

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

電針刺激對麻醉鼠骨盆神經—尿道反射塑性之影響 研究成果報告(精簡版)

計畫類別：個別型
計畫編號：NSC 95-2320-B-040-026-
執行期間：95年08月01日至96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：林則彬

計畫參與人員：博士班研究生-兼任助理：彭賢祐
助理教授：廖娟妙

處理方式：本計畫可公開查詢

中華民國 96 年 11 月 20 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

電針刺激對麻醉鼠骨盆神－尿道反射塑性之影響

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫
計畫編號：NSC 95-2320-B-040-026-
執行期間：95年08月01日至96年07月31日

計畫主持人：林則彬
共同主持人：
計畫參與人員：廖娟妙 彭賢祐

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 96年 10月 31日

目錄

封面	page 1
中文摘要	page 2
英文摘要	page 3
報告內容	page 4~8
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 8
圖	page 9
參考文獻	page 10

中文摘要

關鍵詞：大白鼠、電針、體-交感神經反射、合谷穴、自主神經、骨盆神經—尿道外括約肌反射塑性

前言：電針刺激合谷穴位 (Hoku acupoint) 可以透過體-交感神經反射 (somatic-sympathetic reflex) 來影響不同臟器功能，本研究想探討電針刺激合谷穴所引發體-交感神經反射，對骨盆神經—尿道外括約肌反射塑性所產生之影響。

方法：以麻醉大白鼠為實驗動物進行以下實驗 (1) 電刺激骨盆神經：頻率分別為 0.003 Hz (為測試刺激) 與 1 Hz (為反復性刺激)；(2) 在骨盆神經刺激時，同時對合谷穴 (Li-4) 施予 2 Hz 與 20 Hz 兩種頻率之電針刺激 [固定刺激強度為 $20 \times T$ (T 為能引起肌肉收縮之最小電流閾值)]，觀察並比較外尿道括約肌肌動作電位數之變化。

結果：測試刺激所產生之動作電位數 (spike number) 平均為 1.00 ± 0.26 spikes/stimulation ($n=20$)，反復性刺激誘導出一逐漸增強之神經塑性增益現象，大約在刺激後 90 秒達一穩定的動作電位數，其最終所達到一個穩定的動作電位數目為 16.50 ± 1.62 spikes/stimulation ($n=15$)。脊髓腔內分別給予 NMDA 接受器之拮抗劑 (APV) 和 AMPA 接受器之拮抗劑 (NBQX)，則會完全阻斷 (16.50 ± 1.62 to 1.20 ± 0.20 spikes/stimulation $P < 0.01$ $n=5$)，或部份阻斷 (16.50 ± 1.62 to 9.01 ± 0.71 spikes/stimulation $P < 0.01$ $n=5$) 由重複性電刺激引發的增益現象。另外，以 2Hz 刺激合谷穴，動物血壓及心率持續增加至電針刺激結束才恢復正常，20 Hz 刺激合谷穴位使平均血壓迅速增加，隨後血壓在 3~4 分鐘後逐漸恢復正常。骨盆神經給予測試性或重複性電刺激時，同時在合谷穴給予 2 或 20 Hz 的電針刺激：結果重複性電刺激仍可引發反射增益現象；合谷穴之電針刺激亦可產生增壓反應，但兩種刺激並沒有互相加成的效果，亦即藉由功能性電針刺激調整自主神經活動的方式可能對骨盆-尿道反射之塑性增益作用無顯著影響。

英文摘要

Keywords : Rat, electroacupuncture、somatic-sympathetic reflex、Hoku、autonomic nervous system、plasticity of pelvic nerve-to-urethral sphincter reflex

Introduction: Recent studies in our laboratory have shown that electroacupuncture (Ea) at Hoku acupoint may modulate autonomic nerve activity influencing visceral function via somatic-sympathetic reflex in urethane-anesthetized rats. The reflex plasticity between pelvic afferent and pudendal efferent nerve fibers is physiologically important in urine continence during the storage phase of voiding cycles. To perform the Ea stimulation at Hoku acupoint to examine the effect of Ea on the plasticity of the pelvic nerve-to-urethral sphincter reflex (PPR) is the interesting aim of this study.

Method : External urethral sphincter electromyogram (EUSE) of anesthetized rats response to pelvic afferent test stimulation (TS, 1/30 Hz) or repetitive stimulation (RS, 1 Hz) were recorded synchronized with / without Ea at Hoku acupoint [2 Hz: the low frequency Ea (LFEa) and 20 Hz with intensity of 20 times of motor threshold for 10 min), and / or intrathecal administration 10 μ L of (1) 2,3-dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo (F) quinoxaline (NBQX, 100 μ M), (2) D-2-amino-5-phosphonopentanoic acid (APV, 100 μ M).

Results : RS-induced potentiation of the pelvic-to-pudendal reflex was abolished by a selective N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist (16.50 ± 1.62 to 1.20 ± 0.20 spikes/stimulation $P < 0.01$ $n = 5$) and attenuated by a non-NMDA excitatory amino acid receptor antagonist (16.50 ± 1.62 to 9.01 ± 0.71 spikes/stimulation $P < 0.01$ $n = 5$), suggesting the RS-induced PUR should be mediated by glutamatergic transmission. In addition, Ea stimulation at the Hoku point elicit chronotropic and pressor effects. The pattern of response induced by the LFEa was different from that by the HFEa, i.e. a tonic effect was elicited by the LFEa, while a phasic one was induced by the HFEa. However, synchronized Ea stimulation at the Hoku acupoints didn't significantly affect the PUR activity. All the results in this study implicated that: (1) The mechanisms of RS-induced PUR are glutamatergic transmission involved; (2) Ea at Hoku may activate the sympathetic nerve to induce chronotropic and pressor effects; (3) Ea at Hoku with different stimulation frequencies may elicit distinct mechanism to induce therapeutic effect; (4) The mechanisms of RS-induced PUR maybe distinct from Ea-induced pressor response.

一、計畫背景及目的

電針刺激之相關研究

針灸在中國用以治療各種疾病已有兩千多年的歷史，許多研究針灸生理機制的報告指出，針灸能透過體交感神經反射 (somato-sympathetic reflex) 影響身體各部的內臟功能 (Andersson et al., 1973; Koizumi et al., 1980; Tsuchiya et al., 1991; Sato et al., 1993; Kimura et al., 1995; Liao et al., 2002)。

在 Lin and Fu 的報告指出電針刺激正常大白鼠之合谷穴可以產生加壓之作用，Lin 等人利用此參數刺激麻醉大鼠的合谷穴，發現對膀胱活動的排尿反射也有顯著的抑制效應 (Lin et al. 1998)

膀胱活動與自主神經系統

泌尿道的功能主要是儲存及排除尿液，而此作用需要膀胱、尿道內括約肌及尿道外括約肌等部位彼此間的協調配合才能順利進行。

膀胱活動主要由屬於副交感神經系統的骨盆神經 (pelvic nerve) 與屬於交感神經系統的下胃神經 (hypogastric nerve) 所調控；尿道內括約肌也是由下胃神經控制；而尿道外括約肌則由體神經系統的陰部神經 (pudendal nerve) 所調控；

在儲尿期間 (filling phase) 下胃神經會抑制膀胱的肌肉層-逼尿肌使之放鬆，同時興奮尿道內括約肌使之收縮，此時支配尿道外括約肌的陰部神經也會興奮，使得尿道外括約肌收縮而關緊尿道，即為骨盆-陰部神經反射 (pelvic-pudendal reflex ;或稱 holding reflex)，如此一來膀胱內便可維持低壓以利儲尿(urine continence) (De Groat, 1993)。骨盆傳入神經的活動在儲尿期間會隨著膀胱內壓力漸漸變大而增加，當膀胱內容積達到引起排尿(micturition) 的閾值 (threshold)時，膀胱壁上的牽扯接受器 (stretch receptor ; 或稱機械性刺激接受器 mechanoceptors) 會經由骨盆神經傳遞神經衝動到達脊髓再上行至橋腦的排尿中樞，經由橋腦的排尿中樞處理 (integration) 之後，會下行傳達排尿訊息到脊髓，去除下胃神經對膀胱逼尿肌的抑制作用，以及對尿道內括約肌的興奮作用，此時支配尿道外括約肌的陰部神經會被抑制，使尿道外括約肌反射性的放鬆，尿道內壓因而降低，而同時中樞的下行訊息也會興奮骨盆傳出神經，使其所支配之膀胱逼尿肌收縮，在此變化的幾秒內將尿液排出，因此排尿反射 (micturition reflex) 是由脊髓-腦幹-脊髓路徑 (spinobulbospinal pathway) 所調控 (De Groat et al., 1995 ; Yoshimura and De Groat, 2001)。

骨盆神經－尿道外括約肌反射塑性

在神經系統之迴路的突觸傳遞活性增加並維持一段時間的現象稱為長期增益 (long term potentiation)，此種神經塑性與長期記憶 (Martinez and Derick, 1996)、痛覺及過敏息息相關 (Richter-Levin et al., 1994)。Lin 等人 (2003, 2004) 的研究首度發現，以 1 Hz 的頻率重覆電刺激骨盆傳入神經，上傳至脊髓背角，在脊髓興奮陰道傳出神經 (pudendal efferent nerve) 使得尿道外括約肌的動作電位數不斷持續增加，此種突觸傳導活性增強的現象或稱為骨盆神經－尿道外括約肌反射塑性 (pelvic nerve-to-urethral sphincter reflex plasticity) 的建立，對尿液貯存功能是必要的。

研究目的

綜合上述文獻，一旦發生脊髓損傷、自主神經功能失調、或婦女的骨盆肌肉鬆弛及無力，病人會常因腹壓增加，如大聲笑、打噴嚏、咳嗽或做運動時，產生尿液外漏之應力性尿失禁而直接影響膀胱正常功能。因此本研究計劃的主要目的擬採用電針刺激的方式，並將刺激參數量化，即利用二十倍閾值的刺激強度配合低頻與高頻兩種頻率，對麻醉大鼠之合谷進行電針刺激，觀察對已建立骨盆神經-尿道外括約肌反射塑性的增益現象是否具有加成或其他調節作用，藉由測量實驗動物之收縮壓及心率等循環生理參數變化，配合尿路動力學的記錄，觀察其所誘發的反應對膀胱神經塑性的影響，期能對自主神經功能異常或應力性尿失禁病人儲尿功能的改善有所助益。

二、研究方法：

實驗流程

■ 第一部份實驗：動物先以仰臥姿勢打開腹腔，刺激激骨盆神經並記錄尿道外括約肌的肌電圖，同時量測心率及動脈壓，建立神經塑性增益現象後，在實驗動物合谷穴進行電針刺激。

■ 第二部份實驗：經椎管內分別注射麩胺酸接受器的拮抗劑 NBQS 及 APV，重複實驗一。

I. 動物麻醉：本實驗採用雌性 WISTAR 大白鼠 (體重 200~250 公克)

腹腔內給藥途徑 (intraperitoneal injection; 簡稱 i.p.)，注射長效型麻醉劑，尿管 (urethane)，劑量為每公斤 1.2 公克。

II. 外科手術：

(1) 椎管內插管：便於將藥送達 L6~S1 的位置。

(2) 氣管插管：俾使實驗過程中呼吸道保持暢通，避免分泌物阻塞呼吸道，並可提供急救時，呼吸器導管連接之管路。

(3) 靜脈導管：實驗過程中，可以視情況透過此導管追加麻醉藥的劑量 (0.4 g/kg, i.v.)，必要時也可提供輸液或是提供投藥所需。

(4) 骨盆傳入神經的分離與電刺激：小心將骨盆神經分離出來，將遠端切斷，神經掛在刺激電極上，以電刺激器 (Grass S88, Cleveland, OH, U.S.A.)，過阻絕器 (Grass SIU5B, Cleveland, OH, U.S.A.)，再經穩流器 (Grass CCU1A, Cleveland, OH, U.S.A.) 最後到達不鏽鋼刺激電極上刺激神經。

(5) 外尿道括約肌肌動作電位記錄：以手術露出尿道後，取兩條漆包銅絲 (50 μ m; M.T. Giken Co., Tokyo, Japan)，刮去兩端包覆的絕緣物質，將其穿過 30 號 (30G) 針頭後以針持銅線，斜插入尿道外側 1-2 mm 肌肉層，針頭由銅線的另一端退出，使得銅線埋入外尿道括約肌。將銅線的另一端接到前置放大器上，分別採取高頻 3,000 Hz 低頻 30 Hz 的濾波模式，將訊號放大 20,000 倍，記錄當骨盆神經接受電刺激所引發之外尿道括約肌肌動作電位。

III. 電針刺激

合谷穴則位於上肢第一及第二掌骨交接處。以一隻焊接於電線的皮下針垂直插入刺激點，另一隻相同的針則插入相距約 5-10 mm 處作為正極。以刺激器 (Grass, S88) 輸出電流通至絕緣器 (Grass, SIU5B) 再以穩流器 (Grass, CCU1A) 輸出至動物體。刺激的頻率則分 2 Hz (常見的捻針頻率) 及 20 Hz (高頻刺激組) 兩組，每一頻率以閾值的 20 倍的刺激強度 (20xT) 加以刺激測試。所有的測試其刺

激時間皆設定為十分鐘，因為本實驗所引發的反應在此時間內已達飽和 (Liao et al., 2006)。

IV. 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、電針刺激對骨盆神經—尿道反射活性之影響

(1) 測試性電刺激

於骨盆傳入神經給予一測試性電刺激 (testing stimulation; TS) (0.03Hz, 10分鐘)，並記錄外尿道括約肌肌電圖 (EUSE) (圖一A)。由骨盆神經給予電刺激，在外尿道括約肌產生一動作電位，記錄到之動作電位數 (spike number) 平均為 1.00 ± 0.26 spikes/stimulation ($n=32$)。如果同時在合谷穴進行低頻 (2Hz) (圖一A中) 或高頻 (20 Hz) (圖一A右)，對測試刺激所誘發動作電位數不產生影響。圖二為刺激約第5分鐘達統動作電位數的統計柱狀圖。

(2) 重複性刺激所引發的增益效益現象

於骨盆傳入神經給予一測試性電刺激，其所產生穩定反應10分鐘後，給予相同強度但是不同頻率 (1Hz, 10分鐘) 的電刺激，在骨盆神經-外尿道括約肌反射活性會在刺激後誘導出一逐漸增強之神經塑性增益現象，大約在刺激後90秒達一穩定的動作電位數 (圖一B左)，直到刺激停止。其最終所達到一個穩定的動作電位數目為 16.50 ± 1.62 spikes/stimulation ($n=10$) (圖三)。如果同時在合谷穴進行低頻 (2 Hz) (圖一B右) 或高頻 (20 Hz) (圖一B右)，對重試刺激所誘發動作電位數不產生影響。圖四為刺激約第5分鐘達統動作電位數的統計柱狀圖。

2、麩胺酸致效劑與拮抗劑對骨盆神經—尿道反射之活性影響

給予骨盆傳入神經測試性電刺激，所產生單一動作電位如 (圖5A左上) 所示。在脊髓腔內分別投與麩胺酸 (TS+Glu, $100 \mu\text{M}$, 0.01 ml) 和NMDA (TS+NMDA, $100 \mu\text{M}$, 0.01 ml)，皆可在外尿道括約肌肌電圖產生類似給與骨盆傳入神經重複性電刺激所引發之持續增益現象 (from 1.00 ± 0.26 to 18.20 ± 1.08 and from 1.00 ± 0.26 to 10.60 ± 1.08 spikes/stimulation in glutamate and NMDA $P < 0.01$ $n=10$)。脊髓腔內分別投與麩胺酸與NMDA，其在骨盆神經-外尿道括約肌反射所產生之增益現象如 (圖5A 中及右上) 所示。

而在給予骨盆傳入神經測試性電刺激，其所產生穩定反應10分鐘後(圖5A左下)，在脊髓腔內分別給予NMDA接受器之拮抗劑：APV (RS+APV, $100 \mu\text{M}$, 0.01 ml) 和AMPA接受器之拮抗劑：NBQX (RS+NBQX, $100 \mu\text{M}$, 0.01 ml)，再給予重複性性刺激。其本來可由重複性電刺激引發的增益現象會被此兩種拮抗劑所完全阻斷 (RS v.s RS+APV: from 16.50 ± 1.62 to 1.20 ± 0.20 spikes/stimulation $P < 0.01$ $n=5$) (圖5A右下)，或部份阻斷 (RS v.s RS+NBQX: from 16.50 ± 1.62 to 9.01 ± 0.71 spikes/stimulation $P < 0.01$ $n=5$) (圖5A中下)。脊髓腔內分別投予麩胺酸拮抗劑，其在骨盆神經-外尿道括約肌反射所產生之抑制增益現象之統計圖(圖5B)。

四、計畫成果自評

本計畫成果：

1. 對骨盆神經進行重複性刺激，可誘發外尿道括約肌肌電圖產生持續增益現象。
2. 骨盆神經－外尿道括約肌反射塑性（增益現象）乃透過麩氨酸傳遞路徑產生。
3. 不論使用低頻（2 Hz）或高頻（20 Hz）之電針刺激合谷穴，也許透過不同中樞機制興奮交感神經系統，進而使老鼠的血壓及心率產生 tonic 或 phasic 兩種不同型式的增加。
4. 在誘發骨盆神經－外尿道括約肌反射塑性後，同時由合谷穴給予低頻或高頻的電針刺激，發現電針刺激使交感神經系統興奮並抑制副交感神經活性的效應，並不會顯著影響反射塑性，雖然所得結果與預期結果不同，但也提供我們不同的思維，骨盆神經－外尿道括約肌反射塑性一但建立後，脊髓層次突觸的麩氨酸傳遞路徑的活化強度便不易受其他神經突觸的影響。其詳細的機制有待我們更進一步的探究。

圖解：

圖一：(A) 單獨給予測試性電刺激、同時在合谷穴給予 2 Hz 或 20 Hz 電針刺激的紀錄圖。

TS：測試性電刺激 EUSE：外尿道括約肌肌電圖

(B) 單獨給予重複性電刺激、同時在合谷穴給予 2 Hz 電針刺激的紀錄圖。

(C) 單獨給予重複性電刺激、同時在合谷穴給予 20 Hz 電針刺激的紀錄圖。

RS：重複性電刺激

圖二：單獨給予測試性電刺激、同時在合谷穴給予 2 Hz 或 20 Hz 電針刺激的統計圖。

三組之外尿道括約肌的動作電位數並無顯著差異。

圖三：後之外尿道括約肌肌動作電位統計圖。約在刺激後90秒達一穩定的動作電位數。同時給予電針刺激未影響肌動作電位數之變化。

圖四：給予重複性電刺激後第 5 分鐘，所產生之穩定動作電位數不受合谷穴電針刺激的影響。

圖五：(A) 在TS的情況下給予NMDA的致效劑 glutamate 與 NMDA 後可引發反射塑性上升；而經由 RS 引發塑性活性後，給予NMDA 接受器之拮抗劑 APV 與 AMPA 接受器之拮抗劑NBQX後，其塑性活性皆被抑制。

(B) 肌動作電位統計圖：在 TS 給予 glutamate 與 NMDA 使動作電位數明顯上升；RS 給予 NBQX 與 APV 後，動作電位數明顯下降。

** 代表統計上 $P < 0.01$ ；與 TS 作比較

代表統計上 $P < 0.01$ ；與 RS 作比較

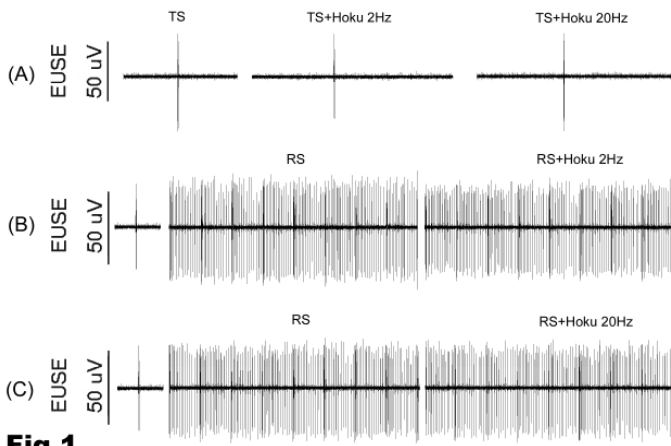


Fig 1

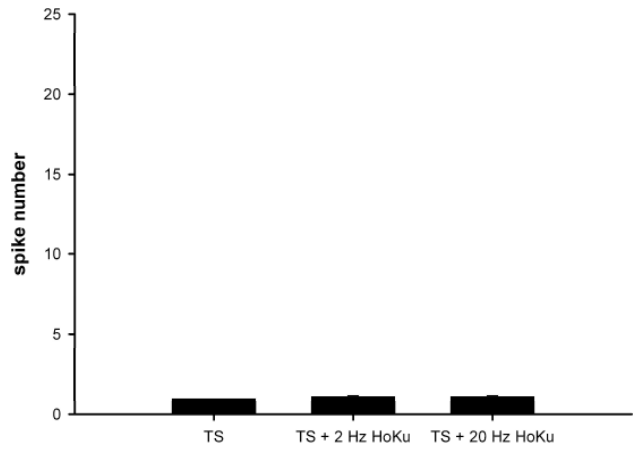


Fig 2

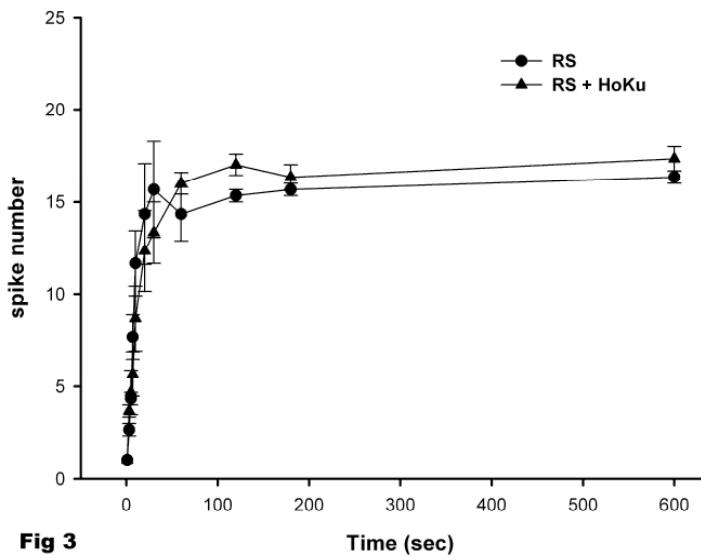


Fig 3

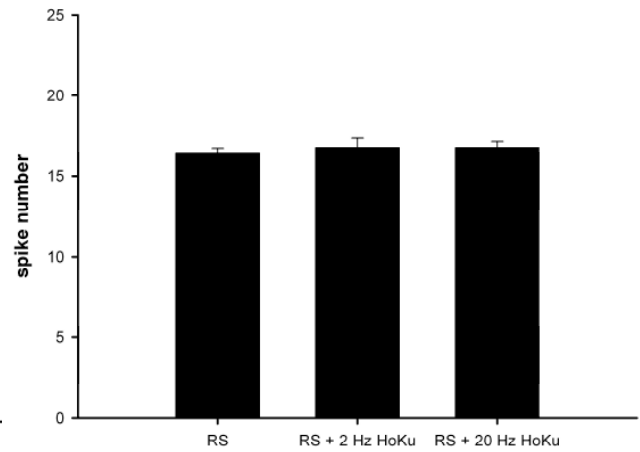


Fig 4

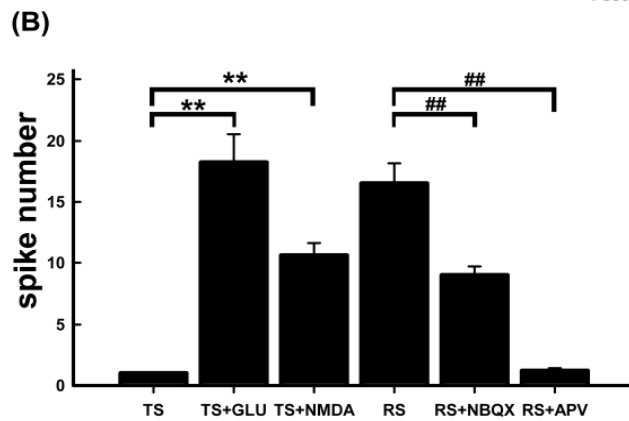
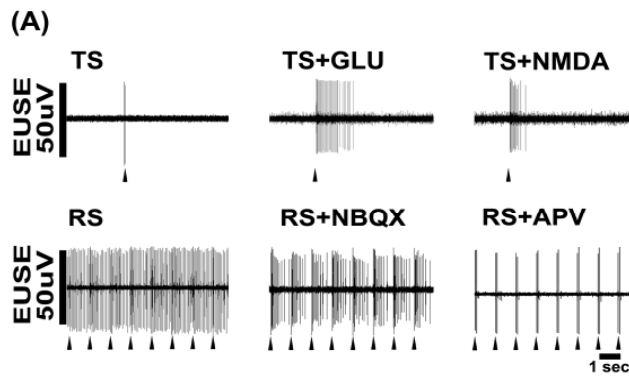


Fig.5

參考文獻

1. Andersson, S. A.; Ericson, T.; Holmgren, E.; Lindqvist, G. Electro-acupuncture. effect on pain threshold measured with electrical stimulation of teeth. *Brain Res.* 63: 393-396; 1973.
2. De Groat WC (1993) Anatomy and physiology of the lower urinary tract. *Urol Clin North Am* 20: 383-401.
3. De Groat WC (1995) Mechanisms underlying the recovery of lower urinary tract function following spinal cord injury. *Paraplegia* 33(9): 439-505.
4. De Groat WC & Yoshimura N (2001). Pharmacology of the lower urinary tract. *Annu Rev Pharmacol* 41, 691-721.
5. Kimura, A.; Ohsawa, H.; Sato, A.; Sato, Y. Somatocardiovascular reflexes in anesthetized rats with the central nervous system intact or acutely spinalized at the cervical level. *Neurosci. Res.* 22: 297-305; 1995.
6. Koizumi, K.; Sato, A.; Terui, N. Role of somatic afferents in autonomic system control of the intestinal motility. *Brain Res.* 182: 85-97; 1980.
7. Lin, T. B.; Fu, T. C.; Chen, C. F.; Lin, Y. J.; Chien, C. T. Low and high frequency electroacupuncture at Hoku elicits a distinct mechanism to activate sympathetic nervous system in anesthetized rats. *Neurosci. Lett.* 247: 75-78; 1998.
8. Lin, T.B., and Fu, T.C. (2000) Effect of electro-acupuncture on blood pressure and adrenal nerve activity in anesthetized rats. *Neuroscience Letters*, 285, 37-40.
9. Lin TB (2003) Dynamic pelvic-pudendal reflex plasticity mediated by glutamate in anesthetized rats. *Neuropharmacology*, 44: 163-170.
10. Lin TB (2004) Tetanization-induced pelvic to pudendal reflex plasticity in anesthetized rat. *Am J Physiol-Renal Physiol*, 287: F245-F251.
11. Liao, J.M., Lin, C.F., Ting, H., Chang, C.C., Lin, Y.J., and Lin, T.B. (2002) Electro-acupuncture at Hoku elicits dual effect on autonomic nervous system in anesthetized rats. *Neuroscience Research*, 42(1), 15-20.
12. Liao, J.-M., H. Ting, S.-D. Lee, C.-H. Yang, T.-M. Liou, M.-L. Peng, S.-J. Tsai, C.-F. Lin and T.-B. Lin (2006) Electro- acupuncture-induced pressor and chronotropic effects in anesthetized rats. *Autonomic Neuroscience Basic & Clinical*. 124: 18-25.
13. Richter-Levin G, Errington ML, Maegawa H & Bliss TVP (1994) Activation of metabolic glutamate receptor is necessary for long-term potentiation in the dentate gyrus and for spatial learning. *Neuropharmacology* 33, 853-857.
14. Sato, A.; Sato, Y.; Suzuki, A.; Uchida, S. Neural mechanism of the reflex inhibition and excitation of gastric motility elicited by acupuncture-like stimulation in anesthetized rats. *Neurosci. Res.* 18: 53-62; 1993.
15. Tsuchiya, T.; Nakayama, Y.; Ozawa, T. Response of adrenal sympathetic efferent nerve activity to mechanical and thermal stimulations of the facial skin area in anesthetized rats. *Neurosci. Lett.* 123: 240-243; 1991.