

電針刺激與一氧化氮合成酵素抑制劑 L-NAME 結合的鎮痛研究

曹永昌^{1,2} 林昭庚¹ 孫維仁³

¹ 中國醫藥學院中醫研究所

台中市

² 台北市立中興醫院中醫科

³ 台大醫學院麻醉科

台北市

(2003 年 3 月 31 日受理, 2003 年 5 月 27 日收校訂稿, 2003 年 5 月 28 日接受刊載)

全身性給予一氧化氮合成酵素 (NOS) 抑制劑 L-N^o nitro-arginine methyl ester (L-NAME) 包括了周邊消炎以及中樞神經的效果, 因此必須從脊髓腔給予藥物才能排除 NOS 抑制劑的周邊消炎作用, 並進一步了解周邊刺激之後, 脊髓內的被活化的 NO 對於神經活動以及相關的疼痛行為的影響。先前研究發現 L-NAME 脊髓注射不僅可以降低早期及晚期階段福馬林疼痛反應, 亦呈現以劑量依賴的方式降低福馬林刺激後脊髓 Fos 標記神經細胞的總量; 而電針足三里穴亦能有效降低早、晚期福馬林疼痛反應, 對於降低福馬林刺激後脊髓 Fos 標記神經細胞總量的表現亦佳。然而傳統的針灸止痛與 NOS 抑制劑 L-NAME 結合在止痛的效果與阻斷疼痛訊息的傳遞上扮演怎樣的角色, 是值得大家深入探討的課題。

本研究隨機將 30 隻 Wistar 雄性鼠分為五組, 分別在福馬林測試前 30 分鐘經脊髓腔細管給予生理食鹽水、1000 nM L-NAME 及十倍強度電針、300 nM L-NAME 及十倍強度電針、1000 nM L-NAME 及二十倍強度電針、300 nM L-NAME 及二十倍強度電針。以觀察疼痛行為反應與脊髓背角 Fos 蛋白之數量來探討鎮痛效果與可能之機轉。

研究結果顯示 L-NAME 注射及電針刺激各組除了可以降低早期及晚期階段福馬林疼痛反應外, 亦以相當劑量依賴性之趨勢對各層區 (表淺層、中間層以及深層) 的 Fos 標記神經細胞產生抑制效果。而本研究證實了結合電針刺激與脊髓腔注射 NOS 抑制劑對福馬林皮下注射有良好的止痛效果, 就分子生物領域 Fos 蛋白質的表現也取得全面的抑制效果, 或可作為醫師臨床上對付各種頑固性疼痛治療的參考。

關鍵詞: 電針, L-NAME, Fos, 鎮痛。

前 言

疼痛訊息在處理的過程常常會受到刺激性或者抑制性系統的修正，因而影響了中央敏感化（central sensitization）¹。周邊疼痛刺激會造成脊髓內一氧化氮合成酵素 NOS 的活化，強化了中央敏感化的生成。經脊髓腔給予一氧化氮合成酵素抑制劑 L-N^o nitro-arginine methyl ester (L-NAME)，會阻斷 N-methyl-D-aspartate (NMDA) 脊髓腔注射造成閃尾疼痛測試 tail-flick test 的促進效果²。全身性給予 NOS 抑制劑也會抑制福馬林或 carageenin 刺激造成的疼痛過敏行為^{3,4}。由此可知，一氧化氮對疼痛訊息傳導的強化，以及隨後發生的疼痛過敏行為都扮演了重要的角色。近年來，Fos 蛋白質則被廣泛地應用來在受到持續性疼痛刺激的清醒、自由移動動物身上，做為監看大量神經活動一個很好的工具^{5,6}。過去的研究証實，全身性給予 NOS 抑制劑 L-NAME 會呈劑量依賴性地抑制周邊刺激後脊髓的 Fos 蛋白質表現⁷。不過，全身性給予 NOS 抑制劑包括了周邊消炎以及中樞神經的效果，因此必須從脊髓腔給予藥物才能排除 NOS 抑制劑的周邊消炎作用，並進一步了解周邊刺激之後，脊髓內的被活化的 NO 對於神經活動以及相關的疼痛行為的影響。因此，我們在先前的研究中⁸ 測量經脊髓腔給予 NOS 抑制劑 L-NAME 對福馬林疼痛測試誘發之疼痛過敏行為，以及不同脊髓層區 Fos 蛋白質表現的影響；並同時以電針刺激測試福馬林誘發之疼痛過敏行為，以及不同脊髓層區 Fos 蛋白質表現的影響。我們發現 L-NAME (300, 1000, 3000 nM) 脊髓注射可以降低早期及晚期階段福馬林疼痛反應，L-NAME (300, 1000, 3000 nM) 亦以劑量依賴的方式降低福馬林刺激後脊髓 Fos 標記神經細胞的總量（各為生理食鹽水控制組之 74 %，69 %，52 %）。而電針部分雖然左右兩側電針足三里穴皆能有效降低早、晚期福馬林疼痛反應，對於降低福馬林刺激後脊髓 Fos 標記神經細胞總量的表現亦不惶多讓（依十倍強度同側電刺激，十倍強度對側電刺激，二十倍強度同側電刺激，二十倍強度對側電刺激的順序各為生理食鹽水控制組的 76 %，28 %，67 %，45 %）⁹。可見中醫傳統的針灸在阻斷疼痛訊息的傳遞上亦可以扮演重要的角色，為尋找臨床上最佳的止痛策略，本研究設計了電針結合脊髓腔給予 L-NAME 觀察福馬林疼痛刺激對大鼠不同脊髓層區 Fos 蛋白質的表現及疼痛行為的影響。

材料與方法

本研究使用重 250-350 克之 Wistar 鼠。動物先以 pentobarbital 50 mg/kg 腹腔注射麻醉。從枕骨與第一頸椎處，剪開肌肉層，並輕挑硬脊膜，將 PE-5 細管置入脊髓腔內 8 公分，使尖端大約位在脊椎腰椎膨大處（lumbar enlargement）。細管尾端套上 silicon tube 經皮下在白鼠耳間部位拉出並固定。等待 3-4 天的恢復期。我們從 silicon tube 以 10 μ l 2 % xylocaine 測試細管功能，並在死後解剖以確定位置。只有細管功能正常及位置正確的老鼠才列入實驗。

實驗共分五組，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）1000 nM L-NAME / 0.9 %生理食鹽水 10 μ l 加十倍強度電針刺激於左側足三里 20 分鐘 (n = 6)，（三）300 nM L-NAME / 0.9 %生理食鹽水 10 μ l 加十倍強度電針刺激於左側足三里 20 分鐘 (n = 6)，（四）

1000 nM L-NAME / 0.9 %生理食鹽水 10 μ l 加二十倍強度電針刺激於左側足三里 20 分鐘 (n = 6) (五) 300 nM L-NAME / 0.9 %生理食鹽水 10 μ l 加二十倍強度電針刺激於左側足三里 20 分鐘。

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 30 \times 30 \times 30 公分的鐵籠內，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為。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)。疼痛加權分數的評估¹⁰ 為所有動物表現在不同疼痛行為的時間乘上加權計分之總和的平均。疼痛行為的加權計分分別為：0，注射腳沒有表現任何疼痛行為。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為的時間乘上加權計分，並以每 5 分鐘為單位平均。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 (100 mg/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。4 μ m 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¹¹。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角各層區 laminae 有 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為三個區域¹²：(一) 表淺層 superficial laminae (laminae I/II)。(二) 中間層 nucleus propius (laminae III/IV)。(三) 深層 deep laminae (laminae V)。我們計算各分層內顏色較深之 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為平均。

所有數據均以平均值士平均標準差 (mean \pm standard error of mean) 表示，對於 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 Scheffe's 試驗。所有的疼痛行為分數都轉化為曲線下區域 area under curve (AUC)¹³。疼痛行為以 Duncan's Multiple Range Test。p 值小於 0.05 視為有意義的誤差。

結 果

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 Fos 標記的神經細胞 (168 \pm 37 個 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^{13,14}，大部分的 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 Fos 標記神經細胞數量的 30 % 以及 46 %)，在中間層的分布則較少。實驗組能有效的降低 Fos 的表現 ($p < 0.001$ Scheff's Test 事後檢定)，依 1000 nM L-NAME / 0.9 %生理食鹽水 10 μ l 加十倍強度電針刺激於左側足三里 (10L1000) 300 nM L-NAME / 0.9 %生理食鹽水 10 μ l 加十倍強度電針刺激於左側足三里 (10L300) 1000 nM L-NAME / 0.9 %生理食鹽水 10 μ l 加二十倍強度電針刺激於左側足三里 (20L1000) 300 nM L-NAME / 0.9 %生理食鹽水 10 μ l 加二十倍強度電針刺激於左側足三里 (20L300)，(10L1000、10L300、20L1000、20L300) 的順序分別降低福馬林刺激後脊髓 Fos 標記神經細胞的總量 (各為生理食鹽水控制組之 36 %、70 %、

28 %、49 %)。L-NAME 對各層區的 Fos 標記神經細胞抑制也大致符合此規律，依 10L1000、10L300、20L1000、20L300 的次序它們在各層區的抑制效果分別是：表淺層 superficial laminae (S) 為生理食鹽水控制組的 32 %、46 %、16 %、33 %，中間層 nucleus proprius (NP) 為生理食鹽水控制組的 46 %、88 %、43 %、61 %，深層 deep laminae (D) 為生理食鹽水控制組的 34 %、75 %、28 %、52 %。對各層區的 Fos 標記神經細胞抑制比較之下，所有劑量的 L-NAME 及電針刺激對表淺層、中間層以及深層 Fos 標記神經細胞的抑制皆呈劑量依賴性之趨勢。(如表 1 及圖 1)

皮下注射 5 % 福馬林產生兩個階段的疼痛行為模式¹⁵。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 (300、1000 nM) 脊髓注射加同側電

表 1 各組在第四腰椎左側背角發現的 Fos 神經細胞數比較

區域	組別 Formalin (1)		10L1000 (2)		10L300 (3)		20L1000 (4)		20L300 (5)		F Value	Multiple Comparison [#]
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD		
LL4 S	48.41	14.82	15.63	3.58	22.29	5.86	7.71	1.78	16.00	7.64	32.15***	1 > 2,3,4,5
LL4 NP	43.51	12.64	20.08	4.31	38.42	6.70	18.79	2.46	26.71	6.29	17.79***	1 > 2,4,5; 3 > 1,4
LL4 D	76.92	19.24	26.04	5.32	57.88	10.65	21.25	1.43	40.33	17.69	28.41***	1 > 2,4,5; 3 > 1,4
TOTAL-LL4	168.85	37.13	61.75	7.86	118.58	20.41	47.75	1.69	83.04	28.35	38.95***	1 > 2,3,4,5; 3 > 1,4

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$

[#]Scheffe's Test 事後檢定

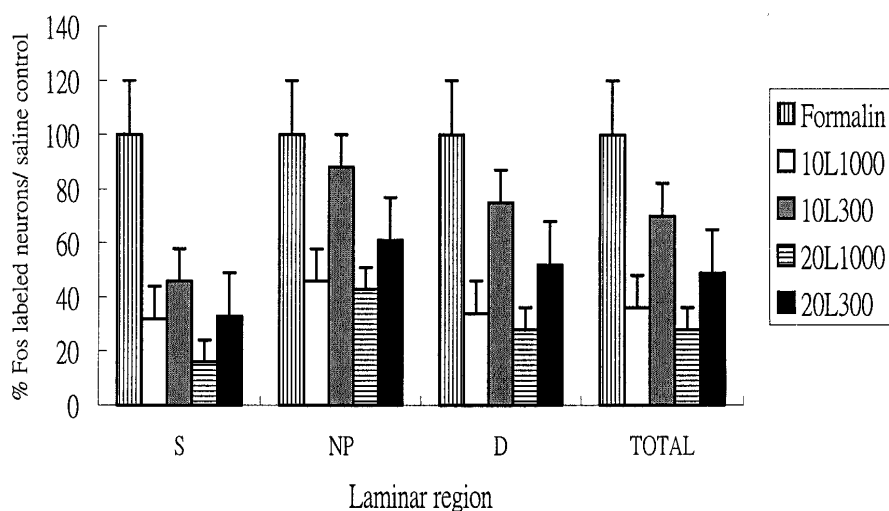


圖 1：各實驗組相對於福馬林對照組在第四腰椎左側背角各區 Fos 神經細胞數百分比。
S 為表淺層，NP 為中間層，D 為深層，TOTAL 為三層之總合。

針刺激足三里 (10 L、20 L) 可以降低早期及晚期階段福馬林疼痛反應 ($p < 0.001$ Duncan's Multipal Range Test) (如表 2 及圖 2)

討 論

之前的研究¹⁶顯示脊髓腔注射 L-NAME (300, 1000, 3000 nM) 可以降低早期及晚期階段福馬林疼痛反應, 而且所有劑量的 L-NAME 對表淺層、中間層以及深層 Fos 標記神經細胞的抑制皆呈劑量依賴性之趨勢。本實驗延續這樣的規律依 1000 nM L-NAME / 0.9% 生理食鹽水 10 μ l 加十倍強度電針刺激於左側足三里 (10L1000) 300 nM L-NAME / 0.9% 生理食鹽水 10 μ l 加十倍強度電針刺激於左側足三里 (10L300) 1000 nM L-NAME / 0.9% 生理食鹽水 10 μ l 加二十倍強度電針刺激於左側足三里 (20L1000) 300 nM L-NAME / 0.9% 生理食鹽水 10 μ l 加二十倍強度電針刺激於左側足三里 (20L300), (10L1000、10L300、20L1000、20L300) 的順序分別降低福馬林刺激後脊髓 Fos 標記神經細胞的總量 (各為生理食鹽水控制組之 36%、70%、28%、49%), 亦呈劑量依賴性之趨勢; 而對各層區的 Fos 標記神經細胞抑制比較之下, 所有劑量的 L-NAME 及電針刺激對表淺層、中間層以及深層 Fos 標記神經細胞的抑制亦皆呈劑量依賴性之趨勢。

而過去的研究顯示選擇性的神經 NOS 抑制劑 7-nitro-indazole 能夠主要抑制在位於脊髓深層, 而非淺層之 Fos 蛋白質表現¹⁷。而全身性給予 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 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¹⁸⁻²⁰。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 Fos 蛋白質抑制效果可能來自週邊的消炎作用降低了進入脊髓的傷害訊息強度之故。因此, 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聯。

NOS 在腰椎脊髓背角主要分布在淺層²¹, 然而, 我們的結果卻顯示, Fos 表現的抑制發生在脊髓背角三層都有。因此, 在這些較深層區的 Fos 表現的抑制應該來自一些連結周邊傳入訊息到脊髓背角更深的層區的聯絡網路 interneuronal circuitry。很可能這些座落在脊髓背角淺層的聯絡神經 interneuron 本身就含有 NOS, 它能經由伸入較深層區的纖維釋放 NO, 調節了脊髓背角深層的神經活動。支持這個推論的證據包括了 Herdegen 等人的觀察, 他們發現在周邊刺激之後, 脊髓內含 NOS 的神經纖維在脊髓背角深層平均接觸 15 個早發性迅速基因標記 IEG-labeled 的神經細胞²¹。而在實驗室內也發現, NO 能夠直接在 striatal 神經細胞中誘發出 c-fos 以及 zif/268 基因的表現²²。這些證據顯示, NO 很可能直接由神經細胞延伸入較深層區的纖維中釋放出來, 參與了脊髓背角較深層 deeper laminae 早發性迅速基因的誘發。當然, 我們無法排除另一種可能性, 這些聯絡神經 interneuron 本身不含 NOS, 但受到表淺層鄰近含 NOS 神經釋放 NO 的影響, 經過伸入較深層區的纖維進而調節脊髓背角深層的神經活動。

而電針刺激部分, 早先研究顯示不論十倍強度電針刺激左側足三里, 或十倍強度電針刺激右側足三里, 或二十倍強度電針刺激左側足三里, 或是二十倍強度電針刺激右側足三里均能有效的降低 Fos 總量的表現, 且對側電針刺激的抑致效果優於同側電針刺激, 而十倍電針強度與二十倍電針強度彼此間無明顯差

表 2 實驗各組福馬林注射後疼痛加權計分比較

時段	Formalin (1)		10L1000 (2)		10L300 (3)		20L1000 (4)		20L300 (5)		F Value	Multiple Comparison [#]
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD		
Phase I	2.09	0.37	0.58	0.61	1.07	0.89	0.48	0.51	0.66	0.81	11.69***	1 > 2,3,4,5
Phase II	21.58	2.59	9.77	5.33	10.76	5.22	6.15	4.60	7.86	5.93	18.64***	1 > 2,3,4,5

Duncan's Multiple Range Test

* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$; Phase I: 為 0~5 分鐘; Phase II: 為 5~60 分鐘

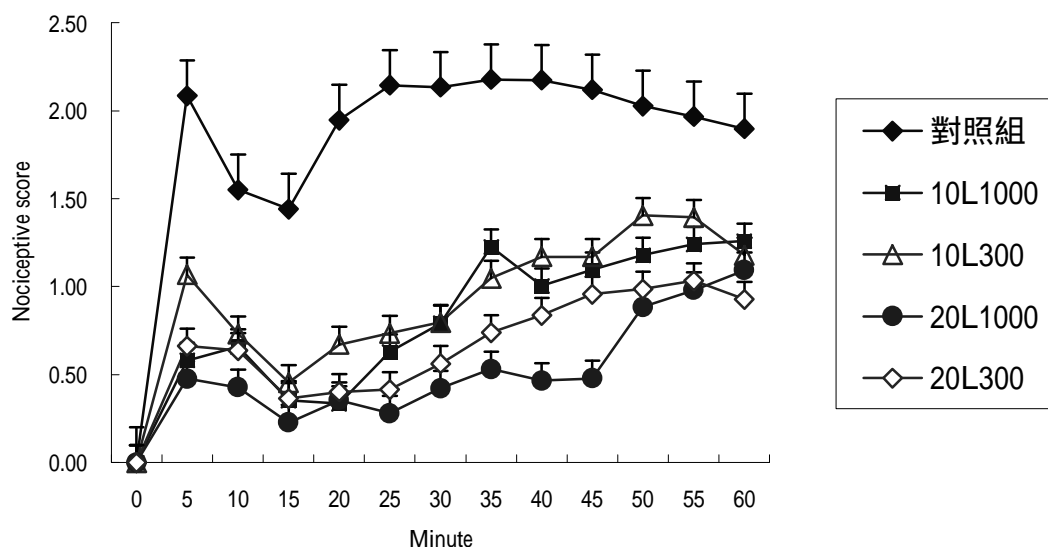


圖 2：實驗各組福馬林注射後之疼痛加權分數，橫軸為時間（分），縱軸為每 5 分鐘之疼痛加權計分。

異，而對各層區 Fos 標記神經細胞的抑制則以表淺層的效果最好，中間層及深層則稍差²³；由於電針本身對實驗鼠而言亦是一種疼痛刺激，故可能會增加相關脊髓區域之 Fos 量，果然就 Fos 而言對側電針刺激的抑致效果優於同側電針刺激，然而福馬林的疼痛行為早期階段卻以同側電針刺激的抑制效果較佳，因此本實驗仍採取同側的電針刺激與低劑量的 L-NAME 相結合，果然取得不錯的止痛與 Fos 抑制效果。L-NAME（300、1000 nM）脊髓注射加同側電針刺激足三里穴（10 L、20 L）均可以降低早期及晚期階段福馬林疼痛反應。

曾經有報告顯示，全身性或者經由腦室給與嗎啡可以對周邊傷害達到完全止痛效果，但卻無法完全抑制脊髓背角表淺層的 Fos 表現^{24,25}。或許可以推論，脊髓背角表淺層有一群聯絡神經受到傳入的訊息刺激後誘發出 Fos 的表現，但這些聯絡神經可能另有別的功能，其 Fos 表現與隨後發生的疼痛過敏行為為並不相干。或是由於 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。

綜言之，藉由本實驗我們認為受到周邊刺激之後，脊髓 NOS 活化產生 NO，這些 NO 能夠分別以反溯回饋或向前傳導等不同的機制調整疼痛訊息的傳遞，參與了疼痛過敏行為的發生。

早先的研究對於電針和脊髓腔注射 L-NAME 的止痛效果比較，似乎電針刺激有較好的 Fos 抑制效果，然而脊髓腔注射 L-NAME 卻有較佳的抑制疼痛行為表現；而本研究證實了結合電針刺激與脊髓腔注射 NOS 抑制劑對福馬林皮下注射有良好的止痛效果，就分子生物領域 Fos 蛋白質的表現也取得全面的抑制效果，或許可供醫師作為臨床上對付各種頑固性疼痛的治療開啟一道曙光。

參考文獻

1. Yaksh TL, Malmberg AB. Central pharmacology of nociceptive transmission. In: P.Wall, R. Melzack, Pain, Churchill Livingstone, London, pp.165-200, 1994.
2. Meller ST, Hykstra C, Beghart GF. Production of endogenous nitric oxide and activation of soluble guantlate cyclase are required for N-methyl-D-aspartate-produced facilitation of the nociceptive tail-flick reflex. *Eur J Pharmacol* 214: 93, 1992.
3. Moore PK, Babbedge RC, Wallace P, Hart SL. 7-nitro- indazole, an inhibitor of nitric oxide synthase, exhibits anti-nociceptive activity in the mouse without increasing blood pressure. *Br J Pharmacol* 108: 296-297, 1993.
4. Malmberg AB, Yaksh TL. Spinal nitric oxide synthesis inhibition blocks NMDA-induced thermal hyperalgesia and produces antinoception in the formalin test in rats. *Pain* 54: 291-300, 1993.
5. Bullitt E. Expression of c-fos-like protein as a marker for neuronal activity following noxious stimulation in the rats. *J Comp Neurol* 296: 145-152, 1990.
6. Hunt SP, Pini A, Evan G. Induction of c-fos-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation. *Nature* 328: 632-634, 1987.
7. Honore P, Chapman V, Buritova J, Besson J-M. Reduction of carrageenin oedema and the associated c-fos expression in the rat lumbar spinal cord by nitric oxide synthase inhibitor. *Br J Pharmacol* 114: 77-84, 1995.
8. Sun WZ, Shyu BC, Shieh JY. Nitrous oxide or halothane, or both, fail to suppress c-fos expression in rat spinal cord dorsal horn neurons after subcutaneous formalin. *Br J Anaesth* 76: 99-105, 1996.
9. 曹永昌，電針治療過敏性疼痛的機轉研究 - 阻斷疼痛訊息傳遞，*中華針灸醫學雜誌*，1：59-64，2001。
10. Dubuisson KR, Dennis SG. The formalin test: a quantitative study of the analgesia effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain* 4: 161-174, 1997.
11. Hsu SR, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxydase complex (ABC) in immunoperoxydase technique: a comparission between ABC and unlabelled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 29: 577-580, 1981.
12. Molander C, Xu Q, Grant B. The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the rat. I. The lower thoracic and lumbaosacral cord. *J Comp Neurol* 230: 133-141, 1984.
13. Sun WZ, Shyu BC, Shieh JY. Nitrous oxide or halothane, or both, fail to suppress c-fos expression in rat spinal cord dorsal horn neurons after subcutaneous formalin. *Br J Anaesth* 76: 99-105, 1996.
14. Hou WY, Shyu BC, Chen TM, Lee JW, Shieh JY, Sun WZ. Intratheally administered c-fos antisense oligodeoxynucleotide decreases formalin-induced nociceptive behavior in adult rats. *J Eur Pharmacol* 329: 17-26, 1997.

15. Dubuisson KR, Dennis SG. The formalin test: a quantitative study of the analgesia effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain* 4: 161-174, 1997.
16. 曹永昌, 電針治療過敏性疼痛的機轉研究 - 阻斷疼痛訊息傳遞, *中華針灸醫學雜誌*, 1: 59-64, 2001。
17. Chapman V, Buritova J, Honore P, Besson JM. 7-nitro-indazole, a selective inhibitor of neuronal nitric oxide synthase reduces formalin evoked c-fos expression in dorsal horn neurons of the spinal cord. *Brain Res* 697: 258-261, 1995.
18. Huges SR, Williams TJ, Brain SD. Evidence that endogenous nitric oxide modulates oedema formation induced by substance P. *Eur J Pharmacol* 191: 481-484, 1990.
19. Malmberg AB, Yaksh TL. Spinal nitric oxide synthesis inhibition blocks NMDA-induced thermal hyperalgesia and produces antinociception in the formalin test in rats. *Pain* 54: 291-300, 1993.
20. Lippe IT, Stabentheiner A, Holzer P. Participation of nitric oxide in the mustard oil-induced neurogenic inflammation of the rat paw skin. *Eur J Pharmacol* 232: 113-120, 1993.
21. Herdegen T, Rudiger S, Mayer B, Bravo R, Zimmermann M. Expression of nitric oxide synthase and colocalisation with Jun, Fos and Krox transcription factors in spinal cord neurons following noxious stimulation of the rat hindpaw. *Mol Brain Res* 22: 245-258, 1994.
22. Morris BJ. Stimulation of immediate early gene expression in striatal neurons by nitric oxide. *J Biol Chem* 270: 24740-24744, 1995.
23. 曹永昌, 電針治療過敏性疼痛的機轉研究 - 阻斷疼痛訊息傳遞, *中華針灸醫學雜誌*, 1: 59-64, 2001。
24. Presley RW, Menetrey D, Levine JD, Basbaum AI. Systemic morphine suppresses noxious stimulation evoked fos protein like immunoreactivity in the rat spinal cord. *J Neurosci* 10: 323-335, 1990.
25. Gogas KR, Presley RW, Levine JD, Basbaum AI. The antinociceptive action of supraspinal opioids results from an increase in descending inhibitory control: correlation of nociceptive behavior and c-fos expression. *Neuroscience* 42: 617-628, 1991.

ELECTROACUPUNCTURE COMBINED WITH NOS INHIBITOR (L-NAME) TREATMENT ON ANALGESIA

Yun-Tson Tsao^{1,2}, Jaung-Geng Lin¹ and Wei-Zen Sun³

*¹Institute of Chinese Medical Science, China Medical College
Taichung, Taiwan*

²Department of Chinese Medicine, Taipei Municipal Chung-Hsin Hospital

*³Department of Anesthesiology, National Taiwan University Medical School
Taipei, Taiwan*

(Received 31th March 2003, revised Ms received 27th May 2003, accepted 28th May 2003)

Systematically administrated nitric oxide synthase (NOS) inhibitor, L-N nitro-arginine methyl ester (L-NAME), does-dependently reduced c-fos expression in the rat lumbar spinal cord. The effects of treatment of NOS inhibitors include anti-inflammation in peripheral system and analgesia in central system. Dosage by intrathecal could exclude the anti-inflammation effect of NOS inhibitors. To investigate the effects of activated NOS in spinal cord on neuronal activities and related behaviors of pain following peripheral stimulation, we examined formalin-induced hyperalgesia and c-fos expression following treatment of NOS inhibitor (L-NAME) by the route of spinal cord combined with electroacupuncture on Zusanli in order to seek the best analgesia strategy.

We observed that L-NAME (300, 1000 nM) administrated intratecally combined with (10 X, 20 X) intensity of electroacupuncture on Zusanli decreased both primary and late stage of hyperalgesia effects induced by formalin ($p < 0.01$); And these treatments decreased the amount of c-fos-labeled neurons in all three regions of dorsal horn (the superficial lamina, nucleus propius and deep lamina) in a likely dose dependent manner. Electroacupuncture combined with L-NAME treatments maybe the best choice of the analgesia strategy in the clinics.

Key words: Electroacupuncture, L-NAME, Fos, Analgesia.