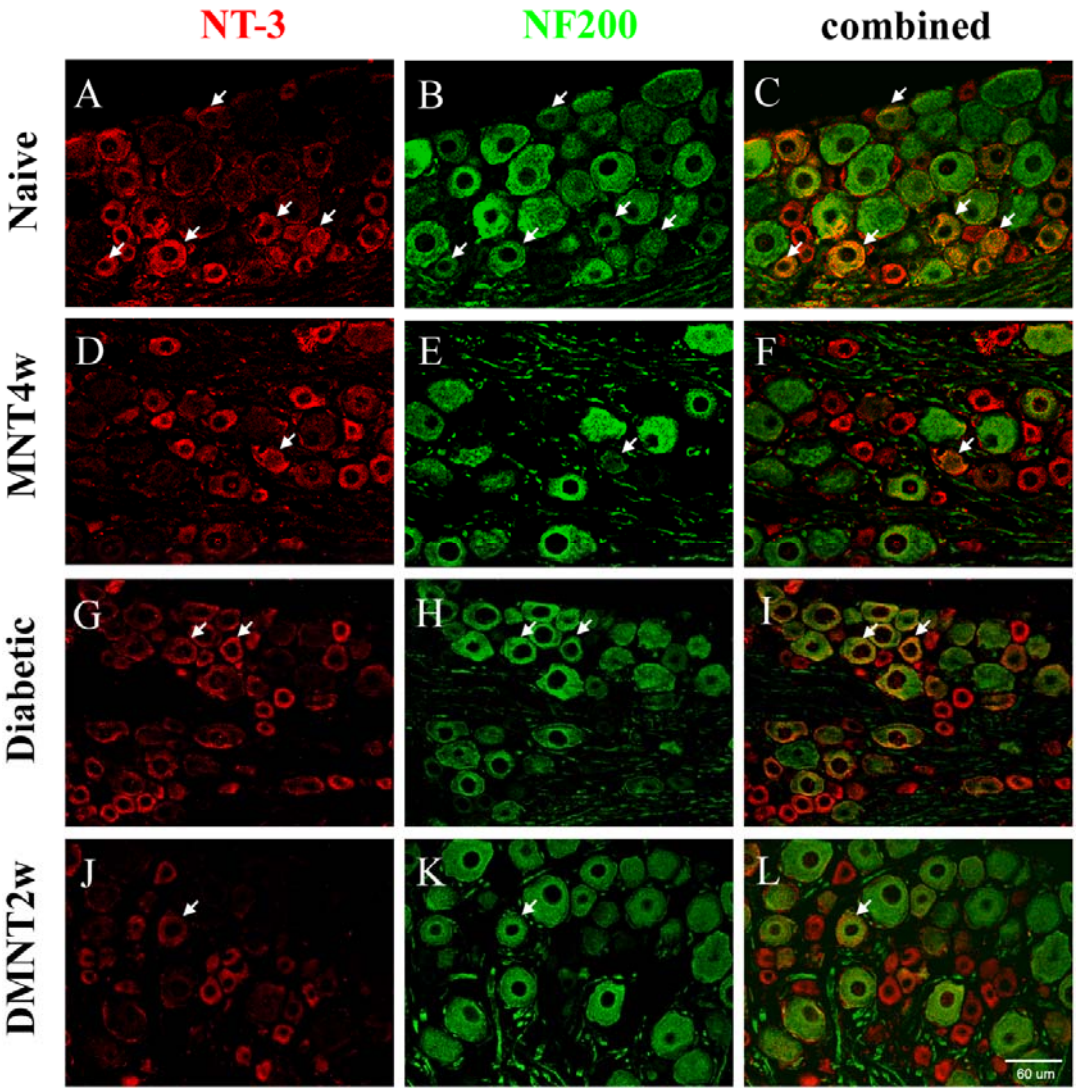
照片所示為神經滋養素-3於非糖尿病(A, B, C) 與糖尿病(D, E, F)大白鼠第六頸髓背根神經節中表現的情形。在正中神經未截斷的組別(A, D)可偵測到許多的神經滋養素-3 免疫反應的神經元, 但在正中神經截斷後兩週(B, E)與四週(C, F), 無論是非糖尿病或糖尿病的組別神經滋養素-3 免疫反應的神經元都明顯的減少(游標尺 = 50 μm)。

圖 6-3



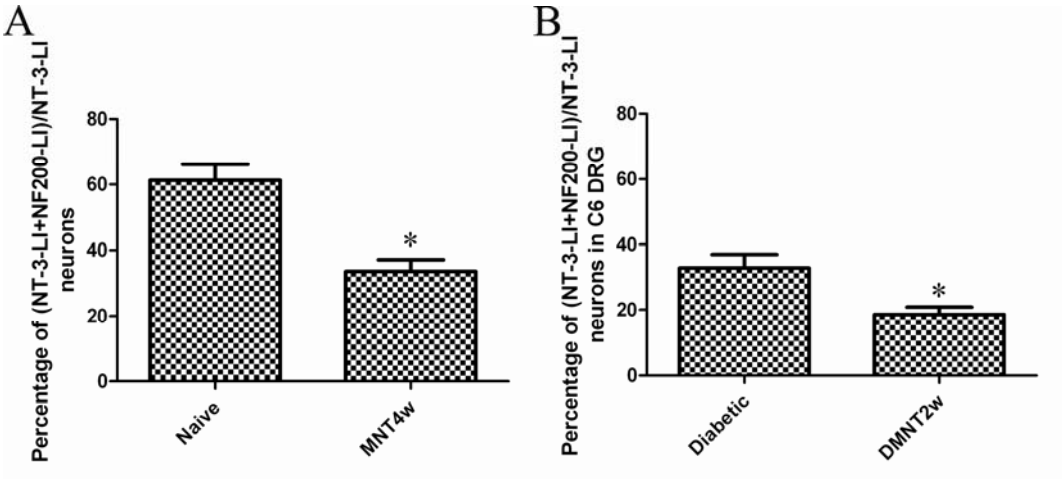
柱狀圖所示為非糖尿病與糖尿病合併正中神經截斷後神經滋養素-3 免疫反應的神經元在第六頸髓背根神經節中, 不同截斷時間點的表現情形。非糖尿病與糖尿病在未進行正中神經截斷時,都可偵測到大量的神經滋養素-3 免疫反應神經元。糖尿病合併正中神經截斷的組別,除了在正中神經截斷後兩週與三週的時間點外, 神經滋養素-3 免疫反應神經元所占背根神經元百分比都顯著高於非糖尿病合併正中神經截斷的組別 (δ P<0.05 相較於非糖尿病組於各時間點)。除此之外神經滋養素-3 免疫反應的神經元所占背根神經元百分比在非糖尿病合併正中神經截斷後四週與糖尿病合併正中神經截斷後兩週達到最低點(# P<0.05 相較於非糖尿病正中神經截斷四週; * P<0.05 相較於糖尿病正中神經截斷兩週)。

圖 6-4



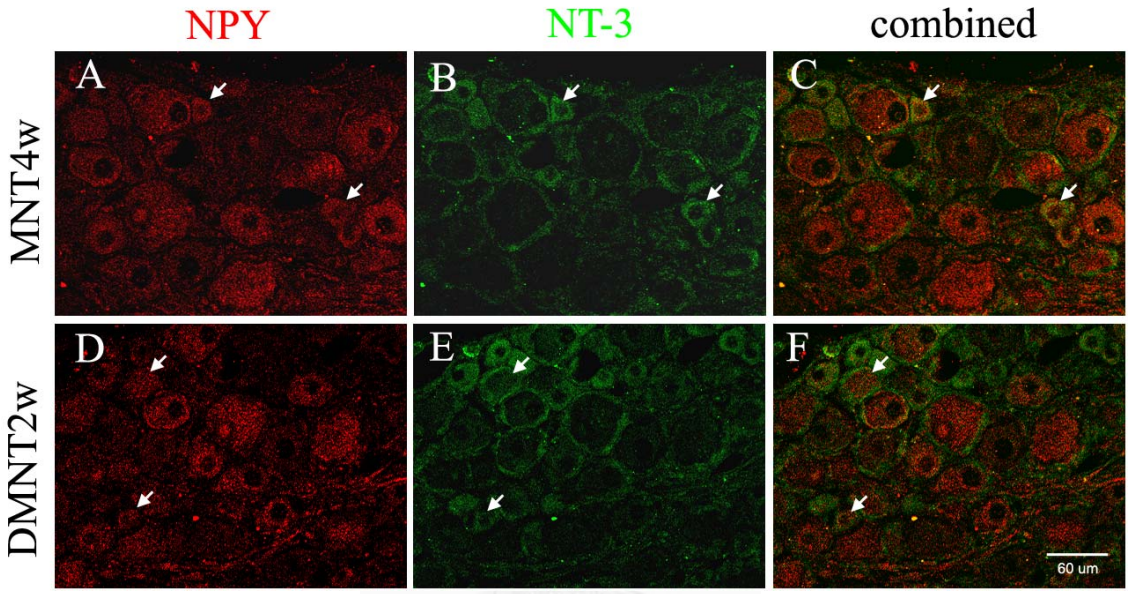
照片所示為免疫螢光雙重標誌分別偵測神經滋養素-3（NT-3）與神經纖維 200（NF200）在第六頸髓背根神經節中控制組(Naïve, A-C)、正中神經截斷四週（MNT4w, D-F)、糖尿病組（Diabetic, G-I）與糖尿病合併正中神經截斷兩週（DMNT2w, J-L）的表現情形。 箭號所指雙重標誌為神經滋養素-3 於大型神經元表現之標示, 而在神經截斷後雙重標定之背神經元在非糖尿病與糖尿病動物均明顯減少(C, F, I, L)（游標尺=60μm)。

圖 6-5



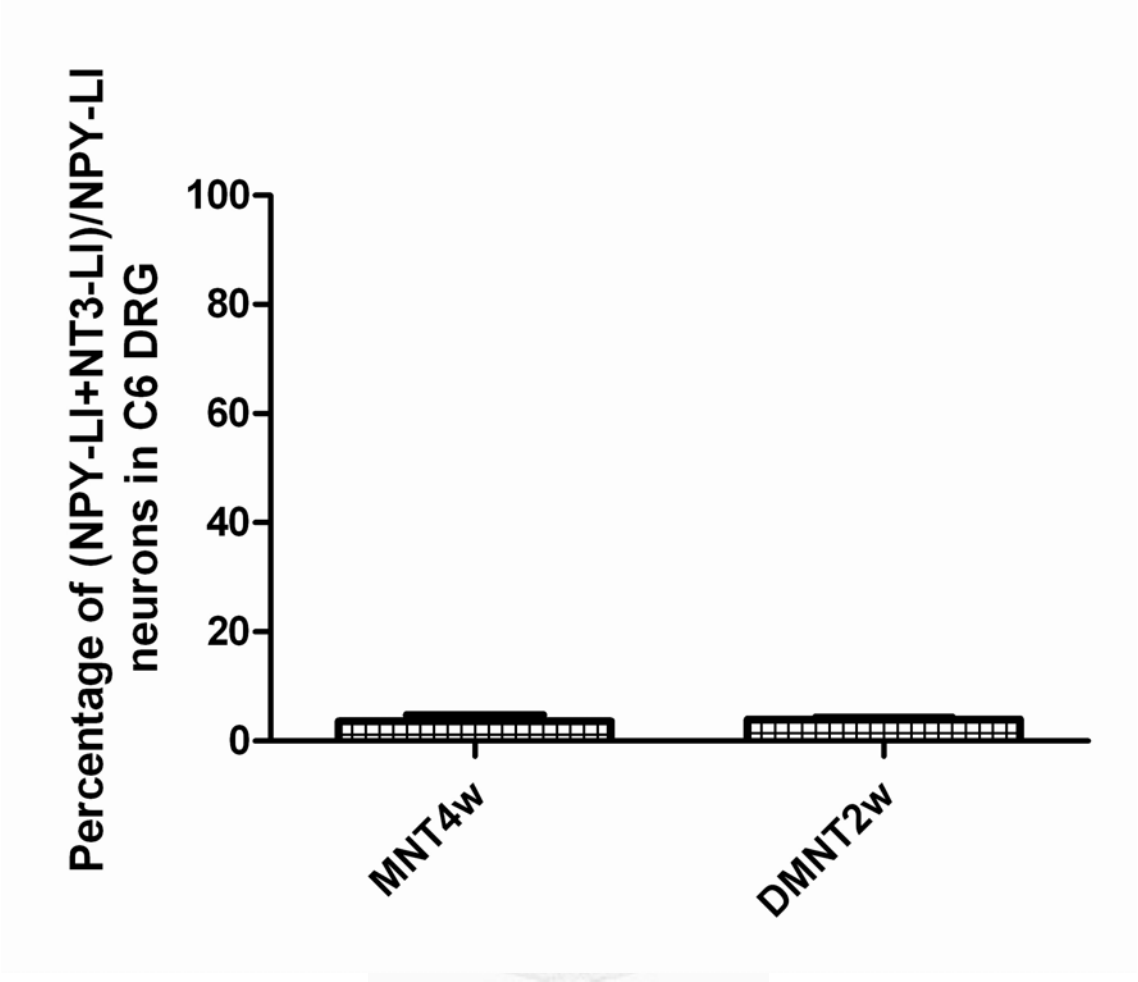
柱狀圖所示為神經滋養素-3（NT-3）與神經纖維 200(NF200)免疫螢光雙重標誌定量之結果，正中神經截斷後四週(A，MNT4w)與糖尿病合併正中神經截斷後兩週的表現情形(B，DMNT2w)。無論在糖尿病或是非糖尿病的組別中，正中神經截斷後雙重標誌所佔比例都明顯低於正中神經未截斷組（* $p<0.05$）。

圖 6-6



照片所示為免疫螢光雙重標誌分別偵測神經滋養素-3（NT-3）與神經胜肽 Y（NPY）在第六頸髓背根神經節中非糖尿病合併正中神經截斷四週與糖尿病合併正中神經截斷兩週的表現情形。箭號所指雙重標誌為神經滋養素-3 與神經胜肽 Y 雙重標誌之標示（游標尺=60μm）。

圖 6-7



柱狀圖所示為免疫螢光雙重標誌偵測神經滋養素-3(NT-3)與神經胜肽 Y(NPY)第六頸髓背根神經節中雙重標誌所佔神經胜肽 Y 免疫反應神經元百分比的結果。結果發現無論是非糖尿病正中神經截斷四週(MNT4w)或糖尿病正中神經截斷兩週(DMNT2w)都只有非常低的神經滋養素-3 與神經胜肽 Y 雙重標誌比例(大約 3%)。