

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

電針刺激對糖尿病鼠膀胱平滑肌收縮蛋白表現及收縮機轉
之影響

研究成果報告(精簡版)

計畫類別：個別型
計畫編號：NSC 97-2320-B-040-004-
執行期間：97年08月01日至98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
計畫參與人員：此計畫無其他參與人員

處理方式：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 98 年 12 月 31 日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫 成果報告
 期中進度報告

電針刺激對糖尿病鼠膀胱平滑肌收縮蛋白表現及收縮機轉之影響

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫
計畫編號：NSC 97-2320-B-040-004
執行期間：97 年 08 月 01 日至 98 年 07 月 31 日

計畫主持人：廖娟妙
共同主持人：林則彬
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：中山醫學大學生理科

中 華 民 國 98 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 5~9
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	
圖解	page 10
圖	page 11-15
參考文獻	page 16

中文摘要：

關鍵字：糖尿病膀胱功能異常、足三里穴、電針刺激、膀胱壓力描記術、細絲相關蛋白

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，但目前對DBD 的致病機轉仍所知有限，也仍缺乏適當治療方法。因此本實驗的目的主要探討長期在動物的足三里穴位(Zusanli acupoint) 進行電針刺激 (electroacupuncture, Ea)，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)、STZ-DM 動物組及STZ-DM-Ea 處理三組，誘發 DM 7天後，每天在 STZ-DM-Ea 動物兩側足三里穴進行電針刺激 (100 Hz, 0.5mA, 1.5- 2ms) 30 分鐘。在針刺治療分別進行第 1, 3, 5 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)，以比較給予重複性電針療法的效應。最後取下膀胱組織以半定量反轉錄酶聚合酶連鎖反應及西方點墨轉漬法測量膀胱組織肌動蛋白細絲相關蛋白 Calponin、Tropomyosin 及 actin 在基因及蛋白層次表現量的變化，以期對DM 造成膀胱逼尿肌型態重組及功能異常的分子機制及電針產生療效的機轉有更進一步了解。結果發現不論糖尿病 (STZ-DM) 組或糖尿病-電針 (STZ-DM-Ea) 處理組的膀胱重量、排尿量 (voiding volume) 及膀胱容量 (bladder capacity) 都比控制組顯著增加，在電針處理 3 週及 5 週後，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，並且與控制組的數據無明顯差異；Calponin、Tropomyosin 及 actin 在基因及蛋白層次的表現趨勢，與上述 PVP 及 ICI 的表現類似。結果顯示長期持續在足三里穴進行電針處理，可部份改善或緩解 DBD 的症狀，期望藉由本實驗能對為 DBD 所苦的病患提供更有效的替代療法。

英文摘要：

Diabetic bladder dysfunction (DBD) is a most common complication of diabetes mellitus (DM). The mechanism involved is still under debate and effectively treated options are limited. This study examined the effect in bladder function following 1, 3, and 5 wk electroacupuncture (Ea) treated at Zusanli (ST-36) acupoints (100 Hz, 0.5mA, 1.5-2ms, under conscious condition, 30 min per day) of streptozotocin (STZ) induced-DM rats compared with that in age-matched non-Ea treated diabetic group, and shamed-treated control group. Urinary functional changes are assessed by cystometry and the bladder was then removed to examine expression of the actin regulatory proteins, calponin, tropomyosin and caldesmon at the mRNA and protein levels by reverse transcriptase- polymerase chain reaction and Western blotting, respectively. Results showed that bladder weight, voiding volume, and bladder capacity increased in both the non-Ea and Ea-treated DM groups. Peak voiding pressure (PVP) and the intercontraction interval (ICI) increased in the non-Ea- and 1wk Ea-treated DM groups. However, in 3 and 5wk Ea-treated DM groups, PVP and ICI decreased and showed no significantly different compared with the sham-treated control group. Similar changes in the expression of the actin regulatory proteins, calponin, tropomyosin and caldesmon at the mRNA and protein levels were seen in the 3 and 5wk Ea treated groups. Long-term Ea-treated at Zusanli acupoints effectively ameliorated a few functional changes in DBD. These results suggest that such a therapeutic technique has potential in clinical practice.

一 計畫背景及目的

糖尿病膀胱病變(Diabetic cystopathy) 介紹

可能因生活型態、飲食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2010年，全球罹患DM的人口將達兩億兩千一百萬(Amos et al., 1997)，許多DM引發的慢性併發症，如神經病變(neuropathy)、視網膜病變(retinopathy)及腎病(nephropathy)已被廣泛研究與熟知，雖然早在1935年也有人提出DM會產生尿路方面的問題，但對DM為何會發展成下泌尿道功能異常的病理機轉及因素的研究仍然有限。

糖尿病對膀胱平滑肌收縮功能之影響

目前已知糖尿病膀胱病變較典型的症狀為膀胱感覺受損(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)及產生大量殘留尿量等症狀(Frimodt-Moller, 1978, 1980; Goldman and Appell, 1999; Yoshimura et al., 2005; Hill et al., 2007)，有研究指出，動物膀胱出口部份阻塞，會因神經退化引起膀胱肥大及逼尿肌功能改變的現象，所以推測糖尿病所造成自主神經的病變，可能是影響逼尿肌收縮功能的主因(Martina et al., 2003)。Daneshgari等人藉由膀胱壓力描計術(cystometry)的方法對膀胱功能進行研究，進一步發現膀胱功能的變化乃視誘發糖尿病的時間長短而定，STZ-動物排尿之最大膀胱內壓(peak detrusor leak pressure)，在誘發後第3~9週(代償性膀胱階段, compensated bladder)會顯著增加，對KCl及carbamylcholine的反應也遠大於控制組；當誘發時間延長至第12~20週(非代償性膀胱階段, decompensated bladder)的結果卻逆轉回控制組的程度(2006)，上述反應各異的詳細機制仍不清楚，有待更進一步實驗探討。近來有不少研究專注於肌動蛋白絲相關蛋白(actin filament-associated proteins)，如Caldesmon(CaD)、Tropomyosin(Tm)及Calponin(CaP)對膀胱平滑肌收縮力的重要性，由alloxan-誘導糖尿病的模式發現，膀胱有增大及平滑肌細胞增生的現象，並且CaP、Tm及h-CaD(只有在平滑肌細胞才表現的異構物)及l-CaD(在非肌細胞中表現的異構物)等蛋白的表現量皆過度增加，顯示對actin-myosin相互作用的抑制作用增加，因而會影響肌肉的收縮力，Su等人的研究指出，儘管輕鏈肌凝蛋白(myosin light chain, MLC)磷酸化的程度增加，但糖尿病膀胱平滑肌的收縮力仍然降低，表示actin相關蛋白的過度表現是重要抑制因素(2004)；另外也發現培養的平滑肌細胞在沒有任何神經支配的情況下，給予高濃度的葡萄糖刺激，CaP、Tm及h-CaD蛋白的表現量也增加了，因而推測，高濃度的葡萄糖會直接影響細胞內對actin相關蛋白的基因調控(Mannikarottu et al., 2005)。

電針刺激的應用

位於下肢小腿外側的足三里穴常被用來治療糖尿病，有學者利用葡萄糖耐受試驗(glucose tolerance test)及胰島素挑戰測試(insulin challenge test)的方法來探討電針刺激對胰島素敏感度(insulin sensitivity)的相關性，以15Hz針刺兩側足三里穴各30及60分鐘，發現電針刺激可以使正常鼠及STZ-糖尿病鼠降血糖能力(hypoglycemic activity)顯著大於未刺激組，於是作者建議電針刺激應該是一個可以改善胰島素的敏

感度或增加胰島素-低血糖效果(insulin- hypoglycemic activity) 的替代療法(Chang et. al., 2006)。Tseng 等人利用自動微量血液收集器，隨時監測動物血中的葡萄糖，丙酮酸(pyruvate) 及乳酸(lactate) 在接受電針刺激後的動態變化：在動物的足三里穴位給予第一次2 Hz 的電針刺激30 分鐘，間隔90 分鐘後再重複一次刺激(2 Hz 或100 Hz)，結果發現血糖降低、乳酸增加及乳酸/葡萄糖的比值變大，推測電針刺激可以也可以透過促進細胞進行無氧葡萄糖代謝(anaerobic glucose metabolism) 的方式來降低血糖(Tseng et al., 2005)。另外，Chang 在2005 年的研究指出針刺足三里穴降血糖的效應不會完全被足量的naloxone (1mg/Kg,i.v.) 所阻斷，甚至在 μ -鴉片接受器缺乏小鼠(μ -opioid receptor knockout mice, MOR-KOM) 的足三里進行電針刺激，仍可引起顯著的降血糖效果，證實內生性鴉片胜肽在足三里穴的降血糖效應中不是扮演主要角色，血清素(serotonin) 的分泌或血中游離脂肪酸的降低，可能都是電針改善胰島素敏感度的原因，所以應該是多途徑的機轉調節針刺足三里穴的降血糖效應。綜合以上所述，糖尿病膀胱病變初期常因為症狀不明顯而被忽略而延誤處理，嚴重影響病患生活品質外也對醫療資源造成龐大負擔，尋求既可輔助血糖控制、經濟又沒有副作用的安全療法已是刻不容緩的課題。根據許多人體或動物的研究指出，在足三里進行針刺療法比中脘穴位產生更佳的降血糖效應，因此本研究選用足三里穴進行實驗，首先建立streptozotocin-誘發糖尿病鼠後，觀察給予重複性及長期電針療法的效應，期能對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：

實驗設計：

將動物分成三組：第一組為控制組(不誘發糖尿病)；第二組以Streptozotocin (STZ)-誘發大鼠產生第一型糖尿病模式；第三組為STZ-糖尿病模式動物+ 電針刺激處理，即從動物注射STZ 的第7天開始，每天在足三里穴位施予電針刺激，分別在注射後第1、3、5週，每組各取8隻動物麻醉手術進行膀胱功能測量，方法是應用膀胱壓力描記術(cystometry) 記錄動物的尿路動力參數(urodynamic parameters)，以監控於誘發糖尿病後的不同週數膀胱功能的變化。

實驗方法：

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, 稀釋於0.1M citrate buffer, pH 4.5)，7 日後抽血糖檢測，若大於350 mg/dl，則確定成功誘發糖尿病(Daneshgari et al., 2006)，即可進行實驗。

2. 動物固定及電針方法：

清醒動物先固定於壓克力老鼠固定器，使四肢暴露在外以供穴位刺激之用(Medeiros et al.,2003a,b)，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，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，刺激頻率100 Hz (Almeida and Duarte, 2008)，刺激時間為30 分鐘，每天於固定時刺激一次。

3. 動物麻醉：

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。

3. 膀胱壓力描記術(cystometry)：

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)，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水到膀胱，等膀胱排尿週期(micturition cycles) 穩定後，收集10 次排尿量及記錄至少10 次穩定排尿週期，並計算尿路動力參數(urodynamic parameters) 來觀察膀胱貯存及排尿功能：

膀胱容量(bladder capacity)：從開始灌流到第一次排尿的時間× 灌流速度

殘餘尿量(residual urine volume)：膀胱容量扣除排尿量

排尿閾值壓力(threshold pressure)：引發排尿收縮之膀胱壓

膀胱順應性(bladder compliance)：膀胱容量/(排尿閾值壓力-灌流前膀胱之基礎壓)

最大排尿壓(P eak voiding pressure)：膀胱收縮之最大壓力

排尿間期(inter-contraction intervals)：兩次排尿間期

其中膀胱容量、順應性及排尿閾值壓力數據可以反應出膀胱貯存尿液的能力，而平均排尿量、最大排尿壓及排尿後膀胱壓則代表膀胱的排尿功能(Daneshgari et al., 2006a)。

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

(1) 利用聚合酶連鎖反應 (semi-quantitative RT-PCR) 方法檢測基因表現

動物犧牲後取下一部份膀胱組織保存於 RNAlater 緩衝溶液中 (Genemark)，此緩衝溶液有抑制 RNase 的作用，減少組織中 RNA 降解。當組織放入溶液中後，先放置在 4°C 下 12-16 小時，之後再保存於-20°C，以備抽取 RNA 及進一步進行聚合酶連鎖反應；其餘組織則迅速置入液態氮中並保存於 -80°C，以備蛋白質電泳分析之用。RNA 萃取的方法主要是參考 Chomczynski (1993) 所發表的方法。已萃取之 RNA 利用洋菜膠體電泳 (Agarose Gel electrophoresis) 來分析 RNA 的完整性。洋菜膠體電泳以含 0.01% DEPC 水所稀釋的 0.5 倍 TAE 緩衝溶液 (Amresco)、agarose (MDBio)、及 ethidium bromide (1 mg/ml) (EtBr) 所配置成 0.8% 的洋菜膠體電泳。RNA 濃度測定，先取 2µl RNA 利用 0.1% DEPC 水稀釋至 100µl，混合均勻後，放入 0.1 ml 的石英管中，以分光光度計 (Hitachi

U-2001 spectrophotometer) 偵測波長 260 nm 所得到吸光值 (OD 值)。半定量反轉錄酶聚合酶連鎖反應的實驗原理是以相同濃度 RNA，經由反轉錄酶與 oligo(dT)₁₈ primer 的作用，使 mRNA 反轉錄成 cDNA，再以相同體積的 cDNA 做模板 (template) 與實驗中所設計之核酸引子 (primer) 進行 PCR 反應，反應完成利用 1.5% 洋菜膠體電泳 (Agarose Gel electrophoresis) 來分析 DNA 的表現。

(2) 測量蛋白質表現量 (protein assay)

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°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 µg 蛋白質量的上清液以 10% 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. 數據統計：實驗數據統計採用 Student's *t*-test 檢測各組間的差異，並選定 P 值小於 0.05 者視為有顯著差異。

三、實驗結果

1、排尿反射動力學參數

(1). 引發膀胱排尿的壓力閾值 (voiding threshold pressure ; TP) :

控制組與糖尿病組分別為 4.59 ± 0.27 cmH₂O 與 7.36 ± 0.48 cmH₂O，顯示誘發糖尿病六週後，大鼠之排尿壓力閾值顯著增加 (圖一， $P < 0.01$)；本實驗選擇在足三里穴分別持續進行電針處理一週、三週及五週，來探討及比較電針處理持續時間的長短對排尿壓力閾值的影響，結果顯連續電針處理一週對糖尿病鼠的 TP 並無明顯影響 (DM-Ea 1W, 7.26 ± 0.54 cmH₂O, $P > 0.05$)；連續電針處理三週 (DM-Ea 3W; 6.23 ± 0.19 cmH₂O) 與五週 (DM-Ea 5W; 6.65 ± 0.29 cmH₂O)，則可明顯降低糖尿病鼠的 TP ($P < 0.01$)，但並未完全恢復至控制組的狀態。

(2). 最大排尿壓 (peak voiding pressure, PVP) :

控制組與糖尿病組分別為 28.86 ± 0.61 cmH₂O 與 35.52 ± 2.56 cmH₂O，顯示誘發糖尿病六週後，大鼠之最大排尿壓顯著增加 (圖二， $P < 0.01$)；本實驗選擇在足三里穴分別持續進行電針處理一週、三週及五週，來探討及比較電針處理持續時間的長短對 PVP 的影響，結果顯連續電針處理一週開始，即可顯著降低糖尿病鼠的 PVP (DM-Ea 1W, 29.04 ± 1.83 cmH₂O, $P < 0.01$)；連續電針處理三週 (DM-Ea 3W; 27.04 ± 1.03 cmH₂O) 與五週 (DM-Ea 5W; 27.31 ± 1.37 cmH₂O)，則可明顯降低糖尿病鼠的 PVP，並恢復至控制組的狀態 ($P < 0.01$)。

(3). 排尿頻率 (voiding frequency, VF) 或排尿間期 (inter-contraction interval, ICI) :

控制組與糖尿病組的 VF 分別為 50.24 ± 2.5 與 9.23 ± 0.91 次/小時，顯示誘發糖尿病會顯著降低動物之 VF (圖三, $P < 0.01$)；相對應於 VF 的變化，控制組與糖尿病組的 ICI 分別為 1.19 ± 0.08 與 6.44 ± 0.55 min，糖尿病造成排尿間期的增加，亦即代表排尿頻率明顯降低 (圖四, $P < 0.01$)；在足三里穴分別持續進行電針處理三週及五週後，雖然可顯著改善糖尿病鼠的 VF 及 ICI ($P < 0.01$)；但無法恢復至控制組的狀態 ($P < 0.01$)。

2、肌動蛋白絲調控蛋白 Tropomyosin (Tm)、Caldesmon (Cad) 及 Calponin (Cap) 表現：

數據顯示：糖尿病動物膀胱逼尿肌平滑肌 (DSM) 細胞，以 Cap、F-actin 及 α -actin 抗體分別進行免疫染色後，利用共軛焦顯微鏡觀察，與控制組 (圖五 A) 比較，發現細胞內的 Cap、cytoskeleton 或 thin filaments 呈現較多表現量，尤其是 Cap 的確在糖尿病動物的 DSM 細胞有過量表現 (圖五 B)，這樣的表現異常增多的現象在電針處理 (見圖五 C) 後獲得顯著緩解。Cad 的表現量與 Cap 呈現相似趨勢，也是在糖尿病組大量表現 (見圖六 B)，並在電針處理組 (見圖六 C) 獲得顯著改善。經由細胞層次的觀察結果，果然與組織層次所得蛋白表現結果是相呼應的 (數據未顯示在本結果中)，actin filament 主要功能除了與收縮有關外，在維持細胞型態、改變細胞外觀、細胞移動及分裂功能也扮演重要角色，當 CaP 或 CaD 的過度表現時似乎也伴隨細胞內 actin filament 增生的現象，這樣的變化推測與膀胱質量增加及平滑肌變肥大重塑的過程有關聯。Tropomyosin (Tm) 在糖病組雖有增加表現量的趨勢，但分佈有趨近環繞於細胞核周圍 (見圖七 B)，而且電針處理的效應並明顯 (見圖七 C)。

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一、三及五週的電針刺激，可明顯降低糖尿病鼠的排尿的壓力閾值，但並未完全恢復至控制組的狀態。
2. 持續進行電針處理一週、三週及五週，可顯著降低糖尿病鼠的最大排尿壓，並恢復至控制組的狀態。
3. 在足三里穴分別持續進行電針處理三週及五週後，雖然可顯著改善糖尿病鼠的排尿頻率及排尿間期，但無法恢復至控制組的狀態。
4. 電針處理可以明顯改善肌動蛋白絲調控蛋白 Tropomyosin (Tm)、Caldesmon (Cad) 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。

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，可以緩解或改善糖尿病引發的膀胱病變的一些症狀。

圖解：

圖一：觀察連續雙側足三里穴位進行連續一、三及五週的電針刺激，對排尿壓力閾值 (voiding threshold pressure) 的影響。Ctrl：控制組；DM：糖尿病組；E1W：糖尿病鼠-連續電針處理一週；E3W：糖尿病鼠-連續電針處理三週；E5W：糖尿病鼠-連續電針處理五週

圖二：觀察連續雙側足三里穴位進行連續一、三及五週的電針刺激，對最大排尿壓力 (peak voiding pressure) 的影響。Ctrl：控制組；DM：糖尿病組；E1W：糖尿病鼠-連續電針處理一週；E3W：糖尿病鼠-連續電針處理三週；E5W：糖尿病鼠-連續電針處理五週

圖三：觀察連續雙側足三里穴位進行連續一、三及五週的電針刺激，對排尿頻率 (voiding frequency) 的影響。Ctrl：控制組；DM：糖尿病組；E1W：糖尿病鼠-連續電針處理一週；E3W：糖尿病鼠-連續電針處理三週；E5W：糖尿病鼠-連續電針處理五週

圖四：觀察連續雙側足三里穴位進行連續一、三及五週的電針刺激，對排尿間期 (inter-contraction interval) 的影響。Ctrl：控制組；DM：糖尿病組；E1W：糖尿病鼠-連續電針處理一週；E3W：糖尿病鼠-連續電針處理三週；E5W：糖尿病鼠-連續電針處理五週

圖五：利用共軛焦顯微鏡觀察 Calponin 蛋白在細胞內的分佈及表現狀況。在控制組可以觀察到 Calponin 沿著 F-actin filament 呈絲狀分佈，在糖尿病組的 Calponin 表現量大增，經連續電針五週處理後，Calponin 的表現量有回復趨勢。

圖六：利用共軛焦顯微鏡觀察 Caldesmon 蛋白在細胞內的分佈及表現狀況。在控制組可以觀察到 Caldesmon 沿著 F-actin filament 呈絲狀分佈，在糖尿病組的 Caldesmon 表現量大增，經連續電針五週處理後，Caldesmon 的表現量有回復趨勢。

圖七：利用共軛焦顯微鏡觀察 Tropomyosin 蛋白在細胞內的分佈及表現狀況。在控制組可以觀察到 Tropomyosin 沿著 F-actin filament 呈絲狀分佈，在糖尿病組的 Tropomyosin 表現量大增，經連續電針五週處理後，Tropomyosin 的表現量回復趨勢並不顯著。

Fig. 1

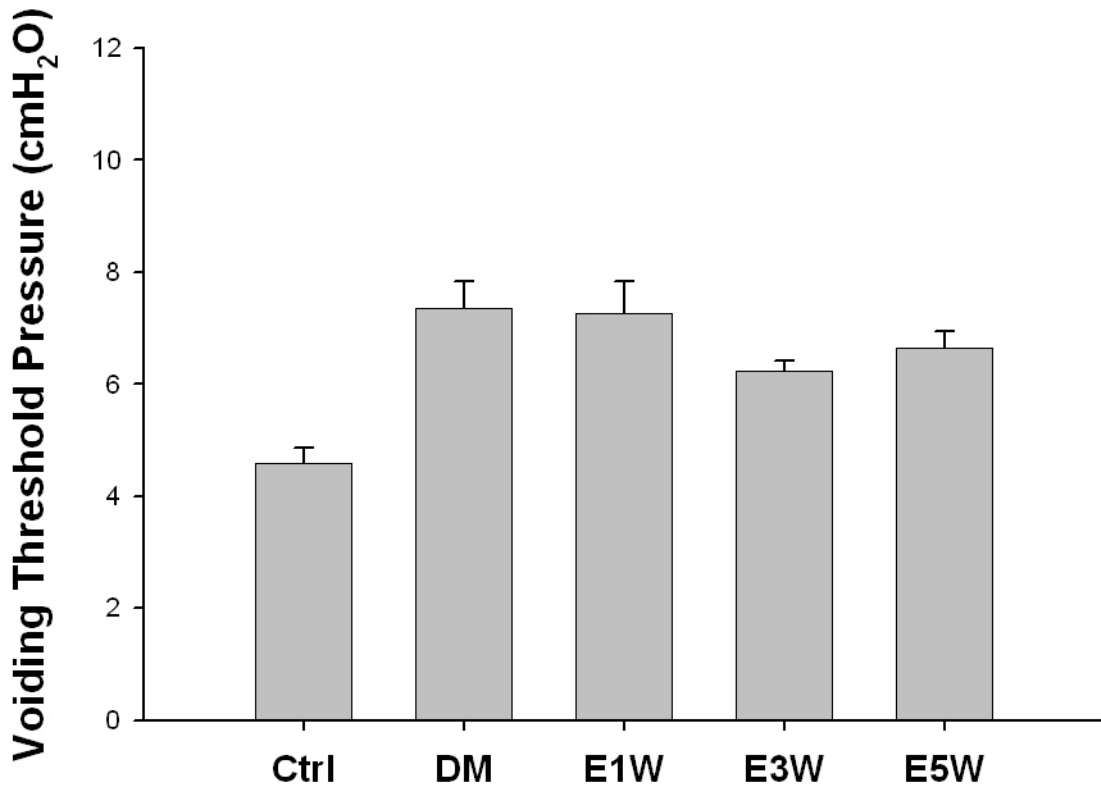


Fig. 2

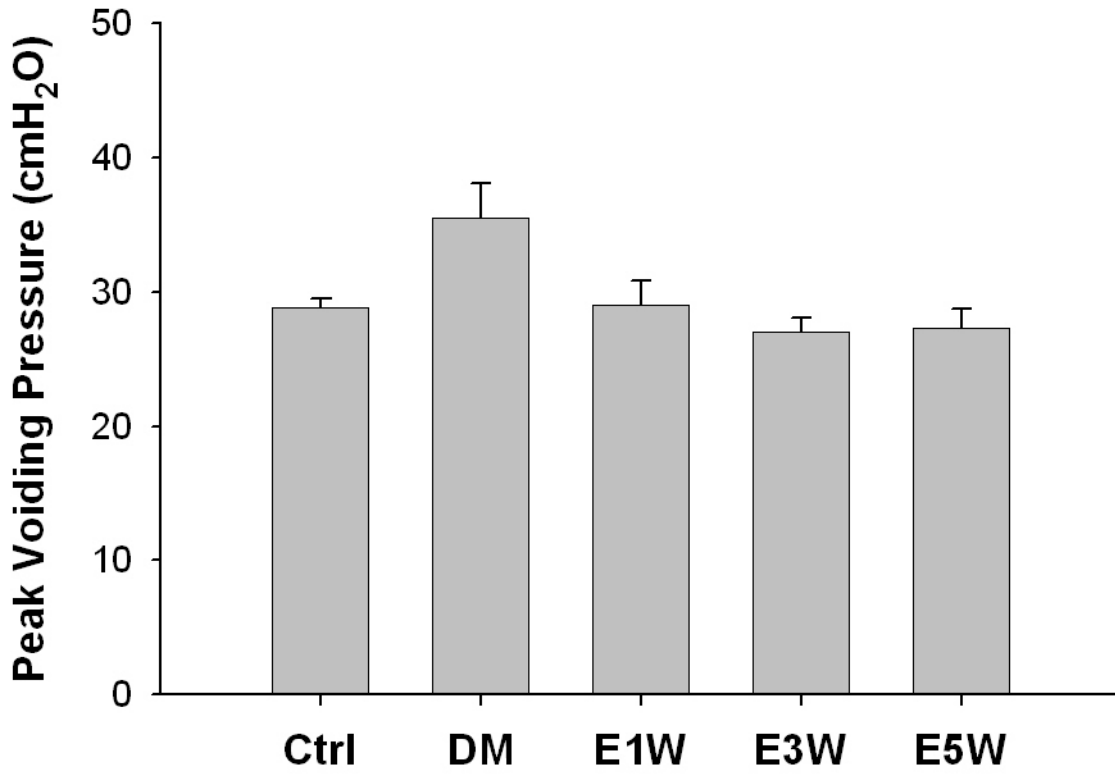


Fig. 3

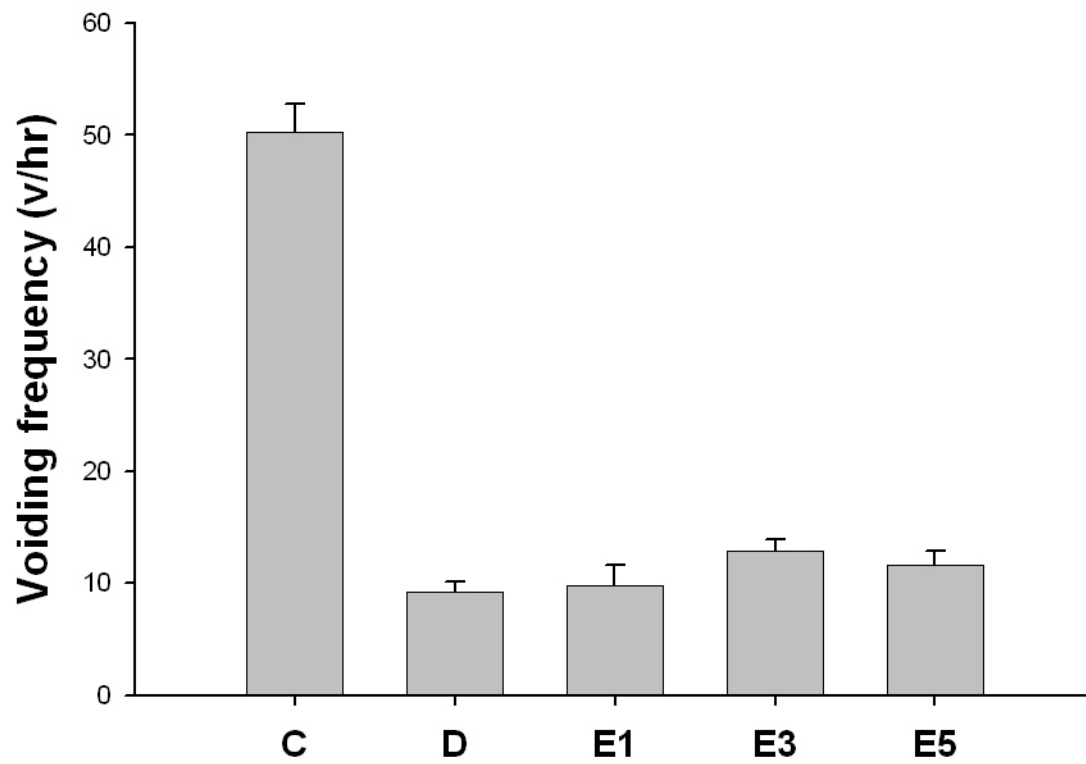


Fig. 4

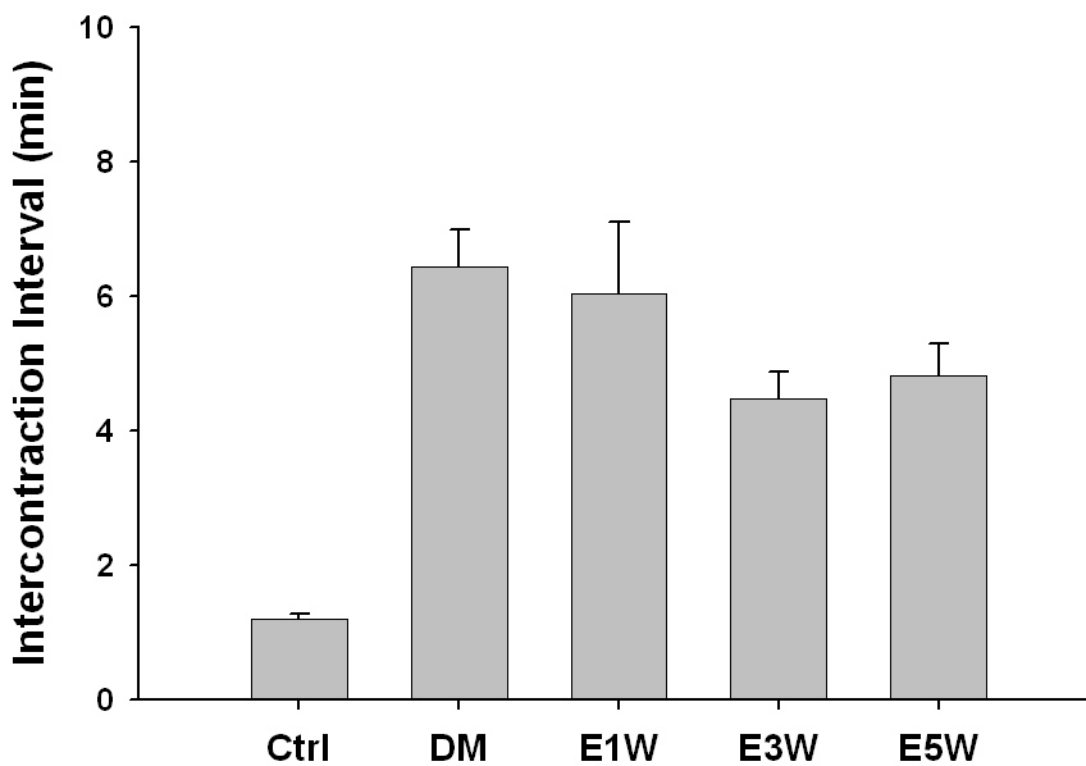
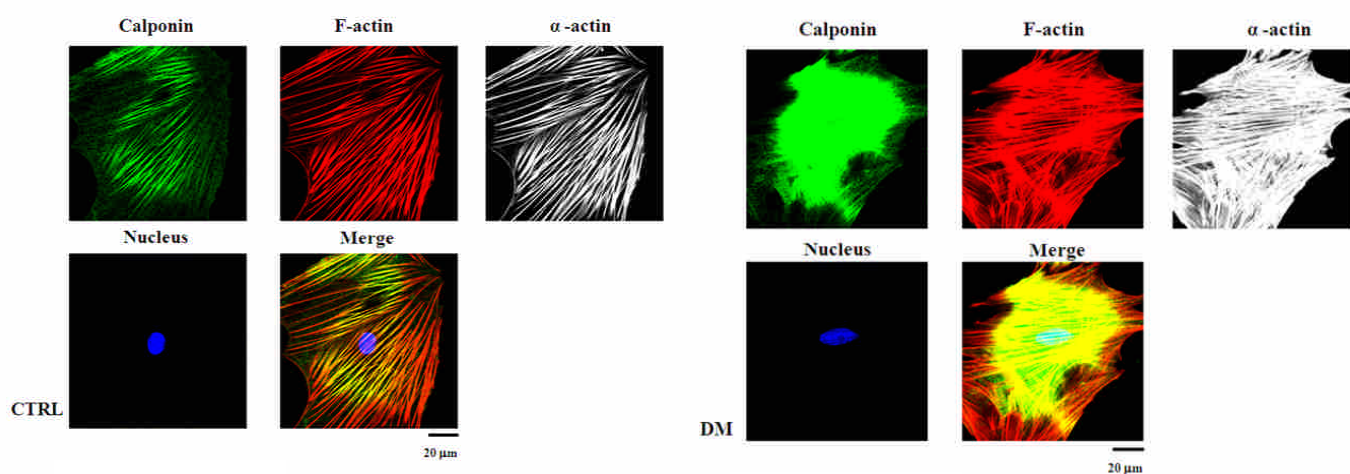
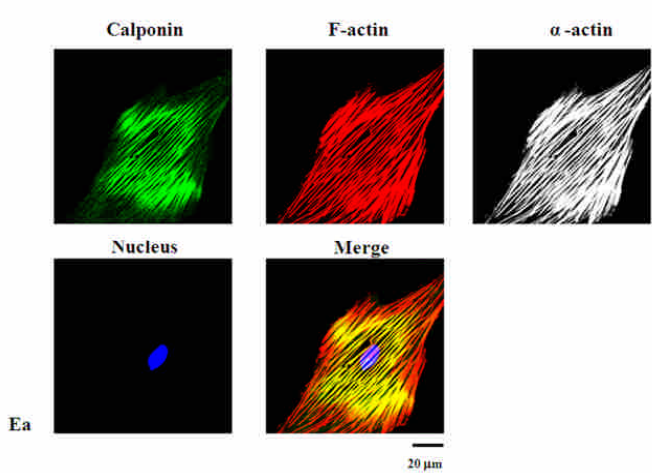


Fig. 5



A : 控制組

B : 糖尿病



C : 糖尿病+電針組

Fig. 6

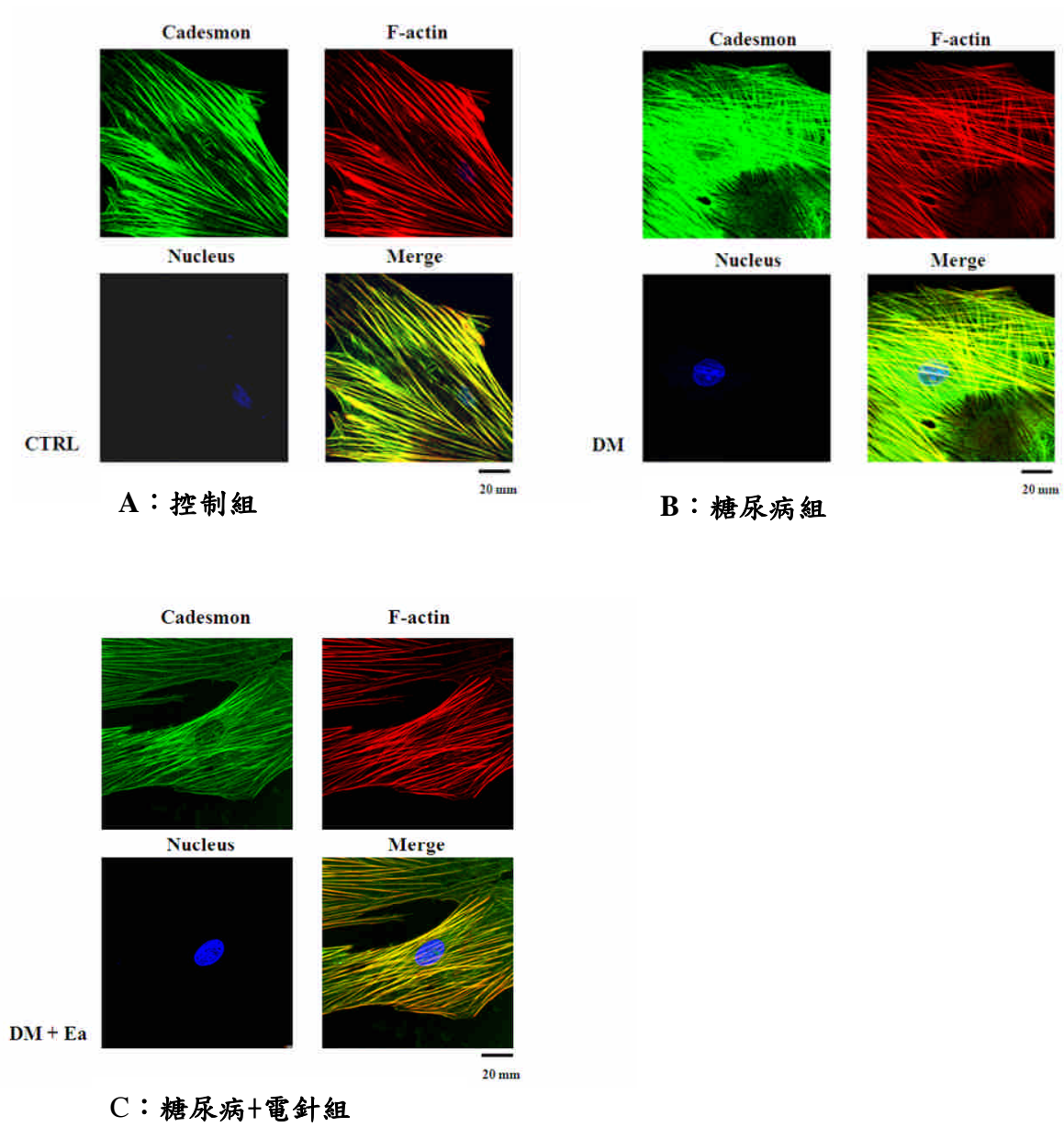
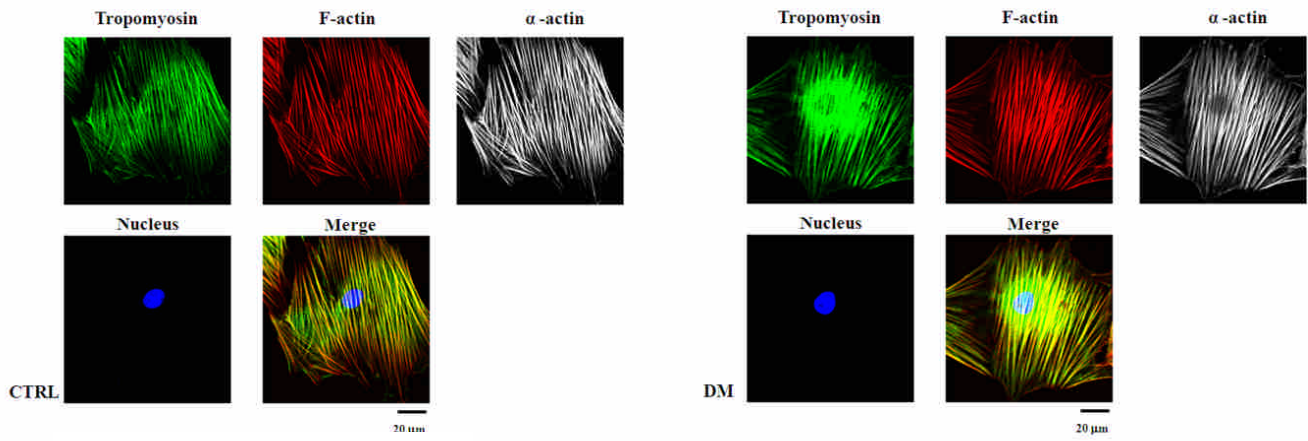
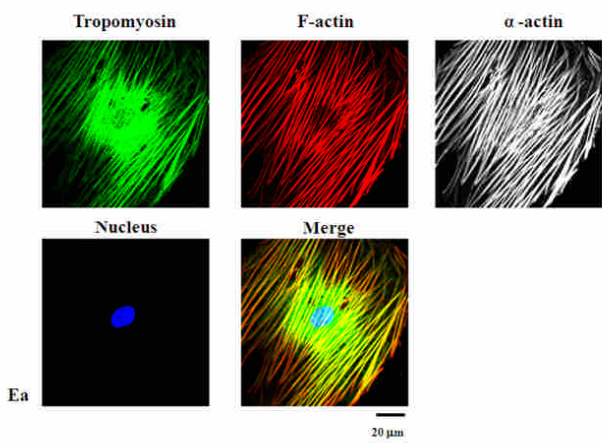


Fig. 7



A：控制組

B：糖尿病組



C：糖尿病+電針組

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.
- Chang SL, Lin JG, Hsieh CL, Cheng JT, Chang TL. Comparison of hypoglycemic effect in different acupoints response to 2 Hz electroacupuncture. *J Chin Med* 12:111-117, 2002.
- 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.
- Daneshgari, F, Xiao Huang, Guiming Liu, James Bena, Lateef Saffore, and C. Thomas Powell. Temporal differences in bladder dysfunction caused by diabetes, diuresis, and treated diabetes in mice. *de GroatWC Integrative control of the lower urinary tract: preclinical perspective. British Journal of Pharmacology* 147:S25–S40, 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.
- Goldman HB, Appell RA. Voiding dysfunction in women with DM mellitus. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 1999;10:130–3.
- Guiming Liu and Firouz Daneshgari. Temporal diabetes-and diuresis-induced remodeling of the urinary bladder in the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 291: R837–R843, 2006.
- Mannikarottu AS, Changolkar AK, Disanto ME, Wein AJ, Chacko S. Overexpression of smooth muscle thin filament associated proteins in the bladder wall of diabetics. *J Urol.* 174:360-364, 2005.
- Mannikarottu AS, Disanto ME, Zderic SA, Wein AJ, Chacko S. Altered expression of thin filament associated proteins in hypertrophied urinary bladder smooth muscle. *Neurourol Urodyn* 25: 78-88, 2006.
- Medeiros, M.A., Canteras, N.S., Suchecki, D., Mello, L.E.A.M. C-fos expression induced by electroacupuncture at the zusanli point in rats submitted to repeated immobilization. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 36, 1673–1684, 2003b.
- Medeiros, M.A., Canteras, N.S., Suchecki, D., Mello, L.E.A.M.. Analgesia and c-Fos expression in the periaqueductal gray induced by electroacupuncture at the Zusanli point in rats. *Brain Res.* 973, 196–204, 2003a.
- Shih-Liang Chang, Chin-Chuan Tsai, Jaung-Geng Lin, Ching -Liang Hsieh, Rong-Tsung Lin, Juei-Tang Cheng. Involvement of serotonin in the hypoglycemic response to 2 Hz electroacupuncture of zusanli acupoint (ST36) in rats. *Neuroscience Letters* 379: 69-73, 2005.
- Shih-Liang Chang, Kuo-Juei Lin, Rong-Tsung Lin, Pei-Hsiu Hung, Jaung-Geng Lin,

Juei-Tang Cheng Enhanced insulin sensitivity using electroacupuncture on bilateral Zusanli acupoints (ST 36) in rats. *Life Sciences* 79 : 967–971, 2006.

Su X, Changolkar A, Chacko S, and Moreland RS. Diabetes decreases rabbit bladder smooth muscle contraction while increasing levels of myosin light chain phosphorylation. *Am J Physiol Renal Physiol*. 287: F690, 2004.

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.