

科技部補助

大專學生參與專題研究計畫研究成果報告

* *****
* 計畫名稱：探討芳香療法對內臟痛覺中樞杏仁核基因表現的潛在成效 *
* *****

執行計畫學生： 陳冠穎
學生計畫編號： NSC 102-2815-C-040-046-B
研究期間： 102年07月01日至103年02月28日止，計8個月
指導教授： 廖玟潔

處理方式： 本計畫可公開查詢

執行單位： 中山醫學大學醫學系解剖學科

中華民國 103年03月18日

摘要

內臟痛(Visceral pain)是臨床醫學上常見且具意義之症狀,影響生活甚鉅,也使得如何舒緩疼痛的不適感成為當今待解的課題。現今神經科學發現杏仁核(Amygdala)具有調節內臟活動和產生情緒之功能,同時屬於大腦嗅覺區的杏仁核也容易被氣味激活,進而調控並連結嗅覺、臟痛情緒與行為等反應。基於芳香療法藉著氣味和情緒的緊密連結原理,本研究目的為了解薰衣草精油噴霧吸入後,芳香氣味對於杏仁核內部神經傳導物質之影響,以及舒緩內臟痛覺的效用。

本實驗使用乙酸(acetic acid)腹腔注射大鼠作為誘導內臟痛動物模式。使用薰衣草精油(lavender oil)作為芳香治療嗅覺刺激的芳香劑。將動物分為內臟痛合併芳香治療、內臟痛無治療以及控制組三組。接續進行四小時行為觀察、收集尿液正腎上腺素(Norepinephrine)濃度檢驗、促腎上腺皮質激素釋放因子(corticotrophin releasing factor ; CRF)以及 c-Fos 早期基因免疫組織化學染色。實驗數據經過統計定量分析。結果顯示,尿液檢查顯示芳療實驗組之正腎上腺數據 (121.6 ± 4.7 ug/L)明顯少於臟痛組(159.2 ± 23 ug/L);芳療實驗組之杏仁核中 CRF 標誌神經元數目 (8.5 ± 0.5)明顯少於臟痛組(40 ± 1);芳療實驗組之杏仁核中 c-Fos 標誌神經元數目(115 ± 18.9)明顯少於臟痛組(317 ± 57.9)。實驗結果顯示芳香療法對於內臟痛動物確實可有效降低上列檢測數據。透過本實驗詳實之生物化學(biochemistry)以及解剖學(anatomy)的證據,深入剖析芳香氣味對於改善臟痛焦慮之影響,進一步證實芳香療法透過氣味改變內臟痛動物杏仁核神經傳導物質變化達到安定的目的,提供病人作為紓緩內臟痛之非侵入性療法。

關鍵詞

內臟痛(Visceral pain)、杏仁核中央核(Central nucleus of Amygdala)、芳香療法(Aromatherapy)、嗅覺(Olfactory)、免疫組織化學反應(immunohistochemistry; IHC)、正腎上腺素(Norepinephrine)、促腎上腺皮質激素釋放因子(corticotrophin releasing factor ; CRF)、c-Fos 早期基因

前言

自古以來,內臟疼痛一直是醫院中常見的病症之一,也是一個造成社會和經濟負擔的健康問題。國家統計調查顯示,腹痛是引起門診患者臨床就診的最常見症狀。在許多胃腸病症中,腹痛常常是主要的主訴症狀。例如:膽結石、急性胰腺炎、急性闌尾炎及憩室炎、功能性胃腸病等等,都是常見得情形(Russo, Wei et al. 2004, Everhart and Ruhl 2009, Peery, Dellon et al. 2012)。統計資料顯示,單在美國憩室炎和急性胰腺炎的花費就超過 20 億美元,功能性胃腸病在美國的年度治療費用達更高達 166 億美元。其中,疼痛更是最常見及難以控制的症狀

(Drossman 2006)。內臟疾病帶來的疼痛不但造成人們身體的不適，還帶給人生活的麻煩和情緒上的困擾，甚至降低了患者的生活品質，進一步影響人類的心理層面。因此，如何舒緩患者的內臟疼痛感儼然成為一個不可忽視的醫學課題。

內臟疼痛是一種傷害相關的感覺，由於胸廓、骨盆或腹部內臟機械性感受器啟動而形成。然而它常伴隨包括噁心、嘔吐、生命體徵變化等等多種症狀以及情緒表現(Mayer 2000)。先前的研究表明，內臟痛會誘發或增強患者精神的病變。最近的報告也表明，情緒狀態起伏會調節源於內臟功能障礙的疼痛感。人們認為，情感和傷害性系統之間有密切的關連性。因為情感和疼痛感源於相同的大腦核區，所以情緒刺激可調節痛覺的形成，並誘發痛覺傳導過程(Burstein 1996)。

杏仁核為前腦結構，由數個不同的核區所組成，包括淺核、基底外側核、中央核和內側核，它被認為在整合嗅覺刺激引發的內臟痛以及情緒反應有重要作用(Gallagher and Chiba 1996)。電生理研究也表明，杏仁核的病變將減少例如發出叫聲等情感有關的疼痛反應(Goldstein, Rasmusson et al. 1996)和壓力後痛覺喪失以及休克誘發的痛覺過敏(Grijalva, Levin et al. 1990, Werka 1997, Crown, King et al. 2000)。此外，人類功能性神經影像學研究也證實杏仁核參與接收、整合和編輯內臟的疼痛，與促成情緒反應相關(Becerra, Breiter et al. 2001, Bornhovd, Quante et al. 2002)。杏仁核具有神經元能分泌 GABA、鴉片肽、促腎上腺皮質激素釋放因數(CRF)、神經降壓素、促生長素抑制素、甘丙肽、P 物質等神經傳導物質。此外，杏仁核與下丘腦及腦幹的自主和調節中心密切聯繫，包括腦導水管周圍灰質、室旁核、中腦多巴胺中心、藍斑和中縫背核(Carrasco and Van de Kar 2003)。人們認為，內臟傷害性刺激與嗅覺資訊都會直接到達杏仁核的中央核(Gottfried, Deichmann et al. 2002)，隨後投射到一些前腦和腦幹結構引發情緒相關的行為反應(Pitkanen, Savander et al. 1997)。基於此觀點，推測利用嗅覺的刺激作用於杏仁核調節疼痛感，可能有助於為抵消內臟痛，作為治療的有效策略。

長期以來，人們認為吸入各種精油有助於外傷後的抗疼痛以及認知功能的改善，(Barocelli, Calcina et al. 2004, Hritcu, Cioanca et al. 2012)。研究指出，嗅覺訊息經由嗅球和梨狀皮質傳到杏仁核，再經腦幹和丘腦中繼內臟和味覺資訊，投射到達包括古皮質、舊皮質、旁古舊皮質，尤其新皮質區等廣泛腦區。(董曉莉, 2002)然而，目前精油芳香療法的分子機轉與成效不明朗。另一方面，實驗證實用於紓解內臟痛的治療更是少之又少。本研究旨在於確定內臟痛覺刺激導致杏仁核的代謝指標物變化，以及進一步探討吸入芳香劑減少內臟疼痛相關神經功能障礙的潛在影響。本研究使用的薰衣草精油作為芳香療法芳香劑。為了瞭解芳香化合物治療的成效，針對芳香療法對於實驗組情緒行為與內臟痛傷害感受的程度的變化予以定量，前者利用具體的站立行為來觀察；後者以腹部收縮作為指標。正腎上腺素尿檢，檢測尿液正腎上腺素的濃度，用以回推體內正腎上腺素濃度，評量內分泌的變化，用以闡明芳香治療的效果，同時也用來窺測其全身性的作用。最後，關於痛覺傳遞對於杏仁核代謝指標的變化，以及芳香治療對於痛覺抑制效果的神經學證據，使用顯微鏡辨識杏仁核中央核，並以免疫組織化學染色標誌早期基因

c-fos 與促腎上腺皮質激素釋放激素(corticotropin releasing factor ; CRF)的表現量變化進一步在顯微鏡下觀察並定量統計。

研究材料與方法

【動物模型之建立】

內臟痛(visceral pain)模型之內臟痛誘導使用乙酸(acetic acid)腹腔注射。薰衣草精油(lavender oil)用作芳香治療嗅覺刺激的芳香劑。內臟痛模型沿用張老師(Hwang, Chang et al. 2007)建立的乙酸腹腔注射誘導內臟痛方法，選擇體重約 240 克健康意識清醒的大鼠，接受腹腔注射 2%乙酸 1 毫升(溶於生理食鹽水)。芳香療法使用 1%薰衣草油藉著超音波括香機擴散香精，將大鼠至於長 39、寬 33、高 25 公分芳香療浴槽中，浴槽上加蓋並保留一道通風間隙讓空氣能流通，持續噴霧括香 4 小時。實驗過程給予充足飲水。觀察腹部收縮行為。觀察用後腳站立，前腳懸空或者靠牆探索行為(rearing behavior)的次數。成功誘導臟痛的大鼠皆有腹部收縮行為(writhing test)，全程使用數碼影像攝影機記錄。

【正腎上腺素尿檢】

收集 4 小時內控制組與實驗組大白鼠排出的尿液。隨後用微量吸管加入 6N 鹽酸溶液(HCl solution)，尿液:鹽酸 = 150:1，於 4°C 冰箱暫時保存。最後將檢體送驗。

【組織固定與切片】

實驗鼠經處理後，即立刻自芳香療癒槽內取出，於最短時間內將動物經腹腔內注射 7%水合氯醛(chloral hydrate)做深部麻醉。待動物完全昏迷，以 18 號針頭插入左心室，導入含 1% 亞硝酸鈉(sodium nitrite)及 1% 檸檬酸鈉(sodium citrate)之生理食鹽水，引流血液後，經左心室導入含有 4% 多聚甲醛(paraformaldehyde)之 0.1M 磷酸鹽緩衝液(phosphate buffer, PB, pH 7.4)，組織經固定後，取下 2mm 到 6mm 的區段，置浸於濃度漸增(10%~30%)之蔗糖磷酸鹽緩衝液(sucrose buffer)內，置於 4°C 冰箱內，直到組織下沉於糖水底部。翌日，以冷凍切片機(cryostat)將組織塊切成 30 μ m 厚之切片，然後以貼片方式按照吻端到尾端的次依序貼附於 silane 塗料玻片(silane coating slide)，於 -20°C 冰箱暫時保存。然後進行 CRF 與 c-fos 免疫組織化學反應。

【免疫組織化學染色】

首先將切片以 0.01M 磷酸鹽食鹽緩衝液(phosphate buffer saline, PBS, pH 7.4)充分潤洗，再將切片置於含 10% 甲醇(methanol)及 3%過氧化氫(H₂O₂)之 0.01M PBS 中，於室溫下充分振盪一小時，以去除內生性過氧化氫。反應後，將切片以 0.01M PBS 充分潤洗，再將切片置於含有牛血清蛋白(bovine serum albumin)之 0.01M PBS 中，於室溫下作用一小時，以去除非專一性結合。之後，

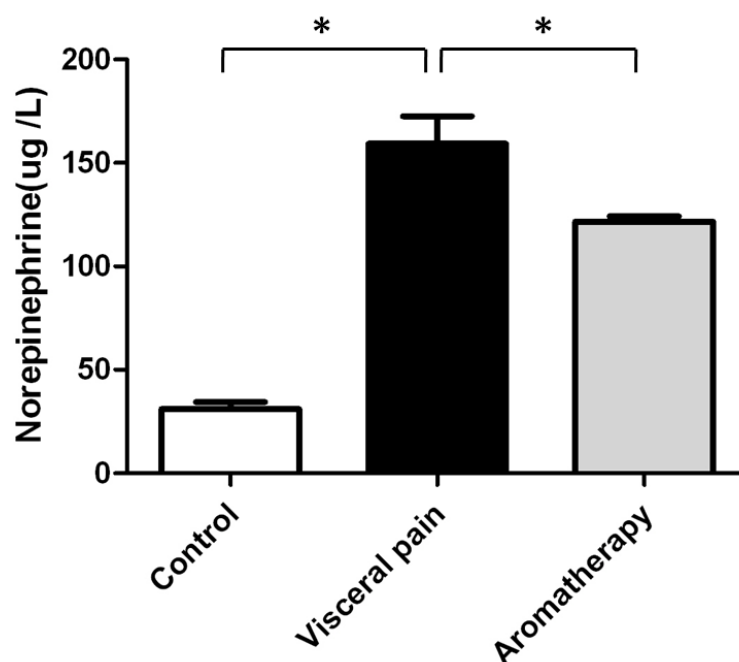
分別將切片培養於同上述步驟之混合液所稀釋之一級抗體 (分別有 c-fos 與 CRF) 中，並於 4°C 環境下，振盪反應 24 小時。反應後將切片以 0.01M PBS 充分潤洗，並分別將切片培養於二級抗體中，於室溫下作用兩小時。反應後將切片以 0.01M PBS 充分潤洗，再將切片經三級抗體反應，於室溫下反應一小時。反應結束後以 0.05M Tris buffer, pH 7.6 充分潤洗切片三次。接著以 DAB (3,3'-diaminobenzidine tetra-hydrochloride, Sigma D-5637) 進行呈色反應。呈色後，將切片貼於經動物膠黏附處理之載玻片上，經空氣陰乾後，透過濃度 (70%~100%) 之酒精脫水，再經蘇木精透明化後，以封片膠封片。

【資料定量分析】

將免疫組織化學染色玻片置於光學顯微鏡下觀察，辨認杏仁核的中央核區位，再經數位相機擷取影像後，將影像轉換成電子圖檔，並進行細胞計數之定量分析。正常組、內臟痛組及芳香治療之內臟痛組所得之免疫化學染色統計數據、尿液正腎上腺素濃度檢驗數據與動物行為學實驗的數據。皆經變異數分析檢定(one-way ANOVA analysis)做統計上的檢定與分析。變異數分析檢定之顯著差異度 (significant difference)訂於 $p < 0.05$ 。

實驗結果

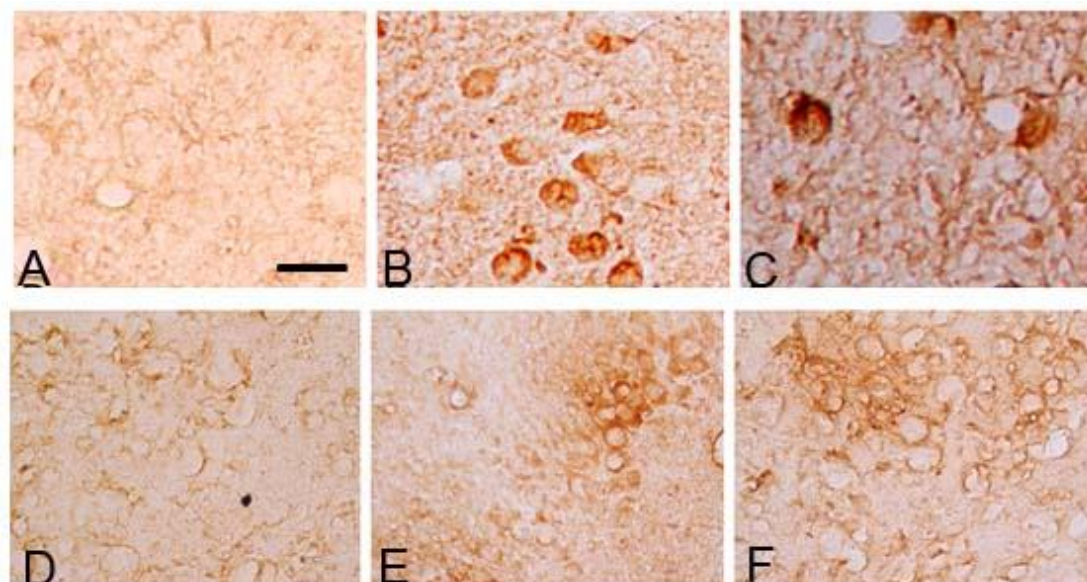
Fig.1



圖一：柱狀圖顯示正常鼠 (Control)，內臟痛鼠 (Visceral pain) 與芳香治療之內臟痛鼠 (Aromatherapy)，尿液正腎上腺素濃度圖。由圖中得知，正常鼠尿液正腎上

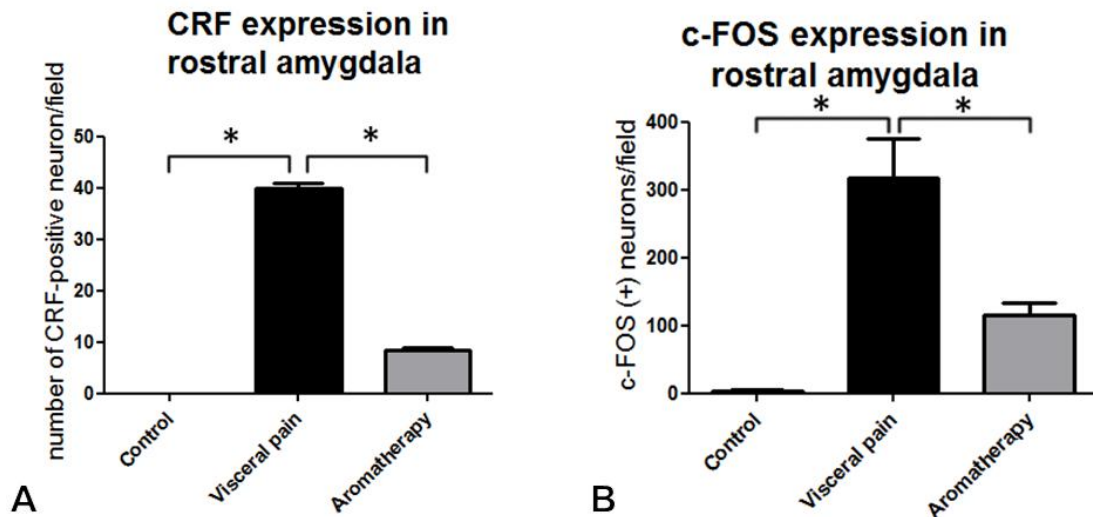
腺素濃度為 $31.1 \pm 5.6 \mu\text{g/L}$ 。然經內臟痛誘導處理後，尿液正腎上腺素濃度明顯上升至 $159.2 \pm 23. \mu\text{g/L}$ 。然而內臟痛誘導透過芳香治療處理後，正腎上腺素濃度僅有 $121.6 \pm 4.7 \mu\text{g/L}$ ，較內臟痛誘導組明顯下降，經變異數分析檢定三實驗組別間均具有顯著差異。 $(p < 0.05)$

Fig.2



圖二：光學顯微鏡照片顯示杏仁核的中央核(距前囟門 $-1.80 \sim -2.8 \text{mm}$)， $\text{bar} = 50 \mu\text{m}$ 。正常鼠(A, D)，內臟痛鼠(B, E)及芳香治療之內臟痛鼠(C, F)杏仁核中央核內 c-fos 免疫組織化學反應(A, B, C) 暨 CRF 免疫組織化學反應 (D, E, F) 活性表現。由圖中得知，CRF 免疫組織化學染色 DAB 呈色的產物標誌於細胞質，而 c-fos 免疫組織化學反應 DAB 呈色產物標誌於細胞核。正常鼠不具有 CRF 免疫組織化學反應呈色之神經元 (D)，而且只具少數 c-fos 免疫組織化學反應呈色神經元(A)。然經內臟痛誘導處理後，杏仁核中央核內無論具 c-fos 或 CRF 標誌之神經元數量皆明顯大量呈現 (B, E)，然而內臟痛誘導透過芳香治療處理後，杏仁核中央核內也具有 c-fos 或 CRF 正向標誌之神經元表現，然而具數量皆較內臟痛誘導組顯著減少(C, F)。

Fig.3



圖三：柱狀圖顯示正常鼠 (Control)，內臟痛鼠 (Visceral pain) 與芳香治療之內臟痛鼠 (Aromatherapy)，杏仁核之中央核 (距前囟門 -1.8~-2.8mm)，腎上腺皮質素釋放因子 (CRF) 組織化學呈色反應 (A) 與即刻早期基因 c-fos 組織化學呈色反應 (B) 單位視野神經元數目統計圖。由圖 A 得知，正常鼠無 CRF 免疫組織化學呈色反應神經元。然經內臟痛誘導處理後，CRF 免疫組織化學呈色反應神經元數量明顯大量出現。細胞計量結果顯示，內臟痛誘導處杏仁核之中央核單位面積有 40 ± 1 個神經元具 CRF 免疫組織化學反應活性表現，然而內臟痛誘導透過芳香治療處理後，相同位置單位面積則僅有 8.5 ± 0.5 個神經元具 CRF 反應活性表現，較內臟痛誘導組明顯減少，經變異數分析檢定三實驗組別間均具有顯著差異 (A)。 $(p < 0.05)$ 。

由圖 B 得知，正常鼠有 4 ± 0.8 極少量 c-fos 免疫組織化學呈色反應神經元。然經內臟痛誘導處理後，c-fos 免疫組織化學呈色反應神經元數量明顯大量出現。細胞計量結果顯示，內臟痛誘導處杏仁核之中央核單位面積約有 317 ± 57.9 個神經元具 c-fos 免疫組織化學反應活性表現，然而內臟痛誘導透過芳香治療處理後，相同位置單位面積則約只有 115 ± 18.9 個神經元具 c-fos 反應活性表現，較內臟痛誘導組明顯減少，經變異數分析檢定三實驗組別間均具有顯著差異 (B)。 $(p < 0.05)$ 。

討論

本實驗首度嘗試以薰衣草精油芳香療法進行舒緩內臟痛的研究。先前諸多研究已證實正腎上腺素 (norepinephrine) 為重要之交感神經傳導物質，也是人體應付壓力的荷爾蒙 (stress hormone)，影響腦部控制注意力和情緒反應中樞杏仁核 (amygdala)，於內臟痛期間將提高血中的膽固醇、血壓心搏速率、增加骨骼肌的血流和腦部之供氧量，體內正腎上腺素活性可應用於檢視藥物作用於內臟痛大鼠模型之療效 (Korzeniewska-Rybicka and Plaznik 2001, O'Mahony, Dinan et al.

2006)。本研究採集芳香療法後內臟痛大鼠尿液之 catecholamines (正腎上腺素 norepinephrine 代謝物)作為生化檢驗證據，結果顯示此指標反應因芳香療法處理而顯著降低(圖一)。本研究發現正常組大鼠體內正腎上腺素濃度約為 31.1 ± 5.6 ug/L。然經注射醋酸引發內臟痛後四小時，正腎上腺素濃度上升至 159.2 ± 23 .ug/L。內臟痛組之大鼠經四小時的薰衣草芳香精油噴霧治療後，正腎上腺素濃度降至 121.6 ± 4.7 g/L，較內臟痛誘導組明顯下降($P < 0.05$)，藉由正腎上腺素濃度的變化首先反應芳香療法之功效。參考 Kania 等人的研究，經藥物舒緩十二指腸脹痛的動物，其血液中 catecholamines (norepinephrine 代謝物)的濃度將顯著的降低(Kania and Sutiak 2011)，搭配觀察全身性臨床行為表徵，正腎上腺素濃度不失為評估內臟痛程度的代表性指標。

c-fos 基因是即刻早期基因家族中的重要成員，為參與細胞最早功能活動的基因，被認為是研究中樞神經系統最具代表性的即刻早期基因，c-fos 的快速表現反應為評估環境刺激後中央核神經元細胞內反應最佳工具(Nakagawa, Katsuya et al. 2003, Lazovic, Wrzos et al. 2005, Shaw, Norwood et al. 2011)。本實驗結果顯示內臟痛誘導透過芳香治療處理後之臟痛組動物，其中央核 c-fos 免疫化學反應表現量，較臟痛組動物顯著減少(圖二 A-C，圖三 B)。由上述結果可推知，中央核 c-fos (+) 神經元為杏仁核之中最先對於臟痛刺激具有反應的核區，經過芳香療法處理之後，中央核神經元中 c-fos 的表現量也會因芳香療效而逐漸減少。

由於杏仁核接受來自各種大腦皮質感覺，其中央核接收並整合來自迷走孤立束徑核(NTS)內臟痛覺訊息，於調節壓力所引起的情緒及行為反應上扮演重要的角色(McDonald, Shammah-Lagnado et al. 1999, Sah, Faber et al. 2003)。中央核神經元訊息藉由多種神經傳導物質傳導，包括促腎上腺皮質素釋放因子

(corticotropin-releasing factor, CRF)和正腎上腺素(norepinephrine, NE)，皆參與調控痛覺、情緒及壓力所引起的認知(Liu, Lonart et al. 2007, Marchant, Densmore et al. 2007)。本研究嘗試針對芳香療法對於實驗組情緒行為與內臟痛傷害感受的程度的變化予以分析定量。實驗利用杏仁核中央核進行促腎上腺皮質素釋放因子(CRF)之免疫組織化學染色，爾後進行定量。觀察 CRF 表現量於核區中之變化(圖二 D-F，圖三 A)，中央核神經元中 CRF 的表現量也會因芳香療效而逐漸減少。

正常情況下，吸入薰衣草香氣分子經嗅覺受器，傳遞至邊緣系統杏仁核，快速的產生內啡肽與神經傳導物質，調控新的神經迴路，進而產生正向愉悅的情緒。過去的研究也指出吸入薰衣草精油確實可以促使大腦中不同區域(如:下視丘、杏仁核)釋出調節情緒相關的神經傳遞物質如多巴胺，血清素(Tsang and Ho 2010, Shaw, Norwood et al. 2011)，產生抗焦慮的作用。已知中央核區主體主位於杏仁核前半部(距前囟門-1.80~-2.30 mm)(Butler, Sharko et al. 2011)，而我們的數據顯示因內臟痛而引起促腎上腺皮質素釋放因子和即刻早期基因 c-fos 表現量上升的神經元，以位於杏仁核前半部居多；經薰衣草精油芳香療法處理之內臟痛組動物杏仁核前半部神經元，其促腎上腺皮質素釋放因子和即刻早期基因 c-fos 之表現量

明顯隨之下降，顯示內臟痛覺與中央核有明顯之關聯性。杏仁核前半部之中央核神經元與前額葉的聯繫，除了可產生正向情緒外還可發揮抑制杏仁核神經元的活性，降低負面情感如焦慮、恐懼(McDonald, Mascagni et al. 1996)之作用。本研究利用醋酸誘導內臟痛動物經芳香療法處理後，採行為觀察、正腎上腺素濃度、杏仁核之中央核 c-fos 免疫化學反應與 CRF 免疫化學反應活性表現等方法，證實芳香療法對於內臟痛的治療功效。透過杏仁核前部之中央核神經元內神經傳導物質調控，降低神經元活性後再建新的神經迴路，抑制臟痛引起的焦慮。藉由生物化學以及神經解剖學的角度切入觀察，相信將有助了解薰衣草芳香療法對於降低內臟痛覺的確切機制，最終希望可作為紓解內臟痛的非侵入性療法之首選。

參考文獻

1. Barocelli, E., F. Calcina, M. Chiavarini, M. Impicciatore, R. Bruni, A. Bianchi and V. Ballabeni (2004). "Antinociceptive and gastroprotective effects of inhaled and orally administered *Lavandula hybrida* Reverchon "Grosso" essential oil." Life Sci **76**(2): 213-223.
2. Becerra, L., H. C. Breiter, R. Wise, R. G. Gonzalez and D. Borsook (2001). "Reward circuitry activation by noxious thermal stimuli." Neuron **32**(5): 927-946.
3. Bornhovd, K., M. Quante, V. Glauche, B. Bromm, C. Weiller and C. Buchel (2002). "Painful stimuli evoke different stimulus-response functions in the amygdala, prefrontal, insula and somatosensory cortex: a single-trial fMRI study." Brain **125**(Pt 6): 1326-1336.
4. Burstein, R. (1996). "Somatosensory and visceral input to the hypothalamus and limbic system." Prog Brain Res **107**: 257-267.
5. Butler, R. K., A. C. Sharko, E. M. Oliver, P. Brito-Vargas, K. F. Kaigler, J. R. Fadel and M. A. Wilson (2011). "Activation of phenotypically-distinct neuronal subpopulations of the rat amygdala following exposure to predator odor." Neuroscience **175**: 133-144.
6. Carrasco, G. A. and L. D. Van de Kar (2003). "Neuroendocrine pharmacology of stress." Eur J Pharmacol **463**(1-3): 235-272.
7. Crown, E. D., T. E. King, M. W. Meagher and J. W. Grau (2000). "Shock-induced hyperalgesia: III. Role of the bed nucleus of the stria terminalis and amygdaloid nuclei." Behav Neurosci **114**(3): 561-573.
8. Drossman, D. A. (2006). "Rome III: the new criteria." Chin J Dig Dis **7**(4): 181-185.
9. Everhart, J. E. and C. E. Ruhl (2009). "Burden of digestive diseases in the United States part I: overall and upper gastrointestinal diseases." Gastroenterology **136**(2): 376-386.
10. Gallagher, M. and A. A. Chiba (1996). "The amygdala and emotion." Curr Opin

Neurobiol **6**(2): 221-227.

11. Goldstein, L. E., A. M. Rasmusson, B. S. Bunney and R. H. Roth (1996). "Role of the amygdala in the coordination of behavioral, neuroendocrine, and prefrontal cortical monoamine responses to psychological stress in the rat." J Neurosci **16**(15): 4787-4798.
12. Gottfried, J. A., R. Deichmann, J. S. Winston and R. J. Dolan (2002). "Functional heterogeneity in human olfactory cortex: an event-related functional magnetic resonance imaging study." J Neurosci **22**(24): 10819-10828.
13. Grijalva, C. V., E. D. Levin, M. Morgan, B. Roland and F. C. Martin (1990). "Contrasting effects of centromedial and basolateral amygdaloid lesions on stress-related responses in the rat." Physiol Behav **48**(4): 495-500.
14. Hritcu, L., O. Cioanca and M. Hancianu (2012). "Effects of lavender oil inhalation on improving scopolamine-induced spatial memory impairment in laboratory rats." Phytomedicine **19**(6): 529-534.
15. Hwang, B. H., H. M. Chang, Z. H. Gu and R. Suzuki (2007). "c-fos gene expression is increased in the paraventricular hypothalamic nucleus of Sprague-Dawley rats with visceral pain induced by acetic acid without detectable changes of corticotrophin-releasing factor mRNA: a quantitative approach with an image analysis system." Anat Rec (Hoboken) **290**(4): 406-413.
16. Kania, B. F. and V. Sutiak (2011). "Influence of centrally administered diltiazem on behavioural responses, clinical symptoms, reticulo-ruminal contractions and plasma catecholamine level after experimentally induced duodenal distension in sheep." Res Vet Sci **90**(2): 291-297.
17. Korzeniewska-Rybicka, I. and A. Plaznik (2001). "Role of serotonergic and noradrenergic systems in a model of visceral pain." Pol J Pharmacol **53**(5): 475-480.
18. Lazovic, J., H. F. Wrzos, Q. X. Yang, C. M. Collins, M. B. Smith, R. Norgren, K. Matyas and A. Ouyang (2005). "Regional activation in the rat brain during visceral stimulation detected by c-fos expression and fMRI." Neurogastroenterol Motil **17**(4): 548-556.
19. Liu, X., G. Lonart and L. D. Sanford (2007). "Transient fear-induced alterations in evoked release of norepinephrine and GABA in amygdala slices." Brain Res **1142**: 46-53.
20. Marchant, N. J., V. S. Densmore and P. B. Osborne (2007). "Coexpression of prodynorphin and corticotrophin-releasing hormone in the rat central amygdala: evidence of two distinct endogenous opioid systems in the lateral division." J Comp Neurol **504**(6): 702-715.
21. Mayer, E. A. (2000). "Spinal and supraspinal modulation of visceral sensation."

Gut **47 Suppl 4**: iv69-72; discussion iv76.

22. McDonald, A. J., F. Mascagni and L. Guo (1996). "Projections of the medial and lateral prefrontal cortices to the amygdala: a Phaseolus vulgaris leucoagglutinin study in the rat." Neuroscience **71**(1): 55-75.
23. McDonald, A. J., S. J. Shammah-Lagnado, C. Shi and M. Davis (1999). "Cortical afferents to the extended amygdala." Ann N Y Acad Sci **877**: 309-338.
24. Nakagawa, T., A. Katsuya, S. Tanimoto, J. Yamamoto, Y. Yamauchi, M. Minami and M. Satoh (2003). "Differential patterns of c-fos mRNA expression in the amygdaloid nuclei induced by chemical somatic and visceral noxious stimuli in rats." Neurosci Lett **344**(3): 197-200.
25. O'Mahony, S., T. G. Dinan, P. W. Keeling and A. S. Chua (2006). "Central serotonergic and noradrenergic receptors in functional dyspepsia." World J Gastroenterol **12**(17): 2681-2687.
26. Peery, A. F., E. S. Dellon, J. Lund, S. D. Crockett, C. E. McGowan, W. J. Bulsiewicz, L. M. Gangarosa, M. T. Thiny, K. Stizenberg, D. R. Morgan, Y. Ringel, H. P. Kim, M. D. Dibonaventura, C. F. Carroll, J. K. Allen, S. F. Cook, R. S. Sandler, M. D. Kappelman and N. J. Shaheen (2012). "Burden of gastrointestinal disease in the United States: 2012 update." Gastroenterology **143**(5): 1179-1187 e1171-1173.
27. Pitkanen, A., V. Savander and J. E. LeDoux (1997). "Organization of intra-amygdaloid circuitries in the rat: an emerging framework for understanding functions of the amygdala." Trends Neurosci **20**(11): 517-523.
28. Russo, M. W., J. T. Wei, M. T. Thiny, L. M. Gangarosa, A. Brown, Y. Ringel, N. J. Shaheen and R. S. Sandler (2004). "Digestive and liver diseases statistics, 2004." Gastroenterology **126**(5): 1448-1453.
29. Sah, P., E. S. Faber, M. Lopez De Armentia and J. Power (2003). "The amygdaloid complex: anatomy and physiology." Physiol Rev **83**(3): 803-834.
30. Shaw, D., K. Norwood and J. C. Leslie (2011). "Chlordiazepoxide and lavender oil alter unconditioned anxiety-induced c-fos expression in the rat brain." Behav Brain Res **224**(1): 1-7.
31. Tsang, H. W. and T. Y. Ho (2010). "A systematic review on the anxiolytic effects of aromatherapy on rodents under experimentally induced anxiety models." Rev Neurosci **21**(2): 141-152.
32. Werka, T. (1997). "The effects of the medial and cortical amygdala lesions on post-stress analgesia in rats." Behav Brain Res **86**(1): 59-65.
33. 董曉莉,謝俊霞(2002)杏仁核的研究及其與帕金森病的關係 (青島大學醫學院學報 vol.38, no.2)