

# 科技部補助專題研究計畫成果報告 期末報告

鏈?佐菌素誘發糖尿病多發性神經病變的皮膚內神經調控疼痛機制

計畫類別：個別型計畫  
計畫編號：NSC 102-2320-B-040-024-  
執行期間：102年08月01日至103年07月31日  
執行單位：中山醫學大學醫學系解剖學科

計畫主持人：曾拓榮

計畫參與人員：學士級-專任助理人員：張淑惠

處理方式：

1. 公開資訊：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，1年後可公開查詢
2. 「本研究」是否已有嚴重損及公共利益之發現：否
3. 「本報告」是否建議提供政府單位施政參考：否

中華民國 103 年 10 月 29 日

中文摘要：糖尿病是因急性高血糖造成慢性併發症的發生。因此，我們使用已建立的動物實驗進行完整且系統性的評估糖尿病多發性神經病變。我們以鏈脲佐菌素(60毫克/公斤，單次腹腔注射方式)誘發原發性糖尿病(第一型糖尿病)，探討糖尿病神經病變後周邊神經系統建立的相關疼痛感覺傳遞機制。隨著誘發後時間變化，糖尿病動物開始表現體重增加停滯的現象並且維持明顯高血糖的狀況。疼痛行為在誘發糖尿病後，產生對熱覺過敏反應和機械性刺激敏感反應的現象。糖尿病動物對熱覺刺激的閾值表現顯著降低並維持在整個實驗期間。類似地，在糖尿病動物開始表現對機械性刺激的閾值降低。皮膚內神經纖維支配是藉由免疫組織化學染色技術，探討背根神經節內神經元在周邊有髓鞘 A 和無髓鞘 C 纖維的變化。因此，我們首先定義表皮下神經纖維為皮膚內真皮層內的神經纖維。表現生長相關蛋白-43 的表皮下神經纖維在皮膚內真皮層具有神經纖維束且呈現網狀分布。經由定量統計，糖尿病動物表現生長相關蛋白-43 的表皮下神經纖維有些許地增加但並無顯著差異。皮膚內真皮層表現的神經絲蛋白-200 表皮下神經纖維具有粗壯的神經纖維且呈現束狀分布，然而，定量表現神經絲蛋白-200 的表皮下神經纖維在糖尿病動物和正常動物之間完全沒有顯著差異。表現物質 P 的表皮下神經纖維呈現連續點狀的分布並且在誘發糖尿病後的開始顯著地增加。我們進一步發現磷酸化細胞外訊息調節激酶在表皮下神經纖維呈現連續線狀的分布，並且在誘發糖尿病動物後開始具有與物質 P 類似的增多表現。我們以足底部皮下注射不同濃度的細胞外訊息調節激酶抑制劑(U0126)說明在周邊皮膚內可依劑量-依賴地抑制糖尿病動物的熱覺過敏反應，但是對於機械性刺激敏感反應並無顯著作用。因此，我們認為表皮下無髓鞘 C 纖維能上調磷酸化細胞外訊息調節激酶產生物質 P 來加強熱覺過敏反應。這結果提供了糖尿病多發性神經病變後疼痛行為在週邊治療上的新策略。

中文關鍵詞：疼痛行為，鏈脲佐菌素，表皮下神經纖維，生長相關蛋白-43，神經絲蛋白-200，物質 P，磷酸化細胞外訊息調節激酶。

英文摘要：Diabetes Mellitus (DM) is caused by the acute hyperglycemia accompanying the chronic complications. Thus, we assigned a well-established animal model to evaluate the diabetic polyneuropathy by streptozotocin (STZ, 60mg/kg, single intraperitoneal injection). After suggestion time variation of STZ induction, the changes of body weights revealed the

stagnation phenomenon and the hyperglycemia maintained the diabetic condition. Regarding the neuropathic pain, thermal threshold of heat sensation in STZ-induced animals had been shown to reduce significantly throughout the experimental periods. Similarly, STZ-induced animals began to show on the lower threshold after mechanical stimulation. By the immunohistochemical staining techniques, we first defined the subepidermal nerve fibers (SENFs) as the myelinated A and unmyelinated C fibers within the dermis of skin. GAP-43-immunoreactivity (IR) SENFs formed the nerve bundles showing the meshwork appearance. By the quantitative statistical analysis, GAP-43-IR SENFs in the STZ-induced animals showed a slightly increase of GAP-43 expression but without any significant difference. NF-200-IR SENFs were with the thick nerve bundles in the dermis of skin. However, there was no significant difference in NF-200-IR SENFs compared with the control animals. SP-IR SENFs showed a continuous dotted distribution and significantly increased after STZ induction. We further found that the STZ induction increased phosphorylated extracellular signal-regulated kinase (pERK) expression in the SENFs showed a continuous linear distribution. We applied the different concentrations of ERK inhibitors (U0126) by intraplantar injections and confirmed the dose-dependently inhibition of thermal hyperalgesia. Therefore, we suggested that unmyelinated C fibers upregulated pERK expression could increase SP expression to enhance the thermal hyperalgesia in the STZ-induced animals.

英文關鍵詞： Neuropathic pain, Streptozotocin, Subepidermal nerve fibers, Growth associated protein-43, Neurofilament-200, Substance P, Phosphorylated extracellular signal-regulated kinase.

# 科技部補助專題研究計畫成果報告

(期中進度報告/期末報告)

鏈脛佐菌素誘發糖尿病多發性神經病變的皮膚內神經調控疼痛機制

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：MOST 102-2320-B-040-024-

執行期間：2013年08月01日至2014年07月31日

執行機構及系所：中山醫學大學 醫學系 解剖學科

計畫主持人：曾拓榮

共同主持人：

計畫參與人員：張淑惠

本計畫除繳交成果報告外，另含下列出國報告，共 0 份：

執行國際合作與移地研究心得報告

出席國際學術會議心得報告

期末報告處理方式：

1. 公開方式：

非列管計畫亦不具下列情形，立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權，一年二年後可公開查詢

2. 「本研究」是否已有嚴重損及公共利益之發現：否 是

3. 「本報告」是否建議提供政府單位施政參考 否 是，\_\_\_\_\_（請列舉提供之單位；本部不經審議，依勾選逕予轉送）

中華民國 103 年 10 月 28 日

目錄：

前言.....	1
研究目的.....	1
文獻探討.....	1
研究方法.....	4
結果與討論（含結論與建議）.....	7
參考文獻.....	12
附圖.....	16
附錄.....	25

## 中文摘要：

糖尿病是因急性高血糖造成慢性併發症的發生。因此，我們使用已建立的動物實驗進行完整且系統性的評估糖尿病多發性神經病變。我們以鏈脲佐菌素(60 毫克/公斤, 單次腹腔注射方式)誘發原發性糖尿病(第一型糖尿病)，探討糖尿病神經病變後周邊神經系統建立的相關疼痛感覺傳遞機制。隨著誘發後時間變化，糖尿病動物開始表現體重增加停滯的現象並且維持明顯高血糖的狀況。疼痛行為在誘發糖尿病後，產生對熱覺過敏反應和機械性刺激敏感反應的現象。糖尿病動物對熱覺刺激的閾值表現顯著降低並維持在整個實驗期間。類似地，在糖尿病動物開始表現對機械性刺激的閾值降低。皮膚內神經纖維支配是藉由免疫組織化學染色技術，探討背根神經節內神經元在周邊有髓鞘 A 和無髓鞘 C 纖維的變化。因此，我們首先定義表皮下神經纖維為皮膚內真皮層內的神經纖維。表現生長相關蛋白-43 的表皮下神經纖維在皮膚內真皮層具有神經纖維束且呈現網狀分布。經由定量統計，糖尿病動物表現生長相關蛋白-43 的表皮下神經纖維有些許地增加但並無顯著差異。皮膚內真皮層表現的神經絲蛋白-200 表皮下神經纖維具有粗壯的神經纖維且呈現束狀分布，然而，定量表現神經絲蛋白-200 的表皮下神經纖維在糖尿病動物和正常動物之間完全沒有顯著差異。表現物質 P 的表皮下神經纖維呈現連續點狀的分布並且在誘發糖尿病後的開始顯著地增加。我們進一步發現磷酸化細胞外訊息調節激酶在表皮下神經纖維呈現連續線狀的分布，並且在誘發糖尿病動物後開始具有與物質 P 類似的增多表現。我們以足底部皮下注射不同濃度的細胞外訊息調節激酶抑制劑(U0126)說明在周邊皮膚內可依劑量-依賴地抑制糖尿病動物的熱覺過敏反應，但是對於機械性刺激敏感反應並無顯著作用。因此，我們認為表皮下無髓鞘 C 纖維能上調磷酸化細胞外訊息調節激酶產生物質 P 來加強熱覺過敏反應。這結果提供了糖尿病多發性神經病變後疼痛行為在週邊治療上的新策略。

## 關鍵詞：

疼痛行為，鏈脲佐菌素，表皮下神經纖維，生長相關蛋白-43，神經絲蛋白-200，物質 P，磷酸化細胞外訊息調節激酶。

## 英文摘要：

Diabetes Mellitus (DM) is caused by the acute hyperglycemia accompanying the chronic complications. Thus, we assigned a well-established animal model to evaluate the diabetic polyneuropathy by streptozotocin (STZ, 60mg/kg, single intraperitoneal injection). After suggestion time variation of STZ induction, the changes of body weights revealed the stagnation phenomenon and the hyperglycemia maintained the diabetic condition. Regarding the neuropathic pain, thermal threshold of heat sensation in STZ-induced animals had been shown to reduce significantly throughout the experimental periods. Similarly, STZ-induced animals began to show on the lower threshold after mechanical stimulation. By the immunohistochemical staining techniques, we first defined the subepidermal nerve fibers (SENFs) as the myelinated A and unmyelinated C fibers within the dermis of skin. GAP-43-immunoreactivity (IR) SENFs formed the nerve bundles showing the meshwork appearance. By the quantitative statistical analysis, GAP-43-IR SENFs in the STZ-induced animals showed a slightly increase of GAP-43 expression but without any significant difference. NF-200-IR SENFs were with the thick nerve bundles in the dermis of skin. However, there was no significant difference in NF-200-IR SENFs compared with the control animals. SP-IR SENFs showed a continuous dotted distribution and significantly increased after STZ induction. We further found that the STZ induction increased phosphorylated extracellular signal-regulated kinase (pERK) expression in the SENFs showed a continuous linear distribution. We applied the different concentrations of ERK inhibitors (U0126) by intraplantar injections and confirmed the dose-dependently inhibition of thermal hyperalgesia. Therefore, we suggested that unmyelinated C fibers upregulated pERK expression could increase SP expression to enhance the thermal hyperalgesia in the STZ-induced animals.

## Keywords:

Neuropathic pain, Streptozotocin, Subepidermal nerve fibers, Growth associated protein-43, Neurofilament-200, Substance P, Phosphorylated extracellular signal-regulated kinase.

## 前言

原發性糖尿病(第一型糖尿病: Insulin-dependent Diabetes Mellitus (IDDM))是慢性的代謝內分泌疾病。實驗動物模式是使用單次腹腔注射化學物鏈脲佐菌素(Streptozocin, STZ, Sigma, St. Louis, MO), 破壞胰臟的內分泌腺體細胞( $\beta$ 細胞), 造成胰臟的胰島素分泌不足以造成血糖升高。鏈脲佐菌素誘發糖尿病後會伴隨著疼痛行為(Neuropathic pain), 包括熱覺過敏反應(Thermal hyperalgesia)與機械性刺激敏感反應(Mechanical allodynia)。疼痛行為的產生被認為是高血糖引發周邊神經病變所導致; 因此, 皮膚真皮層內表皮下神經纖維(Subepidermal nerve fibers (SENFs))的變化值得用於探討疼痛行為產生的重要性。而胞外訊息調節激酶(Extracellular signal-regulated kinases (ERK))在中樞神經系統內參與的訊息路徑已廣泛探討與疼痛行為的關係。本實驗期望釐清皮膚真皮層內表皮下神經纖維是否藉由胞外訊息調節激酶的訊息路徑來調控鏈脲佐菌素誘發的糖尿病疼痛行為, 以作為往後在周邊神經系統內治療糖尿病疼痛行為的重要策略。

## 研究目的

1. 探討化學物鏈脲佐菌素(Streptozocin (STZ))誘發糖尿病動物模式建立之可能性。說明糖尿病動物組(STZ)與正常動物組(Citrate)在誘發後, 實驗動物的體重和飯後血糖數值在時間軸上變化。
2. 探討糖尿病周邊神經病變引發的疼痛行為在時間軸上的長期性變化。說明糖尿病動物組對熱覺過敏反應檢測與機械性刺激敏感反應檢測的變化。
3. 探討誘發糖尿病周邊神經病變後, 糖尿病動物組在時間軸上皮膚內真皮層中神經纖維分布的變化。說明真皮層內表皮下神經纖維(SENFs)表現生長相關蛋白-43 (Growth-associated protein 43 (GAP-43)), 神經絲蛋白-200(Neurofilament 200 (NF-200))和物質 P(Substance P (SP))的分佈。釐清有髓鞘 A 和無髓鞘 C 纖維在糖尿病周邊神經病變後的變化。
4. 探討誘發糖尿病周邊神經病變後, 糖尿病動物組在時間軸上皮膚真皮層內表皮下神經纖維表達磷酸化的胞外信號調節激酶(Phosphorylated ERK (pERK))的變化。並進一步說明在周邊足下注射(Intraplantar injection)胞外訊息調節激酶抑制劑(UO126)對於疼痛行為的影響。

## 文獻探討

糖尿病(Diabetes Mellitus (DM))是一常見的慢性代謝內分泌疾病, 分為原發性糖尿病(第一型糖尿病: Insulin-dependent DM (IDDM))以及繼發性糖尿病(第二型糖尿病: Noninsulin-dependent DM (NIDDM))兩類。基本病理生理為相對或絕對胰島素分泌不足和胰升糖素活性增高所引起的代謝紊亂, 嚴重時常導致酸鹼平衡失常; 特徵為高血糖及胰島素釋放試驗異常(Morley et al., 1984)。糖尿病慢性併發症的發生, 主要原因是經年累月血糖控制不穩定的狀況下, 使體內的心血管系統、神



經系統、腎絲球組織遭到破壞而出現。併發症包含了：1. 眼睛病變：常見的病變有白內障、視網膜病變和青光眼，嚴重時甚至視力喪失。2. 血管病變：腦、心臟及足部等部位的動脈硬化可造成腦中風、心肌梗塞及足部病變；足部的血液供應減少，造成間歇跛行、感覺異常、足部易感染與傷口癒合慢。3. 神經病變：包括自主神經或周邊神經的短期或長期受損。引起腹脹、腹瀉、性功能障礙、手腳發麻及刺痛、神經疼痛、感覺遲鈍。此外，還會導致末梢神經遲鈍及血液循環不良，所以當有腳部傷口感染時，極易變成組織壞死，甚至於有截肢的危險性。4. 腎臟病變：引起腎臟的功能下降，可能會有水腫、蛋白尿、血壓上升等症狀，甚至引起尿毒症(Dyck and Giannini, 1996; Hoybergs et al., 2008)。

神經疼痛是伴隨糖尿病和其他疾病的一種常見病痛，包含：1. 身體有疼痛感覺(夾鉗感、灼燒感、撕裂感)，病因是負責傳導疼痛、溫度和觸覺信號的感覺神經出現損傷；用藥物抑制這種病痛很難見效。2. 遠端皮膚感覺異常及知覺缺乏(麻木感和針刺感)易肌肉無力、萎縮(Calcutt et al., 1996; Kennedy et al., 2005)。然而，對於動物實驗尚未有完整系統性的評估糖尿病多發性神經病變(Diabetic polyneuropathy)，說明罹患糖尿病後動物在神經病變併發症的相關研究。目前實驗研究所採用的鏈脲佐菌素(STZ)是用來誘發原發性糖尿病(第一型糖尿病)，並藉由此動物模式的高血糖狀況來評估神經系統受到傷害而引發神經病變性的疼痛行為。周邊神經遭受高血糖傷害後產生了兩種疼痛敏感度的變化，包括自發性的疼痛反應與刺激引起的疼痛反應(Courteix et al., 1993; Fox et al., 1999; Morrow, 2004; Wuarin-Bierman et al., 1987)。感覺異常症狀的檢測可詳細區分為：機械性刺激敏感反應(非侵入性刺激引起疼痛)(Mechanical allodynia)，機械式刺激過敏反應(被提高敏感度的疼痛性刺激)(Mechanical hyperalgesia)，改變對冷熱覺的敏感度引起冷熱覺過敏反應(被提高冷熱覺敏感度的疼痛性刺激)(Thermal/Cold hyperalgesia)和冷覺敏感反應(非侵入性冷覺刺激引起疼痛)(Cold allodynia)；這些臨床觀察到的神經病變性疼痛症狀，也同樣在鏈脲佐菌素誘發糖尿病而引發疼痛行為的動物模式內可觀察得到這些特徵。依照目前研究說明，大都能一致表示機械式刺激敏感反應的閾值降低現象；然而，對於熱覺過敏反應的結論卻是議論紛紛，包括熱覺過敏反應的閾值降低、不變或是提高(Khan et al., 2002; Pabbidi et al., 2008; Tominaga and Caterina et al., 2004)。

糖尿病神經病變通常是指發生於周邊神經系統的病變。糖尿病神經病變的病理變化包括急性神經纖維異常，接著是慢性神經纖維損傷、萎縮及神經消失。神經纖維的消失是漸進性的，最主要的病理變化是神經軸突消失合併次發性的髓鞘脫失(Said, 1996; Kennedy et al., 2000; Piriz et al., 2009; Yagihashi et al., 1997)。神經病變是因神經軸突退化所致，由遠端向近端進行，因此神經的末端受傷最嚴重。神經傷害可以因為微小血管功能異常以及不成功的神經再生而加重，且與高血糖對周邊神經組織、支持之結締組織及血管的作用有關(Pittenger et al., 2004; Properzi et al., 1993; Wang et al., 2004)。可是對於糖尿病因高血糖造成神經產生病變而引發的疼痛反應機制，目前仍然尚未完全釐清。背根神經節(Dorsal root ganglia (DRG))內感覺神經元的初級傳入(Primary afferents)對應於細胞骨架組成和功能被分類為不同的纖維。包括有

髓鞘的 A $\beta$  纖維傳送機械刺激的輕觸覺，而有髓鞘的 A $\delta$  纖維被認為是機械性的疼痛接收器和無髓鞘 C 纖維主要是疼痛感受器(Lauria et al., 2005; Chen and Levine, 2001; Hitoshi et al., 2003; Toth et al., 2004)。皮膚內神經纖維支配(Skin innervation)是依照已建立的方法來評估皮膚表皮層中感覺神經纖維末梢的變化(Hsieh et al., 2000; Hirai et al., 2000; Toth et al., 2006)。受傷神經所支配的皮膚領域會造成部分神經去支配的現象，是建立在神經病變引發疼痛行為的動物模式所具備的必要條件(Lin et al., 2001; Lindenlaub and Sommer, 2002; Ma and Bisby, 2000)。然而在人類疼痛性的神經病變，許多研究最近開始著重這些初級傳入在皮膚真皮層內的變化，並描述為表皮下神經纖維(SENFs) (Casanova-Molla et al., 2011; Myers et al., 2013; Provitera et al., 2007)。在哺乳動物的研究中，初級傳入末梢的生長錐在神經發育與再生時會高度表現生長相關蛋白-43 (GAP-43)，其功能為誘導神經元的初級傳入向外延伸。周邊神經在受傷之後，背根神經節內神經元會調控生長相關蛋白-43 增強神經末梢再組織化的能力(Cameron et al., 1997)。向下調節生長相關蛋白-43 的表達被認為可以治療神經性疼痛(Wu et al., 2012; Wu et al., 2013)。神經絲蛋白-200 (NF-200)存在於背根神經節感覺神經元，表現於有髓鞘 A 纖維。周邊神經損傷後，神經絲蛋白-200 在真皮層內的神經纖維具有顯著的再支配現象，表示可能參與神經性疼痛的緩解(Duraku et al., 2013; Kishi et al., 2002; Terada et al., 1998)。神經生長因子(Nerve growth factor)可以有效的耗盡糖尿病誘導後感覺神經元內的胜肽(降鈣激素基因相關胜肽(Calcitonin gene-related peptide (CGRP)和物質 P(SP))的表現，以預防和改善糖尿病神經病變(Johnson et al., 2008; Christianson et al., 2007; Sango et al., 2013; Karanth et al., 1990)。物質 P 主要表現於無髓鞘 C 纖維，在解除壓迫後的神經纖維內增加表現也可有效地改善神經性疼痛(Tseng et al., 2007)。然而，目前皮膚內周邊神經在鏈脲佐菌素誘發原發性糖尿病後的變化仍然不明。

G-蛋白連結的接受器(G-protein-coupled receptors)的活化可以經由蛋白質激酶 A(Protein kinase A (PKA))和蛋白質激酶C-epsilon (Protein kinase C (PKC $\epsilon$ ))訊息傳遞路徑，而此路徑被認為與調節胞外訊息調節激酶(ERK)的磷酸化表現有關(Aley and Levine, 2001; Srinivasan et al., 2008; Sugimoto et al., 2008)。胞外訊息調節激酶(ERK)可與許多的轉錄因子、磷酸激酶、去磷酸酶以及細胞凋亡蛋白作用。細胞當胞外訊息調節激酶(ERK)訊息傳遞路徑持續活化時會導致細胞增生與存活。在物理性受損和炎性疼痛動物模型中，在背角中的神經元上調表達磷酸化的胞外信號調節激酶(Phosphorylated ERK (pERK))(Tseng et al., 2007; Tsuda et al., 2008)。並且在傷害性刺激或損傷後，背角中的神經元表達磷酸化的胞外信號調節激酶(ERK)可誘導幾種下游基因的表達，例如，強啡肽原(Prodynorphin)，物質P受體(NK-1 substance P receptor)和大麻素受體1(Cannabinoid receptor 1)，可能是神經性疼痛產生的主要因素(Ciruella et al., 2003; Ji et al., 2002)。然而，在皮膚內周邊神經支配的變化至今仍未詳細說明，尤其是在鏈脲佐菌素誘發原發性糖尿病後。近期研究說明胞外訊息調節激酶抑制劑(UO126)可藉由脊髓內給藥，完全抑制在物理性受損和炎性疼痛動物模型中所產生的神經性疼痛(Popiolek-Barczyk et al., 2014; Fang et al., 2014)。因此，在鏈脲佐菌素誘發

原發性糖尿病後的周邊皮膚內給予胞外訊息調節激酶抑制劑(UO126)去探討與神經病變性疼痛症狀的關係是一個重要的研究目標。

## 研究方法

### 1. 實驗動物

本實驗以雄性 Sprague-Dawley(SD)品系成鼠為試驗動物(樣本數=40 隻)，週齡為 8 週且體重約為 250 公克。實驗成鼠被飼養於具有柔軟木墊的塑膠箱內，目的在於避免對實驗成鼠後腳足墊皮膚產生持續性的刺激而引起疼痛反應影響實驗結果。這些實驗成鼠被置放於溫度與濕度控制的房間，並以 12 小時燈照/黑暗的循環來飼養；食物與水分依照實驗室條件給予。所有飼養步驟與人道關懷按照國際疼痛研究協會的手則(International Association for the Study of Pain (IASP))，實施在實驗研究的成鼠身上(IASP Committee, 1980; Zimmermann, 1983)。

### 2. 實驗步驟

#### A. 化學物誘發糖尿病動物

常用的化學物為鏈脲佐菌素(Streptozocin, STZ, Sigma, St. Louis, MO)，可破壞胰臟的內分泌腺體細胞( $\beta$ 細胞)，造成胰臟的胰島素分泌不足。鏈脲佐菌素(STZ)可溶於含有檸檬酸鈉(Citrate: 10 mM, pH 4.0)的 0.9%生理食鹽水(0.9% NaCl)。本實驗的雄性 SD 品系成鼠，於注射前應先隔夜空腹且不進食(18~24 小時)；再以單次腹腔注射方式(60mg/kg)給予鏈脲佐菌素，稱之為糖尿病動物組；對照實驗動物則給予檸檬酸鈉，稱之為正常動物組。

#### B. 體重測量

體重測量是將實驗 SD 品系成鼠，先隔夜空腹不進食，再直接將動物置於電子磅秤秤重並讀取數值記錄。

#### C. 血糖數值測定

血糖數值測定是將實驗 SD 品系成鼠，先隔夜空腹不進食。之後再自由地讓動物進食半小時方式進行，然後在結束進食後的 120 分鐘時，以尾巴採血方式採血於試紙上，再將試紙置入血糖機測定血糖數值，讀取數值若達到或超過 300mg/dL 時，則視為動物引發糖尿病。

### 3. 動物疼痛行為測試

#### A. 熱覺過敏反應測試(Thermal hyperalgesia: Plantar test)

檢測動物熱覺反應是採用 Hargreaves-type analgesiometer (Ugo Basile, Comerio-Varese, Italy)，此為測量給予的輻射熱刺激對於後腳掌縮回的反應時間，稱之為熱覺反應時間閾值。老鼠被分別置放於玻璃板(3公釐厚)上的三合一分隔區內(Plexiglas containers (22x17x14 cm))，並且給予30分鐘使老鼠習慣後才開始測試。輻射熱源直接置於後腳掌的第一對足墊，後腳掌縮回的反應時間則會自動從輻射熱源刺激開始計數到後腳掌縮回停止，最長時間設定在20秒以避免輻射熱刺激可能對於組織的傷害，每隻動物分別針對左右側以間隔五分鐘的時間共記錄五組數據平均計算分析，所有紀錄數值紀錄到小數點後一位。

#### B. 機械式刺激敏感反應測試(Mechanical allodynia : vonFrey filaments test)

實驗成鼠被分別置放於鐵網(3公釐間格)上的三合一分隔區內(Plexiglas containers(22×17×14公分))，並且給予10分鐘使老鼠習慣後才開始測試。控制室內濕度維持在40-60%且在正常室溫(20-25°C)，依次以校正過的不同號數毛狀纖維(vonFrey filaments)(Somedic, Sweden)直接刺激後腳腳掌的第一對足墊，依照上-下方式測試(Up-and-down method)，測試者必須將毛狀纖維接觸到後腳腳掌足墊並使毛狀纖維彎曲45度，給予相隔五秒連續五次刺激並在此時觀察動物反應，若有舔腳、移動或是跳躍動作則記錄反應號數，將所記錄之號數轉換成克數來計算比較所能承受的力道，稱之為刺激敏感反應閾值(Mechanical thresholds : 克)。若此號數無反應則改用較大號數的毛狀纖維測試。

#### 4. 組織固定及切片流程

於腹腔注射鏈脲佐菌素(STZ)後，對於不同存活時期之實驗成鼠，經氣體麻醉機給予CO<sub>2</sub>安樂死後進行灌流犧牲，切開實驗動物胸腔，經左心室導入含有1%亞硝酸鈉、1%檸檬酸鈉之生理食鹽水及含有4%三聚甲醛之0.1 M 磷酸鹽緩衝液灌流。

足墊皮膚另外以固定液固定6小時後置換到緩衝液內。足墊皮膚置於濃度30%之蔗糖磷酸鹽緩衝液中，於4°C環境下保存隔夜處理至組織沉落，使用冷凍切片機(Cryostat, Leica CM3050S)以垂直表皮的方式切取30μm厚度的切片，並依照切片次序置放入片盤的抗凍劑內且保存於-20°C。為了取樣能涵蓋整個足墊皮膚，共選擇4片足墊皮膚切片進行免疫組織化學染色法。

#### 5. 足墊皮膚免疫組織化學染色法

首先將足墊皮膚切片以0.5% Triton X-100的0.05M Tris 緩衝液(Tris base buffer, TBS, pH 7.6)充分潤洗，再將足墊皮膚切片置於含10%甲醛(Methano)及1%過氧化氫(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)之0.05M TBS脫水30分鐘，以去除內生性過氧化氫。並以5%兔血清(Normal goat serum)於含有0.5%脫脂奶粉-Tris 緩衝液去除過多的抗體鍵結位，再分別加入一級抗體：

- A. 生長相關蛋白-43(GAP-43, rabbit, 1:1000, Chemicon, Temecula, CA)；
- B. 神經絲蛋白-200(NF-200, mouse, 1:1000, Sigma, St. Louis, MO)；
- C. 物質 P(SP, guinea pig, 1:1000, Peninsula Laboratories, San Carlos, Calif., USA)；
- D. 磷酸化的胞外訊息調節激酶(pERK, rabbit, 1:1000, Cell Signaling Technologies, Beverley, MA)。

於4°C作用20小時。分別以相對應的二級抗體作用1小時，再以卵白素-維生素H複合物(Avidin - biotin complex, Vector, Burlingame, CA)作用1小時讓染色訊息擴大，最後以DAB(3,3'-diaminobenzidine tetra-hydrochloride, Sigma, St. Louis, MO)進行呈色反應並觀察結果。DAB呈色液配置法為：每20毫升Tris 緩衝液中，含DAB 5毫克，過氧化氫12 μl。呈色後，將足墊皮膚切片貼於經動物膠黏附處理之載玻片上，經空氣陰乾後，透過濃度漸增(70%~100%)之酒精脫水，再經二甲苯(Xylene)透明化後，用封片膠封片。

## 6. 定量皮膚真皮層內的神經支配

皮膚內真皮層內神經支配的定量方式是採用選取免疫組織染色的足墊皮膚切片，免疫染色作用的真皮層內的神經纖維是用 100× with an Olympus BX40 microscope (Olympus, Tokyo, Japan)觀察並以數位相機(Optronics, Goleta, CA)照相後定量(Casanova-Molla et al., 2011)。每隻動物在每側的染色足墊皮膚切片都選取 3 個擷取影像，因此，6 個染色足墊皮膚切片共有 18 個擷取影像提供定量使用。真皮層內表現免疫組織染色的神經纖維束或是個別的神經纖維是以定義視覺密度的閾值(Thresholds of optical density)，並使用 Adobe Photoshop Elements 2.0(San Jose, CA)來計算觀察到的具有免疫組織染色的神經纖維分布，再以擷取影像的總面積計算真皮層內表皮下的神經纖維的面積，則可因此被表示為真皮層區域內所含有的神經纖維支配面積。

## 7. 藥物的干擾性實驗

在本實驗中干擾藥物的給予是採用足底部皮下注射(Intraplantar injection)的方法，將干擾藥物送入到足底皮膚內真皮層，此實驗給藥的方法是依據已建立步驟執行(Ralevic and Burnstock, 1998)，目的在於避免給藥可能造成的發炎反應，進而影響實驗結果的判讀。簡言之，將實驗成鼠經氣體麻醉機給予 1.5-3%異氟醚(Isoflurane, Sigma, St. Louis, MO)麻醉後，將之腹部朝上固定於軟木栓質之手術板上，於解剖顯微鏡(Olympus)操作下進行足底部皮下注射之給藥處理。首先將右側足底部用沾有 70%酒精之棉花球輕拭，以 26-gauge 針頭連結到 10- $\mu$ l Hamilton 的注射器(Model: 701, Hamilton Company, Reno, NV)平行足底的方向將針頭送入皮膚下真皮層，送入位置在大拇指和第一趾間的位置。以光照保持因麻醉而降低的動物體溫，待動物清醒後以 2-3 隻飼養於鋪有軟木墊的塑膠箱內，避免後腳足墊持續受到刺激而引起疼痛反應並給予充分的飲食與水分。

本實驗中使用的干擾藥物為胞外訊息調節激酶抑制劑(UO126)(Tocris Bioscience (Avonmouth, UK))可溶於 0.9%生理食鹽水(0.9% NaCl)加 10% Dimethyl sulfoxide(10% DMSO, Sigma, St. Louis, MO)。10- $\mu$ l Hamilton 的注射器可將 10 $\mu$ l 的胞外訊息調節激酶抑制劑(UO126)在 30 秒內緩慢地送入到皮膚下真皮層。在該評估中，我們首先建立鏈脈佐菌素誘發糖尿病動物在第 2 週的疼痛行為測試(熱覺過敏反應測試和機械式刺激敏感反應測試)和定義為注射後時間 0 (Post-injection hour 0: PIH0)。根據胞外訊息調節激酶抑制劑(UO126)的濃度，我們隨機分成 50 $\mu$ M、20 $\mu$ M、1 $\mu$ M 和對照組(Vehicle: 0 $\mu$ M)(每組的樣本數=4 隻)。足底內注射後，每隻大鼠間隔 1 小時測定為 1-6 小時(PIH1 至 PIH6)並記錄 24 小時後(PIH24)的疼痛行為。

## 8. 實驗設計與統計分析

所有行為測試再進行腹腔注射前先測試，並且定義為行為測試的基準值(Post-treatment period: weeks)。糖尿病動物組及對照的正常動物組，接著依次在第 2 週、第 4 週、第 6 週以及第 8 週給予所有行為測試；受測者對於分群動物則採取未知處理方式進行，並且在分析資料後才將兩群動物資料區分。糖尿病動物組

(樣本數=6 隻) 及對照的正常動物組(Citrate, 樣本數=4 隻), 並且個別在第 2 週、第 4 週、第 6 週以及第 8 週採取灌流。疼痛行為數據和組織形態定量的資料統計以 SPSS for Windows (SPSS) 以及 GraphPad Prism (GraphPad, San Diego, CA) 計算並以 mean±S.D.表示; 實驗過程中所有疼痛行為測試以及組織形態定量的統計分析數值採用 repeated-measures ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test,  $p < 0.05$  表示具有顯著差異。

## 結果與討論 (含結論與建議)

本實驗研究計畫我們選擇慢性代謝內分泌疾病的糖尿病作為實驗主題, 並且以鏈脛佐菌素誘發糖尿病而成為原發性糖尿病。首先要建立誘發糖尿病動物後所產生的生理狀況; 然後, 分析糖尿病周邊神經病變而引發疼痛行為的條件。

### A. 鏈脛佐菌素誘發糖尿病動物後的生理數值判定(圖一 (Fig. 1))

#### 1. 體重測量

誘發糖尿病動物一週後, 實驗動物即會有明顯的飲食不正常現象。觀察發現動物飲食和飲水的頻率增加; 相對而言, 排泄和排遺的次數也增多。因此, 在誘發前先測量實驗動物的體重, 並定義為第 0 週實驗動物的體重(圖一 A (Fig. 1A))。糖尿病動物組和正常動物組兩組動物依照誘發後的時期, 我們在第 2 週、第 4 週、第 6 週和第 8 週分別再測量實驗動物的體重, 根據數據顯示在第 0 週測量體重後都表現相類似的體重數值(Body weight: 克)( $254.92 \pm 41.79$  克 vs.  $274.14 \pm 40.93$  克,  $p > 0.05$ )。但是在誘發後的第 2 週時, 糖尿病動物組相對於正常動物組顯示體重上升停滯現象( $284.09 \pm 46.61$  克 vs.  $362.78 \pm 48.87$  克,  $p < 0.05$ ), 第 4 週時兩組動物仍顯示明顯的差異( $285.76 \pm 51.17$  克 vs.  $403.45 \pm 35.52$  克,  $p < 0.05$ ), 並且這個現象可以持續到誘發後的第 8 週( $314.89 \pm 52.21$  克 vs.  $468.38 \pm 31.56$  克,  $p < 0.05$ )。

#### 2. 血糖數值測定

血糖數值測定是將實驗動物先隔夜空腹不進食(18~24 小時)。之後再自由地讓動物進食半小時方式進行, 然後在結束進食後的 120 分鐘時, 以尾巴採血方式採血於試紙上, 再將試紙置入血糖機測定血糖數值, 讀取數值(Blood glucose: mg/dL)並記錄。在誘發前開始測量實驗動物的血糖數值, 定義為第 0 週實驗動物的血糖數值(圖一 B (Fig. 1B))。並且依照誘發後的時期, 我們在第 2 週、第 4 週、第 6 週和第 8 週分別再測量實驗動物的血糖數值。根據數據顯示糖尿病動物組和正常動物組兩組動物在第 0 週測量血糖數值後都表現相類似的血糖數值( $101.75 \pm 0.07$  mg/dL vs.  $102.88 \pm 10.70$  mg/dL,  $p > 0.05$ )。但是在誘發後的第 2 週時, 糖尿病動物組相對於正常動物組顯示顯著的血糖數值上升現象( $448.67 \pm 56.91$  mg/dL vs.  $103.50 \pm 12.37$  mg/dL,  $p < 0.05$ ), 第 4 週時糖尿病動物組仍顯示維持明顯的高血糖數值( $537.83 \pm 73.87$  mg/dL vs.  $104.50 \pm 11.21$  mg/dL,  $p < 0.05$ ), 並且這個現象可以持續到誘發後的第 8 週( $552.33 \pm 63.42$  mg/dL vs.  $100.75 \pm 6.65$  mg/dL,  $p < 0.05$ )。

在我們實驗研究結果中, 鏈脛佐菌素誘發糖尿病動物後隨著時間變化, 說明體重上

升停滯現象和高血糖維持的狀況。

## B. 鏈脲佐菌素誘發糖尿病動物後疼痛行為測定(圖二 (Fig. 2))

### 1. 熱覺過敏反應

在誘發前開始測量實驗動物的熱覺過敏反應數值，即定義為第0週實驗動物的熱覺過敏反應數值(圖二 A (Fig. 2A))。糖尿病動物組和正常動物組兩組動物依照誘發後的時期，我們在第2週、第4週、第6週和第8週分別再測量實驗動物的熱覺過敏反應數值。根據數據顯示糖尿病動物組和正常動物組兩組動物在第0週對於有害的熱覺刺激反應都表現相類似的熱覺反應時間閾值(Withdrawal latencies：秒)( $13.46 \pm 0.76$  秒 vs.  $13.81 \pm 1.05$  秒,  $p > 0.05$ )。然而，糖尿病動物組的動物在誘發後第2週經測試的數據顯示，具有典型的熱覺過敏現象產生( $8.54 \pm 0.60$  秒 vs.  $14.03 \pm 0.72$  秒,  $p < 0.05$ )。此類糖尿病周邊神經病變引發疼痛的行為反應在誘發後第4週仍然顯示同樣的熱覺過敏現象( $8.40 \pm 0.63$  秒 vs.  $13.75 \pm 0.98$  秒,  $p < 0.05$ )並且延續到第8週( $8.72 \pm 0.63$  秒 vs.  $13.62 \pm 0.54$  秒,  $p < 0.05$ )。

### 2. 機械性刺激敏感反應

在誘發前開始測量實驗動物的機械式刺激敏感反應數值，定義為第0週實驗動物的機械式刺激敏感反應數值(圖二 B (Fig. 2B))。並且依照誘發後的時期，我們在第2週、第4週、第6週和第8週分別再測量實驗動物的機械式刺激敏感反應數值。根據數據顯示糖尿病動物組和正常動物組兩組動物在第0週對於無害的機械式刺激反應都表現相類似的刺激敏感反應閾值(Mechanical thresholds：克)( $20.92 \pm 3.73$  克 vs.  $21.11 \pm 3.67$  克,  $p > 0.05$ )。然而，糖尿病動物組的動物在誘發後第2週經測試的數據顯示，產生典型神經病變引發的機械式刺激敏感反應產生( $2.95 \pm 2.03$  克 vs.  $21.36 \pm 4.83$  克,  $p < 0.05$ )。此類糖尿病周邊神經病變引發疼痛的行為反應在誘發後第4週仍然顯示同樣的刺激敏感反應現象( $2.25 \pm 0.83$  克 vs.  $19.98 \pm 3.51$  克,  $p < 0.05$ ) 並且延續到第8週( $2.01 \pm 0.93$  克 vs.  $21.64 \pm 2.50$  克,  $p < 0.05$ )。

在我們實驗研究結果中，鏈脲佐菌素誘發糖尿病動物後隨著時間變化，證明動物對於疼痛行為反應產生熱覺過敏和機械性刺激敏感反應現象。

## C. 鏈脲佐菌素誘發糖尿病動物後在皮膚真皮層內表皮下神經纖維的變化

### 1. 表皮下神經纖維內生長相關蛋白-43(GAP-43)表現

藉由免疫組織染色說明糖尿病周邊神經病變後生長相關蛋白-43(GAP-43)在時間軸上的變化(圖三 (Fig. 3))。周邊無髓鞘C和有髓鞘A纖維在皮膚真皮層內明顯地被表達，具有神經纖維束且呈現網狀分布，經由定量統計糖尿病動物組的動物在誘發後第2週表現生長相關蛋白-43(GAP-43)的表皮下神經纖維有些許地增加但並無顯著差異( $4255.09 \pm 338.49 \mu\text{m}^2$  vs.  $3772.43 \pm 213.21 \mu\text{m}^2$ ,  $p > 0.05$ ) (圖七A (Fig. 7A))。第4週仍然顯示類似的表現( $4021.10 \pm 416.12 \mu\text{m}^2$  vs.  $3847.69 \pm 246.78 \mu\text{m}^2$ ,  $p > 0.05$ )並且延續到第8週( $3901.64 \pm 243.55 \mu\text{m}^2$  vs.  $3798.84 \pm 206.49 \mu\text{m}^2$ ,  $p > 0.05$ )。

### 2. 表皮下神經纖維內神經絲蛋白-200(NF-200)表現

藉由免疫組織染色說明糖尿病周邊神經病變後神經絲蛋白-200(NF-200)在時間軸上的變化(圖四 (Fig. 4))。周邊有髓鞘A纖維在皮膚真皮層內明顯地被表達，具有粗壯的神經纖維且呈現束狀分布，經由定量統計糖尿病動物組的動物在誘發後第2週表現神經絲蛋白-200(NF-200)的表皮下神經纖維完全無顯著差異( $1743.22 \pm 156.33 \mu\text{m}^2$  vs.  $1668.31 \pm 185.13 \mu\text{m}^2$ ,  $p > 0.05$ ) (圖七B (Fig. 7B))。第4週仍然顯示類似的表現( $1846.31 \pm 177.40 \mu\text{m}^2$  vs.  $1702.35 \pm 148.37 \mu\text{m}^2$ ,  $p > 0.05$ )並且延續到第8週( $1689.23 \pm 174.85 \mu\text{m}^2$  vs.  $1765.32 \pm 159.34 \mu\text{m}^2$ ,  $p > 0.05$ )。

### 3. 表皮下神經纖維內物質P(SP)表現

藉由免疫組織染色說明糖尿病周邊神經病變後物質P(SP)在時間軸上的變化(圖五 (Fig. 5))。周邊無髓鞘C纖維在皮膚真皮層內明顯地被表達，呈現連續點狀的散亂分布，經由定量統計糖尿病動物組的動物在誘發後第2週表現物質P(SP)的表皮下神經纖維開始顯著地增加( $319.79 \pm 22.65 \mu\text{m}^2$  vs.  $161.67 \pm 11.33 \mu\text{m}^2$ ,  $p < 0.05$ ) (圖七C (Fig. 7C))。第4週顯示增多的表現( $374.15 \pm 27.12 \mu\text{m}^2$  vs.  $169.83 \pm 16.05 \mu\text{m}^2$ ,  $p < 0.05$ )並且延續到第8週( $424.33 \pm 24.77 \mu\text{m}^2$  vs.  $167.89 \pm 12.95 \mu\text{m}^2$ ,  $p < 0.05$ )。

### 4. 表皮下神經纖維內磷酸化的細胞外訊息調節激酶(pERK)表現

藉由免疫組織染色說明糖尿病周邊神經病變後磷酸化的細胞外訊息調節激酶(pERK)在時間軸上的變化(圖六 (Fig. 6))。在皮膚真皮層內明顯地被表達呈現連續線狀的散亂分布，經由定量統計糖尿病動物組的動物在誘發後第2週表現磷酸化的細胞外訊息調節激酶(pERK)的表皮下神經纖維開始顯著地增加( $388.97 \pm 26.67 \mu\text{m}^2$  vs.  $192.79 \pm 13.30 \mu\text{m}^2$ ,  $p < 0.05$ ) (圖七C (Fig. 7C))。第4週顯示更多的表現( $554.15 \pm 36.27 \mu\text{m}^2$  vs.  $198.22 \pm 33.41 \mu\text{m}^2$ ,  $p < 0.05$ )並且延續到第8週( $485.93 \pm 29.59 \mu\text{m}^2$  vs.  $189.48 \pm 19.78 \mu\text{m}^2$ ,  $p < 0.05$ )。

在我們實驗研究結果中，鏈脲佐菌素誘發糖尿病動物後隨著時間變化，證明皮膚真皮層內表皮下神經纖維沒有顯著的退化。取而代之的是增加在皮膚真皮層內無髓鞘C纖維的物質P(SP)表現並且增加磷酸化的細胞外訊息調節激酶(pERK)的表達。

## D. 鏈脲佐菌素誘發糖尿病動物後周邊干擾藥物的作用

為了測試表皮下神經纖維增加的磷酸化細胞外訊息調節激酶(pERK)是否在真皮層內有助於發展的神經性疼痛的假說。我們在鏈脲佐菌素誘發糖尿病動物後第2週，由足底注射胞外訊息調節激酶抑制劑(UO126)並進行疼痛行為評估(圖八 (Fig. 8))。

### 1. 熱覺過敏反應測試

觀察給予糖尿病動物不同濃度的胞外訊息調節激酶抑制劑(UO126)( $50\mu\text{M}$ ;  $20\mu\text{M}$ ;  $1\mu\text{M}$ ; Vehicle)在給藥後時間軸上的作用變化(圖八A (Fig. 8A))。給予 $50\mu\text{M}$ 胞外訊息調節激酶抑制劑(UO126)後迅速地增加了熱覺反應時間閾值，並且從注射後1小時(PIH1)( $12.91 \pm 0.86$ 秒)到6小時(PIH6)( $13.27 \pm 0.28$ 秒)都顯著顯示回到正常熱覺反應時間，注射後24小時(PIH24)( $8.13 \pm 0.52$ 秒)則回復到給藥前的疼痛行為。給予 $20\mu\text{M}$ 胞外訊息調節激酶抑制劑(UO126)後只有增加部分熱覺反應時間閾值，從注射後1小時(PIH1)( $10.46 \pm 1.37$ 秒)到6小時(PIH6)( $9.97 \pm 1.00$ 秒)都維持類似的熱覺反應時間，



注射後24小時(PIH24)( $8.56 \pm 0.50$ 秒)也回復到給藥前的疼痛行為。給予 $1\mu\text{M}$ 胞外訊息調節激酶抑制劑(UO126)後與對照組比較在注射後1小時(PIH1)( $8.24 \pm 0.21$ 秒 vs.  $8.53 \pm 0.24$ 秒)到6小時(PIH6)( $8.25 \pm 0.14$ 秒vs.  $8.42 \pm 0.37$ 秒)對於熱覺反應時間閾值並無顯著作用。

## 2. 機械式刺激敏感反應測試

觀察給予糖尿病動物不同濃度的胞外訊息調節激酶抑制劑(UO126)( $50\mu\text{M}$ ； $20\mu\text{M}$ ； $1\mu\text{M}$ ；Vehicle)在給藥後時間軸上的作用變化(圖八B (Fig. 8B))。不論給予任何濃度的胞外訊息調節激酶抑制劑(UO126)後都無法改變機械式刺激敏感反應數值，例如注射後1小時( $2.92 \pm 0.95$ 克vs.  $2.44 \pm 1.03$ 克vs.  $2.14 \pm 0.81$ 克vs.  $2.92 \pm 0.95$ 克)。

## 結論與建議

糖尿病(Diabetes Mellitus：DM)是一常見的慢性代謝內分泌疾病，基本病理生理為相對或絕對胰島素分泌不足和胰升糖素活性增高所引起的代謝紊亂。糖尿病慢性併發症的發生，主要原因是經年累月血糖控制不穩定的狀況下，使體內的心血管系統、神經系統、腎絲球組織遭到破壞而出現。併發症包含了：1.眼睛病變；2.血管病變；3.神經病變；4. 腎臟病變。

糖尿病神經病變的病理變化包括急性神經纖維異常，接著是慢性神經纖維損傷、萎縮及神經消失。神經纖維的消失是漸進性的，最主要的病理變化是神經軸突消失合併次發性的髓鞘脫失。神經病變是因神經軸突退化所致，由遠端向近端進行，因此神經的末端受傷最嚴重。神經傷害可以因為微小血管功能異常以及不成功的神經再生而加重，且與高血糖對周邊神經組織、支持之結締組織及血管的作用有關。神經疼痛是伴隨糖尿病和其他疾病的一種常見病痛，包含：1.身體有疼痛感覺(夾鉗感、灼燒感、撕裂感)，病因是負責傳導疼痛、溫度和觸覺信號的感覺神經出現損傷；用藥物抑制這種病痛很難見效。2.遠端皮膚感覺異常及知覺缺乏(麻木感，針刺感)易肌肉無力、萎縮。自發性的疼痛反應，疼痛覺過度敏感反應(有害的刺激)以及機械性造成的疼痛覺敏感反應(無害的刺激)現象，都屬於周邊神經損傷產生病變而引起的疼痛反應症狀，並且會明顯地改變生活的情緒與降低生活的品質。

動物實驗尚未有完整系統性的評估糖尿病周邊神經病變(Diabetic peripheral neuropathy)，說明罹患糖尿病病後動物在神經病變併發症的相關研究。本實驗研究鏈脲菌素(Streptozocin (STZ))誘發糖尿病動物模式的可能性，結果說明實驗動物的體重和飯後血糖數值在時間軸上變化具有顯著差異。並建立在高血糖狀況下造成神經病變併發症引發之疼痛行為，此動物模式能提供一致性且持續性的疼痛症狀表現，並能模擬在臨床上糖尿病周邊神經病變性引發疼痛反應的許多特徵。這些相關性的探討可以藉由背根神經節的周邊無髓鞘C和有髓鞘A纖維在皮膚真皮層內支配表現，評估真皮層內表皮下神經纖維(SENFs)表現生長相關蛋白-43 (Growth-associated protein 43 (GAP-43))，神經絲蛋白-200(Neurofilament 200 (NF-200))的分佈在糖尿病周邊神經病變後並無顯著差異。然而，物質P(Substance P (SP))的分佈說明無髓鞘C纖維在糖尿病周邊神經病變後顯著增多。磷酸化的胞外信號調節激酶(Phosphorylated

ERK (pERK))傳遞疼痛感覺訊息的路徑活化被認為與疼痛行為的變化有關。皮膚真皮層內表皮下神經纖維表達磷酸化的胞外信號調節激酶(pERK)在糖尿病周邊神經病變後顯著增多。並進一步說明在周邊足下注射胞外訊息調節激酶抑制劑(UO126)對於疼痛行為有劑量依賴地影響。

先前實驗研究並未能在誘發糖尿病的動物模式，建立相關的疼痛感覺訊息的路徑。本計畫主要貢獻是應用足底部皮下注射的方法，使得動物的疼痛行為獲得舒緩或消除，進而探討神經系統對於疼痛行為傳遞的概念。因而可以提供在誘發糖尿病的動物模式中，顯著地分析影響疼痛行為在周邊神經系統涵蓋的重要機制。以期未來能對臨床上健康醫學針對藥物治療策略的機制有更深層的理解，進而能藉由藥物控制來摒除糖尿病神經病變帶來的疼痛行為和改善生活的品質。

最後藉由本實驗研究計劃的順利執行，能得到疼痛行為測試的詳實完整資料、皮膚組織免疫染色的實驗結果和抑制性藥物治療策略的機制，提供神經生物學上探討周邊神經損傷後在疼痛行為評估、組織形態學證據以及藥物應用原理等相關研究之參考。

## 參考資料

1. Aley KO, Levine JD. Different peripheral mechanisms mediate enhanced nociception in metabolic/toxic and traumatic painful peripheral neuropathies in the rat. *Neuroscience* 111 2002, 389-397
2. Calcutt N.A. Experimental models of painful diabetic neuropathy. *J Neurol Sci* 220 2004, 137-139
3. Chen X, Levine JD. Hyper-responsivity in a subset of C-fiber nociceptors in a model of painful diabetic neuropathy in the rat. *Neuroscience* 102 2001, 185-192
4. Casanova-Molla J, Morales M, Solà-Valls N, Bosch A, Calvo M, Grau-Junyent JM, Valls-Solé J. Axonal fluorescence quantitation provides a new approach to assess cutaneous innervation. *J Neurosci Methods* 200 2011, 190-198
5. Cameron AA, Cliffer KD, Dougherty PM, Garrison CJ, Willis WD, Carlton SM. Time course of degenerative and regenerative changes in the dorsal horn in a rat model of peripheral neuropathy. *J Comp Neurol* 379 1997, 428-442.
6. Christianson JA, Ryals JM, Johnson MS, Dobrowsky RT, Wright DE. Neurotrophic modulation of myelinated cutaneous innervation and mechanical sensory loss in diabetic mice. *Neuroscience* 145 2007, 303-313.
7. Ciruela A, Dixon AK, Bramwell S, Gonzalez MI, Pinnock RD, Lee K. Identification of MEK1 as a novel target for the treatment of neuropathic pain. *Br J Pharmacol* 138 2003, 751-756.
8. Courteix C, Eschalier A, Lavarenne J. Streptozocin-induced diabetic rats: behavioural evidence for a model of chronic pain. *Pain* 53 1993, 81-88.
9. Duraku LS, Hossaini M, Schüttenhelm BN, Holstege JC, Baas M, Ruigrok TJ, Walbeehm ET. Re-innervation patterns by peptidergic Substance-P, non-peptidergic P2X3, and myelinated NF-200 nerve fibers in epidermis and dermis of rats with neuropathic pain. *Exp Neurol* 241 2013, 13-24.
10. Dyck PJ, Giannini C. Pathologic alterations in the diabetic neuropathies of humans: a review. *J Neuropathol Exp Neurol* 55 1996, 1181-1193.
11. Fang JQ, Fang JF, Liang Y, Du JY. Electroacupuncture mediates extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathways in the spinal cord of rats with inflammatory pain. *BMC Complement Altern Med* 14 2014, 285.
12. Fox A, Eastwood C, Gentry C, Manning D, Urban L. Critical evaluation of the streptozotocin model of painful diabetic neuropathy in the rat. *Pain* 81 1999, 307-316.
13. Hirai A, Yasuda H, Joko M, Maeda T, Kikkawa R. Evaluation of diabetic neuropathy through the quantitation of cutaneous nerves. *J Neurol Sci* 172 2000, 55-62.
14. Hitoshi Y, Masahiko T, Kengo M, Shuro K, Mitsuru S, Masakazu H, Atsunori K,

- Ryuichi K. Diabetic neuropathy and nerve regeneration. *Progress in Neurobiology* 69 2003, 229-285.
15. Hsieh ST, Chiang HY, Lin WM. Pathology of nerve terminal degeneration in the skin. *J Neuropathol Exp Neurol* 59 2000, 297-307.
  16. Hoybergs YM, Biermans RL, Meert TF. The impact of bodyweight and body condition on behavioral testing for painful diabetic neuropathy in the streptozotocin rat model. *Neurosci Lett* 436 2008, 13-18.
  17. IASP Committee. Ethical standards for investigations of experimental pain in animals. The Committee for Research and Ethical Issues of the International Association for the Study of Pain. *Pain* 1980 9, 141-143.
  18. Ji RR, Befort K, Brenner GJ, Woolf CJ. ERK MAP kinase activation in superficial spinal cord neurons induces prodynorphin and NK-1 upregulation and contributes to persistent inflammatory pain hypersensitivity. *J Neurosci* 22 2002, 478-485.
  19. Johnson MS, Ryals JM, Wright DE. Early loss of peptidergic intraepidermal nerve fibers in an STZ-induced mouse model of insensate diabetic neuropathy. *Pain*. 140 2008, 35-47.
  20. Karanth SS, Springall DR, Francavilla S, Mirrlees DJ, Polak JM. Early increase in CGRP- and VIP-immunoreactive nerves in the skin of streptozotocin-induced diabetic rats. *Histochemistry* 94 1990, 659-666.
  21. Kennedy JM, Zochodne DW. The regenerative deficit of peripheral nerves in experimental diabetes: its extent, timing and possible mechanisms. *Brain* 123 2000, 2118-2129.
  22. Kennedy JM, Zochodne DW. Experimental diabetic neuropathy with spontaneous recovery. Is there irreparable damage? *Diabetes* 54 2005, 830-837.
  23. Khan GM, Chen SR, Pan HL. Role of primary afferent nerves in allodynia caused by diabetic neuropathy in rats. *Neuroscience* 114 2002, 291-299.
  24. Kishi M, Tanabe J, Schmelzer JD, Low PA. Morphometry of dorsal root ganglion in chronic experimental diabetic neuropathy. *Diabetes* 51 2002, 819-824.
  25. Lauria G, Lombardi R, Borgna M, Penza P, Bianchi R, Savino C, Canta A, Nicolini G, Marmiroli P, Cavaletti G. Intraepidermal nerve fiber density in rat foot pad: neuropathologic-neurophysiologic correlation. *J Peripher Nerv Syst*. 10 2005, 202-208.
  26. Lin YW, Tseng TJ, Lin WM, Hsieh ST. Cutaneous nerve terminal degeneration in painful mononeuropathy. *Exp Neurol* 170 2001, 290-296.
  27. Lindenlaub T, Sommer C. Epidermal innervation density after partial sciatic nerve lesion and pain-related behavior in the rat. *Acta Neuropathol* 104 2002, 137-143.
  28. Ma W, Bisby MA. Calcitonin gene-related peptide, substance P and protein gene product 9.5 immunoreactive axonal fibers in the rat footpad skin following partial

- sciatic nerve injuries. *J Neurocytol* 29 2000, 249-262.
29. Morley, G.K., Mooradian, A.D., Levine, A.S., Morley, J.E. Mechanism of pain in diabetic peripheral neuropathy. Effect of glucose on pain perception in humans. *Am. J. Med.* 77 1984, 79-82.
  30. Morrow TJ. Animal models of painful diabetic neuropathy: the STZ rat model. *Curr Protoc Neurosci.* 2004 Chapter 9, Unit 9.18.
  31. Myers MI, Peltier AC, Li J. Evaluating dermal myelinated nerve fibers in skin biopsy. *Muscle Nerve* 47 2013, 1-11.
  32. Pabbidi RM, Cao DS, Parihar A, Pauza ME, Premkumar LS. Direct role of streptozotocin in inducing thermal hyperalgesia by enhanced expression of transient receptor potential vanilloid 1 in sensory neurons. *Mol Pharmacol* 73 2008, 995-1004.
  33. Piriz J, Torres-Aleman I, Nuñez A. Independent alterations in the central and peripheral somatosensory pathways in rat diabetic neuropathy. *Neuroscience* 160 2009, 402-411.
  34. Pittenger GL, Ray M, Burcus NI, McNulty P, Basta B, Vinik AI. Intraepidermal nerve fibers are indicators of small-fiber neuropathy in both diabetic and nondiabetic patients. *Diabetes Care* 27 2004, 1974-1979.
  35. Popiolek-Barczyk K, Makuch W, Rojewska E, Pilat D, Mika J. Inhibition of intracellular signaling pathways NF- $\kappa$ B and MEK1/2 attenuates neuropathic pain development and enhances morphine analgesia. *Pharmacol Rep* 66 2014, 845-851.
  36. Properzi G, Francavilla S, Poccia G, Aloisi P, Gu XH, Terenghi G, Polak JM. Early increase precedes a depletion of VIP and PGP-9.5 in the skin of insulin-dependent diabetics--correlation between quantitative immunohistochemistry and clinical assessment of peripheral neuropathy. *J Pathol* 169 1993, 269-277.
  37. Provitera V, Nolano M, Pagano A, Caporaso G, Stancanelli A, Santoro L. Myelinated nerve endings in human skin. *Muscle Nerve* 35 2007, 767-775
  38. Ralevic V, Burnstock G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev* 50 1998, 413-492.
  39. Said G. Diabetic neuropathy: an update. *J Neurol* 243 1996, 431-440.
  40. Sango K, Verdes JM, Hikawa N, Horie H, Tanaka S, Inoue S, Sotelo JR, Takenaka T. Nerve growth factor (NGF) restores depletions of calcitonin gene-related peptide and substance P in sensory neurons from diabetic mice in vitro. *J Neurol Sci.* 126 1994, 1-5.
  41. Srinivasan R, Wolfe D, Goss J, Watkins S, de Groat WC, Sculptoreanu A, Glorioso JC. Protein kinase C epsilon contributes to basal and sensitizing responses of TRPV1 to capsaicin in rat dorsal root ganglion neurons. *Eur J Neurosci* 28 2008, 1241-1254.
  42. Sugimoto K, Rashid IB, Shoji M, Suda T, Yasujima M. Early changes in insulin

- receptor signaling and pain sensation in streptozotocin-induced diabetic neuropathy in rats. *J Pain* 9 2008, 237-245.
43. Terada M, Yasuda H, Kikkawa R. Delayed Wallerian degeneration and increased neurofilament phosphorylation in sciatic nerves of rats with streptozocin-induced diabetes. *J Neurol Sci* 155 1998, 23-30.
  44. Toth C, Brussee V, Cheng C, Zochodne DW. Diabetes mellitus and the sensory neuron. *J Neuropathol Exp Neurol* 63 2004, 561-573.
  45. Toth C, Brussee V, Zochodne DW. Remote neurotrophic support of epidermal nerve fibres in experimental diabetes. *Diabetologia* 49 2006, 1081-1088.
  46. Tominaga M, Caterina MJ. Thermosensation and pain. *J Neurobiol* 61 2004, 3-12.
  47. Tseng TJ, Chen CC, Hsieh YL, Hsieh ST. Effects of decompression on neuropathic pain behaviors and skin reinnervation in chronic constriction injury. *Exp Neurol* 204 2007, 574-582.
  48. Tsuda M, Ueno H, Kataoka A, Tozaki-Saitoh H, Inoue K. Activation of dorsal horn microglia contributes to diabetes-induced tactile allodynia via extracellular signal-regulated protein kinase signaling. *Glia* 56 2008, 378-386.
  49. Wang Y, Schmelzer JD, Schmeichel A, Iida H, Low PA. Ischemia-reperfusion injury of peripheral nerve in experimental diabetic neuropathy. *J Neurol Sci* 227 2004, 101-107.
  50. Wu F, Miao X, Chen J, Liu Z, Tao Y, Yu W, Sun Y. Inhibition of GAP-43 by propentofylline in a rat model of neuropathic pain. *Int J Clin Exp Pathol* 6 2013, 1516-1522.
  51. Wu F, Miao X, Chen J, Sun Y, Liu Z, Tao Y, Yu W. Down-regulation of GAP-43 by inhibition of caspases-3 in a rat model of neuropathic pain. *Int J Clin Exp Pathol* 5 2012, 948-955.
  52. Wuarin-Bierman L, Zahnd GR, Kaufmann F, Burcklen L, Adler J. Hyperalgesia in spontaneous and experimental animal models of diabetic neuropathy. *Diabetologia* 30 1987, 653-658.
  53. Yagihashi S. Nerve structural defects in diabetic neuropathy: do animals exhibit similar changes? *Neurosci Res Commun* 21 1997, 25-32.
  54. Zimmermann, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16 1983, 109-110.

## 附圖

圖一 (Figure 1) 鏈脲佐菌素(Streptozocin (STZ))誘發糖尿病動物後的生理變化。

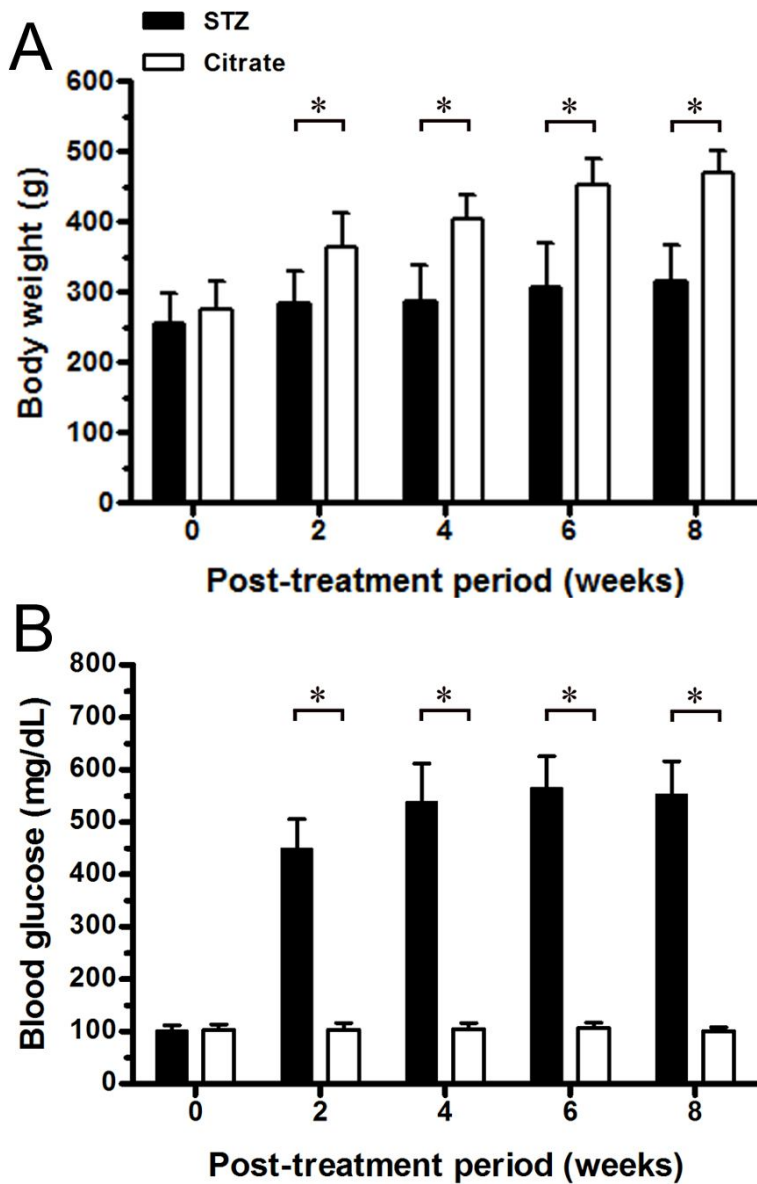
### A. 體重測量變化

圖片顯示糖尿病動物組(STZ)以及正常動物組(Citrate)的動物對於體重測量變化在時間軸上的變化。數據是以電子磅秤儀器秤重後，讀取正確體重數值來表示。

### B. 血糖數值測定

圖片顯示糖尿病動物組(STZ)以及正常動物組(Citrate)的動物對於血糖數值測定變化在時間軸上的變化。數據是以尾巴採血方式，使用血糖機測定讀取測量數值來表示。

\*：表示糖尿病動物組(STZ)與正常動物組(Citrate)的動物在比較上具有差異,  $p < 0.05$ 。



圖二 (Figure 2) 鏈脲佐菌素(Streptozocin (STZ))誘發糖尿病動物後對疼痛行為的影響。

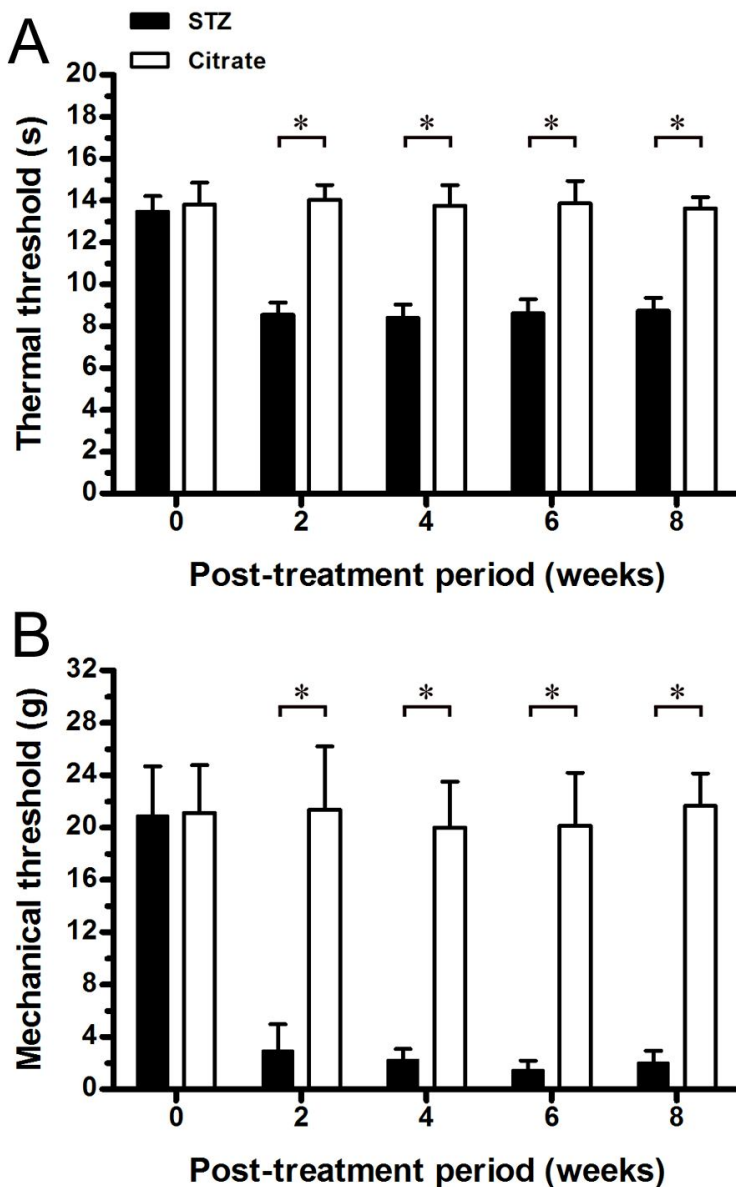
A. 熱覺過敏反應

圖片顯示糖尿病動物組(STZ)以及正常動物組(Citrate)的動物對於熱覺過敏反應現象在時間軸上的變化。數據是以Hargreaves-type analgesiometer給予輻射熱刺激後，後腳掌縮回的反應時間(熱覺反應時間閾值)來表示。

B. 機械式刺激敏感反應

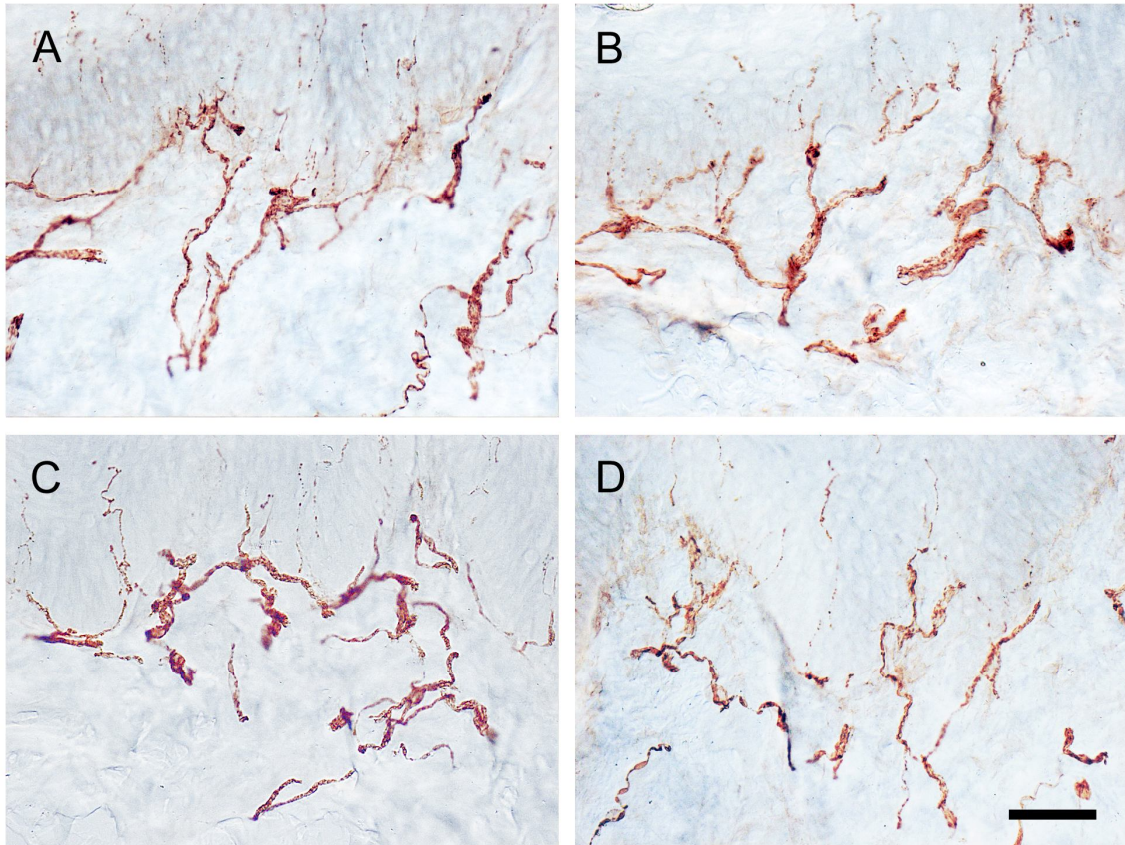
圖片顯示糖尿病動物組(STZ)以及正常動物組(Citrate)的動物對於機械式刺激敏感反應現象在時間軸上的變化。數據是以vonFrey filaments儀器給予毛狀纖維接觸刺激後，後腳掌所能承受的克數(機械式刺激敏感反應閾值)來表示。

\*：表示糖尿病動物組(STZ)與正常動物組(Citrate)的動物在比較上具有差異， $p < 0.05$ 。

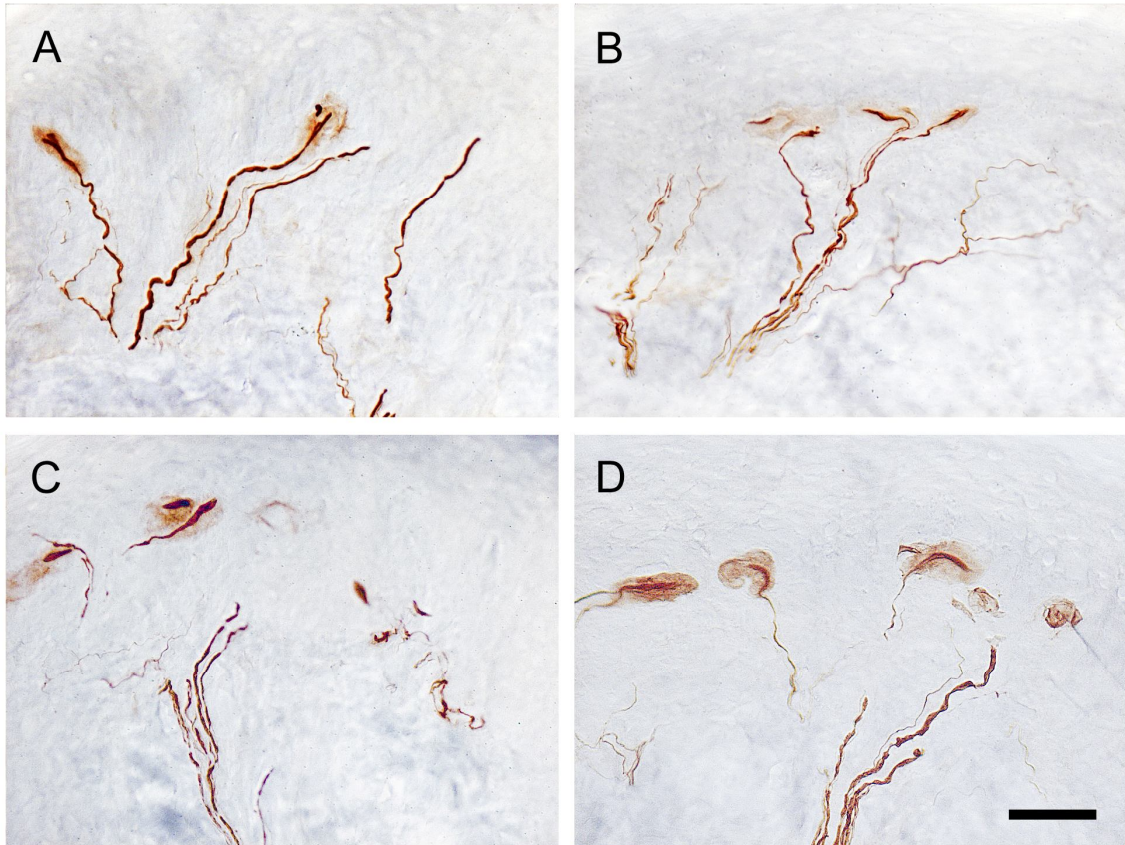




圖三 (Figure 3) 皮膚內表皮下神經纖維的生長相關蛋白-43(GAP-43)表現。  
(A-C) 糖尿病動物組(STZ)的動物在皮膚內表皮下神經纖維的生長相關蛋白-43(GAP-43)在時間軸上的變化(分別為第2週、第4週和第8週)。(D) 正常動物組 (Citrate)的動物在皮膚內表皮下神經纖維的生長相關蛋白-43(GAP-43)。周邊無髓鞘C和有髓鞘A纖維在皮膚真皮層內明顯地被表達，具有神經纖維束且呈現網狀分布。



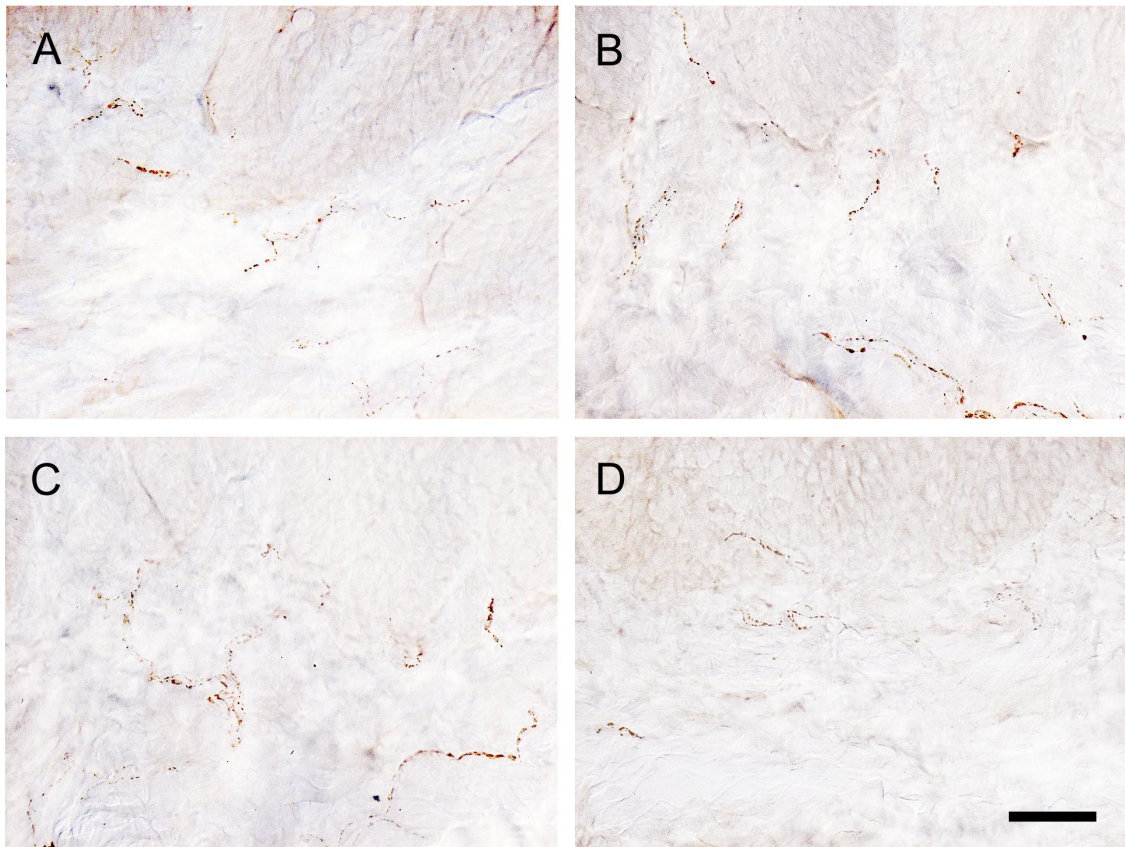
圖四 (Figure 4) 皮膚內表皮下神經纖維的神經絲蛋白-200(NF-200)表現。  
(A-C) 糖尿病動物組(STZ)的動物在皮膚內表皮下神經纖維的神經絲蛋白-200(NF-200)在時間軸上的變化(分別為第2週、第4週和第8週)。(D) 正常動物組(Citrate)的動物在皮膚內表皮下神經纖維的神經絲蛋白-200(NF-200)。周邊有髓鞘A纖維在皮膚真皮層內明顯地被表達，具有粗壯的神經纖維且呈現束狀分布。





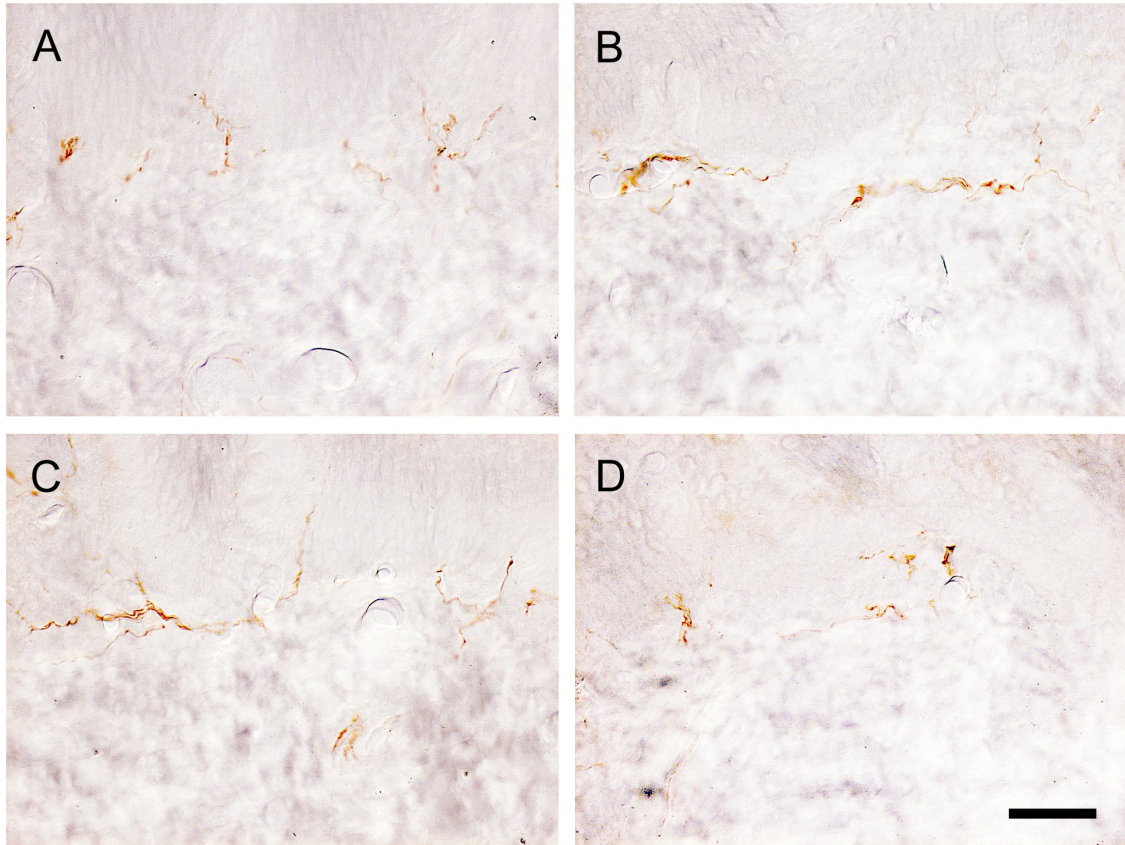
圖五 (Figure 5) 皮膚內表皮下神經纖維的物質P(SP)表現。

(A-C) 糖尿病動物組(STZ)的動物在皮膚內表皮下神經纖維的物質P(SP)在時間軸上的變化(分別為第2週、第4週和第8週)。(D) 正常動物組(Citrate)的動物在皮膚內表皮下神經纖維的物質P(SP)。周邊無髓鞘C纖維在皮膚真皮層內明顯地被表達，呈現連續點狀的散亂分布。



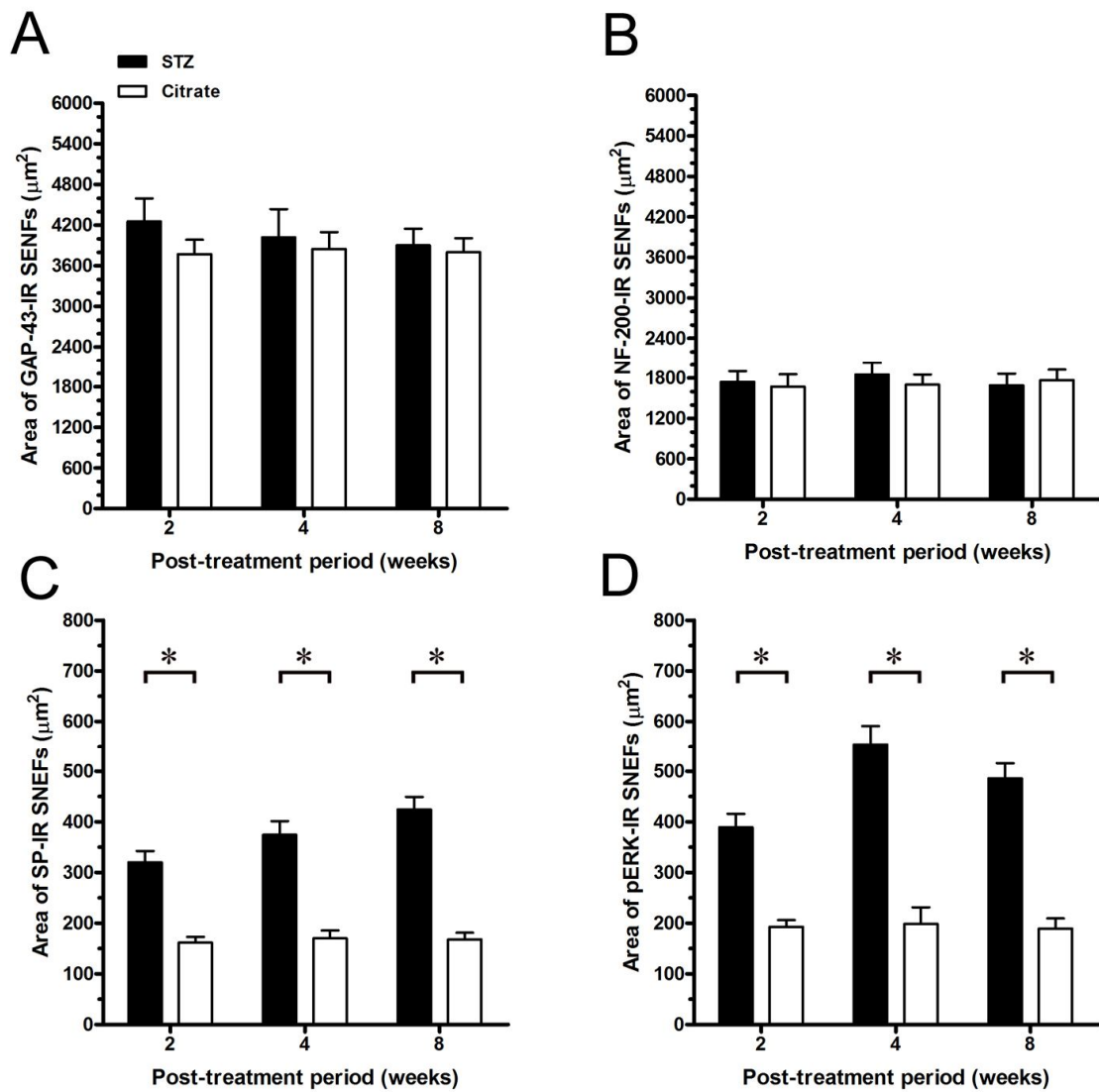
圖六 (Figure 6) 皮膚內表皮下神經纖維的磷酸化的細胞外訊息調節激酶(pERK)表現。

(A-C) 糖尿病動物組(STZ)的動物在皮膚內表皮下神經纖維的磷酸化的細胞外訊息調節激酶(pERK)在時間軸上的變化(分別為第2週、第4週和第8週)。(D) 正常動物組(Citrate)的動物在皮膚內表皮下神經纖維的磷酸化的細胞外訊息調節激酶(pERK)。在皮膚真皮層內明顯地被表達呈現連續線狀的散亂分布。



圖七 (Figure 7) 定量分析皮膚內表皮下神經纖維在時間軸上的表現變化。  
 (A)生長相關蛋白-43(GAP-43)，(B)神經絲蛋白-200(NF-200)，(C)物質P(SP)和(D)磷酸化的細胞外訊息調節激酶(pERK)。

\*：表示糖尿病動物組(STZ)與正常動物組(Citrate)的動物在比較上具有差異,  $p < 0.05$ 。



圖八 (Figure 8) 鏈脲佐菌素誘發糖尿病動物後在周邊干擾藥物的作用。

由足底注射胞外訊息調節激酶抑制劑(UO126)(包括50 $\mu$ M、20 $\mu$ M、1 $\mu$ M和對照組(Vehicle: 0 $\mu$ M))後進行疼痛行為評估。

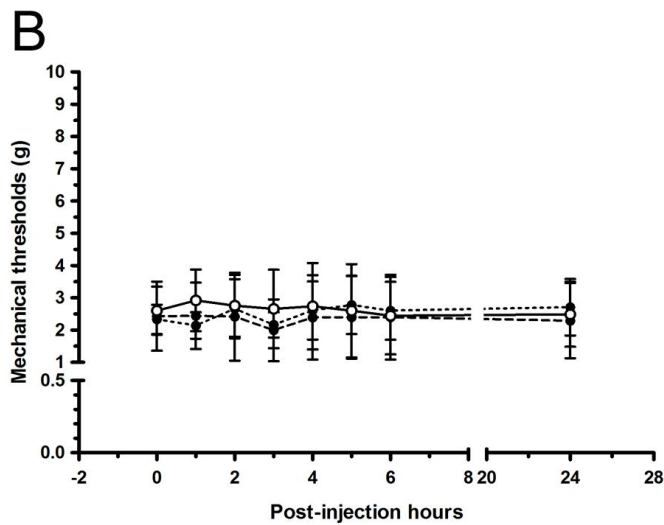
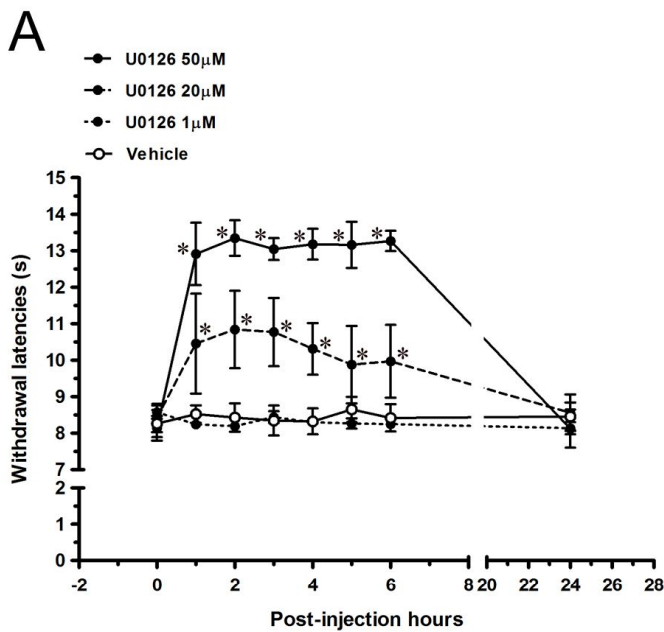
#### A. 熱覺過敏反應

圖片顯示不同濃度的胞外訊息調節激酶抑制劑(UO126)對於糖尿病動物組(STZ)的熱覺過敏反應現象在時間軸上的變化。

#### B. 機械式刺激敏感反應

圖片顯示不同濃度的胞外訊息調節激酶抑制劑(UO126)對於糖尿病動物組(STZ)的機械式刺激敏感反應現象在時間軸上的變化。

\*：表示足底注射不同濃度胞外訊息調節激酶抑制劑(UO126)後對於對照組(Vehicle: 0 $\mu$ M))在比較上具有差異,  $p < 0.05$ 。





## 計畫成果自評

糖尿病神經病變的病理變化包括急性神經纖維異常，接著是慢性神經纖維損傷、萎縮及神經消失。神經纖維的消失是漸進性的，最主要的病理變化是神經軸突消失合併次發性的髓鞘脫失。神經病變是因神經軸突退化所致，由遠端向近端進行，因此神經的末端受傷最嚴重。神經傷害可以因為微小血管功能異常以及不成功的神經再生而加重，且與高血糖對周邊神經組織、支持之結締組織及血管的作用有關。神經疼痛是伴隨糖尿病和其他疾病的一種常見病痛，包含：1.身體有疼痛感覺（夾鉗感、灼燒感、撕裂感），病因是負責傳導疼痛、溫度和觸覺信號的感覺神經出現損傷；用藥物抑制這種病痛很難見效。2.遠端皮膚感覺異常及知覺缺乏（麻木感，針刺感）易肌肉無力、萎縮。自發性的疼痛反應，疼痛覺過度敏感反應（有害的刺激）以及機械性造成的疼痛覺敏感反應（無害的刺激）現象，都屬於周邊神經損傷產生病變而引起的疼痛反應症狀，並且會明顯地改變生活的情緒與降低生活的品質。

動物實驗能完整系統性的評估糖尿病周邊神經病變（Diabetic peripheral neuropathy），說明罹患糖尿病病後動物在神經病變併發症的相關研究。本實驗研究鏈脲佐菌素（Streptozocin, STZ）誘發糖尿病動物模式的可能性，並建立在高血糖狀況下造成神經病變併發症引發之疼痛行為反應，此動物模式能提供一致性且持續性的疼痛症狀表現，並能模擬在臨床上糖尿病周邊神經病變性引發疼痛反應的許多特徵。這些相關性的探討可以藉由背根神經節的周邊小直徑無髓鞘 C 和有髓鞘 A-delta 神經纖維在皮膚內支配表現，顯著地分析影響疼痛行為反應在周邊神經系統涵蓋的重要機制。以期未來能對臨床上健康醫學針對藥物治療策略的機制有更深層的理解，進而能藉由藥物控制來摒除糖尿病神經病變帶來的疼痛行為反應和改善生活的品質。

## 附錄

[Redistribution of voltage-gated sodium channels after nerve decompression contributes to relieve neuropathic pain in chronic constriction injury.](#)

Tseng TJ, Hsieh YL, Ko MH, Hsieh ST.

Brain Res. 2014 Jul 16. pii: S0006-8993(14)00941-X. doi: 10.1016/j.brainres.2014.07.012.

[Epub ahead of print]



# 科技部補助計畫衍生研發成果推廣資料表

日期:2014/10/15

科技部補助計畫	計畫名稱: 鏈脛佐菌素誘發糖尿病多發性神經病變的皮膚內神經調控疼痛機制
	計畫主持人: 曾拓榮
	計畫編號: 102-2320-B-040-024- 學門領域: 解剖
無研發成果推廣資料	

102 年度專題研究計畫研究成果彙整表

計畫主持人：曾拓榮		計畫編號：102-2320-B-040-024-					
計畫名稱：鏈?佐菌素誘發糖尿病多發性神經病變的皮膚內神經調控疼痛機制							
成果項目		量化			單位	備註（質化說明：如數個計畫共同成果、成果列為該期刊之封面故事...等）	
		實際已達成數（被接受或已發表）	預期總達成數（含實際已達成數）	本計畫實際貢獻百分比			
國內	論文著作	期刊論文	0	0	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	0	0	100%		
		專書	0	0	100%		
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力（本國籍）	碩士生	0	0	100%	人次	
		博士生	0	0	100%		
		博士後研究員	0	0	100%		
		專任助理	0	0	100%		
國外	論文著作	期刊論文	0	0	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	0	0	100%		
		專書	0	0	100%	章/本	
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力（外國籍）	碩士生	0	0	100%	人次	
		博士生	0	0	100%		
		博士後研究員	0	0	100%		
		專任助理	0	0	100%		

<p>其他成果 (無法以量化表達之成果如辦理學術活動、獲得獎項、重要國際合作、研究成果國際影響力及其他協助產業技術發展之具體效益事項等，請以文字敘述填列。)</p>	<p>無</p>
--	----------

	成果項目	量化	名稱或內容性質簡述
科 教 處 計 畫 加 填 項 目	測驗工具(含質性與量性)	0	
	課程/模組	0	
	電腦及網路系統或工具	0	
	教材	0	
	舉辦之活動/競賽	0	
	研討會/工作坊	0	
	電子報、網站	0	
	計畫成果推廣之參與(閱聽)人數	0	

# 科技部補助專題研究計畫成果報告自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現或其他有關價值等，作一綜合評估。

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

達成目標

未達成目標（請說明，以 100 字為限）

實驗失敗

因故實驗中斷

其他原因

說明：

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形：

論文： 已發表  未發表之文稿  撰寫中  無

專利： 已獲得  申請中  無

技轉： 已技轉  洽談中  無

其他：（以 100 字為限）

3. 請依學術成就、技術創新、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）（以 500 字為限）

糖尿病神經病變的病理變化包括急性神經纖維異常，接著是慢性神經纖維損傷、萎縮及神經消失。神經纖維的消失是漸進性的，最主要的病理變化是神經軸突消失合併次發性的髓鞘脫失。神經病變是因神經軸突退化所致，由遠端向近端進行，因此神經的末端受傷最嚴重。神經傷害可以因為微小血管功能異常以及不成功的神經再生而加重，且與高血糖對周邊神經組織、支持之結締組織及血管的作用有關。神經疼痛是伴隨糖尿病和其他疾病的一種常見病痛，包含：1. 身體有疼痛感覺（夾鉗感、灼燒感、撕裂感），病因是負責傳導疼痛、溫度和觸覺信號的感覺神經出現損傷；用藥物抑制這種病痛很難見效。2. 遠端皮膚感覺異常及知覺缺乏（麻木感，針刺感）易肌肉無力、萎縮。自發性的疼痛反應，疼痛覺過度敏感反應（有害的刺激）以及機械性造成的疼痛覺敏感反應（無害的刺激）現象，都屬於周邊神經損傷產生病變而引起的疼痛反應症狀，並且會明顯地改變生活的情緒與降低生活的品質。

動物實驗能完整系統性的評估糖尿病周邊神經病變（Diabetic peripheral neuropathy），說明罹患糖尿病病後動物在神經病變併發症的相關研究。本實驗研究鏈脲佐菌素（Streptozocin, STZ）誘發糖尿病動物模式的可能性，並建立在高血糖狀況下造成神經病變併發症引發之疼痛行為反應，此動物模式能

提供一致性且持續性的疼痛症狀表現，並能模擬在臨床上糖尿病周邊神經病變性引發疼痛反應的許多特徵。這些相關性的探討可以藉由背根神經節的周邊小直徑無髓鞘 C 和有髓鞘 A-delta 神經纖維在皮膚內支配表現，顯著地分析影響疼痛行為反應在周邊神經系統涵蓋的重要機制。以期未來能對臨床上健康醫學針對藥物治療策略的機制有更深層的理解，進而能藉由藥物控制來摒除糖尿病神經病變帶來的疼痛行為反應和改善生活的品質。