

行政院國家科學委員會專題研究計畫 期末報告

抗氧化處理對糖尿病大鼠逼尿肌收縮及肌動蛋白調控蛋白
表現之保護效應(第3年)

計畫類別：個別型
計畫編號：NSC 98-2320-B-040-008-MY3
執行期間：100年08月01日至102年07月31日
執行單位：中山醫學大學醫學系生理學科

計畫主持人：廖娟妙
共同主持人：林則彬、陳凌雲
計畫參與人員：此計畫無其他參與人員

公開資訊：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

中華民國 102年11月17日

中文摘要：糖尿病膀胱功能異常 (diabetic bladder dysfunction, DBD) 是最困擾糖尿病 (DM) 病患的問題之一，有相關研究指出 DBD 的致病機轉之一可能與氧化壓力有關，因此本實驗的目的主要探討在動物的足三里穴位 (Zusanli acupoint) 進行電針刺激 (electroacupuncture, Ea) 以及餵食綠茶兒茶素 (catechins) 處理，觀察對 streptozotocin (STZ)-誘發 DBD 的影響。將實驗動物分成控制組 (未注射 STZ, 穴位進針但不通電刺激, 不餵食綠茶素)、DM 動物組、糖尿病-電針 (DM-Ea 處理) 及糖尿病-餵食綠茶素 (DM-GTP) 四組。從動物注射 STZ 後第 3 天確定糖尿病誘導成功，每天分別以管餵方式餵食綠茶素或足三里施予電針處理 30 分鐘，實驗處理 4 週後，每組各取 8 隻動物，應用膀胱壓力描記術 (cystometry) 記錄動物的尿路動力參數 (urodynamic parameters)；膀胱肌束等長收縮 (isometric contraction) 測量；西方點墨轉漬法測量膀胱肌動蛋白細絲相關蛋白 (Calponin、Tropomyosin) 及 nitrotyrosine 蛋白的表現量。結果發現在實驗處理四週後，DM 組、DM-Ea 或 DM-GTP 處理等動物的膀胱重量、攝食量、飲水量、排尿量 (voiding volume) 及膀胱容量 (bladder capacity) 都比控制組顯著增加，電針處理可使動物的最大排尿壓 (Peak voiding pressure; PVP) 以及排尿間期 (inter-contraction intervals; ICI) 比 DM 組顯著減小。但不論 PVP 及 ICI 的表現；Calponin、Tropomyosin 及硝基酪氨酸 (nitrotyrosin) 蛋白的表現量或膀胱肌束等長收縮的張力測定，在綠茶素餵食處理的動物組則未見任何顯著變化或改善。結果顯示：長期持續在足三里穴進行電針處理，相對於管餵綠茶素而言，可部份改善或緩解 DBD 的症狀，期望藉由本實驗能對為 DBD 所苦的病患提供有效的替代療法。

中文關鍵詞：糖尿病膀胱功能異常、電針刺激、綠茶兒茶素、細絲相關蛋白、硝基酪氨酸

英文摘要：

英文關鍵詞：

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫 成果報告
 期末報告

抗氧化處理對糖尿病大鼠逼尿肌收縮及肌動蛋白調控蛋白表現
之保護效應

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 98-2320-B-040-008-MY3

執行期間：98年08月01日至 101年07月31日

計畫主持人：廖娟妙

共同主持人：林則彬、陳凌雲

計畫參與人員：

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)：精簡報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

- 赴國外出差或研習心得報告一份
- 赴大陸地區出差或研習心得報告一份
- 出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
- 國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年 二年後可公開查詢

執行單位：中山醫學大學

中 華 民 國 102 年 10 月 31 日

目錄：

封面	page 1
中文摘要	page 3
英文摘要	page 4
報告內容	page 5~12
一、計劃背景與目的	
二、研究方法	
三、實驗結果	
四、計劃成果自評	
參考文獻	page 13~14

中文摘要：

關鍵字：糖尿病膀胱功能異常、電針刺激、綠茶兒茶素、細絲相關蛋白、硝基酪氨酸

糖尿病膀胱功能異常 (diabetic bladder dysfunction, DBD) 是最困擾糖尿病 (DM) 病患的問題之一，有相關研究指出DBD 的致病機轉之一可能與氧化壓力有關，因此本實驗的目的主要探討在動物的足三里穴位(Zusanli acupoint) 進行電針刺激 (electroacupuncture, Ea) 以及餵食綠茶兒茶素 (catechins) 處理，觀察對 streptozotocin (STZ)-誘發DBD 的影響。將實驗動物分成控制組 (未注射STZ，穴位進針但不通電刺激，不餵食綠茶素)、DM 動物組、糖尿病-電針(DM-Ea處理)及糖尿病-餵食綠茶素(DM-GTP) 四組。從動物注射 STZ 後第3天確定糖尿病誘導成功，每天分別以管餵方式餵食綠茶素或足三里施予電針處理 30分鐘，實驗處理 4 週後，每組各取 8 隻動物，應用膀胱壓力描記術 (cystometry) 記錄動物的尿路動力參數 (urodynamic parameters)；膀胱肌束等長收縮(isometric contraction)測量；西方點墨轉漬法測量膀胱肌動蛋白細絲相關蛋白(Calponin、Tropomyosin) 及nitrotyrosine 蛋白的表現量。結果發現在實驗處理四週後，DM組、DM-Ea 或 DM-GTP處理等動物的膀胱重量、攝食量、飲水量、排尿量(voiding volume)及膀胱容量 (bladder capacity) 都比控制組顯著增加，電針處理可使動物的最大排尿壓(Peak voiding pressure; PVP) 以及排尿間期 (inter-contraction intervals; ICI) 比 DM 組顯著減小。但不論PVP 及 ICI 的表現；Calponin、Tropomyosin 及硝基酪氨酸(nitrotyrosin)蛋白的表現量或膀胱肌束等長收縮的張力測定，在綠茶素餵食處理的動物組則未見任何顯著變化或改善。結果顯示：長期持續在足三里穴進行電針處理，相對於管餵綠茶素而言，可部份改善或緩解 DBD 的症狀，期望藉由本實驗能對為 DBD 所苦的病患提供有效的替代療法。

英文摘要：

Key words: Diabetic bladder dysfunction, electroacupuncture, green tea polyphenols, nitrotyrosine

Diabetic bladder dysfunction (DBD) is a most common complication of diabetes mellitus (DM), and is seen in 50-80% of diabetic patients. The mechanism involved is still under debate and treatment options are limited. Recently many studies implicated that oxidative stress contributes to the pathophysiology of many diseases, and suggested that the oxidative damage of detrusor muscle cells may be a contributory factor in DBD. The purpose of this study is to investigate whether Ea treatment and green tea polyphenols (GTP) administration could increase the antioxidant capabilities or protective effects in streptozotocin (STZ) induced diabetic rats with DBD. Female Sprague-Dawley rats are dosed with STZ (65 mg/kg) or vehicle and divided into four groups containing 8 animals each: Control (with needling at Zusanli without electroacupuncture stimulation), STZ-induced DM, DM-Ea (Ea is applied to bilateral Zusanli for 30 min every day following the induction of DM) and DM with GTP oral administration (400 mg/kg/day) groups. Four weeks after treatment, functional changes are assessed by cystometry and the bladder was then removed for oxidative status (the levels of nitrotyrosine), isometric contractile and molecular studies. The levels of expression of the actin regulatory protein expression are determined by Western blotting.

Results showed that bladder weight, voiding volume, and bladder capacity increased in the non-Ea, GTP treated and Ea-treated DM and groups. Peak voiding pressure (PVP) and the intercontraction interval (ICI) increased in the non-Ea-DM and GTP treated groups. However, in 4 wk Ea-treated DM groups, PVP and ICI were showed no significantly different compared with the sham-treated control group. Similar changes in the expression of the nitrotyrosine, CaP and Tm protein levels were seen in the 4wk Ea-treated but not the GTP treated groups. Results suggested that Ea at Zusanli acupoints more than the GTP administration should be considered as alternative methods for improving hyperglycemic oxidative stress induced by STZ in rats. We hope such a therapeutic technique has potential in clinical practice.

一 計畫背景及目的

近年來由於社會型態變遷、生活富裕、習慣改變及肥胖人口增多，糖尿病 (Diabetes mellitus, DM) 的盛行率逐年增加，預估到了 2025 年，全球罹患 DM 的人口將達三億 (Amos et al., 1997; Boyle et al, 2001)。在許多 DM 引發的慢性疾病中，至少有 50% 以上的病人深受糖尿病膀胱病變症狀所苦，糖尿病膀胱病變的典型的症狀包括膀胱感覺受損 (impaired sensation)、排尿速率減低、膀胱過動 (detrusor overactivity)、頻尿 (urinary frequency)、逼尿肌收縮障礙 (impaired detrusor contractility)、產生大量殘留尿量 (urinary retention)、尿路感染 (urinary tract infection) 及容易引發膀胱癌 (Frimodt- Moller, 1978; Yoshimura et al., 2005; Rosen et al, 2008)。儘管 DM 膀胱病變的發生率這麼普遍，但目前對糖尿病如何引發膀胱功能障礙的機轉仍未完全釐清，也尚無適當的治療對策可以減輕或根治病人的不適。

有愈來愈多的研究針對氧化壓力與膀胱疾病產生的相關性產生興趣，猜測氧化壓力在糖尿病膀胱病變的致病過程應扮演關鍵角色。Yu 等人發現，在過度脹滿 (over distension) 膀胱組織中，ROS 的表現量增加，對膀胱排尿功能產生不良影響 (Yu et al., 2003)； Bashay 和 Carrier 首度提出氧化傷害應是糖尿病膀胱病變的重要原因之一：在糖尿病鼠膀胱組織中發現，平滑肌中清除自由基的 Catalase-like activity 明顯降低，thiobarbituric acid reactive substances (脂質產生過氧化的生物標記物) 的濃度顯著增加 (2004)；另有研究發現，一氧化氮合成酶 (nitric oxidative synthase; NOS) 及 superoxide anion 在糖尿病小鼠膀胱平滑肌及上皮組織中的表現量顯著增加，其且可以活化 oxidant-related stress 訊息傳遞路徑 (Poladia 及 Bauer, 2005)。由以上與糖尿病相關的研究顯示，組織長期處於高血糖環境，大量累積的活性氧物質與自由基所造成的氧化緊迫現象，可能在 DM 患者膀胱病變的發展過程扮演重要的角色 (Seghrouchni et al., 2002)。因此我們推測，如果可以提升糖尿病患者體內抗氧化能力，應能改善氧化壓力所帶來的損傷與併發症之發生。

目前臨床上對糖尿病膀胱病變的治療策略，除了胰島素的補充、口服降血糖藥、配合運動及飲食控制、定時排尿訓練外通常就只能往舒緩症狀方向處理，所以可輔助血糖控制、經濟及可降低併發症發生機率的有效治療方針或另類輔助療法已刻不容緩。是故針灸等傳統療法日漸受到重視，本計劃在第一年的實驗結果發現在足三里 (Zusanli acupoints, ST36) 穴位每天進行電針刺激連續三個星期後，可以降低糖尿病膀胱組織肌動蛋白絲相關蛋白的過度表現，對排尿功能似乎產生改善效果，但尚未發現有明顯的降血糖效應。

另外，在不同的動物模式所進行電針試驗結果發現，動物的腦組織在腦血管缺血/再灌流後易因 ROS 的累積而產生神經毒性，應用電針刺激處理 30 分鐘後，發現腦水腫的現象減緩，並且可以降低 lipid peroxidation 的發生 (Zhao et al., 2000)，Siu 等人在相同物模式的足三里穴施行 30 分鐘的電針刺激，可有效增加 thioredoxin (具抗

氧化能力，能清除 hydrogen peroxide 及 hydroxyl radicals) 的表現量，減少氧化壓力對腦組織的傷害 (2005)。由腦中風的動物模式的實驗，我們很有興趣的發現，電針處理可以透過活化體內的抗氧化系統來產生療效。而上述糖尿病動物經足三里穴位的電針處理的相關研究，大多着重於血糖的調控、胰島素敏感度或醣類代謝的影響。至於電針刺激足三里穴的效應，是否是藉由提升糖尿病患者的抗氧化潛能，減低氧化損傷進而改善糖尿病膀胱病變的症狀，目前則還沒有相關研究可以證實，需更進一步實驗探討。

有許多研究證實綠茶多酚可增加 DM 大鼠體內 superoxide dismutase 和 glutathione 的濃度、同時可降低血糖及加強葡萄糖耐受能力 (Igarashi et al., 2007; Wolfram et al., 2006)，由第二型 DM 的 Goto-Kakizaki 大鼠的試驗，也發現綠茶兒茶素可顯著降低 DNA 的氧化傷害，葡萄糖耐受能力也獲得改善 (Igarashi et al., 2007)。Chen 等人也指出，實驗動物預先以綠茶兒茶素餵食兩週，藉由兒茶素的抗氧化能力可顯著改善 Substance-P 誘發的神經發炎及膀胱過動現象 (2004)，在培養的膀胱平滑肌細胞加入過氧化氫藉以誘發氧緊迫的實驗也證明，細胞受 superoxide 攻擊產生凋亡的數量也因兒茶素的保護而降低 (Coyle et al., 2008)。以上研究顯示兒茶素確實具有很強的抗氧化的潛能，也對 DM 的氧化壓力及提升葡萄糖耐受能力有明顯改善效果，但至目前尚未有研究直接去探討綠茶兒茶素與 DM 動物或病人膀胱病變的相關性，是否藉由兒茶素抗氧化的能力，改善氧化壓力所帶來的損傷與減緩併發症的發生？

因此本實驗擬藉由兒茶素提升糖尿病動物的葡萄糖耐受力及抗氧化能力，探討是否能改善高血糖的氧化壓力對膀胱組織所帶來的損傷與減緩併發症的發生？又如果對糖尿病動物同時進行足三里穴的電針及飲用兒茶素雙管齊下的抗氧防護處理，是否在抗氧化的效應或改善膀胱收縮的程度能有更好的功效呢？這是本計劃另一個研究重點，期能為糖尿病膀胱病變所苦的病患提供更有效的替代療法。

二 研究方法：

1. 動物處理

(1). 建立 STZ-糖尿病模式：

本實驗採用雌性 Wistar 大白鼠 (體重 180~220 公克)，大白鼠先禁食 24 小時，於腹腔注射 streptozotocin (STZ, 65 mg/kg 溶於 0.1M citrate buffer, pH 4.5)，3 日後抽血糖檢測，血糖大於 300 mg/dl 才確定誘發糖尿病成功 (Daneshgari et al., 2006)，即可進行實驗。

(2). 動物固定及電針方法：

刺激穴位參照中國傳統的針灸圖譜，以解剖學的相對位置在動物體上加以定位。足三里穴位於下肢膝下脛骨的上緣，其定位採同身寸法，將外膝眼至外踝分成 16 等分，於上 3/16 位置，以一支焊接於電線的皮下針插入刺激點，深度約 3 mm，另一支

相同的針則插入對側足三里穴處作為正極，電流則以刺激器 (Grass, S88) 輸出通至絕緣器 (Grass, SIU5B) 再以穩流器 (Grass, CCU1A) 輸出至動物體。刺激強度 0.5 mA (選用閹下刺激強度，即不會引起明顯肌肉抽動或動物發出聲音，儘量模擬臨床上可能應用的強度)，刺激頻率 100 Hz (Almeida and Duarte, 2008)，刺激時間為 30 分鐘，每天於固定時間刺激一次。

(3) 餵食綠茶萃取物方法：

綠茶萃取物由日本的太陽化學株式會社購得；製造地是大陸無錫綠寶生物製品有限公司製造。經過處理的綠茶萃取物內含 98.24 % 多酚，多酚內含 84.93 % 兒茶素，兒茶素中含 53.61 % 的 EGCG；另外經過處理的綠茶萃取物，降低了咖啡因的含量 (只含有 0.89% 咖啡因)，可降低咖啡引起的中樞神經系統興奮作用。餵食劑量分別為 100、200 及 400mg/kg，自誘導糖尿病 3 天後開始每天餵食。

2. 血糖耐受測試 (Glucose tolerance test)：

實驗鼠經禁食 18 小時後進行血糖耐受試驗，以管灌方式經口給予實驗鼠葡萄糖 (2 g/kg BW)，分別在給予葡萄糖前及後的 0、30、90、120 分鐘，在尾巴靜脈採血，並以簡易血糖機 (Roche, Germany) 測定血糖值。

3. 膀胱壓力描記術 (cystometry)：

在動物進行膀胱功能測定前先行麻醉。腹腔注射長效型麻醉劑尿胺 (urethane) (i.p., 1.2 g/Kg)，動物麻醉後進行氣管插管以維持氣暢通，進行股靜脈插管以利麻醉劑的補充或藥物處理。將大白鼠腹腔沿腹中線切開暴露出膀胱，將兩側輸尿管剪斷，靠膀胱端以線紮緊，近腎臟端自由引流。切開膀胱頂後在切口置入尿道插管 (PE50 管)，一端留在尿道內，另一端穿出尿道出口後以縫線固定，尿道插管接至流速儀 (Transonic, T110R) 記錄尿液排出的流速。取一膀胱插管 (PE50 管)，一端由膀胱頂切口進入膀胱後以線固定之，插管另一端接有三插管，分別連接到壓力轉換器 (P23 ID; Gould-Statham, U.S.A.) 及灌流幫浦 (infors CH-043)，透過前置放大器 (Grass 7P1, Cleveland, OH, U.S.A.) 多功能記錄器 (Biopac, MP35, Santa Babra, U.S.A.) 將膀胱內壓 (intravesicular pressure) 變化的訊號記錄到電腦上。手術後讓膀胱排空並穩定 10 分鐘後，由灌流幫浦以 6ml/hr 的速度經膀胱插管灌流生理食鹽水到膀胱，等膀胱出現排尿週期 (micturition cycles) 後紀錄膀胱容量 (bladder capacity)、膀胱順應性 (bladder compliance) 及最大排尿壓 (Peak voiding pressure) (Daneshgari et al., 2006)。

3. 逼尿肌肌束 (detrusor muscle strip) 收縮功能測量：

動物經麻醉後，迅速取下膀胱，垂直剪開膀胱體，剪成 3x10mm 的肌束，將肌束一端固定於力量轉換器，另一端固定於組織支持架的掛鉤，置於內含 10ml Krebs 溶液的組織容器 (organ bath) 內，連續通以 95% O₂ 及 5% CO₂ 混合氣，水溫維持在 37°C。利用微調器將肌束調整至被動張力為 2 g，平衡穩定 60 分鐘後開始進行以下實驗：(1) 電刺激 (field stimulation)：預先在肌束兩端固定白金電極，由刺激器 (Grass

S88 field stimulator) 發出刺激頻率分別為 2、8 及 32 Hz 之刺激 (80V, 1 ms), 每次刺激時間為 20 秒, 刺激之間的時間間隔為 3 分鐘; (2) 20 μ M Carbachol (蕁鹼型受體致活劑) 測試肌束的收縮張力; (3) 120 mM KCl 測試肌束的收縮力, 不同藥物處理前, 需以新鮮 Krebs 溶液清洗至少三次。

4. 肌動蛋白調控蛋白 Tropomyosin、Caldesmon 及 Calponin 表現量測量

組織以含 urea 之均質液均質 (在冰浴中進行) 後, 以 14000 rpm 離心 30 分鐘後 (4 $^{\circ}$ C), 均質液煮沸 8 分鐘以利蛋白質的變性展開 (denature) 後, 以 10000 rpm 離心 20 分鐘, 取上清液以 Bio-Rad protein assay 染劑 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) 結合定量法進行蛋白質定量分析。取含 20 μ g 蛋白質量的上清液以 12% 聚醯胺 (polyacrylamide) 電泳膠片的凹槽中分離後, 再將膠片上之蛋白質轉印 (transfer) 至 PVDF (polyvinylidene difluoride membrane, PerkinElmer Life Sciences, INC), 轉印結束後以阻斷緩衝液 (5% non-fat milk in 0.05% Tween 20 in TBS buffer) 在室溫下進行 45 分鐘, 接著使用不同的初級抗體偵測上述蛋白。

5. 氧化生化指標(Nitrotyrosine)測量

蛋白質受到各種型式的 ROS 攻擊而產生羧化作用 (carbonylation) 後的產物, 常被引用為細胞氧化傷害的生物指標; 而 nitrotyrosin 則常被用來代表蛋白質受到 reactive nitrogen species (RNS) 自由基攻擊的指標。

各組動物之膀胱以 100mg/ml 的比例加入含有蛋白質水解酶抑制劑之組織均質液 (50mM Tris, pH 7.5, 5% Tiron), 將檢體均質化 (在冰浴中進行) 後, 加入 SDS (最終濃度 1%), 均質液煮沸 4 分鐘以利蛋白質的變性展開 (denature) 後, 以 10000 rpm 離心 20 分鐘 (4 $^{\circ}$ C), 取上清液以 Bio-Rad protein assay 染劑 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) 結合定量法進行蛋白質定量分析。取含 20 μ g 蛋白質量的上清液以 12% 聚醯胺 (polyacrylamide) 電泳膠片的凹槽中分離後, 再將膠片上之蛋白質轉印 (transfer) 至 PVDF (polyvinylidene difluoride membrane, PerkinElmer Life Sciences, INC), 轉印結束後以阻斷緩衝液 (5% non-fat milk in 0.05% Tween 20 in TBS buffer) 在 37 $^{\circ}$ C 下進行 45 分鐘, 接著使用不同的初級抗體偵測下列蛋白 (代表氧化壓力的指標; oxidative stress makers):

偵測 Nitrotyrosine 的膜在 blocking 結束後, 接著使用稀釋 1000 倍 anti-nitrotyrosine 初級抗體在 4 $^{\circ}$ C 下進行隔夜震盪反應, 再使用稀釋 5000 倍的二級抗體 (anti-mouse peroxidase-labeled antibody; Senta Cruz) 進行 4 $^{\circ}$ C 下 1 小時的震盪反應。最後使用 ECL reagents (PerkinElmer Life Sciences, INC) 與 PVDF membrane 反應, 以冷光影像分析儀 (Fujifilm USA Inc, LAS-3000) 分析 band 的強度 (Juan et al., 2008)。

6. 數據統計: 實驗數據統計採用 Student's t-test 檢測各組間的差異, P 值小於 0.05 者視為有顯著差異。

三、實驗結果

Fig 1: 將動物置入代謝籠中，觀察餵食綠茶萃取物對糖尿病大鼠飲水量(A)、攝食量(B)及排尿量(C)的影響。綠茶萃取物的處理劑量分別為100mg/kg BW (GT100)、200mg/kg BW (GT200) 及400mg/kg BW (GT400)，糖尿病(DM)鼠的飲水量(A)、攝食量(B)及排尿量(C)皆顯著比控制組增加 ($P < 0.05$)，高劑量的綠茶萃取物(GT400)使飲水量及排尿量稍有降低，但未達顯著效果。

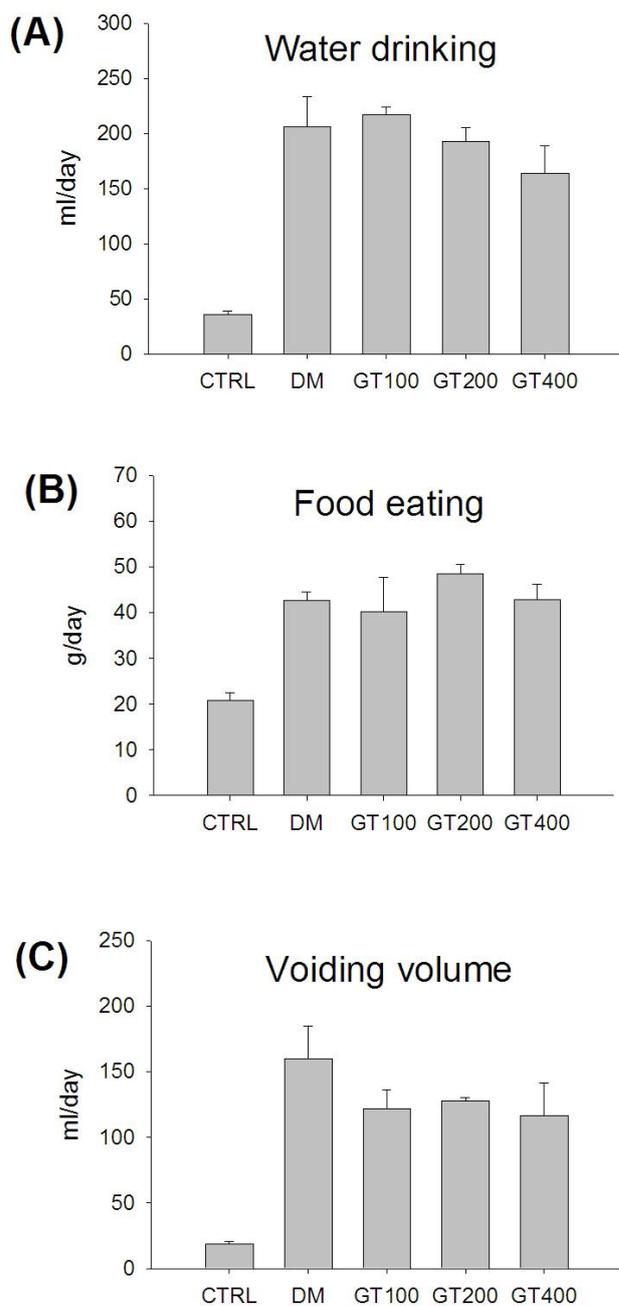


Fig 2: 將實驗鼠經禁食 18 小時後進行血糖耐受試驗(Glucose tolerance test)，以管灌方式經口給予實驗鼠葡萄糖 (2 g/kg BW)，分別在給予葡萄糖前及後的 0、30、90、120、180 分鐘，由尾巴靜脈採血，並以簡易血糖機 (Roche, Germany) 測定血糖值。(A) 圖為糖尿病(DM)鼠以電針處理四週後(Ea4W)後；(B) 圖為糖尿病(DM)鼠連續餵食綠茶萃取物四週後(GT400)後，分別進行血糖耐受試驗，結果發現電針處理或餵食高濃度綠茶萃取物的處理和糖尿病(DM)鼠未處理組之間並未呈現顯著差異。

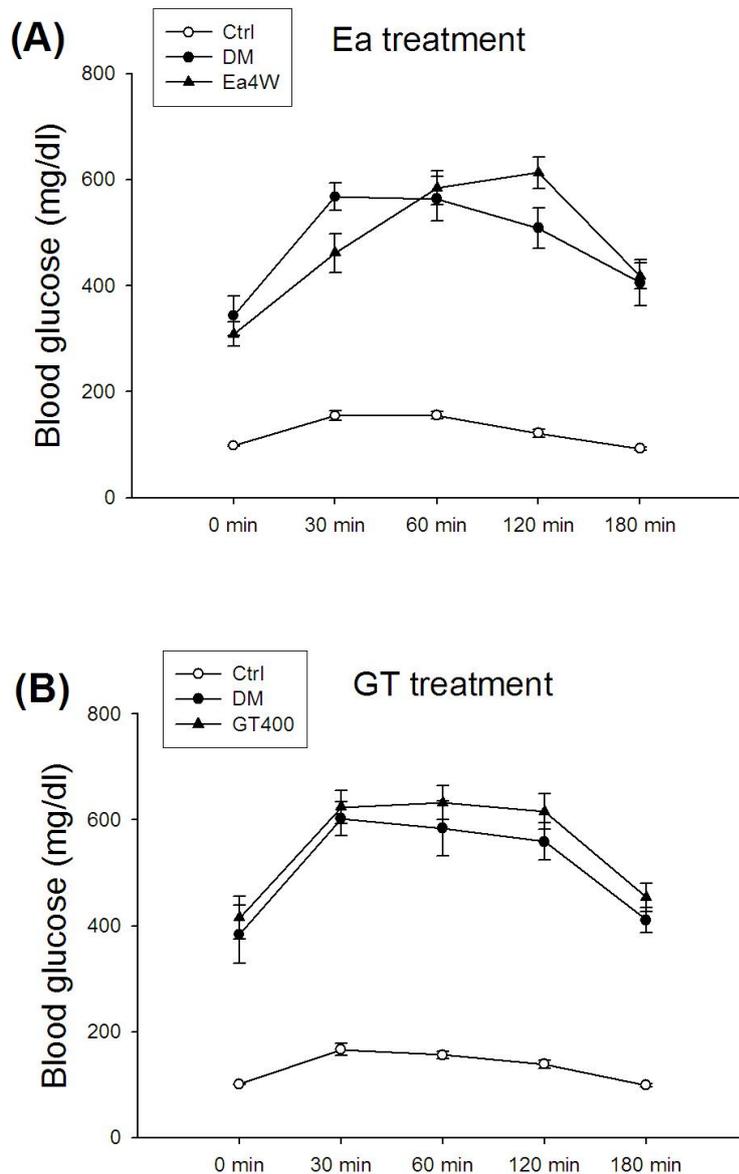


Fig 3: 觀察餵食綠茶萃取物對糖尿病大鼠膀胱收縮相關性蛋白 Tropomyosin (A)、Calponin (B) 及氧化指標蛋白 nitrotyrosine (C) 等蛋白表現量的影響。綠茶萃取物的處理劑量分別為 100mg/kg BW (GT100)、200mg/kg BW (GT200) 及 400mg/kg BW (GT400)，結果發現糖尿病(DM)鼠的 Calponin(B) 及 nitrotyrosine(C)的表現量皆顯著比控制組增加 ($P<0.05$)，高劑量的綠茶萃取物(GT400)使 Calponin 及 nitrotyrosine 的表現量稍有降低，但未達顯著效果。

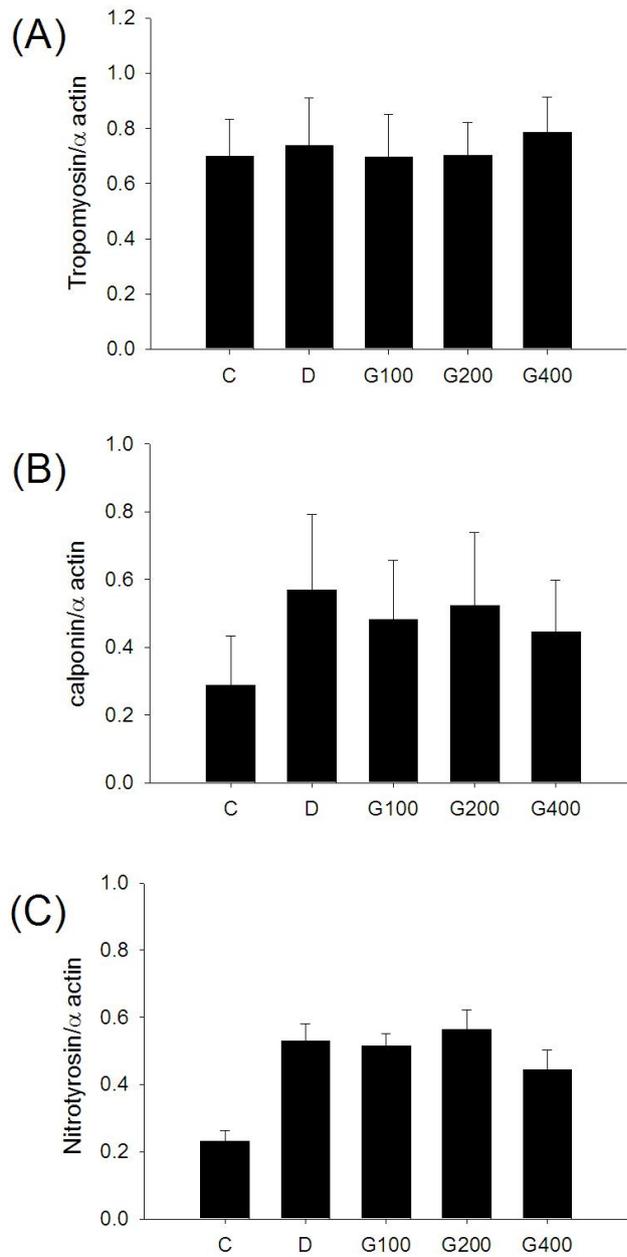
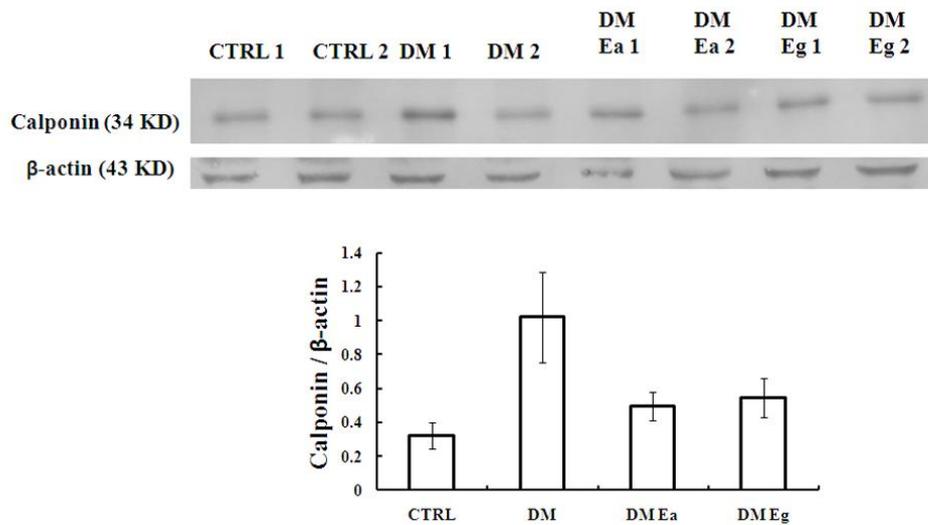


Fig 4：糖尿病大鼠 (DM 組, n=6) 膀胱逼尿肌中，Calponin 的蛋白表現量顯著增高；DM+電針處理 (DMEa 組, n=5)，在足三里穴連續電針處理四週後，發現 Calponin 的表現量有顯著回復趨勢；Calponin 的表現量在 DM+綠茶萃取物組 (DMEg 組, n=8) 也有類似電針處理的效應一樣，有明顯回復的現象。但此種結果並未在單獨餵食綠茶萃取物的動物組中呈現。



四、計畫成果自評

本計畫成果：

1. 在大鼠雙側的足三里穴位進行連續四週的電針刺激，可明顯降低糖尿病鼠的排尿的壓力閾值、最大排尿壓、排尿頻率及排尿間期，但並未完全恢復至控制組的狀態。
2. 電針處理可以明顯改善肌動蛋白絲調控蛋白 Tropomyosin (Tm) 及 Calponin (Cap) 在糖尿病動物膀胱逼尿肌細胞中過度表現 (overexpression) 的現象。
3. 高濃度綠茶萃取物的餵食處理在本實驗雖然都呈現改善攝食量、排尿量及氧化壓力的趨勢，但仍未達顯著差異。

由上述結果顯示，長期在動物雙側的足三里穴位進行連續三週以上時間的電針刺激，顯然比單獨餵食綠茶萃取物更可緩解或改善糖尿病引發的膀胱病變的一些症狀。

參考文獻

- Almeida, R.T. and Duarte, I.D.G. Nitric oxide/cGMP pathway mediates orofacial antinociception induced by electroacupuncture at the St36 acupoint. *Brain research* 188: 54-60, 2008.
- Amos AF, McCarty DJ, Zimmet P. The rising global burden of DM and its complications: Estimates and projections to the year 2010. *Diabet Med* 1997;14:S1–S85.
- Beshay E and Carrier S. Oxidative stress plays a role in diabetes-induced bladder dysfunction in a rat model. *Urology* 64: 1062-1067, 2004.
- Boyle JP, Honeycutt AA, Narayan KM. Projection of DM burden through 2050: Impact of changing demography and disease prevalence in the U.S. *DM care.* 24:1936-40, 2001.
- Chen W-C, Hayakawa S, Shimizu K., Chien C-T, Lai M-K. Catechins prevents substance P-induced hyperactive bladder in rats via the downregulation of ICAM and ROS. *Neurosci Let* 367: 213-217, 2004.
- Coyle CH, Philip BJ, Morrisroe SN, Chancellor MB, Yoshimura N. Antioxidant effects of green tea and its polyphenols on bladder cells. *Life Sci* 83: 12-18, 2008.
- Daneshgari F, Liu G. and Imrey PB. Time Dependent changes in diabetic cystopathy in rats include compensated and decompensated bladder function. *J. Urol.* 176: 380-386, 2006.
- Frimodt-Moller C. Diabetic cystopathy. A review of the urodynamic and clinical features of neurogenic bladder dysfunction in DM mellitus. *Dan Med Bull* 25:49–60, 1978.
- Igarashi K, Honma K, Yoshinari O, Nanjo and Hara Y. Effects of dietary catechins on glucose tolerance, blood pressure and oxidative status in Goto-Kakizaki rats. *J Nutr Sci Vitaminol.* 53: 496-500, 2007.
- Juan Y-S, Mannikarottu A, Schuler C, Lin W-Y, Huang C-H, Levin RM. The immediate effect of nitric oxide on the rabbit bladder after ovariectomy. *Nitric Oxide* 19: 289-294, 2008.
- Poladia DP and Bauer JA. Functional, structural, and neuronal alterations in urinary bladder during diabetes: investigations of a mouse model. *Pharmacology* 74:84-94, 2005.
- Rosen DA, Hung C-S, Kline KA and Hultgren SJ. Streptoxocin-induced diabetic mouse model of urinary tract infection. *Infection and Immunity* 76(9): 4290-4298, 2008.

- Seghrouchni I, Draï J, Bannier E, Rivière J, Calmard P, Garcia I, Orgiazzi J, Revol A. Oxidative stress parameters in type I, type II and insulin-treated type 2 diabetes mellitus; insulin treatment efficiency. *Clin. Chim. Acta.* 321:89 – 96, 2002.
- Siu Fkw, Lo SCL, Leung MCP. Electro-acupuncture potentiates the disulphide-reducing activities of thioredoxin system by increasing thioredoxin expression in ischemia-reperfused rat brains. *Life Sciences* 77: 386-399, 2005.
- Wolfram S, Raderstruff D, Preller M, Wang Y, Teixeira SR, Riegger C, Weber P. Epigallocatechin gallate supplementation alleviates diabetes in rodents. *Nutr* 136: 2512-2518, 2006.
- Yoshimura N, Chancellor MB, Andersson KE, et al. Recent advances in understanding the biology of DM-associated bladder complications and novel therapy. *BJU Int* 95:733–8,2005.
- Yu H-J, Chien C-T, Lai Y-J, Lai M-K, Chen C-F, Levin RM, and Hsu S-M. Hypoxia preconditioning attenuates bladder overdistension-induced oxidative injury by up-regulation of Bcl-2 in the rat. *J Physiol.* 554(3): 815-828, 2003.
- Zhao P, Huang Z, Cheng J. Electro-acupuncture attenuates nitric oxide release from rat striatum after transient middle cerebral artery occlusion *Acupuncture and Electro-Therapeutic Research* 25: 101-107, 2000.

國科會補助計畫衍生研發成果推廣資料表

日期:2013/11/08

國科會補助計畫	計畫名稱: 抗氧化處理對糖尿病大鼠逼尿肌收縮及肌動蛋白調控蛋白表現之保護效應
	計畫主持人: 廖娟妙
	計畫編號: 98-2320-B-040-008-MY3 學門領域: 中醫藥
無研發成果推廣資料	

98 年度專題研究計畫研究成果彙整表

計畫主持人：廖娟妙		計畫編號：98-2320-B-040-008-MY3				計畫名稱：抗氧化處理對糖尿病大鼠逼尿肌收縮及肌動蛋白調控蛋白表現之保護效應	
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	3	3	80%		
		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	1	1	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	

國科會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：

獲得結果與預期目標不符，仍需進一步檢討改進。

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）

本研究結果顯示：長期持續在足三里穴進行電針處理，相對於管餵綠茶萃取物而言，更可部份改善或緩解糖尿病膀胱功能異常（diabetic bladder dysfunction, DBD）的症狀，期望藉由本實驗能對為 DBD 所苦的病患提供有效的替代療法。