

中山醫學大學醫學研究所碩士論文
Master Thesis, Institute of Medicine,
Chung Shan Medical University

睡眠剝奪對大鼠骨盆神經-外尿道括
約肌反射塑性之影響

Effects of Sleep Deprivation on the Pelvic
Nerve-to-Urethra Reflex Plasticity in Rats

指導教授：陳進典 教授 Gin-Den Chen

林則彬 教授 Tzer-Bin Lin

研究生：簡瑋權 Wei-Ching Chien

中華民國九十五年六月

June, 2006

誌謝

在緊湊的實驗和充實的課程交錯縱橫之中，一轉眼間，兩年的碩士班生活就要在鳳凰花開的季節中劃下了句點。在研究過程裡，有求知的充實收穫與喜悅，亦有實驗挫折後的沮喪與再出發的勇氣，心中點點滴滴的累積，無限的感激更在此刻傾注而出。

首先感謝恩師林則彬教授及陳進典教授細心栽培與提攜，在學業與實驗方面的支持與指導。恩師林則彬教授在實驗和學業上悉心指導與諄諄教誨，並帶領學生進入神經電生理學的領域，不斷的啟發學生對於研究的熱忱與興趣。恩師陳進典教授在學術研究方面的栽培乃至於論文寫作過程的逐字斧正，皆使我獲益匪淺，感受良多。師恩浩瀚，永銘於心。

承蒙口試委員許添桓老師、董光中老師及張宏名老師於百忙之中撥冗指導，於口試中指點應有的思維與疏漏處，對於本論文的謬誤之處，鉅細靡遺的校閱，讓本論文愈臻完善，使學生對於研究能有更寬廣的思考與瞭解，謹此獻上最誠摯的謝意。

感謝生理科廖娟妙老師在生化實驗與生活上的悉心指導與幫忙，使得學生更能在研究過程中堅持下去，完成碩士學業；感謝解剖科張宏名老師在睡眠剝奪的領域給予學生悉心指導並慷慨提供睡眠剝奪機以幫助實驗之所需；感謝生化所陳凌雲老師在生化實驗的協助，使學生有良好完備的實驗環境下完成生化實驗部份；感謝台大生理所陳朝峰老師在大學時給學生對研究的啟蒙與教導，使得學生在這兩年的研究工作，更能得心應手；同時也要感謝實踐大學食品營養系上多位師長的疼愛，使我得以茁壯。

論文得以完成，歸功於許多人的協助，使得實驗順利進行。感謝生理科蔡金秋老師，在物品使用上的協助，獻上誠摯之謝意。感謝美森學姐、思滿學姐和世吉學長給予研究實驗上的指點。謝謝同實驗室的好友賢祐、美枝、佩怡及心怡，一起度過這兩年實驗生活。謝謝學弟妹彥君、奕君及昱征，平日的協助幫忙。也謝謝生化所顯益、闊顯、政益及雅惠，在生化實驗上的幫忙；謝謝解剖科大任、瓊珠和威靈，一同分享生活上的歡笑；謝謝中興生科所俊雄，在生化實驗上的指點；也感謝所上多位師長、學長姐、同窗好友芯蘭和許多大學好友，陪伴我一起走過這豐富的研究生活。您們的協助使我的學習生涯更加順利，也是我人生過程難忘的美好回憶。

最後要深深感謝我摯愛的父母親及妹妹，對於我的支持，給予我不求回報的付出與鼓勵，還有彥君對我的耐心與包容，在求學的道路上，每當有實驗不順利或生活不如意時，總是有您們在我的身邊給我鼓勵給我建言，讓我得以安心的完成碩士學位，對於您們的感激盡在不言之中。

僅以這一本論文獻給曾經幫助我的任何人，及在實驗過程中犧牲生命的實驗動物大白鼠，謝謝你們！

目次

縮寫表.....	I
一、中文摘要.....	II
二、英文摘要.....	III
三、文獻回顧	
1、下泌尿系統生理學	
1-1、下泌尿系統之解剖構造.....	1
1-2、下泌尿系統之神經支配.....	1
1-2-1、薦髓之副交感神經路徑.....	2
1-2-2、胸腰髓之交感神經路徑.....	2
1-2-3、體神經之傳出神經路徑.....	3
1-2-4、傳入神經路徑.....	3
1-3、排尿功能.....	3
1-3-1、儲尿反射.....	4
1-3-2、排尿反射.....	4
2、神經突觸之塑性	
2-1、神經突觸之塑性.....	5
2-2、骨盆神經—外尿道括約肌反射.....	5
2-3、調控骨盆神經—外尿道括約肌反射的神經傳導物質..	6
2-3-1、麩胺酸.....	6
2-3-2、麩胺酸之作用機制.....	6
2-3-3、麩胺酸之調控.....	7

3、一氧化氮	
3-1、一氧化氮.....	8
3-2、一氧化氮合成酶.....	8
3-3、一氧化氮合成酶在下泌尿系統之分布.....	8
3-3-1、膀胱.....	9
3-3-2、尿道及膀胱頸.....	9
3-4、神經性一氧化氮合成酶之調節機制.....	10
4、睡眠剝奪	
4-1、睡眠簡介.....	11
4-2、睡眠剝奪之生理影響.....	11
4-3、一氧化氮對睡眠的影響.....	11
4-4、睡眠剝奪對長期增益效應的影響.....	12
四、研究目的	14
五、研究材料及方法	
1、實驗動物之準備	
1-1、實驗動物的飼養.....	15
1-2、實驗設計.....	15
2、動物處理	
2-1、睡眠剝奪處理.....	16
2-2、一般手術.....	16
3、電生理的實驗	
3-1、電刺激.....	18
3-2、藥品給予之紀錄.....	18

4、西方點墨分析	
4-1、檢體之處理.....	20
4-2、西方點墨法.....	20
5、免疫組織化學分析	
5-1、檢體之處理.....	21
5-2、NADPH-d 組織化學反應.....	22
5-3、NOS 免疫組織化學反應.....	22
6、資料處理及統計方法.....	23
7、實驗藥品.....	23
8、實驗溶液配製.....	24
9、實驗儀器.....	25
六、實驗結果	
1、骨盆神經—外尿道括約肌反射之活性.....	26
2、反覆性刺激引發骨盆神經—外尿道括約肌反射之活性.....	26
3、Glutamatergic 拮抗劑對骨盆神經—外尿道括約肌反射活性 之影響	
3-1、椎管內給予 CNQX.....	26
3-2、椎管內給予 APV.....	27
4、Glutamatergic 促進劑對骨盆神經—外尿道括約肌反射活性 之影響	
4-1、椎管內給予 Glutamate.....	27
4-2、椎管內給予 NMDA.....	28
5、Nitrinergic 對骨盆神經—外尿道括約肌反射活性的影響...	28

6、一氧化氮合成酶之蛋白質表現	
6-1、西方點墨法.....	29
6-2、免疫組織化學法.....	29
七、討論	
1、睡眠剝奪對骨盆神經—外尿道括約肌反射活性之影響.....	30
2、一氧化氮對骨盆神經—外尿道括約肌反射活性之調控.....	31
3、睡眠剝奪對脊髓內神經性一氧化氮合成酶表現之影響.....	32
4、結論.....	34
5、未來研究方向.....	34
八、參考文獻.....	35
九、附錄.....	49



圖次

圖一、控制儲尿及排尿反射之神經路徑圖.....	50
圖二、骨盆神經—外尿道括約肌反設路徑神經電刺激配置圖.....	51
圖三、測試性刺激引發骨盆神經—外尿道括約肌反射之肌動作電位.....	52
圖四、骨盆傳入神經測試性刺激引發反射之平均潛伏期.....	53
圖五、骨盆傳入神經反覆性刺激引發反射之肌動作電位圖.....	54
圖六、給予骨盆傳入神經反覆性刺激，對骨盆神經—外尿道括約肌反射塑性之影響.....	55
圖七、Glutamatergic 拮抗劑 (CNQX) 對反覆性刺激引發骨盆神經—外尿道括約肌反射之活性的影響.....	56
圖八、Glutamatergic 拮抗劑 (CNQX) 影響反覆性刺激 (RS) 引發骨盆神經—外尿道括約肌反射活性之統計圖.....	57
圖九、Glutamatergic 拮抗劑 (APV) 對反覆性刺激引發骨盆神經—外尿道括約肌反射活性的影響.....	58
圖十、Glutamatergic 拮抗劑 (APV) 影響反覆性刺激 (RS) 引發骨盆神經—外尿道括約肌反射活性之統計圖.....	59
圖十一、Glutamatergic 促進劑 (Glutamate) 對測試性刺激 (TS) 引發骨盆神經—外尿道括約肌反射之活性的調控影響.....	60
圖十二、Glutamatergic 促進劑 (Glutamate) 對測試性刺激 (TS) 引發骨盆神經—外尿道括約肌反射之活性的統計圖.....	61
圖十三、Glutamatergic 促進劑 (NMDA) 對測試性刺激 (TS) 引發骨盆神經—外尿道括約肌反射之活性的調控影響.....	62

圖十四、Glutamatergic 促進劑 (NMDA) 對測試性刺激 (TS) 引發骨盆神經—外 尿道括約肌反射之活性的統計圖.....	63
圖十五、Nitrinergic 拮抗劑 (L-NAME) 與促進劑 (L-Arg) 對反覆性刺激引發骨 盆神經—外尿道括約肌反射之活性的調控影響.....	64
圖十六、Nitrinergic 拮抗劑 (L-NAME) 與促進劑 (L-Arg) 對反覆性刺激引發骨 盆神經—外尿道括約肌反射之活性的統計圖.....	65
圖十七、利用西方點墨法比較控制 (C) 與睡眠剝奪(TSD) 組在骨盆傳入神經反 覆性刺激 1 小時前後，脊髓 (L6-S2) 內 nNOS 蛋白表現量之差異....	66
圖十八、利用西方點墨法比較控制 (C) 與睡眠剝奪 (TSD) 組在骨盆傳入神經反 覆性刺激 1 小時前後，脊髓 (L6-S2) 內 p-NOS 蛋白表現量之差異...	67
圖十九、利用組織化學法比較控制 (C) 與睡眠剝奪(TSD) 組在骨盆傳入神經反 覆性刺激 1 小時前後，脊髓 (L6) 內 NADPH-d 表現量之差異.....	68
圖二十、利用組織化學法比較控制 (C) 與睡眠剝奪(TSD) 組在骨盆傳入神經反 覆性刺激 1 小時前後，脊髓 (S2) 內 NADPH-d 表現量之差異.....	69
圖二十一、利用免疫組織化學法比較控制 (C) 與睡眠剝奪(TSD) 組在骨盆傳入 神經反覆性刺激 1 小時前後，脊髓 (L6) 內 nNOS 表現量之差異.....	70
圖二十二、利用免疫組織化學法比較控制 (C) 與睡眠剝奪(TSD) 組在骨盆傳入 神經反覆性刺激 1 小時前後，脊髓 (S2) 內 nNOS 表現量之差異.....	71

縮寫表

CNS	central nervous system
DRG	dorsal root ganglia
EEG	electroencephalography
eNOS	endothelial NOS
EUS	external urethral sphincter
EUS-EMG	external urethral sphincter-electromyogram
GLU	glutamate
ICV	intracerebroventricular
IL-1	interleukin-1
iNOS	inducible NOS
IUS	internal urethral sphincter
L-Arg	L-arginine
LTP	long term potentiation
LUT	lower urinary treat
nNOS	neuronal NOS
NO	nitric oxide
NOS	nitric oxide synthase
NREM	non-rapid eye movement
PUR	pelvic nerve-urethral reflex
REM	rapid eye movement
RS	repetitive stimulation
TS	test stimulation
TSD	total sleep deprivation
VGCC	voltage-gated calcium channel

一、中文摘要

骨盆神經-外尿道括約肌反射 (pelvic nerve-urethral reflex, PUR) 會引發尿道括約肌的收縮及維持儲存尿液期間的自律性，在藥理試驗也證實在骨盆神經-外尿道括約肌反射的活性是透過麩胺酸 NMDA 接受器所調控的；此外，給予睡眠剝奪後在大鼠的海馬回會減低長期增益效應 (Long-term potentiation, LTP) 或是給予快速動眼期睡眠剝奪則有抑制 LTP 的現象；一氧化氮 (NO) 會間接調控許多生理及病理上神經退化性疾病的神經突觸塑性的活性。因此本篇實驗主要目的想探討給予睡眠剝奪後，骨盆神經-外尿道括約肌反射的活性是否會有影響，並且 NO 是否參與其調控；更進一步想探討脊髓內 nNOS 的表現量之變化情形。

本實驗使用大鼠並在椎管內注射 Glutamatergic 拮抗劑及促進劑，亦注射 Nitrinergic 拮抗劑及促進劑，並取下脊髓 (L6-S2) 組織，來探討 nNOS 蛋白質表現量之變化。實驗動物經睡眠剝奪的處理後，發現反覆性刺激引發骨盆神經—外尿道括約肌反射之活性有降低之情形。Glutamatergic 拮抗劑，可抑制反覆性刺激所引發 PUR 之活性；給予睡眠剝奪後，亦有此抑制現象產生。Glutamatergic 促進劑，可增加測試性刺激所引發 PUR 之活性；給予睡眠剝奪後，亦有此增加趨勢。Nitrinergic 拮抗劑，可抑制反覆性刺激所引發 PUR 之活性；給予睡眠剝奪後，亦可抑制此現象的產生。接著再給予 Nitrinergic 促進劑，可將此被抑制的情形恢復至原本反覆性刺激所產生的現象；給予睡眠剝奪後，亦有此回復現象的產生。

從西方點墨法與免疫組織化學法的結果可以發現，在脊髓 (L6-S2) 組織中，確實有神經性一氧化氮合成酶 (nNOS) 及磷酸化神經性一氧化氮合成酶 (p-NOS) 蛋白質的表現，並在給予電刺激下，nNOS 蛋白質表現有略高的現象，此外，給予睡眠剝奪下，nNOS 蛋白質表現量有降低之情形。

由本篇實驗結果顯示，動物給予睡眠剝奪後，會降低反覆性刺激引發 PUR 之活性，推論睡眠剝奪可能對下泌尿系統儲尿功能造成傷害及神經退化的現象。

二、英文摘要

The aim of this study was to examine the participation of nitrinergic neurotransmission in the stimulation-induced potentiation on pelvic nerve-to-urethra reflex (PUR) activities and determine the neuronal nitric oxide synthase (nNOS) reactivity of lower spinal levels (L6-S2), which mediated micturition function after total sleep deprivation (TSD). The magnitude of the repetitive stimulation (RS, 1 Hz)-induced potentiation in PUR activity decreased significantly in the TSD group when compared with the control groups (19.86 ± 1.39 and 9.43 ± 1.39 spikes/stimulation in control and TSD group; respectively, $P < 0.01$, $n=7$). The magnitude of the RS induced potentiation in PUR activity decreased significantly after intrathecal 6-Cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX; from 15.36 ± 1.11 to 7.21 ± 0.74 , and from 9.44 ± 0.44 to 5.44 ± 0.58 spikes/stimulation in control, and TSD, respectively, $P < 0.01$, $n=7$) and D-2-amino-5-phosphonoraleric acid (APV, from 17.38 ± 1.30 to 2.94 ± 0.34 , and from 9.44 ± 0.44 to 2.25 ± 0.31 spikes/stimulation in control, and TSD, respectively, $P < 0.01$, $n=7$). In addition, potentiation in PUR activities was induced by intrathecal L-glutamate (from 1.50 ± 0.22 to 26.50 ± 0.50 , and from 1.33 ± 0.21 to 5.67 ± 0.42 spikes/stimulation in control, and TSD, respectively, $P < 0.01$, $n=7$) and N-methyl-Daspartic acid (from 1.17 ± 0.17 to 11.50 ± 1.50 , and from 1.33 ± 0.21 to 3.83 ± 0.40 spikes/stimulation in control, and TSD); Intrathecal L-NAME blocked repetitive stimulation induced potentiation in pelvic-urethral reflex activities (from 14.56 ± 0.80 to 3.67 ± 0.71 , and from 9.33 ± 0.33 to 3.67 ± 0.33 spikes/stimulation in control, and TSD $P < 0.01$, $n=7$). Intrathecal L-Arg reversed the blocking effects exerted by L-NAME on repetitive stimulation-induced pelvic-urethral reflex potentiation (from 3.67 ± 0.71 to 14.17 ± 1.19 , and from 3.67 ± 0.33 to 9.67 ± 0.33 spikes/stimulation in control, and TSD $P < 0.01$, $n=7$).

nNOS activities were found in the lower spinal levels. In addition, following TSD

treatment, the intensity of nNOS reactivity were reduced when compared with control group (n=5). All the results suggest that the increased nNOS in spinal levels appears to be related with the RS-induced potentiation in PUR activity and decrease of nNOS expression may deteriorate the spinal neurotransmission and result in the TSD-induced micturition dysfunction.



三、文獻回顧

1、下泌尿系統生理學

下泌尿系統的主要功能是儲存及排除尿液，這些複雜且精細的生理動作需要藉由膀胱 (bladder)、內尿道括約肌 (internal urethral sphincter, IUS) 及外尿道括約肌 (external urethral sphincter, EUS) 等部位互相協調配合才能順利完成。

1-1、下泌尿系統之解剖構造

下泌尿系統分為兩部份，一部份為膀胱 (bladder)，另一部份為尿道 (urethra)。膀胱，是一個中空，具有彈性的器官，又可再區分為膀胱本體及膀胱三角 (trigone) 兩部分，(1) 膀胱本體：由平滑肌 (smooth muscle) 或是稱逼尿肌 (detrusor muscle) 所組成；(2) 膀胱三角：由兩端輸尿管開口 (ureteral openings) 和尿道出口 (urethral orifices) 所形成的三角區域。尿道分成尿道內括約肌及尿道外括約肌，(1) 尿道內括約肌：位於膀胱頸 (neck) 與尿道的接合處，由平滑肌所構成，會自主性收縮；只有在膀胱逼尿肌收縮時，膀胱內壓升高到閾值，才會舒張使尿液排出；(2) 尿道外括約肌：由橫紋肌所構成，當膀胱內壓升高時，可由意識控制外尿道括約肌收縮不讓尿液流出。而以上各個部位或是器官之間的運動，皆由腦部、脊髓及周邊神經系統組成的複雜神經迴路協調運作所完成 (de Groat and Yoshimura, 2001; Morrison *et al.*, 2005)。

1-2、下泌尿系統之神經支配

儲存及週期性排除尿液是取決於下泌尿系統兩種功能單位之活性：(1) 儲存 (reservoir)：膀胱；(2) 出口 (outlet)：由膀胱頸、尿道及橫紋肌的外尿道括約肌所構成 (Fry *et al.*, 2005; Morrison *et al.*, 2005)。上述結構是由以下三種周邊神經系統所相互調控的，即薦髓的副交感神經系統 (parasympathetic nervous system)：骨盆神經

(pelvic nerve)；胸腰髓的交感神經系統 (sympathetic nervous system)：下胃神經及交感神經鏈 (hypogastric nerve and sympathetic chain)和薦髓的體神經系統 (somatic nervous system)：陰部神經 (pudendal nerve) (Morrison *et al.*, 2005)。

1-2-1、薦髓之副交感神經路徑 (Sacral parasympathetic pathways)

膀胱的興奮性神經衝動主要來自薦髓的副交感神經，膽鹼性 (cholinergic) 的節前神經元位在薦髓灰質的中間外側區 (intermediolateral region) (Morgan *et al.*, 1993)，它的軸突經由骨盆神經與位在骨盆神經叢 (pelvic plexus) 及膀胱壁上的神經節之節後神經元形成突觸，副交感節前神經末梢釋放出神經傳導物質主要是乙醯膽鹼，透過菸鹼性膽鹼機制 (nicotinic cholinergic mechanism) 活化不同的接受器，包括蕁毒鹼性 (muscarinic)、腎上腺素激導性 (adrenergic)、嘌呤性 (purinergic) 及胜肽性 (peptidergic) 之接受器來興奮節後神經元 (de Groat & Booth, 1993)；副交感神經節後神經元釋放膽鹼性神經傳導物質，乙醯膽鹼 (acetylcholine) 和非腎上腺素非膽鹼性 (nonadrenergic-noncholinergic) 神經傳導物質來刺激膀胱平滑肌的收縮 (Andersson, 1993; Andersson & Arner, 2004; Morrison *et al.*, 2005)。

1-2-2、胸腰髓之交感神經路徑 (Thoracolumbar sympathetic pathways)

交感神經節前神經元位於胸腰髓 (T11-L2) 灰質的中間外側區，之後在腸繫膜下神經節 (inferior mesenteric ganglion) 與脊柱旁神經節 (paravertebral ganglia) 和骨盆神經節 (pelvic ganglia) 的節後神經元形成突觸 (Jänig and Morrison, 1986; de Groat *et al.*, 1993; de Groat and Booth, 1993)；交感神經節前神經末端釋放神經傳導物質為乙醯膽鹼，與菸鹼性接受器 (nicotinic receptors) 結合；交感神經節後神經末端釋放神經傳導物質為正腎上腺素 (norepinephrine)，與腎上腺素激導性接受器 (adrenoceptors) 結合，促進膀胱底部 (bladder base) 與尿道平滑肌收縮與膀胱體 (bladder body) 舒張 (Andersson, 1993; de Groat and Booth, 1993)；此外，交感神經節後神經元亦傳神經衝動給膀胱的副交感神經節，可促進或抑制副交感神經節之神經傳導 (de Groat and Booth, 1993)。

1-2-3、體神經之傳出神經路徑 (Somatic efferent pathways)

支配屬橫紋肌的外尿道括約肌和骨盆底部肌肉群 (pelvic floor musculature) 的體神經運動神經元 (motoneurons) 是源自薦髓 (S2-S4) 灰質的前角 (anterior horn) 的 Onuf's 核 (Onuf's nucleus)；體神經末端釋放之神經傳導物質為乙醯膽鹼，與菸鹼性接受器結合，促使外尿道括約肌收縮 (de Groat and Booth, 1993)。

1-2-4、傳入神經路徑 (Afferent pathways)

膀胱脹滿或是疼痛的感覺衝動會經由骨盆和下胃神經的傳入神經軸突傳達至脊髓內 (Jänig and Morrison, 1986; Häbler *et al.*, 1990)；這些傳入神經的細胞體位於脊髓的 S2-S4 和 T11-L2 的背根神經節 (dorsal root ganglia, DRG) 內；這些傳入神經纖維是源自膀胱壁上的牽張接受器 (stretch receptors) 和痛覺接受器 (nociceptors)，然後經過背根神經元到達脊髓；在排尿反射 (micturition reflex) 的最初期，傳入神經纖維是經由骨盆神經將神經衝動傳入薦髓；膀胱的傳入神經纖維包含有髓鞘神經 (myelinated fibers)，即 A δ 纖維 (A δ -fiber) 或是無髓鞘 (unmyelinated) 神經，即 C 纖維 (C-fibers) 軸突 (de Groat *et al.*, 1981; Mallory *et al.*, 1989; Vera and Nadelhaft, 1990)。

1-3、 排尿功能 (micturition)：

排尿反射的神經調控可歸納為三個層次：(1) 周邊層次 (Peripheral level)：由胸腰髓 (T11-L2) 發出的交感神經 (下胃神經)、由薦髓 (S2-S4) 發出的副交感神經 (骨盆神經) 及由薦髓 (S2-S4) 發出的體神經 (陰部神經) 共同調控；(2) 脊髓層次 (spinal level)：主要是由脊髓內的傳入神經、聯絡神經元、傳出神經和上、下行路徑等調控；(3) 上脊髓層次 (supraspinal level)：主要是由位在橋腦的泌尿中樞所調控。

正常的排尿功能分為儲尿反射 (storage reflexes) 及排尿反射 (voiding reflexes) (圖一)。

1-3-1、儲尿反射 (Storage reflexes)

維持儲尿功能的反射有二，其一為經由下胃神經抑制膀胱逼尿肌，使膀胱舒張，同時興奮尿道括約肌，促使尿道收縮；陰部神經會促進尿道外括約肌，而使尿道收縮，即為骨盆-陰部神經反射 (pelvic-pudendal nerve reflex)，膀胱便可維持低壓來自律調節尿液蓄積 (urine continence)(Kuru, 1965; de Groat, 1995; Vaughan and Satchell, 1995)。由此可知尿液的儲存主要是經由脊髓反射路徑 (spinal reflex pathway) 所調控，來自橋腦的下行訊息也會經由活化陰部運動神經元 (pudendal motoneurons) 來增加尿道的阻力 (urethral resistance)。

1-3-2、排尿反射 (Voiding reflexes)

骨盆傳入神經在儲尿期間會隨著膀胱內壓力漸漸變大而增加活性，當膀胱內容積達到引起排尿的閾值 (threshold) 時，膀胱壁上的牽張接受器 (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，經由橋腦排尿中樞的處理 (integration) 之後，會下行傳達排尿訊息至脊髓，抑制下胃神經，使內尿道括約肌舒張；同時抑制陰部神經，使外尿道括約肌舒張，而使尿道內壓降低以利排尿；另外，中樞的下行訊息同時促進骨盆傳出神經，使膀胱逼尿肌收縮，使尿液得以排出。所以排尿反射是由脊髓-腦幹-脊髓路徑 (spinobulbospinal pathway) 所調控 (de Groat and Booth, 1980; Yoshimura and de Groat, 1997)。此外，在人類排尿時，逼尿肌是處在張力性收縮的狀態，尿道則呈現協調性舒張狀態；但大鼠排尿時，尿道則呈現間歇性收縮-舒張的活動，故大鼠的尿液是以滲漏的方式排出。因此，當整個排尿反射的過程，若任何一部份有協調上的問題時，整體的排尿功能就會受到影響 (de Groat, 1995; de Groat *et al.*, 1998; de Groat and Yoshimura, 2001)。

2、神經突觸之塑性 (Synaptic plasticity)

2-1、神經突觸之塑性 (synaptic plasticity)

許多腦部組織中的神經突觸，給予反覆性刺激作用 (repetitive activation)，會調節神經突觸的傳訊功能 (Macklis and Madison, 1991; Siegelbaum and Kandel, 1991)。在神經突觸給予傳入性的重複刺激時，會激發傳出神經活性增加的形式有兩種：第一種形式稱為長期增益效應 (Long-term potentiation, LTP)(Bliss and Lomo, 1970; Bliss and Gardner-Medwin, 1971)，在神經突觸的傳入纖維給予強且反覆性的刺激後，會有長時間且持久性的增強效果，近二十年來在海馬回 (hippocampus) CA1 區產生的長期增益效應已被廣泛地研究，因為它被認為是學習及記憶的形成過程中的基本的機制 (Siegelbaum and Kandel, 1991)；第二種形式則稱為 wind-up，在脊髓的背角神經元 (dorsal horn neurons) 給予低頻且反覆性的刺激下，可引發動作電位數有漸進性增加的情形 (Woolf, 1983, 1991)。

2-2、骨盆神經-外尿道括約肌反射 (pelvic-urethral reflex, PUR)

尿液的儲存是膀胱很重要的功能之一。在排尿週期 (micturition cycle) 的儲尿期間，膀胱擴張會引起感覺衝動，由骨盆傳入神經纖維經過背角進入脊髓 (de Groat, 1993)，經由脊髓整合訊息後，運動衝動藉由陰部傳出神經纖維傳至外尿道括約肌 (Kamo *et al.*, 2003)，使之收縮，此過程稱為骨盆神經-外尿道括約肌反射 (pelvic nerve-urethral reflex, PUR)。因骨盆神經-外尿道括約肌反射會引發尿道括約肌的收縮及維持儲尿期間膀胱良好的順應性 (de Groat and Yoshimura, 2001)，故在儲尿功能扮演重要角色。最近對骨盆神經-外尿道括約肌反射活性的研究指出，在骨盆傳入神經纖維給予反覆性或是強直性的刺激，會引起長時間且持續性的增益效應 (long-lasting potentiation)；另外，經由藥理試驗也證實骨盆神經-外尿道括約肌反射的活性是透過麩胺酸的 NMDA 接受器所調控的 (Lin, 2003, 2004)。

2-3、調控骨盆神經-外尿道括約肌反射的神經傳導物質

麩胺酸 (glutamate)，在調控排尿反射迴路中扮演著重要的角色 (Mayer and Westbrook, 1987; Maggi and Conte, 1990; Yoshiyama *et al.*, 1993, 1995)。

2-3-1、麩胺酸 (glutamate)

麩胺酸主要是經由活化離子通透性 (ionotropic) 和代謝性 (metabotropic) 接受器 (Honore *et al.*, 1988; Watkins *et al.*, 1990) 產生興奮性反應，麩胺酸離子通透性接受器是一種陽離子配基控制通道 (ligand-gated cation channels)，此類接受器分別有三種型式：N-methyl-D-aspartate (NMDA)、alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate (AMPA) / quisqualate (QA) 及 kainate 接受器。其中 AMPA 和 kainate 型通道為鈉、鉀離子通透控制，而 NMDA 型通道則屬於鈉、鉀及鈣離子通透性之通道 (Mayer and Westbrook, 1987)。麩胺酸代謝性接受器則透過活化 G- 蛋白來控制離子通透的開啟。因此，鈣離子主要是經由 NMDA 接受器的活化和經由電位控制鈣離子通道 (voltage-gated calcium channel, VGCC) 的方式流入細胞 (Onuma *et al.*, 1998)。

2-3-2、麩胺酸之作用機制

在麩胺酸調控反射塑性下，反覆性刺激骨盆傳入神經纖維，會使麩胺酸的釋放增加，並且導致突觸後膜 (postsynaptic membrane) 去極化 (depolarization)，接著鈣離子經由 L-type 的鈣離子通道流入細胞內，但是受 NMDA 接受器所調控，最後使得細胞內鈣離子濃度上升，來進行一連串的細胞反應 (Sheardown *et al.*, 1990)。

2-3-3、麩胺酸之調控

在過去許多文獻證實，麩胺酸在調控排尿反射迴路中扮演著重要的角色 (Mayer and Westbrook, 1987; Maggi and Conte, 1990; Yoshiyama *et al.*, 1993, 1995)。早期也有文獻指出，當在大鼠及貓的排尿反射中樞注射麩胺酸，發現會促進膀胱排尿 (Mallory *et al.*, 1991; Willette *et al.*, 1988)。另外，也有許多文獻報告顯示，當 NMDA receptor 或 AMPA receptor 受到影響後，會使得正常的排尿反射受到抑制 (Maggi and Conte, 1990)。根據神經電生理研究 (Kruse *et al.*, 1990)，以電刺激的方式刺激排尿反射中樞，會誘導膀胱收縮而引發排尿；然而，預先給予 glutamatergic antagonist 處理後，包括非競爭性 NMDA receptor antagonist (MK-801) 與競爭性 NMDA receptor antagonist (LY274614； Yoshiyama *et al.*, 1991, 1993)，再施予電刺激的方式來刺激排尿反射中樞，則發現電刺激所引發的膀胱排尿收縮以及引起外尿道括約肌的活性增加等會受到抑制。另外，在 1995 年 Yoshiyama 等人將麻醉性的大鼠利用靜脈給予 AMPA/kainite receptor antagonists (GYKI-52466) 處理後，再以電刺激的方式刺激排尿反射中樞時，由電刺激所引發的膀胱排尿收縮會受到抑制，因此認為 NMDA receptor 或 AMPA/kainite receptor 的被活化對於排尿反射是必要的步驟 (Yoshiyama *et al.*, 1995)。在 1986 年 Potashner 等人，將天竺鼠 (guinea pig) 的脊髓兩側背根神經切斷 (dorsal bilateral rhizotomy) 後，發現脊髓背角內的麩胺酸的含量有顯著的減少。因此，推測中樞神經系統及脊髓內主要的興奮性神經傳遞物質為麩胺酸，在脊髓層次上調控排尿反射的迴路中可能扮演著極重要的角色。

3、一氧化氮 (Nitric oxide, NO)

3-1、一氧化氮

一氧化氮 (NO) 是一種半衰期短 (short-lived)、迅速擴散 (rapidly diffusible) 和自由基 (free radical) 氣體，在神經發展 (neuronal development) 及神經突觸塑性扮演重要的訊息傳遞物質 (Gally *et al.*, 1990; Garthwaite, 1991)。一氧化氮在許多器官中扮演重要的生理角色，例如調節血管平滑肌張力 (vascular smooth muscle tone) 和增殖 (proliferation)，在中樞及周邊神經系統也扮演神經傳導物質的角色；除此之外，一氧化氮亦影響膀胱及尿道的舒張，一氧化氮在下泌尿道也扮演神經傳導物質的角色 (Ho *et al.*, 2004)，對於下泌尿道功能的神經調控亦扮演調控的角色 (Ignarro *et al.*, 1987; Bredt and Snyder, 1990; Moncada *et al.*, 1991)。

3-2、一氧化氮合成酶

一氧化氮的生成是經由一氧化氮合成酶 (nitric oxide synthase, NOS) 將 L-精氨酸 (L-arginine, L-Arg) 轉變為 L-瓜胺酸 (L-citrulline) 和一氧化氮 (Bredt and Snyder, 1990)。一氧化氮合成酶有三種明確的異構體 (isoform)，第一型主要是發現在神經元細胞，稱為神經性一氧化氮合成酶 (neuronal NOS, nNOS)；第二型主要是在巨噬細胞 (macrophages) 內發現，稱為誘導性一氧化氮合成酶 (inducible NOS, iNOS)；第三型主要是發現在內皮細胞 (endothelial cells)，稱為內皮性一氧化氮合成酶 (endothelial NOS, eNOS)(Knowles and Moncada, 1994; Forstermann *et al.*, 1994)。NADPH-d (α -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-diaphorase)是神經性一氧化氮合成酶活化的輔酶之一，因此可以做為在組織化學實驗上神經性一氧化氮合成酶活性的指標 (Wolf, 1997)。

3-3、一氧化氮合成酶在下泌尿系統之分布

在動物和人類的下泌尿道組織中，已被證實有內皮性、神經性及誘導性一氧化

氮合成酶的表現，包括膀胱移行上皮細胞 (urothelium)、平滑肌、橫紋肌、神經及血管，皆發現有一氧化氮合成酶活性存在 (Mumtaz *et al.*, 2000; Mamas *et al.*, 2003)。

3-3-1、膀胱 (bladder)

主要在膀胱體的移行上皮細胞 (urothelium) 發現有一氧化氮合成酶活性，逼尿肌接受較少的一氧化氮型神經支配 (nitrinergic innervations)，對一氧化氮的敏感性比尿道略低 (Mumtaz *et al.*, 2000; Mamas *et al.*, 2003)。有研究顯示，在人類膀胱逼尿肌組織可以辨識到內皮性一氧化氮合成酶的表現，在膀胱移行上皮細胞則有較少的內皮性一氧化氮合成酶的表現；而神經性一氧化氮合成酶僅表現在黏膜下層表面 (submucosal surface)，以及在肌肉細胞之間的一氧化氮型神經纖維 (nitrinergic fibers)(Fathian-Sabet *et al.*, 2001) 中被發現。

3-3-2、尿道及膀胱頸 (urethra and bladder neck)

一氧化氮在許多的器官中包括下泌尿道系統，扮演一種非正腎上腺素性、非膽鹼性的神經傳導物質。在動物模式實驗中，使用免疫組織化學 (immunohistochemistry) 試驗發現一氧化氮合成酶-containing 神經纖維通過骨盆神經節後，主要支配到尿道，而此類纖維較少支配膀胱逼尿肌。在大鼠實驗中，刺激支配尿道的副交感神經，會引起一氧化氮依賴性調控尿道平滑肌舒張，而且移除主要骨盆神經節，則會抑制一氧化氮依賴性調控尿道平滑肌的舒張 (Mumtaz *et al.*, 2000; Mamas *et al.*, 2003)，若系統性地給予一氧化氮供給物，可使尿道及膀胱頸舒張；反之，給予一氧化氮合成酶抑制劑，可以抑制一氧化氮的生成，使尿道及膀胱頸的舒張受到抑制 (Bennett *et al.*, 1995)，由此可推論一氧化氮是調節尿道及尿道括約肌舒張的重要物質。近年在女性尿道橫紋肌肌纖維膜 (sacrolemma) 內也發現有一氧化氮合成酶的免疫反應 (immunoreactivities)，故一氧化氮在女性尿道內橫紋肌 (intramural striated muscle) 也扮演調控角色 (Ho *et al.*, 2003)。利用一氧化氮合成酶免疫反應和 NADPH-diaphorase (一氧化氮合成酶的指標) 的測定，在膀胱及尿道的傳入和傳出神經纖維上也被發現具一氧化氮合成酶活性 (Andersson and Persson,

1994; Smet *et al.*, 1994)。

3-4、神經性一氧化氮合成酶活性之調節機制

在大腦，神經性一氧化氮合成酶活化並生成一氧化氮，一氧化氮是一種新的二級傳訊物質，可以穿越細胞膜並且使鄰近細胞的生化反應路徑活化 (Bredt and Snyder, 1989, 1992; Brenman and Bredt, 1997; Esplugues, 2002; Moncada *et al.*, 1991)。NMDA 接受器是一種甦胺酸所調控的離子通道，在神經突觸的神經傳訊、神經的塑性和許多的病理狀態下扮演重要的角色 (Cull-Candy *et al.*, 2001)。NMDA 接受器會與神經性一氧化氮合成酶結合成為一個複合體，而神經性一氧化氮合成酶會受到神經突觸骨架蛋白 (synaptic scaffolding protein) PSD-95 的調控 (Christopherson *et al.*, 1999; Sattler *et al.*, 1999)。PSD-95 在 NMDA 接受器的細胞質表面且接近鈣離子流入通道的近端與神經性一氧化氮合成酶結合。鈣離子經由 NMDA 接受器調控流入神經元，以調節 NMDA 接受器下游之生化反應，藉由 PKC (Protein kinase C)、CaMKII (Calcium/Calmodulin-dependent protein kinase II) 及 PKA (Protein kinase A) 的磷酸化所調節，使得神經性一氧化氮合成酶活化及產生一氧化氮 (Bredt and Snyder, 1989; Hayashi *et al.*, 1999; Nakane *et al.*, 1991)。在大腦組織，利用西方點墨法及結合特定磷酸化蛋白的抗體，發現正常情況下，神經性一氧化氮合成酶在 Ser⁸⁴⁷ 的位置會被磷酸化，該位置是被攜鈣蛋白激酶 (CaMKII) 進行磷酸化的位置 (Agostino *et al.*, 2004; Hayashi *et al.*, 1999)，攜鈣蛋白激酶將神經性一氧化氮合成酶磷酸化後，會部分地抑制鈣離子與攜鈣蛋白結合及抑制神經性一氧化氮合成酶的活性 (Komeima *et al.*, 2000)。興奮 NMDA 接受器促使鈣離子流入與攜鈣蛋白 (calmodulin) 結合後，可促使神經性一氧化氮合成酶去磷酸化及調節神經性一氧化氮合成酶 dimer 之間的電子轉移 (Panda *et al.*, 2001)。亦即鈣離子與攜鈣蛋白結合，可使神經性一氧化氮合成酶活化；當神經性一氧化氮合成酶在 Ser⁸⁴⁷ 的位置磷酸化，提供抑制神經性一氧化氮合成酶活性的機制。

4、睡眠剝奪 (sleep deprivation)

4-1、睡眠 (sleep) 簡介

睡眠是一個動態的腦部活動，由腦部數個構造及神經傳導物質所調控。由腦電波圖 (electroencephalography, EEG) 的紀錄來看，睡眠可分為二個階段：快速動眼期 (rapid eye movement, REM) 與非快速動眼期 (non-rapid eye movement, NREM)(Karni *et al.*, 1994)。

4-2、睡眠剝奪之生理影響

睡眠剝奪 (sleep deprivation) 或是睡眠喪失 (sleep loss) 都是一個造成極端地壓力性 (stressful) 的刺激。睡眠剝奪鼠在許多生理上 (physiological) 和行為節律 (behavioral rhythms) 有脫序 (desynchronization) 現象，包括：容易疲倦 (fatigue)、嗜睡 (sleepiness)、運動失調 (ataxia)、胃潰瘍 (gastric ulcers)、體重減輕，甚至導致死亡的現象 (Rechtschaffen *et al.*, 1983)。人體經短時間的睡眠喪失會導致顯著的認知不足 (cognitive deficits)，而長時間的睡眠干擾則使壽命有減少現象 (reduced longevity)(Horne, 1988; Kripke *et al.*, 1979)。在睡眠剝奪鼠的實驗發現當睡眠被剝奪 2-3 星期，可導致許多併發徵狀的特徵，包括：食物攝入 (food intake) 增加、體重減輕、能量消耗 (energy expenditure) 增加及體溫逐漸降低等現象 (Rechtschaffen *et al.*, 1983, Rechtschaffen and Bergmann, 1995)。

4-3、一氧化氮對睡眠的影響

一氧化氮影響許多基本的神經性功能，例如調節神經傳導物質的釋放及神經突觸之效力 (Scott and Bennett, 1993; Shibuki and Okada, 1991)。另外，如發展神經網路系統 (neural networks)、記憶 (memory)、性行為 (sexual behavior) 及攝食 (eating) 等許多複雜的神經功能，皆會受到一氧化氮的影響 (Gaily *et al.*, 1990; Hölscher and Rose, 1992; Mani *et al.*, 1994; Morley and Flood, 1991)。由此間接證據指出一氧化氮在

調節睡眠生理及腦部結構功能上扮演一個重要的角色。一氧化氮合成酶出現在中樞神經系統 (central nervous system, CNS) 的前腦基部 (basal forebrain) 及腦幹 (brainstem) 等局部區域，並參與睡眠的調節 (Vincent and Kimura, 1992)。有睡眠障礙時，在下視丘 (hypothalamus)、腦幹、小腦 (cerebellum) 及海馬回中一氧化氮合成酶的活性會有明顯地變化 (Ayers *et al.*, 1996)。在兔子及大鼠實驗中，抑制一氧化氮合成酶會導致睡眠喪失 (Kapás *et al.*, 1994b; Kapás *et al.*, 1994a)，並且在兔子實驗發現，抑制一氧化氮合成酶也會干擾睡眠活動因子 (somnogenic actions)：白介素-1 (interleukin-1, IL-1) 的產生 (Kapás *et al.*, 1994b)。另外，在側腦室 (intracerebroventricular, ICV) 注射或腦幹顯微注射一氧化氮合成酶抑制劑，會抑制非快速動眼睡眠期 (Kapás *et al.*, 1994b; Kapás *et al.*, 1993)。在睡眠與清醒的生理週期中 (sleep-wake cycle)，一氧化氮也扮演調節角色。抑制老鼠腦部一氧化氮的產生，則自發性睡眠 (spontaneous sleep) 會被抑制 (Kapás *et al.*, 1994a)，對失眠後的促睡反應現象也會降低 (Ribeiro *et al.*, 2000)；反之，給予一氧化氮供給物 molsidomine 與 S-nitroso-N-acetylpenicillamine，則可促使老鼠進入睡眠 (Kapás and Krueger, 1996; Datta *et al.*, 1997)。

4-4、睡眠剝奪對長期增益效應的影響

快速動眼期睡眠，在海馬回的 CA1 區、齒狀回 (dentate gyrus) 與內側鼻區內皮質 (medial entorhinal cortex) 可以持續記錄到與記憶固化 (memory consolidation) 有關的同步化 theta 波 (4-7 Hz) (Wetzel *et al.*, 1977; Culebras, 1996)。工作記憶 (working memory) 是一種儲存最近事件，並且很快就會消失的記憶圖象 (engram)，為海馬回處理的重要事物之一 (Culebras, 1996)。經過長期增益效應的作用，海馬回會產生神經突觸塑性與構造改變，工作記憶就會被強化成為長期記憶 (Graham, 1990)。當動物被剝奪睡眠後，短期記憶會因而改變，結果導致注意力無法集中、精神渙散、動力缺乏、無法強記，使得記憶的形成發生困難 (Nilsson *et al.*, 1989; Culebras, 1996)。而且，它們的立即回憶與長期記憶的能力也會減退 (Polzella, 1975)。最近研究也指出，大鼠給予睡眠剝奪後，會減低海馬回長期增益效應的產生

(Campbell *et al*, 2002)，或是進行快速動眼期的睡眠剝奪也有抑制長期增益效應的現象 (Kim *et al*, 2005)。另外，有研究證實，給予睡眠剝奪之後，發現 NADPH-d 與一氧化氮合成酶的活性降低，此即反映出長期睡眠剝奪後會導致記憶減退 (Hsu *et al.*, 2003)。



四、研究目的

利用睡眠剝奪機建立睡眠剝奪的動物模式，探討以下問題

1. 是否影響骨盆神經-外尿道括約肌反射的增益現象？
2. 一氧化氮是否參與骨盆神經-外尿道括約肌反射增益現象的調控？
3. 動物予以睡眠剝奪處理及反覆性刺激骨盆神經 1 小時之後，分析脊髓內神經性一氧化氮合成酶蛋白的表現有何變化？



五、研究材料及方法

1、實驗動物之準備

1-1、實驗動物的飼養

本實驗使用體重約 200 至 300 公克重的 Wistar 母鼠。實驗過程中，將大白鼠飼養在中山醫學大學動物中心，室內溫度維持在 20 ± 2 °C，溼度 65 ± 2 %，呼吸一般的空氣，光線提供由 7:00 AM 至 7:00 PM，使光線週期維持在白天和夜晚各 12 小時，並於每天給予充足之飲水和飼料。實驗過程中，動物的照護及飼養，均依循「國際實驗動物飼養管理及使用規範 (the International Guiding Principles for Animal Research)」。



1-2、實驗設計

實驗中將動物分組為：電生理實驗及神經性一氧化氮合成酶蛋白表現量兩大部分。

- (1) 電生理實驗部份，動物分成控制組 (C) 及睡眠剝奪組 (TSD)，共兩組。
- (2) 在神經性一氧化氮合成酶蛋白表現量部份，又將動物組分成：
 - a. 電刺激處理的控制組 (CR)
 - b. 無電刺激處理的控制組 (C)
 - c. 電刺激處理的睡眠剝奪組 (TSDR)
 - d. 無電刺激處理的睡眠剝奪組 (TSD)

2、動物處理

2-1、睡眠剝奪處理

睡眠剝奪的方式為根據在 2001 年 Lan 等人所改良的方法。進行睡眠剝奪的大白鼠置放於兩個透明箱中，透明箱為長立方型塑膠箱併之，每個大小為 60 (長) x 20 (寬) x 60 (高) 公分。二個塑膠箱中間有食物盒及飲水瓶，由大白鼠自由食用。二個塑膠箱中央底部有一個圓盤 (直徑 40 公分)，由定時器及電動馬達來控制轉動，轉動速度為 3.5 圈/分，每轉動 8 秒，停止 15 秒。塑膠箱底部盛水，約 10 公分深，水面低於圓盤，當圓盤緩慢轉動時，大白鼠需慢步逆向走動以免落入水中。這樣可造成大白鼠的睡眠剝奪，但不至於使大白鼠過度運動而勞累。每次可以有兩隻老鼠同時進行睡眠剝奪處理，每次剝奪時間為五天。

2-2、一般手術

(1) 動物麻醉：實驗當天，大白鼠於腹腔內注射長效型麻醉藥，氨基甲酸乙酯 (urethane, 1.2 g/Kg, 60%, Sigma)。

(2) 動物插管：

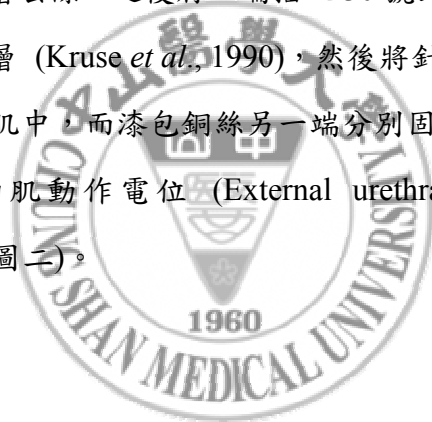
- a. 氣管插管：自頸部中線切開皮膚，分離出氣管，以 PE-260 (260 號聚乙烯管) 進行氣管插管，以維持自發性呼吸及防止分泌物阻塞呼吸道，必要時可供急救之用。
- b. 股靜脈插管：自大腿內側切開皮膚，分離出股靜脈，以 PE-50 進行股靜脈插管，以便灌注生理食鹽水來維持體液的平衡及補充麻醉劑來維持動物麻醉深度。
- c. 椎管內插管：自枕骨大孔與頸椎第一節交接處，切開皮膚露出硬膜後，用針頭尖端小心地劃破硬膜及蜘蛛膜兩層，以 PE-10 進行椎管內插管，將導管插入蜘蛛膜下腔至脊柱 T13 之

位置，以便灌注藥物到達脊髓神經 L6-S2 之位置。

d. 膀胱頂插管：自腹腔中線切開皮膚，找出膀胱，用小剪刀將膀胱頂剪個切口，以 PE-50 進行膀胱頂插管，將導管插入膀胱頂用棉線固定之，以便產生之尿液得以排出及增加尿道曝露面積。

(3) 骨盆傳入神經之分離與電刺激：將一側骨盆神經小心地分離出來並去除附於神經旁的組織，預留一小段，將遠心端剪斷，鉤於刺激電極上並給予電刺激。刺激電流，經由電刺激器 (Harvard, Student Stimulator, 50-4969) 到達不鏽鋼刺激電極上送至實驗動物體。

(4) 外尿道括約肌的肌動作電位記錄：將尿道露出後，取兩條漆包銅絲，先將兩端之絕緣層去除，之後將一端插入 30 號針頭，並彎成鈎狀，斜插入尿道外側肌肉層 (Kruse *et al.*, 1990)，然後將針頭取出，讓漆包銅絲電極埋入尿道括約肌中，而漆包銅絲另一端分別固定在輸入插座上以記錄尿道外括約肌的肌動作電位 (External urethral sphincter–electromyogram; EUS-EMG)(圖二)。



3、電生理的實驗

3-1、電刺激

- (1) 骨盆傳入神經測試性刺激 (test stimulation, TS) :

經由電刺激器，以每 30 秒一次，輸入一個穩定的閾值上(suprathreshold) 刺激，刺激強度介於 5-25 伏特，且在外尿道括約肌的肌動作電位圖上，動作電位數維持穩定的單一動作電位，持續紀錄 10 分鐘。

- (2) 骨盆傳入神經反覆性刺激 (repetitive stimulation, RS) :

經由電刺激器，得到穩定的測試性刺激強度後，將刺激頻率改為以每 1 秒一次，使外尿道括約肌的肌動作電位數逐漸增多至穩定狀態，持續紀錄 10 分鐘。

3-2、藥品給予之紀錄

- (1) 椎管內 (intrathecal) 給予 Glutamate，使用劑量為 0.1 mM、10 μ l :

經由每 30 秒一次之電刺激頻率，得到穩定的測試性刺激強度後，將刺激頻率改為每 1 秒一次，且在外尿道括約肌的肌動作電位數逐漸增多至穩定狀態，持續紀錄 10 分鐘，休息之後再將刺激頻率改為每 30 秒一次，經由椎管內給予 Glutamate 之藥物，紀錄外尿道括約肌的肌動作電位數之變化，持續紀錄 10 分鐘。

- (2) 椎管內 (intrathecal) 給予 NMDA，使用劑量為 0.1 mM、10 μ l :

經由每 30 秒一次之電刺激頻率，得到穩定的測試性刺激強度後，將刺激頻率改為每 1 秒一次，且在外尿道括約肌的肌動作電位數逐漸增多至穩定狀態，持續紀錄 10 分鐘，休息之後再將刺激頻率改為每 30 秒一次，經由椎管內給予 NMDA 之藥物，紀錄外尿道括約肌的肌動作電位數之變化，持續紀錄 10 分鐘。

(3) 椎管內 (intrathecal) 給予 CNQX，使用劑量為 0.1 mM、10 μ l：

經由每 30 秒一次之電刺激頻率，得到穩定的測試性刺激強度後，將刺激頻率改為每 1 秒一次，且在外尿道括約肌的肌動作電位數逐漸增多至穩定狀態，持續紀錄 10 分鐘，之後經由椎管內給予 CNQX 之藥物，紀錄外尿道括約肌的肌動作電位數之變化，持續紀錄 10 分鐘。

(4) 椎管內 (intrathecal) 給予 APV，使用劑量為 0.1 mM、10 μ l：

經由每 30 秒一次之電刺激頻率，得到穩定的測試性刺激強度後，將刺激頻率改為每 1 秒一次，且在外尿道括約肌的肌動作電位數逐漸增多至穩定狀態，持續紀錄 10 分鐘，之後經由椎管內給予 APV 之藥物，紀錄外尿道括約肌的肌動作電位數之變化，持續紀錄 10 分鐘。

(5) 椎管內 (intrathecal) 給予 L-NAME 及 L-arginine，使用劑量皆為 0.1 mM、10 μ l：

經由每 30 秒一次之電刺激頻率，得到穩定的測試性刺激強度後，將刺激頻率改為每 1 秒一次，且在外尿道括約肌的肌動作電位數逐漸增多至穩定狀態，持續紀錄 10 分鐘，之後經由椎管內給予 L-NAME 之藥物，紀錄外尿道括約肌的肌動作電位數之變化，持續紀錄 10 分鐘，再由椎管內給予 L-arginine 之藥物，紀錄外尿道括約肌的肌動作電位數之變化，持續紀錄 10 分鐘。

4、西方點墨分析 (Western blotting analysis)

4-1、檢體之處理

動物分成電刺激處理的控制組 (CR)、無電刺激處理的控制組 (C)、電刺激處理的睡眠剝奪組 (TSDR) 及無電刺激處理的睡眠剝奪組 (TSD)，共四組。

- (1) 電刺激處理的控制組：將正常之大鼠給予骨盆神經反覆性刺激處理，持續刺激 1 小時。
- (2) 無電刺激處理的控制組：將正常之大鼠給予相同之手術，但不給予骨盆神經反覆性刺激處理。
- (3) 電刺激處理的睡眠剝奪組：將睡眠剝奪五天之大鼠給予骨盆神經反覆性刺激處理，持續刺激 1 小時。
- (4) 無電刺激處理的睡眠剝奪組：將睡眠剝奪五天之大鼠給予相同之手術，但不給予骨盆神經反覆性刺激處理。

處理完之後，以過量的麻醉劑將實驗動物犧牲，並以生理食鹽水灌流之，立即收集這四組之脊髓神經 L6-S2 之檢體並先由液態氮保存再由 -80°C 保存之，觀察神經性一氧化氮合成酶蛋白質表現量。

4-2、西方點墨法

以含有蛋白質水解酶抑制劑之組織均質液將檢體均質化 (在冰浴中進行之)，其後以 14000 rpm 離心 30 分鐘 (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 蛋白質量的上清液與 4 倍 sample buffer 混合之，於沸水 (100°C) 煮沸反應 7 分鐘，以利蛋白質的變性展開 (denature)。再置於冰上冷卻，低速離心後將蛋白質檢體注入 8% 聚醯胺 (polyacrylamide) 電泳膠片的凹槽中，加入電泳緩衝液 (electro buffer)，先以 65V 之電壓電泳分離蛋白質 30 分鐘後，再以 120V 之電壓進

行分離，分離結束後，再將膠片上之蛋白質轉印 (transfer) 至 PVDF (polyvinylidene difluoride membrane, PerkinElmer Life Sciences, INC)，放入轉印槽中以 100V 進行轉印 90 分鐘，轉印結束後以阻斷緩衝液 (6% non-fat milk in TBS buffer) 室溫下進行 1 小時，接著使用稀釋 1000 倍的神經性一氧化氮合成酶的初級抗體 (rabbit polyclonal antibodies to nNOS, 155 kDa; Senta Cruz Biotechnology, INC) 在 4°C 下進行隔夜震盪反應，結束後以 Tris buffer saline (TBS) 清洗 3 次各 10 分鐘，再使用稀釋 2000 倍的二級抗體 (goat anti-rabbit peroxidase-labeled antibody; Senta Cruz Biotechnology, INC) 進行 4°C 下 1 小時的震盪反應，結束後進行同上之清洗步驟，最後使用 ECL reagents (PerkinElmer Life Sciences, INC) 與 PVDF membrane 反應，以冷光螢光影像分析儀 (Fujifilm USA Inc, LAS-3000) 來分析位於分子量約 155KD 處的主要帶狀墨漬。接下來使用去除溶液 (stripping buffer) 將 PVDF membrane 震盪反應去除 nNOS 之抗體，結束後以 Tris buffer saline (TBS) 清洗 3 次各 10 分鐘，使用稀釋 200 倍的磷酸化一氧化氮合成酶的初級抗體 (rabbit polyclonal antibodies to p-NOS, Senta Cruz Biotechnology, INC) 在 4°C 下進行隔夜震盪反應，結束後以 Tris buffer saline (TBS) 清洗 3 次各 10 分鐘，再使用稀釋 2000 倍的二級抗體 (goat anti-rabbit peroxidase-labeled antibody; Senta Cruz Biotechnology, INC) 進行 4°C 下 1 小時的震盪反應，結束後進行同上之清洗步驟，最後使用 ECL reagents (enhanced chemiluminescence reagents, PerkinElmer Life Sciences, INC) 與 PVDF membrane 反應，以冷光螢光影像分析儀 (Fujifilm USA Inc, LAS-3000) 來分析磷酸化一氧化氮合成酶之主要帶狀墨漬。

5、免疫組織化學分析

5-1、檢體之處理

動物分成電刺激處理的控制組 (CR)、無電刺激處理的控制組 (C)、電刺激處理的睡眠剝奪組 (TSDR) 及無電刺激處理的睡眠剝奪組 (TSD)，共四組。

實驗動物經處理後，將動物經腹腔內注射麻醉藥做深度麻醉。待動物完全昏迷，

便將其固定於厚質木板上，以手術刀切開胸腔，暴露出心臟後，以 18 號針頭插入左心室，導入生理食鹽水，同時以小剪剪開右心耳以引流血液，讓生理食鹽水沖淨體內殘存之血液成分。待體內血液洗淨後，經左心室導入含有 4% 三聚甲醛 (paraformaldehyde) 之 0.1 M 磷酸鹽緩衝液 (phosphate buffer, PB, pH 7.4) 內，於室溫下灌流 40 分鐘。灌流後，以骨鉗打開動物脊柱，使其暴露出脊髓。以手術刀取下脊髓與背根神經節後，將之置放於濃度漸增 (10%~30%) 之蔗糖磷酸鹽緩衝液內，置於 4°C 環境下隔夜。以冷凍切片機將組織塊切成 30 μ m 厚之切片，並進行如下之組織化學或免疫組織化學反應。

5-2、NADPH-d 組織化學反應

首先將切片置於 0.1M 之磷酸鹽緩衝液中充分潤洗三次，每次五分鐘。潤洗後，將切片置於每毫升含 0.1 毫克 nitro blue tetrazolium (Sigma, N-6876, USA Inc) 及 1 毫克 β -NADPH (Sigma, N-1630, USA Inc) 之磷酸鹽緩衝液中，於 37°C 環境下反應一小時。反應時間結束後，以蒸餾水潤洗反應切片數次，以徹底洗淨殘存之反應液。最後將切片貼於經動物膠 (gelatin) 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，最後再經二甲苯 (xylene) 透明化後，用封片膠 (Permount) 封片。

5-3、一氧化氮合成酶免疫組織化學反應

首先將切片置於 0.01M 之磷酸鹽食鹽緩衝液 (phosphate buffer saline, PBS, pH 7.4) 充分潤洗，再將切片置於含 10% 甲醇 (methanol) 及 3% 過氧化氫 (H_2O_2) 之 0.01M PBS 中，於室溫環境下充分反應震盪一小時，以去除內生性過氧化氫。反應後，將切片以 0.01M PBS 充份潤洗，再將欲進行 NOS 免疫反應之切片置於含有 3% 羊血清 (normal goat serum) 及 2% 牛血清蛋白 (bovine serum albumin) 之 0.01M PBS 中，於室溫下作用一小時，以去除非專一性結合。之後，將切片培養在上述步驟之混合液所稀釋的 NOS 一級抗體 (rabbit anti-neuronal NOS polyclonal antibody, Chemicon, 1:500) 中，並於 4°C 環境下，震盪反應 48 小時。反應後將切片以 0.01M

PBS 充份潤洗，並將欲進行 NOS 免疫反應之切片培養於 1:200 之維辛素結合羊抗兔血清 (biotinylated goat anti-rabbit IgG) 中，於室溫下作用兩小時。反應後將切片以 0.01M PBS 充份潤洗，再將切片經 Avidin-Biotin Complex (1:100) 反應，於室溫下反應一小時。反應結束後以 0.05M Tris buffer, pH 7.6 充份潤洗切片三次，每次十分鐘。接著以 DAB (3,3' diaminobenzidine tetra-hydrochloride, Sigma D-5637, USA Inc) 進行呈色反應。DAB 呈色液配置法為：每 20 毫升 Tris buffer 中，含 DAB 5 毫克，過氧化氫 12 μ l。呈色後，將切片貼於經動物膠 (gelatin) 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，最後再經二甲苯 (xylene) 透明化後，用封片膠 (Permount) 封片。最後以光學顯微鏡 (ZEISS Axioplan 2, Germany) 觀察拍照。

6、資料處理及統計方法

實驗數據以平均值 \pm 標準誤差 (mean \pm S.E.M) 表示實驗數據之差異，統計則採用 Student's t-test 檢測各組間差異，並選定 P 值小於 0.05 者，表示有顯著差異。

7、實驗藥品

本實驗所使用之藥品及劑量如下：

1. 氨基甲酸乙酯 (Urethane)：美國 Sigma 公司出品。作為麻醉劑使用，使用劑量為 1.2 g/Kg 體重。
2. 麩胺酸 (L-glutamate)：美國 Sigma 公司出品。作為 NMDA 接受器之促進劑使用，使用劑量為 0.1 mM、10 μ l。
3. N-methyl-D-aspartic acid (NMDA)：美國 Sigma 公司出品。作為 NMDA 接受器之促進劑使用，使用劑量為 0.1 mM、10 μ l。
4. 6-Cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX)：美國 Sigma 公司出品。作為 AMPA 接受器之拮抗劑使用，使用劑量為 0.1 mM、10 μ l。

5. D-2-amino-5-phosphonoraleric acid (APV)：美國 Sigma 公司出品。作為 NMDA 接受器之拮抗劑使用，使用劑量為 0.1 mM、10 μ l。
6. N ω -Nitro-L-arginine (L-NAME)：美國 Sigma 公司出品。作為 NOS 之抑制劑使用，使用劑量為 0.1 mM、10 μ l。
7. 精胺酸 (L-arginine)：美國 Sigma 公司出品。作為 NO 之前驅物使用，使用劑量為 0.1 mM、10 μ l。

8、實驗溶液配製

本實驗所使用之溶液及劑量如下：

1. 均質液 (Homogenizing medium, pH 7.6)：100 mM imidazole (6.808 g)、50 mM Na₂EDTA (1.861 g)、200 mM sucrose (68.460 g)、0.1 % sodium deoxycholate (1 g)，以二次水定量到 1 L。
2. 4 倍 Sample Buffer (4X Sample Buffer)：Tris-HCl (pH 6.8) (10 ml)、0.125 M DTT (0.96375 g)、10 % SDS (20 ml)、100 % Glycerol (10 ml)、bromphenol blue (二平匙)，以二次水定量到 50 ml。
3. Electro Buffer：Tris-base (3 g)、Glycine (14.4 g)、SDS (1 g)，以二次水定量到 1000 ml。
4. Transfer Buffer (pH 8.3)：Tris-base (9.1 g)、Glycine (43.2 g)、methanol (600 ml)，以二次水定量到 3000 ml。
5. Tris Buffer Saline (TBS)：Tris-base (3.99 g)、NaCl (27 g)、HCl (1.5ml)，以二次水定量到 3000 ml。
6. Blocking Buffer：6 % 安佳脫脂奶粉，泡製在 TBS 溶液內，每次實驗當天新鮮配製。

9、實驗儀器

本實驗所使用之儀器如下：

1. 睡眠剝奪機：根據 2001 年 Lan 等人所改良的方法。
2. 電刺激器：Harvard Student Stimulation，型號 50-4969，美國。
3. 神經訊號處理器：BIOPAC System Inc 出品，型號 MP 30，加拿大。
4. 冷光螢光影像分析儀：Fujifilm 出品，型號 LAS-3000，美國。
5. 光學顯微鏡：ZEISS 出品，型號 Axioplan 2，德國。



六、實驗結果

1、骨盆神經—外尿道括約肌反射之活性

在控制組與睡眠剝奪組，經由電刺激器，以每 30 秒一次，輸入一個穩定的刺激骨盆神經，刺激強度介於 5-25 V，且在外尿道括約肌的肌動作電位圖上動作電位數維持穩定的單一動作電位，持續紀錄 10 分鐘 (圖三、五, n=7)。以骨盆傳入神經測試性刺激 (TS) 引發反射的平均潛伏期 (latency) 時間分別為 (81.54 ± 3.40 and 85.12 ± 5.27 ms, $P > 0.05$, n=7)，兩組平均潛伏期時間均無統計上顯著差異 (圖四)。在 TS 引發反射的肌動作電位數，發現兩者肌動作電位數在統計上無顯著差異 (圖六)。

2、反覆性刺激引發骨盆神經—外尿道括約肌反射之活性

在控制組與睡眠剝奪組，經由電刺激器，得到穩定的測試性刺激強度後，將刺激頻率改為以每 1 秒一次，使外尿道括約肌的肌動作電位數逐漸增多至穩定狀態，持續紀錄 10 分鐘 (圖五, n=7)。以骨盆傳入神經反覆性刺激 (RS) 引發反射的肌動作電位數，發現睡眠剝奪組的肌動作電位數 (9.43 ± 1.39 , n=7) 低於控制組 (19.86 ± 1.39 , n=7)，且在統計上有顯著差異 (圖六, $P < 0.01$)。

3、Glutamatergic 拮抗劑對骨盆神經—外尿道括約肌反射活性之影響

3-1、椎管內給予 CNQX

在控制組與睡眠剝奪組，經由每 30 秒一次之電刺激頻率，得到穩定的測試性刺激強度後，將刺激頻率改為每 1 秒一次，且在外尿道括約肌的肌動作電位數逐漸

增多至穩定狀態 (RS)，持續紀錄 10 分鐘之後，經由椎管內給予 CNQX 之藥物，即 AMPA 接受器之拮抗劑，紀錄外尿道括約肌的肌動作電位數之變化 (圖七)。發現以 RS 所引發的肌動作電位數有統計學上的差異 (控制組 RS：15.36±1.11, n=7; 睡眠剝奪組 RS：9.44±0.44, n=7, P<0.01)，給予 CNQX 注射後，兩組皆受到部分抑制的現象 (控制組 RS+CNQX：7.21±0.74, n=7; 睡眠剝奪組 RS+CNQX：5.44±0.58, n=7) (圖八, P<0.01)。

3-2、椎管內給予 APV

在控制組與睡眠剝奪組，經由每 30 秒一次之電刺激頻率，得到穩定的測試性刺激強度後，將刺激頻率改為每 1 秒一次，且在外尿道括約肌的肌動作電位數逐漸增多至穩定狀態 (RS)，持續紀錄 10 分鐘之後，經由椎管內給予 APV 之藥物，即選擇性 NMDA 接受器之拮抗劑，紀錄外尿道括約肌的肌動作電位數之變化 (圖九)。可發現以 RS 所引發的肌動作電位數 (控制組 RS：17.38±1.30, n=7; 睡眠剝奪組 RS：9.44±0.44, n=7, P<0.01)，給予 APV 注射後，兩組皆有顯著受抑制的現象 (控制組 RS+APV：2.94±0.34, n=7; 睡眠剝奪組 RS+APV：2.25±0.31, n=7) (圖十, P<0.01)。

4、Glutamatergic 促進劑對骨盆神經—外尿道括約肌反射活性之影響

4-1、椎管內給予 Glutamate

在控制組與睡眠剝奪組，經由電刺激器，以每 30 秒一次，輸入一個穩定的刺激，且在外尿道括約肌肌動作電位圖上，動作電位數維持穩定的單一動作電位，持續紀錄 10 分鐘 (圖十一, n=7) 休息之後，經由椎管內給予 glutamate 之藥物，即 NMDA 接受器之促進劑，紀錄外尿道括約肌的肌動作電位數之變化 (圖十一)。可發現以 TS 所引發的肌動作電位數 (控制組 TS：1.50±0.22, n=7; 睡眠剝奪組 TS：1.33±0.21, n=7, P<0.01)，給予 glutamate 注射後，兩組皆有促進的現象 (控制組

TS+Glu : 26.50 ± 0.50 , n=7; 睡眠剝奪組 TS+Glu : 5.67 ± 0.42 , n=7) (圖十二, $P < 0.01$)。

4-2、椎管內給予 NMDA

在控制組與睡眠剝奪組，經由電刺激器，以每 30 秒一次，輸入一個穩定的刺激，且在外尿道括約肌的肌動作電位圖上，動作電位數維持穩定的單一動作電位，持續紀錄 10 分鐘 (圖十三, n=7) 休息之後，經由椎管內給予 NMDA 之藥物，即 NMDA 接受器之促進劑，紀錄外尿道括約肌的肌動作電位數之變化 (圖十三)。發現以 TS 所引發的肌動作電位數 (控制組 TS : 1.17 ± 0.17 , n=7; 睡眠剝奪組 TS : 1.33 ± 0.21 , n=7)，給予 NMDA 注射後，兩組皆有促進的現象 (控制組 TS+NMDA : 11.50 ± 1.50 , n=7; 睡眠剝奪組 TS+NMDA : 3.83 ± 0.40 , n=7) (圖十四, $P < 0.01$)。

5、Nitrinergic 對骨盆神經-外尿道括約肌反射之活性的影響

在控制組與睡眠剝奪組，經由每 30 秒一次之電刺激頻率，得到穩定的測試性刺激強度後，將刺激頻率改為每 1 秒一次，且在外尿道括約肌的肌動作電位數逐漸增多至穩定狀態時，持續紀錄 10 分鐘之後，經由椎管內給予 L-NAME 之藥物，紀錄外尿道括約肌的肌動作電位數之變化，再由椎管內給予 L-Arg 之藥物，紀錄外尿道括約肌的肌動作電位數之變化。發現以 RS 所引發的肌動作電位數在兩組中有顯著的差異 (控制組 RS : 14.56 ± 0.80 , n=7; 睡眠剝奪組 RS : 9.33 ± 0.33 , n=7, $P < 0.01$)。給予 L-NAME 注射後，兩組皆有受抑制的現象 (控制組 RS+L-NAME : 3.67 ± 0.71 , n=7; 睡眠剝奪組 RS+L-NAME : 3.67 ± 0.33 , n=7)，且在統計上有顯著差異 (圖十五、十六, $P < 0.01$)。接著再給予 L-Arg 注射後，兩組受抑制的現象皆有回復至之前 RS 的現象 (控制組 RS+L-NAME+L-Arg : 14.17 ± 1.19 , n=7; 睡眠剝奪組 RS+L-NAME+L-Arg : 9.67 ± 0.33 , n=7) (圖十五、十六, $P < 0.01$)。

6、一氧化氮合成酶之蛋白質表現

6-1、西方點墨法

使用西方點墨法做為一氧化氮合成酶之蛋白質表現之半定量測定，從數據中顯示 (圖十七、圖十八)，在脊髓 (L6-S2) 組織中，確實有神經性一氧化氮合成酶及磷酸化神經性一氧化氮合成酶 (p-NOS) 蛋白質的表現。在電刺激處理的控制組發現，脊髓中一氧化氮合成酶略高於控制組，但在統計上無顯著差異；在睡眠剝奪處理後，發現脊髓中一氧化氮合成酶略低於控制組，但在統計上無顯著差異 (圖十七, n=5)。另外，以西方點墨法作為磷酸化一氧化氮合成酶之蛋白質表現之半定量測定，從數據中顯示，在控制組電刺激處理後，發現脊髓中磷酸化一氧化氮合成酶略低於控制組，在統計上無顯著差異；在睡眠剝奪處理後，發現脊髓中磷酸化一氧化氮合成酶高於控制組，但在統計上無顯著差異 (圖十八, n=5)。

6-2、免疫組織化學法

使用組織化學法做為 NADPH-d 測定，從圖中顯示 (圖十九、二十)，在控制組電刺激處理後，發現脊髓中 NADPH-d 略高於控制組；在睡眠剝奪處理後，發現脊髓中 NADPH-d 低於控制組 (圖十九、二十, n=5)。另外，以免疫組織化學法做為一氧化氮合成酶之蛋白質表現測定，從圖中顯示 (圖二十一、二十二)，在控制組電刺激處理後，發現脊髓中一氧化氮合成酶略高於控制組；在睡眠剝奪處理後，發現脊髓中一氧化氮合成酶低於控制組 (圖二十一、二十二, n=5)。

七、討論

本研究實驗數據顯示：(1) 以 30 秒一次的頻率 (0.033 Hz) 刺激骨盆傳入神經，在外尿道括約肌紀錄動作電位，電刺激引發的動作電位數維持穩定的單一動作電位；每秒一次的刺激頻率 (1 Hz) 則使外尿道括約肌的肌動作電位數逐漸增多至穩定狀態，即表示在骨盆神經—外尿道括約肌反射塑性上，激發一個長時間且連續性的增益效果。(2) 實驗動物經睡眠剝奪的處理，發現反覆性刺激引發骨盆神經—外尿道括約肌反射之增益效應有降低之情形。(3) Glutamatergic 拮抗劑可抑制反覆性刺激引發骨盆神經—外尿道括約肌反射之增益效應；給予睡眠剝奪後，亦有此抑制現象產生。(4) Glutamatergic 促進劑使測試性刺激引發骨盆神經—外尿道括約肌反射之增益效應增加；動物經睡眠剝奪處理後也有相同的增加趨勢。(5) Nitrinergic 拮抗劑會抑制反覆性刺激引發骨盆神經—外尿道括約肌反射之增益效應，接著再給予 Nitrinergic 促進劑，可將此抑制情形回復至原本反覆性刺激的程度；動物經睡眠剝奪處理後也有相同的抑制趨勢，接著再給予 Nitrinergic 促進劑，亦有類似的回復現象產生。(6) 從西方點墨法與免疫組織化學法的結果可以發現，睡眠剝奪鼠在脊髓 (L6-S2) 組織中，神經性一氧化氮合成酶 (nNOS) 蛋白質表現量雖低於控制組，但未有顯著差異；分別在兩組動物的骨盆傳入神經給予電刺激處理後，神經性一氧化氮合成酶蛋白質表現量皆有增加趨勢，但未呈現顯著差異。

1、睡眠剝奪對骨盆神經—外尿道括約肌反射活性之影響

已知骨盆神經—外尿道括約肌反射能促進尿道括約肌的收縮及維持尿液儲存期間膀胱良好的順應性 (de Groat and Yoshimura, 2001)，本篇研究探討動物給予長期睡眠剝奪處理後，對在脊髓層次上調控骨盆神經—外尿道括約肌反射路徑神經塑性的影響。由結果顯示，動物給予睡眠剝奪後，顯著降低反覆性刺激引發骨盆神經—外尿道括約肌反射之塑性，推論睡眠剝奪可能對於下泌尿系統儲尿功能造成影響。

因為許多研究指出麩胺酸在調控排尿反射迴路中扮演著重要的角色 (Mayer and Westbrook, 1987; Maggi and Conte, 1990; Yoshiyama *et al.*, 1993, 1995)，由最近 Lin (2004) 的研究也證實，骨盆神經—外尿道括約肌反射的塑性是透過麩胺酸 NMDA 接受器所調控的。為了進一步了解及驗證骨盆神經—外尿道括約肌反射的塑性需依賴麩胺酸的機制，本篇實驗在大鼠椎管內注射 glutamatergic 拮抗劑後，發現骨盆神經—外尿道括約肌反射之塑性確實受到抑制，相反地，在椎管內注射 glutamatergic 促進劑則使骨盆神經—外尿道括約肌反射之增益效應增加；在實驗組睡眠剝奪鼠進行相同試驗，發現分別注射 glutamatergic 拮抗劑或促進劑後，骨盆神經—外尿道括約肌反射之增益效應亦有被抑制或促進的現象發生。上述結果與先前 Lin (2004) 之研究相符合，證實麩胺酸 NMDA 接受器在排尿反射路徑的控制上扮演興奮的角色，亦即當膀胱傳入神經興奮時，麩胺酸可調控骨盆神經—外尿道括約肌反射路徑之增益效應；實驗組睡眠剝奪鼠之骨盆神經—外尿道括約肌反射塑性明顯比控制組低，顯示此一反射的增益現象可因睡眠被剝奪而減弱，另外予以 glutamatergic 拮抗劑處理，骨盆神經—外尿道括約肌反射之增益效應明顯被抑制，抑制的程度則略低於控制組，給以 glutamatergic 促進劑處理後，可明顯促進該反射的塑性，增進塑性的程度則略低於控制組。由上述結果可推論睡眠剝奪可能會影響麩胺酸 NMDA 接受器的訊息傳遞路徑，進而減低骨盆神經—外尿道括約肌反射的增益現象。

2、一氧化氮對骨盆神經—外尿道括約肌反射活性之調控

一氧化氮除了在中樞及周邊神經系統扮演神經傳導物質，也對於下泌尿道功能的神經調控扮演調節的角色 (Ignarro *et al.*, 1987; Bredt and Snyder, 1992; Moncada *et al.*, 1991)。由一氧化氮與下泌尿道系統相關的文獻發現，如果系統性給予一氧化氮供給物，可使尿道及膀胱頸舒張；反之，給予一氧化氮合成酶抑制劑，可以抑制一氧化氮的生成，使尿道及膀胱頸的舒張受到抑制 (Bennett *et al.*, 1995)，可推知一氧化氮在膀胱平滑肌舒張以進行尿液儲存功能上可能扮演重要角色。另外有一氧化氮

影響睡眠的相關研究指出，抑制一氧化氮合成酶會導致睡眠喪失 (Kapás *et al.*, 1994a; Kapás *et al.*, 1994b)；或在睡眠與清醒的生理週期中，抑制腦部一氧化氮的產生，則老鼠自發性睡眠會被抑制 (Kapás *et al.*, 1994a)；反之，給予一氧化氮供給物，則可促使老鼠進入睡眠 (Kapás and Krueger, 1996; Datta *et al.*, 1997)。由上述文獻可知一氧化氮對膀胱尿液儲存功能的促進，以及正常自發性睡眠週期的維持扮演極重要的角色。目前尚未有任何相關研究在探討睡眠剝奪現象對骨盆神經—外尿道括約肌反射塑性有何影響，因此本篇實驗設計分別在控制組及實驗組睡眠剝奪鼠椎管內進行 Nitroergic 拮抗劑及促進劑的注射，來觀察反覆性電刺激引發骨盆神經—外尿道括約肌反射塑性的變化情形；兩組實驗動物的結果都顯示，拮抗劑顯著抑制反射的增益現象，隨後再注射促進劑，可將被抑制的反射活性回復至注射抑制劑前反覆性電刺激引發反射增益現象的程度。只是睡眠剝奪組的反射塑性，在給予抑制劑後被抑制的程度，以及給予促進劑後的回復能力都明顯低於控制組 (該實驗結果並未列出)，由此可推論，一氧化氮在骨盆神經—外尿道括約肌反射塑性的控制上，應該扮演活化的角色，當膀胱傳入神經被活化時，可藉由一氧化氮的路徑來調控骨盆神經—外尿道括約肌反射塑性，而睡眠剝奪的處理可能會影響一氧化氮的調控機制，進而減弱骨盆神經—外尿道括約肌反射塑性之增益程度。

3、睡眠剝奪對脊髓內神經性一氧化氮合成酶表現之影響

有研究利用免疫組織化學法發現，當發生坐骨神經損傷、骨盆神經損傷或是慢性膀胱發炎後，在腰薦髓之背根神經節的神經性一氧化氮合成酶蛋白表現量及其 mRNA 的產量都有顯著增加的現象 (Verge *et al.*, 1992; Zhang *et al.*, 1993; Vizzard *et al.*, 1995; Vizzard *et al.*, 1996)；另外 Rameau (2003) 等學者利用西方點墨法方式得知，給予 NMDA 接受器之調控藥劑，會影響大鼠皮質神經元磷酸化一氧化氮合成酶 (一氧化氮合成酶的不活化態) 的表現。由本實驗先前的結果可知，骨盆神經—外尿道括約肌反射塑性調控路徑的脊髓層次上，應是依賴麩胺酸 NMDA 及一氧化氮的機制所調控，當動物的睡眠受到剝奪，或給予 Nitroergic 拮抗劑後，會明顯降

低骨盆神經—外尿道括約肌反射塑性，因此本篇實驗希望利用西方點墨法與免疫組織化學法，進一步探討位在脊髓組織 (L6-S2) 的神經性一氧化氮合成酶及磷酸化神經性一氧化氮合成酶 (pNOS) 蛋白質的表現量的變化，希望在蛋白表現層次上更進一步驗證一氧化氮在該反射塑性上所扮演角色。由西方點墨法結果顯示，控制組在脊髓組織 (L6-S2) 的一氧化氮合成酶蛋白表現量高於實驗組睡眠剝奪鼠，但未達顯著差異；另外在兩組動物的骨盆傳入神經給予電刺激後，發現兩組動物一氧化氮合成酶蛋白表現量雖然比電刺激前有略高的趨勢，但在統計上也未達顯著差異。另外磷酸化神經性一氧化氮合成酶 (pNOS) 的表現也不如預期，追究原因可能是由於電刺激之強度、時間不足、取脊髓組織的方法或將整段脊髓 (L6-S2) 均質化以萃取蛋白的方法不夠專一，使得一氧化氮合成酶蛋白質表現量的增加量不如預期顯著。有其他研究利用腰髓背角的一半組織，即可觀察在脊髓組織特定蛋白如 Erk 1/2 蛋白的表現量 (Wei *et al.*, 2006)，本實驗在選取均質組織以萃取蛋白的部位可能應更專一，未來可朝此方式改進。

由免疫組織化學法的結果顯示，睡眠剝奪組在脊髓 (L6-S2) 組織中，不論是 NADPH-d 或一氧化氮合成酶蛋白的表現量都明顯比控制組低，電刺激處理則會促進控制組及實驗組的 NADPH-d 或一氧化氮合成酶蛋白的表現量，此現象與 Hsu 等人發現睡眠剝奪會降低大腦 NADPH-d 與一氧化氮合成酶的活性的結果相似。因此推論睡眠剝奪會影響及降低骨盆神經—外尿道括約肌反射的塑性及迴路中一氧化氮或其合成酶的表現量，可能造成下泌尿系統儲尿功能神經的退化現象。

4、結論

本篇實驗結果發現睡眠剝奪影響神經傳導物質一氧化氮的活性。本篇結論為睡眠剝奪影響睡眠及神經傳導物質一氧化氮的活性，進而導致膀胱 PUR 增益效應的減弱，可能造成下泌尿系統儲尿功能的減弱。

5、未來研究方向

本篇實驗證明了骨盆神經—外尿道括約肌反射路徑神經塑性是經由一氧化氮調節麩胺酸 NMDA 依賴性機制所控制，但在調控骨盆神經—外尿道括約肌反射塑性是否還有經由其他的路徑去控制，則需更進一步實驗去證實。

此外，在脊髓層次上，存在有許多不同的神經傳導物質或其接受器，本篇實驗只著重在神經性一氧化氮合成酶蛋白表現之探討，在電刺激下，神經性一氧化氮合成酶表現不如預期，是否在其他神經傳導物質或其接受器，給予電刺激下，其表現量有較顯著的影響，都需更進一步實驗去得知。

另外，本篇實驗發現長期睡眠剝奪會降低骨盆神經—外尿道括約肌反射塑性；已知一氧化氮是中樞神經調控睡眠的重要因子，睡眠剝奪確實使在脊髓層次上的神經性一氧化氮合成酶蛋白表現量降低。是否有不同的神經傳導物質在睡眠剝奪抑制骨盆神經—外尿道括約肌反射塑性之機制上也扮演調控角色，皆需更進一步實驗去得知。

八、參考文獻

Agostino PV, Ferreyra GA, Murad AD, Watanabe Y, Golombek DA (2004) Diurnal, circadian and photic regulation of calcium/calmodulin-dependent kinase II and neuronal nitric oxide synthase in the hamster suprachiasmatic nuclei. *Neurochem Int* 44:617-25.

Anderson KE (1993) Pharmacology of lower urinary tract smooth muscles and penile erectile tissues. *Pharmacol Rev* 45:253-308.

Andersson KE, Arner A (2004) Urinary bladder contraction and relaxation: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 84:935-86.

Andersson KE, Persson K (1994) Nitric oxide synthase and nitric oxide-mediated effects in lower urinary tract smooth muscles. *World J Urol* 12:274-80.

Ayers NA, Kapas L, Krueger JM (1996) Circadian variation of nitric oxide synthase activity and cytosolic protein levels in rat brain. *Brain Res* 707:127-30.

Bennett BC, Kruse MN, Roppolo JR, Flood HD, Fraser M, de Groat WC (1995) Neural control of urethral outlet activity in vivo: role of nitric oxide. *J Urol* 153:2004-9.

Bliss TV, Lomo T (1970) Plasticity in a monosynaptic cortical pathway. *J Physiol* 207:61P.

Bliss TV, Gardner-Medwin AR (1971) Long-lasting increases of synaptic influence in the unanesthetized hippocampus. *J Physiol* 216:32P-33P.

Bredt DS, Snyder SH (1990) Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:682-5.

Bredt DS, Snyder SH (1989) Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(22):9030-3.

Bredt DS, Snyder SH (1992) Nitric oxide, a novel neuronal messenger. *Neuron* 8(1):3-11. Review.

Brenman JE, Bredt DS (1997) Synaptic signaling by nitric oxide. *Curr Opin Neurobiol* 7:374-8.

Campbell IG, Guinan MJ, Horowitz JM (2002) Sleep deprivation impairs long-term potentiation in rat hippocampal slices. *J Neurophysiol* 88:1073-6.

Christopherson KS, Hillier BJ, Lim WA, Bredt DS (1999) PSD-95 assembles a ternary complex with the N-methyl-D-aspartic acid receptor and a bivalent neuronal NO synthase PDZ domain. *J Biol Chem* 274:27467-73.

Cull-Candy S, Brickley S, Farrant M (2001) NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Curr Opin Neurobiol* 11:327-35.

Culebras A (1996) Sleep and neuromuscular disorders. *Neurol Clin* 14:791-805.

Datta S, Patterson EH, Siwek DF (1997) Endogenous and exogenous nitric oxide in the pedunculopontine tegmentum induces sleep. *Synapse* 27:69-78.

de Groat WC, Booth AM (1980) Inhibition and facilitation in parasympathetic ganglia of the urinary bladder. *Fed Proc* 39(12):2990-6. Review.

de Groat WC, Nadelhaft I, Milne RJ, Booth AM, Morgan C (1981) Organization of the sacral parasympathetic reflex pathways to the urinary bladder and large intestine. *J Auton Nerv Syst* 3:135-60.

de Groat WC, Araki I, Vizzard MA, Yoshiyama M, Yoshimura N, Sugaya K, Tai C, Roppolo JR (1998) Developmental and injury induced plasticity in the micturition reflex pathway. *Behav Brain Res* 92(2):127-40. Review.

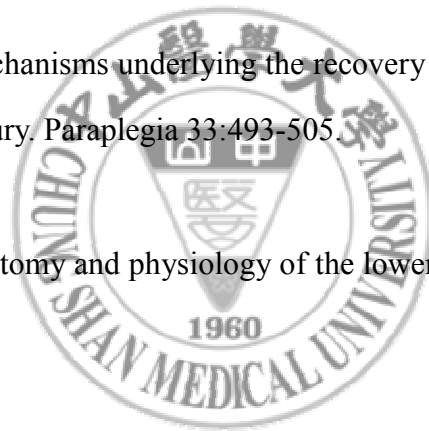
de Groat WC (1995) Mechanisms underlying the recovery of lower urinary tract function following spinal cord injury. *Paraplegia* 33:493-505.

de Groat WC (1993) Anatomy and physiology of the lower urinary tract. *Urol Clin North Am* 20:383-401.

de Groat WC, Booth AM (1993) Synaptic transmission in pelvic ganglia. In: *The Autonomic Nervous System, Vol.3, Nervous Control of the Urogenital System*, ed. Maggi CA pp.291-347. London: Harwood Academic Publishers.

de Groat WC (2006) Integrative control of the lower urinary tract: preclinical perspective. *Br J Pharmacol* 147:S25-S40.

de Groat WC, Yoshimura N (2001) Pharmacology of the lower urinary tract. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41:691-721. Review.



de Groat WC, Booth AM, Yoshimura N (1993) Neurophysiology of micturition and its modification in animal models of human disease. In: *The Autonomic Nervous System, Vol. 3, Nervous Control of the Urogenital System*, pp. 227-290. Ed C.A. Maggi. Harwood Academic Publishers, London.

Duncan AJ, Heales SJ (2005) Nitric oxide and neurological disorders. *Mol Aspects Med* 26:67-96.

Esplugues JV (2002) NO as a signalling molecule in the nervous system. *Br J Pharmacol* 135:1079-95.

Fathian-Sabet B, Bloch W, Klotz T, Niggemann S, Jacobs G, Addicks K, Engelmann U (2001) Localization of constitutive nitric oxide synthase isoforms and the nitric oxide target enzyme soluble guanylyl cyclase in the human bladder. *J Urol* 165:1724-9.

Forstermann U, Closs EI, Pollock JS, Nakane M, Schwarz P, Gath I, Kleinert H (1994) Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension* 23:1121-31. Review.

Fry CH, Brading AF, Hussain M, Lewis SA, Takeda M, Tuttle JB, Uvelius B, Wood DN, Drake M (2005) Cell biology. In: *Incontinence*, eds. Abrams P, Cardozo L, Khoury S, Wein A pp.313-362. Jersey: Health Publications, Ltd.

Gally JA, Montague PR, Reeke GN Jr, Edelman GM (1990) The NO hypothesis: possible effects of a short-lived, rapidly diffusible signal in the development and function of the nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:3547-51.

Gaily EK, Granstrom ML, Hiilesmaa VK, Bardy AH (1990) Head circumference in children of epileptic mothers: contributions of drug exposure and genetic background. *Epilepsy Res* 5:217-22.

Garthwaite J (1991) Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system. *Trends Neurosci* 14:60-7.

Graham RB (1990) Memory; in Graham, R.B. (ed): *Physiological Psychology*. California, Wadsworth Publishing Company. pp 611-647.

Habler HJ, Janig W, Koltzenburg M, McMahon SB (1990) A quantitative study of the central projection patterns of unmyelinated ventral root afferents in the cat. *J Physiol* 422:265-87.

Hayashi F, Yu H, Olshevskaya E, Duda T, Seno K, Sharma RK, Dizhoor AM, Yamazaki A (1999) Activation of retinal guanylyl cyclase-1 by Ca^{2+} -binding proteins involves its dimerization. *J Biol Chem* 274 (22):15547-55.

Honore T, Davies SN, Drejer J, Fletcher EJ, Jacobsen P, Lodge D, Nielsen FE (1988) Quinoxalinediones: potent competitive non-NMDA glutamate receptor antagonists. *Science* 241 (4866):701-3.

Ho KM, Borja MC, Persson K, Brading AF, Andersson KE (2003) Expression of nitric oxide synthase immunoreactivity in the human female intramural striated urethral sphincter. *J Urol* 169 (6):2407-11.

Ho MH, Bhatia NN, Khorram O (2004) Physiologic role of nitric oxide and nitric oxide synthase in female lower urinary tract. *Curr Opin Obstet Gynecol* 16 (5):423-9.

Horne JA (1988) Sleep loss and "divergent" thinking ability. *Sleep* 11 (6):528-36.

Holscher C, Rose SP (1992) An inhibitor of nitric oxide synthesis prevents memory formation in the chick. *Neurosci Lett* 145 (2):165-7.

Hsu JC, Lee YS, Chang CN, Chuang HL, Ling EA, Lan CT (2003) Sleep deprivation inhibits expression of NADPH-d and NOS while activating microglia and astroglia in the rat hippocampus. *Cells Tissues Organs* 173 (4):242-54.

Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G (1987) Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84 (24):9265-9.

Janig W, Morrison JF (1986) Functional properties of spinal visceral afferents supplying abdominal and pelvic organs, with special emphasis on visceral nociception. *Prog Brain Res* 67:87-114.

Kapás L, Fang J, Krueger JM (1994a) Inhibition of nitric oxide synthesis inhibits rat sleep. *Brain Res* 664 (1-2):189-96.

Kapás L, Shibata M, Kimura M, Krueger JM (1994b) Inhibition of nitric oxide synthesis suppresses sleep in rabbits. *Am J Physiol* 266 (1 Pt 2):R151-7.

Kapás L, Obal F Jr, Krueger JM (1993) Humoral regulation of sleep. *Int Rev Neurobiol* 35:131-60.

Kapás L, Krueger JM (1996) Nitric oxide donors SIN-1 and SNAP promote nonrapid-eye-movement sleep in rats. *Brain Res Bull* 41 (5):293-8.

Kamo I, Torimoto K, Chancellor MB, de Groat WC, Yoshimura N (2003)

Urethral closure mechanisms under sneeze-induced stress condition in rats: a new animal model for evaluation of stress urinary incontinence. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 285 (2):R356-65.

Karni A, Tanne D, Rubenstein BS, Askenasy JJ, Sagi D (1994) Dependence on REM sleep of overnight improvement of a perceptual skill. *Science* 265 (5172):679-82.

Kim EY, Mahmoud GS, Grover LM (2005) REM sleep deprivation inhibits LTP in vivo in area CA1 of rat hippocampus. *Neurosci Lett* 388 (3):163-7.

Knowles RG, Moncada S (1994) Nitric oxide as a signal in blood vessels.

Trends Biochem Sci 17 (10):399-402.

Komeima K, Hayashi Y, Naito Y, Watanabe Y (2000) Inhibition of neuronal nitric-oxide synthase by calcium/ calmodulin-dependent protein kinase IIalpha through Ser847 phosphorylation in NG108-15 neuronal cells. *J Biol Chem* 275 (36):28139-43.

Kripke DF, Simons RN, Garfinkel L, Hammond EC (1979) Short and long sleep and sleeping pills. Is increased mortality associated? *Arch Gen Psychiatry* 36(1):103-16.

Kruse MN, Noto H, Roppolo JR, de Groat WC (1990) Pontine control of the urinary bladder and external urethral sphincter in the rat. *Brain Res* 532(1-2):182-90.

Kuru M (1965) Nervous control of micturition. *Physiol Rev* 45:425-94.

Lan CT, Hsu JC, Ling EA (2001) Influence of sleep deprivation coupled with administration of melatonin on the ultrastructure of rat pineal gland. *Brain Res* 910:1-11.

Lin TB (2004) Tetanization-induced pelvic-to-pudendal reflex plasticity in anesthetized rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 287 (2):F245-51.

Lin TB (2003) Dynamic pelvic-pudendal reflex plasticity mediated by glutamate in anesthetized rats. *Neuropharmacology* 44 (2):163-70.

Macklis JD, Madison RD (1991) Neuroblastoma grafts are noninvasively removed within mouse neocortex by selective laser activation of intracellular photolytic chromophore. *J Neurosci* 11 (7):2055-62.

Maggi CA, Conte B (1990) Effect of urethane anesthesia on the micturition reflex in capsaicin-treated rats. *J Auton Nerv Syst* 30 (3):247-51.

Mallory BS, Roppolo JR, de Groat WC (1991) Pharmacological modulation of the pontine micturition center. *Brain Res* 546 (2):310-20.

Mallory B, Steers WD, De Groat WC (1989) Electrophysiological study of micturition reflexes in rats. *Am J Physiol* 257 (2 Pt 2):R410-21.

Mamas MA, Reynard JM, Brading AF (2003) Nitric oxide and the lower urinary tract: current concepts, future prospects. *Urology* 61 (6):1079-85.

Mani SK, Allen JM, Rettori V, McCann SM, O'Malley BW, Clark JH (1994) Nitric oxide mediates sexual behavior in female rats. *Proc Natl Acad Sci* 91 (14):6468-72.

Mayer ML, Westbrook GL (1987) The physiology of excitatory amino acids in the vertebrate central nervous system. *Prog Neurobiol* 28 (3):197-276.

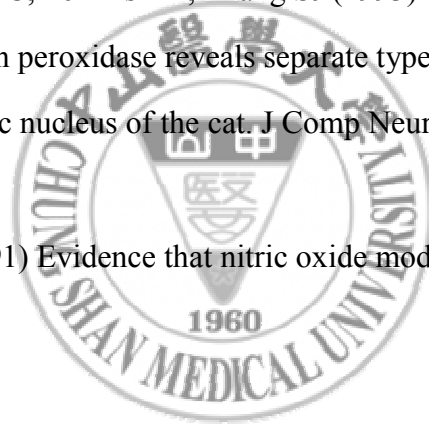
Moncada S, Rees DD, Schulz R, Palmer RM (1991) Development and mechanism of a specific supersensitivity to nitrovasodilators after inhibition of vascular nitric oxide synthesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci* 88 (6):2166-70.

Morgan CW, De Groat WC, Felkins LA, Zhang SJ (1993) Intracellular injection of neurobiotin or horseradish peroxidase reveals separate types of preganglionic neurons in the sacral parasympathetic nucleus of the cat. *J Comp Neurol* 331(2):161-82.

Morley JE, Flood JF (1991) Evidence that nitric oxide modulates food intake in mice. *Life Sci* 49 (10):707-11.

Morrison J, Birder L, Craggs M, de Groat WC, Downie J, Drake M, Fowler C, Thor K (2005) Neural control. In: *Incontinence*, eds. Abrams P, Cardozo L, Khoury S, Wein A pp.363-422. Jersey: Health Publications, Ltd.

Mumtaz FH, Shukla N, Sullivan ME, Thompson CS, Khan MA, Morgan RJ, Stansby G, Mikhailidis DP (2000) Inhibition of diabetic bladder smooth muscle cell proliferation by endothelin receptor antagonists. *Urol Res* 28 (4):254-9.



Nakane M, Mitchell J, Forstermann U, Murad F (1991) Phosphorylation by calcium calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase C modulates the activity of nitric oxide synthase. *Biochem Biophys Res Commun* 180 (3):1396-402.

Nilsson LG, Backman L, Karlsson T (1989) Priming and cued recall in elderly, alcohol intoxicated and sleep deprived subjects: a case of functionally similar memory deficits. *Psychol Med* 19 (2):423-33.

Onuma H, Lu YF, Tomizawa K, Moriwaki A, Tokuda M, Hatase O, Matsui H (1998) A calcineurin inhibitor, FK506, blocks voltage-gated calcium channel-dependent LTP in the hippocampus. *Neurosci Res* 30 (4):313-9.

Panda K, Ghosh S, Stuehr DJ (2001) Calmodulin activates intersubunit electron transfer in the neuronal nitric-oxide synthase dimer. *J Biol Chem* 276 (26):23349-56.

Polzella DJ (1975) Effects of sleep deprivation on short-term recognition memory. *J Exp Psychol* 104 (2):194-200.

Potashner SJ, Dymczyk L (1986) Amino acid levels in the guinea pig spinal gray matter after axotomy of primary sensory and descending tracts. *J Neurochem* 47:412-22.

Rameau GA, Chiu LY, Ziff EB (2003) NMDA receptor regulation of nNOS phosphorylation and induction of neuron death. *Neurobiol Aging* 24 (8):1123-33.

Rechtschaffen A, Gilliland MA, Bergmann BM, Winter JB (1983) Physiological correlates of prolonged sleep deprivation in rats. *Science* 221 (4606):182-4.

Rechtschaffen A, Bergmann BM (1995) Sleep deprivation in the rat by the disk-over-water method. *Behav Brain Res* 69 (1-2):55-63.

Ribeiro AC, Gilligan JG, Kapas L (2000) Systemic injection of a nitric oxide synthase inhibitor suppresses sleep responses to sleep deprivation in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 278 (4):R1048-56.

Sattler R, Xiong Z, Lu WY, Hafner M, MacDonald JF, Tymianski M (1999) Specific coupling of NMDA receptor activation to nitric oxide neurotoxicity by PSD-95 protein. *Science* 284 (5421):1845-8.

Scott TR, Bennett MR (1993) The effect of nitric oxide on the efficacy of synaptic transmission through the chick ciliary ganglion. *Br J Pharmacol* 110 (2):627-32.

Sheardown MJ, Nielsen EO, Hansen AJ, Jacobsen P, Honore T (1990) 2,3-Dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo (F) quinoxaline: a neuroprotectant for cerebral ischemia. *Science* 247 (4942):571-4.

Shibuki K, Okada D (1991) Endogenous nitric oxide release required for long-term synaptic depression in the cerebellum. *Nature* 349 (6307):326-8.

Siegelbaum SA, Kandel ER (1991) Learning-related synaptic plasticity: LTP and LTD. *Curr Opin Neurobiol* 1 (1):113-20.

Smet PJ, Edyvane KA, Jonavicius J, Marshall VR (1994) Distribution of NADPH-diaphorase-positive nerves supplying the human urinary bladder. *J Auton Nerv Syst* 47 (1-2):109-13.

Vaughan CW, Satchell PM (1995) Urine storage mechanisms. *Prog Neurobiol* 146 (2-3):215-37.

Vera PL, Nadelhaft I (1990) The conduction velocity and segmental distribution of afferent fibers in the rectal nerves of the female rat. *Brain Res* 526 (2):342-6.

Verge VM, Xu Z, Xu XJ, Wiesenfeld-Hallin Z, Hokfelt T (1992) Marked increase in nitric oxide synthase mRNA in rat dorsal root ganglia after peripheral axotomy: in situ hybridization and functional studies. *Proc Natl Acad Sci* 89 (23):11617-21.

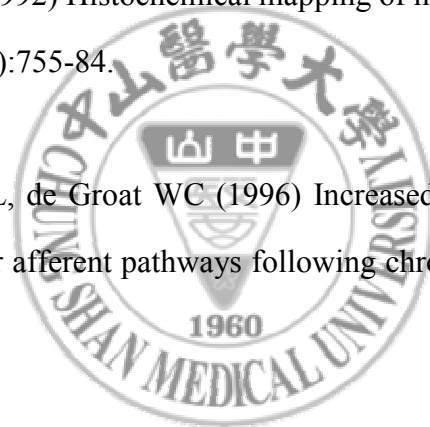
Vincent SR, Kimura H (1992) Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. *Neuroscience* 46(4):755-84.

Vizzard MA, Erdman SL, de Groat WC (1996) Increased expression of neuronal nitric oxide synthase in bladder afferent pathways following chronic bladder irritation. *J Comp Neurol* 370 (2):191-202.

Vizzard MA, Erdman SL, de Groat WC (1995) Increased expression of neuronal nitric oxide synthase (NOS) in visceral neurons after nerve injury. *J Neurosci* 15:4033-45.

Watkins JC, Krogsgaard-Larsen P, Honore T (1990) Structure-activity relationships in the development of excitatory amino acid receptor agonists and competitive antagonists. *Trends Pharmacol Sci* 11:25-33.

Wetzel W, Ott T, AMthies H (1977) Post-training hippocampal rhythmic slow activity ("theta") elicited by septal stimulation improves memory consolidation in rats. *Behav Biol* 21 (1):32-40.



Wei F, Vadakkan KI, Toyoda H, Wu LJ, Zhao MG, Xu H, Shum FW, Jia YH, Zhuo M (2006) Calcium calmodulin-stimulated adenylyl cyclases contribute to activation of extracellular signal-regulated kinase in spinal dorsal horn neurons in adult rats and mice. *J Neurosci* 26 (3):851-61.

Willette RN, Morrison S, Sapru HN, Reis DJ (1988) Stimulation of opiate receptors in the dorsal pontine tegmentum inhibits reflex contraction of the urinary bladder. *J Pharmacol Exp Ther* 244 (1):403-9.

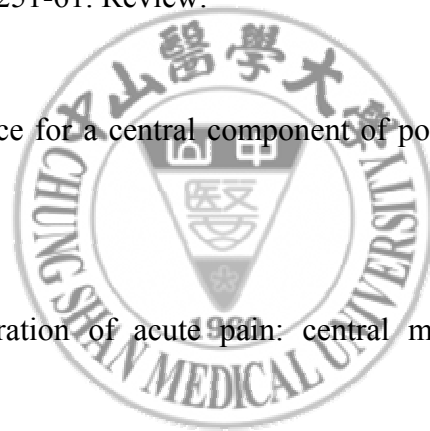
Wolf G (1997) Nitric oxide and nitric oxide synthase: biology, pathology, localization. *Histol Histopathol* 12(1):251-61. Review.

Woolf CJ (1983) Evidence for a central component of post-injury pain hypersensitivity. *Nature* 306 (5944):686-8.

Woolf CJ (1991) Generation of acute pain: central mechanisms. *Br Med Bull* 47 (3):523-33.

Yoshimura N, de Groat WC (1997) Neural control of the lower urinary tract. *Int J Urol* 4 (2):111-25.

Yoshiyama M, Roppolo JR, de Groat WC (1995) Effects of GYKI 52466 and CNQX, AMPA/kainate receptor antagonists, on the micturition reflex in the rat. *Brain Res* 691 (1-2):185-94.



Yoshiyama M, Roppolo JR, De Groat WC (1995) Interactions between NMDA and AMPA/kainate receptors in the control of micturition in the rat. *Eur J Pharmacol.* 287:73-8.

Yoshiyama M, Roppolo JR, Thor KB, de Groat WC (1993) Effects of LY274614, a competitive NMDA receptor antagonist, on the micturition reflex in the urethane-anaesthetized rat. *Br J Pharmacol* 110 (1):77-86.

Zhang X, Verge V, Wiesenfeld-Hallin Z, Ju G, Brecht D, Synder SH, Hokfelt T (1993) Nitric oxide synthase-like immunoreactivity in lumbar dorsal root ganglia and spinal cord of rat and monkey and effect of peripheral axotomy. *J Comp Neurol* 335 (4):563-75.



第21屆生物醫學聯合學術年會(95年度)

The 21th Joint Annual Conference
of Biomedical Sciences (2006)

論文摘要 Abstracts

中華民國毒物學學會
Toxicology Society of Taiwan
中國生理學會
The Chinese Physiological Society
台灣藥理學會
The Pharmacological Society in Taiwan
中華民國解剖學學會
The Association of Anatomists of the Republic of China
台灣生物化學及分子生物學學會
The Taiwan Society for Biochemistry and Molecular Biology
中華民國細胞及分子生物學學會
The Chinese Society of Cell and Molecular Biology
中華民國臨床生化學會
Chinese Association for Clinical Biochemistry

日期: 2006-03-18 至 2006-03-19
地點: 國防大學國防醫學院
(114台北市內湖區民權東路六段161號)

P062

DOWN-REGULATION OF NEURONAL NITRIC OXIDE SYNTHASE EXPRESSION IN THE SPINAL CORD OF TOTAL SLEEP DEPRIVED RATS

Hung-Ming Chang¹, Gin-Den Chen¹, Jiuann-Miaw Liao², Wei-Ching Chien^{2*}, Sheng-Yen Lin², Shih-Jei Tsai³, Ying-Jui Ho³, Tzer-Bin Lin^{2*}

Department of Anatomy¹, Physiology², Psychology³, College of Medicine, Chung-Shan Medical University, Taichung, Taiwan, Department of Gynecology and Obstetrics⁴, Neurology⁵, Hospital, Chung-Shan Medical University, Taichung, Taiwan.

The present study is aimed to determine the nitric oxide synthase (NOS) reactivity of lower spinal levels (L6-S2), which mediated micturition function after total sleep deprivation (TSD). Adult rats subjected to five days of TSD were sacrificed and processed for quantitative NOS immunostaining. The results indicated that in normal un-treated rats, neuronal NOS reactivity were found in the lower spinal levels. In addition, following TSD treatment, the intensity of NOS reactivity were reduced when compared with normal un-treated ones. All the results suggest decrease of NOS expression may deteriorate the spinal neurotransmission and result to the TSD-induced micturition dysfunction.

P063

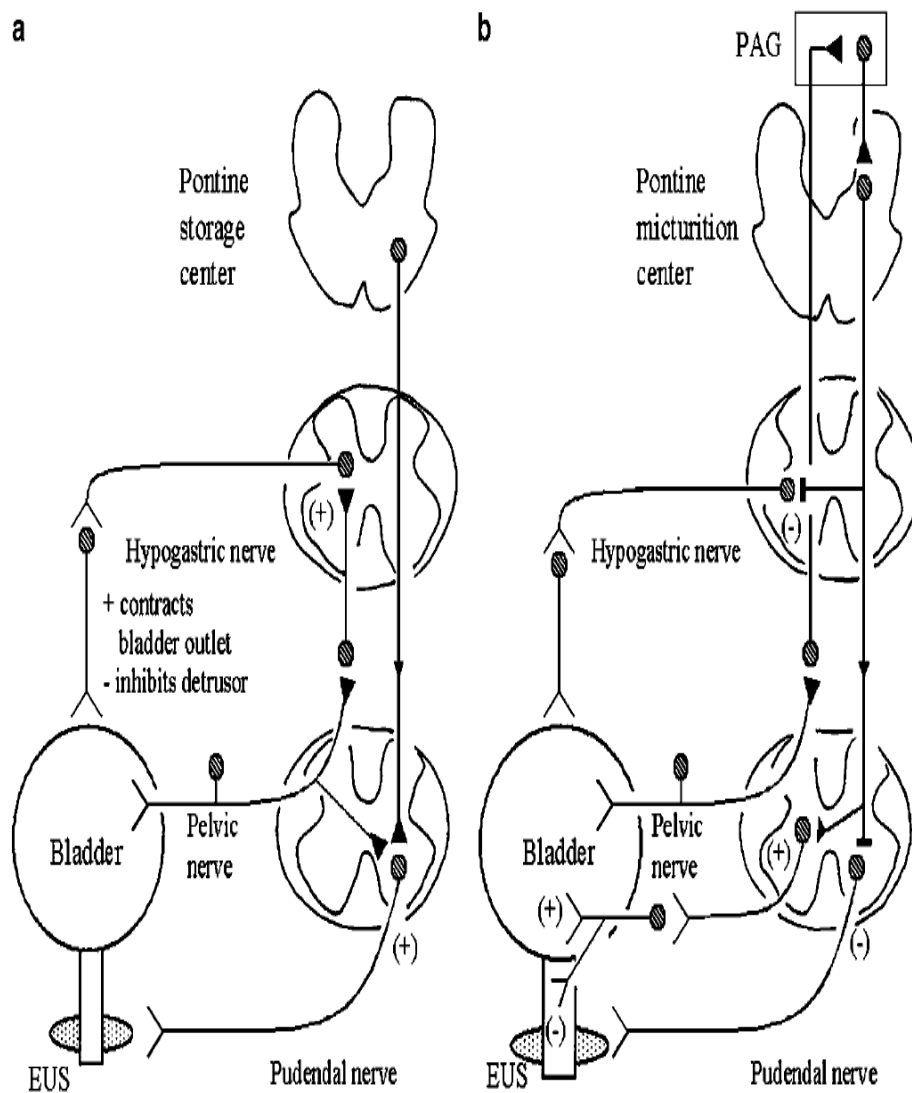
NEURONAL NITRIC OXIDE SYNTHASE DEPENDENT STIMULATION-INDUCED POTENTIATION ON PELVIC NERVE-TO-URETHRA REFLEX IN ANESTHETIZED RATS

Hung-Ming Chang¹, Gin-Den Chen¹, Jiuann-Miaw Liao², Wei-Ching Chien², Joyce C¹. Chen, She-Hong Lim², Chao-Hsun Yang⁶, Tzer-Bin Lin^{2*}

Department of Anatomy¹, Physiology, College of Medicine, Chung-Shan Medical University, Taichung, Taiwan, Department of Gynecology and Obstetrics, Hospital, Chung-Shan Medical University, Taichung, Taiwan, Department of Anatomy and Cell Biology, College of Medicine, National Taiwan University, Taipei, Taiwan, Department of Life Science, National Chung-Hsing University, Taichung, Taiwan, Department of Cosmetic Science, Providence University, Taichung, Taiwan

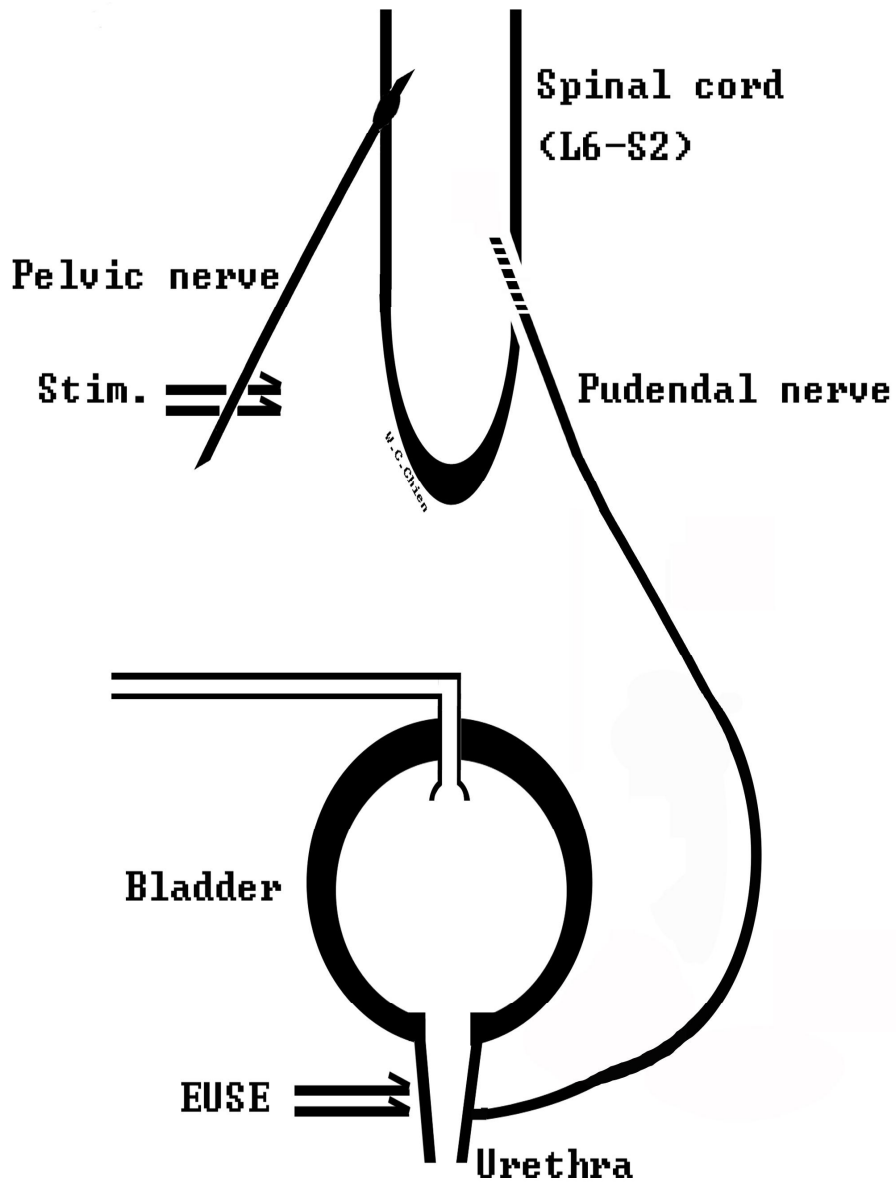
The aim of this study was to examine the participation of nitrenergic neurotransmission in the stimulation-induced potentiation on pelvic nerve-to-urethra reflex (PUR) activities. We characterized the PUR activity elicited by pelvic afferent nerve test stimulation (TS, 1/30Hz) and repetitive stimulation (RS, 1Hz) in rats. When compared with TS (1.00±0.33 spikes/stimulation, N=7), RS produced a potentiation in PUR activity (24.00±1.00 spikes/stimulation, N=7, P<0.01). Intrathecal *p*-2-amino-5-phosphonateralic acid (APV 100 μM, 10 μl) abolished (1.33±0.33 spikes/stimulation, N=4, P<0.01) and intrathecal 2,3-dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo (CF) quinoxaline (NBQX; 20 μM, 10 μl) attenuated (8.40±0.88 spikes/stimulation, N=3, P<0.05) the RS-induced potentiation in PUR activity. Western blots of spinal cord tissues corroborated the RS-induced PUR potentiation in that expression of neuronal NO-synthase (nNOS) was increased. All the results suggest that the increased nNOS in spinal levels appears to be necessary for the RS-induced potentiation in PUR activity.

九、附錄

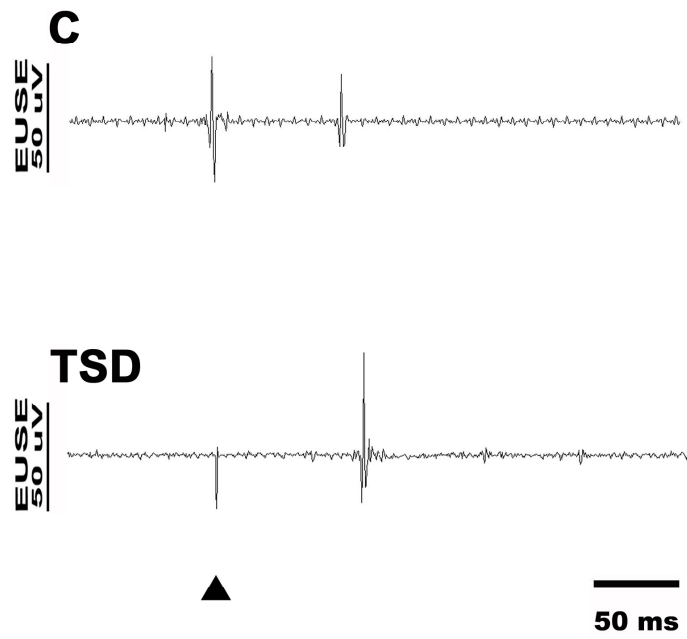


圖一、控制儲尿 (a) 及排尿 (b) 反射之神經路徑圖

引自 de Groat WC (2006) Integrative control of the lower urinary tract: preclinical perspective. Br J Pharmacol 147:S25-S40



圖二、骨盆神經—外尿道括約肌反射路徑神經電刺激配置圖
 Stim 標示處為刺激電極擺放位置
 EUSE 為記錄銅線插入位置



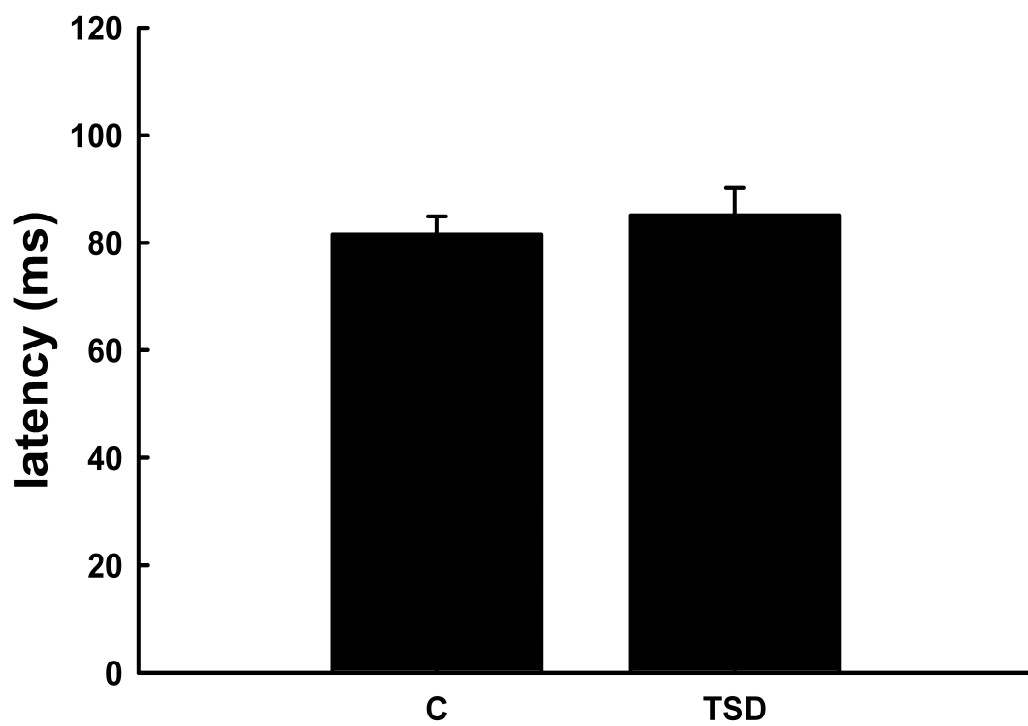
圖三、測試性刺激引發骨盆神經—外尿道括約肌反射之肌動作電位

每 30 秒一次對骨盆傳入神經輸入一個穩定刺激，可在外尿道括約肌紀錄到一個動作電位

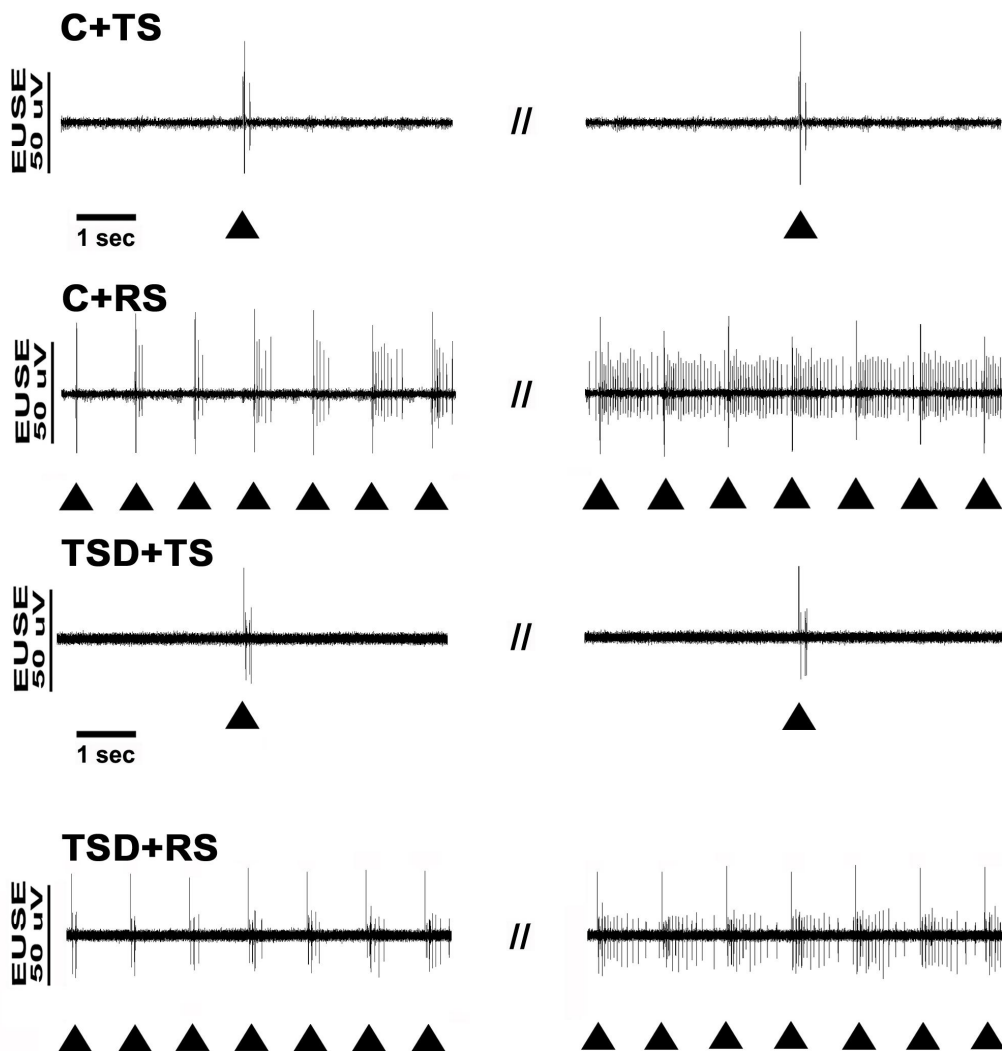
上圖：控制組 (C)

下圖：睡眠剝奪組 (TSD)

▲表刺激點



圖四、骨盆傳入神經測試性刺激引發反射之平均潛伏期 (latency)
註：控制組 (C)、睡眠剝奪組 (TSD)



圖五、骨盆傳入神經反覆性刺激引發反射之肌動作電位圖

C+TS：控制組給予測試性刺激

TSD+TS：睡眠剝奪組給予測試性刺激

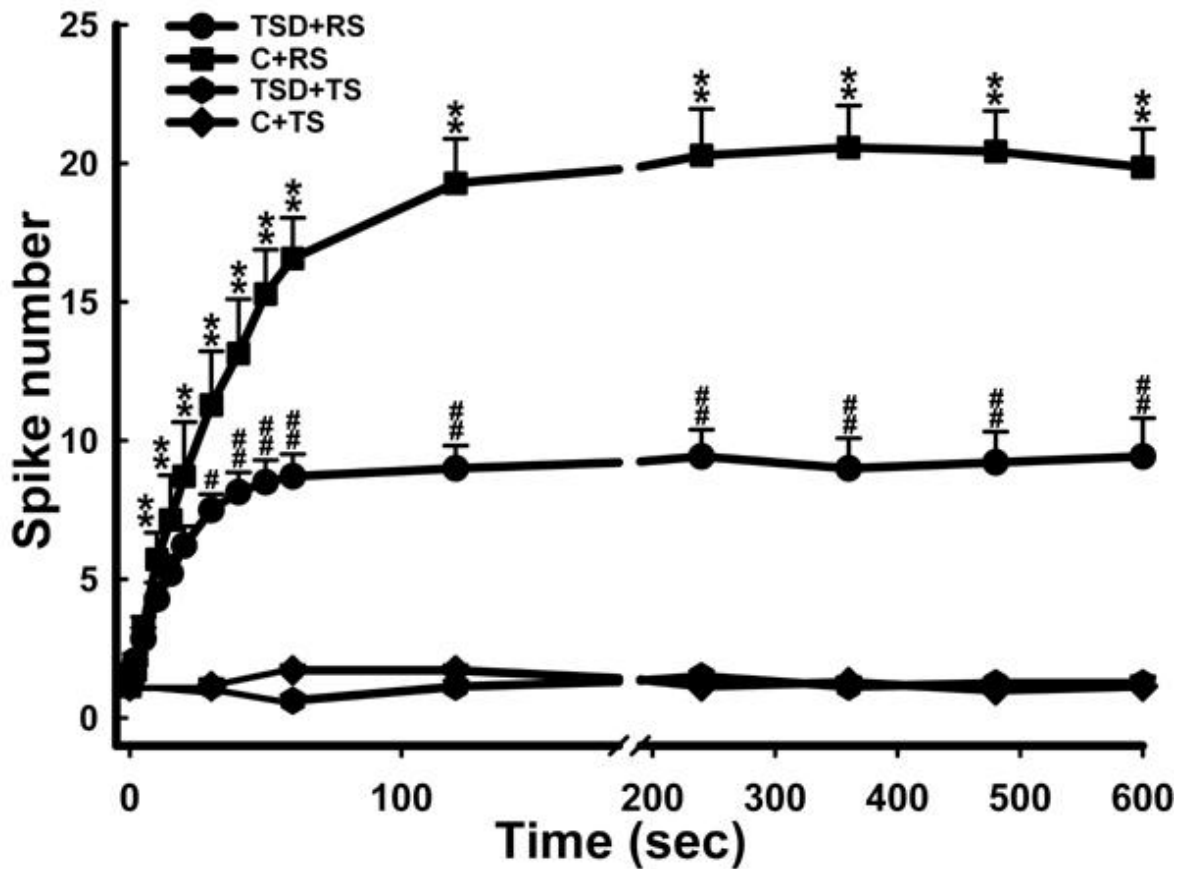
C+RS：控制組給予反覆性刺激

TSD+RS：睡眠剝奪組給予反覆性刺激

▲表刺激點

註：分組中 RS 組，左側為實驗前 7 秒肌動作電位圖；右側為實驗後 7 秒肌動作電位圖

分組中 TS 組，左側為實驗第 1 個 30 秒肌動作電位圖；右側為實驗最後 1 個 30 秒肌動作電位圖

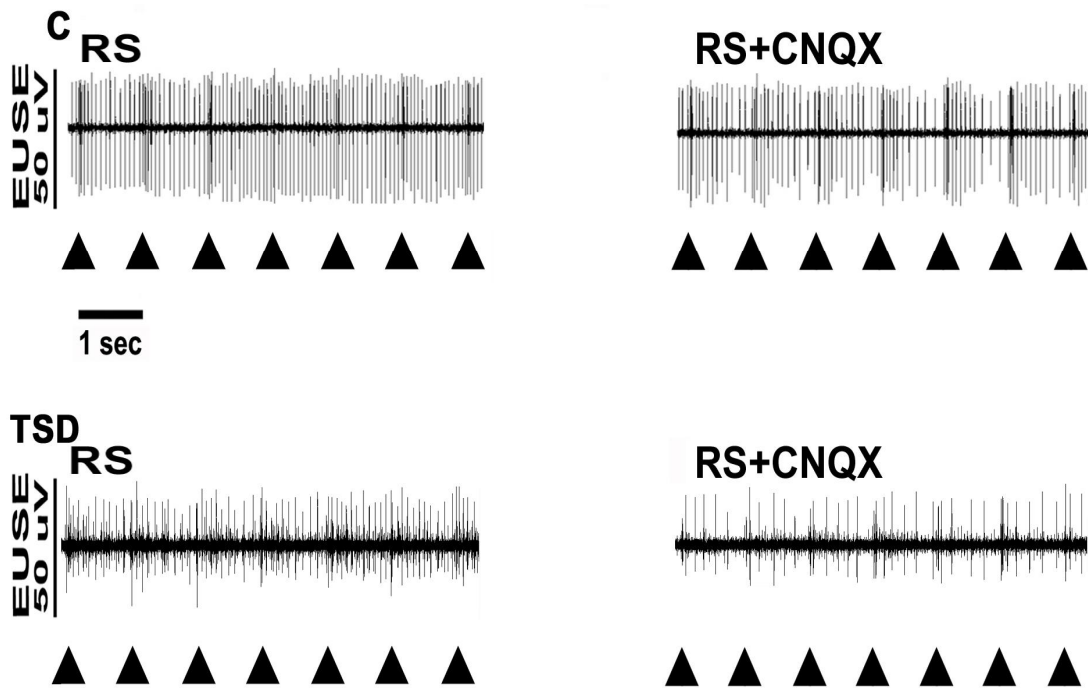


圖六、給予骨盆傳入神經反覆性刺激，對骨盆神經—外尿道括約肌反射塑性之影響

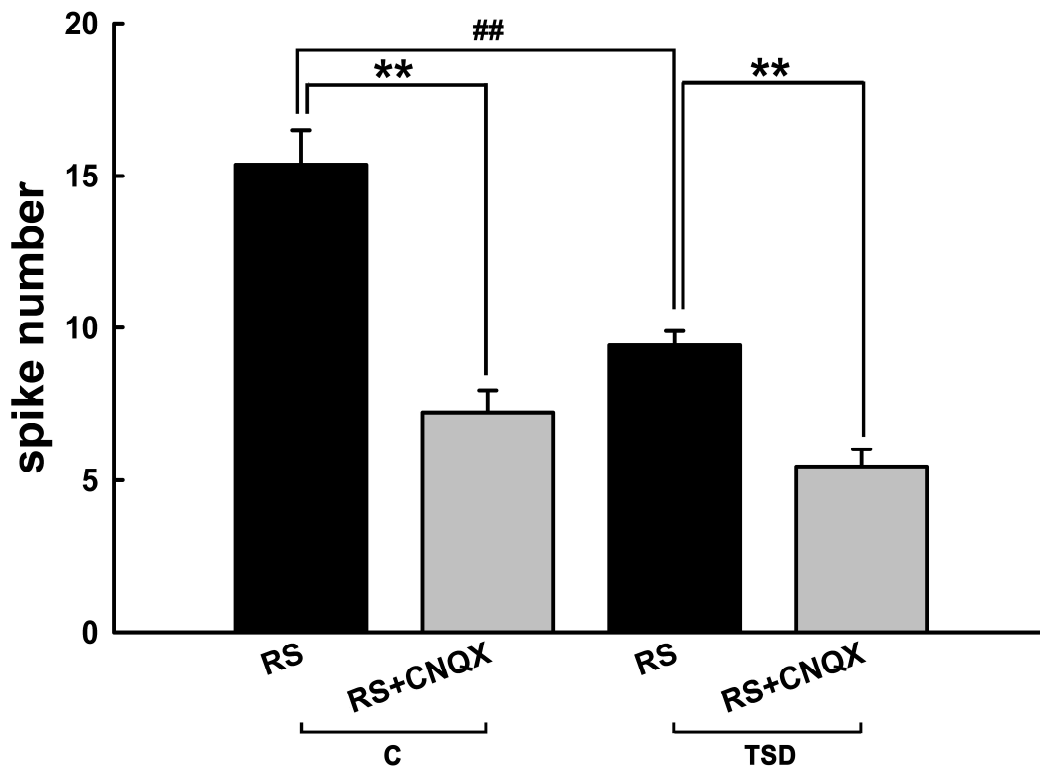
註： ** 意指統計差異 $P < 0.01$ ，為控制組 RS 的每個時間點與 TS 的第 1 秒作比較

意指統計差異 $P < 0.01$ ，為控制與睡眠剝奪的 RS 作比較

意指統計差異 $P < 0.05$ ，為控制與睡眠剝奪的 RS 作比較



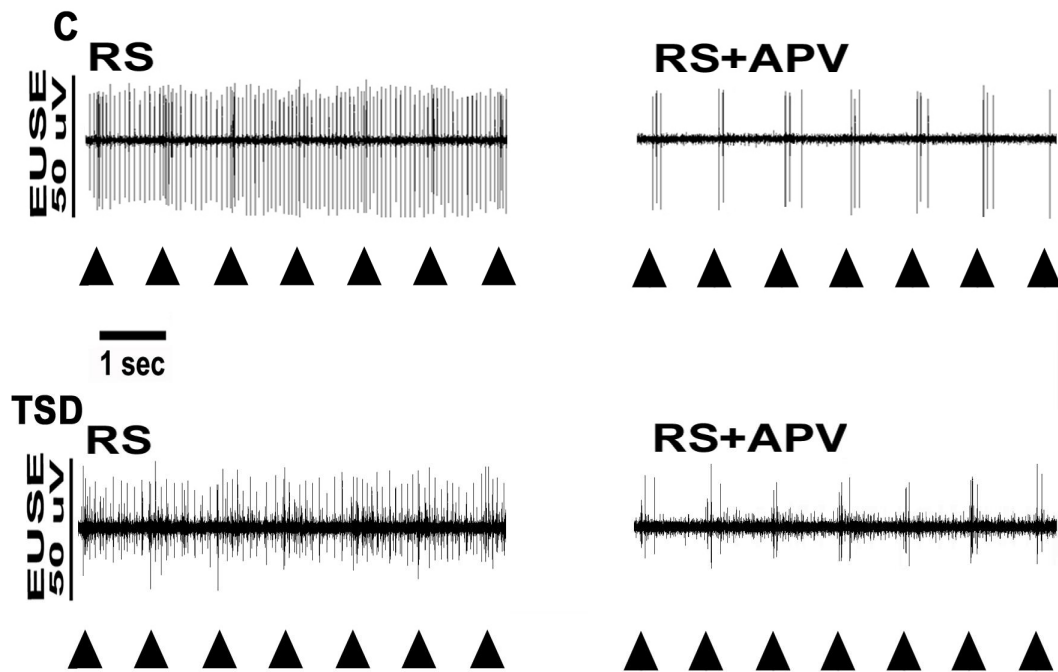
圖七、Glutamatergic 拮抗劑 (CNQX) 對反覆性刺激引發骨盆神經—外尿道括約肌反射之活性的影響
 RS+CNQX：在反覆性刺激下給予部份阻斷劑，所引發之肌動作電位
 ▲表刺激點



圖八、Glutamatergic 拮抗劑 (CNQX) 影響反覆性刺激 (RS) 引發骨盆神經—外尿道括約肌反射活性之統計圖。

註： ** 意指統計差異 $P < 0.01$ ，皆為各組在給藥前後對 RS 引發骨盆神經—外尿道括約肌反射活性差異之比較

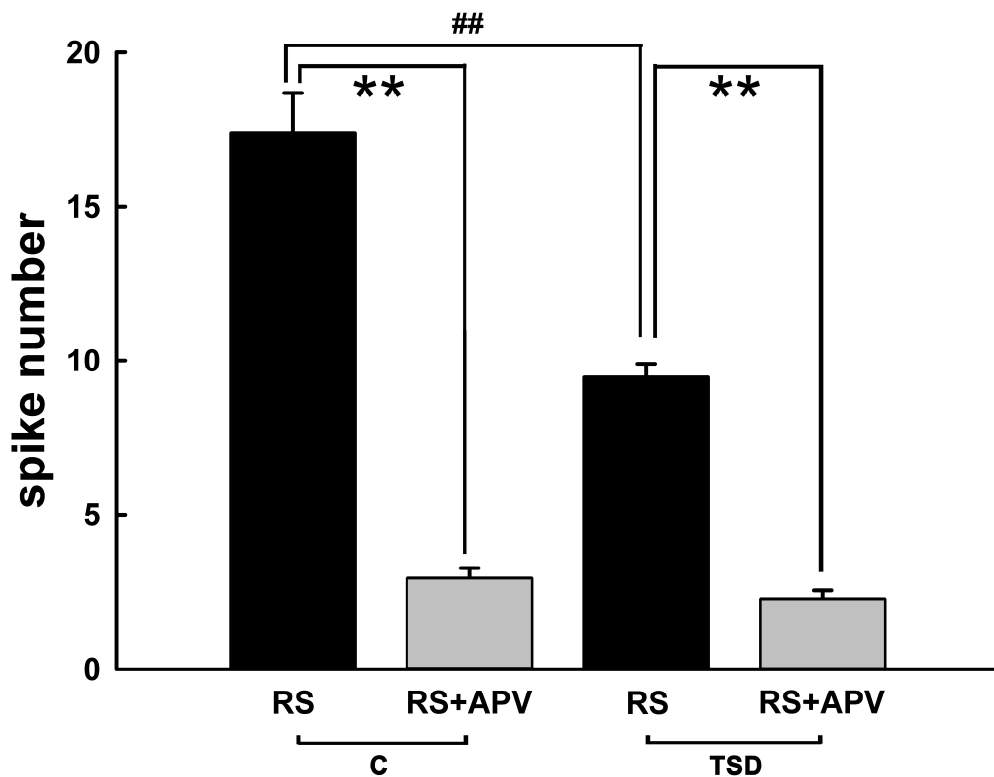
意指統計差異 $P < 0.01$ ，比較控制與睡眠剝奪鼠 RS 引發骨盆神經—外尿道括約肌反射活性的差異



圖九、Glutamatergic 拮抗劑 (APV) 對反覆性刺激引發骨盆神經—外尿道括約肌反射活性的影響

RS+APV：在反覆性刺激下給予阻斷劑後肌動作電位數之變化

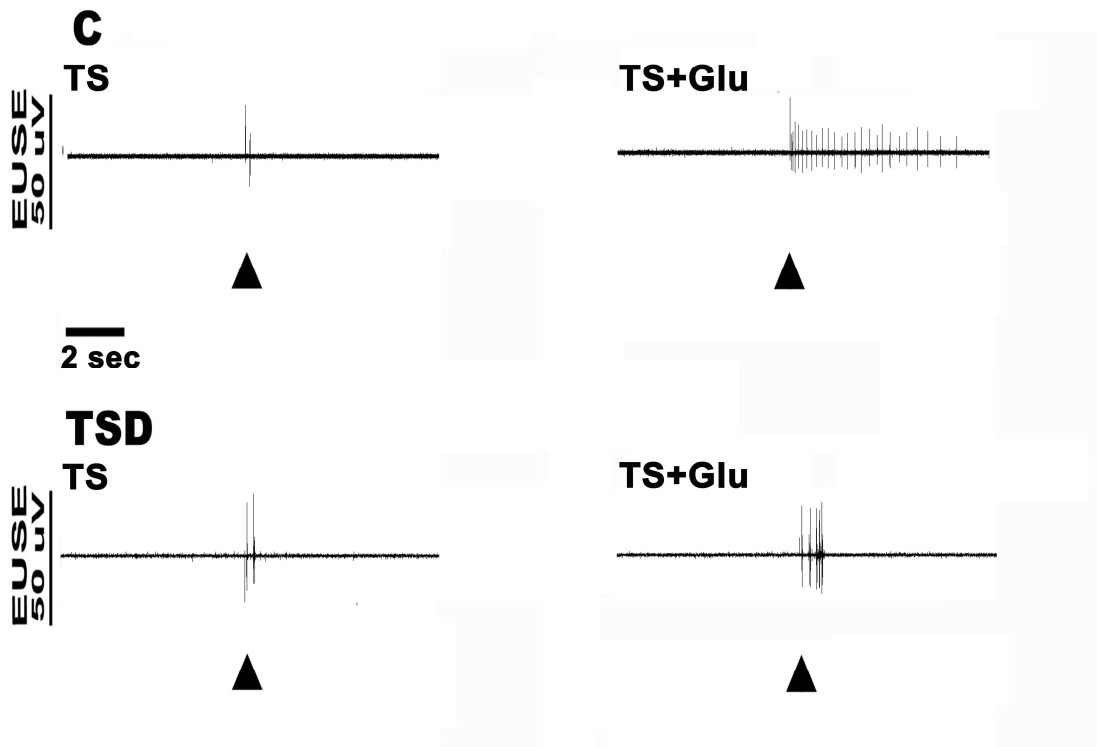
▲表刺激點



圖十、Glutamatergic 拮抗劑 (APV) 影響反覆性刺激 (RS) 引發骨盆神經—外尿道括約肌反射活性之統計圖。

註： ** 意指統計差異 $P < 0.01$ ，皆為各組在給藥前後對 RS 引發骨盆神經—外尿道括約肌反射活性差異之比較

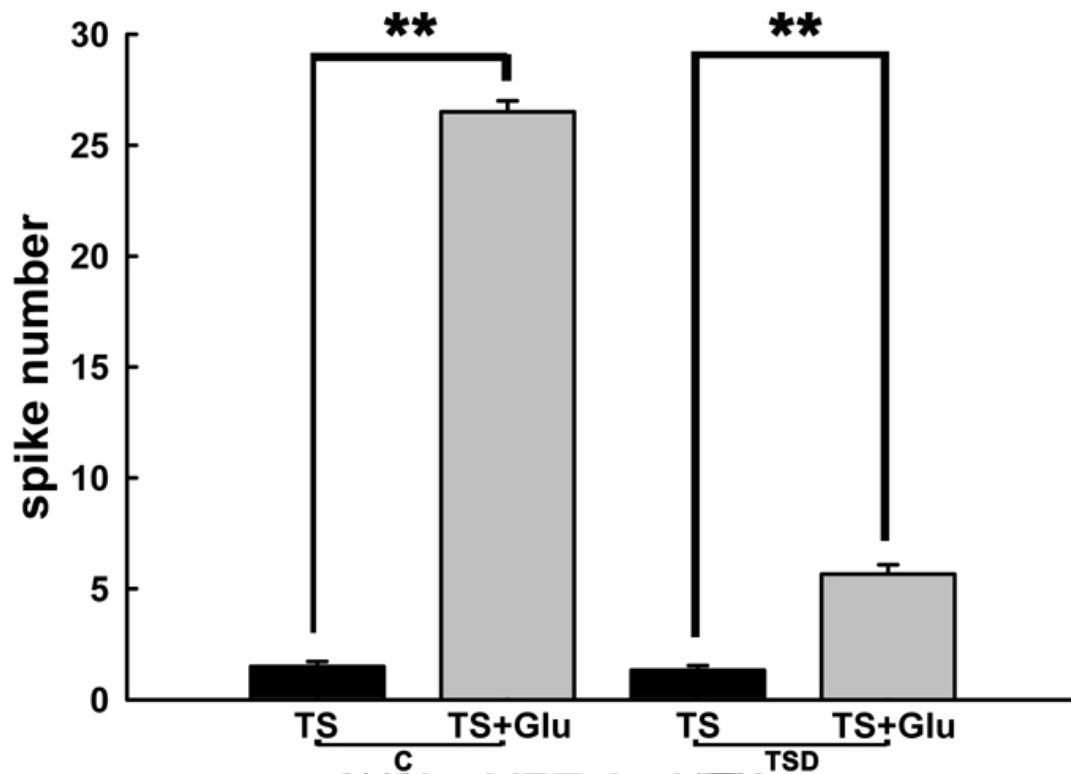
意指統計差異 $P < 0.01$ ，比較控制與睡眠剝奪鼠 RS 引發骨盆神經—外尿道括約肌反射活性的差異



圖十一、Glutamatergic 促進劑 (Glutamate) 對測試性刺激 (TS) 引發骨盆神經—外尿道括約肌反射之活性的調控影響

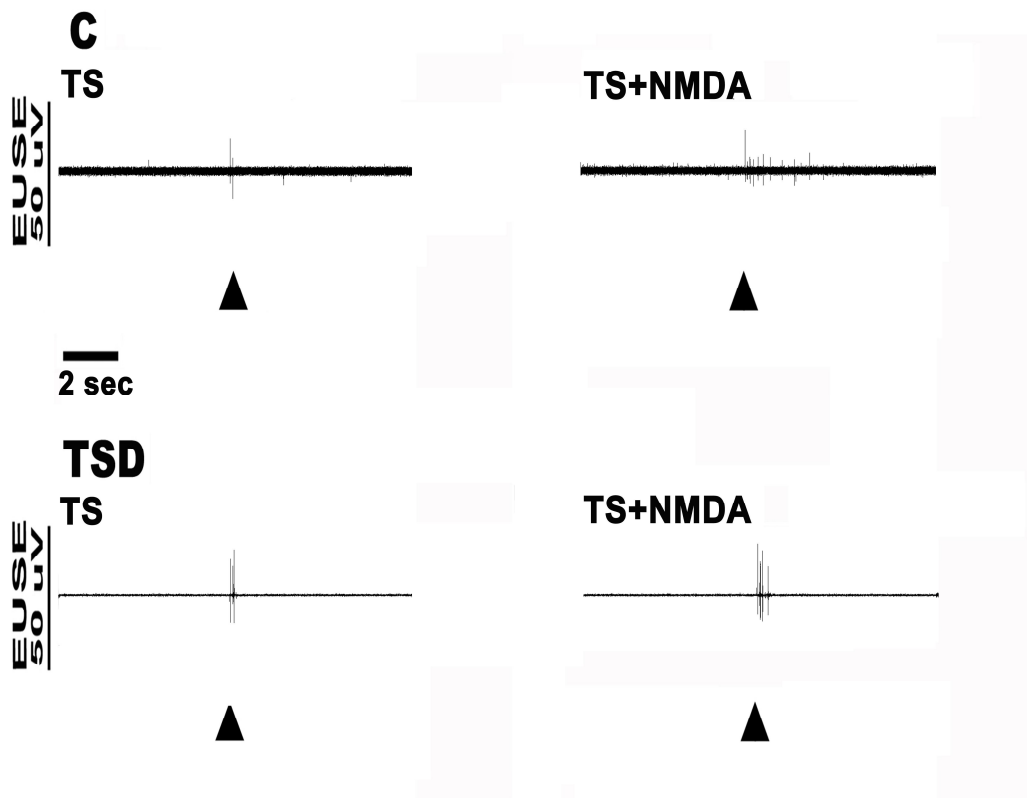
TS+Glu：在測試性刺激下給予促進劑，所引發之肌動作電位

▲表刺激點



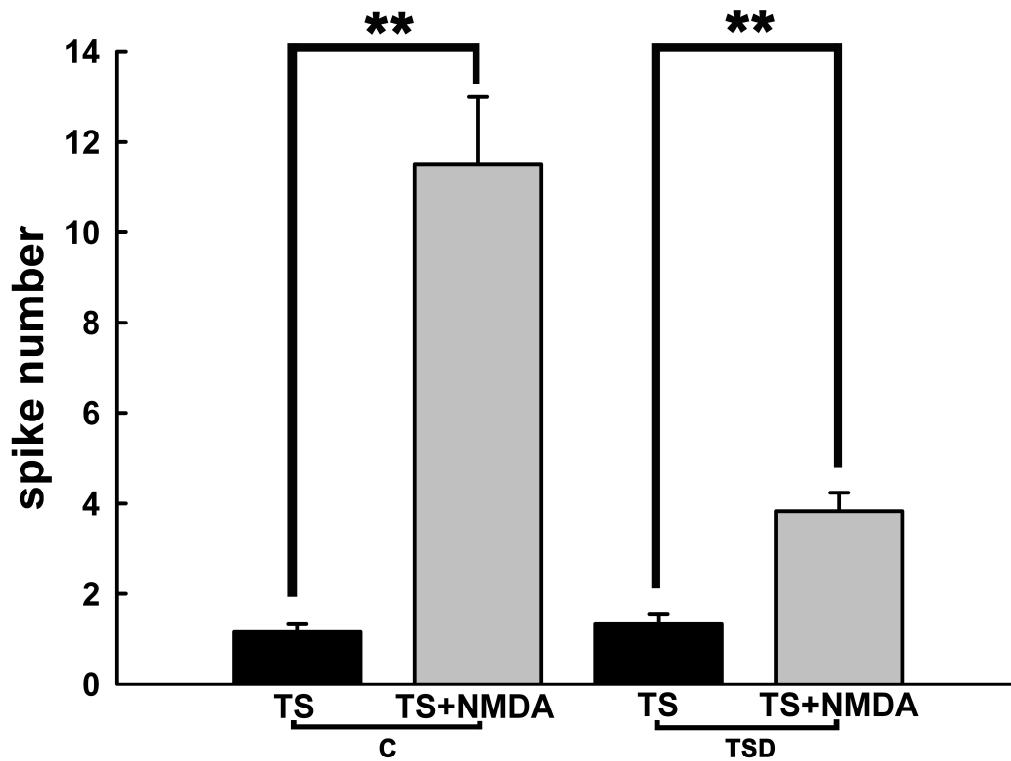
圖十二、Glutamatergic 促進劑 (Glutamate) 對測試性刺激 (TS) 引發骨盆神經—外尿道括約肌反射之活性的統計圖

註： ** 意指統計差異 $P < 0.01$ ，皆為各組給予 Glutamate 的給藥前與給藥後作比較



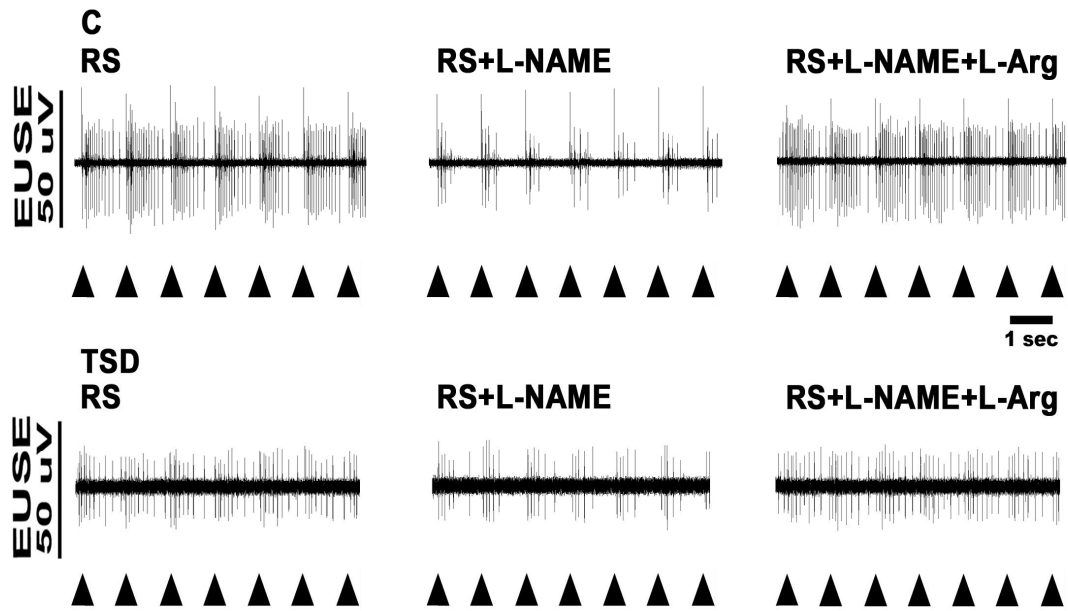
圖十三、Glutamatergic 促進劑 (NMDA) 對測試性刺激 (TS) 引發骨盆神經—外尿道括約肌反射之活性的調控影響

TS+NMDA：在測試性刺激下給予促進劑，所引發之肌動作電位
▲表刺激點



圖十四、Glutamatergic 促進劑 (NMDA) 對測試性刺激 (TS) 引發骨盆神經—外尿道括約肌反射之活性的統計圖

註： ** 意指統計差異 $P < 0.01$ ，皆為各組給予 NMDA 的給藥前與給藥後作比較

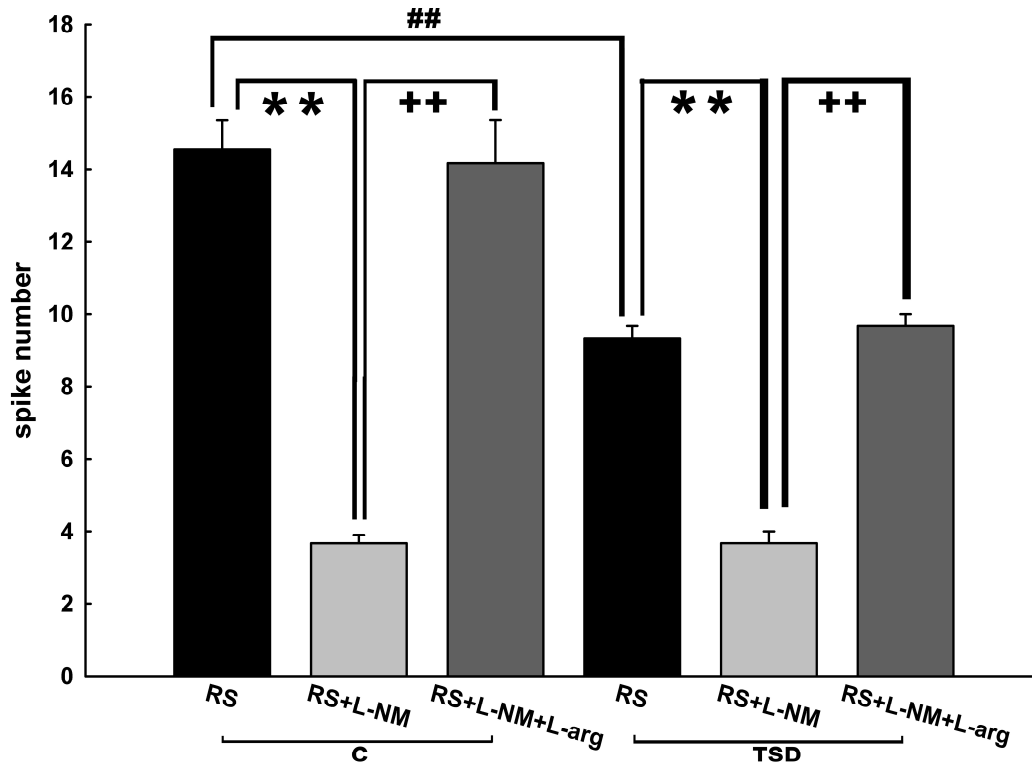


圖十五、Nitricergic 拮抗劑 (L-NAME) 與促進劑 (L-Arg) 對反覆性刺激引發骨盆神經—外尿道括約肌反射之活性的調控影響

RS+L-NAME：在反覆性刺激下給予阻斷劑，所引發之肌動作電位

RS+L-NAME+L-Arg：在反覆性刺激下給予阻斷劑後，再給予促進劑所引發之肌動作電位

▲表刺激點



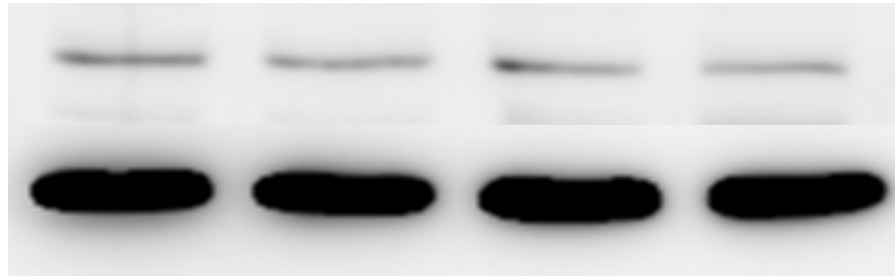
圖十六、Nitric oxide 拮抗劑 (L-NAME) 與促進劑 (L-Arg) 對反覆性刺激引發骨盆神經—外尿道括約肌反射之活性的統計圖

註： ** 意指統計差異 $P < 0.01$ ，皆為各組給予 L-NAME 的給藥前與給藥後作比較

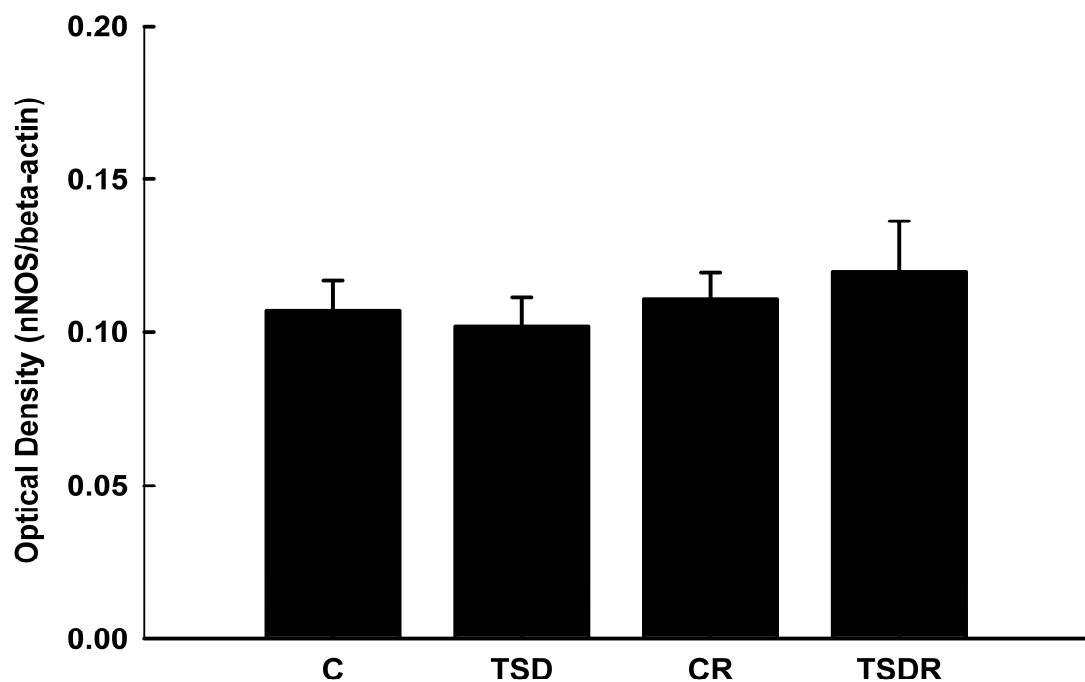
++ 意指統計差異 $P < 0.01$ ，皆為各組給予 L-NAME 後，再給予 L-Arg 的給藥前與給藥後作比較

意指統計差異 $P < 0.01$ ，為控制與睡眠剝奪兩組 RS 的比較

(A)



(B)



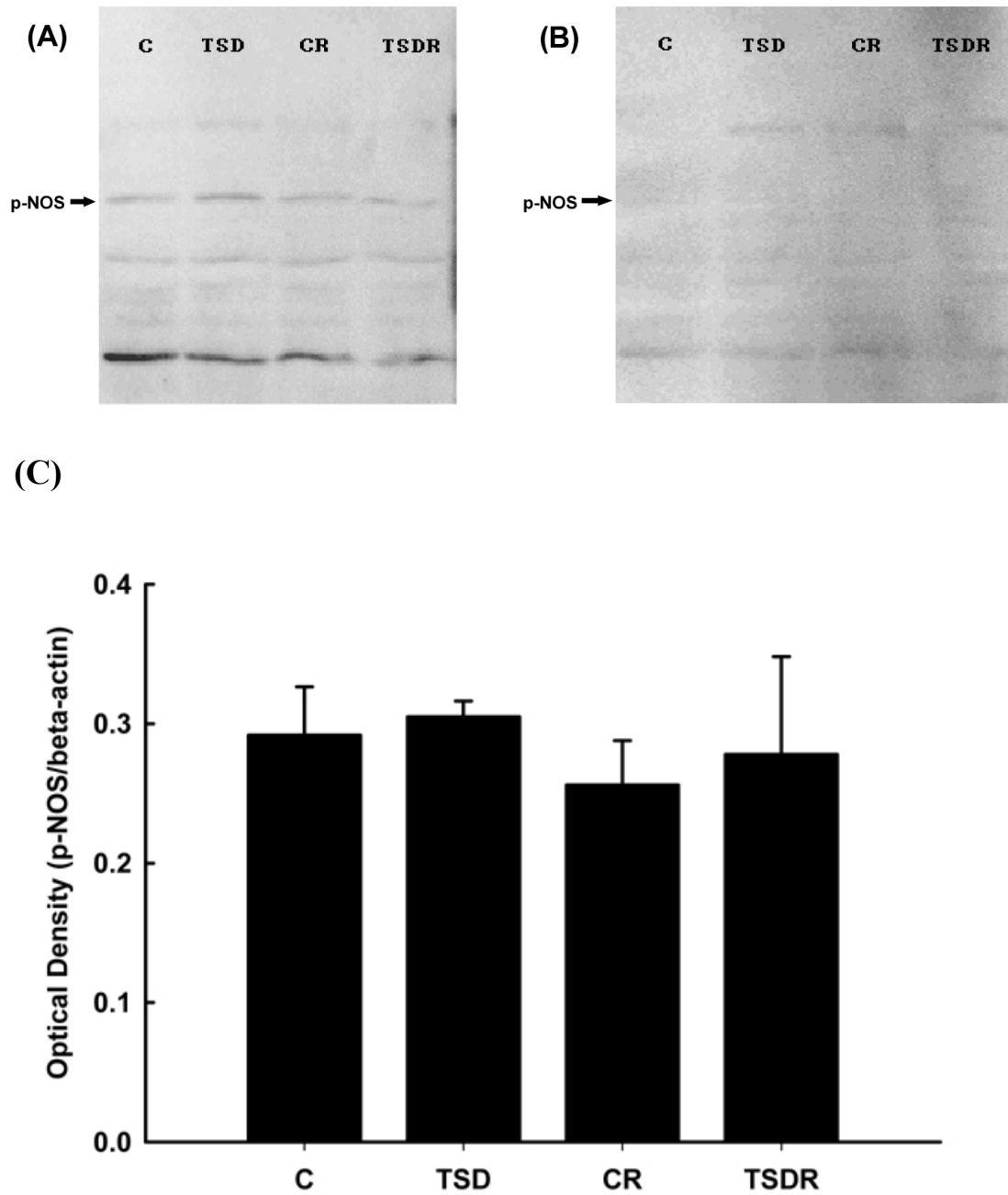
圖十七、利用西方點墨法測定 nNOS 表現量，比較控制 (C) 與睡眠剝奪(TSD) 組在骨盆傳入神經反覆性刺激 1 小時前後，脊髓 (L6-S2) 內 nNOS 蛋白表現量之差異。

圖 A：上者為 nNOS；下者為 beta-actin

圖 B 為 nNOS 與 beta-actin 的比值。

CR：控制組給予骨盆傳入神經反覆性刺激 1 小時

TSDR：睡眠剝奪組給予骨盆傳入神經反覆性刺激 1 小時



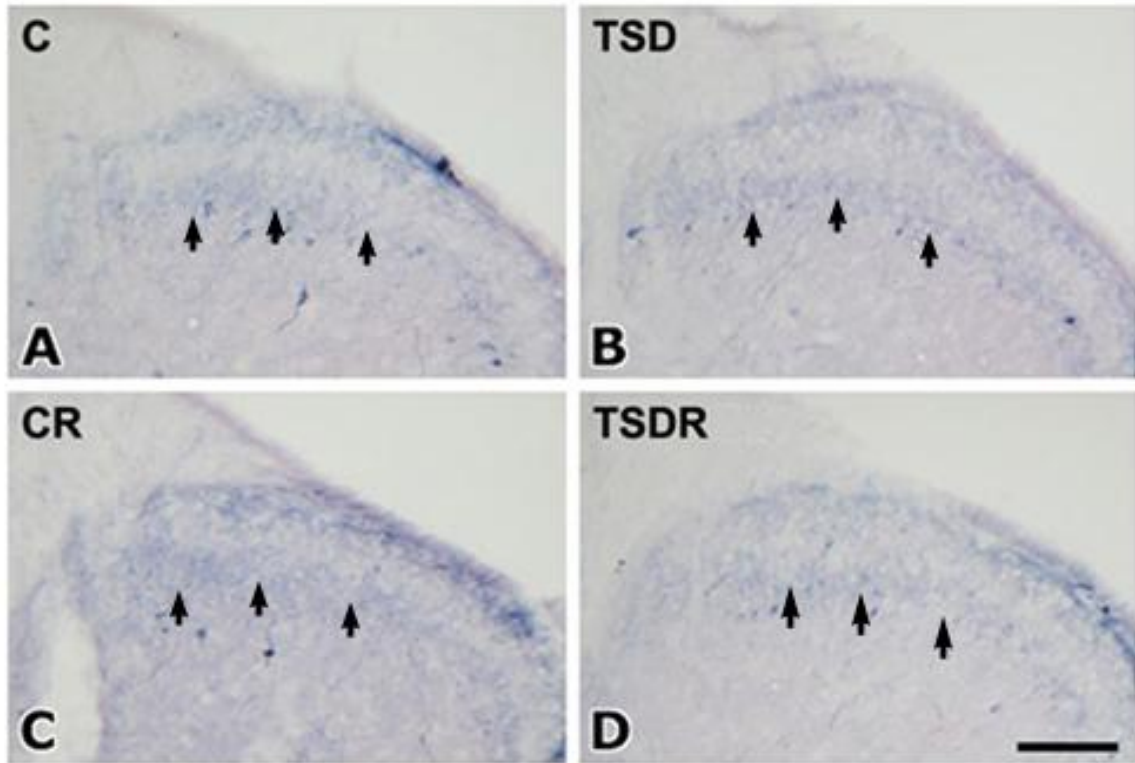
圖十八、利用西方點墨法測定 p-NOS 表現量，比較控制 (C) 與睡眠剝奪 (TSD) 組在骨盆傳入神經反覆性刺激 1 小時前後，脊髓 (L6-S2) 內 p-NOS 蛋白表現量之差異。

圖 C 為 p-NOS 與 beta-actin 的比值。

CR：控制組給予骨盆傳入神經反覆性刺激 1 小時

TSDR：睡眠剝奪組給予骨盆傳入神經反覆性刺激 1 小時

註：圖 A 為 p-NOS 蛋白的表現，圖 B 為未加 p-NOS 一級抗體之呈色結果，目的在確認 p-NOS 蛋白的表現位置。



圖十九、利用組織化學法測定 NADPH-d 表現量，比較控制 (C) 與睡眠剝奪(TSD) 組在骨盆傳入神經反覆性刺激 1 小時前後，脊髓 (L6) 內 NADPH-d 表現量之差異。游標尺=100 微米

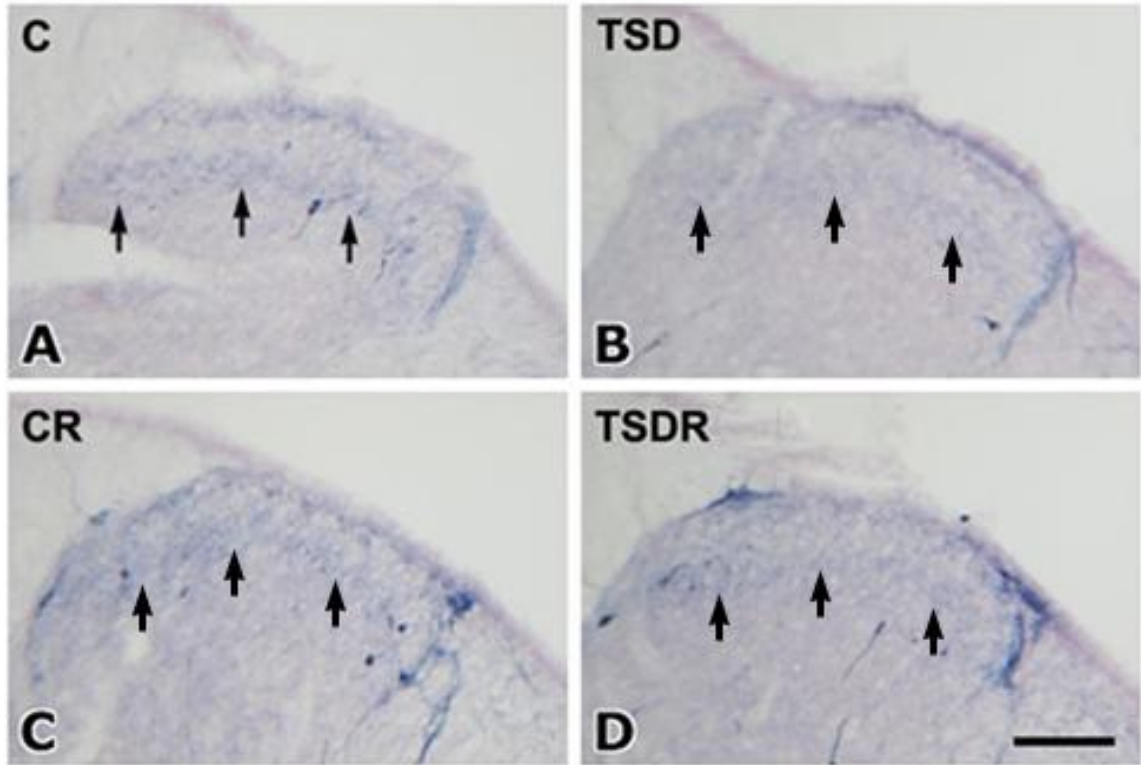
圖 A 為控制組未給予骨盆傳入神經反覆性刺激 (C)

圖 B 為睡眠剝奪組未給予骨盆傳入神經反覆性刺激 (TSD)

圖 C 為控制組給予骨盆傳入神經反覆性刺激 1 小時 (CR)

圖 D 為睡眠剝奪組給予骨盆傳入神經反覆性刺激 1 小時 (TSDR)

↑ 所標示為脊髓背角第三層之位置



圖二十、利用組織化學法測定 NADPH-d 表現量，比較控制 (C) 與睡眠剝奪(TSD) 組在骨盆傳入神經反覆性刺激 1 小時前後，脊髓 (S2) 內 NADPH-d 表現量之差異。游標尺=100 微米

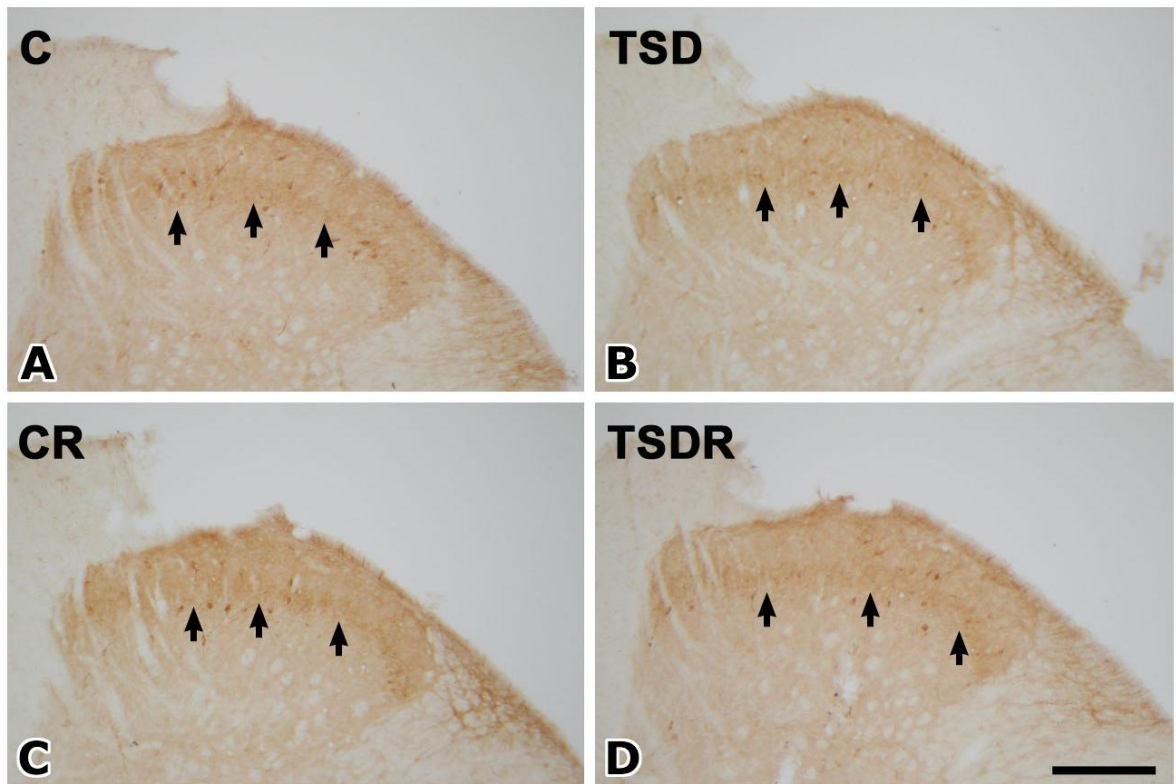
圖 A 為控制組未給予骨盆傳入神經反覆性刺激 (C)

圖 B 為睡眠剝奪組未給予骨盆傳入神經反覆性刺激 (TSD)

圖 C 為控制組給予骨盆傳入神經反覆性刺激 1 小時 (CR)

圖 D 為睡眠剝奪組給予骨盆傳入神經反覆性刺激 1 小時 (TSDR)

↑ 所標示為脊髓背角第三層之位置



圖二十一、利用免疫組織化學法測定 nNOS 表現量，比較控制 (C) 與睡眠剝奪 (TSD) 組在骨盆傳入神經反覆性刺激 1 小時前後，脊髓 (L6) 內 nNOS 表現量之差異。游標尺=100 微米

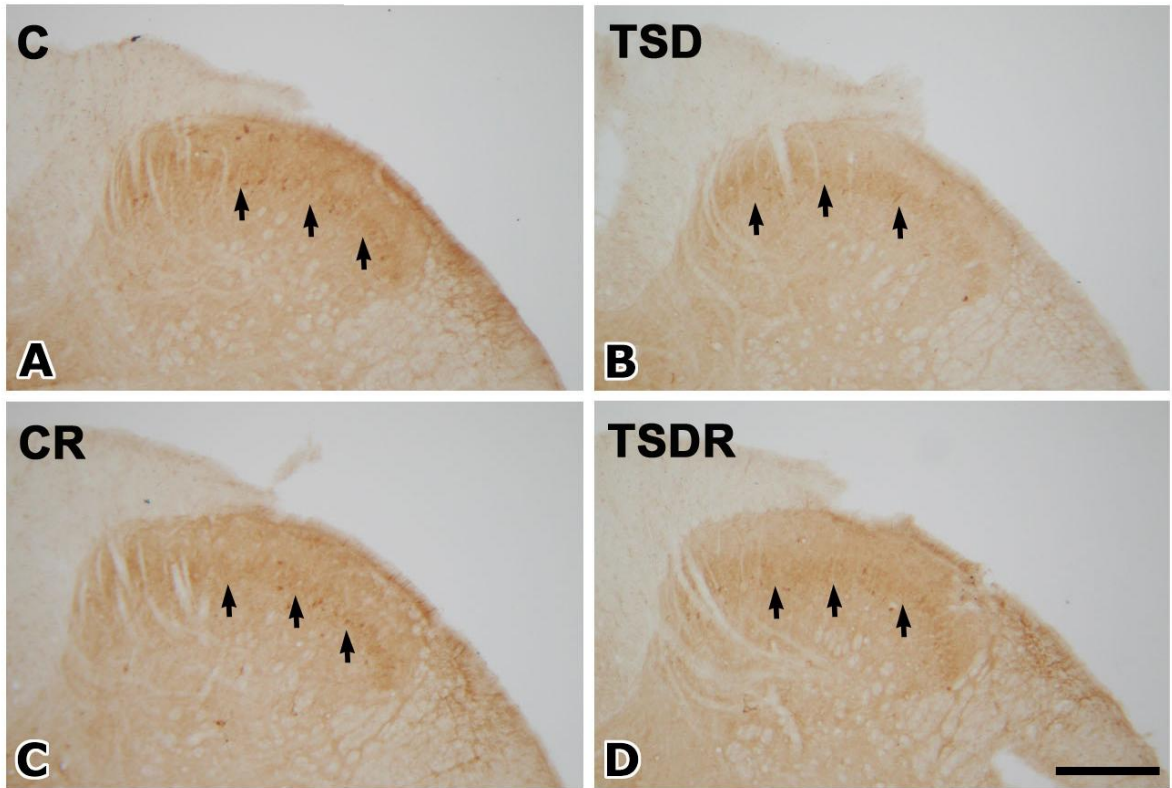
圖 A 為控制組未給予骨盆傳入神經反覆性刺激 (C)

圖 B 為睡眠剝奪組未給予骨盆傳入神經反覆性刺激 (TSD)

圖 C 為控制組給予骨盆傳入神經反覆性刺激 1 小時 (CR)

圖 D 為睡眠剝奪組給予骨盆傳入神經反覆性刺激 1 小時 (TSDR)

↑ 所標示為脊髓背角第三層之位置



圖二十二、利用免疫組織化學法測定 nNOS 表現量，比較控制 (C) 與睡眠剝奪 (TSD) 組在骨盆傳入神經反覆性刺激 1 小時前後，脊髓 (S2) 內 nNOS 表現量之差異。游標尺=100 微米

圖 A 為控制組未給予骨盆傳入神經反覆性刺激 (C)

圖 B 為睡眠剝奪組未給予骨盆傳入神經反覆性刺激 (TSD)

圖 C 為控制組給予骨盆傳入神經反覆性刺激 1 小時 (CR)

圖 D 為睡眠剝奪組給予骨盆傳入神經反覆性刺激 1 小時 (TSDR)

↑ 所標示為脊髓背角第三層之位置