

中國醫藥大學

醫學研究所

碩士學位論文

以單一核苷酸多型性為生物標記尋找原發性夜間

遺尿候選基因和探討致病機制

**Single nucleotide polymorphisms as biomarkers
applied for searching candidate genes and exploring
mechanisms of primary nocturnal enuresis**

指導教授：蔡輔仁 教授

共同指導教授：萬磊 助理教授

研究生：魏長菁

中華民國九十六年七月

Abstract

Primary nocturnal enuresis (PNE) is a common childhood problem. The incidence of PNE is approximately 10% of 7-year-old children. PNE make significant psychosocial distresses for both children and their parents and a child with PNE seems to have low confidence. Despite numerous studies on PNE, its etiology remains elusive. The etiology of PNE is multifactor, involving genetic influence, maturational delay, sleep disorder, psychological problem and decreased nighttime secretion of antidiuretic hormone.

Normal voiding might include the synchronized circadian rhythm in the secretion of arginine vasopressin (AVP) and functional maturation of the central nervous system (CNS), which reduces the child's ability to inhibit bladder emptying at night. Our major concerns for PNE are the compromised vasopressin production and the balance of CNS transmitters. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) are the most abundant types of DNA sequence variation in the human genome. The SNP marker provides a new way for the identification of complex gene-associated diseases such as PNE. We tried to use SNPs as biomarkers to search candidate genes and the pathogenesis of PNE.

This study is the first to search the 5HTR2A gene polymorphisms in children with PNE. It was determined that 5HTR2A gene polymorphism, a predominantly TT

genotype, may be associated with non-mono-symptomatic NE in Taiwanese children.

These findings confirm previous observation that the heterogeneity of NE and open a window for the future research to find the mechanisms of NE.



中文摘要

原發性夜間遺尿為一常見之兒童問題，原發性夜間遺尿在七歲兒童之盛行率約百分之十。原發性夜間遺尿不但會造成兒童和父母莫大精神上的壓力，同時原發性夜間遺尿的小朋友也常常會自信心受挫。儘管目前有許多研究投注在探討原發性夜間遺尿的成因，但是至今仍是成因不明。目前的文獻認為造成之致病因子相當廣泛，其可能病因包括基因遺傳、神經發育延遲、睡眠障礙、心理及行為問題、夜晚抗利尿激素分泌不足等。

正常排尿功能須包含正常與協調的日夜週期性抗利尿激素的製造與成熟的中樞神經及相關傳導物質調控-能抑制夜晚膀胱不自主的收縮。目前許多學者認為原發性夜間遺尿是多種疾病，由多種基因的影響。我們希望藉由釐清原發性夜間遺尿的各種臨床表現，對它的遺傳性有更深入的了解。單一核苷酸多型性為人類之最常見之 DNA 序列變異。基因功能之特異表現是影響疾病形成之重要因素之一，近年來，以單一核苷酸多型性作為偵測各種疾病之工具已越來越普遍的使用，基因異常表現也許是形成原發性夜尿之可能原因。於本實驗中我們將以 vasopressin 及神經傳導物質之基因多形性。我們將分析這些基因多形性與原發性夜間遺尿之關聯性。我們亦嘗試進一步分析這些多形體基因與原發性夜間遺尿不同亞型之關聯性，對於可能相關之分子生物機轉亦將進一步探討。

本文是第一篇文章尋找 5HTR2A 單一核苷酸多型性和原發性夜間遺尿的關

連，而且本研究結果發現 5HTR2A 單一核苷酸多型性和多症狀原發性夜間遺尿有關，尤其是 TT genotype。再次驗證尿床並非單一疾病，它至少可以區分為單一症狀原發性夜間遺尿或多症狀原發性夜間遺尿，多症狀原發性夜間遺尿會合併膀胱和腸道症狀，這兩種亞型形成原因可能不同，而 serotonin 在多症狀原發性夜間遺尿上則扮演著重要的角色。這實驗結果在原發性夜間遺尿遺傳研究的路上開啟一扇窗，在原發性夜間遺尿遺傳研究上，並且幫助我們更了解原發性夜間遺尿複雜的原因和神經傳導物質之間的關係。



目錄

第一章 前言	
第一節 研究背景-----	1
原發性夜間遺尿的定義-----	1
臺灣地區原發性夜間遺尿流行病學的研究 -----	2
原發性夜間遺尿致病機轉 -----	2
原發性夜間遺尿的評估診斷 -----	3
原發性夜間遺尿的治療 -----	4
原發性夜間遺尿的遺傳性-----	7
單一核苷酸多型性-----	8
第二節 研究目的-----	9
第二章 研究方法	
第一節 研究材料-----	10
納入實驗條件-----	10
排出實驗條件-----	10
頻尿的定義-----	11
便秘的定義-----	11
由睡眠中清醒的困難度評估-----	11
第二節 研究設計 -----	12
DNA抽取與純化-----	12
基因分析PCR-RFLP -----	13
候選基因選取(candidate gene search)-----	16
第三節 統計方法-----	16
第三章 研究結果	
第一節 描述性統計分析-----	18
原發性夜間遺尿病童臨床表現和對照組的分析 -----	18
第二節 推論性統計分析-----	18
原發性夜間遺尿病童和正常兒童基因型和基因多型性頻率分析-----	18
原發性夜間遺尿病童有無合併頻尿基因型和基因多型性頻率分析 -	18
原發性夜間遺尿病童難喚醒和易喚醒兩組基因型和基因多型性頻率分析	
-----	19
原發性夜間遺尿病童有無家族史基因型其基因多型性頻率分析 ----	19
原發性夜間遺尿病童有無便秘其基因型和基因多型性頻率分析 ----	20
5HT _{2A} 基因多型性在原發性夜間遺尿病童不同的表現型間的分析-----	20

第四章 討論	
第一節 結果討論	21
第二節 其他相關性討論	23
第三節 研究限制	25
第五章 結論與建議	26
參考文獻	27



圖表目錄

(表一) 臺灣地區原發性夜間遺尿流行病學的研究-----	34
初診病人原發性夜間遺尿評估表-----	35
(圖一) 原發性夜間遺尿的形成三種主要的機轉-----	36
(表二) 候選基因選取(candidate gene search) -----	37
(表三) 原發性夜間遺尿病童臨床表現和對照組的分析 -----	38
(表四) 原發性夜間遺尿和無原發性夜間遺尿病童基因型和基因多型性頻率分析-----	38
(表五) 原發性夜間遺尿病童有無合併頻尿基因型和基因多型性頻率分析-----	39
(表六) 原發性夜間遺尿病童難易喚醒兩組基因型和基因多型性頻率分析-----	40
(表七) 原發性夜間遺尿病童有無家族史基因型和基因多型性頻率分析-----	40
(表八) 原發性夜間遺尿病童有無便秘基因型和基因多型性頻率分析-----	41
(表九) 5HTR2A 基因多型性在病童不同的表現型間的比較 -----	42

第一章、前言

第一節、研究背景

原發性夜間遺尿(primary nocturnal enuresis)占7歲兒童10-15%，是令許多的孩童和家長困擾的問題，但在以往的觀念中，大多人認為隨著年齡增長，夜間遺尿的問題會自行改善，無需過於擔心，但是現在的觀念中，夜間遺尿是一個需要治療的疾病，因為夜間遺尿會影響成長中孩子的心理層面，包括自尊心人際關係。同時根據統計，如果大於7歲的小孩仍有夜間遺尿的問題而百分之 5-10% 直到成年仍有相同的困擾。

原發性夜間遺尿的定義

世界衛生組織定義夜間遺尿為：五歲以上的孩童在沒有神經學或尿路系統異常的前提下，在夜晚睡眠時不自主的排尿現象。國際小兒禁制協會(ICCS)則定義遺尿(enuresis)為在不恰當或社會上不能接受的時間或地點“正常”的解尿。以上是屬於原發性夜間遺尿(primary nocturnal enuresis)，而繼發性夜間遺尿(secondary nocturnal enuresis)是指原來已經至少六個月不再發生遺尿的孩童，又再發生遺尿的現象。單一症狀夜間遺尿(monosymptomatic nocturnal enuresis)意指只有單純夜間遺尿，並無白天頻尿或尿急的現象。多症狀夜間遺尿(polysymptomatic enuresis)係指從出生到現在，除了尿床外還伴隨著日間遺尿、排尿障礙、便秘、泌尿道感染...等情形。事實上，原發性夜間遺尿本身可能是包含許多不同的問題(heterogenous group of disease)，而它導致的原因包括外來的和內生的因素。可是要區分原發性夜間遺尿的不同它型是非常困難。¹⁻⁷

臺灣地區尿床流行病學的研究 (表一)

如果定義為每個月超過一次夜間遺尿的盛行率，在六歲的孩童約有 14%、十歲的孩童約有 3%。男性為女性的 1.5-2 倍。隨著年紀的增長，夜間遺尿的孩童約每年有 15% 會自動痊癒。台灣地區的研究，在 6-12 歲的孩童，若在一個月內超過一次的夜間遺尿的盛行率約有 5.5%。若定義為六個月內超過一次的夜間遺尿的盛行率則為 8%。⁸⁻¹⁰

尿床致病機轉

1. 遺傳因素：

原發性夜間遺尿具有遺傳傾向，父母中若有一人有幼年夜間遺尿的病史，則子女夜間遺尿的機會有 40%，父母雙方中若皆有幼年夜間遺尿的病史，則子女夜間遺尿的機會有 70%。Frury 的研究結果認為原發性夜間遺尿是單一隱性基因遺傳²。Halgren 的研究顯示有七成以上的夜間遺尿患者有陽性家族史¹¹。最近的分子遺傳學的研究顯示，它的基因可能在體染色體 8, 12, 13, 22 上。¹¹⁻²⁴

2. 神經系統發育遲緩：

會夜間遺尿的小朋友其神經系統發育成熟的速度比一般正常小朋友還來得慢。但他們的神經構造與控制中樞是正常的，並沒有真正的神經病變或疾病存在。這可由大部份小朋友隨著年紀的增加其夜間遺尿現象會逐漸的好轉得到應證。^{25-27, 28-30}

3. 夜間逼尿肌過度收縮(detrusor hyperactivity)：

單一症狀夜間遺尿的孩童雖然在白天時的膀胱容積正常，但經由尿路動力學的研究，卻有約 30%的孩童有夜間逼尿肌過度收縮的現象，造成膀胱容積較小而尿床。這類小朋友往往一個晚上尿許多次，每次的尿量都不多。^{13,}

31-34

4. 夜間多尿：

研究發現，有些原發性夜間遺尿的小朋友，其膀胱容量與相同年齡的正常小孩無太大的差異。正常的孩童在夜間睡覺時的尿液是會濃縮而減少的，這是因為他們睡眠時的抗利尿激素(antidiuretic hormone, ADH)分泌會比白天增加，尿液進而濃縮而減少。尿床的小孩則不然，他們夜間的抗利尿激素的分泌量比較少，所以有夜間多尿的情形，當夜間尿液量超過膀胱容積(bladder capacity)時，尿床就可能發生。^{35,36}

5. 睡眠太深沈：

許多家長與研究都會發現，夜間遺尿兒幾乎都睡得較沉，他們不易由睡眠中清醒或被喚醒。但根據對夜間遺尿兒的睡眠研究，遺尿可發生於睡眠中的任何階段，即夜間遺尿發生時的睡眠程度有深也有淺。^{1,31}

原發性夜間遺尿的評估診斷

應先排除繼發性或其他多發症狀夜間遺尿的原因，包括解尿功能障礙(常合併白天尿失禁一起發生)、泌尿道感染(膀胱炎)、膀胱輸尿管迴流症、便秘、心理

障礙、神經性膀胱、腎間質性病灶、尿崩症、糖尿病、尿道阻塞性病灶(如後尿道瓣膜)、呼吸道阻塞導致睡眠時呼吸暫停等...。對於上述的疾病，藉由詳細的病史、問診、理學檢查與基本的尿液例行檢驗，幾乎就可以排除掉上述的繼發性原因，有時可以加上膀胱與腎臟超音波的檢查。其他進一步的檢查，如解尿期膀胱尿道攝影、尿液培養、尿路動力學檢查、膀胱內視鏡、脊椎MRI檢查等...則視個別的致病原因安排。^{4, 10, 31, 37-39}

原發性夜間遺尿的治療

原發性夜間遺尿症治療上常用的方法，可以簡單分為藥物療與非藥物療。

(一) 非藥物治療

1. 一般治療：

不論原發性或次發性原發性夜間遺尿初步處理的方式皆相同。一般來說，次發性夜間遺尿常合併心理上的障礙，應先予以改善。如果幼童同時合併便秘或滲便的情形，則排便障礙應先行治療，而隨著排便問題的改善，夜間遺尿可有72%的治癒率。非單一症狀之夜間遺尿，則白天合併症狀如頻尿應該先治療。⁴⁰⁻⁴²

2. 行為療法：

遺尿警報器（條件反射治療）：利用尿液導電的特性，安裝電極片在尿布上。在兒童尿濕時會發出很大聲響，而把小朋友吵醒。經由此條件訓練，小朋友便逐漸學會不尿床或者在尿漲時起床排尿。然而此方法在台灣少用。

此法需要治療一段時間。當孩子已可控制尿床後，還要繼續裝設三週。若太早停止，復發率會增高。一般成功率有七成以上。即使復發，再次使用，仍有相同療效。^{40, 43, 44}

3. 針灸：

有研究發表，原發性夜間遺尿孩子接受針灸治療，arousal threshold 降低，澳洲學者也有發表：6個月中，平均12.45次針灸治療有65%孩童原發性夜間遺尿得到改善。⁴⁰

(二) 藥物治療法：

藥物的治療法主要針對下面三種造成原發性夜間遺尿的主要原因：1. 夜間多尿症 2. 過動性膀胱 3. 睡眠太深沈。(圖一)⁴⁵⁻⁴⁷

1. Desmopressin (dDAVP)

抗利尿激素類似物 (dDAVP)：睡前使用dDAVP證實可以有效地治療原發性夜間遺尿，成功率在40-80%，短期使用常造成夜間遺尿復發，長期使用停藥後復發率不高。有研究指出6-12歲原發性夜間遺尿孩童，使用一年停藥後有61%的治癒率；另外也有研究報導指出使用3至6個月停藥後有16%以上的幼童不再出現夜間遺尿，比起不用藥物治療每年15%治癒率並沒有明顯的差異，但是似乎有加速改善的效果。可以口服錠劑或噴鼻方式給予，口服劑量為0.1-0.4mg，而噴鼻的劑量為10-40 μ g，以漸漸減量的方式慢慢停藥，可以減少尿床的復發率。目前知道dDAVP除了對於夜間多尿的改善外，對於中樞

神經甦醒系統的成熟也有幫助。dDAVP的使用安全性很高，但不應在睡前喝太多水份，以免造成低鈉症。^{40, 42, 48-51}

2. Oxybutynin (合併Desmopressin使用)

抗副交感神經劑，主要是減少無法抑制的膀胱收縮，以增加膀胱的有效容積。它用來治療夜尿合併過動性膀胱而造成膀胱容量減少。有研究顯示有三成以上原發性夜間遺尿的幼童是屬於這一型。Oxybutynin的副作用包括口乾、便秘和暈眩。便秘是比較困擾的問題，因為過動性膀胱的病人常有便秘，而便秘會加重過動性膀胱。使用Oxybutynin的孩童還要注意檢查解完小便後是否還有餘尿，餘尿會增加泌尿道感染的機會。另外有一種新藥Tolterodine，和Oxybutynin的效果相當，但副作用較少，在成人已納入治療組合中，而在孩童最近也有些報告顯示效果不錯。^{40, 51}

3. Tricyclic antidepressants

三環抗憂鬱劑(尤其是 Imipramine)，長久以來，就已用於夜間遺尿的治療，大約 50%的病患對 Imipramine 有反應，但復發率高。雖然已經有長期使用的經驗，但是它對夜間遺尿的治療機轉仍然不清楚。其劑量為 0.9-1.5mg/kg，副作用包括口乾、嘔心、焦慮、人格改變等...誤食或高劑量時會導致心臟傳導障礙，可能致死。一般需至少連續服用三個月後再採漸進式的方式停藥。此藥物使用前應做心電圖以確定沒有 Q-T 間隔異常，當使用尿床警報器或者 desmopressin 治療失敗了，才考慮使用，為第二線選擇用藥。

原發性夜間遺尿的遺傳性

雖然原發性夜間遺尿的盛行率是如此之高，目前我們對它形成的機轉仍不明瞭，而有關原發性夜間遺尿機轉的文獻也很多。有幾個主要的機轉可能有關係，如：膀胱的容量較小，膀胱功能異常，夜間抗利尿激素分泌不足，夜間多尿，異常的睡型式和夜晚不易甦醒等(圖一)。

家族及雙胞胎遺傳研究(familial and twin study) 顯示原發性夜間遺尿是一個遺傳疾病。^{12, 14-18} 如果父母均有夜間遺尿，則下一代有 77% 會有同樣的問題。芬蘭的研究顯示同卵雙生在兒童期 concordance rate 是 0.43 而異卵雙生是 0.19 而至成年時兩者 concordance rate 則是 0.25 及 0。

Segregation 研究 顯示原發性夜間遺尿的遺傳方式是顯性遺傳合併高穿透力 (**dominant trait with high penetrance**)。²⁰⁻²⁴ **家族聯結分析(linkage analysis)** 和原發性原發性夜間遺尿和相關的染色體分佈在 **8q、12q、13q 及 22q**。^{14-18, 20-24, 59}

Eiberg 在 1995 年發表在 11 個中有 5 個丹麥家族聯結分析在 13q 13-14，另外 16 個中有 3 個瑞典家族也有相同發現，並且另外有 6 個家族聯結分析和 12q 13-21 有關。而德國也有發表和上述二個位置有關。後來也有人發表在第 8 對和 21 對染色體。^{14-18, 20-24, 59} 綜合以上論點，原發性夜間遺尿和是一群疾病，由一群基因的調控。如果我們想對它的遺傳性有更深入的了解，應該去釐清原發性夜間遺尿的各種臨床表現：包括夜間喚醒能力，膀胱的功能，夜間多尿的表現等。進一步做明確的分類(clinical phenotype of nocturnal enuresis)。

許多原發性夜間遺尿的基因研究，都是北歐國家大家庭，進行多代的聯結分析。^{12, 14, 16, 21, 24} 而這類型的研究卻難在台灣執行，因為台灣的家庭多為小家庭，同時許多民眾也不認為夜間遺尿是疾病，反正長大就會好，而在作家族史的調查時也遇到一些困難，因為讓民眾也會認為原發性夜間遺尿是件不光彩之事，所以在台灣我們如果想做基因研究或許該換思維，不要做家族聯結分析。家族聯結分析的好處是我們對疾病的機轉無需涉入太多，如果我們想由**功能選殖 (functional cloning)**的方式進行，我們必需先對產生原發性夜間遺尿的原理先做一番探討，建立假設的機轉。同時要循著前人的腳步，站在巨人的肩膀上，在之前文獻發表過可能的染色體上以生物資訊的方式找尋與機轉有關基因位點，也就是找尋原發性夜間遺尿的候選基因，希望對夜間遺尿的形成原因之探尋有突破性的發展，而本實驗室已有數次成功的經驗以單一核苷酸多型性變化探討複雜多基因遺傳疾病，而我們也希望繼續複製此成功的經驗於尿床候選基因的研究。

單一核苷酸多型性 (single nucleotide polymorphism (SNPs))

自從人類基因體計劃完成後，醫學已邁入所謂的後基因體時代。雖然人類基因體計劃會提供我們一份詳盡的基因組序列資料，但是我們必須注意個體與個體的基因組所存在的序列變異性(sequence variation)。這樣的變異性對於解釋不同個體的疾病感受性(disease susceptibility)有其重要的意義。單一核苷酸多型性是每個人基因中最小單位的鹼基排列順序差異較大的位點，若將特定疾病病患的單一核苷酸多型性共同點找出可以對疾病形成的機轉甚至醫師可以依病患單一核

苷酸多型性的資料，診斷病情或研判罹患該項病症的機率，或者對於治療藥物的反應效果，分辨人與人之間體質的不同。定義突變和單一核苷酸多型性一樣也是基因序列有所改變，只是突變在同一個位置上出現的頻率低於1%，且序列變異會對基因功能產生影響，造成表現型(phenotype)之改變。很多社會大眾常見的疾病，例如高血壓、糖尿病，如同原發性夜間遺尿一般，其病因並非都由單一基因突變引起，有時是由多種基因交錯所致。因此，若能利用生物統計將所偵測到個體的單一核苷酸多型性資料與疾病發病做連結、比對、分析，應可有效地預測個體疾病的感受性。

第二節、研究目的

本研究的目的是希望能找出原發性夜間遺尿遺傳基因，藉由清楚的定義分出不同臨床表現型(phenotype)如夜間多尿、夜間喚醒能力差、膀胱功能性容量小等等，接著探討不同表現型在相關染色體(8q, 12q, 13q, 22q)上重要標的基因的相關性。而利用**單一核苷酸鹼基多形性(SNPs)**當生物標記(biomarker)來分析原發性夜間遺尿機轉的基因遺傳。在單一核苷酸鹼基變異方面，目前並未找到和相關的單一核苷酸鹼基因變異，建議單一核苷酸鹼基多形性的分析可能要和不同臨床表現型分別評比，若是整體性的反應，則較難得到有顯著的結果。

第二章、研究方法

第一節、研究材料

本實驗收集的病人是年齡大於 7 歲仍有夜尿的台灣兒童和正常的對照組。本實驗是經由中國醫藥大學附設醫院人體試驗委員會通過，所有參加本實驗的兒童均大於 7 歲，並且在參與實驗前均填寫基因試驗同意書。所有的病人在參與本實驗前簽署同意書。於數次門診安排中完成臨床分析及原發性夜間遺尿評估表登錄。

所有原發性夜間遺尿病童的性別喚醒分數，有無合併白天症狀，(如頻尿、尿急等)，便秘均加以登錄，其中尿床病童如果不是原發性夜間遺尿，神經性膀胱或已知泌尿道結構異常者，泌尿道感染或腎功能異常者，則排出本實驗，所有的病童均接受相關的理學檢查和神經學檢查，並且他們的尿比重應大於 1.015。

受試者納入及排除條件

納入條件

1. 七歲以上的孩童在沒有神經學或尿路系統異常的前提下，在夜晚睡眠時一週有一次以上不自主的排尿現象
2. 區分有無白天頻尿或尿急等多症狀夜間遺尿或單一症狀夜間遺尿 (polysymptomatic or monosymptomatic NE).

排除條件

1. 次發性夜間遺尿- 曾經有半年沒有夜間遺尿
2. 神經性排尿功能異常
3. 尿路系統異常
4. 目前正有泌尿道感染
5. 尿比重低於 1.015
6. 腎功能異常

頻尿的定義

不到兩小時就要去解尿一次或一天至少小便八次以上

便秘的定義

一週解便的次數不到三次並持續三週以上

由睡眠中清醒的困難度評分³¹

當有人在房內輕聲交談或開燈能甦醒(1分)

當有人叫你名字能甦醒(2分)

當有人大聲叫你名字或聽到鬧鐘聲響能甦醒(3分)

當有人在耳邊大聲叫你名字或搖你能甦醒(4分)

當房屋內有巨大聲響或振動能甦醒(5分)

當身體站立起來能甦醒(6分)

當身體站立起來並且被人攙扶行走能甦醒(7分)

當身體被人帶離開床都不能甦醒(8分)

第二節 、實驗步驟

DNA抽取與純化

1. 先將 elution buffer 加熱至 70°C 備用
2. 在 1.5ml 的離心管中加入 500 μ l 的 extraction buffer，後加入 100 μ l 的全血並混和均勻。
3. 靜置於室溫中 5min。
4. 將 GFX 管柱放置於 2ml 的收集管中備用。
5. 將所有的萃取物加入 GFX 管柱；高速離心（8000rpm）1min
6. 丟棄離心至收集管中的液體後將 GFX 管柱放回原來的 2ml 的收集管
7. 加入 500 μ l 的 extraction buffer 到 GFX 管柱中；高速離心（8000rpm）1min
8. 丟棄離心至收集管中的液體後將 GFX 管柱放回原來的 2ml 的收集管
9. 加入 500 μ l 的 wash buffer 到 GFX 管柱中；高速離心（8000rpm）1min
10. 丟棄離心至收集管中的液體後將 GFX 管柱放回原來的 2ml 的收集管
11. 高速離心（12000rpm）3min 以使管柱乾燥
12. 丟棄收集管；並將 GFX 管柱放置入新的 1.5ml 的離心管中
13. 加入 50 μ l 預先加熱（70°C）的 elution buffer 於管柱中的玻璃纖維盤中。
14. 靜置於室溫中 1min
15. 高速離心（12000rpm）1min 以收集純化的 DNA

基因分析 PCR-RFLP

一、試劑：

甲、2X O' in 1 DNA polymerase (YT006-100)

乙、*Bsp*I 限制酶

丙、3% agarose gel

丁、EtBr

戊、PCR 引子 P1: 5- CAGCCACCACAGTTCAGTTC-3' ; P2: 5' -

CGGCTGTCAGTAAAGCAGAC-3'

二、所需之儀器：PCR machine，DNA 電泳槽，瓊脂膠片照相系統

三、實驗步驟：

A. PCR

1. 在 0.2ml PCR 管子依下表加入試劑和 Genomic DNA

DNA	
Ingredients	Volume (μ l)
2X O' in 1 DNA polymerase	10
Primer P1 (20 μ M)	1
Primer P1 (20 μ M)	1
Genomic DNA (50ng)	X
H ₂ O	Y
Total volume	20

2. 混和均勻並離心使試劑集中於管子底層。
3. 依照下表設定 PCR machine

Steps/cycles	95°C	50°C	72°C
Step1/1 cycle	5 min		
Step2/3 cycles	1 min	1 min	1 min
Step3/1 cycle	7 min		

4. 將準備好的反應管放入機器中進行 PCR 反應。

B. 3% 瓊脂膠片的製備

- (1) 準備電泳膠膜盤，並將樣本孔梳插上，放置於平穩桌面或無塵操作台上備用。
- (2) 以微量分析天平分別秤取 3g 的 agarose 粉末。
- (3) 依次倒入三角錐形瓶內，加入 100ml 0.5 X TBE Buffer。
- (4) 混合均勻之。
- (5) 以保鮮膜將錐形瓶口封住，並於瓶口上以 tip 鑿些孔洞，以便錐形瓶內外透氣之用。

以微波爐加熱溶解
- (6) 將溶解好的膠體溶液放置於桌面或抽氣櫃中，去除保鮮膜,待冷卻至 70°C 左右。

(7) 小心將膠體溶液倒入電泳膠膜盤中，大盤約 25 ml、小盤約 15 ml

左右，厚度約 4 mm，注意膠片不可以有氣泡凝固於膠片中央。

(8) 關掉抽氣開關。

(9) 置於室溫，等膠體冷卻之後，小心拔開樣本孔梳。

(10) 將瓊脂膠片放入電泳槽中使用或於夾鏈塑膠袋中保存待用。

C. 瓊脂膠片電泳分析：

(1) 取一片瓊脂膠片放置迷你電泳槽內。

(2) 將迷你電泳槽內倒入適量之 0.5 X TBE buffer

(3) 取一小片 parafilm 在上面先點上追蹤染劑 (loading dye) 約 1 μ l 左右。

(4) 取 3 μ l 檢體與追蹤染劑混合均勻。

(5) 以 Pipetman 吸取全部混合液加入瓊脂膠片的 well 內。

(6) 以 Pipetman 吸取 3 μ l 標準核酸 (ladder marker) 加入瓊脂膠片適當的 well 內。

(7) 將電泳槽電源打開，選擇 100 V，通電約 25-30 分鐘。

(8) 將電泳槽電源關閉。

(9) 完成待測。

D. *Bsp*I 切割 DNA 片段

1. 在 0.2ml PCR 管子依下表加入試劑。

Ingredients	Volume (μ l)
PCR mixture	8.5
<i>B</i> speI buffer	1
<i>B</i> speI	0.5
Total volume	10

2. 混和均勻並離心使試劑集中於管子底層。
3. 將反應置於 37°C 作用 2 小時後進行 3%瓊脂膠片電泳分析。

候選基因選取(candidate gene search) (表一)

在本實驗開始之初，我們體篩選出數個基因位點位於第 8、12、13、22 對染色體上，同時調控晝夜生理節奏、膀胱容量、排尿反射、中樞神經系統、睡眠或甦醒相關的神經傳導物質(圖一)，總共有 32 個基因位點分別位在四個不同的分子，包括 AVP、5HTR2A、CYR61、DRD5 等，但是我們在這 32 個位點中，只發現我們的病人在 5HTR2A 上有基因的多型性 (表二)。

第三節、統計方法

統計方法

Allelic frequency 定義為變異 alleles 的數目在所有 alleles 總數中表現的比例。

5HTR2A **基因型(genotype)**和 allelic frequency 的多型性變異和不同的**表現型**

(**phenotype**)的組別相比較。我們使用統計軟體 SAS system 執行以卡方檢定和

Fisher's exact test 分析類別變項。P 值定義為小於 0.05 為統計學上有意義。



第三章 研究結果

第一節、描述性統計分析

本次實驗共有 151 名台灣的小朋友參與，99 名是夜間遺尿小朋友（其中 52 名男生；47 名女），62 名是健康的對照組。

第二節、推論性統計分析

原發性夜間遺尿病童臨床表現和對照組的比較（表三）

我們分析夜間遺尿病人和對照組年紀、性別、身高、身高百分位、體重、體重百分位、喚醒分數六個變項中發現，原發性夜間遺尿病人的性別以男性居多 ($P=0.031$)，喚醒分數比較高，而兩組在年齡、身高、身高百分位、體重、體重百分位變項中並無差異，這和前人觀察並無差異。

原發性夜間遺尿組和無原發性夜間遺尿組比較基因型和基因多型性頻率（表四）

我們比較夜間遺尿的病童和對照組之間 5HT_{2A} 基因的多型性 (TT、TC、CC) 和基因多型性的頻率 (T、C) 的相關性，發現在原發性夜間遺尿組的基因型與基因頻率的分布分別是 TT(42.4%)，TC(40.4%)，CC(17.2%)，T(59.0%)，C(41.0%)而對照組則是 TT(37.1%)，TC(46.8%)，CC(16.1%)，T(57.1%)，C(42.9%)，兩組在基因型和基因頻率間無差異性，P 值分別是 0.731 和 0.786。

原發性夜間遺尿組中合併頻尿以及無合併兩組比較基因型和基因多型性頻率(表五)

我們比較夜間遺尿的病童合併頻尿以及無合併頻尿兩組之間 5HTR2A 基因的多型性 (TT、TC、CC) 和基因多型性的頻率 (T、C) 的相關性，發現在頻尿組的基因型與基因頻率的分布分別是 TT(58.3%)，TC(25.0%)，CC(16.6%)，T(66.7%)，C(31.3%)而無合併頻尿組則是 TT(39.6%)，TC(58.4%)，CC(20.7%)，T(55.3%)，C(44.7%)，兩組在基因型有顯著差異，**P 值是 0.037**，**頻尿組基因型以 TT 表現居多。**

原發性夜間遺尿組中難喚醒以及易喚醒兩組比較基因型和基因多型性頻率 (表六)

我們比較原發性夜間遺尿的病童難喚醒以及易喚醒兩組之間 5HTR2A 基因的多型性 (TT、TC、CC) 和基因多型性的頻率 (T、C) 的相關性，發現在難喚醒以及易喚醒兩組的分布分別是 TT(52.5%)，TC(37.5%)，CC(10.0%)，T(65.5%)，C(34.5%)而無合併頻尿組則是 TT(35.6%)，TC(42.4%)，CC(22.0%)，T(54.8%)，C(45.2%)，兩組在基因型和基因頻率間無差異性，P 值分別是 0.156 和 0.786。

原發性夜間遺尿組中有家族史以及無家族史兩組比較基因型和基因多型性頻率 (表七)

我們比較原發性夜間遺尿的病童有家族史以及無家族史兩組之間 5HTR2A 基因的多型性 (TT、TC、CC) 和基因多型性的頻率 (T、C) 的相關性，發現在有家族史以及無家族史兩組的分布分別是 TT(40.0%)，TC(42.2%)，

CC(17.8%)，T(58.7%)，C(41.3%)而無合併頻尿組則是 TT(44.4%)，TC(38.9%)，CC(16.7%)，T(60.0%)，C(40.0%)，兩組在基因型和基因頻率間無差異性，P 值分別是 0.896 和 1.000。

原發性夜間遺尿組中有便秘以及無便秘兩組比較基因型和基因多型性頻率 (表八)

我們比較原發性夜間遺尿的病童有便秘以及無便秘兩組之間 5HTR2A 基因的多型性 (TT、TC、CC) 和基因多型性的頻率 (T、C) 的相關性，發現在有便秘以及無便秘兩組的分布分別是 TT(63.6%)，TC(24.2%)，CC(12.1%)，T(70.7%)，C(36.3%)而無合併頻尿組則是 TT(31.8%)，TC(48.5%)，CC(19.7%)，T(54.1%)，C(45.9%)，兩組在基因型有顯著差異，P 值是 0.010，頻尿組基因型以 TT 表現居多。

5HTR2A 基因多型性在原發性夜間遺尿病童不同的表現型間的比較 (表九)

我們以原發性夜間遺尿病童是否有白天解尿症狀，喚醒分數和便秘分別不同的表現型和 5HTR2A 的基因型和基因多型性頻率來比較其相關性，發現有無白天頻尿症狀以及有無便秘與 5HTR2A 基因多型性有相關性。

第四章、 討論

第一節、 結果討論

三環抗憂鬱藥用於治療原發性夜間遺尿 1960 年開始，而自從那時候，有許多臨床研究顯示三環抗憂鬱藥可以有效改善原發性夜間遺尿的狀況，雖然這類型的藥物常用來治療情感性疾病，不過近年來這類藥物也用於治療非情感疾病，如原發性夜間遺尿也是其中之一。有些文獻也討論精神疾病和尿失禁之相關性，如憂鬱症和過動症。⁶⁰⁻⁶⁴ **散彈槍假說(shotgun hypothesis)**解釋三環抗憂鬱藥會作用在多種神經傳導物質接受器，如 **adrenergic receptor, muscarinic receptor, serotonin receptor** 三環抗憂鬱藥可增加 synaptic cleft **serotonin** 和 **norepinephrine** 的濃度。¹ 動物實驗也顯示 TCA 會經由 central cholinergic 的機轉，抑制排尿反射導致逼尿肌放鬆。⁶⁵⁻⁶⁷ 另外動物實驗也顯示如果在中樞神經中 monoamine(如 serotonin 和 noradrenaline)會導致憂鬱和膀胱過動(hyperactivity bladder)^{58, 68} 最近也有一些個案報導表示 serotonin reuptake inhibitors(SSRI)，如 Sertraline 和 Fluoxetine 可以用來治療尿床。^{69-71,72} 這些發現再度暗示 serotonin 在夜尿的產生扮演一個重要的角色。

Serotonin 是一個很重要的神經傳遞物質，它參與許多重要的生理活動，如睡眠、食慾、體溫調節、疼痛的感受和荷爾蒙的分泌。對於睡眠中被膀胱膨脹之排尿反射刺激之喚醒能力障礙是原發性夜間遺尿重要機轉之一，而它的調控的地方是位於**腦幹的神經核**。原發性夜間遺尿一般認為是中樞神經不成熟的疾病，對

排尿反射的中樞抑制和喚醒能力的缺乏是造成原發性夜間遺尿重要的原因。而這兩種能力主要控制是在腦幹的神經核。^{7, 25-27, 29, 73}曾經有人以電位刺激合併腦波檢查，包括 brainstem auditory evoked potential, visual evoked potential, event-related acoustic- evoked potential 和 prepulse inhibition of startle reflex (PPI) 發現尿床的人和不會尿床的人是不同的，表示尿床的人腦幹功能較不成熟。^{74, 75} Wolfish 等人曾提出夜尿病童在睡眠時，清醒的門檻較高，也就是膀胱膨脹腦幹神經核不易被活化。⁷⁶ Unal 發現在尿床的人在 bulbar reticular formation neuron 的抑制功能較弱，⁷⁷ 另外 Kohyama 也發現尿床的人在 pontine reticular formation 有功能上的變異，這些實驗也再次證明夜尿的人腦幹的成熟度較慢。⁷⁸ 廣為大家所認知 **5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2A (5HTR2A)** 會引起 phospholipase C system 活化，產生 inositol trisphosphate 接下來產生一系列的反應，5HTR2A 的調控 gene 是位在 **13q14**，這個 gene 共有 20kb，內含有三種 exons 和二個 introns；轉譯為 serotonin receptor，是一種 G-protein-linked receptor，而調控基因的變異會影響 5HTR2A receptor 的表現，進而影響 serotonin 的神經傳導。

本文是首先發表 5HTR2A 單一核苷酸多型性和夜間遺尿的關連，而且本研究結果發現 5HTR2A 單一核苷酸多型性和多症狀夜間遺尿有關，尤其是 **TT** genotype。原發性夜間遺尿一般可區分為單一症狀和多症狀兩種，**多症狀**原發性夜間遺尿病童有白天病狀如尿頻、尿急、便秘等，多症狀夜間遺尿病童和併便秘有較高的比率會頻尿和泌尿道感染。

本研究再次驗證原發性夜間遺尿並非單一疾病，它至少可以區分為單一症狀原發性夜間遺尿或多症狀原發性夜間遺尿，多症狀原發性夜間遺尿會合併膀胱和腸道症狀，這兩種亞型形成原因可能不同，而 serotonin 在多症狀原發性夜間遺尿上則扮演著重要的角色。如此分類可以提供臨床照顧病人方面提供有效的資訊，決定之後治療訓練的方式。這實驗結果在原發性夜間遺尿遺傳研究的路上開啟一扇窗，在原發性夜間遺尿遺傳研究上，並且幫助我們更了解原發性夜間遺尿複雜的原因和神經傳導物質之間的關係。未來的研究在這個相關主題上，如果有更大的規模更多的檢體可以幫助我們了解 5HT_{2A} 單一核苷酸多型性在原發性夜間遺尿上扮演的角色。

第二節 其他相關性討論

原發性夜間遺尿應區分亞型的觀念是由 Djurhuus 和 Neveus 兩人所提出的，主要分成二種亞型，一種是尿量過多(volume dependent)，這類型的小朋友膀胱功能和膀胱容量是正常的，而這些人對於 Desmopressin 的反應佳。^{79,80} 另一種是膀胱容量不足(detrusor dependent)，這類型的小朋友比較會有白天頻尿，而功能性膀胱容積不足，一個晚上可能會數次的原發性夜間遺尿，這類型的病人對 Desmopressin 的反應不佳，但是對原發性夜間遺尿鬧鈴治療效果較佳。而這二類型病童的共同表現則是夜晚尿鈉排泄量高(nocturnal natriuresis)，合併或未合併多尿(polyuria)，高尿鈣(hypercalciuria)和不同程度的睡眠時呼吸道阻塞或呼吸中

止，便秘等。臨床上對於原發性夜間遺尿的**分型(subtype)**是重要的，因為原發性夜間遺尿包含數種截然不同的臨床表現，這可以幫助我們更了解原發性夜間遺尿不同的原因和處理治療的策略。一般認為原發性夜間遺尿的形成是基於三種主要的機轉，第一是尿量過多(volume dependent)。第二是功能性膀胱容量過小(detrusor dependent)。第三是對於膀胱膨脹引發排尿反射的喚醒能力不佳(sleep/arousal dependent)。而原發性夜間遺尿孩童就是上述三種機能尚未發育成熟。至於 nocturnal natriuresis、hypercalciuria、sleep apnea、constipation 則尚未有明確的定位。

本研究再次驗證了前人的看法，原發性夜間遺尿是一群複雜的疾病和多基因調控，如同高血壓、糖尿病、氣喘等。先前我們並無妥善的研究方法可以探討這些遺傳因素，近年來由於人類基因體科技之進展帶動了分子醫學之新紀元，也建立人類遺傳學研究之新趨向。目前許多遺傳學家正致力於人類序列之變異(human sequence variation)，人類基因序列之變異以單一核苷酸多型性最為常見。多基因遺傳疾病是由於多個單一核苷酸多型性與環境因子交互作用的結果。根據“常見疾病-常見變異”的假說(common disease - common variant hypothesis)，罹患常見疾病的風險乃是受到常見單一核苷酸多型性的影響，也就是說，若某個人的 DNA 序列上存在某個特定的單一核苷酸多型性時，則其罹病機率將比一般人來的大。

第三節 研究限制

在尿失禁學會定義，原發性單一症狀夜間遺尿有幾個論述，如果原發性夜間遺尿的孩童有任何白天症狀表示此兒童有潛在膀胱功能失調。但是白天症狀在第一次問卷中通常是正常，而在反覆問卷甚至是尿床日誌中才被發現，而白天頻尿的情形常會因白天飲水量少而未被發現，而有些小孩是因為膀胱容量相對於同年齡較小而被發現。所以在以往的遺傳研究中，許多和併白天症狀的孩童被誤認為是單一症狀夜間遺尿，也許是這個因素，所以許多原發性夜間遺尿的遺傳研究是多基因遺傳，或許夜間遺尿可能是多種基因的疾病所造成。國內許多夜間遺尿的兒童不易被診斷有膀胱功能異常，即膀胱容量較小的原因，是因為白天飲水量少或者是因為擔心遺尿的問題而減少飲水量，而導致白天溶質排出量減少，更增加夜間利尿的情況。

第五章、結論與建議

本研究分析原發性夜間遺尿病人和對照組年紀、性別、身高、身高百分位、體重、體重百分位、喚醒分數七個變項中發現，原發性夜間遺尿病人的性別以男性居多，喚醒分數比較高，而在年齡、身高、身高百分位、體重、體重百分位變項中並無差異。

單一核苷酸鹼基變異方面，多症狀型原發性夜間遺尿包括便秘和白天頻尿分析傾向5HTR2A變異在統計上有顯著的意義，顯示單一核苷酸多型性的分析可能和原發性夜間遺尿分別評比較相關。本研究再次驗證了前人的看法，原發性夜間遺尿是一群複雜的疾病和多基因調控。若是以夜間遺尿整體性的比較，可能因子太多而更複雜，則較難得到有顯著的結果；須等到收集更多病人才會有出現較有意義的結論。

參考文獻

1. Wolfish, N. M.: Sleep/Arousal and enuresis subtypes. *J Urol*, **166**: 2444, 2001
2. Loeys, B., Hoebeke, P., Raes, A., Messiaen, L., De Paepe, A., Vande Walle, J.: Does monosymptomatic enuresis exist? A molecular genetic exploration of 32 families with enuresis/incontinence. *BJU Int*, **90**: 76, 2002
3. Thiedke, C. C.: Nocturnal enuresis.see comment. *Am Fam Physician*, **67**: 1499, 2003
4. Yeung, C. K., Sreedhar, B., Leung, V. T., Metreweli, C.: Ultrasound bladder measurements in patients with primary nocturnal enuresis: a urodynamic and treatment outcome correlation. *J Urol*, **171**: 2589, 2004
5. Baeyens, D., Roeyers, H., Hoebeke, P., Verte, S., Van Hoecke, E., Walle, J. V.: Attention deficit/hyperactivity disorder in children with nocturnal enuresis. *J Urol*, **171**: 2576, 2004
6. Dehoorne, J. L., Walle, C. V., Vansintjan, P., Raes, A. M., De Guchtenaere, A. R., Van Laecke, E., et al: Characteristics of a tertiary center enuresis population, with special emphasis on the relation among nocturnal diuresis, functional bladder capacity and desmopressin response. *J Urol*, **177**: 1130, 2007
7. Baeyens, D., Roeyers, H., Hoebeke, P., Antrop, I., Mael, R., Walle, J. V.: The impact of attention deficit hyperactivity disorders on brainstem dysfunction in nocturnal enuresis. *J Urol*, **176**: 744, 2006
8. Tai, H. L., Chang, Y. J., Chang, S. C., Chen, G. D., Chang, C. P., Chou, M. C.: The epidemiology and factors associated with nocturnal enuresis and its severity in primary school children in Taiwan. *Acta Paediatr*, **96**: 242, 2007
9. Rushton, H. G.: Nocturnal enuresis: epidemiology, evaluation, and currently available treatment options. *J Pediatr*, **114**: 691, 1989
10. Cher, T. W., Lin, G. J., Hsu, K. H.: Prevalence of nocturnal enuresis and associated familial factors in primary school children in taiwan. *J Urol*, **168**: 1142, 2002
11. Balat, A., Alasehirli, B., Oguzkan, S., Gungor, M.: Nitric oxide synthase gene polymorphisms in children with primary nocturnal enuresis: a preliminary study. *Ren Fail*, **29**: 79, 2007

12. Bayoumi, R. A., Eapen, V., Al-Yahyaee, S., Al Barwani, H. S., Hill, R. S., Al Gazali, L.: The genetic basis of inherited primary nocturnal enuresis: A UAE study. *J Psychosom Res*, **61**: 317, 2006
13. Yeung, C. K., Sit, F. K., To, L. K., Chiu, H. N., Sihoe, J. D., Lee, E., et al: Reduction in nocturnal functional bladder capacity is a common factor in the pathogenesis of refractory nocturnal enuresis. *BJU Int*, **90**: 302, 2002
14. Eiberg, H., Schaumburg, H. L., Von Gontard, A., Rittig, S.: Linkage study of a large Danish 4-generation family with urge incontinence and nocturnal enuresis. *J Urol*, **166**: 2401, 2001
15. von Gontard, A., Schaumburg, H., Hollmann, E., Eiberg, H., Rittig, S.: The genetics of enuresis: a review. *J Urol*, **166**: 2438, 2001
16. von Gontard, A., Eiberg, H., Hollmann, E., Rittig, S., Lehmkuhl, G.: Molecular genetics of nocturnal enuresis: linkage to a locus on chromosome 22. *Scandinavian Journal of Urology & Nephrology Supplementum*, **202**: 76, 1999
17. Arnell, H.: The genetics of nocturnal enuresis: a simple question of complexity.comment. *Acta Paediatrica*, **87**: 487, 1998
18. Eiberg, H.: Total genome scan analysis in a single extended family for primary nocturnal enuresis: evidence for a new locus (ENUR3) for primary nocturnal enuresis on chromosome 22q11. *Eur Urol*, **33 Suppl 3**: 34, 1998
19. Hollmann, E., Von Gontard, A., Eiberg, H., Rittig, S., Lehmkuhl, G.: Molecular genetic, clinical and psychiatric associations in nocturnal enuresis. *Br J Urol*, **81**: 37, 1998
20. von Gontard, A., Eiberg, H., Hollmann, E., Rittig, S., Lehmkuhl, G.: Molecular genetics of nocturnal enuresis: clinical and genetic heterogeneity.see comment. *Acta Paediatrica*, **87**: 571, 1998
21. Arnell, H., Hjalmas, K., Jagervall, M., Lackgren, G., Stenberg, A., Bengtsson, B., et al: The genetics of primary nocturnal enuresis: inheritance and suggestion of a second major gene on chromosome 12q. *J Med Genet*, **34**: 360, 1997
22. von Gontard, A., Eiberg, H., Hollmann, E., Rittig, S., Lehmkuhl, G.: Genetic heterogeneity in nocturnal enuresis. *Am J Psychiatry*, **154**: 885, 1997

23. Eiberg, H.: Nocturnal enuresis is linked to a specific gene. *Scandinavian Journal of Urology & Nephrology Supplementum*, **173**: 15, 1995
24. Eiberg, H., Berendt, I., Mohr, J.: Assignment of dominant inherited nocturnal enuresis (ENUR1) to chromosome 13q. *Nat Genet*, **10**: 354, 1995
25. Freitag, C. M., Rohling, D., Seifen, S., Pukrop, R., von Gontard, A.: Neurophysiology of nocturnal enuresis: evoked potentials and prepulse inhibition of the startle reflex. *Developmental Medicine & Child Neurology*, **48**: 278, 2006
26. von Gontard, A., Freitag, C. M., Seifen, S., Pukrop, R., Rohling, D.: Neuromotor development in nocturnal enuresis. *Developmental Medicine & Child Neurology*, **48**: 744, 2006
27. Iscan, A., Ozkul, Y., Unal, D., Soran, M., Kati, M., Bozlar, S., et al: Abnormalities in event-related potential and brainstem auditory evoked response in children with nocturnal enuresis. *Brain Dev*, **24**: 681, 2002
28. Watanabe, H. and Kawauchi, A.: Locus coeruleus function in enuresis. *Scandinavian Journal of Urology & Nephrology Supplementum*, **202**: 14, 1999
29. Unal, M., Tataroglu, C., Toros, F., Kanik, A., Pata, Y. S.: Brainstem evaluation in children with primary nocturnal enuresis. *Acta Med Okayama*, **58**: 1, 2004
30. Kohyama, J., Kumada, S., Shimohira, M., Araki, S., Itoh, M., Iwakawa, Y.: Nocturnal enuresis and the pontine reticular formation. *Eur Urol*, **38**: 631, 2000
31. Chandra, M., Saharia, R., Hill, V., Shi, Q.: Prevalence of diurnal voiding symptoms and difficult arousal from sleep in children with nocturnal enuresis. *J Urol*, **172**: 311, 2004
32. Gepertz, S. and Neveus, T.: Imipramine for therapy resistant enuresis: a retrospective evaluation. *J Urol*, **171**: 2607, 2004
33. Medel, R., Ruarte, A. C., Castera, R., Podesta, M. L.: Primary enuresis: a urodynamic evaluation. *Br J Urol*, **81**: 50, 1998
34. Khanna, O. P., Heber, D., Gonick, P.: Cholinergic and adrenergic neuroreceptors in urinary tract of female dogs. Evaluation of function with pharmacodynamics. *Urology*, **5**: 616, 1975
35. Aikawa, T., Kasahara, T., Uchiyama, M.: The arginine-vasopressin secretion

- profile of children with primary nocturnal enuresis. *Eur Urol*, **33**: 41, 1998
36. Eggert, P.: What's new in enuresis? *Acta Paediatrica Taiwanica*, **43**: 6, 2002
37. Cayan, S., Doruk, E., Bozlu, M., Akbay, E., Apaydin, D., Ulusoy, E., et al: Is routine urinary tract investigation necessary for children with monosymptomatic primary nocturnal enuresis? *Urology*, **58**: 598, 2001
38. Cayan, S., Doruk, E., Bozlu, M., Duce, M. N., Ulusoy, E., Akbay, E.: The assessment of constipation in monosymptomatic primary nocturnal enuresis. *International Urology & Nephrology*, **33**: 513, 2001
39. Soderstrom, U., Hoelcke, M., Alenius, L., Soderling, A. C., Hjern, A.: Urinary and faecal incontinence: a population-based study. *Acta Paediatrica*, **93**: 386, 2004
40. Zaffanello, M., Giacomello, L., Brugnara, M., Fanos, V.: Therapeutic options in childhood nocturnal enuresis. *Minerva Urol Nefrol*, **59**: 199, 2007
41. Yeung, C. K.: Nocturnal enuresis (bedwetting). *Curr Opin Urol*, **13**: 337, 2003
42. Etele-Hainz, A., Artens, E., Marberger, M.: Therapy concept in enuretic children. *Eur Urol*, **33**: 49, 1998
43. Kroll, P. and Zachwieja, J.: The system of management nocturnal enuresis based on functional classification. *Przegl Lek*, **63 Suppl 3**: 229, 2006
44. Van Kampen, M., Bogaert, G., Akinwuntan, E. A., Claessen, L., Van Poppel, H., De Weerd, W.: Long-term efficacy and predictive factors of full spectrum therapy for nocturnal enuresis. *J Urol*, **171**: 2599, 2004
45. Glazener, C. M. and Evans, J. H.: Drugs for nocturnal enuresis in children (other than desmopressin and tricyclics).update in *Cochrane Database Syst Rev*. 2003;(4):CD002238; PMID: 14583948. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 002238, 2000
46. Glazener, C. M. and Evans, J. H.: Tricyclic and related drugs for nocturnal enuresis in children.update in *Cochrane Database Syst Rev*. 2003;(3)
47. Tietjen, D. N. and Husmann, D. A.: Nocturnal enuresis: a guide to evaluation and treatment. *Mayo Clin Proc*, **71**: 857, 1996

48. Eggert, P., Fritz, A., Stecker, B., Muller, D.: Desmopressin has an influence on the arousability of children with primary nocturnal enuresis. *J Urol*, **171**: 2586, 2004
49. Miller, K., Atkin, B., Moody, M. L.: Drug therapy for nocturnal enuresis. Current treatment recommendations. *Drugs*, **44**: 47, 1992
50. van Kerrebroeck, P. E.: Experience with the long-term use of desmopressin for nocturnal enuresis in children and adolescents. *BJU Int*, **89**: 420, 2002
51. Yang, S. S., Chiou, Y. H., Lin, C. Y., Cher, T. W., Yu, T. J., Lin, A. T., et al: Treatment guideline of enuresis in Taiwan. *Acta Paediatrica Taiwanica*, **42**: 271, 2001
52. Alessi, N. E., Knight, C. D., Bergs, J. T., Eisner, S. J.: A double-blind, placebo-controlled study of the effect of imipramine on TRH-induced urinary urgency in healthy men. *Psychoneuroendocrinology*, **17**: 223, 1992
53. Glazener, C. M., Evans, J. H., Peto, R. E.: Drugs for nocturnal enuresis in children (other than desmopressin and tricyclics).update of Cochrane Database Syst Rev. 2000;(3):
54. Glazener, C. M., Evans, J. H., Peto, R. E.: Tricyclic and related drugs for nocturnal enuresis in children.update of Cochrane Database Syst Rev. 2000;(3)
55. Mikkelsen, E. J.: Enuresis and encopresis: ten years of progress. *Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry*, **40**: 1146, 2001
56. Tamayo, M., Fernandez de Gatta, M. M., Garcia, M. J., Dominguez-Gil, A.: Dosage optimization methods applied to imipramine and desipramine in enuresis treatment. *J Clin Pharm Ther*, **17**: 55, 1992
57. Tamayo, M., Fernandez de Gatta, M. M., Garcia, M. J., Dominguez-Gil, A.: Population pharmacokinetics of imipramine in children. *Eur J Clin Pharmacol*, **43**: 89, 1992
58. Maggi, C. A., Borsini, F., Lecci, A., Giuliani, S., Meli, P., Gragnani, L., et al: Effect of acute or chronic administration of imipramine on spinal and supraspinal micturition reflexes in rats. *J Pharmacol Exp Ther*, **248**: 278, 1989

59. Nothwang, H. G., Wirth, J., Brandl, B., Haaf, T., Nielsen, K. B., Tommerup, N., et al: Identification of positional candidates for neurological disorders on chromosome 13q14-->q22. *Cytogenet Cell Genet*, **79**: 293, 1997
60. Volkers, A. C., Heerdink, E. R., van Dijk, L.: Antidepressant use and off-label prescribing in children and adolescents in Dutch general practice (2001-2005). *Pharmacoepidemiol Drug Saf*, 2007
61. Steers, W. D. and Lee, K. S.: Depression and incontinence. *World J Urol*, **19**: 351, 2001
62. Ambrosini, P. J., Bianchi, M. D., Rabinovich, H., Elia, J.: Antidepressant treatments in children and adolescents: II. Anxiety, physical, and behavioral disorders. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, **32**: 483, 1993
63. Murphy, D. L., Siever, L. J., Insel, T. R.: Therapeutic responses to tricyclic antidepressants and related drugs in non-affective disorder patient populations. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, **9**: 3, 1985
64. Quist, J. F., Barr, C. L., Schachar, R., Roberts, W., Malone, M., Tannock, R., et al: Evidence for the serotonin HTR2A receptor gene as a susceptibility factor in attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). *Mol Psychiatry*, **5**: 537, 2000
65. Labay, P. and Boyarsky, S.: The action of imipramine on the bladder musculature. *J Urol*, **109**: 385, 1973
66. Wand, H.: Effect of thymoleptic agents on the motor function of the bladder (animal experiments and clinical studies). *Urologe A*, **11**: 284, 1972
67. Sohn, U. D. and Kim, C. Y.: Suppression of the rat micturition reflex by imipramine. *J Auton Pharmacol*, **17**: 35, 1997
68. Springer, J. P., Kropp, B. P., Thor, K. B.: Facilitatory and inhibitory effects of selective norepinephrine reuptake inhibitors on hypogastric nerve-evoked urethral contractions in the cat: a prominent role of urethral beta-adrenergic receptors. *J Urol*, **152**: 515, 1994
69. Kandil, S. T., Aksu, H. B., Ozyavuz, R.: Reversible nocturnal enuresis in children receiving SSRI with or without risperidone: presentation of five cases. *Israel Journal of Psychiatry & Related Sciences*, **41**: 218, 2004

70. Feeney, D. J. and Klykylo, W. M.: SSRI treatment of enuresis. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, **36**: 1326, 1997
71. Took, K. J. and Buck, B. J.: Enuresis with combined risperidone and SSRI use. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, **35**: 840, 1996
72. Murray, M. E.: Treatment of enuresis with paroxetine. *J Dev Behav Pediatr*, **18**: 435, 1997
73. Von Gontard, A., Schmelzer, D., Seifen, S., Pukrop, R.: Central nervous system involvement in nocturnal enuresis: evidence of general neuromotor delay and specific brainstem dysfunction. *J Urol*, **166**: 2448, 2001
74. Freitag, C. M., Rohling, D., Seifen, S., Pukrop, R., von Gontard, A.: Neurophysiology of nocturnal enuresis: evoked potentials and prepulse inhibition of the startle reflex. *Developmental Medicine & Child Neurology*, **48**: 278, 2006
75. Iscan, A., Ozkul, Y., Unal, D., Soran, M., Kati, M., Bozlar, S., et al: Abnormalities in event-related potential and brainstem auditory evoked response in children with nocturnal enuresis. *Brain Dev*, **24**: 681, 2002
76. Wolfish, N. M.: Sleep/Arousal and enuresis subtypes. *J Urol*, **166**: 2444, 2001
77. Unal, M., Tataroglu, C., Toros, F., Kanik, A., Pata, Y. S.: Brainstem evaluation in children with primary nocturnal enuresis. *Acta Med Okayama*, **58**: 1, 2004
78. Kohyama, J., Kumada, S., Shimohira, M., Araki, S., Itoh, M., Iwakawa, Y.: Nocturnal enuresis and the pontine reticular formation. *Eur Urol*, **38**: 631, 2000
79. Hagstroem, S., Kamperis, K., Rittig, S., Rijkhoff, N. J., Djurhuus, J. C.: Monosymptomatic nocturnal enuresis is associated with abnormal nocturnal bladder emptying. *J Urol*, **171**: 2562, 2004
80. Hunsballe, J. M., Hansen, T. K., Rittig, S., Norgaard, J. P., Pedersen, E. B., Djurhuus, J. C.: Polyuric and non-polyuric bedwetting--pathogenic differences in nocturnal enuresis. *Scand J Urol Nephrol Suppl*, **173**: 77, 1995

圖表

(表一) 臺灣地區原發性夜間遺尿流行病學的研究

Table 1 The frequency of PNE in relation to age and sex

<i>Age (years)</i>	<i>Boys n/N (%)</i>	<i>Girls n/N (%)</i>	<i>Total n/N (%)</i>
6	21/129 (16)	10/100 (10)	31/299 (14)
7	15/105 (14)	8/85 (9)	23/190 (12)
8	12/99 (12)	6/94 (6)	18/193 (9)
9	6/80 (8)	3/87 (4)	9/167 (5)
10	4/126 (3)	3/93 (3)	7/219 (3)
11	3/85 (3)	1/93 (1)	4/178 (2)
Total	61/624 (10)	31/552 (6)	92/1176 (8)

n, number of enuretic children; *N*, total number in each age group.

2001 BJU International 87, 678–681



初診病人--原發性夜間遺尿評估表

病患姓名：

病歷號碼：

A. 病史詢問(家長請填寫)

1. 尿床情形 白天與晚上都有遺尿情形嗎？ 只有在床上睡覺才會遺尿嗎（夜尿）？
2. 尿床出現時間 出生後就一直有 曾有乾爽六個月之後，才又復發
3. 日間症狀
小便次數 高頻率（每天多於八次） 低頻率（每天少於四次） 正常（每天四～八次） 其他
尿量經常是 多量 中量 少量
解尿前問題 無 尿急但解不出來 常憋尿 急尿
解尿時間問題 無 小便流速慢 小便疼痛 小便斷斷續續 壓膀胱才尿得出來 其他
4. 泌尿道感染史 無 有：_____
5. 排便習慣 正常 內褲上會沾到大便 大便失禁 便秘
6. 神經學病史 無 運動與語言障礙 學習或閱讀障礙 學校學習困難
7. 心理學病史 無 精神病史 行為異常史 睡眠障礙
8. 家族尿床史 無 有：_____
9. 現在使用藥物 無 有：_____
10. 從睡眠中甦醒過來的評估分數_____
 1. 當有人在房內輕聲交談或開燈能甦醒
 2. 當有人叫你名字能甦醒
 3. 當有人大聲叫你名字或聽到鬧鐘聲響能甦醒
 4. 當有人在耳邊大聲叫你名字或搖你能甦醒
 5. 當房屋內有巨大聲響或振動能甦醒
 6. 當身體站立起來能甦醒
 7. 當身體站立起來並且被人攙扶行走能甦醒
 8. 當身體被人帶離開床都不能甦醒

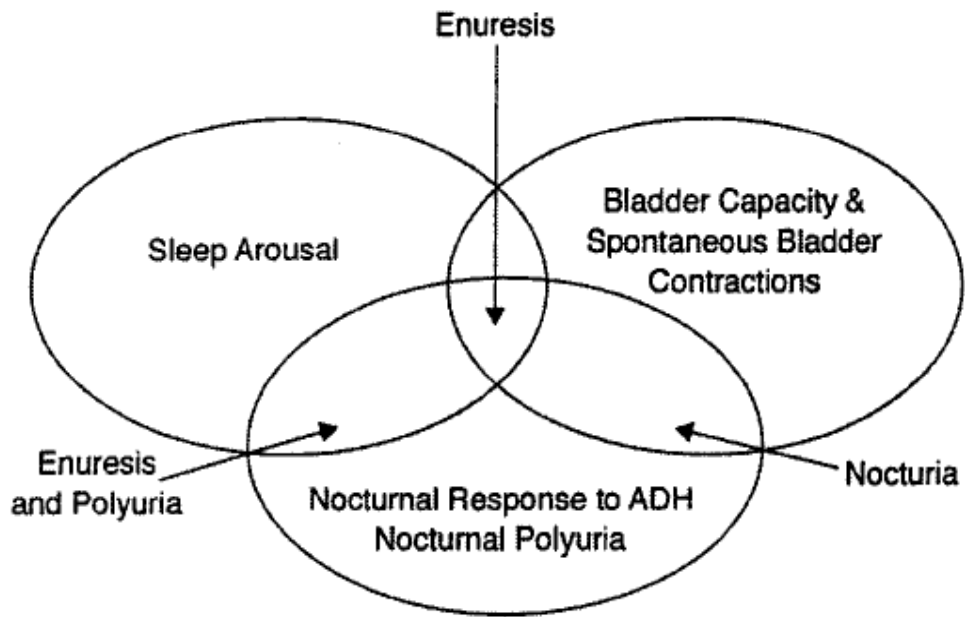
B. 理學檢查(醫師填寫)

1. 腹部 正常 腸胃蠕動異常 肋骨脊椎骨交界敲痛 摸得到膀胱 下腹痛 腎臟腫大
2. 外生殖器異常 無 尿道上裂 尿道下裂 尿道狹窄 異位輸尿管 大小便異味
3. 泌尿神經學 正常 腰薦椎凹陷或腫塊 脊椎管縫合不全 肛門反射異常 肛門張力異常 下肢異常
4. 觀察排尿情形 正常 異常：_____

C. 實驗室檢查(醫師填寫)

1. 必須的 尿液分析 尿比重 腎臟超音波 BUN/Creatinine CBC管留全血 2 cc
2. 選擇性的 尿液細菌培養 血清肌酐酸與鈉離子 K.U.B 餘尿測量 尿動力學 口渴測試 血清抗利尿激素

(圖一) 原發性夜間遺尿的形成三種主要的機轉



(表二) 原發性夜間遺尿候選基因選取(Candidate genes search)

gene	dbSNP rs#cluster id	Material method	SNP	restriction enzyme	Primer	size(bp)
AVP	rs13041148	sequence	4		CCGTGCTCACACGTCCTC	270
					CATTGGCGGAGGTTTATTGT	
	rs5195	RFLP	1	Hpy99I	GGCAAAGGCCGCTGCTT	179
					TCGTTGCAGCAAACGCCGAA	
5HTR2A	rs3125	sequence	4		TTCAGTGTCAGTACAAGGAAAACAA	420
					CCAAGCACACATTTTGTAGCA	
	rs17069218	RFLP	1	Hpych4V	GGTCAGTGTTATAAAATCTGTATTGC	349
					CCAAATACCTCGATAGTGCTG	
	rs6313	RFLP	1	Bspel	CAGCCACCACAGTTCAGTTC	433
					CGGCTGTCAGTAAAGCAGAC	
CYR61	rs2297140	RFLP	2	ApaI MscI	GACCTCGAGCGAAAGACG	537
					GGGAGAAGATACGCGTGAGA	
	rs1062805	sequence	9		CCTCGGCTGGTCAAAGTTA	451
					CATTGGTAACTCGTGTGGAGA	
	rs9658587	RFLP	1	FauI	ACGCTGGATGTTTGAGTGTG	211
					CCCTTGTTTGTCTAGGTGTGC	
	rs9658588	RFLP	1	MspI	CCCTTGTTTGTCTAGGTGTGC	289
					AGCTGACCAGGACTGTGAAGATC	
DRD5	rs2227845	sequence	12		CAGCTCAACTGGCACAGG	489
					CGGGGTTGAGTGAGGAGTTA	
	rs16888557	RFLP	2	AlwNI Ddel	AACCAAGACATCGTCTTCCA	295
					CAGTGTCTGTGCGGTTATGC	

(表三) 原發性夜間遺尿病童臨床表現和對照組的分析

	Enuresis(-)	Enuresis(+)	P
	n=62	n=99	
Age (year)	10.58 ± 1.69	10.87 ± 2.82	0.143
Sex (M/F)	32/30	52/47	0.031
Height (cm)	138.85 ± 12.28	132.71 ± 16.5	0.637
percentile	3.35 ± 1.42	3 ± 0.38	0.164
Weight (Kg)	35.25 ± 10.4	33.07 ± 13.80	0.989
percentile	3.16 ± 1.34	3 ± 0.38	0.611

(表四) 原發性夜間遺尿病童和正常兒童基因型和基因多型性頻率分析

	Nocturnal enuresis	Normal subjects	P
	No. (%) (n=99)	No. (%) (n=62)	Value*
Genotype			
TT	42(42.4)	23(37.1)	0.731
TC	40(40.4)	29(46.8)	
CC	17(17.2)	10(16.1)	
Allelic frequency			
Allele T	82(59.0)	52(57.1)	0.786
Allele C	57(41.0)	39(42.9)	

(表五) 原發性夜間遺尿病童有無合併頻尿基因型和基因多型性頻率分析

	Frequency No. (%) (n=36)	Non- frequency No. (%) (n=63)	<i>P</i> Value*
Genotype			
TT	21(58.3)	21(39.6)	0.037
TC	9(25.0)	31(58.4)	
CC	6(16.6)	11(20.7)	
Allelic frequency			
Allele T	30(66.7)	52(55.3)	0.182
Allele C	15(31.3)	42(44.7)	



(表六)原發性夜間遺尿病童難喚醒和易喚醒兩組基因型和基因多型性頻率分析

	Arousal score		P Value*
	6-8 (difficultly awaken)	2-5 (easily awaken)	
	No. (%) (n=40)	No. (%) (n=59)	
Genotype			
TT	21(52.5)	21(35.6)	0.156
TC	15(37.5)	25(42.4)	
CC	4(10.0)	13(22.0)	
Allelic frequency			
Allele T	36(65.5)	46(54.8)	0.786
Allele C	19(34.5)	38(45.2)	

(表七)原發性夜間遺尿病童有無其家族史基因型和基因多型性頻率分析

	Nocturnal enuresis patients		P Value*
	with family history	without family history	
	Patient No. (%) (n=45)	Patient No. (%) (n=54)	
Genotype			
TT	18(40.0)	24(44.4)	0.896
TC	19(42.2)	21(38.9)	
CC	8(17.8)	9(16.7)	
Allelic frequency			
Allele T	37(58.7)	45(60.0)	1.000
Allele C	26(41.3)	30(40.0)	

(表八) 原發性夜間遺尿病童有無便秘其基因型和基因多型性頻率分析

	Nocturnal enuresis patients		<i>P</i> Value*
	with constipation	without constipation	
	Patient No. (%) (n=33)	Patient No. (%) (n=66)	
Genotype			
TT	21(63.6)	21(31.8)	0.010
TC	8(24.2)	32(48.5)	
CC	4(12.1)	13(19.7)	
Allelic frequency			
Allele T	29(70.7)	53(54.1)	0.172
Allele C	12(36.3)	45(45.9)	



(表九) 5HTR2A 基因多型性在原發性夜間遺尿病童不同的表現型間的分析

No. patients	Controls (n=62)	NE (Total) (n=99)	NE with DVS*		NE with high arousal score		NE with constipate**	
			Yes (n=36)	No (n=63)	Yes (n=40)	No (n=59)	Yes (n=33)	No (n=64)
Genotype								
TT	23	42	21	21	21	21	21	21
TC	29	40	9	31	15	25	8	32
CC	10	17	6	11	4	13	4	13
Allelic frequency								
T	52	82	30	52	36	46	29	53
C	39	57	15	42	19	38	12	45

* Genotype distribution in NE with and without DVS yielded statistically significant differences, **P=0.037**; *
Genotype distribution in NE with constipation yielded statistically differences **P=0.010**

