

科技部補助專題研究計畫成果報告 期末報告

胰島素對鏈脛佐菌素誘發神經病變性疼痛行為的影響：探討胰
島素受體貝塔的作用

計畫類別：個別型計畫
計畫編號：MOST 104-2320-B-040-012-
執行期間：104年08月01日至105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：此計畫無其他參與人員

中華民國 105 年 10 月 25 日

中文摘要：糖尿病(Diabetes Mellitus)的慢性併發症，包括因急性高血糖造成神經病變而引發疼痛行為(Neuropathic pain)。因此，我們使用單次腹腔注射方式給予鏈脲佐菌素(Streptozotocin, STZ, 60mg/kg)來誘發原發性糖尿病，探討疼痛感覺的傳遞機制。結果顯示隨著誘發後時間變化，相較於糖尿病對照組(Citrate)，糖尿病動物組(STZ)在體重變化表現停滯現象，並維持持續高血糖的狀況。對於疼痛行為評估，在誘發糖尿病後同時產生對熱覺遲鈍(Thermal hypoalgesia)和機械性刺激敏感(Mechanical allodynia)的反應現象。糖尿病動物組(STZ)在誘發糖尿病後，皮膚內表皮下神經纖維(Subepidermal nerve fibers (SENFs))表現的神經絲蛋白200(Neurofilament 200 (NF-200))呈現粗壯的束狀分布，表示周邊有髓鞘A β 纖維在皮膚真皮層內無明顯地減少。表皮下神經纖維(SENFs)在糖尿病動物組(STZ)誘發後第2週後顯著增加表現周邊蛋白(Peripherin)，表示周邊有髓鞘A δ 和無髓鞘C纖維在皮膚真皮層內明顯地變多。然而，在第4週後與糖尿病對照組(Citrate)比較並無顯著差異。我們藉由皮膚表皮層內的梅克爾氏細胞(Merkel cells (MCs))與皮膚真皮層內有髓鞘A β 纖維的關係，來說明機械性刺激敏感(Mechanical allodynia)的形成。常規的蛋白激酶C(Protein kinase C (PKC))透過二酰基甘油(DAG)，鈣離子(Ca²⁺)和磷脂調控被磷酸化，證據表明蛋白激酶C(PKC)可能在疼痛調節中發揮重要作用。藉由組織免疫化學染色，糖尿病動物組(STZ)在誘發糖尿病第2週，皮膚表皮層內表現磷酸化蛋白質激酶C α (phosphorylated Protein kinase C α (pPKC α))的梅克爾氏細胞(MCs)顯著地增加且持續到第16週。然而，磷酸化蛋白質激酶C γ (pPKC γ)在梅克爾氏細胞(MCs)的表現顯示誘發糖尿病後無顯著差異。用以證明梅克爾氏細胞(MCs)向上調節蛋白質激酶C α (pPKC α)對於機械性刺激敏感(Mechanical allodynia)的形成機制有關。我們建立誘鏈脲佐菌素(STZ)誘發糖尿病動物模式，探討梅克爾氏細胞-神經突複合物(Merkel cell-neurite complex)對於疼痛行為傳遞的概念。本計畫主要貢獻是應用組織化學免疫染色的方法，說明皮膚內表皮下神經纖維(SENFs)的分布，進而探討梅克爾氏細胞(MCs)調控蛋白質激酶C α (PKC α)對於疼痛感覺的形成。結果可以提供分析疼痛行為的影響和在周邊神經系統涵蓋的重要機制。

中文關鍵詞：鏈脲佐菌素，神經病變性疼痛，表皮下神經纖維，周邊蛋白，神經絲蛋白200，梅克爾氏細胞，蛋白激酶C

英文摘要：The major chronic syndrome of Diabetes Mellitus (DM) in human resulting from acute hyperglycemia is accompanied with neuropathic pain. Thus, we perform the well-established animal model of DM by a single intraperitoneal injection of Streptozotocin (STZ, 60mg/kg) to display the insulin-dependent DM (IDDM). According to our results, STZ groups show with a higher blood glucose (> 300 mg/dL) and maintain the stagnation of body weight during the experimental periods. We first show the rats in STZ group significantly reveal the thermal hypoalgesia and mechanical allodynia. To understand the relationships between the

neuropathic pain and cutaneous innervations, we study the dermal distribution of subepidermal nerve fibers (SENFs) in STZ-induced rats. Based on the morphological evidence in footpad skin, there is no significant decrease in Neurofilament 200-immunoreactive (ir) SENFs demonstrating the normal cutaneous A fiber innervation after STZ injection. Additionally, the increases of peripherin-ir SENFs are significant observed at 2 weeks, but reversed to normal beginning from 4 weeks after STZ injection. We further evaluate the potential signaling pathway of Merkel cells (MCs) to study the issues of Merkel cell-neurite complex in mechanical allodynia. By the immunohistochemistry, the increases of phosphorylated protein kinase C α (pPKC α)-ir MCs are significant observed in the epidermis after STZ injection. However, there is no significant difference in pPKC γ -ir MCs during the experimental periods. We therefore suggest that MCs upregulate PKC α to contribute to mechanical allodynia in STZ-induced rats.

英文關鍵詞：Streptozocin, Neuropathic pain, Subepidermal nerve fibers, Peripherin, Neurofilaments 200, Merkel cells, Protein kinase C 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 104-2320-B-040-012-

執行期間：2015年08月01日至2016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：

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 105 年 10 月 25 日

目錄：

前言.....	1
研究目的.....	1
文獻探討.....	1
研究方法.....	3
結果與討論（含結論與建議）.....	6
參考文獻.....	10
附圖.....	12
附錄.....	19

中文摘要：

糖尿病(Diabetes Mellitus)的慢性併發症，包括因急性高血糖造成神經病變而引發疼痛行為(Neuropathic pain)。因此，我們使用單次腹腔注射方式給予鏈脲佐菌素(Streptozotocin, STZ, 60mg/kg)來誘發原發性糖尿病，探討疼痛感覺的傳遞機制。結果顯示隨著誘發後時間變化，相較於糖尿病對照組(Citrate)，糖尿病動物組(STZ)在體重變化表現停滯現象，並維持持續高血糖的狀況。對於疼痛行為評估，在誘發糖尿病後同時產生對熱覺遲鈍(Thermal hypoalgesia)和機械性刺激敏感(Mechanical allodynia)的反應現象。糖尿病動物組(STZ)在誘發糖尿病後，皮膚內表皮下神經纖維(Subepidermal nerve fibers (SENFs))表現的神經絲蛋白200 (Neurofilament 200 (NF-200))呈現粗壯的束狀分布，表示周邊有髓鞘A β 纖維在皮膚真皮層內無明顯地減少。表皮下神經纖維(SENFs)在糖尿病動物組(STZ)誘發後第2週後顯著增加表現周邊蛋白(Peripherin)，表示周邊有髓鞘A δ 和無髓鞘C纖維在皮膚真皮層內明顯地變多。然而，在第4週後與糖尿病對照組(Citrate)比較並無顯著差異。我們藉由皮膚表皮層內的梅克爾氏細胞(Merkel cells (MCs))與皮膚真皮層內有髓鞘A β 纖維的關係，來說明機械性刺激敏感(Mechanical allodynia)的形成。常規的蛋白激酶C(Protein kinase C (PKC))透過二酰基甘油(DAG)，鈣離子(Ca²⁺)和磷脂調控被磷酸化，證據表明蛋白激酶C(PKC)可能在疼痛調節中發揮重要作用。藉由組織免疫化學染色，糖尿病動物組(STZ)在誘發糖尿病第2週，皮膚表皮層內表現磷酸化蛋白質激酶C α (phosphorylated Protein kinase C α (pPKC α))的梅克爾氏細胞(MCs)顯著地增加且持續到第16週。然而，磷酸化蛋白質激酶C γ (pPKC γ)在梅克爾氏細胞(MCs)的表現顯示誘發糖尿病後無顯著差異。用以證明梅克爾氏細胞(MCs)向上調節蛋白質激酶C α (pPKC α)對於機械性刺激敏感(Mechanical allodynia)的形成機制有關。我們建立誘鏈脲佐菌素(STZ)誘發糖尿病動物模式，探討梅克爾氏細胞-神經突複合物(Merkel cell-neurite complex)對於疼痛行為傳遞的概念。本計畫主要貢獻是應用組織化學免疫染色的方法，說明皮膚內表皮下神經纖維(SENFs)的分布，進而探討梅克爾氏細胞(MCs)調控蛋白質激酶C α (PKC α)對於疼痛感覺的形成。結果可以提供分析疼痛行為的影響和在周邊神經系統涵蓋的重要機制。

關鍵詞：

鏈脲佐菌素，神經病變性疼痛，表皮下神經纖維，周邊蛋白，神經絲蛋白200，梅克爾氏細胞，蛋白激酶C。

英文摘要：

The major chronic syndrome of Diabetes Mellitus (DM) in human resulting from acute hyperglycemia is accompanied with neuropathic pain. Thus, we perform the well-established animal model of DM by a single intraperitoneal injection of Streptozotocin (STZ, 60mg/kg) to display the insulin-dependent DM (IDDM). According to our results, STZ groups show with a higher blood glucose (> 300 mg/dL) and maintain the stagnation of body weight during the experimental periods. We first show the rats in STZ group significantly reveal the thermal hypoalgesia and mechanical allodynia. To understand the relationships between the neuropathic pain and cutaneous innervations, we study the dermal distribution of subepidermal nerve fibers (SENFs) in STZ-induced rats. Based on the morphological evidence in footpad skin, there is no significant decrease in Neurofilament 200-immunoreactive (ir) SENFs demonstrating the normal cutaneous A fiber innervation after STZ injection. Additionally, the increases of peripherin-ir SENFs are significant observed at 2 weeks, but reversed to normal beginning from 4 weeks after STZ injection. We further evaluate the potential signaling pathway of Merkel cells (MCs) to study the issues of Merkel cell-neurite complex in mechanical allodynia. By the immunohistochemistry, the increases of phosphorylated protein kinase C α (pPKC α)-ir MCs are significant observed in the epidermis after STZ injection. However, there is no significant difference in pPKC γ -ir MCs during the experimental periods. We therefore suggest that MCs upregulate PKC α to contribute to mechanical allodynia in STZ-induced rats.

Keywords:

Streptozocin, Neuropathic pain, Subepidermal nerve fibers, Peripherin, Neurofilaments 200, Merkel cells, Protein kinase C kinase.

前言

第一型糖尿病：Insulin-dependent Diabetes Mellitus (IDDM)是原發性糖尿病，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(β 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。皮膚表皮層內神經纖維(Intraepidermal nerve fibers (IENFs))在先前研究中說明在鏈脲佐菌素誘發糖尿病後顯著地減少；因此，皮膚真皮層內表皮下神經纖維(Subepidermal nerve fibers (SENFs))的變化值得探討相關性。梅克爾氏細胞(Merkel's cells (MCs))與皮膚真皮層內的有髓鞘 A β 纖維形成複合結構用以傳遞觸覺訊息，對於梅克爾氏細胞(MCs)的參與的訊息路徑與疼痛產生的重要性的確認值得關注。本實驗期望釐清皮膚真皮層內表皮下神經纖維(SENFs)是否藉由梅克爾氏細胞(MCs)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刺激反應與機械性刺激反應的檢測變化。
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)表現神經絲蛋白 200(Neurofilament 200 (NF-200))和周邊蛋白(Peripherin)的分佈。釐清有髓鞘 A β 纖維和有髓鞘 A δ 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表皮層內梅克爾氏細胞(MCs)表達磷酸化的蛋白質激酶 C(Phosphorylated protein kinase C (pPKC))的變化。並進一步說明比較不同類型磷酸化的蛋白質激酶 C (pPKC)與疼痛行為的相關性。

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(Ahlgren and Levine, 1993)。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(Kumazawa et al., 1996; Dyck and Giannini, 1996)。

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(Brown and Asbury, 1984; Said, 1996; Calcutt et al., 1996)。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(Woolf and Mannion, 1999)。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)；此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(Thye-Ronn et al., 1994; Blackburn-Munro, 2004; Dworkin et al., 2003)。

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(Archer et al., 1983; Said, 1996)。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。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 δ 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，而有髓鞘

的 A β 纖維傳送機械刺激的輕觸覺 (Basbaum and Julius, 2006)。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; Kennedy, 2004; McCarthy et al., 1995)。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 (Chiang et al., 2005; 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 (Subepidermal nerve fibers (SENFs)) (Myers et al., 2013; Provitera et al., 2007; Casanova-Molla et al., 2011)。周邊蛋白 (Peripherin) 是主要在周邊神經系統 (PNS) 的神經元中表達的 III 型中間絲 (Intermediate filaments) 蛋白，表現於有髓鞘 A δ 和無髓鞘 C 纖維。其大小，結構和蛋白質基序的序列/位置與其他 III 型中間絲蛋白例如結蛋白，波形蛋白和膠質纖維酸性蛋白類似。像這些蛋白質，周邊蛋白可以自組裝形成均聚絲狀網絡，但它也可以與幾種神經元類型的神經絲異聚。周邊蛋白被認為在損傷後發育和軸突再生期間的神經突延長中起作用，但其確切功能是未知的。神經絲蛋白 200 (Neurofilament 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 (NF-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)。然而，目前皮膚內周邊神經在鏈脛佐菌素誘發原發性糖尿病後的變化仍然不明。

梅克爾氏細胞 (Merkel cells (MCs)) 存在於所有脊椎動物的皮膚中，它們是在足底表面的表皮凹陷的基底層直徑，大約 10 μ m 的卵圓受體細胞。梅克爾神經末梢 (Merkel nerve endings) 是為 A β 纖維，形成梅克爾氏細胞神經突複合物 (Merkel cell-neurite complex)。它們與形狀和紋理的輕觸摸區分的感覺相關聯。蛋白激酶 C (Protein kinase C (PKC)) 家族由人類中的 15 種同功酶組成。根據他們的第二信使要求，他們被分為三個亞家族：常規的 (或古典的)，新的和非典型的。常規的蛋白激酶 C (PKC) 含有同類型 α ， β I， β II 和 γ 。這些需要二酰基甘油 (DAG)，鈣離子 (Ca²⁺) 和磷脂 (磷脂酰絲氨酸)，磷酸化這些蛋白上的絲氨酸和蘇氨酸氨基酸殘基的羥基來參與控制其它蛋白的功能。蛋白激酶 C (PKC) 在幾個信號轉導級聯中起重要作用，證據表明可能在疼痛調節中發揮重要作用。因此，在此研究中探討蛋白激酶 C (PKC) 在梅克爾氏細胞 (MCs) 內的調節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(β 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应時間，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 (22×17×14 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，後腳掌縮回的反应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 CO₂ 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 30 μ m 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(H₂O₂)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. 周邊蛋白(Peripherin, rabbit, 1:1000, Millipore, Temecula, CA)；
- B. 神經絲蛋白-200(NF-200, mouse, 1:1000, Sigma, St. Louis, MO)；
- C. 磷酸化-蛋白激酶 C α (Phospho-protein kinase C α (pPKC α), rabbit, 1:1000, Epitomics, Beverley, MA)；
- D. 磷酸化-蛋白激酶 C γ (Phospho-protein kinase C γ (pPKC γ), rabbit, 1:1000, Epitomics, 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 μ l。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 \times 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. 計量皮膚表皮層內的梅克爾氏細胞(MCs)

皮膚內梅克爾氏細胞(MCs)的定量方式是採用選取免疫組織染色的足墊皮膚切片，免疫染色作用的表皮層內的梅克爾氏細胞(MCs)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。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梅克爾氏細胞(MCs)分布，再以擷取影像的計算表皮層的總長度，則可因此被表示為表皮層區域內所含有的梅克爾氏細胞(MCs)數目。

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 8 週以及第 16 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 8 週以及第 16 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，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 8 週和第 16 週分別再測量實驗動物的體重(圖一 A (Fig. 1A))，根據數據顯示在誘發後的第 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(241.63 ± 22.24 克 vs. 371.05 ± 21.16 克, $p < 0.05$)，第 4 和第 8 週時兩組動物仍顯示明顯的差異 (266.77 ± 44.28 克 vs. 422.18 ± 46.28 克, $p < 0.05$; 283.33 ± 49.50 克 vs. 508.67 ± 61.62 克, $p < 0.05$)，並且這個現象可以持續到誘發後的第 16 週(319.33 ± 54.00 克 vs. 631.33 ± 34.43 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。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(圖一 B (Fig. 1B))。根據數據顯示在誘發後的第 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(430.68 ± 60.82 mg/dL vs. 105.00 ± 9.79 mg/dL, $p < 0.05$)，第 4 和第 8 週時糖尿病動物組仍顯示維持明顯的高血糖數值(431.15 ± 72.91 mg/dL vs. 102.94 ± 9.39 mg/dL, $p < 0.05$; 442.25 ± 58.36 mg/dL vs. 94.44 ± 7.14 mg/dL, $p < 0.05$)，並且這個現象可以持續到誘發後的第 16 週(457.33 ± 56.17 mg/dL vs. 97.50 ± 7.66 mg/dL, $p < 0.05$)。

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，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 8 週和第 16 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的動物在誘發後第 2 週和正常動物組比較，具有典型的熱覺遲鈍的現象產生(14.29 ± 1.55 秒 vs. 10.27 ± 0.34 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 和第 8 週時仍然顯示同樣的熱覺過敏現象(13.23 ± 1.18 秒 vs. 10.28 ± 0.37 秒, $p < 0.05$; 13.62 ± 1.50 秒 vs. 10.42 ± 0.31 秒, $p < 0.05$)，並且延續到第 16 週(13.71 ± 0.84 秒 vs. 10.09 ± 0.28 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 8 週和第 16 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在誘發後第 2 週和正常動物組比較，產生典型神經病變引發的機械式刺激敏感反應產生(4.89 ± 4.94 克 vs. 18.16 ± 6.28 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 週和第 8 週時仍然顯示同樣的刺激敏感反應現象(5.48 ± 4.25 克 vs. 20.02 ± 7.25 克, $p < 0.05$; 2.98 ± 1.50 克 vs. 15.59 ± 5.55 克, $p < 0.05$) 並且延續到第 8 週(4.20 ± 1.61 克 vs. 15.24 ± 5.81 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刺激遲鈍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(圖三 (Fig. 3))。周邊有髓鞘A β 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($8109.38 \pm 526.68 \mu\text{m}^2$ vs. $8069.46 \pm 567.85 \mu\text{m}^2$, $p > 0.05$) (圖三B (Fig. 3B))。第4週和第8週時仍然顯示類似的表現($8478.63 \pm 642.36 \mu\text{m}^2$ vs. $8360.67 \pm 337.39 \mu\text{m}^2$, $p > 0.05$; $8069.48 \pm 658.58 \mu\text{m}^2$ vs. $8178.25 \pm 429.35 \mu\text{m}^2$, $p > 0.05$)，並且延續到第8週($7642.53 \pm 902.31 \mu\text{m}^2$ vs. $8264.15 \pm 524.72 \mu\text{m}^2$, $p > 0.05$)。

2. 表皮下神經纖維內周邊蛋白(Peripherin)表現

藉由免疫組織染色說明糖尿病周邊神經病變後周邊蛋白(Peripherin)在時間軸上的變化(圖四 (Fig. 4))。周邊無髓鞘C和有髓鞘A δ 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週表現周邊蛋白(Peripherin)的表皮下神經纖維有顯著地增加($962.20 \pm 227.91 \mu\text{m}^2$ vs. $554.41 \pm 101.73 \mu\text{m}^2$, $p < 0.05$) (圖四B (Fig. 4B))。第4週和第8週時顯示些許增加但並無差異($850.67 \pm 104.10 \pm 193.54 \mu\text{m}^2$ vs. $649.55 \pm 165.93 \mu\text{m}^2$, $p > 0.05$; $836.04 \pm 118.16 \mu\text{m}^2$ vs. $670.02 \pm 229.75 \mu\text{m}^2$, $p > 0.05$)，並且延續到第8週($740.35 \pm 106.11 \mu\text{m}^2$ vs. $650.06 \pm 198.07 \mu\text{m}^2$, $p > 0.05$)。

D. 鏈脲佐菌素誘發糖尿病動物後在皮膚表皮層內的梅克爾氏細胞(MCs)的變化

1. 梅克爾氏細胞(MCs)內磷酸化-蛋白激酶Ca (pPKCa)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-蛋白激酶Ca (pPKCa)在時間軸上的變化(圖五 (Fig. 5))。梅克爾氏細胞(MCs)在皮膚表皮層內明顯地被表達，具有橢圓的細胞外觀且呈現緊密排列分布，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-蛋白激酶Ca (pPKCa)的梅克爾氏細胞(MCs)密度顯著上升($7.05 \pm 1.16 \text{ cells/mm}$ vs. $3.78 \pm 1.05 \text{ cells/mm}$, $p < 0.05$) (圖五B (Fig. 5B))。第4週和第8週時仍然顯示類似的增加表現($5.78 \pm 2.52 \text{ cells/mm}$ vs. $3.35 \pm 1.08 \text{ cells/mm}$, $p < 0.05$; $6.38 \pm 2.46 \text{ cells/mm}$ vs. $2.68 \pm 0.56 \mu\text{m}^2$, $p < 0.05$)，並且延續到第16週($9.49 \pm 2.70 \text{ cells/mm}$ vs. $4.33 \pm 0.81 \mu\text{m}^2$, $p < 0.05$)。

2. 梅克爾氏細胞(MCs)內磷酸化-蛋白激酶C γ (pPKC γ)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-蛋白激酶C γ (pPKC γ)在時間軸上的變化(圖六 (Fig. 6))。梅克爾氏細胞(MCs)在皮膚表皮層內具有橢圓的細胞外觀且呈現群聚排列分布，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-蛋白激酶C γ (pPKC γ)的梅克爾氏細胞(MCs)密度沒有顯著地增加($7.38 \pm 2.17 \text{ cells/mm}$ vs. $6.30 \pm 2.36 \text{ cells/mm}$, $p > 0.05$) (圖六B (Fig. 6B))。第4週和第8週時仍然顯示同樣的表現但並無差異($5.73 \pm 1.69 \text{ cells/mm}$ vs. $5.48 \pm 5.44 \text{ cells/mm}$, $p > 0.05$; $5.74 \pm 1.60 \text{ cells/mm}$ vs. $6.95 \pm 1.94 \text{ cells/mm}$, $p > 0.05$)，並且延續到第8週($5.29 \pm 2.03 \text{ cells/mm}$ vs. $6.24 \pm 0.82 \text{ cells/mm}$, $p > 0.05$)。

本實驗研究計畫之重要性：

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，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 δ 神經纖維和有髓鞘 A β 神經纖維在皮膚內真皮層內的支配表現，評估疼痛行為功能的變化。也可從梅克爾氏細胞 (Merkel cells (MCs)) 和梅克爾神經末梢 (Merkel nerve endings) 形成梅克爾氏細胞神經突複合物 (Merkel cell-neurite complex) 來說明傳遞疼痛感覺訊息的路徑活化。證據表明常規的蛋白激酶 C (Protein kinase C (PKC)) 含有同種型 α ， β I， β II 和 γ 可能在疼痛調節中發揮重要作用。因此，在此研究中說明蛋白激酶 C α (PKC α) 在梅克爾氏細胞 (MCs) 內的調節與神經病變性疼痛症狀的關係。

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。最後並期望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促效劑、拮抗劑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. Ahlgren SC, Levine JD. Mechanical hyperalgesia in streptozotocin-diabetic rats. *Neuroscience* 52 1993, 1049-1055
2. Aley KO, Levine JD. Different peripheral mechanisms mediate enhanced nociception in metabolic/toxic and traumatic painful peripheral neuropathies in the rat. *Neuroscience* 111 2002, 389-97
3. Beiswenger KK, Calcutt NA, Mizisin AP. Dissociation of thermal hypoalgesia and epidermal denervation in streptozotocin-diabetic mice. *Neurosci Lett.* 2008 Sep 19;442(3):267-72.
4. Brown, M.J., Asbury, A.K. Diabetic neuropathy. *Ann. Neurol.* 1984 15, 2-12
5. Chen HS, Lei J, He X, Qu F, Wang Y, Wen WW, You HJ, Arendt-Nielsen L. Peripheral involvement of PKA and PKC in subcutaneous bee venom-induced persistent nociception, mechanical hyperalgesia, and inflammation in rats. *Pain.* 2008 Mar;135(1-2):31-6. Epub 2007 Jun 1.
6. 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, 185-92
7. Christianson JA, Ryals JM, Johnson MS, Dobrowsky RT, Wright DE. Neurotrophic modulation of myelinated cutaneous innervation and mechanical sensory loss in diabetic mice. *Neuroscience* 2007 145(1):303-13.
8. Courteix C, Eschalier A, Lavarenne J. Streptozocin-induced diabetic rats: behavioural evidence for a model of chronic pain. *Pain* 53 1993, 81-8
9. Courteix, C., Bardin, M., Chantelauze, C., Lavarenne, J., Eschalier, A. Study of the sensitivity of the diabetes-induced pain model in rats to a range of analgesics. *Pain* 57 1994, 153-160
10. Dobretsov M, Hastings SL, Romanovsky D, Stimers JR, Zhang JM. Mechanical hyperalgesia in rat models of systemic and local hyperglycemia. *Brain Res.* 960 2003, 174-83
11. Fernyhough P, Huang TJ, Verkhatsky A. Mechanism of mitochondrial dysfunction in diabetic sensory neuropathy. *J Peripher Nerv Syst* 8 2003, 227-23
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.* 2000 Jan 1;172(1):55-62.
14. 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.* 2008 May 2;436(1):13-8.
15. Johnson MS, Ryals JM, Wright DE. Early loss of peptidergic intraepidermal nerve fibers in an STZ-induced mouse model of insensate diabetic neuropathy. *Pain.* 2008

Nov 15;140(1):35-47.

16. Kennedy JM, Zochodne DW. The regenerative deficit of peripheral nerves in experimental diabetes: its extent, timing and possible mechanisms. *Brain* 123 2000, 2118-2129
17. Kennedy JM, Zochodne DW. Experimental diabetic neuropathy with spontaneous recovery. Is there irreparable damage? *Diabetes* 54 2005, 830-837
18. Khan GM, Chen SR, Pan HL. Role of primary afferent nerves in allodynia caused by diabetic neuropathy in rats. *Neuroscience* 114 2002, 291-299
19. Kishi M, Tanabe J, Schmelzer JD, Low PA. Morphometry of dorsal root ganglion in chronic experimental diabetic neuropathy. *Diabetes* 51 2002, 819-824
20. Said G. Diabetic neuropathy: an update. *J Neurol* 243 1996, 431-440
21. 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
22. Toth C, Brussee V, Cheng C, Zochodne DW. Diabetes mellitus and the sensory neuron. *J Neuropathol Exp Neurol* 63 2004, 561-573
23. Toth C, Brussee V, Zochodne DW. Remote neurotrophic support of epidermal nerve fibres in experimental diabetes. *Diabetologia*. 2006 May;49(5):1081-8.
24. Tominaga M, Caterina MJ. Thermosensation and pain. *J Neurobiol*. 2004 Oct;61(1):3-12. Review.
25. Yagihashi S. Nerve structural defects in diabetic neuropathy: do animals exhibit similar changes? *Neurosci Res Commun* 21 1997, 25-32
26. Zochodne DW, Verge VMK, Cheng C, Sun H, Johnston Does diabetes target ganglion neurons? Progressive sensory neuron involvement in long term experimental diabetes. *J. Brain* 124 2001, 2319-2334

圖一 (Figure 1) Basic characteristics.

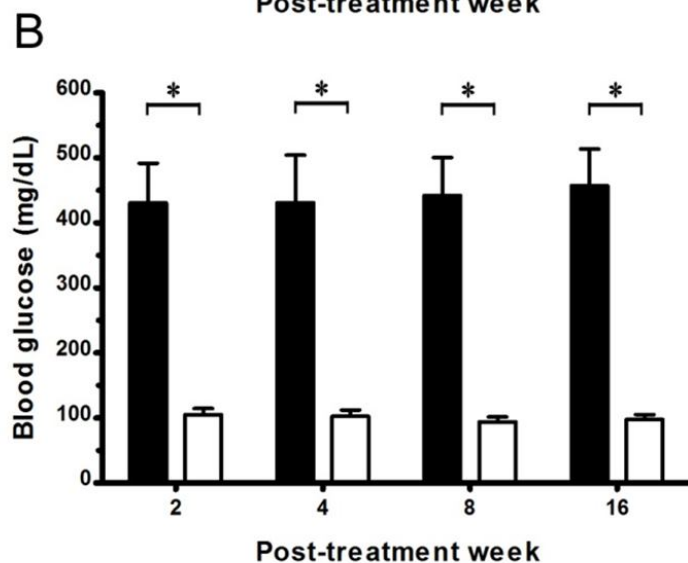
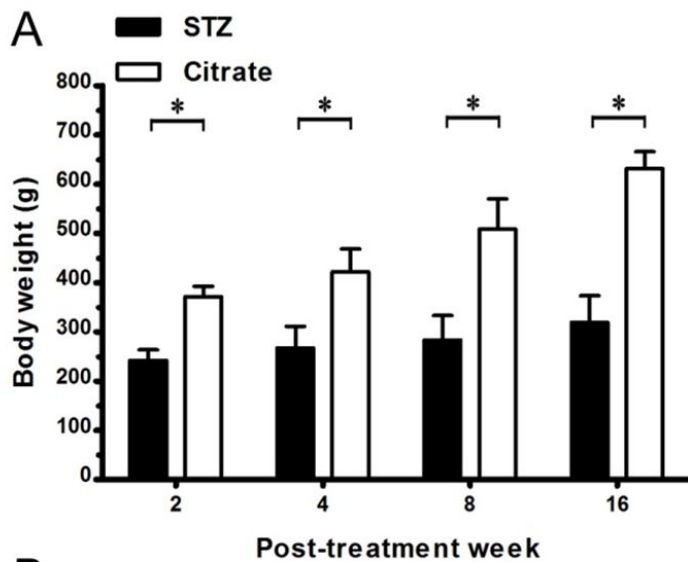
A. 體重測量變化

圖片顯示糖尿病動物組(STZ)的動物對於體重測量變化在時間軸上的變化，以及正常動物組(Citrate)在體重測量變化的影響。數據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)的動物對於血糖數值測定變化在時間軸上的變化，以及正常動物組(Citrate)在血糖數值測定變化的影響。數據以尾巴採血方式，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) Behavioral assessments.

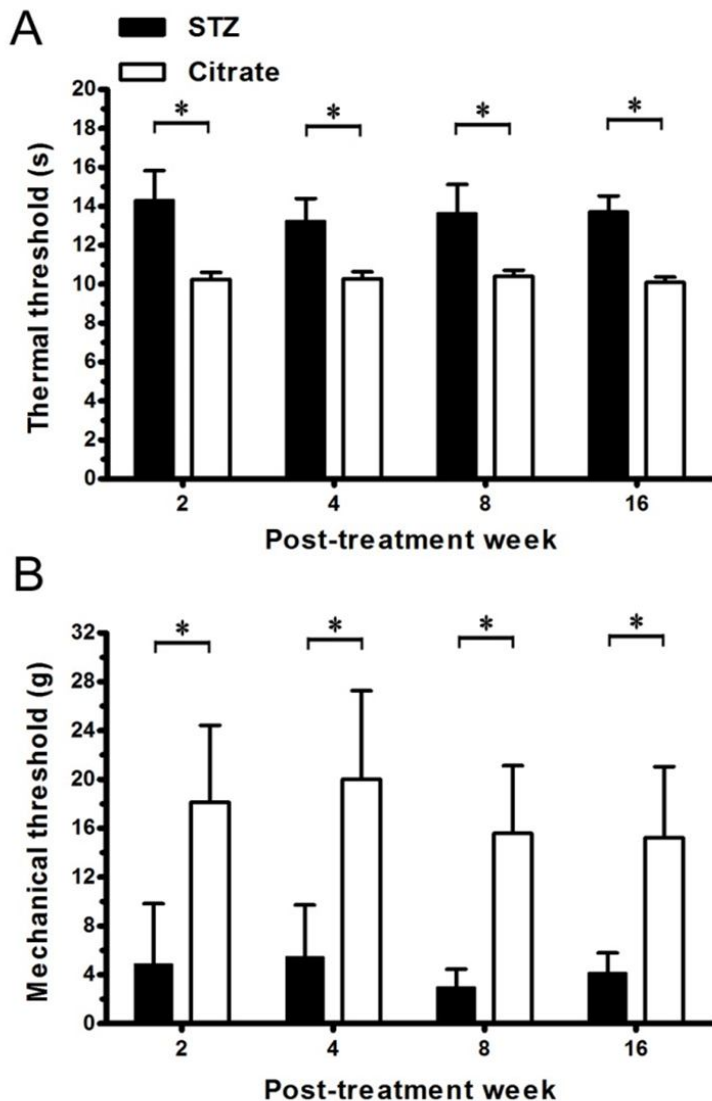
A. 熱覺刺激過敏反應

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

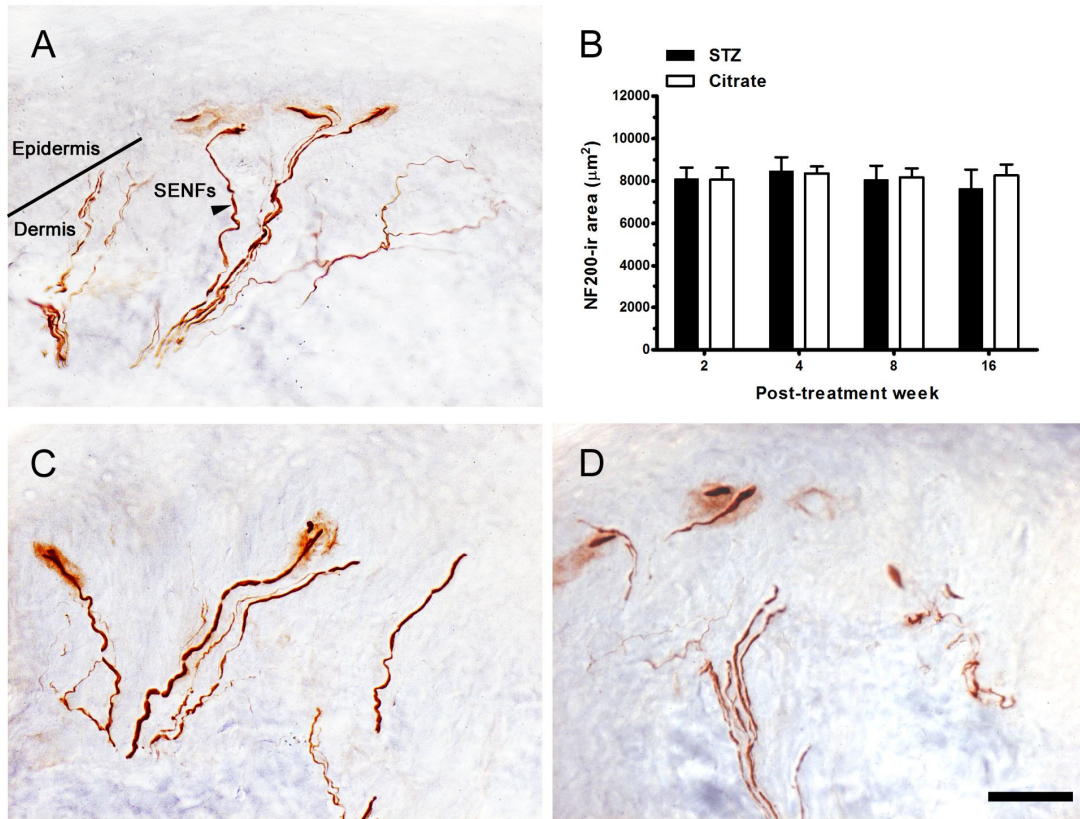
B. 機械式刺激敏感反應

圖片顯示糖尿病動物組(STZ)的動物對於機械式刺激敏感反應現象在時間軸上的變化，以及正常動物組(Citrate)對於機械式刺激敏感反應的影響。數據以 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， $p < 0.05$ 。

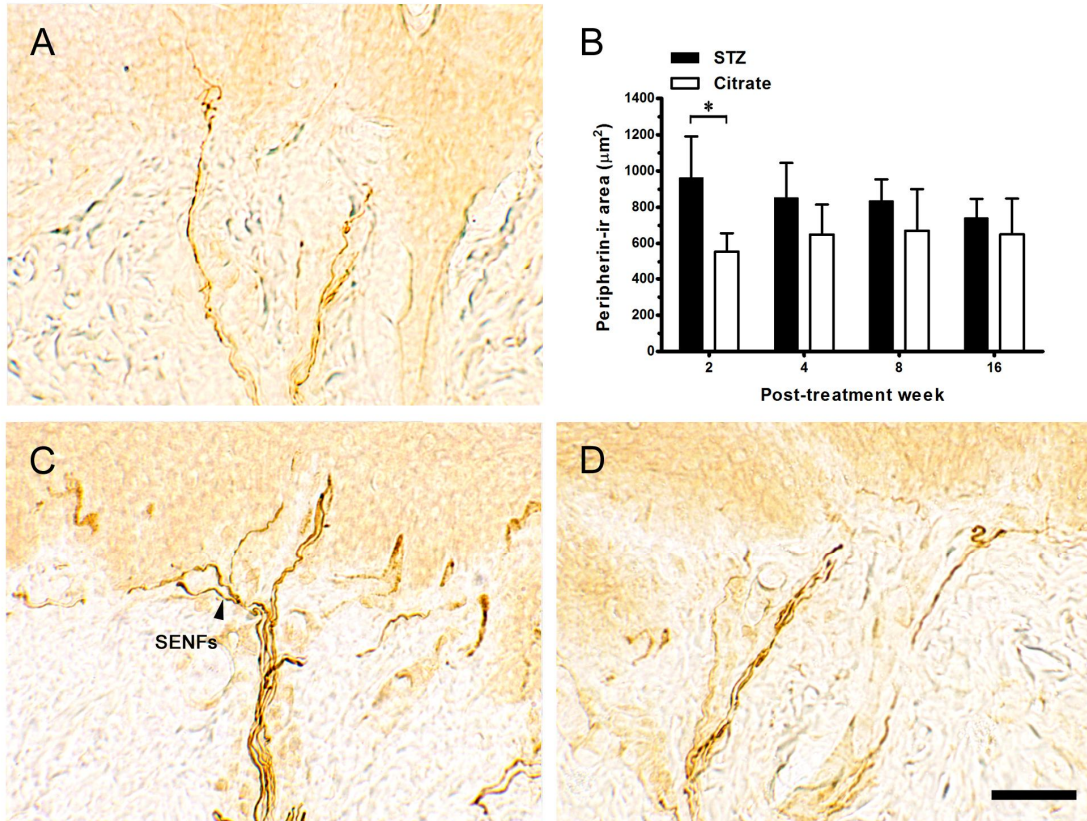


圖三 (Figure 3) **Neurofilament 200(NF-200)-immunoreactive (ir) SENFs innervation.** NF-200-ir SENFs were shown (A) after Citrate at post-treatment week (PTW) 2 and (B) temporal changes of SENFs area were expressed as NF-200-ir area of SENFs (mean \pm SD). * $p < 0.05$, indicated as a significant difference. (C) NF-200-ir SENFs sprout into superficial dermis significantly after STZ at PTW 2 but (D) withdraw at PTW16. Scale bar = 50 μ m.

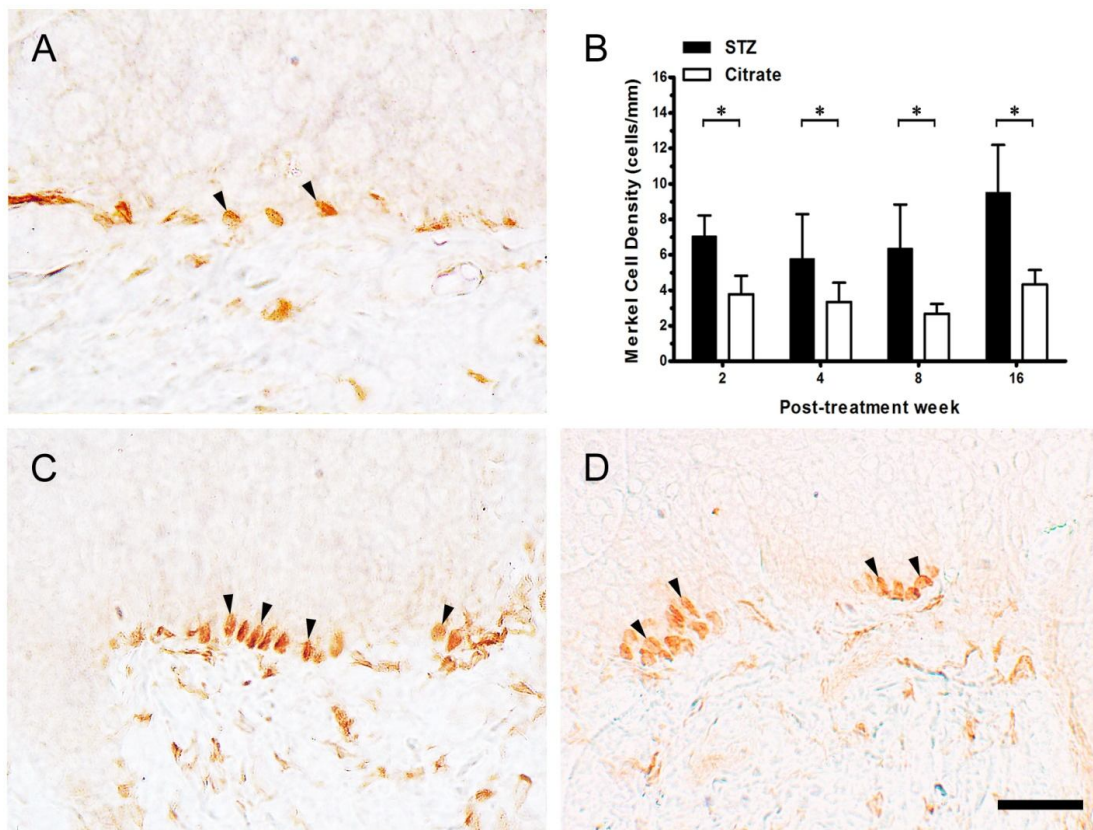


圖四 (Figure 4) **Peripherin-immunoreactive (ir) SENFs innervation.**

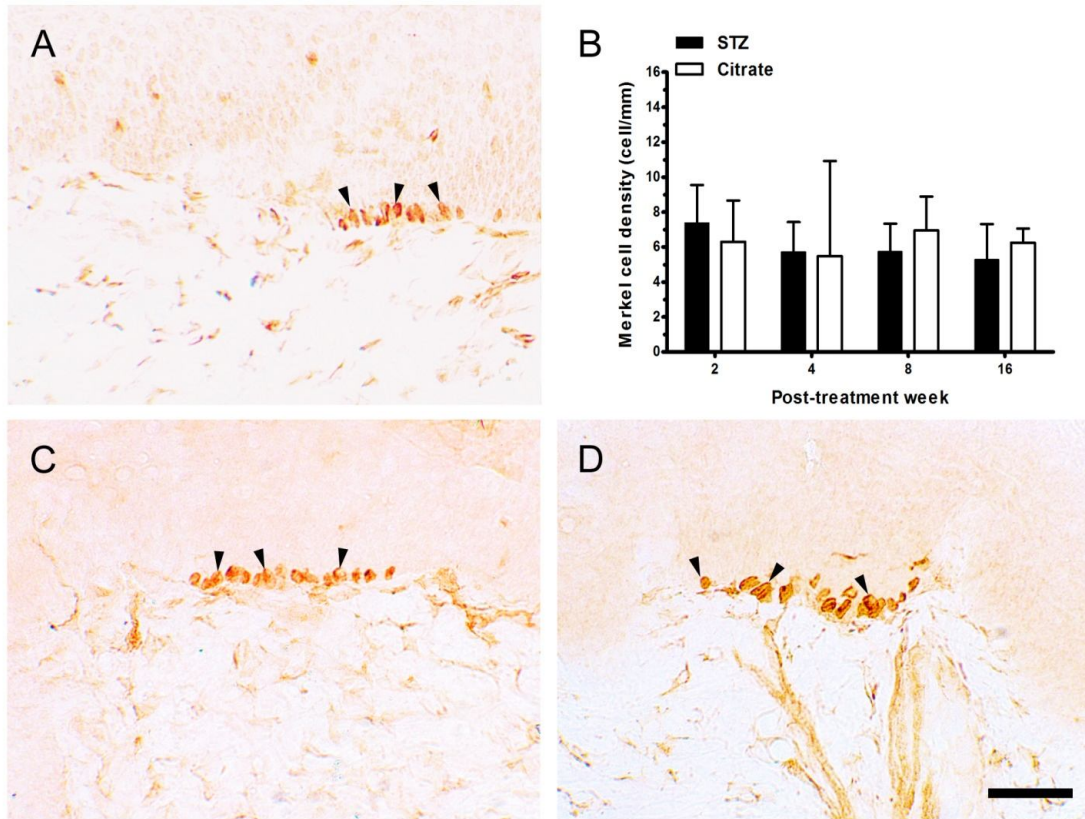
Peripherin-ir SENFs were shown (A) after Citrate at post-treatment week (PTW) 2 and (B) temporal changes of SENFs area were expressed as Peripherin-ir area of SENFs (mean \pm SD). * $p < 0.05$, indicated as a significant difference. (C) Peripherin-ir SENFs sprout into superficial dermis significantly after STZ at PTW 2 but (D) withdraw at PTW16. Scale bar = 50 μ m.



圖五 (Figure 5) **Phospho-protein kinase C α (pPKC α)-ir MCs distribution.**
 pPKC α -ir MCs were shown (A) after Citrate at PTW 2, (C) after STZ at PTW 2, and (D) after STZ at PTW 16 (arrowhead). (B) Temporal changes of pPKC α -ir Merkel Cell Density were expressed as mean \pm SD. * $p < 0.05$, indicated as a significant difference.
 Scale bar = 50 μ m.



圖六 (Figure 63) **Phospho-protein kinase C γ (pPKC γ)-ir MCs distribution.** pPKC γ -ir MCs were shown (A) after Citrate at PTW 2, (C) after STZ at PTW 2, and (D) after STZ at PTW 16 (arrowhead). (B) Temporal changes of pPKC γ -ir Merkel Cell Density were expressed as mean \pm SD. Scale bar = 50 μ m.



計畫成果自評

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藉由梅克爾氏細胞和梅克爾神經末梢形成默克爾細胞神經突複合物來說明。證據表明常規的蛋白激酶 C 可能在疼痛調節中發揮重要作用。因此，在此研究中說明蛋白激酶 Ca 在梅克爾氏細胞內的調節與神經病變性疼痛症狀的關係。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。

附錄

Intact subepidermal nerve fibers mediate mechanical hypersensitivity via the activation of protein kinase C gamma in spared nerve injury.

Ko MH, Yang ML, Youn SC, Lan CT, Tseng TJ.

Mol Pain. 2016;12. pii: 1744806916656189. doi: 10.1177/1744806916656189.

科技部補助計畫衍生研發成果推廣資料表

日期:2016/10/24

科技部補助計畫	計畫名稱: 胰島素對鏈脲佐菌素誘發神經病變性疼痛行為的影響: 探討胰島素受體貝塔的作用
	計畫主持人: 曾拓榮
	計畫編號: 104-2320-B-040-012- 學門領域: 細胞生物及解剖
無研發成果推廣資料	

104年度專題研究計畫成果彙整表

計畫主持人：曾拓榮		計畫編號：104-2320-B-040-012-				
計畫名稱：胰島素對鏈脛佐菌素誘發神經病變性疼痛行為的影響：探討胰島素受體貝塔的作用						
成果項目		量化	單位	質化 (說明：各成果項目請附佐證資料或細項說明，如期刊名稱、年份、卷期、起訖頁數、證號...等)		
國內	學術性論文	期刊論文	1	篇	Intact subepidermal nerve fibers mediate mechanical hypersensitivity via the activation of protein kinase C gamma in spared nerve injury. Ko MH, Yang ML, Youn SC, Lan CT, Tseng TJ. Mol Pain. 2016 Jun 13;12.	
		研討會論文	0			
		專書	0	本		
		專書論文	0	章		
		技術報告	0	篇		
		其他	0	篇		
	智慧財產權及成果	專利權	發明專利	申請中	0	
				已獲得	0	
				新型/設計專利	0	
		商標權		0		
		營業秘密		0		
		積體電路電路布局權		0		
		著作權		0		
		品種權		0		
		其他		0		
技術移轉	件數		0	件		
	收入		0	千元		
國外	學術性論文	期刊論文	0	篇		
		研討會論文	0			
		專書	0	本		
		專書論文	0	章		
		技術報告	0	篇		
		其他	0	篇		
	智慧財產權及成果	專利權	發明專利	申請中	0	
				已獲得	0	
				新型/設計專利	0	
		商標權		0		
營業秘密		0				

		積體電路電路布局權	0		
		著作權	0		
		品種權	0		
		其他	0		
	技術移轉	件數	0	件	
		收入	0	千元	
參與計畫人力	本國籍	大專生	0	人次	
		碩士生	0		
		博士生	0		
		博士後研究員	0		
		專任助理	0		
	非本國籍	大專生	0		
		碩士生	0		
		博士生	0		
		博士後研究員	0		
		專任助理	0		
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。)					

科技部補助專題研究計畫成果自評表

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（簡要敘述成果是否具有政策應用參考價值及具影響公共利益之重大發現）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（請於其他欄註明專利及技轉之證號、合約、申請及洽談等詳細資訊）

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200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）

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藉由梅克爾氏細胞和梅克爾神經末梢形成默克爾細胞神經突複合物來說明。證據表明常規的蛋白激酶C可能在疼痛調節中發揮重要作用。因此，在此研究中說明蛋白激酶C α 在梅克爾氏細胞內的調節與神經病變性疼痛症狀的關係。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。

4. 主要發現

本研究具有政策應用參考價值： 否 是，建議提供機關

（勾選「是」者，請列舉建議可提供施政參考之業務主管機關）

本研究具影響公共利益之重大發現： 否 是

說明：（以150字為限）