

中國醫藥大學針灸研究所碩士論文

編號：GIAS-95-9402

指導教授：張世良 博士

共同指導教授：林昭庚 教授

論文題目

電針改善大鼠葡萄糖耐受機轉之探討

Investigation of the Mechanisms for Improvement of
Glucose Tolerance in Rats by Electroacupuncture

研究生：邱瑞發

中華民國九十六年七月五日

中國醫藥大學碩士班研究生

論文指導教授推薦書

針灸研究所，邱瑞發君所提之論文

電針改善大鼠葡萄糖耐受機轉之探討

，係由本人指導撰述，同意提付審查。

指導教授_____（簽章）

中華民國九十六年七月五日

中國醫藥大學碩士班研究生

論文口試委員審定書

針灸研究所，邱 瑞 發 君所提之論文
電針改善大鼠葡萄糖耐受機轉之探討，經本委
員會審議，認為符合碩士資格標準。

論文口試委員會 委員 _____ (簽章)

所長 _____

中華民國九十六年七月五日

目 錄

目錄	iv
圖目錄	v
表目錄	vi
中文摘要	1
第一章 前言	3
第二章 文獻探討	8
第一節 中醫學對糖尿病的認知及針灸治療	8
第二節 體內血糖的恆定及代謝	16
第三節 糖尿病及葡萄糖耐力	19
第四節 胰島素的生理功能及運輸	22
第五節 胰島素與訊號蛋白傳遞系統	25
第六節 游離脂肪酸的生理功能及對胰島素之影響	28
第七節 一氧化氮合成酶 (NOS) 與胰島素的關係	32
第八節 副交感神經系統與胰島素的關係	37
第九節 電針在副交感神經系統與 NOS 之調控	39
第十節 足三里與一氧化氮合成酶 (NOS) 的關係	41
第三章 材料與方法	42
第一節 實驗構想	42
第二節 實驗設計	43
第三節 統計分析	54
第四章 結 果	55
第一節 實驗一：電針在 ivGTT 下對葡萄糖耐量之影響	55
第二節 實驗二：不同阻斷劑 L-NAME、Atropine 與 HC-3， 對電針改善葡萄糖耐量之影響	58
第三節 實驗三：利用測定游離脂肪酸 FFA 評估電針對 胰島素敏感度之影響	66
第四節 實驗四：電針對胰島素訊號蛋白與 nNOS 影響試驗	70
第五章 討論	76
第六章 結論	82
參考文獻	83
英文摘要	90
謝辭	93

圖 目 錄

圖 3.1 以 Wistar 鼠探討電針雙側足三里改善葡萄糖耐量機轉的動物穴位圖	45
圖 4.1 電針在 ivGTT 下對正常大鼠血糖耐量的影響	58
圖 4.2 L-NAME 阻斷電針在 ivGTT 下對正常大鼠血糖變化的影響	60
圖 4.3 Atropine 阻斷電針在 ivGTT 下對正常大鼠血糖變化的影響	61
圖 4.4 HC-3 阻斷電針在 ivGTT 下對正常大鼠血糖變化的影響	62
圖 4.5 合併 L-NAME 與 Atropine 阻斷電針在 ivGTT 下對血糖變化的影響	64
圖 4.6 合併 L-NAME 與 HC-3 阻斷電針在 ivGTT 下對血糖變化的影響	65
圖 4.7 在 ivGTT 下電針對正常大鼠游離脂肪酸變化的影響	67
圖 4.8 在 L-NAME 與 Atropine 作用下做 ivGTT，電針對正常大鼠游離脂肪酸變化的影響	69
圖 4.9 在 ivGTT 下電針對胰島素訊息蛋白與 nNOS 的效應	71
圖 4.10 西方點墨法做胰島素訊息蛋白與 nNOS 的 X 光壓片呈色圖	72
圖 4.11 正常大鼠雙側足三里電針之實驗模型。	73

表 目 錄

表 4.1	電針在 ivGTT 下改善大鼠葡萄糖耐量各實驗結果、意義	74
-------	------------------------------	----



中文摘要

電針改善大鼠葡萄糖耐受機轉之探討

邱瑞發¹ 林昭庚² 張世良¹

¹ 中國醫藥大學 針灸研究所

² 中國醫藥大學 中國醫學研究所

目前已知電針可改善正常大鼠與類固醇誘導的糖尿病鼠葡萄糖耐受量 (glucose tolerance) 之現象，本研究的目的是進一步探討電針兩側足三里 (ST 36) 對正常大鼠葡萄糖耐受試驗的影響與其相關機轉。

我們利用雄性威斯特 (wistar) 大鼠，做靜脈注射葡萄糖耐受試驗 (intravenous Glucose Tolerance Test、ivGTT)。利用副交感神經阻斷劑阿脫品 (atropine)、HC-3 (hemicholinium-3) 抑制乙醯膽鹼 (Ach) 的生成與一氧化氮合成酶抑制劑 (NG-nitro-L-arginine methyl ester, L-NAME) 阻斷一氧化氮合成酶 (NOS) 的生成。大鼠經空腹 12 小時以上，在麻醉下皆接受 ivGTT，實驗組接受電針兩側足三里，電針劑量 15 Hz，10 mA，60 min；控制組不電針。在實驗開始後 0、15、30、60、90 min 抽血檢測血糖值。並單獨或同時給予 atropine、HC-3 與 L-NAME，觀察電針與不電針兩組的差異性。並利用 atropine 與 L-NAME 觀察電針在 ivGTT 下對游離脂肪酸 (free fatty acid, FFA) 變化量的影響效應。再利用大鼠骨骼肌做蛋白質西

方轉漬法分析 (western blotting assay) 檢測骨骼肌中胰島素訊息蛋白 IRS-1、PI3-Kinase、Akt1、GLUT4、nNOS 及 Actin 的含量，觀察電針與不電針兩組的差異性。

結果我們發現在葡萄糖耐受試驗下，電針處置後血糖下降較不電針組明顯，有統計上顯著差異。以 atropine 或 L-NAME 阻斷劑單獨進行阻斷，電針與不電針組血糖下降仍有差異。同時以 L-NAME 及 atropine、L-NAME 及 HC-3 阻斷劑電針血糖下降，與非電針組無顯著差異。電針在 ivGTT 下也有下降 FFA 的作用，其下降作用也可以被 atropine 與 L-NAME 阻斷劑所阻斷。同時，胰島素訊息蛋白 IRS-1 與 nNOS 相對含量，電針組顯著高於不電針組。

綜合以上，我們的結論是電針足三里能明顯提升正常大鼠 ivGTT 的血糖下降程度，可能透過副交感神經的乙醯膽鹼 (ACh) 及一氧化氮合成酶 (NOS) 降低血中 FFA 達到較佳降糖作用，而且電針可使胰島素訊息蛋白 IRS-1 與 nNOS 相對含量增加。因此，我們推論電針可同時透過副交感神經及 NOS 來提升大鼠對葡萄糖之耐受性。

關鍵詞：電針 (electroacupuncture)，葡萄糖耐受試驗 (glucose tolerance test)，副交感神經 (parasympathetic nerve)，一氧化氮 (nitric oxide, NO)，游離脂肪酸 (free fatty acid, FFA)，胰島素訊息蛋白 (insulin signal protein)。

第一章 前言

受現代文明影響的台灣地區，隨著現代醫學技術的進步及醫藥的發展，在四、五十年代影響國人健康的是傳染性疾病如腸胃疾病、肺炎、及肺結核，如今九十年代卻是許多慢性疾病的蔓延。前十大死因分別為癌症、腦血管疾病、意外、心臟病、糖尿病、慢性肝病、肺炎、腎病症候群及腎炎、高血壓、及氣喘，其中大多數為慢性疾病¹。

根據民國 75 年台大陳建仁的調查，40 歲以上罹患糖尿病的盛行率為 6.23%²，而 40 歲以上的中老年人約占台灣二千三百萬人口的四分之一，約有 37 萬人有糖尿病。依據健保局的資料，健保局 1998 年申報之糖尿病（用藥人口約 54 萬人佔總人口之 2.62%）醫療費用分析結果發現治療糖尿病的醫療費用佔當年總醫療費用的 11.5%，其中住院費用佔 39.2%，門診費用佔 60.8%，糖尿病患醫療照護成本是非糖尿病患照護成本的 4.3 倍³。但是 2003 年已攀升到 3.8%，逐年增加的幅度約為 0.2%。以現代生活環境的污染及人口的老化速度增加來看，更會助長糖尿病的發生，糖尿病本身及併發症所造成的死亡率，也不斷向上攀升。依據陽明大學周碧瑟教授的觀察在全台灣人口中，糖尿病的盛行率約為 4.0%，年發生率則在 0.5~1.0% 之間，至於年齡別死亡率經調整後在 1960 年為 3.7 人(每十萬人口)，到了 1988

年則為 23.3 人(每十萬人口), 在 30 年間上升了 6.3 倍。以四十歲以上的盛行率方面, 民國五十九年大於四十歲的成年人糖尿病盛行率為 5.05%, 到了民國六十七年增加為 8.67%⁴。其中, 以第二型糖尿病佔大多數。上世紀末 1996~2000 年, 魏榮男調查台灣地區糖尿病盛行率與住院率的結果, 顯示台灣地區糖尿病盛行率逐年上升及住院盛行率居高不下, 五年間所有年齡的女性標準化盛行率介於 38-46/1000, 男性標準化盛行率介於 29-37/1000。這是一個刻不容緩的國人健康議題。

以世界衛生組織的定義, 老年人口(六十五歲以上人口) 超過人口比率 7% 時即稱為高齡化社會。民國八十九年, 台灣地區老年人口已佔總人口比率的 8.84%, 早已成為高齡化社會⁵。到了 96 年已達到 10%, 人數超過 229 萬人。10 年後老人人口超過 13%, 必須儘早儲備老人長期照顧體系以為因應。因此, 行政院 96 年 3 月通過「長期照顧 10 年計畫」, 預計未來 10 年內 817 億 3500 萬元預算, 建構國內長期照顧制度, 可見因為老化及慢性病造成的醫療成本增加愈來愈多。特別是糖尿病盛行率的增加, 伴隨而來的糖尿病併發症, 如大小血管病變造成心血管疾病, 腎病變造成腎衰竭而要經常洗腎, 視網膜病變造成視盲等併發症, 都是糖尿病病患需要完整長期照護的醫療成本。

西元 1988 年, GM. Reaven 發現高血脂、高血糖、高血壓經常一

起出現，這些因子均是可以導致心血管疾病的危險因子，因此命名為「X 症候群 (Syndrome X)」⁶，並且發現胰島素阻抗性 (Insulin resistance) 和胰島素分泌相對不足是第二型糖尿病的兩個重要致病機轉⁷。西元 1998 年，世界衛生組織正式將高血壓、高血脂、高血糖、肥胖等幾個會導致心血管疾病的危險因子命名為新陳代謝症候群 (Metabolic syndrome)。患有新陳代謝症候群的人會增加 79% 的心血管疾病的危險性，尤其是大血管病變和以後糖尿病的發生。在美國，以 ATP III 的診斷標準，代謝症候群盛行率是 23.9%⁸。台灣的國民健康局於 96 年 1 月 18 日公告實施代謝症候群之判定標準，即以下 5 項危險因子中，若包含 3 項或以上者可判定之。包括 (1) 腹部肥胖：(腰圍：男性 ≥ 90 cm、女性 ≥ 80 cm)，(2) 高血壓：收縮血壓 (SBP) ≥ 130 mmHg，舒張血壓 (DBP) ≥ 85 mmHg，(3) 高血糖：空腹血糖值 (FG) ≥ 100 mg/dl，(4) 高密度酯蛋白膽固醇 (HDL-C)：男性 < 40 mg/dl、女性 < 50 mg/dl，(5) 高三酸甘油酯 (TG) ≥ 150 mg/dl。依據衛生署 91 年三高 (高血壓、高血糖、高血脂) 調查研究顯示：國人代謝症候群盛行率：15 歲以上為 14.99% (男 16.9%，女 13.8%)，且隨年齡上升而有增加的趨勢。代謝症候群所造成之腦血管疾病、心臟病、糖尿病、高血壓等慢性疾病，皆年居台灣十大死因榜中，儼然已成為我國及世界之新興重要公共衛生議題。

針對代謝症候群的治療，如何改善胰島素阻抗性成為一個重要的方向。以現代醫學的方式治療糖尿病常會遇到許多瓶頸，由於病人無法正確有效的飲食控制，無法從事適度的運動。以服用藥物控制血糖，雖然是目前的治療方式，但是最終仍會有藥物耐受性的問題，劑量逐漸加大，甚而需要以胰島素治療。在全世界，如印度⁹、韓國¹⁰、美國¹¹、墨西哥¹²，糖尿病的另類輔助治療，包括中醫處方、針灸、民間草藥等治療方式被目前的糖尿病患者所使用。

糖尿病在傳統的中醫典籍屬於消渴的範疇，早在晉代皇甫謐的針灸甲乙經中已經提到針灸治療消渴的說法，記載中提到「消渴身熱，面黃赤，意舍主之」、「陰氣不足，熱中消穀，善饑腹熱，身煩狂言，三里主之」。說明消渴的治療穴位¹³。黃維三在其所著針灸科學中亦提到，糖尿病的針灸治療先針內關、足三里，再針中脘、下脘，灸脾俞、腎俞、關元、三陰交等穴¹⁴。

在近代特別注重實證醫學的精神，若以動物實驗¹⁵或臨床實驗¹⁶驗證針灸治療糖尿病的療效系統回顧，已經獲得初步成效。以針灸的方式作為第二型糖尿病的輔助療法，是一個臨床可行的輔助療法。針灸治療不僅可以降低血糖¹⁷、改善胰島素阻抗性，對於糖尿病的神經病變¹⁸、糖尿病引起的腸胃功能異常也有幫助¹⁹。

初步的研究已發現電針可改善正常大鼠與類固醇誘導的糖尿病

鼠葡萄糖耐受量 (Glucose Tolerance) 之現象²⁰，本研究欲藉由足三里穴同時電針刺激，並以副交感神經阻斷劑 atropine、HC-3 (hemicholinium-3) 與一氧化氮合成酶 (NOS) 的阻斷劑 L-NAME (NG-nitro-L-arginine methyl ester)，在靜脈葡萄糖耐受試驗 (intravenous Glucose Tolerance Test; ivGTT) 中觀察其血糖值與游離脂肪酸的變化，試圖找出電針改善葡萄糖耐受量作用的機轉與副交感神經及一氧化氮合成酶的關係。

本研究欲進一步觀察電針對正常大鼠改善葡萄糖耐受量之效果是否與骨骼肌中胰島素訊息蛋白 IRS-1、PI3-Kinase、Akt1、GLUT4 及 nNOS 有關聯？電針降血糖及影響胰島素敏感度的能力，是否藉由影響游離脂肪酸量及這些訊號蛋白的傳遞來達成？

希望透過本研究了解電針改善葡萄糖耐受效果的機轉。藉由大鼠骨骼肌中胰島素訊息蛋白 IRS-1、PI3-Kinase、Akt1、GLUT4 的變化，探討電針的作用與副交感神經系統、一氧化氮及胰島素訊號蛋白的角色和改善胰島素敏感度之可能作用機轉。

第一章 文獻探討

第一節 中醫學對糖尿病的認知及針灸治療

在中醫醫學史上，尚未出現糖尿病之病名，但有類似糖尿病的病
症。目前的醫家認為，糖尿病屬於中醫學範圍『消渴』、『三消』的範圍。

早在西漢 淳于意的診籍《史記·扁鵲倉公列傳》書中記載了肺消瘵²¹。

但是一般公認最早有關糖尿病的論述是《黃帝內經》。在《素問·通
評虛實論》：「消瘵，脈實大，病久可治，脈懸，久不可治。凡治消瘵、
仆擊、偏估、痿厥、氣滿、發逆，肥貴人則高粱之疾也」。《素問·奇病
論》：「帝曰：有病口甘者，病名為何？何以得之？岐伯曰：此五氣之濫
也，名曰脾瘵，夫五味入口，藏於胃，脾為之行其精氣，津液在脾，故
令人口甘也，此肥美之所發也。此人必數食甘美而多肥也，肥者令人內
熱，甘者令人中滿，故其氣上溢，轉為消渴，治之以蘭，除陳氣也」²²。
均描述到消渴症的病因和高粱厚味，肥貴之人有關。也提到了脈證預後
與治療方向。

《黃帝內經》開始論述中醫學糖尿病的理论基礎²³。但『消渴』一詞，比較明確且有系統論述的，應該是張仲景的《金匱要略·消渴病脈證治》：「消渴篇曰：厥陰之為病，消渴，氣上衝心，心中疼熱，飢而不欲食，食則吐蛔，下之不肯止。」、「男子消渴，小便反多，以飲一斗，小便一斗，腎氣丸主之。」、「陽脈數，胃中有熱，即消穀引食，大便必堅，小便必數。」、「渴欲飲水，口乾舌燥者，白虎加人參湯主之。」等等。因此《金匱要略》更清楚的將消渴症的症狀、治療加以系統分類。其中的症狀，和現代醫學所描述的三多，吃多、喝多、尿多的症狀完全符合。張仲景的《金匱要略》開創了中醫學糖尿病的「辨證論治」的治療方法。巢元方《諸病源候論》也談到中醫師對糖尿病的「證候分類」。對消渴的定義，分型、病因病機、傳變等均有新的描述。到了唐、宋、金、元醫家，包括唐·孫思邈《千金方·論證》提到慎飲酒、房室、鹹食及麵。金·劉完素的《消渴》及《三消論》。元·張從政《儒門事親·三消當從火斷》、元·李東垣的《辨內外傷·益脾說》、元·朱丹溪的《丹溪心法·護腎陰及以肝論治》對消渴多所論述，相關證治體系逐漸形成。明

清時醫家多所補充與總結，如明·戴思恭《秘傳證治要訣》、明·李延《醫學入門》。清·陳夢雷的《古今圖書集成之醫部全錄》集各家之論述²⁴。使有關糖尿病的中醫理論、病因病機、證候分型、治療方向得以完備。

在針灸的治療上亦有許多古籍的論述中，詳細記載各種消渴證的針灸治療方法²⁵。

《針灸甲乙經》：「消渴身熱，面黃赤，意舍主之」、「陰氣不足，熱中消穀，善饑腹熱，身煩狂言，三里主之」。《千金要方·消渴·淋閉》卷二十一論曰：「凡消渴病經百日以上者，不得灸刺，灸刺則于瘡上漏膿水不歇，遂致癰疽，羸瘦而死。亦忌有所誤傷，但作針許大瘡，所飲之水，皆于瘡中變成膿水而出，若水出不止者必死，慎之慎之。初得患者，可如方灸刺之佳。」、「消渴咽喉乾，灸胃管下俞三穴各百壯，穴在背第八椎下橫三寸間寸灸之。」、「消渴口干不可忍者，灸小腸俞百壯，橫三間寸灸之。」、「消渴咳逆，灸手厥陰，隨年壯。」、「消渴咽喉干，灸胸堂五十壯。又灸足太陽五十壯。」、「消渴口干煩悶，灸足厥陰百壯。又灸陽池五十壯。」、「消渴小便數，灸兩手小指頭，及足兩小指頭，并

灸項椎佳。又灸當脊樑中央解間一處，與腰目上灸兩處，凡三處。又灸背上脾俞下四寸，當夾脊樑灸之兩處。凡諸灸，皆當隨年壯。又灸腎俞二處，又灸腰目在腎俞下三寸，亦夾脊骨兩旁各一寸半左右，以指按取關元一處。又兩旁各二寸二處，陰市二處，在膝上當伏兔上行三寸臨膝取之。或三二列灸相去一寸名曰腎系者。（《黃帝經》云：伏兔下一寸）

曲泉、陰谷、陰陵泉、復溜，此諸穴斷小行最佳不損陽氣。亦云止遺尿也。太溪、中封、然谷、太白、大都、跌陽、行間、大敦、隱白、湧泉，凡此諸穴各一百壯。腹背兩腳凡四十七處。其腎俞、腰目、關元、水道，此可灸三十壯，五日一極之，各得一百五十壯，佳。湧泉一處可灸十壯，大敦、隱白、行間，此處可灸三壯，余者悉七壯，皆五日一極之。滿三灸可止也。若發如此灸諸陰而不愈，宜灸諸陽，諸陽在腳表，并灸肺俞

募按流注孔穴，壯數如灸陰家法。小便數而少且難用力輒失精者，令其人舒兩手合掌并兩大指令齊急逼之，令兩爪甲相近，以一炷灸兩爪甲本肉際，肉際方后自然有角令炷當角中，小侵入爪土。此兩指共用一炷也。亦灸腳大指，與手同法，各三炷而已，經三日又灸之。」

《醫心方·治消渴方》卷十二：《小品方》云灸消渴法：「灸關元一處，又夾兩旁各二寸二處各灸三十壯，五日一報，至百五十壯。」

《聖濟總錄·治消渴灸法》卷一百九十二：「消渴病，兼身體疼痛，灸隱白二穴，在足大指內側，去爪甲角如韭葉各三壯。《甲乙經》云足太陰脈所出。」

《扁鵲心書·附竇材灸法》卷上：「上消病日飲水三五升，乃心、肺壅熱，又吃冷物傷肺、腎之氣，灸關元一百壯，可以免死，或春灸氣海，秋灸關元三百壯，口生津液。中消病多食，而四肢羸瘦，困倦無力，乃脾、胃、腎虛也。當灸關元五十壯。」

《扁鵲心書·消渴》卷中：「若腎水枯涸，不能上榮于口，今人多飲而小更反少……正書：春灸氣海三百壯，秋灸關元二百壯，日服延

壽丹十九。……若脾氣有余，腎不足則成消中病，脾實有火，故善食而消。腎氣不足，故下部少力，或小便如瘕……正法：先灸關元三百壯，服金液丹一斤而愈。治驗：一人頻飲水而渴不止，余曰：君病是消渴也。……一覺胸脅氣痞而喘……急灸關元、氣海各三百壯，服四神丹，六十日津液復生。」

《針灸玉龍經·針灸歌》：「意舍消渴誠非虛。」

《針灸集成·消渴》等症五十：「消渴：金津、玉液、承漿。」

問曰：此證緣何得也？答曰：因房事過多，腎水枯竭，水火不濟，脾敗腎虛。久不治，發成癰疽，則難療也。然此非一症。復刺別穴，無不效也：人中、廉泉、氣海、腎俞。」

《醫學綱目·消瘵門》卷二十一：「【密】消渴，經百日已上者，不可刺灸。刺灸則瘡口病水不止：玉液(一分，瀉見血訖·取下穴)、足三

里(瀉訖如前，補玉液一分，再取下穴)、關元(瀉訖再取廉泉)。

【東】小腸俞、陽池(各灸之)、廉泉(出惡血方已)。又法：胃俞、心俞、膻中(各灸之)。又法：承漿、然谷、勞宮、曲池、意舍、關元(各灸之)。

【世】口熱咽干，唾如粘膠，口苦，噎中介介然：太溪(五分)、陽陵泉(二寸半)。」

《針灸捷徑》卷之下：「消渴有三：金津、玉液、人中、承漿、關元、腎俞。」

《針灸聚英·百証賦》卷四上：「行間、湧泉，主消渴之腎竭。」

《類經圖翼·消渴》卷十一：「消渴：腎俞、小腸俞。」

《勉學堂針灸集成·食不化》卷二：「飲食倍多，身漸羸瘦，痲痺腹痛：脾俞三壯至年壯，章門、期門、大白、中脘針。」

《勉學堂針灸集成·消渴》卷二：「消渴飲水：人中、兌端、隱白、承漿、然谷、神門、內關、三焦俞。腎虛消渴：然谷、腎俞、腰俞、肺俞、中膂俞在第二時椎下兩旁各二寸夾脊起肉端，灸三壯。食渴：針中腕、三焦俞、胃俞、太淵、列缺針，皆瀉。」

可見在歷代古籍中就有前人對消渴證在不同時期出現的不同症狀所記載之詳細針灸方法，包括針刺與灸的配穴、先後順序、劑量（壯數）、針刺深度、補瀉手法等等豐富的有效臨床經驗。



第二節 體內血糖的恆定及代謝 26-27

血液中的葡萄糖是供應全身所需能量的主要來源，尤其對腦細胞而言是唯一的能量來源。血糖在體內基本上必須維持在一種動態恆定。一般來說，禁食狀態下週邊靜脈血糖值大約在 70-110 mg/dl。進餐後血糖質約在 120-140 mg/dl 之間。

肝臟在血糖的恆定系統中扮演一個重要角色，人體藉由多種內分泌物質來調節血糖濃度，以胰島素、昇糖激素最為重要。當血糖濃度升高時，會刺激胰島素分泌，使得血糖進入肝臟以肝醣（glycogen）方式儲存於肝臟之中。當血糖濃度下降時，胰島素的分泌就減少，使得肝臟得以釋放葡萄糖到血液之中，以供身體能量所需。昇糖激素對血糖的恆定與胰島素呈一個相反的回饋系統。當血糖濃度降低時，刺激昇糖激素的分泌，使得血糖升高。在特殊狀況下，低血糖會刺激下視丘交感神經系統，使腎上腺素分泌，刺激肝臟釋出葡萄糖。另外生長激素及皮質醇對血糖的恆定，也有部分的作用。

葡萄糖的代謝，包括(1)肝醣合成作用、(2)肝醣分解作用、(3)糖解作用、(4)糖質新生等幾個生化的作用，其過程約略描述如下 28-29：

(1) 肝醣合成作用（Glycogenesis）

葡萄糖合成肝醣的起始步驟乃是葡萄糖經肌肉中的六碳糖激酶

酶 (hexokinase) 或肝中的葡萄糖激酶 (glucokinase) 催化形成 6-磷酸葡萄糖 (glucose-6-phosphate), 經由一連串的生化反應, 形成肝醣儲存於肝臟和骨骼肌中。

(2) 肝醣分解作用 (Glycogenolysis)

肝醣分解起始步驟乃是由磷酸化酶 (phosphorylase) 催化; 為肝醣分解的速率限制步驟, 酶由支鏈外側往內切, 產物是 1 磷酸葡萄糖。肝醣分解所產生的 Glucose-1-phosphate; 再經由磷酸葡萄糖變位酶 (phosphoglucomutase) 催化形成 Glucose-6-phosphate。glucose-6-phosphate 在腎臟或肝臟中經 6-磷酸葡萄糖磷酸酶 (glucose-6-phosphatase) 催化去形成葡萄糖。

(3) 糖解作用 (Glycolysis)

糖解作用在有氧或無氧狀況下都可進行, 生物在缺氧狀況以此作用代謝獲取能量。也是葡萄糖代謝的主要過程之一。糖解作用到丙酮就完成, 但是在缺氧情況下, 丙酮還會被還原成乳酸, 堆積在肌肉內造成肌肉酸痛。肌肉在無氧狀態下, 葡萄糖的糖解作用 (glycolysis) 為唯一能提供能量供應肌肉收縮所需的途徑。

(4) 糖質新生 (Gluconeogenesis)

所有將非糖類轉變成葡萄糖 (glucose) 或肝醣 (glycogen) 的反應過程及機轉叫做糖質新生。糖質新生作用最重要的場所在肝臟或

腎臟，主要的原料為胺基酸、甘油 (glycerol)、乳酸 (lactate) 及丙酸 (propionate)。糖質新生作用的代謝途徑包括檸檬酸循環 (citric acid cycle) 的部分反應及修飾過的糖解作用 (glycolysis) 之逆反應。

日常飲食中的碳水化合物如葡萄糖、果糖、半乳糖等多半經由消化作用形成葡萄糖。因此，葡萄糖為醣類最重要的單醣，葡萄糖能在肝臟中轉化成各種醣類，如奶品中的乳糖 (lactose) 及半乳糖 (galactose)，腦細胞的腦甘脂類 (cerebrosides) 中的醣類、肝醣 (glycogen)、核酸中的核糖 (ribose)、脂質複合體物中的醣類、與蛋白質結合形成各種重要的醣蛋白 (glycoprotein) 或蛋白多醣體 (proteoglycans) 均跟人體的正常生理功能息息相關。

因此當血糖的恆定及代謝出現問題時，常常造成許多疾病，如代謝症候群所引發的糖尿病、高血壓、高血脂、中風等致命慢性疾病。

第三節 糖尿病 (Diabetes Mellitus) 及葡萄糖耐力 (Glucose Tolerance)

若有多尿 (polyuria)，巨渴 (polydipsia)，吃多 (polyphagia)，體重減輕 (unexplained weight loss) 等，並且血糖過高 ≥ 200 mg/dL 時，及空腹血糖 (fasting plasma glucose) ≥ 126 mg/dL。若空腹血糖無法決定是否有糖尿病，可以做口服葡萄糖耐受測試 (oral glucose tolerance test, OGTT)，讓病人處於無壓力狀態下，身體活動無限制下，隔夜空腹下給於口服葡萄糖 75 g 後抽血 (吃完立即抽血，2 小時後再抽血)，若 140 ~ 200 mg/dL 則為葡萄糖耐受性不佳 (impaired glucose tolerance)，若 ≥ 200 mg/dL 並符合上述兩項則可以診斷為糖尿病³⁰。因此口服葡萄糖耐受測試 (oral glucose tolerance test, OGTT)，臨床常用來作糖尿病的診斷工具。

糖尿病病患會有葡萄糖耐力降低的原因可歸類成下列 2 點。1. 週邊組織的葡萄糖利用減少 (decreased peripheral utilization)，2. 肝臟葡萄糖恆定作用 (glucostatic function) 失調²⁶。

由於進入細胞的葡萄糖減少，就是所謂週邊利用減少（decreased peripheral utilization）。當 Insulin 缺乏時，進入骨骼肌、心肌、平滑肌、及其它組織中的葡萄糖減少。被肝臟吸收的葡萄糖也減少。葡萄糖在小腸的吸收並未受到影響，而在腎臟近曲小管（proximal tubules）細胞對尿糖的再吸收作用（reabsorption）也未受到影響，大部份的腦部及紅血球對葡萄糖的吸收也是正常。

肝臟的葡萄糖恆定作用失效是造成糖尿病患者血糖過高的另一主要的原因。肝臟由血流中吸收葡萄糖，並以肝糖的形成來儲存；但由於肝臟也含有 glucose 6-phosphatase，它也能將葡萄糖釋入血流中。事實上，Claude Bernard 曾說肝臟是一個分泌葡萄糖的內分泌腺。而 insulin 可以加速肝糖的合成，並抑制肝臟的葡萄糖輸出量（hepatic glucose output）。當血糖升高時，正常情況下 insulin 的分泌會升高，而肝的葡萄糖生成作用（glucogenesis）降低；然而此一作用在糖尿病患者身上不見了。Glucagon 也會造成血糖過高；在疾病的壓力較大時，肝臟的葡萄糖輸出也會因 catecholamines，cortisol 及 growth hormone 而增加。

口服葡萄糖耐受測試 (oral glucose tolerance test, OGTT) 雖常被爭議其再現性 (reproducibility) 不佳³¹, 但與空腹血糖比較, 對老年人及較不胖的病患, OGTT 對糖尿病的測試是較敏感的³²。在美國與加拿大糖尿病協會以空腹血糖為糖尿病的診斷標準 (> 7.0 mmol/L、>126 mg/dl), 但為了更明確診斷糖尿病, 仍建議若空腹血糖介於 5.7 到 6.9 mmol/L (102.6 - 124.2mg/dl) 間之病患, 應接受 OGTT 的試驗, 以及早診斷出糖尿病³³。



第四節 胰島素的生理功能及運輸³⁴

甲. 胰島素的生理作用:

Insulin 的生理作用可分成快速 (rapid)、中速 (intermediate) 和遲發 (delayed) 的作用。最為人所知的是降血糖的作用 (hypoglycemic effect)，也可影響胺基酸及電解質的運送，對酵素和生長也有作用。

其最終反應為儲存醣類、蛋白質和脂肪。

葡萄糖的擴散是以 facilitated diffusion (促進性擴散) 進入細胞內；但在肌肉、脂肪、及其它許多的組織中，insulin 可以藉由增加細胞膜上葡萄糖運輸裝置 (glucose transporter) 的數目，來加速葡萄糖進入細胞。在這些組織中，葡萄糖進入細胞中，其磷酸化 (phosphorylation) 的速度是由許多的激素調節。例如在某些組織中，Growth hormone (生長激素) 和 Cortisol 皆會抑制磷酸化 (phosphorylation)。

Insulin 也會增加葡萄糖進入肝細胞，但此作用卻非經由增加 GLUT 4 的數目而達成；而是經由誘導 hexokinase 來增加葡萄糖糖的磷酸化，

使得細胞內游離的葡萄糖保持較低的濃度，而加速葡萄糖進入細胞。

乙. 葡萄糖運輸系統 (Glucose Transporters) :

葡萄糖運輸系統主要靠主動運輸及促進擴散 (facilitated diffusion)。負責葡萄糖促進擴散通過細胞膜的 glucose transporters 是來回跨越細胞膜 12 次的一群蛋白質 (glucose transporters, GLUTs)。它們不同於次級主動運輸的 SGLT (sodium-dependent glucose transporter, Na^+ /glucose cotransporter)，SGLT 是負責將葡萄糖運出小腸及腎小管的次級主動運輸。GLUTs 目前有五種不同的 subtypes 已確認出來，依發現順序依序稱為 GLUT 1 到 GLUT 5。它們包含了 492-524 個胺基酸，且對葡萄糖具有不同的親和力，也有不同的任務。例如 GLUT4 是具 insulin 感受性 (insulin-sensitive) 的肌肉和脂肪組織的 glucose transporter；在這些肌肉和脂肪組織細胞的細胞質中含有許多 GLUT4 分子，當這些細胞碰上 insulin 時，transporters 明顯地藉由 exocytosis 而迅速的移到細胞膜上。當 insulin 的刺激停止時，它們又

會回到細胞中(可能藉由 endocytosis), 並為下次當細胞再接受 insulin

時作好準備。而其它的 GLUT 則似乎一直停留在細胞表面。



第五節 胰島素與訊號蛋白傳遞系統：³⁵

Saltiel 與 Kahn 在 2001 年 Nature 中已提出胰島素對胰島素訊息蛋白產生的活化傳遞作用對血糖與脂肪代謝的調節，可清楚知道胰島素訊息蛋白 IRS-1、PI3-Kinase、Akt1、GLUT4 在調控血糖的重要性。

胰島素接受器 (Insulin receptor, IR) 是一種酪胺酸激酶 (tyrosine kinase) 受器，與胰島素結合之後，可自行活化其膜上之次單元，用來磷酸化 IR 自身與其他胞內蛋白質的酪胺酸單元。接受 IR 磷酸化的，有細胞質內的 IR 受質體 (insulin receptor substrates; IRSs) 與 Shc 等。胰島素接受器被磷酸化後，透過 PI3-kinase、Akt 引發一連串反應。

1. 增進葡萄糖之進入：已知 GLUT 在胞膜上的量，由移位 (translocation) 的機制來控制。胰島素訊號的傳入，刺激帶有 GLUT 的囊膜移位到細胞膜上，同時抑制 GLUT 被胞飲 (endocytosis) 作用帶回胞內，也就因此增加位於胞膜上 GLUT 的密度。另外 IR 所涉及之訊息傳遞，亦可能造成 GLUT 基因表現之增加。
2. 增加肝醣合成：PI3 Kinase 的下游激酶 Akt 可藉由磷酸化來活化肝醣

合成激酶 (glycogen synthase kinase 3; GSK3)，促進肝糖合成。

3. 抑制糖質新生 (gluconeogenesis) 路徑：由脂肪酸與蛋白質均能透過糖質新生而產糖。肝臟的 glucose-6-phosphatase 為其他肌肉等細胞所沒有，可將糖質新生所產生之 glucose-6-phosphate 轉換成 glucose 而釋放到胞外，肌肉細胞則只能在胞內利用此能源。肝臟在此種葡萄糖的製造上受到胰島素很大的影響，遠較其對於葡萄糖利用要敏感。

4. 訊號傳遞分子之基因表現型與磷酸化狀態，包括：

A. 胰島素接受器之受質 (insulin receptor substrate, IRS)：IRS 目前已發現者有 4 個，可提供具有 SH2 基團的分子如 PI3K (p85 調控部份) 結合之 docking sites。IRS-1 與 IRS-2 與肝臟與周邊組織胰島素阻抗有關，IRS-1 亦透過 Ras 與整體性生長遲緩有關，IRS-2 缺乏則特定影響胰島、腦、視網膜等組織。

B. PI3 kinase (PI3-K)：PI3K 在肝糖、脂質、蛋白質合成等胰島素誘導之代謝調控扮演重要的角色，直接控制三類訊息分子之調控。

PI3-K 包含 p85a 調控單元與 p110 活性單元。可磷酸化並活化

Akt/PKB。

C. Akt：也被稱為 protein kinase B (PKB)，本身亦為激酶，接受 PI3-K 所控制之 PDK1 活化，能透過磷酸化 GSK3 (glycogen synthase kinase 3)促進肝醣合成，也參與 GLUT 轉位至胞膜。

林榮宗研究亦發現類固醇可抑制胰島素訊息蛋白 IRS-1 及 PI3-kinase 蛋白的表現；而電針改善胰島素阻抗的方面，初步可看出電針可恢復被類固醇抑制的胰島素訊息蛋白 IRS1 的含量，進而改善胰島素阻抗性³⁶。



第六節 游離脂肪酸的生理功能及對胰島素之影響³⁷

血液中的脂肪成分，可以分成三酸甘油酯 (45%)、磷脂質 (35%)、膽固醇 (15%)、游離脂肪酸 (5%)。透過飲食攝入的脂肪，主要是以三酸甘油酯 (TG)形式為主，和白蛋白結合而成乳糜微粒，經淋巴系統進入循環。透過脂蛋白脂肪酶 LPL (lipoprotein lipase) 將三酸甘油酯轉變成甘油及游離脂肪酸 (FFA)。人體內膽固醇除了一部份攝取自食物外，大部份由肝臟中的肝細胞合成。血漿中膽固醇濃度不會立即受到當日食物中膽固醇多寡的影響。

而肝臟則是提供內源性脂肪的主要來源，肝臟分泌極低密度脂蛋白 (VLDL)，經由 LPL 的影響，分解出三酸甘油酯和中密度脂蛋白 (IDL)，IDL 由肝臟再吸收回去，一部份則形成低密度脂蛋白 (LDL)，高密度脂蛋白 (HDL) 亦由肝臟分泌，部分則來自乳糜微粒，VLDL 的代謝。透過乳糜微粒及 VLDL，運送到組織中氧化利用，或是運送到脂肪組織中儲存，而週邊的脂肪組織，則是以游離脂肪酸的方式移出，和白蛋白結合加以運送³⁸。

FFA 由外源性脂肪經 LPL 分解後形成，也能由脂肪組織中經脂肪分解作用而產生，血漿中的 FFA 是和白蛋白結合一起運行。一般而言，FFA 在血液中的濃度約為 0.1-0.2 $\mu\text{eq/ml}$ ，在消化吸收後，FFA 濃度可以上升到 0.5 $\mu\text{eq/ml}$ ，在完全禁食的狀態下，會上升到 0.7-0.8 $\mu\text{eq/ml}$ ，在糖尿病患者體內，甚至可以高達 2 $\mu\text{eq/ml}$ 。事實上，平時 FFA 就會是人體能量所需的一部份，在禁食狀況下，更有高達 25-50 % 的能量是由游離脂肪酸所提供，以確保少數只能以葡萄糖為能量來源的器官，如大腦，得以順利運作。

FFA 在脂肪組織中的儲存總量是由脂肪組織的脂肪分解作用 (lipolysis) 及再酯化作用 (reesterfication) 來共同決定。在脂肪組織中，三酸甘油酯是由 acyl-CoA 及 glycerol 3-phosphate 經酯化而成，其中，glycerol 3-phosphate 來自葡萄糖醣解作用。三酸甘油酯在脂肪組織中則經由脂肪分解作用，分解成 FFA 及甘油。當再酯化的速度比脂肪分解作用慢時，FFA 就會累積，釋放到血漿中，與白蛋白結合，血漿中的 FFA 濃度因而上升，提供身體組織所需的能量。

脂肪分解作用被多種荷爾蒙所調控，其中，腎上腺素、甲狀腺激素、昇糖素等均可以活化脂肪分解，使得血漿中 FFA 濃度增加，胰島素則是抑制脂肪分解，並且抑制 FFA 及甘油的釋出，降低血漿中的 FFA 濃度。

肝細胞為防止三酸甘油酯過多蓄積於肝臟內，乃藉著合成極低密度脂蛋白，將過剩的三酸甘油酯排出肝臟。食物很容易影響血漿三酸甘油酯濃度，例如飲酒、攝取含大量脂肪或醣類食物，可於短期內提高血漿三酸甘油酯濃度，運動則可經由消耗熱量而降低血漿三酸甘油酯的濃度。持續高濃度的血漿三酸甘油酯，常會導致三酸甘油酯蓄積於肝細胞內，伴生脂肪肝（fatty liver）病變。

糖尿病患由於細胞內葡萄糖不足，因此脂肪倉庫（fat depots）中有較少量的葡萄糖轉成脂肪酸。在脂肪組織中 insulin，會抑制 hormone-sensitive lipase，故缺乏 insulin 時，血液中 FFA 的量會增加到正常兩倍以上。因此糖尿病患的血糖量與 FFA 的量是平行的。若實驗使胰島細胞長期暴露於游離脂肪酸（FFA）下，會抑制葡萄糖刺激分泌胰島素³⁹⁻⁴⁰。過高的 FFA 對胰島細胞有促凋亡（apoptotic）的作用：FFA

對胰島細胞的毒性可能源自於 FFA 降低胰島細胞中的血糖代謝，促凋亡的效果可能與 caspase 有關，可能也與 Bcl-2 的基因調控相關⁴¹。Boden G 指出 FFA 引起胰島素阻抗的原因，主要包括肌細胞間和肝細胞間堆積了 triglycerides 及 diacylglycerol，活化了 serine / threonine kinases，減少 IRS-1/2 的 tyrosine phosphorylation，造成胰島素傳遞系統中 IRS 與 PI3-kinase (phosphatidylinositol 3-kinase) 的缺失，引發 T2DM 發生。同時使肌細胞與肝細胞產生低程度的發炎現象，造成粥狀血管與非酒精性脂肪肝病變⁴²。林榮宗運用類固醇建立胰島素阻抗之動物模式，並且運用胰島素挑戰試驗(Insulin challenge test, ICT)、葡萄糖耐量試驗(GTT)及胰島素阻抗指標(HOMA Index) 的研究，發現大量類固醇給予後，血中 FFA 的含量也有增高的趨勢，進而增加胰島素阻抗³⁴。故從基礎的動物實驗與人體臨床研究，發現電針確有改善胰島素敏感度的趨勢，有可能透過降低血液中 FFA 的效果有關⁴³。

第七節 一氧化氮合成酶 (NOS) 與胰島素的關係

自從 1998 年諾貝爾醫學獎主題一氧化氮 (NO) 被證實是「內皮衍生放鬆因子」(EDRF)後，這個在生物體內扮演傳導信息之一的一氧化氮，在人體生理功能上也扮演一個重要的角色，包括神經傳導作用、血管張力、血小板凝集作用、免疫反應作用、勃起反射、內外分泌功能等均有關聯。

一氧化氮 NO 是由 L-精胺酸 (L-arginine) 在一氧化氮合成酶 Nitric Oxide Synthase (NOS) 的催化下，經過一中間產物才能轉換成 L-西瓜胺酸 (L-citrulline) 和一氧化氮，一氧化氮合成酶 (NOS) 有組合式 (constitutive) 和誘發式 (inducible) 二種，有三種基因表現型 (isoform)：神經性一氧化氮合成酶 neuronal NOS (nNOS)、誘發性一氧化氮合成酶 inducible NOS (iNOS) 和內皮性一氧化氮合成酶 endothelial NOS (eNOS)。nNOS 與 eNOS 是組合式 (constitutive NOS) 需要鈣離子和調鈣蛋白 (calmodulin) 先組合，再與之組合才能產生催化作用。iNOS 是誘發式，不需要鈣離子和調鈣蛋白，細胞素 (cytokine) 可直接誘發 iNOS

產生催化作用。當前突觸神經元 (presynaptic neuron) 由胞內釋放化學信息物麩胺酸鹽 (glutamate) 和後突觸神經元的 NMDA (N-methyl-D-aspartate, N-甲基-D-天門冬胺酸鹽) 受體結合，打開細胞膜通道讓鈣離子進入細胞內。鈣離子和調鈣蛋白先組合形成複合體，再和 nNOS 組合形成活化的 nNOS 再進一步催化 L-精胺酸形成 L-西瓜胺酸和 NO。血管內的乙醯膽鹼 (acetylcholine, Ach) 和乙醯膽鹼受體結合，開啟一個血管內皮細胞膜的通道讓鈣離子進入內皮細胞內。鈣離子和調鈣蛋白亦先組合形成複合體，然後複合體再和 eNOS 組合形成活化的 eNOS，才能進一步催化 L-精胺酸製造 L-西瓜胺酸和 NO，血管內皮細胞的 NO 會滲透入血管平滑肌細胞中。

一般知道一氧化氮在神經突觸可是當作神經傳導因子，和腦部學習及記憶有關。在血管內皮使血管的平滑肌細胞放鬆而擴張血管，而達到降低血壓。在巨噬細胞則可損壞腫瘤細胞而將其殺死或停止其繁殖。因為控制一氧化氮的產生是調節一氧化氮活性的關鍵，一氧化氮可在任何製造其出來的地方快速滲透到任何方向，要調控一氧化氮的產生可用一

氧化氮合成酶 (NOS) 的阻斷劑 NG-硝基-L-精胺酸甲酯 (NG-nitro-L-arginine methyl ester, L-NAME)來競爭 NOS 的結合減少 NOS 的催化作用，進而降低 L-精胺酸產生一氧化氮。

在 NOS 影響胰島素的分泌方面，Lajoix 等學者提出 nNOS 在胰島素的 β 細胞中與 INS-1 細胞株中均會有表現。大鼠胰臟的 β 細胞胰島素分泌的控制與 nNOS 的表現 (express) 是有關的，以雙免疫螢光術顯示 nNOS 存在於分泌胰島素的 β 細胞中。若以電子顯微鏡觀察，發現 nNOS 主要位於 β 細胞胰島素分泌顆粒中，較少存在粒腺體與細胞核中，且 β 細胞對精胺酸與葡萄糖的正常功能會被 L-NAME 阻斷而失去⁴⁴。2003 年日本學者利用雙免疫細胞化學分析，以 NO 反應螢光劑 DAF-2 作影像分析發現 constitutive NOS (nNOS、eNOS) 存在於大鼠胰臟的 β 細胞中，且以不同葡萄糖濃度刺激離體小島細胞測量細胞內 NO 的產生，其是經由透過鈣離子活化 constitutive NOS 而產生一氧化氮⁴⁵。而且 2004 年 Lajoix 等人研究又發現一氧化氮可增加胰島素的分泌，發現胰臟蘭氏小島中的 β 細胞藉由 nNOS 的表現來控制胰島素的分泌，Insulin 的分泌是

受 NO 的產量與細胞色素 C 還原酶 (cytochrome C reductase) 的活性所影響，而控制胰臟 β 細胞的功能⁴⁶。以 STZ-NA (Streptozocin, nicotinamide) 誘發之 DM 動物模型，以藥理學與分子生物學方法，若對精胺酸產生胰島素不正常過度反應 (insulin hyper-responsiveness)，可能是因為 β 細胞中 nNOS 在表現作用中轉譯後的缺損使催化酶活性降低使然⁴⁷。

以外來的 NO 可刺激胰島素的分泌時，發現內源性的 NO 卻是調控胰島素的釋放，此結果是透過放射免疫分析測量三個 NO 的不同 donor：hydroxylamine (HA)、sodium nitroprusside、3-morpholinopyridone (SIN-1)，三個均能明顯增加 INS-1 細胞株分泌胰島素，其機轉分別是：HA 透過細胞膜的去極化作用使細胞內 Ca^{+2} 增加刺激內源性 NO 的產生，而 SIN-1 則是強化葡萄糖誘導的細胞內 Ca^{+2} 增加，使 β 細胞的胰島素分泌增加，故推測在 INS-1 細胞株和原始的大鼠 β 細胞均能因 Ca^{+2} 和葡萄糖的增加刺激分泌 NO 的產生⁴⁸。

NO 對胰島素阻抗的研究中，在 2004 年加拿大學者認為胰島素阻抗是肥胖者產生第二型糖尿病及心血管疾病的主要病因，而其可能的原因

是iNOS產生的NO抑制了胰島素訊號蛋白的傳遞，而由eNOS、nNOS產生的NO可以透過cGMP促進骨骼肌胰島素訊號蛋白的傳遞增加胰島素的敏感性，故提出NO對於骨骼肌血糖代謝的角色是屬於雙向調節的假說⁴⁹。但在2006年Simon Badal等學者另有以SD鼠的骨骼肌細胞做實驗，發現外源性NO會引起骨骼肌的胰島素阻抗，肌細胞內的Insulin receptor- β 和酪氨酸磷酸化（tyrosine phosphorylation）的IRS-1均明顯減少，但絲胺酸磷酸化（serine phosphorylation）的IRS-1卻增加，因此推斷NO是一個有力的 insulin-mediated signal transduction 調節因子，也可能是第二型糖尿病的病理因素扮有重要角色⁵⁰。

第八節 副交感神經系統與胰島素的關係

由於副交感神經系統中的乙醯膽鹼 (Acetylcholine, ACh) 會作用在兩大接受體，muscarinic 受體與 nicotinic 受體，muscarinic 受體屬於膜上 G 蛋白接合的接受體群，人類有 5 種以上的 subtypes (M1-M5)，M1 受體在自主神經節和中央神經系統，M2 受體主要在心臟，M3 受體位於平滑肌、腺體和上皮細胞。ACh 作用於血管的平滑肌造成舒張和降低血壓，主要就是活化 M3 受體，增加細胞內 Ca^{+2} 和活化 NOS，增加 NO 生成。nicotinic 受體則是 Ligand-gate 的離子通道。

副交感神經阻斷劑阿脫品(atropine)，是 ACh muscarinic 受體的阻斷劑，直接與 ACh 競爭接受體而達阻斷作用。而 Hemicholinium (HC-3) 則是抑制 cholinergic nerve 對 choline 再吸收通道的抑制劑，直接抑制 ACh 的生成⁵¹，不直接作用於神經傳遞作用，與 atropine 的阻斷方式不同。

在 1998 年 Sadri P 即提出進食後，副交感神經系統促使肝臟釋放出 ACh，ACh 作用到 muscarinic 受體而引起 NO 的產生。NO 則負責使肝臟釋放 hepatic insulin sensitizing substance (HISS) 的物質，而 HISS 則使

骨骼肌對 Insulin 產生反應，若其中被中斷則會發生胰島素阻抗，若以 L-NAME 和 atropine 抑制 insulin 的作用，發現 atropine 抑制的效果比 L-NAME 強，且 L-NAME 和 atropine 均會造成胰島素阻抗⁵²。

2004 年加拿大學者 Guarino MP 以 rapid insulin sensitizing test (RIST) 評估 Wistar 大鼠的 insulin sensitivity，以 atropine 抑制 HISS 的產生，L-NAME 抑制 NOS，提出副交感神經系統和肝臟的 NOS 與 HISS 的分泌有密切關係，而 HISS 關係著周邊的胰島素敏感度。其中肝臟中的 NO 透過活化 hepatic guanylate cyclase(GC)，使 GC 讓肝臟中的 HISS 分泌出來作用到周邊的組織⁵³。

第九節 電針在副交感神經系統與 NOS 之調控

1995年大陸學者Zhao 利用SRBC (sheep red blood cell) 誘導免疫反應，及Hemicholine-3 (HC-3)阻斷劑，測試副交感神經在電針誘導的免疫調節作用的角色。以Lymphocyte Transformation Test (LTT) 和 Interlukin-2 (IL-2) 活性評估，提出電針引起的免疫調節作用是透過周邊副交感神經釋放ACh所致⁵⁴。在1999年也有國內學者以2Hz與100Hz電針足三里測試對人體心跳與皮膚溫度的變化影響，推測電針足三里可能藉由活化較大副交感神經達到降低心跳速率⁵⁵。2005年Wang 等人亦利用 c-Fos的腦幹免疫組織化學染色，決定電針在治療胃潰瘍SD鼠的角色，發現電針在潰瘍前可預防潰瘍得產生，電針對潰瘍形成後治療較有限。也推論電針調控副交感神經的傳入⁵⁶。2006年Iwa 等人利用motility index 觀察電針足三里 (10Hz、20min) 對遠端大腸的影響與 c-Fos-immunopositive cells在橋腦 Barrington 細胞核的表現，利用 atropine 阻斷副交感神經的作用。證實電針足三里透過腰部的副交感神經系統來增加遠端大腸的蠕動與傳送，且橋腦的Barrington 細胞核扮演

重要角色⁵⁷。可見電針可透過調控副交感神經系統影響一些生理作用。

至於電針對NOS的調控，先前也有不少實驗證實他們的關係。例如2000年Yang 等人以RT-PCR，測試電針對癲癇的威斯特鼠大腦海馬核NOS的影響，發現電針在penicillin誘導的癲癇下，會使nNOS 與iNOS的量降低，推論電針的抗癲癇作用與降低NOS有關⁵⁸。Hou 等人以Nicotinamide adenosine dinucleotide phosphate diaphorase (NADPH-d) 觀察電針足三里不同時間對septal subnuclei中NOS positive neurons的影響，發現電針會增加NOS的表現，且電針15min到60min的影響是相同水平⁵⁹。2007年韓國Kim 等學者利用iNOS knockout mice做tail-flick response (TFR)，觀察分別以2Hz與100Hz電針足三里的止痛效應，發現iNOS不管在低高頻電針引發的止痛效應均扮演重要角色⁶⁰。可見電針會藉由調控不同型態的NOS來達到不同的電針作用。

第十節 足三里與一氧化氮合成酶（NOS）的關係

足三里對 NOS 表現的研究中，在大陸安徽以逆行傳導 horse radish peroxidase(HRP) 與 NADPH 做研究，發現有 NOS positive neuron 從 L4 到 S1 神經節分布到足三里的穴區，由脊髓的 lamina 4 放射出來到足三里⁶¹。Jang 等人觀察到以鏈尿佐菌素（Streptozocin, STZ）誘發的第二型糖尿病 SD 大鼠之動物模型中，用 NADPH-d 為中樞神經系統的組織化學標記測量，針刺足三里可以增加大腦內海馬迴（hippocampus）NOS 的表現⁶²。2005 年 Sun 等人以冷壓力潰瘍（cold stree ulcer）大鼠模型觀察針刺足三里的保護作用，亦發現針刺足三里後大鼠的潰瘍指數（ulcer index）會下降，而且 nNOS 在下視丘的基因表現明顯增加，iNOS 和 eNOS 在下視丘的基因表現減少，腎上腺的基因表現則只有 nNOS 可被針刺抑制，因此推論針刺足三里可以藉由調昇 nNOS，調降 iNOS、eNOS 的基因表現，達到保護胃黏膜的作用⁶³。

第三章 材料與方法

第一節 實驗構想

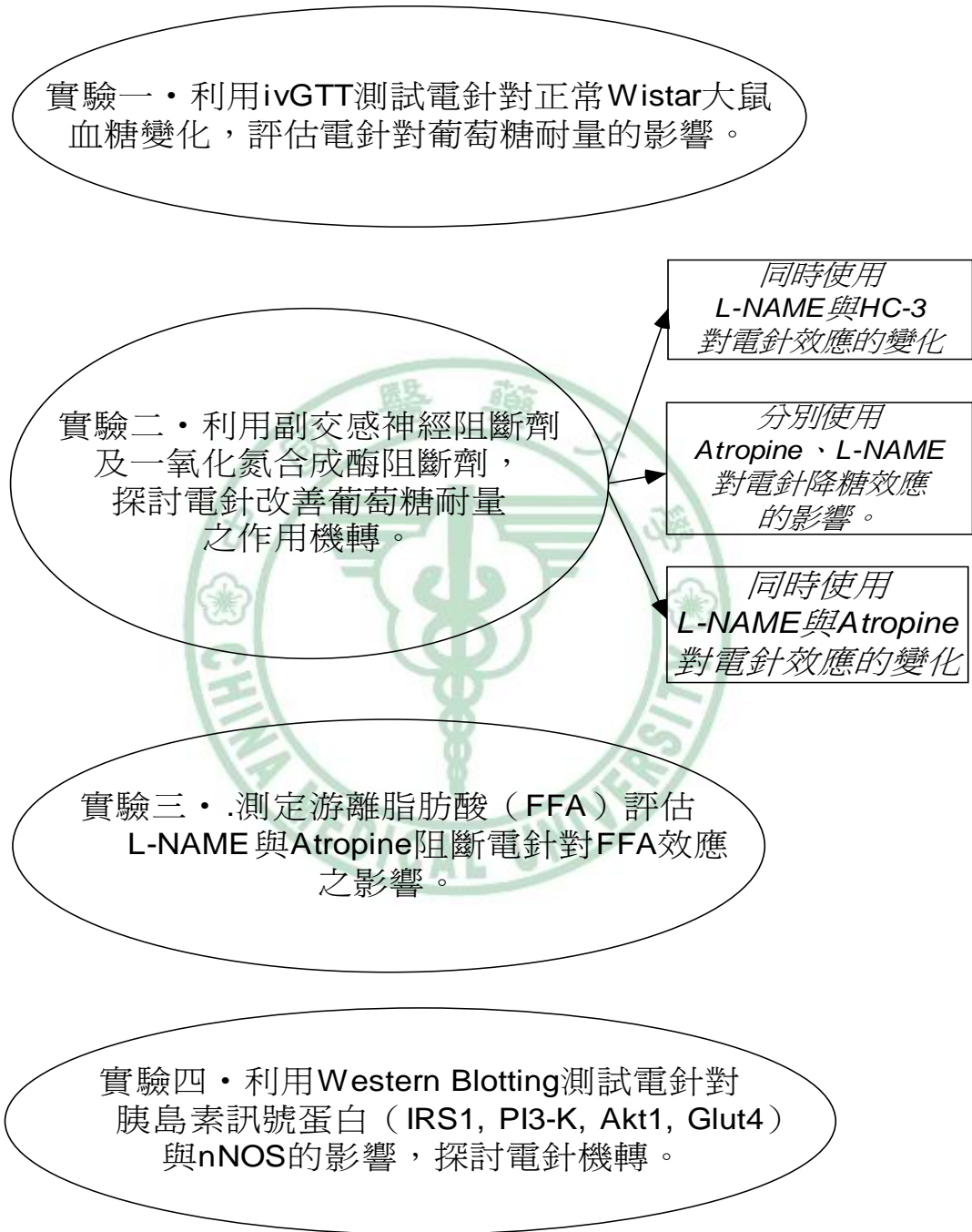


圖 3.1 以正常大鼠做 ivGTT 探討電針改善葡萄糖耐量機轉的流程圖。(ivGTT : intravenous Glucose tolerance Test , FFA : free fatty acid , HC-3 = hemicholinium-3)

第二節 實驗設計

一、 實驗動物：

由樂斯特實驗動物繁殖中心購得正常 Wistar 大白鼠，於中國醫藥大學動物中心飼養，室溫控制在 22 ± 2 °C、相對濕度為 65 ± 5 %，並且於半日照環境下，任其自由飲水和餵食標準飼料。適應一週後，進行實驗探討。

二、 大鼠足三里定穴與雙側足三里電針之實驗模型：

1. 採用先前文獻發表的取穴方法¹⁷，先將大鼠仰臥於解剖板上，四肢予與活固定，足三里則位於小腿脛前肌 (anterior tibia muscle) 與脛骨間近膝側上 1/6 的位置，依人類同身寸法相對比例位置取穴之，穴位圖如圖 3.2 足部三陽經穴取穴圖⁶⁴。
2. 針具採用 0.5 寸 30 號針 (宇光公司)，垂直刺入肌肉層約 2-5 mm。
3. 電針機為韓氏電針儀 (Han's Healthronic Likon, Taipei, Taiwan)，在小腿兩側足三里穴接上電針機，正極接在右

側，負極接於左側；非穴區則將正極接在右側小腿外側腓腸肌的上端，負極接於其下端，刺激參數為頻率 15 Hz、電流 10 mA、電針時間 60 min。

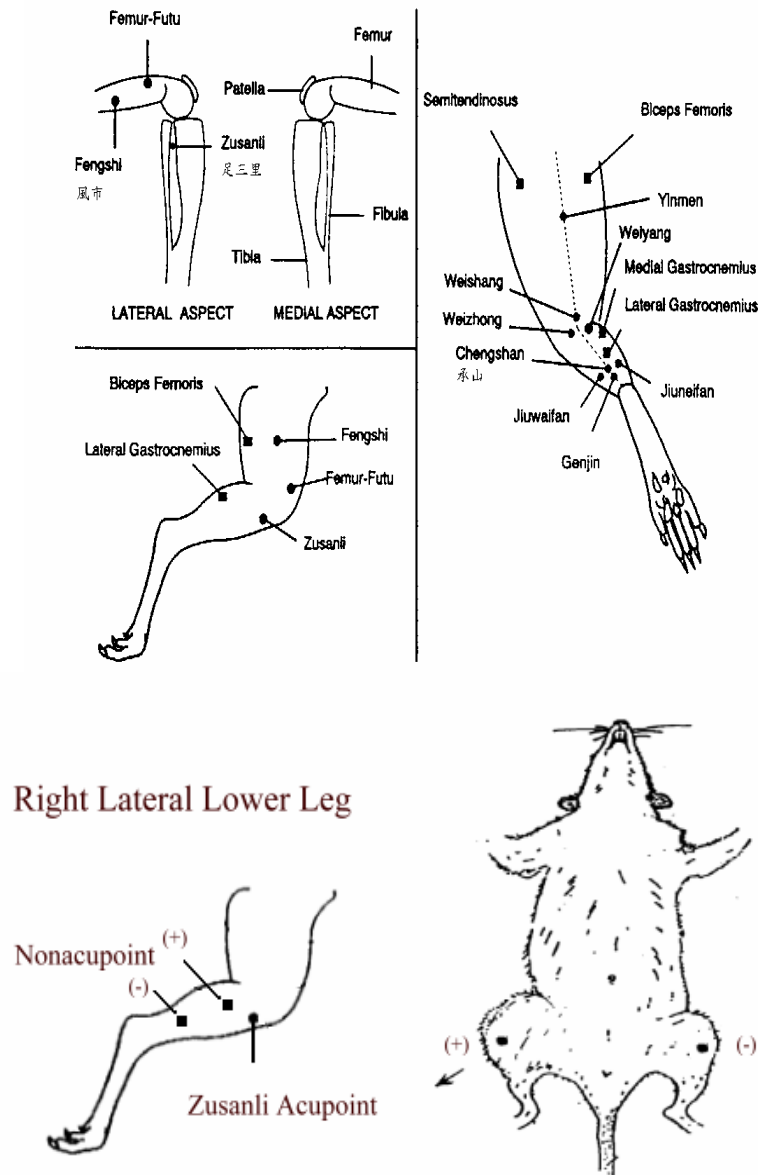


圖 3.2 以 Wistar 鼠探討電針雙側足三里改善葡萄糖耐量機轉的動物穴位圖 (Romita VV et al., Brain Res 1997)。

三、靜脈注射葡萄糖耐受試驗 (ivGTT) 的血糖檢測試驗：

1. 先將正常雄性 Wistar 鼠絕食 12 小時以上，用 Pentobarbital (40 mg/Kg, i.p, 旭富製藥) 麻醉後抽血，以 0.5 ml 針筒內含 heparin，由股靜脈採血 0.3 - 0.5 ml 當起始樣本 0 min。
2. 打入葡萄糖 (1 mg/Kg, i.v) 到大鼠的股靜脈作靜脈注射葡萄糖耐受試驗。每 15 min、30 min、60 min、90 min 各以 0.5 ml 針筒內含 heparin，由股靜脈採血，0.3 - 0.5 ml。分別為樣本 15 min、樣本 30 min、樣本 60 min、樣本 90 min。
3. 兩組各樣本皆置試管 (eppendorff tube) 中，輕搖冰上保存。
4. 全部樣本離心 13000 rpm, 5 min。
5. 取上清液血清，存放於 -20 °C 中，待測。

四、 實驗步驟：

實驗一：電針對葡萄糖耐量之影響。

1. 將正常雄性 Wistar 鼠絕食 12 小時以上，用 Pentobarbital (40 mg/Kg, i.p) 麻醉後隨機分成兩組一組電針組、一組不電針組同時做靜脈注射葡萄糖耐受試驗 (ivGTT)。
2. 電針組，在打入葡萄糖 (1 mg/Kg, i.v) 後並同時針刺雙側足三里，加電針機持續刺激。刺激頻率 15 Hz、強度 10 mA，刺激時間為 60 min。不電針組不做針刺與加電針機。
3. 利用兩組血糖變化量評估電針改善大鼠葡萄糖耐量。

實驗二：不同阻斷劑 Atropine、L-NAME 與 HC-3 對電針改善葡萄糖耐量之影響。

甲、 個別阻斷劑在電針對葡萄糖耐量效應之影響：

1. 將正常雄性 Wistar 鼠絕食 12 小時以上，用 Pentobarbital (40 mg/Kg, i.p) 麻醉後，分別加打 Atropine (0.1 mg/kg, i.p)、L-NAME (10 mg/kg, i.p) 或 HC-3 (0.1 mg/kg, i.p)。
2. 隨機分成兩組一組電針組、一組不電針組同時做 ivGTT。
3. 電針組，在打入葡萄糖 (1 mg/Kg, i.v) 後並同時針刺雙

側足三里，加電針機持續刺激。刺激頻率 15 Hz 、強度 10 mA ，刺激時間為 60 min 。不電針組不做針刺與加電針機。

4. 利用兩組血糖變化量評估個別阻斷劑在電針對葡萄糖耐量效應之影響。

乙、合併兩種不同阻斷劑在電針對葡萄糖耐量效應之影響：

1. 將正常雄性 Wistar 鼠絕食 12 小時以上，用 Pentobarbital (40 mg/Kg, i.p) 麻醉後，同時打 Atropine (0.1 mg/kg, i.p) 與 L-NAME (10 mg/kg, i.p) 或 L-NAME (10 mg/kg, i.p) 與 HC-3 (0.1 mg/kg, i.p)。
2. 隨機分成兩組一組電針組、一組不電針組同時做 ivGTT。
3. 電針組，在打入葡萄糖 (1 mg/Kg, i.v) 後並同時針刺雙側足三里，加電針機持續刺激。刺激頻率 15 Hz 、強度 10 mA ，刺激時間為 60 min 。不電針組不做針刺與加電針機。
4. 利用兩組血糖變化量評估合併不同阻斷劑在電針對葡萄糖耐量效應之影響。

實驗三：利用測定 FFA 評估電針對胰島素敏感度之影響。

甲、電針在 ivGTT 下對 FFA 值之影響：

1. 將正常雄性 Wistar 鼠絕食 12 小時以上，用 Pentobarbital (40 mg/Kg, i.p) 麻醉後隨機分成兩組一組電針組、一組不電針組同時做 ivGTT。
2. 電針組，在打入葡萄糖 (1 mg/Kg, i.v) 後並同時針刺雙側足三里，加電針機持續刺激。刺激頻率 15 Hz、強度 10 mA，刺激時間為 60 min。不電針組不做針刺與加電針機。
3. 利用檢測兩組血清中 FFA 變化量評估電針對胰島素敏感度之影響。

乙、阻斷劑對於電針在 ivGTT 下對 FFA 值效應之影響：

1. 將正常雄性 Wistar 鼠絕食 12 小時以上，用 Pentobarbital (40 mg/Kg, i.p) 麻醉後，同時打 Atropine (0.1 mg/kg, i.p) 與 L-NAME (10 mg/kg, i.p)。
2. 隨機分成兩組一組電針組、一組不電針組同時做 ivGTT。
3. 電針組，在打入葡萄糖 (1 mg/Kg, i.v) 後並同時針刺雙側足三里，加電針機持續刺激。刺激頻率 15 Hz、強度

10 mA ，刺激時間為 60 min 。不電針組不做針刺與加電針機。

4. 檢測兩組血清中 FFA 值的變化，評估阻斷劑對於電針在 ivGTT 下對 FFA 值效應之影響。

實驗四：電針對胰島素訊號蛋白與 nNOS 影響試驗。

1. 將正常雄性 Wistar 鼠絕食 12 小時以上，用 Pentobarbital (40 mg/Kg, i.p) 麻醉後隨機分成兩組一組電針組、一組不電針組同時做靜脈注射葡萄糖耐受試驗 (ivGTT)。
2. 電針組，在打入葡萄糖 (1 mg/Kg, i.v) 後並同時針刺雙側足三里，加電針機持續刺激。刺激頻率 15 Hz 、強度 10 mA ，刺激時間為 60 min 。不電針組不做針刺與加電針機。
3. 實驗 60 min 後電針組、不電針組各組取大鼠大腿腓腸肌束。
4. 離體大腿腓腸肌，骨骼肌，以均質機研磨後離心，取上清液 (supernatant) ，利用西方轉漬法測量 PI3-k、IRS-1、Akt1、

GLUT4、nNOS 與 Actin 的含量。

5. 比較兩組 PI3-k、IRS-1、Akt1、GLUT4、nNOS 與 Actin 的相對含量的差異，評估電針對胰島素訊號蛋白與 nNOS 之影響。

五、 血糖測定 (Assay of Plasma Glucose)：

利用 Glucose UA 試劑 (Glucose UA Reagent, Raichem) 檢測血清中生化指標葡萄糖 (GLU) 之含量，其含量採用 Roche 全自動生化儀 (COBA-MIRA-PLUS, ROCHE) 來進行檢測各組樣本血清中血糖值。

六、 游離脂肪酸的測定 (Assay of Free Fatty Acid, FFA)：

1. 以 Non Esterified Fatty acid kit (購自 Randox Laboratories Canada Ltd.) 檢測各組樣本血清中 FFA 值。
2. 自動生化儀檢測 (COBAS^R system)：利用酵素會將實驗各組各時間點樣本血清中的 FFA 轉變成 Acyl-CoA，再氧化成有色的

purple adduct，以分光光度儀（spectrophotometer, Quik-Lab, Ames, Miles Inc., Elkhart, Ind., USA），波長 550 nm 進行比色，再與已知濃度標準品比較求得實驗樣本中的 FFA 濃度。

七、胰島素訊號蛋白與 nNOS 之抗體（Antibody of Insulin signal

protin and nNOS）：

IRS-1 抗體（1:200 稀釋，rabbit polyclonal antibody）、GLUT4 抗體（1:200 稀釋，goat polyclonal antibody）、PI3-K 抗體（1:200 稀釋，goat polyclonal antibody）、Akt1 抗體（1:200 稀釋，goat polyclonal antibody）、 β -Actin 抗體（1:500 稀釋，goat polyclonal antibody），由 Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, Calif. 購得。nNOS 抗體（1:1000 稀釋，Mouse monoclonal antibody）自（ZYMED Laboratories）購得。

八、西方轉漬法分析 (Western Blotting Assay) :

1. 大鼠離體腓腸肌組織於 RIPA Lysis Buffer 裡，以均質機研磨後，萃取出蛋白質，再以分光光度計偵測蛋白質含量。
2. 取約 90 μg / μl 蛋白質在 8 % SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) -polyacrylamide 凝膠進行蛋白質分離，以轉漬緩衝液 (20% methanol, 25 mmol/l TRIS base and 192 mmol/l glycine) 轉漬 (電流伏特 90 V, 90 min) 到硝化纖維膜 (poly vinylidene difluoride、PVDF) transfer membrane) 上。
3. 待轉漬完成後，再將 PVDF 浸潤於含 5% 的脫脂牛奶中，於室溫下將 PVDF 膜上的非特異性結合位阻斷。
4. 接著，將 (poly vinylidene difluoride、PVDF) 浸潤於含 1% 的脫脂牛奶及適量的 anti-IRS-1 antibody、anti-PI3-kinase antibody、anti-Akt1 antibody anti-GLUT 4 antibody 與 anti-nNOS

antibody、anti-Actin antibody 等抗體中，於 4°C 冰箱內緩慢振盪
隔夜。

5. 以 PBST buffer 清洗 PVDF 四次，每次 10 分鐘。再將 PVDF 浸潤於含 1% 的脫脂牛奶及適量的 anti-goat IgG antibody 中，於室溫下緩慢振盪 1hr。重覆以 PBST buffer 洗 PVDF 4 次，每次 10 分鐘。

6. 最後，將 PVDF 膜上水漬滴乾，加入 ECL detection kit (Chemiluminescence Reagent Plus)，再以 X-RAY 予以壓片。



第三節 統計分析 (Statistical analysis)

在本研究中，實驗數值以平均值±標準誤差 (Mean ± SE) 表示。實驗組與對照組間差異的比較，是採用 Independent-Sample T Test。同一組前後比較採 Paired-T Test。若 p 值 < 0.05，其差異為有意義。實驗結果以套裝統計軟體 SPSS 11.5 計算。



第四章 結果

實驗一：電針在 ivGTT 下對葡萄糖耐量之影響。

目的：利用兩組血漿中血糖變化量評估電針改善大鼠葡萄糖耐量。

1. 比較電針組 (EA 60 min) 與非電針組 (non-EA)，在 0 min 時兩組

血糖平均值分別為 116.35 ± 21.96 mg/dL 與 127.07 ± 19.73 mg/dL，

並無統計差異 (NS)，表示在分組隨機分配上並無選擇性偏差

(selective bias)。

2. 實驗開始後 15、30、60、90 min 為大鼠抽血所得樣本，測量血漿

血糖濃度，得到的血糖平均值。非電針組 (non-EA) 分別為 268.96

± 33.82 mg/dL、 161.17 ± 42.78 mg/dL、 110.45 ± 23.94 mg/dL、

105.99 ± 17.75 mg/dL。電針組 (EA 60min) 分別為 195.71 ± 33.82

mg/dL、 96.88 ± 40.33 mg/dL、 78.38 ± 18.26 mg/dL、 71.79 ± 21.90

mg/dL。

3. 可見電針組到了 15min 即產生較佳的降糖效果，與非電針組有顯

著差異 ($p=0.0003$)，接下來幾個時間點 p 值分別為 30 min

($p=0.0009$)、60 min ($p=0.0012$)、90 min ($p=0.0003$) 皆達到統

計上顯著差異，如下圖 4.1 所示。



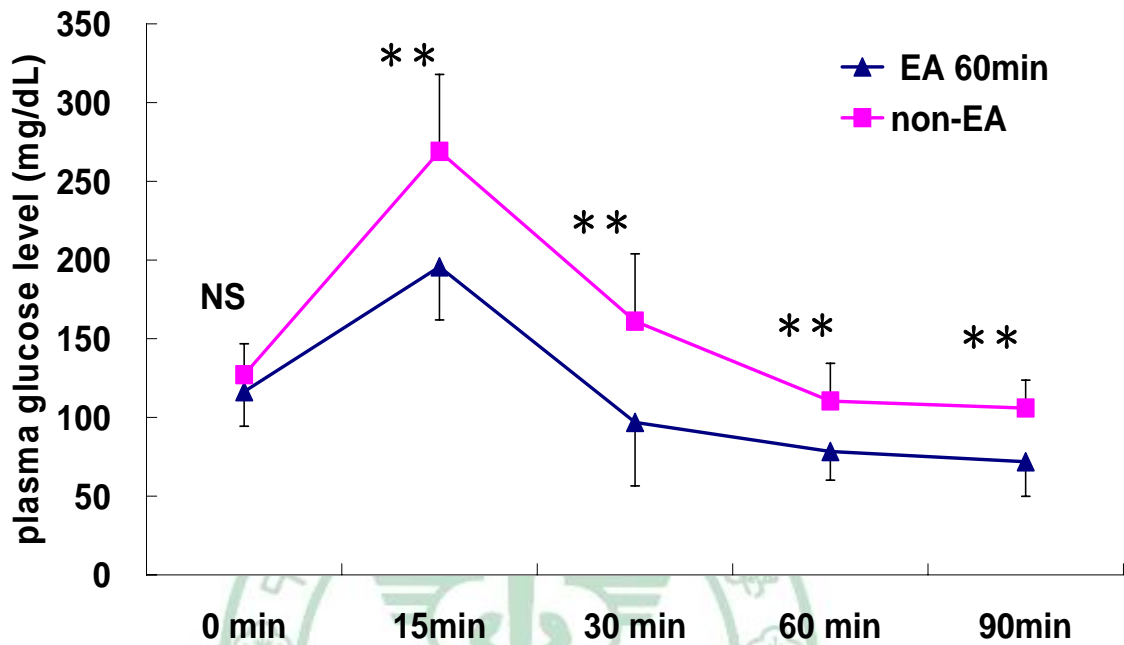


圖 4.1 電針在 ivGTT 下對正常大鼠血糖耐量的影響。

電針組 (EA 60 min) 的血糖下降速率，明顯大於非電針組。

數值以 (Mean \pm SE) 表示。(** , $p < 0.005$; NS = No

Significant)

實驗二 不同阻斷劑 L-NAME、Atropine 與 HC-3 對電針改善葡萄糖耐量之影響。

目的：利用不同阻斷劑改變電針的作用，評估電針改善葡萄糖耐量

可能的機轉路徑。

甲、個別阻斷劑在電針對葡萄糖耐量效應之影響：

1. 比較電針組 (EA 60 min) 與非電針組 (non EA)，在 0 分鐘時兩組平均血糖值並無明顯統計差異，表示在分組時並無選擇性偏差。
2. 分別打入 L-NAME 或 Atropine 到大鼠腹腔中。電針的降糖效果單獨使用 L-NAME 在每個時間點的平均血糖值與非電針組(non EA) 均有非常明顯差異 ($p < 0.005$)，除了 30 min 明顯差異 ($p < 0.05$)，電針的降糖作用未被 L-NAME 所阻斷。(如下圖 4.2)
3. 電針的降糖效果，單獨使用 Atropine 只能使 60、90 min 時間點的平均血糖值與非電針組 (non EA) 無明顯差異 (60 min $p=0.0949$ 、90 min $p=0.2381$)。(如下圖 4.3)
4. 電針的降糖效果，若單獨使用 HC-3 亦只能使 60、90 min 時間點

的平均血糖值與非電針組（non EA）無明顯差異（60 min

$p=0.18355$ 、90 min $p=0.28073$ ）。（如下圖 4.4）

4. 表示單獨使用 L-NAME、 Atropine 或 HC-3 無法完全阻斷電針的

降糖作用，只能部分阻斷電針的作用。



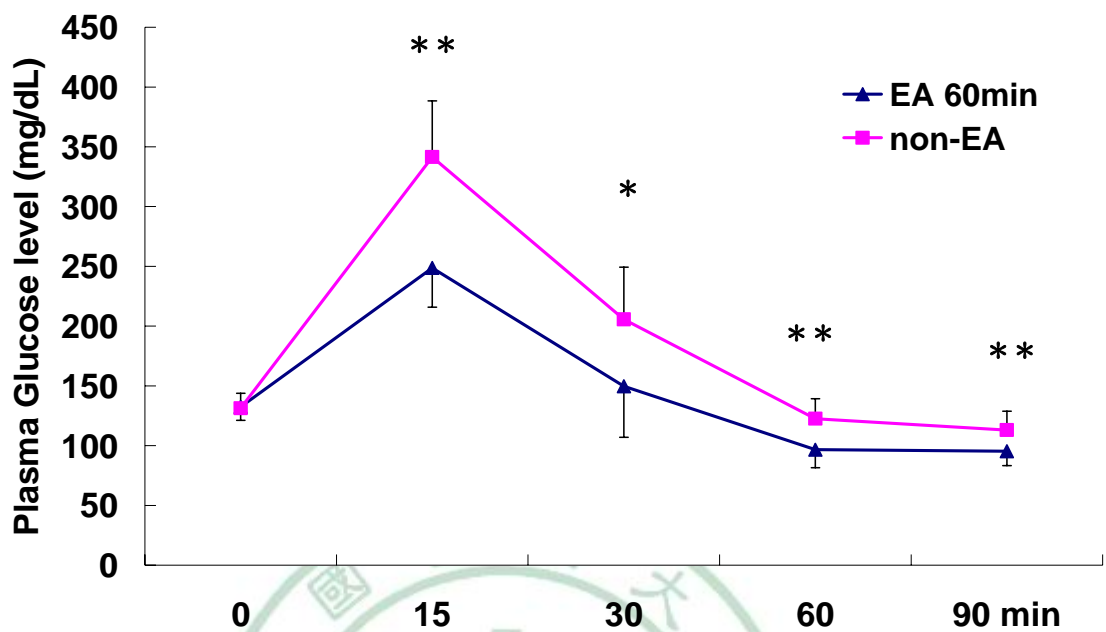


圖 4.2 L-NAME 阻斷電針在 ivGTT 下對正常大鼠血糖變化的影響。

電針組 (EA 60 min) 的降血糖作用，在每個時間點與非電針組 (non EA) 均有明顯差異，電針降糖作用未被 L-NAME 阻斷掉， (* , $p < 0.05$; ** , $p < 0.005$)。

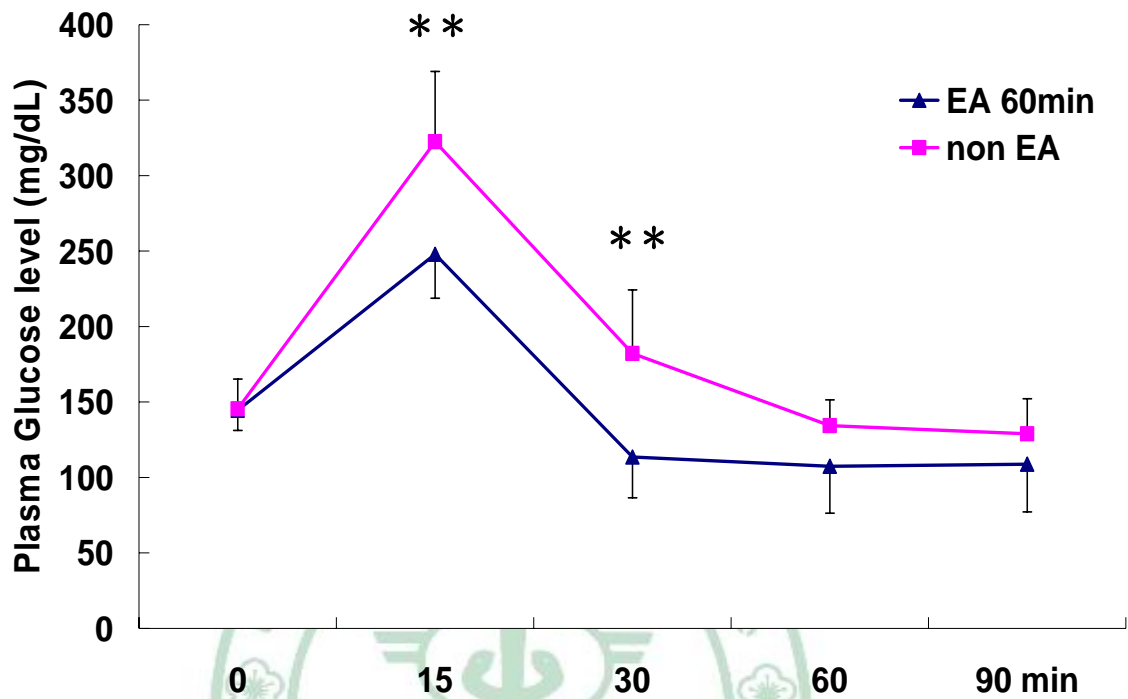


圖 4.3 Atropine 阻斷電針在 ivGTT 下對正常大鼠血糖變化的影響。

電針雙側足三里 60 分鐘組 (EA 60 min) 的降血糖作用，在 60、90 min 並無差異，也部分被 Atropine 阻斷掉。(** , $p < 0.005$)

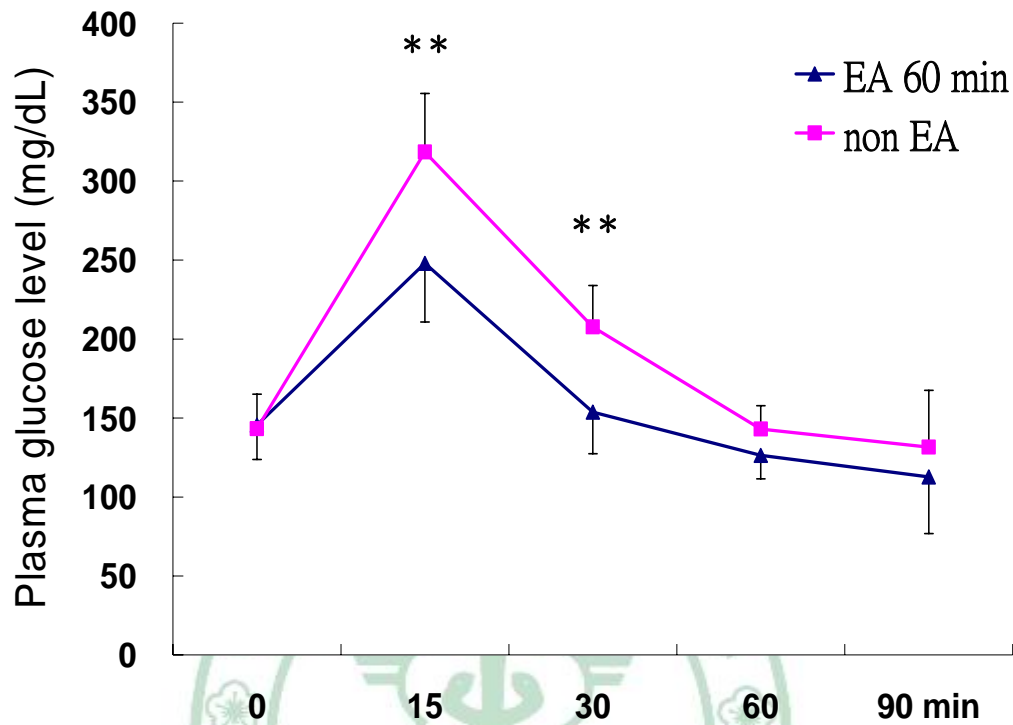


圖 4.4 HC-3 阻斷電針在 ivGTT 下對正常大鼠血糖變化的影響。

電針雙側足三里 60 分鐘組 (EA 60 min) 的降血糖作用，在 60、90 min 並無差異，與 atropine 一樣部分被 HC-3 阻斷掉。(** , $p < 0.005$)

乙、合併兩種不同阻斷劑在電針對葡萄糖耐量效應之影響：

1. 比較電針組 (EA 60 min) 與非電針組 (non EA)，在 0 分鐘時兩組平均血糖值 129.11 ± 20.76 與 128.82 ± 16.81 mg/dL 並無明顯統計差異，表示在隨機分組上無選擇性偏差。
2. 同時加入 L-NAME 與 Atropine 實驗開始後 15、30、60、90 min 得到各時間點的血糖平均值，電針組分別為 360.49 ± 60.83 mg/dL、 216.22 ± 79.00 mg/dL、 121.00 ± 51.06 mg/dL、 99.26 ± 43.85 mg/dL，而非電針組分別為 363.59 ± 33.08 mg/dL、 272.16 ± 63.71 mg/dL、 175.02 ± 57.93 mg/dL、 143.89 ± 39.30 mg/dL，並無顯著差異。加入 L-NAME 與 HC-3 各時間點的血糖平均值亦無顯著差異。
3. 電針組 (EA 60 min) 的降糖效果，在 L-NAME 與 Atropine，或 L-NAME 與 HC-3 同時的作用下，使全部時間點的平均血糖值均與非電針組 (non EA) 的控制組無明顯差異，表示同時使用 L-NAME 與 Atropine，或 L-NAME 與 HC-3 能夠完全阻斷電針的降糖作用，(如圖 4.5，圖 4.6)。

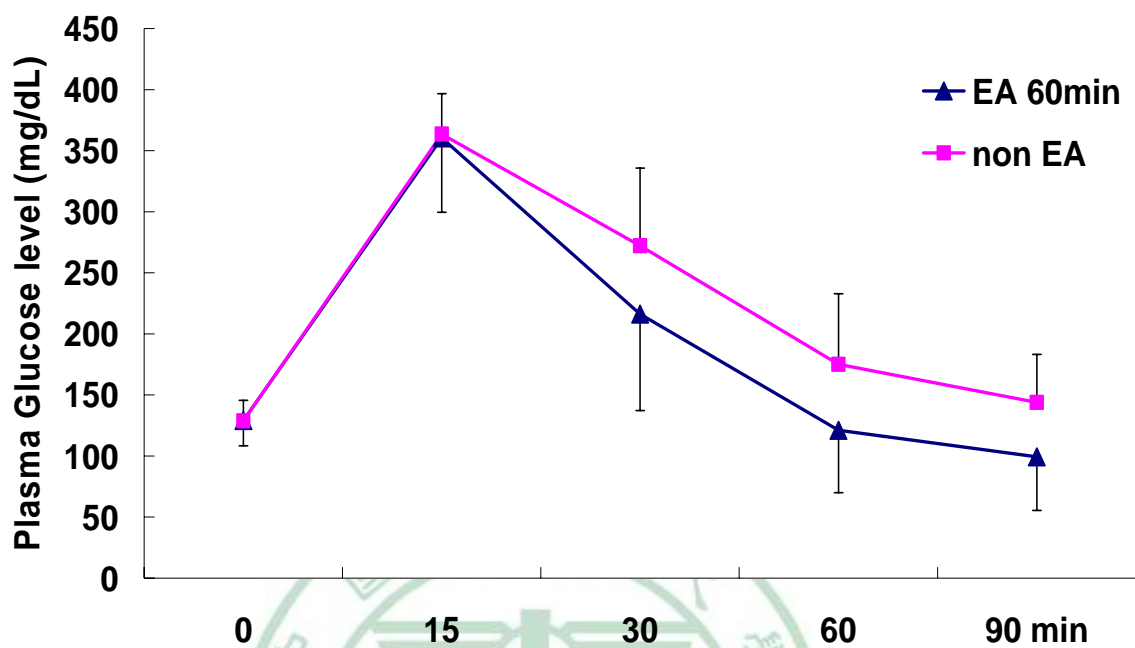


圖 4.5 合併 L-NAME 與 Atropine 阻斷電針在 ivGTT 下對血糖變化的影響。

電針組 (EA 60 min) 的降血糖作用，在 L-NAME 與 Atropine 作用下各時間點的平均血糖值與非電針組 (non EA) 並無差異，原電針的降糖作用被 L-NAME 與 Atropine 完全阻斷掉。

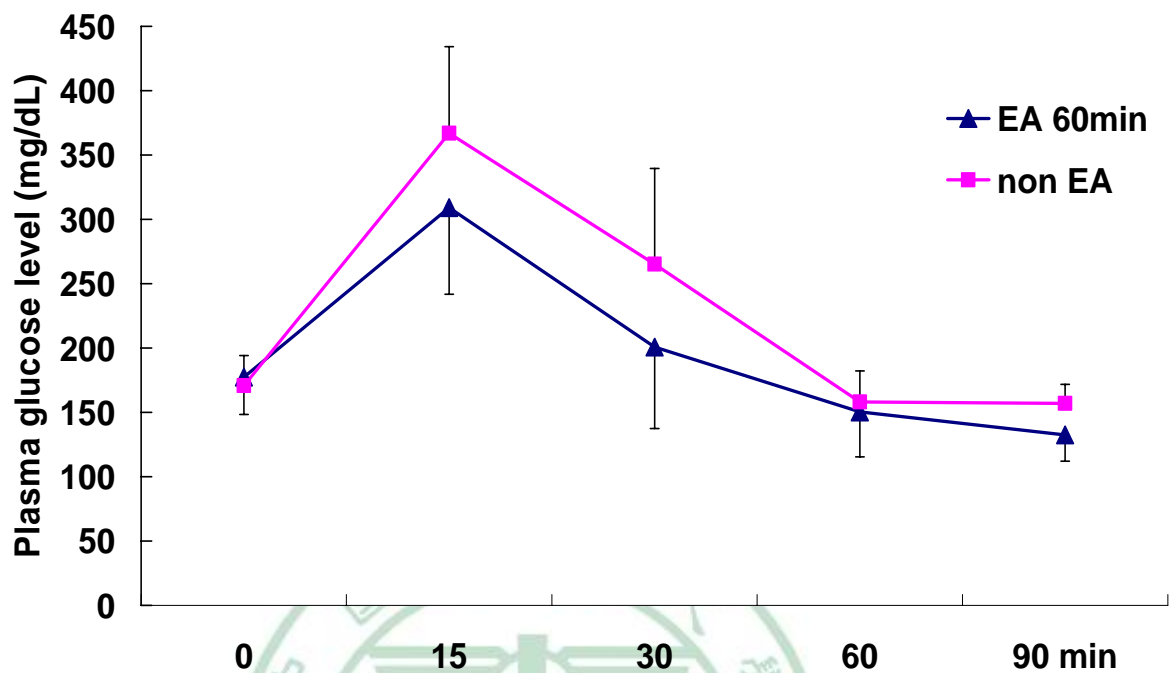


圖 4.6 合併 L-NAME 與 HC-3 阻斷電針在 ivGTT 下對血糖變化的影響。

電針組 (EA 60 min) 的降血糖作用，在 L-NAME 與 HC-3 作用下各時間點的平均血糖值與非電針組 (non EA) 並無差異，原電針的降糖作用亦被 L-NAME 與 HC-3 完全阻斷掉。

實驗三：利用測定游離脂肪酸(FFA)評估電針對胰島素敏感度之影響。

目的：檢測 ivGTT 下血漿中 FFA 的變化評估電針對胰島素敏感度之影響。

甲、電針在 ivGTT 下對 FFA 值之影響：

1. 實驗開始後 0、15、30、60、90 分鐘為大白鼠抽血檢查血漿中游離

脂肪酸的平均濃度。發現非電針組 (non EA) 的平均 FFA 濃度從

0 min 到 90 min 時有先降後昇的 U 形曲線關係。

2. 比較電針組 (EA 60 min) 與非電針組 (non EA)，在電針 30 min 以

後到 60 min 電針停止時，電針組的 FFA 平均濃度均低於非電針

組，但無明顯統計差異。同組間 0 min 與 15 min 亦無統計差異。

3. 觀察到在 90 min 時的平均 FFA 值，電針組為 0.529 ± 0.21 meq/L

低於非電針控制組的 1.052 ± 0.238 meq/L，且達到統計上顯著差異

($p=0.011$)，表示電針在 ivGTT 的狀態下有降低 FFA 的作用。(如

圖 4.7)

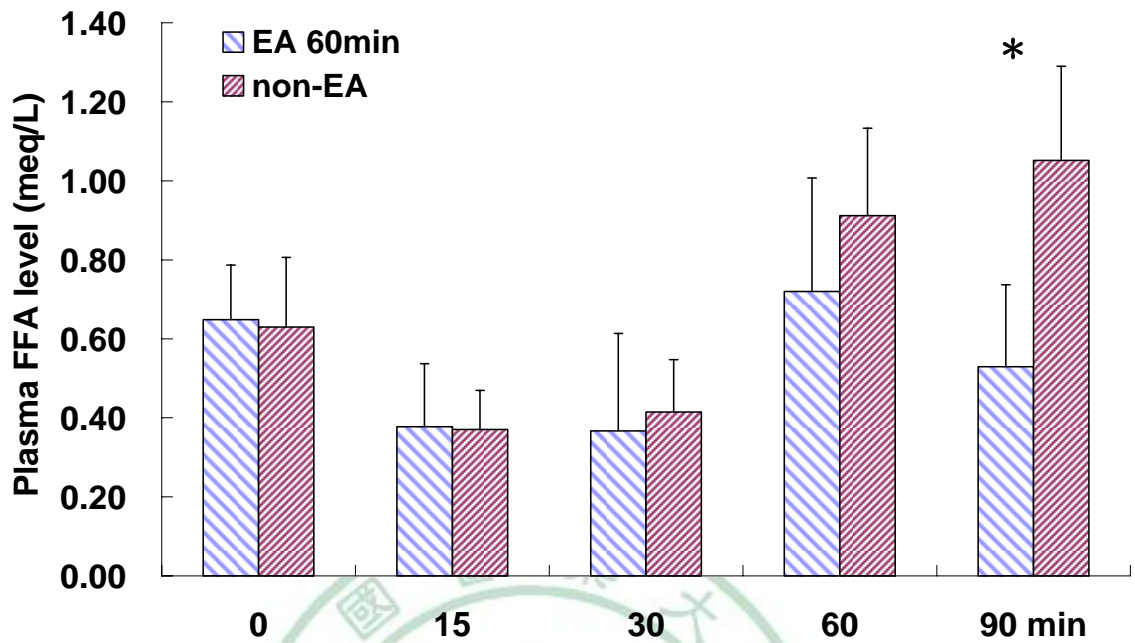


圖 4.7 在 ivGTT 下電針對正常大鼠游離脂肪酸變化的影響。

電針組 (EA 60min) 為大鼠電針雙側足三里 60 min，使血漿中的 FFA 有下降的趨勢，在 90 min 與非電針組達到統計上顯著差異。(*， $p < 0.05$)

乙、阻斷劑對於電針在 ivGTT 下對 FFA 值效應之影響：

1. 在做 ivGTT 之前，以 L-NAME 與 Atropine 阻斷劑打入大鼠腹腔，實驗開始後 0、15、30、60、90 min 為大白鼠抽血供檢查血漿中游离脂肪酸 (FFA) 濃度。
2. 比較電針組 (EA 60min) 與非電針組 (non EA)，在 0、15、30、60、90 min 各個觀察點的平均 FFA 值。在 90 min 時電針組為 1.083 ± 0.19 meq/L 低於非電針組的 1.496 ± 0.44 meq/L，但未達統計差異。
3. 原有 ivGTT 下電針 60 min，在 90 min 時觀察到的電針降 FFA 的作用，被 L-NAME 與 Atropine 同時作用所阻斷。(如下圖 4.8)

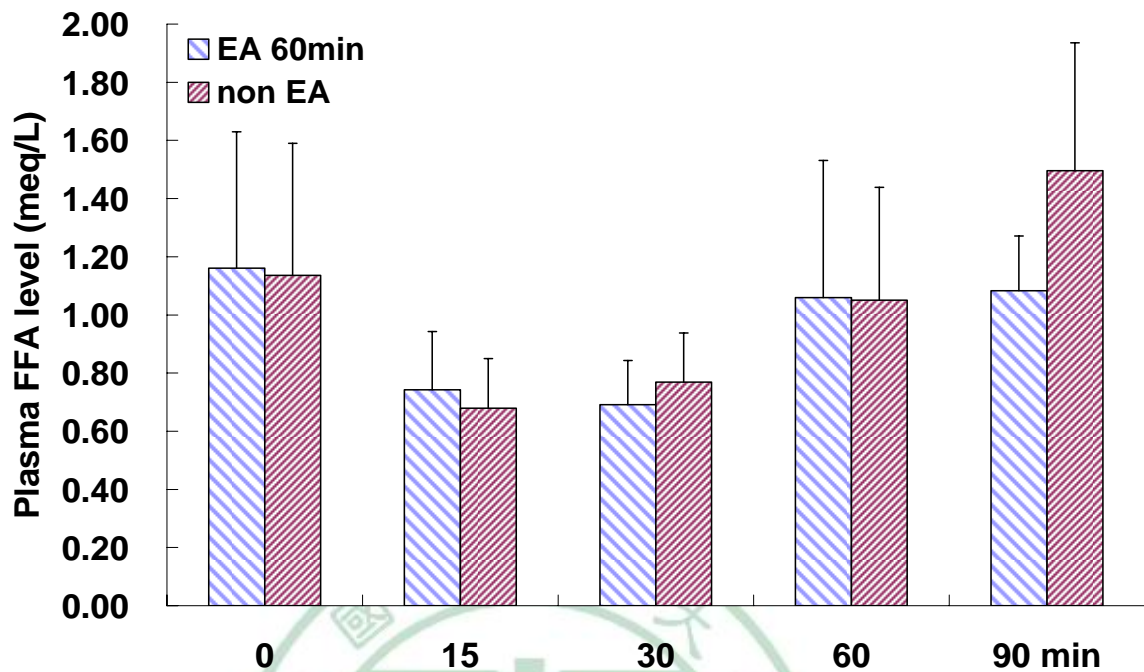


圖 4.8 在 L-NAME 與 Atropine 作用下做 ivGTT，電針對大鼠游離脂肪酸變化的影響。

電針組 (EA 60 min) 與非電針組 (non EA) 的平均 FFA 值，在各個時間點並無顯著差異。原電針降 FFA 的作用被 L-NAME 與 Atropine 同時作用所阻斷。

實驗四：電針對胰島素訊號蛋白與 nNOS 影響試驗。

目的：評估胰島素訊息蛋白與 nNOS 的相對改變量，探討電針改善葡萄糖耐量之作用。

1. 在 ivGTT 實驗開始後 60 min，將電針組 (EA 60 min) 與非電針組 (non EA) 均取大鼠下肢腓腸肌，利用免疫點墨法檢測 IRS-1、PI-3 kinase、Akt1、GLUT4 及 n-NOS 的相對含量。
2. 觀察比較各胰島素訊號蛋白與 β -Actin 的相對含量比，發現訊號蛋白 IRS-1、PI-3 kinase、Akt1 及 GLUT4，電針組含量均大於非電針組，但只有 IRS-1 電針組比率為 1.293 ± 0.74 大於非電針組 0.248 ± 0.15 ，且達到顯著差異 ($p=0.010$)，但其他 3 種未達統計上差異。
3. 骨骼肌中 n-NOS 的含量，電針組平均相對含量比 0.643 ± 0.21 ，大於非電針組 0.374 ± 0.07 ，且有達到顯著差異 ($p=0.038$)。(如下圖 4.9、4.10)

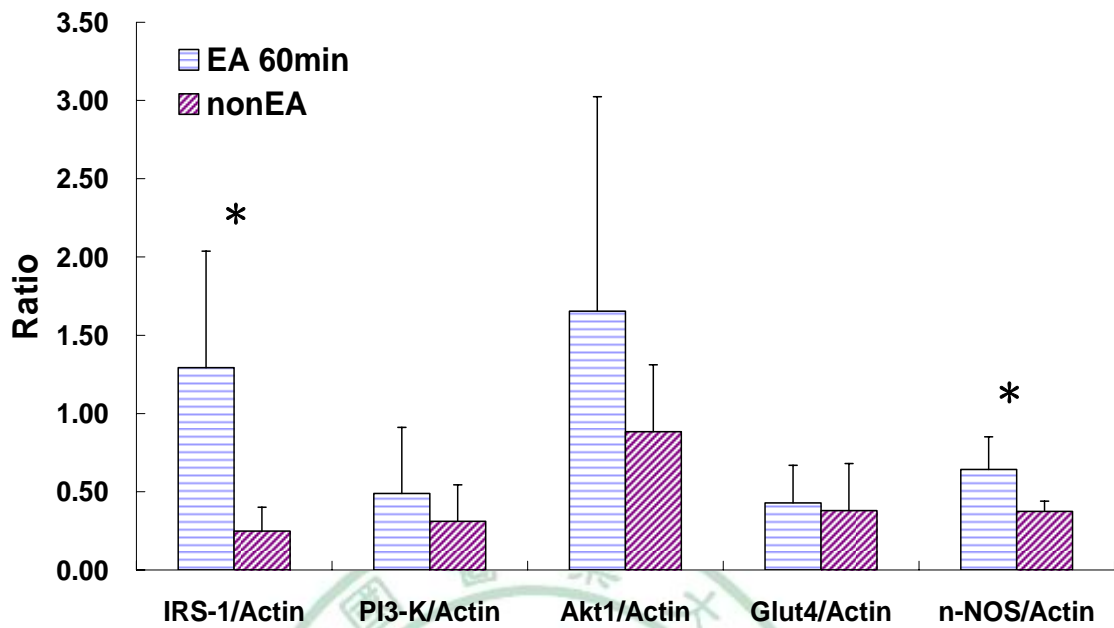


圖 4.9 在 ivGTT 下電針對胰島素訊息蛋白與 nNOS 的效應。

電針(EA)可增加骨骼肌中胰島素訊息蛋白 IRS-1、PI-3 k、Akt1、GLUT4 與 n-NOS 的相對含量。(*, $p < 0.05$)

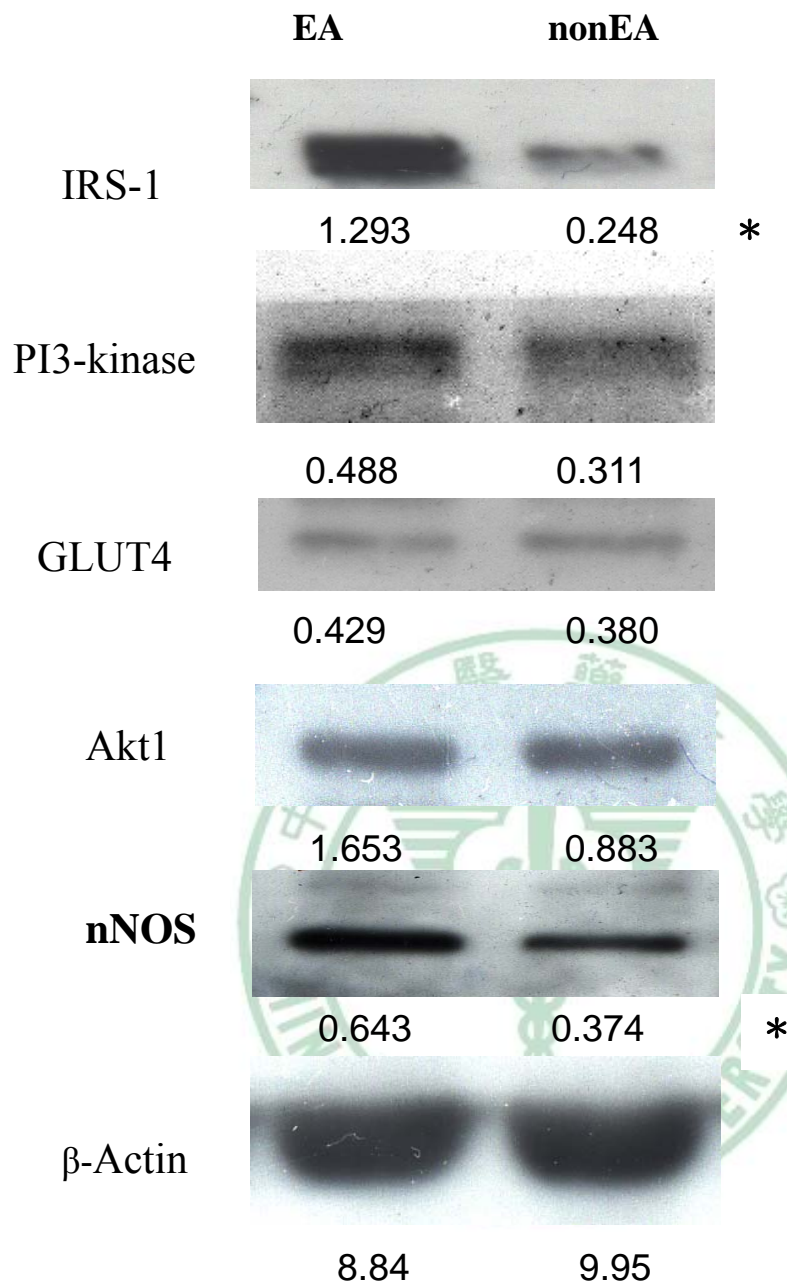


圖 4.10 西方點墨法做胰島素訊息蛋白與 nNOS 的 X 光壓片呈色圖與相對含量。

IRS-1 電針組 (EA) 相對比率大於非電針組 (nonEA)，且達到顯著差異。n-NOS 的含量，電針組平均相對含量比大於非電針組，且有達到顯著差異，(*, $p < 0.05$)。



圖 4.11 正常大鼠雙側足三里電針之實驗模型。

足三里位於小腿脛前肌近膝側，採同身寸法，取上 1/6 處進針。接上電針機(Han's Healthronic Likon, Taiwan)，正極接在右側，負極接於左側，刺激參數 15Hz，10mA，60 分鐘。

表 4.1：電針在 ivGTT 下改善大鼠葡萄糖耐量各實驗結果及其意義。

實驗名稱	實驗目的	實驗結果	意義
實驗一： 電針在 ivGTT 下對葡萄糖耐量之影響	利用血漿中血糖變化量評估電針改善大鼠葡萄糖耐量	電針組的平均血糖值與非電針組，15、30、60、90 min 皆達到統計上顯著差異。電針組的血糖下降速率，明顯大於非電針組。	電針確實有降糖作用，能改善葡萄糖耐量。
實驗二： 不同阻斷劑 Atropine、L-NAME 與 HC-3 對電針改善葡萄糖耐量之影響	利用不同阻斷劑評估電針改善葡萄糖耐量可能的機轉	<p>甲. 單獨阻斷劑之影響 分別使用 L-NAME Atropine 或 HC-3，電針組與非電針組均有明顯差異，單獨使用阻斷劑無法完全阻斷電針降糖作用，只能部分阻斷。</p> <p>乙. 合併兩種不同阻斷劑之影響 在 L-NAME 與 Atropine，或 L-NAME 與 HC-3 同時的作用下，電針組與非電針組均無明顯差異，同時使用兩種不同阻斷劑能夠完全阻斷電針的降糖作用。</p>	電針效應的路徑並非單獨以 ACh 或 NOS 的作用。電針可透過副交感神經的 ACh 與 NOS 的協同作用，產生降糖的效果。
實驗三： 利用測定游離脂肪酸 FFA 評估電針對胰島素敏感度之影響	利用檢測 ivGTT 下血漿中 FFA 的變化評估電針對胰島素敏感度之影響	<p>甲. 電針在 ivGTT 下對 FFA 值之影響 在電針 30 min 以後到 60 min 電針停止時，電針組的 FFA 平均濃度均低於非電針組，但無明顯差異。到在 90 min 時的平均 FFA 值，電針組低於非電針組，(p<0.05)。</p> <p>乙. 阻斷劑對於電針在 ivGTT 下對 FFA 值效應之影響 電針組在 90 min 時 FFA 低於非電針組但未達統計差異。電針降 FFA 的作用，被 L-NAME 與 Atropine 同時作用所阻斷。</p>	電針在 ivGTT 的狀態下有降低 FFA 的作用。電針可透過 ACh 與 NO 的協同作用，使 FFA 下降，增加胰島素敏感度。
實驗四： 電針對胰島素訊號蛋白與 nNOS 影響試驗	評估胰島素訊號蛋白與 nNOS 的改變量，探討電針改善葡萄糖耐量之作用。	比較各胰島素訊號蛋白的相對含量比，IRS-1、PI-3 kinase、Akt1 及 GLUT4，電針組含量均大於非電針組，但只有 IRS-1 達到顯著差異。骨骼肌中 n-NOS 的含量，電針組有達到顯著差異 (p<0.05)。	電針可藉由增加胰島素訊號蛋白的活性、數量，及骨骼肌中 nNOS 的增加，達到胰島素增敏。

總 結： 電針改善大鼠葡萄糖耐量的機轉可能同時透過副交感神經系統的乙醯膽鹼 (ACh) 及一氧化氮合成酶 (NOS) 的作用，降低血中游離脂肪酸，來提升大鼠對葡萄糖之耐受性，增加胰島素敏感度，達到降糖的作用。



第五章 討 論

自從 1896 年 Langerhan 發現胰腺之胰島及 1921 年 Banting 及 Best 發現胰島素 (insulin) 以後，到 1922 年對 Thompson 少年投與胰島素開創了糖尿病治療成功的新紀元⁶⁵。經過近年不斷的研究進展，無論在觀念、診斷、治療上都有明顯的進展。一般認為對於糖尿病人血糖的控制不外：藥物治療或非藥物治療飲食、運動等二方面，但藥物的控制雖然方便而有效，包括了 5 大種類降血糖藥與 10 多種降血壓藥，但其副作用卻難以避免。例如針對輕度到中度空腹高血糖的病患 Troglitazone 可增加周邊組織對葡萄糖的攝取，卻有肝毒性或低血糖副作用，TZD (Thiazolidine diones) 是肝毒性會有 Edema 和 CHF-like Syndrome，常見的 Metformin 會有食慾不振，腹脹痛，噁心，腹瀉等等副作用。臨床的觀察，在非胰島素依賴型 (T2DM) 的病人身上，常服用口服降血糖藥以控制血糖，由於臨床藥物的種類，劑量難掌控，血糖的不穩定在糖尿病人的身上常反覆發生⁶⁶，又由於近幾年代謝症候群病患持續增加，於是尋找溫和且無副作用，甚至能增加胰島素的敏感度 (insulin sensitivity) 的治療或輔助治療法，乃是針灸治療學迫切研究的課題。

本研究的目的是依照 Chang 等學者在 2005 年觀察到電針足三里有非腎上腺來源，非經由內生性嗎啡 (endogenous opioid peptides)

的機轉參與其中。使用去血清素 (serotonin) 藥劑 (PCPA) 結合足量的 naloxone 探討此一推論，發現電針足三里除內生性嗎啡外，尚有血清素參與其中，單獨直接靜脈注射，血清素亦有降糖作用⁶⁷，2006 年以 intravenous glucose tolerance test (ivGTT) 和胰島素挑戰試驗 insulin challenge test (ICT) 對正常 Wistar 大白鼠與 STZ 誘導的 DM 鼠足三里穴做 15 Hz 電針 60 min，發現兩者均有降血糖的作用，結果顯示電針可以增加葡萄糖的糖耐量及胰島素增敏作用與促進胰島素誘導的降血糖作用²⁰。故本研究以正常 Wistar 大鼠為材料欲探討在葡萄糖耐受試驗 (ivGTT) 下，15 Hz 電針雙側足三里對降血糖的可能機轉，動物模型如圖 4.11 所示。

從實驗一的結果，我們觀察到在葡萄糖耐受試驗 (ivGTT) 中，電針組 (EA) 與非電針組 (non EA)，在起始血糖值並無明顯統計差異 ($p=0.2204$)，但到了 15 min 之後電針組即產生較佳的降糖效果，到了 90 min 兩組血糖值仍有明顯差異，且達到統計上非常顯著差異，表示電針確實有降糖作用，能改善葡萄糖耐受量，增加胰島素敏感度，與先前實驗對正常 Wistar 大白鼠足三里穴做 15 Hz 電針 60 min 有降血糖的作用²⁰，有相同實驗結果。在實驗二當中，分別以 L-NAME 或 Atropine 阻斷電針在 ivGTT 下的降糖效應，檢測電針與非電針組兩組的差異，兩組的平均血糖值都仍能觀察到有統計上差

異，電針的降糖效果仍存在，如圖 4.2、4.3、4.4，因此 L-NAME、Atropine 或 HC-3 都不能單獨完全阻斷電針的降糖效應，表示電針效應的路徑並非單獨以副交感神經系統的 ACh 為藉媒或單獨透過 NOS 產生 NO 的作用來影響血糖值，從另一角度來看，此一無法阻斷的現象，重覆印證了實驗一及先前的研究電針改善糖耐量試驗的現象。

若以 L-NAME 與 Atropine 或者是 L-NAME 與 HC-3 同時作用於阻斷電針改善葡萄糖耐量試驗，我們發現同時兩種阻斷劑的組合能完全阻斷掉電針的降糖效果，如圖 4.5、4.6。此實驗結果與 Sadri P 與 Guarino MP 所提出的理論，副交感神經系統透過肝臟 NOS 產生 NO 分泌 HISS 來影響骨骼肌對胰島素的影響相同⁵²⁻⁵³，電針亦有可能透過 HISS 影響周邊組織的血糖值，但此途徑仍須設計進一步的實驗證實。由於 Atropine 是跟 ACh 競爭 ACh 接受體，能完全阻斷副交感神經突觸後的 ACh 接受體，使 ACh 無法與接受體接合產生作用。而 HC-3 則是阻斷 ACh 從突觸間隙的再回收，使前突觸神經元無法合成 ACh 進而分泌 ACh，因此當 L-NAME 與 HC-3 及 L-NAME 與 Atropine 分別同時作用可以阻斷掉電針在 ivGTT 下的效應，我們可以推測電針可能透過副交感神經的乙醯膽鹼 (ACh) 與一氧化氮合成酶 (NOS) 的協同作用，增加 HISS 物質的分泌，增加胰島素敏感度，產生降糖的效果。

實驗三中，我們觀察到會影響胰島素敏感度的 FFA 在 ivGTT 下，血中 FFA 濃度均呈現先降後昇的趨勢，意味著當體內葡萄糖濃度過高時，FFA 下降以利胰島素的降血糖作用，如圖 4.7，而電針組在幾個觀察點 FFA 平均濃度均比非電針組低。若比較電針組 0 min 與 15 min 同組的平均 FFA 值，並無顯著差異 ($p > 0.05$)，非電針組亦如此。但在 90 min 時電針組的 FFA 平均濃度比非電針組低，且有達到統計上顯著差異 ($p < 0.05$)，表示電針在 ivGTT 下也可降低血液中的 FFA 濃度，以利血糖的調降。為了探討其作用路徑，同樣同時加入 L-NAME 與 Atropine 兩種阻斷劑，電針降低 FFA 濃度的效應在 90 min 卻也消失了，如圖 4.8，進一步證實了前面的推論，電針可透過 Ach 與 NO 的協同作用，使 FFA 下降，增加胰島素敏感度，產生降糖的效果。

再透過實驗四分子生物學中的西方轉漬法，我們觀察到大鼠骨骼肌中胰島素訊息蛋白 IRS-1、PI3-Kinase、Akt1、GLUT4 及 nNOS 相對於 β -Actin 的含量比，比較兩組各個胰島素訊息蛋白相對比率，電針組均比非電針組高，可證實電針確可活化胰島素訊號傳遞系統。但只有 IRS-1 的相對含量比率兩組達到統計上差異 ($p < 0.05$)，如圖 4.9、4.10，此結果與 Simon Badal 所做實驗 NO 調控 IRS-1 增加相同⁵⁰。由於實驗設計中電針 60 min 後，即立刻取下大鼠後肢的骨骼肌，

使骨骼肌的胰島素訊號傳遞系統中訊息蛋白未達到完全被活化的階段，而無法觀察到其他訊息蛋白有明顯差異，應增長電針後的作用時間到 90 min 或更長，再行取骨骼肌樣本，應可得到較佳的結果。

因此，推測電針的胰島素增敏作用，可藉由增加胰島素訊息蛋白的活性、數量，進而達到快速降糖的作用。唯獨實驗設計的限制只能觀察到電針 60 min 後的效應，未能繼續觀察更長時間後骨骼肌中胰島素訊息蛋白的變化是為何？

在以往的實驗中透過免疫反應、組織化學、細胞分流 (cellular fractionation) 方法均能證實 nNOS 是存在許多哺乳動物的骨骼肌中，透過 NO 調節的骨骼肌功能包括產生肌力、血流控制、肌肉細胞分化、呼吸和血糖恆定 (glucose homeostasis)，其中 nNOS 參與肌肉快速收縮站重要地位⁶⁸。Nakane 等人發現 nNOS 的活性人類骨骼肌比大腦中更高⁶⁹。Kobzik 等學者卻提出 nNOS 的活性表現在大鼠腦部比肢體或橫膈膜肌肉都高⁷⁰。在 nNOS 影響胰島素分泌方面，nNOS 確實存在於胰臟的 β 細胞中⁴⁵，並且透過 NO 與一些酶參與胰島素的分泌⁴⁶⁻⁴⁸。Roy D 等人利用 hyperinsulinemic-euglycemic clamp 與 L-NAME 研究大鼠體內的 NOS 是否會影響周邊組織的葡萄糖代謝，發現藉由 NO 能增強 Insulin 作用於周邊骨骼肌組織對葡萄糖的吸收⁷¹。在我們的實驗中發現，在 ivGTT 下骨骼肌 nNOS 的含量電針組比

非電針組高，且達到統計上差異 ($p < 0.05$)，電針可使骨骼肌中 nNOS 的含量增加，與加拿大 Patrice 等學者所提出 nNOS 可使周邊血管通透性增加⁴⁹，進而調控血糖的假說相似。

故我們推論電針確實有透過 NOS 的作用，而協同副交感神經造成周邊血管的變化、擴張，加速 Insulin 的釋放與 Glucose 的轉運，增加胰島素訊息傳遞系統中訊息蛋白的活化、使 Insulin 與 IRS 的結合增加，而產生降糖的效應，增加胰島素的敏感度。



第六章 結 論

綜合以上實驗結果，我們發現電針足三里能明顯提升正常大鼠葡萄糖耐受試驗（ivGTT）的血糖下降程度，單獨使用 atropine 或 L-NAME 無法完全阻斷電針對正常大鼠的降糖作用。若同時使用兩種阻斷劑 atropine 與 L-NAME、及 HC-3 與 L-NAME 阻斷劑則可以阻斷電針對正常大鼠的降糖作用。電針足三里也能明顯降低正常大鼠葡萄糖耐量試驗中的血中游離脂肪酸的含量，而且此種電針效應會被同時使用兩種阻斷劑 atropine 和 L-NAME 所阻斷。且從骨骼肌中胰島素訊息蛋白量的變化趨勢，發現電針可以增加 IRS-1 及 nNOS 蛋白的表現，促進胰島素訊息蛋白傳遞的活化，改善胰島素的敏感度。

因此，我們推論電針改善大鼠葡萄糖耐受的機轉可能同時透過副交感神經系統的乙醯膽鹼（ACh）及一氧化氮合成酶（NOS）的作用，降低血中游離脂肪酸（FFA），來提升大鼠對葡萄糖之耐受性，增加胰島素敏感度，達到降糖的作用。

參考文獻

- ¹ 行政院衛生署：中華民國台灣地區公共衛生概況，行政院衛生署，台北 1992; 12:pp.1-56.
- ² 陳建仁：流行病學，伙伴出版公司，台北 1978; 5:pp.17-46.
- ³ 蔡世澤：台灣糖尿病照護現況與省思，臨床醫學雜誌，2000; 4: pp.316-20
- ⁴ 台大內科醫師：台大內科學講義，第二版，橘井文化，台北 1997; pp. 461.
- ⁵ 中國醫藥學院附設醫院社區醫學部：銀髮族健康照護精要，中國醫藥學院附設醫院，台中 2002; pp. 1-4.
- ⁶ Reaven GM. Role of insulin resistance in human disease. Diabetes 1988;37: 1595-607
- ⁷ Reaven GM , Law AMI. Insulin resistance:the metabolic syndrome X .humana press Inc., Totowa, NJ. 1999; pp. 146-148
- ⁸ Ford ES, Giles WH. A comparison of the prevalence of metabolic syndrome using two proposed definitions. Diabetes Care. 2003;26:575-581.
- ⁹ Chack E. Culture and therapy: Complementary strategies for the treatment of type-2 diabetes in an urban setting in kerala, india. Soc Sci Med. 2003;56:1087-1098.
- ¹⁰ Lee MS, Lee MS, Lim HJ, Moon SR. Survey of the use of complementary and alternative medicine among korean diabetes mellitus patients. Pharmacoepidemiol Drug Saf. 2004;13:167-171.
- ¹¹ Dunning T. Complementary therapies and diabetes. Complement Ther Nurs Midwifery. 2003;9:74-80.
- ¹² Argaez-Lopez N, Wachter NH, Kumate-Rodriguez J, Cruz M, Talavera J, Rivera-Arce E, Lozoya X. The use of complementary and alternative medicine therapies in type 2 diabetic patients in mexico. Diabetes Care. 2003;26:2470-2471.

-
- ¹³ 皇甫謐：針灸甲乙經卷十一(晉)，中國醫學大成(三十四)，上海科學技術出版社，上海 1990; pp. 82.
- ¹⁴ 黃維三：針灸科學，第一版，正中書局，台北 1997; pp.532.
- ¹⁵ 張世良、林昭庚、鄭瑞棠、謝慶良、鄭裕文、林榮宗：電針治療糖尿病動物模式之研究回顧。中華針灸醫學會雜誌 2004; 12: 29-31.
- ¹⁶ 張世良、林昭庚、謝慶良、張淳堆、鄭瑞棠：針灸治療糖尿病之文獻探討。中華針灸醫學會雜誌 2002; 11: 37-43.
- ¹⁷ Chang SL, Lin JG, Chi TC, Liu IM, Cheng JT. An insulin-dependent hypoglycaemia induced by electroacupuncture at the zhongwan (CV12) acupoint in diabetic rats. Diabetologia. 1999;42:250-255.
- ¹⁸ Mo X, Chen D, Ji C, Zhang J, Liu C, Zhu L. Effect of electro-acupuncture and transcutaneous electric nerve stimulation on experimental diabetes and its neuropathy. Chen Tzu Yen Chiu. 1996; 21:55-59.
- ¹⁹ Wang L. Clinical observation on acupuncture treatment in 35 cases of diabetic gastroparesis. J Tradit Chin Med. 2004;24:163-165.
- ²⁰ Chang SL, Lin KJ, Lin RT, Hung PH, Lin JG, Cheng JT. Enhanced insulin sensitivity using electroacupuncture on bilateral Zusanli acupoints (ST 36) in rats. Life sciences. 2006;79: 967-971.
- ²¹ 李鳳玲：針灸治療糖尿病的概況，中國針灸 1994; 14:pp.165-167。
- ²² 陳夢雷：古今圖書集成醫部全錄，第六冊諸疾上，人民衛生出版社北京 1991; pp. 1386-1390.
- ²³ 張隱菴：黃帝內經素問集註(清)，中國醫學大成(一)，上海科學技術出版社，上海 1990; pp. 82.
- ²⁴ 陳夢雷：古今圖書集成醫部全錄，第六冊諸疾上，人民衛生出版社北京 1991;pp. 14506-1451.
- ²⁵ 鄧良月、黃龍祥：中國針灸症治通鑑，青島出版社，青島 2004 ;1:pp. 263-266.

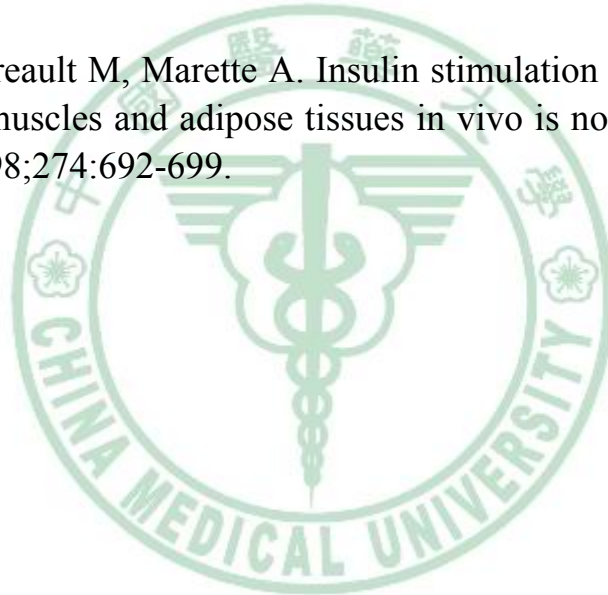
-
- ²⁶ Ganong WF. Review of medical physiology. Twentieth Ed. McGraw-Hill Book Co. 2001;pp.322-326.
- ²⁷ Guyton AC. Hall JE. Textbook of medical physiology, ninth Ed. W.B. Saunders Co. 1996;pp.855-864.
- ²⁸ Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. Harper's biochemistry, twenty fifth Ed. McGraw-Hill Book Co. 2000;pp. 190-198.
- ²⁹ Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. Harper's biochemistry, twenty fifth Ed. McGraw-Hill Book Co. 2000;pp. 268-271.
- ³⁰ 陳國榮，陳碧華，牛亞蕾，李文欽，吳肇鑫，蕭志賢：華盛頓內科學手冊，合記，台北 民 90； PP397-398
- ³¹ Sievenpiper JL, Leiter LA, Vuksan V. Intrasubject coefficient of variation corresponds to diagnostic reproducibility in diabetes screening. Can T Diabetes. 2002;26:105-112.
- ³² Shaw JE, de Courten M, Boyko EJ, Zimmet PZ. Impact of new diagnostic criteria for diabetes on different populations. Diabetes Care. 1999;35:62-67.
- ³³ Lyon AW, Larsed ET, Edwards AL. The impact of new guidelines for glucose tolerance testing on clinical practice and laboratory services. CMAJ, 2004;171:1067-1069.
- ³⁴ Ganong WF. Review of medical physiology. Twentieth Ed. McGraw-Hill Book Co. 2001;pp.330-343.
- ³⁵ Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. Nature. 2001;414:799-806.
- ³⁶ 林榮宗，張世良：電針改善類固醇誘導胰島素阻抗大鼠之研究，中國醫藥大學中西醫結合研究所碩士論文，2005。
- ³⁷ Ganong WF. Review of medical physiology. Twentieth Ed. McGraw-Hill Book Co. 2001; pp. 290-302.

-
- ³⁸ Timothy O, Tu TN, Zimmerman BR. Hyperlipidemia and Diabetes Mellitus. *Mayo Clinic Proceedings* 1998;73:969-976.
- ³⁹ Paolisso G, Gambardella A, Amato L, Tortoriello R, D'Amore A, Varricchio M, D'Onofrio F. Opposite effects of short-and long-term fatty acid infusion on insulin secretion in healthy subject. *Diabetologia*. 1995;38:1295-1299.
- ⁴⁰ Ritz-Laser B, Meda P, Constant I, Klages N, Carollais A, Morales A, Magnan C, Ktorza A, Philippe J. Glucose-induced preproinsulin gene expression is inhibited by the free fatty acid palmitate. *Endocrinology* 1999;140:4005-4014.
- ⁴¹ Lupi R, Dotta F, Marselli L, Guerra SD, Masini M, Santangelo C, Atane G, Boggi U, Piro S, Anello M, Bergamini E, Mosca F, Mario UD, Prato SD, Marchetti P. Prolonged exposure to free fatty acids has cytostatic and pro-apoptotic effects on human pancreatic islets. Evidence that β -cell death is caspase mediated, partially dependent on ceramide pathway, and Bcl-2 regulated. *Diabetes* 2002;51:1437-1442.
- ⁴² Boden G. Fatty acid-induced inflammation and insulin resistance in skeletal muscle and liver. *Curr Diab Rep*. 2006;6:177-181.
- ⁴³ 李德茂、林榮宗、白惠菁、邱瑞發、張晉賢、洪培修、林昭庚、鄭瑞棠、張世良：電針對胰島素敏感度之影響。中華針灸醫學會雜誌 2006; 12:33-41.
- ⁴⁴ Lajoix AD, Reggio H, Charde T, Sylvie PR, Tribillac F, Roye M, Dietz S, Broca C, Manteghetti M, Ribes G, Wollheim CB, Gross R. A neuronal isoform of nitric oxide synthase expressed in pancreatic β -cell controls insulin secretion. *Diabetes*. 2001;50:1311-1323.
- ⁴⁵ Nakada S, Ishikawa T, Yamamoto Y, Kaneko Y, Nakayama K. Constitutive nitric oxide synthases in rat pancreatic islets: direct imaging of glucose-induced nitric oxide production in β -cells. *Pflugers Arch - Eur J Physiol*. 2003;447: 305–311.
- ⁴⁶ Lajoix AD et al. Changes in the dimeric state of neuronal Nitric Oxide Synthase affect the kinetics of secretagogue induced insulin response. *Diabetes*. 2004;53:1467-1474.

-
- ⁴⁷ Novelli M, Pocai A, Lajoix AD, Beffy P, Bezzi D, Marchetti P, Gross R, Masiello P. Alteration of β -cell constitutive NO synthase activity is involved in the abnormal insulin response to arginine in a new rat model of type 2 diabetes. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2004; 219:77–82.
- ⁴⁸ Simon R, Smukler, Lan T, Michael B, Wheeler, Anne-Marie F, Salapatek. Exogenous Nitric Oxide and Endogenous Glucose Stimulated Cell Nitric Oxide Augment Insulin Release. *Diabetes*. 2002; 51: 3450–3460.
- ⁴⁹ Patrice Dallaire , André Marette, Obesity-linked Insulin Resistance: Is Nitric Oxide the Missing Link? *Canadian Journal of Diabetes*. 2004; 28:59-60.
- ⁵⁰ Simone Badal, Brown P.D, Dalip R. Nitric oxide agents impair insulin-mediated signal transduction in rat skeletal muscle. *BMC biochemistry*. 2006;7:17-25.
- ⁵¹ Lee WK, Kao ST, Liu IM, Cheng JT. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 2006; 1: P27–32.
- ⁵² Sadri P, Lutt WW. Blockade of nitric oxide production in the Liver causes insulin resistance. *Proc West. Pharmacol. Soc*. 1998; 41: 37-38.
- ⁵³ Guarino MP, Correia NC, Lutt WW, Macedo MP. Insulin sensitivity is mediated by the activation of the ACh/NO/cGMP pathway in rat liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2004; 287: 527-532.
- ⁵⁴ Zhao X. Effect of HC-3 on electroacupuncture induced immunoregulation. *Zhen Ci Yan Jiu*. 1995;20:59-62.
- ⁵⁵ Hsieh CL, Lin JG, Li TC, Chang QY. Changes of pulse rate and skin temperature evoked by electroacupuncture stimulation with different frequency on both zusanli acupoints in humans. *The American Journal of Chinese Medicine*. 1999;27:11-18.
- ⁵⁶ Wang H, Wang CY, Zhang JS, Sun L, Sun JP, Tian QH, Jin XL, Yin L. Acupuncture therapy for experimental stomach ulcer and c-fos expression in rats. *World J Gastroenterol*. 2005;11:5517-5520.

-
- ⁵⁷ Iwa M, Matsushima M, Nakade Y, Pappas TN, Fujimiya M, Takahashi T. Electroacupuncture at st-36 accelerates colonic motility and transit in freely moving conscious rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2006;290:G285-292.
- ⁵⁸ Yang R, Huang ZN, Cheng JS. Anticonvulsion effect of acupuncture might be related to the decrease of neuronal and inducible nitric oxide synthases. *Acupunct Electrother Res.* 2000;25:137-143.
- ⁵⁹ Hou LQ, Xiong KR. [effect of different needle-retained time of electroacupuncture on expression of nitric oxide synthase in the septum of the rat]. *Zhongguo Zhen Jiu.* 2006;26:879-882.
- ⁶⁰ Kim EH, Park HJ, Lee H, Seo JC, Hong M, Park HK, Jang MH, Kim CJ, Ha E, Lee H, Kang S, Choi S, Ryu Y, Chung JH. Analgesic effects by electroacupuncture were decreased in inducible nitric oxide synthase knockout mice. *Neurol Res.* 2007;29:S28-31.
- ⁶¹ Xiong K, Li H, Wang T. Origin of nitric oxide synthase positive nerve fibers at zusanli area in rats. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi.* 1998;18: 230-232.
- ⁶² Jang MH, Shin MC, Lim BV, Kim HB, Kim YP, Kim EH, Kim H, Shin MS, Kim SS. Acupuncture Increases Nitric Oxide Synthase Expression in Hippocampus of Streptozotocin-induced Diabetic Rats. *The American Journal of Chinese Medicine.* 2003;31:305–313.
- ⁶³ Sun JP, Pei HT, Jin XL, Yin L, Tian QH, Tian SJ. Effects of acupuncturing Tsusanli (ST36) on expression of nitric oxide synthase in hypothalamus and adrenal gland in rats with cold stress ulcer. *World Journal of Gastroenterology.* 2005;11:4962-4966.
- ⁶⁴ Romita VV, Yashpal K, Hui-Chan CW, Henry JL. Intense peripheral electrical stimulation evokes brief and persistent inhibition of the nociceptive tail withdrawal reflex in the rat. *Brain Res.* 1997;761:192-202.
- ⁶⁵ Busnardo AC, DiDio LJ, Tidrick RT, Thomford NR. History of the pancreas. *Am J Surg.* 1983;146:539-550.
- ⁶⁶ Ryan AS. Insulin resistance with aging: effects of diet and exercise. *Sports Med.* 2000;30:327-346.

-
- ⁶⁷ Chang SL, Tsai CC, Lin JG, Hsieh CL, Lin RT, Cheng JT. Involvement of serotonin in the hypoglycemic response to 2 Hz electroacupuncture of zusanli acupoint (ST36) in rats. *Neurosci Lett*. 2005;379:69-73.
- ⁶⁸ Stamler JS, Meissner G. Physiology of nitric oxide in skeletal muscle. *Physiol Rev*. 2001;81:209-237.
- ⁶⁹ Nakane M, Schmidt HH, Pollock JS, Forstermann U, Murad F. Cloned human brain nitric oxide synthase is highly expressed in skeletal muscle. *FEBS Lett*. 1993;316:175-180.
- ⁷⁰ Kobzik L, Reid MB, Bredt DS, Stamler JS. Nitric oxide in skeletal muscle. *Nature*. 1994;372:546-548.
- ⁷¹ Roy D, Perreault M, Marette A. Insulin stimulation of glucose uptake in skeletal muscles and adipose tissues in vivo is no dependent. *Am J Physiol*. 1998;274:692-699.



English Abstract

Investigation of the mechanisms for improvement of Glucose tolerance in rats by electroacupuncture

The purpose of this investigation is to evaluate the effect and mechanisms of electroacupuncture (EA) at the bilateral zusanli acupoint (ST-36) on glucose intolerance in normal wistar rats.

The male wistar rats are applied in this test, The intravenous glucose tolerance test (ivGTT) is carried out to compare the glucose tolerance of normal rats. The parasympathetic inhibitor, atropine, HC-3 blocks the parasympathetic activity and nitric oxide synthase (NOS) antagonists, *NG*-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) inhibit the release of nitric oxide (NO) in rats. Both of them have been treated for blocking the effect of EA in this test. After fasting for 12 hrs, then the rats are took the ivGTT. The experimental group (EG) is proceeded the EA on bilateral Zusanli acupoint (ST-36), and then carried out with the frequency, 15Hz and a fixed intensity of 10 mA for 60 min; the control group (CG) is not proceeded the EA. At the time 0, 15, 30, 60, 90 min

later plasma glucose levels and FFA levels were obtained for assaying. Further, the atropine and L-NAME have been injected to Wistar rats alone or simultaneously, that is performed to investigate the difference of plasma glucose levels between these two groups. The western blot assay is also applied to realize the activity of skeletal muscle insulin signaling protein (IRS-1、PI3-Kinase、Akt1 and GLUT4) and nNOS to exam the correlation to EA improving glucose tolerance.

According to the results, we suggested this EA is significantly lowered the plasma glucose levels more than CG does under intravenous glucose tolerance test (ivGTT). When the L-NAME、atropine or HC-3 treated animal alone, the plasma glucose level still has difference between EG and CG. But, L-NAME and atropine, HC-3 and L-NAME combined treatment in ivGTT, there are no significant difference levels of plasma glucose. Also, this EA decreased FFA level and enhancing the skeletal muscle insulin signaling protein IRS-1 and nNOS activity under ivGTT.

Taken together, we concluded this EA at zusanli acupoint significantly can lower plasma glucose levels of normal Wistar rats under ivGTT. Therefore, the action of EA can through parasympathetic system and NO release via lowering the plasma FFA to enhance glucose

tolerance. Further, that may activate insulin signaling protein IRS1 and enhancing nNOS activity to improve the glucose tolerance .

Keywords: electroacupuncture, glucose tolerance test, parasympathetic nerve, nitric oxide, free fatty acid, insulin signaling protein.



謝 辭

僅以此文感謝中國醫藥大學研究計劃 (CMU95-115) 及嘉義基督教醫院研究計畫 (R96-2) 提供之經費，更要感謝張世良老師孜孜不倦的教導及其研究助理團隊陳瑛宜與古欣平小姐細心的提供實驗技術指導及協助，使本研究能順利完成。

更感謝內人富琳與家人在繁忙工作、課業的背後全力支持，及嘉義基督教中醫部主任陳明和學長及醫師同事們的幫助，使整個研究學習過程能一切順利。最後要感謝蘇貫中老師與陳榮洲老師在中醫的啟蒙與鼓勵。

