

八十八會計年度國科會專題計畫成果報告

執行機關：國立台灣大學醫學院麻醉科

計畫編號：88-2314-B-002-307

計畫主持人：孫維仁

執行期限：87年8月1日至88年10月31日

應用基因治療方法抑制一氧化氮合成酵素於疼痛治療(第二年) Genetic Suppression of Nitric Oxide for Pain Management (II)

計畫成果摘要:

關鍵詞: L-NAME, c-fos proto-oncogene, nitric oxide, hyperalgesia, spinal cord

一、簡介 (Introduction)

爲了瞭解脊髓內不同層區之一氧化氮 nitric oxide 在疼痛傳遞的過程中扮演的角色，我們在脊髓腔注射不同劑量之一氧化氮酵素抑制劑 nitric oxide synthase inhibitor，並觀察福馬林測試誘發之疼痛反應以及不同層區之 c-Fos 蛋白質表現。L-NAME 在脊髓腔注射低或中劑量 L-NAME (100, 370, 1000 nm) 能以劑量依賴方式降低福馬林誘發之晚期階段疼痛反應，並抑制了位於脊髓中間層與深層之 c-Fos 蛋白質表現。而注射高劑量 L-NAME (3000 nm) 則降低了福馬林誘發之早、晚期階段疼痛反應，以及所有脊髓背角層區 c-Fos 蛋白質之表現。福馬林晚期階段疼痛反應與脊髓中間層、深層或者是全部的 c-Fos 標記神經細胞數量成有意義的正相關，而福馬林晚期階段疼痛反應與表淺層的 c-Fos 標記神經細胞數量則沒有任何顯著的相關。NOS 位在腰椎脊髓背角主要分布在淺層，我們的結果卻顯示，c-Fos 表現的抑制主要發生在脊髓背角中間層或深層。因此，在表淺層應有一些含有 NOS 的聯絡神經，它能經由伸入較深層區的纖維釋放 NO，調節脊髓背角深層的神經活動。此外，給予高劑量 L-NAME (3000 nm) 同時抑制所有層區 c-Fos 蛋白質的表現，並降低了早期、晚期階段之福馬林疼痛反應。很可能 NO 能夠擴散出細胞外並回溯到主要傳入神經細胞，造成了局部 NO 的高濃度，因此只有高劑量 L-NAME 才能阻斷表淺層區大量的 NOS 活性，抑制了包括突觸前、後的疼痛傳遞。綜而言之，在受到周邊刺激之後，脊髓 NOS 活化產生 NO。我們相信，這些 NO 能夠分別以不同的機制調整疼痛訊息的傳遞，參與了疼痛過敏行爲的形成過程。

二、材料及方法(Subjects and Methods)

動物依隨機方式在福馬林測試前 30 分鐘經細管給予 (一) 0.9%生理食鹽水 10 μ l (n=6)。(二) 100 nm L-NAME/0.9%生理食鹽水 10 μ l (n=5)。(三) 370 nm L-NAME/0.9%生理食鹽水 10 μ l (n=6)。(四) 1000 nm L-NAME/0.9%生理食鹽水 10 μ l (n=6)。(五) 3000 nm L-NAME/0.9%生理食鹽水 10 μ l (n=6)。在給藥之後，再經由細管內以 10 μ l 生理食鹽水灌沖。

福馬林疼痛測試以 26 號針頭在老鼠左後腳掌皮下注射 50 μ l 5% 福馬林開始，隨即將老鼠置入 30x30x30 公分的透明玻璃箱內，並在外下方 45 度角置一鏡面，以方便從所有的角度觀察動物行爲。我們利用自己設計之程式記錄並觀察老鼠的疼痛加權分數 weighted pain score。疼痛加權分數 weighted pain score 的評估 (Dubuisson et al 1977) 爲所有動物表現在不同疼痛行爲的時間乘上加權計分之總和的平均。疼痛行爲的加權計分分別爲：0，注射腳沒有表現任何疼痛行爲。1，注射腳輕輕著地，幾乎沒有負荷體重。2，注射腳抬高，沒有任何面與地面接觸。3，老鼠舔、咬注射腳或注射腳顫動。在注射後的 1 小時期間，用電腦程式每分鐘計算老鼠表現之各種疼痛行爲的時間乘上加權計分，並以每 5 分鐘爲單位平均。觀察者並不知道動物的給藥以及分組。

福馬林疼痛測試結束之後，老鼠立即給予大量 pentobarbital (100mg/kg) 腹腔注射麻醉，剪開胸骨，經心臟灌流食鹽水，以及 4% paraformaldehyde/ 1% phosphate buffer。取出脊髓腰椎膨大部位，後固定，並以 30% sucrose/ phosphate buffer 隔夜冷藏保護。40mm 冷凍切片以 phosphate buffer 收集。在攝氏 4 度下給予稀釋成 1:2400 之兔多株 anti-Fos 抗血清 (Santa Cruz. 序號 sc-52) 48 小時，接著是對抗兔血清之 biotin 化羊 IgG，然後是標準的 avidin-biotin-complex 之多體聚合步驟 (Hsu et al 1981)。之後切片置放在 gelatin 塗抹之載玻片上，風乾，蓋上蓋玻片供顯微鏡觀察。我們檢查第四腰椎脊髓背魚各層區 laminae 有 c-Fos 標記的神經細胞分佈。在暗視野下，我們進一步將脊髓背角分爲三個區域 (Molander et al 1984)：(一) 表淺層 superficial laminae (laminae I/II)。(二) 中間層 laminae propius (laminae III/IV)。(三) 深層 deep laminae (laminae V)。我們計算各分層內顏色較深之 c-Fos 標記的神經細胞數量。每個數據至少計算十片切片，取其中前三最高值作爲平均。

所有數據均以平均值 \pm 平均標準差 (mean \pm standard error of mean) 表示，對於 c-Fos 標記的神經細胞數量比較我們採用單向變異數分析 (one-way ANOVA) 來統計，事後比較 (post-hoc test) 則使用 Student-Newman-Keuls 試驗。所有的疼痛行爲分數都轉化爲曲線下區域 area under curve (AUC)。疼痛行爲以單向 Kruskal-Wallis 試驗分析，並以 Dunnett's 試驗作事後比較。p 值小於 0.05 視爲有意義的誤差。

三、結果(Results)

在生理食鹽水控制組中，在注射福馬林腳同側的脊髓背角可發現許多 c-Fos 標記的神經細胞 (233 ± 3 個 c-Fos 標記神經細胞/每一片切片)，在對側則很少。Fos 標記神經細胞的層區分布和過去我們的研究差不多 (Sun et al 1996, Hou et al 1997)，大部分的 c-Fos 標記神經細胞分布在表淺層 superficial laminae 以及深層 deep laminae (分別佔了全部 c-Fos 標記神經細胞數量的 $39.6 \pm 1\%$ 以及 $40.9 \pm 1\%$)，在中間層的分布則較少 (圖 5-1A)。L-NAME (100, 370, 1000, 3000 nm) 以劑量依賴的方式降低福馬林刺激後脊髓 c-Fos 標記神經細胞的總量 (各為生理食鹽水控制組之 $92.5 \pm 7\%$, $86.1 \pm 6\%$, $68.6 \pm 4\%$, $63.5 \pm 7\%$ ，圖 5-1A-E, 5-2A)。L-NAME 對各層區的 c-Fos 標記神經細胞抑制也是呈劑量依賴性的，依 100, 370, 1000, 3000 nm L-NAME 的次序它們在各層區的抑制效果分別是：表淺層 superficial laminae 為生理食鹽水控制組的 $111 \pm 5\%$, $104 \pm 6\%$, $93 \pm 9\%$, $77.8 \pm 11\%$ ，中間層 nucleus proprius 為生理食鹽水控制組的 $93.5 \pm 14\%$, $79.9 \pm 12\%$, $52.6 \pm 4\%$, $49.1 \pm 5\%$ ，深層 deep laminae 為生理食鹽水控制組的 $76 \pm 8\%$, $70.3 \pm \%$, $53.8 \pm 6\%$, $55.5 \pm 6\%$ (圖 5-2A)。L-NAME 對各層區的 c-Fos 標記神經細胞抑制比較之下，所有劑量的 L-NAME 對表淺層 c-Fos 標記神經細胞的抑制不如對中間層以及深層 c-Fos 標記神經細胞的抑制顯著 (圖 5-2B)。

皮下注射 5% 福馬林產生兩個階段的疼痛行為模式 (Dubuisson et al 1977)。第一階段 (早期階段) 在注射福馬林之後立刻發生，持續約 3-5 分鐘，之後約有 10-15 分鐘動物安靜下來，幾乎沒有表現任何疼痛行為。第二階段 (晚期階段) 約在注射 15-20 分鐘之後展開，並持續 20-40 分鐘左右。L-NAME (100, 370, 1000, 3000 nm) 以劑量依賴的方式降低晚期階段福馬林疼痛反應 (注射後 5-60 分鐘，各為生理食鹽水控制組之 $87.8 \pm 6\%$, $79.8 \pm 5\%$, $71.3 \pm 2\%$, $54.8 \pm 8\%$ ，圖 5-3A)，但只有 3000 nm 之 L-NAME 才能顯著降低早期階段 (0-5 分鐘) 福馬林疼痛反應 (圖 5-3B)。在本實驗的所有的動物裡，脊髓中間層、深層或者是全部的 c-Fos 標記神經細胞數量與福馬林晚期階段疼痛反應成有意義的正相關 (分別是 $r=0.4547$, 0.4783 , 0.4775 ，見表 5-1)，而在表淺層的 c-Fos 標記神經細胞數量與福馬林晚期階段疼痛反應則沒有任何顯著的相關。

四、討論(Discussion)

本實驗証實了脊髓腔注射低或中劑量 L-NAME (100, 370, 1000 nm) 能以劑量依賴方式降低福馬林誘發之晚期階段疼痛反應，並抑制了主要位於脊髓中間層與深層之 c-Fos 蛋白質表現。而注射高劑量 L-NAME (3000 nm) 則降低了福馬林誘發之早、晚期階段疼痛反應，以及所有脊髓背角層區 c-Fos 蛋白質之表現。過去的研究顯示 (Chapman et al 1995) 選擇性的神經 NOS 抑制劑 7-nitro-indazole 也同樣能夠主要抑制在位於脊髓深層，而非淺層之 c-Fos 蛋白質表現。很有趣地，全身性給予 L-NAME 注射可以同時降低 carrageenin 所誘發在脊髓背角包括表淺層以及深層之 c-Fos 蛋白質表現。而在本實驗中，脊髓腔注射低或中劑量 L-NAME (100, 370, 1000 nm) 只能抑制位於脊髓深層之 c-Fos 蛋白質表現。由於 L-NAME 同時具備了周邊的消炎作用以及抑制中樞神經內的訊息傳遞功能 (Huges et al 1990, Malmberg et al 1993b, Lippe et al 1993)，因此我們推測，全身性注射 L-NAME 相對於脊髓腔注射所多出來的表淺層 c-Fos 蛋白質抑制效果可能來自周邊的消炎作用降低了進入脊髓的傷害訊息強度的緣故。因此，我們認為疼痛訊息傳遞的過程中，脊髓內 NOS 的產物-NO 對於疼痛過敏反應的調節主要與背角深層的神經活動較有關連。

在本實驗中，只有脊髓腔注射高劑量 L-NAME (3000 nm) 能降低福馬林誘發之早期階段疼痛反應。目前確實的機制尚不明白。但是由於 NO 能夠擴散出細胞外並回溯到主要傳入神經細胞，使得興奮性胺基酸 excitatory amino acid 再釋放，更促進突觸後神經的興奮。由於 NOS 在空間上分布的因素造成表淺層區有較高 NOS 活動力，因此很可能只有高劑量 L-NAME (3000 nm) 才能打破這個循環，使得早期、晚期階段之福馬林疼痛反應因而減輕。