

腦部微透析動物模式應用在 穴位針刺研究

蔡東湖^{1,2} 王麗惠² 洪菱謙¹ 鄭婷宜² 陳介甫¹

¹ 國立中國醫藥研究所

² 國立陽明大學 傳統醫藥學研究所

台北

(2001年3月27日受理, 2001年4月17日收校訂稿, 2001年4月18日接受刊載)

針灸是一個歷史悠久的方法, 可用來治療疾病和舒解疼痛。在東方國家, 針灸使用在治療心血管、呼吸、內分泌、消化系統疾病已有好幾世紀的時間。相似地, 在西方國家利用神經肌肉電刺激來緩解疼痛、增加肌力、提高週邊血管病變病人的血流量。近年來也有一些利用表面電極來電刺激穴位的方法, 此方法也可以產生和針刺、電針相同的生理及治療效果, 尤其應用在治療周邊血管病變。目前, 對於傳統針刺、電針、神經肌肉電刺激應用在治療腦病變方面仍頗多爭議。為了瞭解針刺和腦中神經傳遞物質釋放之間的相關性, 本篇研究報導利用微透析探針插入腦中的某些特定區來偵測該區域神經傳遞物質的釋放。在這個新的研究領域, 本論文提供了一些詳細的微透析研究步驟及方法。

關鍵詞: 針灸, 電針, 微透析, 神經傳導物質, 高效液相層析儀。

前 言

針刺療法在世界衛生組織 WHO 公佈主治有 43 種疾病之多, 其有效性不容忽視¹。針刺的作用主要表現在雙向性調節作用、免疫調整、防禦外邪、對抗疾病及止痛方面, 研究指出針刺療法可能是透過神經機制而發揮這些作用, 其神經機制主要是透過神經傳導物質的釋放, 打通相關的神經迴路而產生作用, 如: 針刺經神經路徑傳導, 激活下視丘 - 腦下垂體 - 內分泌腺體系統來調節內分泌的作用; 又如針刺的止痛除了神經系統作用外, 也有一些神經傳導物質的參與, 例如腦內單胺物質如血清素 (serotonin; 5-HT) 或內源性鴉片樣物質如 endorphine 等等的釋放。近年來有關針刺影響中樞神經系統研究較多的是麻醉止痛²。

針灸治病，和中醫其他各科治療一樣，是以中醫理論為指導，進行辨證論治的。所不同的是針灸減輕症狀，甚至治病是用針刺和艾灸的方法，施用在人體腧穴上，通過經絡的作用，達到治療疾病的目的⁵。

1950年代，發現哺乳動物的腦內神經元含有單胺類神經傳導物質^{3,4}，如正腎上腺素（noradrenaline；NA）、多巴胺（dopamine；DA）和血清素。1980年間，有一個技術上的重大突破，就是腦內微透析取樣技術的發明。在活體做腦部透析的方法，源自1970-1980年代 Ungerstedt 和他的研究小組，他們用來測量大白鼠紋狀體多巴胺的釋出⁶。微透析取樣技術的過程是在活體內，將生理透析液注入透析探針的入口（Inlet），而這個探針是經過立體定位後植入腦內一個特定（discrete）區域的。流動的灌流液（perfusate）從探針尖端的半透膜滲到腦組織，神經傳導物質則由細胞外液擴散出來，二者進行交換。而後透析液（dialysate）由探針出口（outlet）進行收集。藉偵測透析液中神經傳導物質的含量，腦中局部區域的傳導物質分泌量就可知道。此技術的關鍵部位是探針的結構與透析膜材質，也就是暴露到腦組織的那個部分，是由半透膜所構成，因此，就跟組織形成一個密閉的透析系統，而不同於終端開放（open-ended）的透析法如推進-抽拉（push-pull）取樣。微透析取樣時，腦細胞外液中的神經傳導物質，因濃度梯度，也就是經由濃度差，高濃度往低濃度擴散，經過半透膜擴散到透析液中。這個簡單的新發明，能保持腦組織的完整性，因可避免終端開放透析法中持續沖刷腦組織的弊端。另一個重要的優點是，這個方法能用在小型實驗動物上，使這個方法能廣為神經科學家所接受。透析液中且含有許多可偵測的神經物質，如胺基酸（amino acids），乙醯膽鹼（acetylcholine），purines 和各種 neuropeptides，以及腦部代謝物質和離子等等。因為腦細胞中蛋白質等的大分子物質已被半透膜阻隔掉，所以透析液中的神經傳導物質不必進行分析前處理，而可直接用高效液相層析儀（high-performance liquid chromatography; HPLC）配合電化學檢測器（electrochemical detection; ED）分析透析液中的神經傳導物質，此微透析取樣和高效液相層析分析技術提供了高敏感度、高選擇性的方法來直接偵測腦細胞外液中微量的內源性（endogenous）單胺神經傳導物質。本文的目的是要詳細描述微透析的基本原理與應用，同時本實驗室最近用來測量，活體大白鼠腦細胞外液中的正腎上腺素、多巴胺、血清素、胺基酸的方法也一併討論。並進一步與傳統中醫師常用的針刺結合，探討傳統針刺的原理。

針灸的原理與微透析應用

一、針灸的作用及其原理

1. 針灸的作用主要是雙向性調節、免疫調整、防禦外邪、對抗疾病及止痛方面。

- (1) 雙向調節作用：即能治療完全不同性質的疾病或者發展趨勢完全相反的兩類病症，如便秘和泄瀉，這種調節作用遍及人體各個系統，可以使用相同穴位，不同的手法來治療。

- (2) 防禦外邪及免疫調整作用：針灸不只可治療慢性疾病，且對許多急性傳染病，炎症性的疾病都有不錯的療效。針灸對人體特異性免疫功能或非特異性免疫功能均有促進作用，因而可防止炎症的發生和發展，可控制炎症病灶處血管過度的通透，抑制白血球過多的游出和浸潤，改善局部的血液及淋巴循環，有助於肉芽組織的形成，所以可以使病灶的癒合加速。
- (3) 對抗疾病作用：針灸可以提高生物體的防衛能力，增強體質，從而提高抗病能力，如灸足三里，可以有強壯保健及預防疾病的作用。
- (4) 止痛作用：研究指出針刺的止痛作用是來自腧穴部位與來自疼痛區的傳入神經衝動在中樞各級水平相互作用的結果^{5,7}。一些研究指出：如針刺足三里，三陰交等穴可使腦內血清素含量增加，認為這是實現針刺止痛必須的⁸；內源性鴉片樣物質與鴉片受體，在針刺止痛中也很重要，如針刺足三里，三陰交等穴還可促使腦內嗎啡樣物質釋放加強止痛作用⁹；腦內乙醯膽鹼也會明顯增多，這也是加強針刺止痛效應的重要物質⁸；還有 P 物質 (substance P)，組織胺 (histamine) 等也都與針刺止痛效應有著密切的關係。總之針刺止痛與神經、神經傳導物質及其代謝物質有關。針灸可引起痛覺中樞傳導物質的變化，及腦內物質代謝的改變，所以有良好的止痛作用^{10,11}。

二、針刺的止痛作用及其原理

1. 針刺的止痛作用：

許多臨床研究表明，針刺治療各種疼痛有良好效果。如針刺合谷、內庭、下關等穴可治牙痛，針刺中脘、足三里、天樞等穴可治腹痛，針刺印堂、太陽、列缺等穴可治頭痛，針刺魚腰、四白、下關等穴治療原發性三叉神經痛，針刺陽陵泉、手三里、曲池、足三里等穴可治網球肘，針刺膽俞、肝俞等穴治急性膽絞痛；針刺大包治療急性扭傷¹²。

2. 針刺止痛的神經作用機理：

針刺可透過刺激腧穴深部的感受器，感受器發生興奮，興奮以神經衝動的方式經過傳入神經傳向中樞，針刺信息經各級中樞整合調制後，通過傳出途徑對痛反應進行調節和控制。研究資料報導：中樞神經系統發揮止痛作用的多個層次，如脊髓（閘門學說）、腦幹、邊緣系統、大腦皮質等都參與針刺止痛過程。其閘門學說，認為針刺刺激粗神經纖維，引起神經衝動傳入脊髓後，興奮其內膠狀質細胞，進而對脊髓後角灰質，，，層的神經細胞（T 細胞）產生抑制，然後像閘門一樣關閉起來，阻斷來自疼痛部的中細纖維神經的傳導，而產生止痛的作用^{13,14}。

3. 中樞神經傳導物質與針刺止痛：

針刺信號進入中樞後，可以激發很多神經元的活動，釋放出多種的神經傳導物質，其中如血清素、內源性嗎啡樣物質、乙醯膽鹼等是有助於針刺止痛的實現；有些如兒茶酚胺和抗嗎啡物質則起拮抗作用²。

三、經由表面電極電刺激穴位的作用

此為根據中醫十二經絡和十二皮部理論，具有“通經脈，調血氣，平衡陰陽，協調臟腑，

扶正驅邪”的功能。臨床方面：尤擅長於活血止痛、平衡陰陽、調經安神、行氣榮血^{15,16}。

- 1.活血止痛：可用於各種頭疼、腰痛、腿痛、腹痛等（如：合谷、勞宮、阿是穴）。
- 2.平衡陰陽：尤宜陽虛畏寒、遺尿、遺精、早泄等（如：雙腎俞、氣海、關元）。

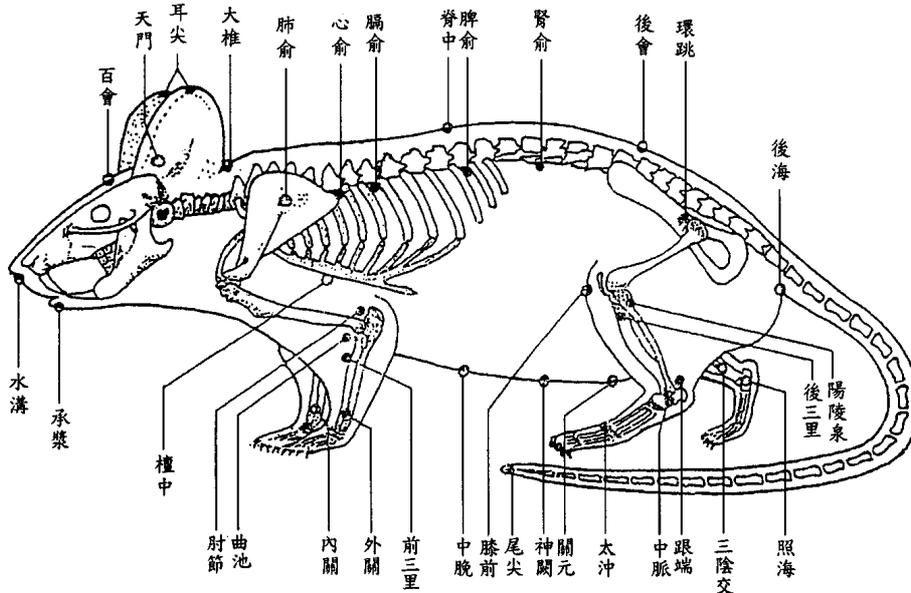


圖 1 大鼠的骨骼及針灸穴位圖

- 3.調經安神：適宜各類氣血紊亂、心神不寧之煩燥、失眠、健忘者（如：內關、外關、勞宮、大陵）。
- 4.行氣榮血：可用於氣血偏枯，氣滯血瘀之痿症、偏癱（如：環跳、足三里、曲池、合谷）。

四、微透析技術與大鼠針刺研究

針刺或電針大鼠的穴位（圖 1），會導致中樞神經那一種傳導物質釋放以及釋放多少，一直不能清楚的定性和定量，但現在可望經由微透析技術結合 HPLC-ED 來探討其作用機轉¹⁷。

微透析探針

組成探針的主要成分是：小口徑的透析膜、矽管、防水萬用膠、矽膠毛細管，以下將描述本實驗室最近所用的同心導管探針的製作。同心導管微透析探針可能是使用最廣泛的微透析探針¹⁸。

同心導管微透析探針的製備步驟（圖 2）：

一、材料

1. 橡膠管：(0.381 mm I.D.; 2.210 mm O.D.)。
2. 矽膠管 (silica tubing) 粗管：(0.32 mm I.D.)。
3. 矽膠管 (silica tubing) 細管：(0.04 mm I.D.; 0.14 mm O.D.)。
4. 聚乙烯管 PE-10 (polyethylene tubing)：(0.28 mm I.D.; 0.61 mm O.D.)。
5. 透析膜 (Dialysis membrane)：(0.2 mm O.D.); Molecular weight cut-off 13,000 Da。
6. 環氧乙烷 (epoxy adhesive)：(A:B=1:1 等量混合)。
7. 注射針頭：(0.45 mm I.D., 26 gauge \times 1/2")。

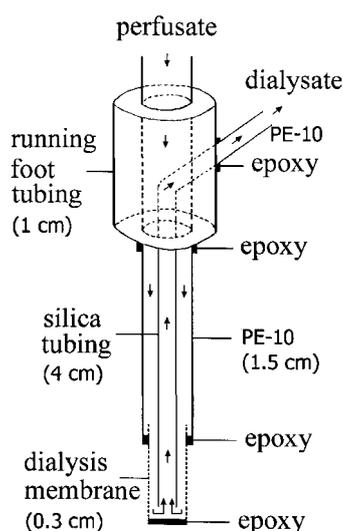


圖 2 同心導管微透析探針的製備

二、製作步驟

【腦組織用】

1. 取材料橡膠管 1.0 cm 當作探針的基座，將注射針頭由橡膠管管口伸入，在管壁 0.5 cm 處 45° 穿出；待針尖套上矽膠管 (細管) 4 cm 後，順勢再將針拉回，便可將矽膠管 (細管) 放入橡膠管中。
2. 在橡膠管前端的矽膠管 (細管) 套上矽膠管 (粗管) 1.5 cm，且調整前端的矽膠管 (細管) 使露出 0.3 cm；側端的矽膠管 (細管) 套上 PE-10 1.5 cm。
3. 使用環氧乙烷與硬化劑 (A:B=1:1) 等量混合後黏接接縫處。
4. 待膠乾後，再將矽膠管 (細管) 露出 0.3 cm 部套上透析膜，且將多餘透析膜稍推入矽膠管 (粗管) 或剪除。
5. 再將透析膜兩端用環氧乙烷黏接好。
6. 作好的成品再放到顯微鏡下看是否有黏接好。

【血管用】

1. 取材料橡膠管 1.0 cm 當作探針的基座，將注射針頭由橡膠管管口伸入，在管壁 0.5 cm 處 45° 穿出；待針尖套上矽膠管 (細管) 6 cm 後，順勢再將針拉回，便可將矽膠管 (細管) 放入橡膠管中。

- 2.在橡膠管前端的矽膠管(細管)套上 PE-10 3.0 cm, 且調整前端的矽膠管(細管)使露出 1.0 cm; 側端的矽膠管(細管)套上 PE-10 1.5 cm。
- 3.使用環氧乙烷與硬化劑(A:B=1:1)等量混合後黏接縫處。
- 4.待膠乾後, 再將矽膠管(細管)露出 1.0 cm 部套上透析膜, 且將多餘透析膜稍推入矽膠管(粗管)或剪除。
- 5.再將透析膜兩端用環氧乙烷黏接好。
- 6.作好的成品再放到顯微鏡下看是否有黏接好。

執行上, 用窄的多孔 acrylic copolymer 膜做成探針是很困難的。以膜對單胺的通透性並非決定在分子量大小, 因為單胺的分子量相比之下很小。每個膜通透性不同的原因, 可能在於膜孔壁的厚度及孔的形狀, 而非膜的成分。單胺通透性可用離體的簡單實驗來計算, 直覺上認為對單胺通透性愈大, 則在活體上也應能回收愈多單胺, 而認為這可能是選擇膜時最重要的因素。但, 這可能想得太簡單了。最近發現, 離體和活體的單胺代謝物的回收率(recovery), 相關性很有限, 雖然離體上膜對溶解物的通透性和回收率有重要關係, 但活體上, 組織對溶質移動的阻力, 才更是回收率的決定性因素¹⁷。

透析相關儀器及透析液

一、透析幫浦

一般而言, 微透析探針在透析時, 最好是流速穩定且緩慢, 範圍介於 1-5 $\mu\text{l}/\text{min}$ 。小的輸注式幫浦(infusion pump)比傳統的蠕動式幫浦(peristaltic pump)適合。本實驗室採用 CMA/100, 是特別為微透析設計的幫浦, 它有些特點很有用, 如快速的前進/後退模式, 連續而可調整的流速, 和微調控制選擇(microprocessor control option)。可適用於微透析的幫浦, 還有 Harvard Microliter 注射式(syringe)幫浦, 及 Sage Model 341A 幫浦。探針的入口, 用一個聚乙烯管(PE-20)連接到一個安置在幫浦上, 含透析液的 1 ml 抽唧管。若是在麻醉動物身上, 透析幫浦直接經聚乙烯管連到探針。若在清醒動物身上, 則必須連到一個液體轉動軸(liquid swivel), 如此動物才能自由行動, 不會被透析管纏住。

二、轉換透析液

Carnegie Medicine 公司則發展了一個全自動的透析液轉換器 CMA/110 及 CMA/111。因這個機器有微調的功能, 馬達驅動的設備, 來轉換透析液, 在轉換過程中不會讓空氣進入。

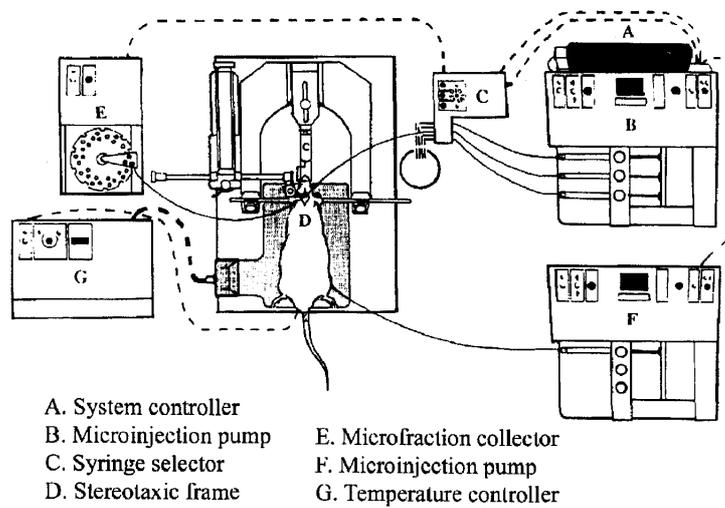
三、收集透析液

由出口端收集透析液有幾種方法。若是對麻醉動物, 有一個簡便的方法是剪下 Eppendorf 管的尖端部分, 接上連在探針出口, 長 1 cm 的聚乙烯管, 透析液將因毛細作用被保留在這尖端裡面。而每個收集時間點到了, 則手動換一支收集管。

對清醒的動物，收集管需要小心不要溢出。通常從液體轉動軸這高度的出口管收集或經液體傳動軸在動物活動室（behavioural chamber）外收集。換言之，可放一個管子固定器在老鼠身上的鞍具上。

手動收集透析液雖然耗時間，但可使一台 HPLC 發揮最大功用。例如收集時間要 20 分鐘，測定一個樣品只要 7-8 分鐘，則一台 HPLC 力足以應付 3 種樣品。另外，手動收集透析液，也使樣品分離和分析很明確。

也可使用自動收集器 CMA/140，這是手動法的替代品，這個設備將透析液收集在冷藏（refrigerated）設備的旋轉盤上的玻璃小瓶內，這個旋轉盤能直接接到 HPLC 自動注射器（CMA/200）。這就不需在實驗過程中一直看守著儀器，但就無法一邊收一邊分析透析液。



有些實驗室已經將自動收集的功能，更進一步發展，將探針出口直接連到 HPLC 的承載閥（load-valve）上，而直接在線上自動分析透析液。隨著自動收集器的發明，這個方法的收集及分析，都把一台 HPLC 限制在單一動物身上，但也使透析實驗全自動化（圖 3）¹⁹。

四、灌流液(perfusate)

我們較早的實驗使用自行配製的 Ringer's solution (147 mM Na⁺, 4.0 mM K⁺, 2 mM Ca²⁺) 做灌流液，它含有必須的（essential）離子來維持離子的平衡²⁰。最近則採用人造的腦脊髓液，它是一種適合腦組織的緩衝液且含有較多的離子和葡萄糖。它的成分是：

- 140 mM NaCl
- 3 mM KCl
- 1.2-2.4 mM CaCl₂
- 1 mM MgCl₂
- 1.2 mM Na₂HPO₄
- 0.27 mM NaH₂PO₄
- 7.2 mM glucose

•pH 7.4

不同於終端開放(open-ended)的透析探針，微透析探針有一個重要的特徵，就是腦組織與透析液沒有直接接觸，中間隔著半透膜。因此可想見植入微透析探針附近的腦組織，仍然是浸於正常且大量的細胞外液中，而非浸於外來的人造透析液。可以預期的是細胞外液和透析液的任何不同成分，都可透過透析膜來達到平衡。然而，腦內的維持恆定的機制，會將打擾細胞外液的混亂因子降到最低。因此可以經由分析取得的透析液來瞭解細胞外液的確實成分。

目前，透析液的成分很多樣化，但何者最適合則取決於取樣的特定組織例如腦組織則採用人工腦脊髓液等等。然而，很多證據顯示，甚至最簡單的透析液，如 Ringer's salt solution，也能將從神經元釋放出來的單胺物質和代謝產物透析出來，經由 HPLC-ED 儀器測出有否改變。

五、透析液中鈣離子的濃度

大多數微透析使用的透析液，都含有 1-3.4 mM 濃度的鈣離子。當使用具有離子選擇性的電極，去測細胞外液中游離鈣離子的濃度時，發現大白鼠腦中的不同區域，鈣離子濃度從 1-2 mM 不等。透析液中含有 3.4 mM 和含有 1.2 mM 鈣離子時，對藥物引起的 DA 變化，會有定量的 (quantitative) 不同。目前我們雖知透析液中鈣離子的含量，對單胺的釋出有影響，但影響的程度則未知。組織間的不同差異，鈣離子可能是一個影響因素。

微透析的步驟

一、透析探針的植入

同心導管探針植入腦中，需借助立體定位的技術。必須的儀器是：外科器械、鑽孔機、立體定位儀。此外，一個照明良好的通風櫥，用來隔離大白鼠，並抽空麻醉藥及牙粉溶劑蒸發出來的氣味。

二、微透析探針植入前的準備

- 1.手術前，將透析探針 (儲存在乾的狀態下) 連上透析系統，並安置在立體定位儀的把手。
- 2.將把手夾在一個小蒸餾架上，將探針浸到含有透析液的燒杯中，使透析膜完全浸濕和微微張開。一旦透析膜弄濕後，就不可將透析膜移出溶液，因為透析膜乾掉後，會影響單胺的回收率。
- 3.這時，小心檢查透析膜，確定它是流通而不滲漏的。

三、麻醉

非復原性 (急性實驗 acute preparation) 的實驗中，我們用 chloral hydrate (400 mg/kg i.p.) 或 halothane (0.15% halothane/air mixture)。但 halothane 較宜用於慢性實驗 (chronic preparation, 自由活動實驗)，因為恢復快又比較不會發生意外。以小動物麻醉機或由小的氣體幫浦供應 95% O₂ 與 5% CO₂，經由蒸發器導入 halothane，經由面罩對動物施行麻醉。

四、手術步驟

微透析探針植入腦內

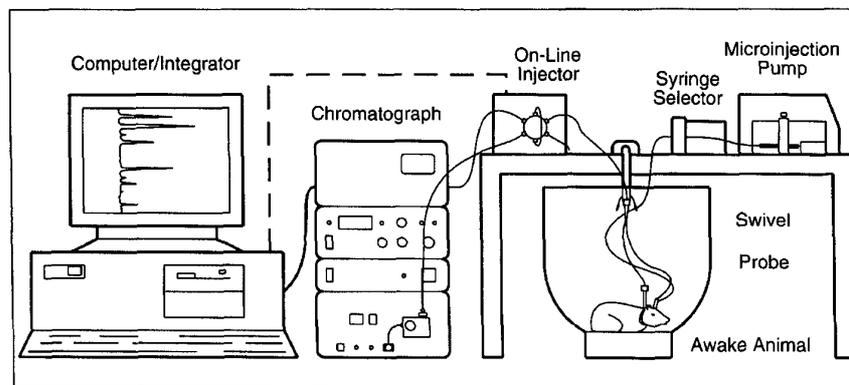
1. 將已麻醉的動物固定在立體定位儀上，頭上做 1 cm 切口，露出頭骨。盡可能保持乾燥及清潔，將頭皮用止血鉗夾住，拖往兩邊。
2. 鑽幾個 2 mm 的洞，小心硬腦膜不要弄破，然後放 1 或 2 個不鏽鋼螺絲釘在多餘的洞，這些是用來做牙粉定位點 (anchor point) 的。
3. 接下來，將微透析探針放到立體定位儀上，調整前後左右的刻度 (根據前窗門)，往下降接觸到硬腦膜，此處算為上下刻度的零點。然後暫時移走探針，用皮下注射針的針頭戳破硬腦膜，小心不要傷到大腦表面的血管。
4. 植入探針前，先將頭骨和大腦表面弄乾淨，因為牙粉不能黏附在濕面上。更有甚者，有時整個實驗過程測到很高濃度的血清素，這可能是因為在植入過程中，半透膜沾到血液的緣故。
5. 為避免折到探針尖端及損傷腦組織，植入探針時儘可能緩慢 (速度小於 1 mm/min)。植入速度太快將造成透析液中的 catecholamine 代謝物 DOPAC 和 HVA 持續數小時升高，而多巴胺則進行性 (progressive) 下降。植入速度太快，透析液可能被受損神經元釋出的傳導物質污染。
6. 一旦定位後，在倒牙粉前，小心地將顱骨儘可能弄乾。當牙粉快乾之前，放掉止血鉗，使皮膚合起來。然後倒上更多牙粉，使傷口封住，不必縫合。
7. 等到牙粉變硬，移走探針把手，並用更多牙粉加強固定，以確保探針被好好地支撐著。
8. 這個製備現在是已準備好要做急性實驗。慢性實驗則需特別注意牙粉的黏合和傷口的密封是完全的，且黏合的高度和探針露出的長度愈少愈好。最後，切斷連在探針出口和進口端的聚乙烯管，封上骨蠟，等動物從麻醉醒來後，就放回原來的籠子。

五、急性 (麻醉的) 微透析實驗

整個實驗過程中，動物是處於麻醉狀況中，我們例行性地使用 pentobarbital 或 halothane 或 chloral hydrate 來麻醉。Halothane 的優點是，它能維持一個穩定且持續的麻醉狀態。然而，這樣，每隻動物都需要麻醉機和混合 (95% O₂ 與 5% CO₂) 空氣供應，相較之下，halothane 吸入麻醉比 pentobarbital 或 chloral hydrate 的週邊麻醉給藥，麻煩的多。採用後者的麻醉方式，在實驗中則需要不斷的補充劑量，可用 60 mg/kg/h 的 chloral hydrate 維持達到至少 8 小時穩定的麻醉狀態。實驗進行中，用加溫毯或檯燈將動物體溫維持在 37 °C。所需時間方面，若是典型的藥物對單胺釋放量作用的急性實驗，其經過如下：手術 (30 min)，然後等 2 小時作基礎值測定期 (baseline period) (透析液每 20 分鐘收集一次)，然後藥物注射之後，繼續測定 2 小時的給藥測定期 (post-drug)。關鍵就在於插入探針後至少 2 小時的基礎值測定時間，看單胺釋放量有否趨於穩定^{18,19}。

六、慢性 (自由活動) 的微透析實驗 (圖 4)

為了瞭解單胺釋出量與動物行為與生理狀態的關係，動物需要處在清醒自由活動的狀態。用一個液體轉動軸，能在動物自由運動的情形下，不受限制地收集透析液，此外，一個適當的動物活動室也使動物行為合乎生理狀況。這個最簡單的動物室，是一個半圓形大碗，並有一個液體轉動軸放在頭頂正中央。Perspex 活動室，則是有隔音有空調的子房子，有一個環狀跑道。四個水平的光電管 (photocell beams)，連到一個數據讀數器 (digital readout counter)，對稱性地放在跑道旁，可對其活動情形做很靈敏的估計¹⁷。



微透析實驗的注意事項

一、組織傷害

對腦組織急性植入小導管或探針，導致立即地，但數分鐘到數小時內可恢復的變化，如：在探針鄰近區域，組織被壓凹，血腦障壁被破壞，葡萄糖代謝受影響。植入探針造成的這些混亂和不可避免的神經元傷害，或許可解釋在植入後一小時左右，透析液中為何有高濃度單胺。然而，探針植入和開始測量單胺濃度的時間間隔愈久，則受來自損傷神經元或非神經元來源之傳導物的影響愈小。舉例而言，5-HT 神經元受損的大白鼠，在前兩個小時，海馬迴透析液中的 5-HT 量比對照組低。這暗示，只有超過 2 小時（至少在我們的實驗狀況下是如此）以後的 5-HT，才的確源自 5-HT 神經元。

因此，假若只要等待兩小時單胺的釋出就已降低和穩定，那麼，急性的微透析實驗應可以提供有效的單胺計算。而且，這已因對確定的藥物或生理刺激有適當的單胺釋出變化，而獲得證實。當有人質疑單胺釋出的測量是否符合標準時，可給腦組織更長的時間去復原，如術後 24 小時再開始實驗。

二、慢性實驗的過程

現在已經清楚知道，微透析探針植入幾天，透析膜附近的組織，立即發生神經膠 (gliotic)

的反應，結果造成發炎細胞和結締組織覆蓋在半透膜上，形成障壁（barrier）阻礙透析進行。這可解釋為何探針植入後幾天，基本的單胺釋出和藥物引起的單胺釋出，都會下降。然而，無論是術後 4 天紋狀體的 DA 和術後 7 天海馬回的 5-HT，其基本的釋出量都與鈣離子相關，仍暗示它們都源自神經元。

探針植入後，在同一動物身上，隨著時間經過，組織狀況的改變，和單胺釋出減少的趨向，都使治療效果的研究複雜化。然而，這個問題，可能共同出現在所有用腦內探針偵測單胺釋出的技術上。

三、麻醉藥的使用

當選擇在麻醉下做實驗時，有一個很大的考量，就是麻醉藥是否會影響實驗。舉例而言，有證據顯示 halothane 會改變 DA antagonist 的反應。

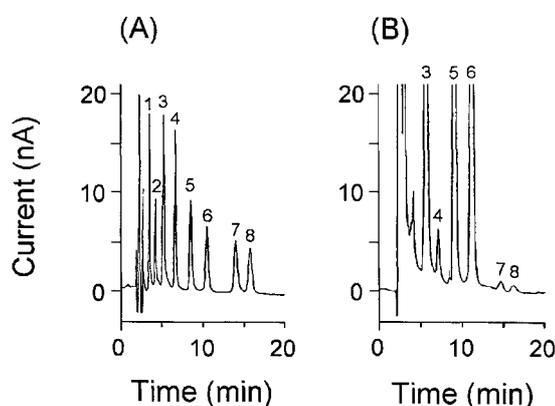


圖 5 HPLC-ED 分析單胺及其代謝物實驗。(A)單胺及其代謝物標準品。(B)紋狀體透析液。1. norepinephrine; 2. epinephrine; 3. dopamine; 4. DOPAC; 5. 5-HIAA; 6. HVA; 7. 3-MT(3-methoxytyramine); 8. 5-HT.

鑑於做清醒動物的微透析實驗，技術上較困難又耗時，所以要考量，從事麻醉動物之實驗，是否可用一半時間，較少的老鼠，及較不使動物受苦，而達到相同的效果。當質疑答案時，可事先做有麻藥及無麻藥的預試驗。

用高效液相層析 - 電化學偵測儀(HPLC-ED)分析單胺及其代謝物

一、基本原則

用以石墨為基礎(carbon-based)的電化學偵測電極，以高敏感及高準確度地來計算 catechol 和 indole 化合物是最近許多做腦部單胺微透析分析所使用的方法。用 HPLC-ED 測量，不需做樣品萃取，並能在實驗進行當中迅速地分析透析液。由於此一特性，不只能在穩定基本值已知的情況下給藥，也能做放射線酵素(radioenzymatic)或質譜儀(mass spectrometry)的分析。

對 HPLC 使用有一個徹底的認識是重要的，尤其是層析的分離和偵測器敏感度的調整。因

為不僅將面臨如何解決和偵測微透析液中非常少量單胺的問題，更將遭遇層析圖中必然出現的一些小而亂，難以鑑別的波峰 (peak)。此外，若根據已發表的 HPLC 方法來作分析時，尚且必須因層析管柱 (column) 的不同，層析管柱新舊的程度，樣品污染物等的不同，而需對移動相 (mobile phase) 加以調整。

分離單胺及其代謝物最常用的層析條件，是使用逆相離子對 (reversed-phase ion-pair)。通常是用含有水溶液緩衝劑 (例如磷酸，醋酸 - 檸檬酸) 和離子對界面活性劑，例如 sodium octanyl sulphonate 的傳統層析管柱 (150-250 mm 長，內徑 4.6 mm 寬，內充填 5 μm C₁₈ 粒子)，和有機溶劑，例如 methanol、acetonitrile、tetrahydrofuran。

二、HPLC 儀器

下列是現在本實驗室所用 HPLC 儀器的配備：

- HPLC 幫浦 (BAS PM-80, Bioanalytical System, IN, USA)
- Rheodyne 7125 注射器 (10 μl 的環)
- 電化學偵測器 (BAS-4C, Bioanalytical System, IN, USA)

分離單胺及其代謝物的層析條件：

以下是可以對大鼠局部區域 (regional) 腦微透析液，進行 DA, 5-HT, 及其代謝物進行分離的層析條件。移動相皆用純水製備，並用 0.22 μm 的膜 (Millipore) 過濾。移動相配製成 1 公升，在室溫下，儲存在燒瓶中。

移動相(1 liter, pH 3.0)

- 2.2 mM (476 mg) Sodium 1-octanesulfonate (216.3 g/mol, Sigma)
- 14.7 mM (2.03 g) Monosodium dihydrogen orthophosphate (138 g/mol, Merck)
- 30 mM (8.82 g) Sodium citrate (294.1 g/mol, Merck)
- 0.027 mM (10 mg) EDTA (372.24 g/mol, Merck)
- 1 ml Diethylamine (Merck)
- 120 ml Acetonitrile (Merck)

微量層析管(microbore column)

15 \times 1 mm，內填 5 μm 的 C₁₈ 粒子

流速：0.05 ml/min

偵測電極(Detector cell)

BAS 4C 薄層玻璃碳工作電極 (glassy carbon working electrode)，維持在 +0.75 伏特，氯化銀參考電極(Ag/AgCl referenced electrode)²⁰。

三、標準品和樣品的儲存

備用溶液(stock solution)用 0.1 M perchloric acid 製成含有 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 標準品(DA; DOPAC: dihydroxyphenylacetic acid; HVA: homovanillic acid ; 5-HIAA: 5-hydroxyindole acetic acid; 5-

HT) 的個別配製。再將個別配製的標準品 (DA, DOPAC, HVA, 5-HIAA, 5-HT) 混合, 使混合標準品的濃度為 1 $\mu\text{g/ml}$, 分裝在 Eppendorf 儲存在 -70°C 的冰箱中, 安定性可到 3 個月。每天再由混合標準品分別做出 DA, DOPAC, HVA, 5-HIAA, 5-HT 等五條校正曲線, 以便定量。

微透析樣品儘可能總是在實驗當天, 一收集到, 就立刻注入 HPLC 分析。(若非如此, 則儲存下的單胺的穩定度, 需做確認)。偶而, 樣品可累積, 並在分析前暫時放在冰桶中。

四、方法確認

要牢記微透析技術的侵犯性的本質, 所以, 確認單胺來自有功能的神經元, 而非來自受損的神經元, 或來自非神經元, 這事是重要的。必須執行一些確認實驗來釐清這個可能性(同時也幫助確認層析圖中波峰的鑑定)。以下是重要實驗。

(一)鈣離子和 tetrodotoxin 的敏感度

有些微透析的研究已經顯示, 當透析液換成不含鈣離子的, 或含有鈉離子管道 (sodium-channel) 阻斷劑 tetrodotoxin 的透析液時, DA、NA, 和 5-HT 的基礎釋放量都下降, 這是可預料到的, 也是我們已經知道的生理性的神經傳導物質釋出的情形¹⁷。

A、鈣離子相依性

做一組如前所示的透析液(假如合適, 加回收阻斷劑)和另一組不含 CaCl_2 的。用標準透析液對動物進行 2-3 小時的透析, 取得穩定的單胺釋出。然後換成不含鈣離子的透析液, 單胺釋放量將快速下降, 換回標準透析液後 60-80 分鐘, 單胺釋放量將恢復。雖然這將視基礎單胺量接近偵測極限 (detectable limit) 的程度, 但至少應降低 50%。

B、Tetrodotoxin 的敏感度

對急性或慢性實驗的動物進行標準品透析 2-3 小時, 得到穩定的單胺釋出情形, 然後換成含有 1 或 10 μM tetrodotoxin 的透析液 60 分鐘, 再換回原液。含 tetrodotoxin 時, 單胺量應顯著下降, 換回原液時應又恢復。

(二)生理性的刺激

神經去極化時將引起鈣離子相依的單胺釋出增多。誘發去極化的方法如下:

A 高鉀 - 單胺釋出的情形穩定後, 透析液換成含高鉀離子(50-100 mM)進行透析 20 分鐘, 會引發顯著而短暫的單胺釋出增多。若在換成高鉀透析液之前, 代以不含鈣離子的透析液, 高鉀離子對單胺釋出幾乎沒有影響力。

B 神經刺激 - 對中腦的單胺神經元細胞體或軸突部分進行電刺激, 可如預期的將有 NA、DA、5-HT 分泌增加¹⁷。

(三)神經元的損傷

單胺神經元選擇性和普遍性的損傷將造成單胺釋出顯著下降。所以要以前文所述之注意事項, 也就是經過一段穩定期間, 待其恢復到穩定狀況。在微透析實驗開始前, 應先用生化或組織化學的方法確認這個損害。另外要指出, 有些表現出正常量神經傳導物的動物其實有部分神經是受損的, 這是因其他的正常神經元會增加活動以代償, 作為測驗單胺來源的

實驗，損傷實驗不如前幾種方法明確。

(四)不同實驗條件的有效性

以上的這些準則，因不同實驗條件而變化很大，特別是不同探針，急性或慢性實驗都會產生不同結果。例如，有少數實驗報導說，腦微透析的單胺不是從功能性地單胺神經元而來。特別是使用環狀探針(非本實驗室所使用)植入紋狀體的急性實驗，發現 DA 的釋出與鈣離子不相關，且 5-HT 神經元受損時，5-HT 也不減少。雖然這好像暗示急性實驗不符合以上準則，但也有研究指出，這是例外而非常態。這些矛盾更強化了對實驗條件做確認的必要，尤其是急性實驗中，基礎值測定時間 (baseline period) 要夠長，這是決定性因素。

結 論

在活體大鼠上偵測腦內單胺釋出的這項技術，將對瞭解針刺及或電針穴位如何影響神經傳導非常有幫助。這項技術也將有助於我們更進一步了解單胺神經元功能的複雜性，觀察針刺或電針影響神經傳導的路徑，針刺或電針對中樞神經系統的作用，針刺或電針穴位有效性的原理，及不同穴位對神經傳導物質的不同影響。本實驗室對微透析技術的基本原則做了詳細的討論，也對操作技術做了詳細的解釋，希望本文對微透析在針刺或電針大鼠穴位的研究有所貢獻。

參考資料

1. Gu JC, Zhang LM. Acupuncture and moxibustion in primary health care in rural China, World Health Organization Forum 13: 51, 1992.
2. 石學敏，中醫綱目上冊，凱銓出版社，台北，pp. 287-305，1992。
3. Meyer JS, Teraura T, Sakamoto K, Kondo A. Central neurogenic control of cerebral blood flow. Neurology 21:247-262, 1971.
4. Furshpan EJ, Potter DD. Mechanism of nerve-impulse transmission at a crayfish synapse. Nature 180:342-343, 1957.
5. 楊楣良，實用針灸手冊，浙江科學技術出版社，浙江，pp. 4-8，1995。
6. Zettesstrom T, Sharp T, Marsden CA, Ungerstedt U. In vivo measurement of dopamine and its metabolites by intracerebral dialysis: changes after d-amphetamine. J Neurochem 41: 1769-1773, 1983.
7. 朱麗霞，徐維，陳正秋，針刺鎮痛中大腦皮層和腦幹的下行抑制及脊髓水平的的作用機理，針刺研究 16: 145-150, 1991。
8. 湯健、涂宗萍、任民峰、韓濟生，中樞乙醯膽鹼和 5-羥色胺在針刺鎮痛中的作用，針刺研究 5: 143-146, 1980。

9. 謝翠微、張萬琴、洪息君、韓濟生，大鼠中樞甲硫腦啡太和亮腦啡太含量與電針鎮痛的關係，生理學報 36: 192-197, 1984。
10. 韓濟生，中樞神經介質與針刺鎮痛，北京醫學院學報 12: 12-19, 1980。
11. Han JS. The neurochemical basis of pain relief by acupuncture, 中國醫藥科技出版社，北京，pp. 152-155, 1987。
12. 楊兆民，鞠傳軍，實用針灸選穴手冊，金盾出版社，北京，pp. 338-341, 1998。
13. 黃維三，針灸科學，正中書局，台北，pp. 9-11, 1985。
14. 林昭庚，新針灸大成，中國醫藥學院針灸研究中心，台中，1996。
15. 韓濟生，H.A.N.S.韓氏穴位暨神經刺激器，使用手冊，北京，1999。
16. Kaplan EA. Percutaneous electrical nerve stimulation for treatment of low back pain. JAMA 282: 941-942, 1999.
17. Sharp T, Zetterstrom T. In vivo measurement of monoamine neurotransmitter release using brain microdialysis. Stamford JA. (Ed) Monitoring neuronal activity. Oxford University Press, Oxford, U.K. pp. 147-179, 1992.
18. Tsai TH, Chen YF, Chen IF, Chen CF. Measurement of unbound caffeic acid in rat blood by on-line microdialysis coupled with liquid chromatography and its application to pharmacokinetic studies. J Chromatogr B 729:119-125, 1999.
19. Huang CT, Chen CF, Tsai TH. Pharmacokinetic study of granisetron in rat blood and brain by microdialysis. Life Sci 64:1921-1931, 1999.
20. Tsai TH, Chen CF. Simultaneous measurement of acetylcholine and monoamines by two serial on-line microdialysis systems, effects of methamphetamine on neurotransmitters release from the striatum of freely moving rats. Neurosci Lett 166: 175-177, 1994.

J Chin Med 12(2): 69-84, 2001

AN ANIMAL BRAIN MICRODIALYSIS MODEL FOR ACUPUNCTURE STUDY

T. H. Tsai^{1,2}, L. H. Wang², L. C. Hung¹, T. Y. Tseng² and C. F. Chen¹

¹ *National Research Institute of Chinese Medicine
Taipei, Taiwan*

² *Institute of Traditional Medicine, National Yang-Ming University
Taipei, Taiwan*

(Received 27th March 2001, revised MS received 17th April 2001, accepted 18th April)

Acupuncture has been used in the treatment of diseases and relief of pain for centuries in The Orient. Acupuncture may be effective in the management of patients with compromised cardiovascular, respiratory, endocrine and digestive function. Similarly, neuromuscular electrical stimulation has been commonly employed in Western countries to alleviate pain, augment muscle strength and enhance blood flow in clinic applications, particularly as adjunctive treatment for peripheral vascular diseases. In the same way, electrical stimulation of acupuncture points with skin plate electrodes can elicit the same physiological and therapeutic effects as those produced by acupuncture and electro-acupuncture techniques, most commonly in connection with treatment of with peripheral vascular disease. Recently, there are controversies in the literature as to the effects of traditional acupuncture, electro-acupuncture and neuromuscular electrical stimulation in the treatments on brain disease. In order to investigate the relationship between acupuncture and brain neurotransmitter disposition, the microdialysis technique, which involved the inserting into a specific brain region of an animal dialysis probe through which neurotransmitter levels could be continuously monitored, was employed. This paper provides the details of such an acupuncture-microdialysis model, and discussion of the advantages and limitations of such approach.

Key words: Acupuncture, Electro-acupuncture, Microdialysis, Neurotransmitter, High-performance liquid chromatography.

Corresponding to: Dr. T.H. Tsai, National Research Institute of Chinese Medicine, 155-1, Li-Nong Street Section 2, Taipei 112, Taiwan. Tel: (02) 2820-1999 ext 8091. Fax: (02) 2826-4276. E-mail: thtsai@cma23.nricm.edu.tw