

基于Cajal间质细胞探讨电针对逼尿肌反射亢进型神经源性膀胱大鼠的作用机制

李炆^{1,2}, 张润宁^{1,2}, 张保平², 丁天红²

【摘要】 目的:观察经电针治疗后的逼尿肌反射亢进型神经源性膀胱大鼠的膀胱功能变化,并基于Cajal间质细胞(ICC)探索该治疗方法的作用机制。方法:健康成年雌性SD大鼠40只,按照随机数字表法分为对照组、假手术组、模型组、电针组每组各10只。假手术组在T10水平只暴露脊髓,不离断;模型组、电针组大鼠在T10水平完全横断脊髓制作神经源性膀胱大鼠模型。待大鼠渡过脊休克期后,电针组给予电针次髂穴治疗,1次/d,连续14天。电针14天后测尿流动力学,观察各组大鼠膀胱功能的变化;然后处死大鼠,蛋白质印迹法检测膀胱组织C-kit蛋白的表达;免疫荧光分析ICC数量变化。结果:模型组和电针组膀胱最大容量及膀胱顺应性较对照组和假手术组降低($P<0.05$),膀胱基础压力和漏尿点压力较之增加($P<0.05$);电针组的膀胱最大容量、膀胱顺应性较模型组增加($P<0.05$),膀胱基础压与漏点压较之降低($P<0.05$);模型组和电针组膀胱C-kit蛋白表达较对照组和假手术组升高($P<0.01$),ICC数量增加($P<0.01$);与模型组比较,电针组膀胱C-kit蛋白表达降低($P<0.01$),ICC数量减少($P<0.01$)。结论:电针次髂穴对逼尿肌反射亢进型神经源性膀胱有显著疗效,其机制之一可能为通过抑制C-kit表达,减少ICC数量,从而减少膀胱逼尿肌无抑制收缩。

【关键词】 脊髓损伤;神经源性膀胱;电针;ICC;C-kit

【中图分类号】 R49;R694 **【DOI】** 10.3870/zgkf.2019.04.001

Action mechanism of electroacupuncture on detrusor hyperreflexic neurogenic bladder in rats LI Yang, Zhang Run-ning, Zhang Baoping, et al. Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712000, China

【Abstract】 Objective: To observe the changes of bladder function in rats with neurogenic bladder with detrusor hyperreflexia after electroacupuncture treatment, and to explore the mechanism of this treatment based on interstitial cells of Cajal(ICC). Methods: Forty healthy adult female SD rats were randomly divided into control group, sham operation group, model group, and electroacupuncture group with 10 rats in each group. The sham operation group exposed only the spinal cord at the T10 level which was not disconnected. The spinal cord at the T10 level in the model group and the electroacupuncture group was completely transected to make a rat model of neurogenic bladder. After the rats passed through the spinal shock phase, the electroacupuncture group was electroacupunctured on Ciliao, once a day for 14 consecutive days. Urinary flow dynamic parameters were measured 14 days after electroacupuncture and the changes of bladder function were observed. Rats were then sacrificed, and the expression of C-kit protein in bladder tissue was detected by Western blotting. The number of ICC was analyzed by immunofluorescence. Results: The maximum bladder capacity and bladder compliance in the model group and the electroacupuncture group were significantly reduced ($P<0.05$), and the bladder base pressure and the leakage point pressure were increased as compared with those in the control group and the sham operation group (all $P<0.05$). The maximum bladder capacity and bladder compliance in the electroacupuncture group increased ($P<0.05$), and the bladder basal pressure and leakage point pressure decreased ($P<0.05$) as compared with the model group. The expression of bladder C-kit protein and the number of ICC in the model group and electroacupuncture group were significantly increased as compared with those in the control group and sham operation ($P<0.01$). As compared with the model

group, the expression of C-kit protein in the bladder and the number of ICC were significantly reduced in the electroacupuncture group ($P<0.01$). Conclusion: Electroacupuncture at the time of acupoints has a significant effect on detrusor hyperreflexia neurogenic bladder, probably by inhibiting the expression of C-KIT and

基金项目:陕西省中医管理局(2017 中医管理局 JCPT040)

收稿日期:2018-06-14

作者单位:1. 陕西中医药大学, 陕西咸阳 712000; 2. 陕西中医药大学第二附属医院针灸康复科, 陕西咸阳 712000

作者简介:李炆(1986-),男,硕士研究生,主要从事神经康复的基础及临床方面的研究。

通讯作者:张润宁(1973-),xyzrn2000@163.com

reducing the number of ICC, thereby decreasing the contractile contraction of the bladder detrusor.

【Key words】 spinal cord injury; neurogenic bladder; electroacupuncture; interstitial cells of cajal; C-KIT; rats

正常的排尿过程受交感神经、副交感神经、躯体神经系统的控制,由于神经损伤或疾病扰乱正常的排尿过程而引发的疾病称为神经源性膀胱(Neurogenic bladder, NGB)^[1]。在脊髓损伤患者中,排尿功能障碍非常普遍,绝大多数伤者在伤后一年内都有不同程度的泌尿系统功能障碍,其中不足1%的患者能完全康复^[2]。神经源性膀胱的康复治疗中,针灸已经成为主要手段,且具有疗效显著、安全性高、易被患者接受的特点,在临床上广泛应用。有研究发现Cajal间质细胞(interstitial cells of Cajal, ICC)上的C-kit信号通路可能与脊髓损伤后神经源性膀胱发病相关^[3]。许明等^[4]研究表明电针能减轻脊髓继发性损伤,保护支配膀胱的神经而改善膀胱功能。本研究进一步研究了电针是否通过作用于膀胱ICC而治疗NGB,探讨其作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料 ①实验动物与分组:40只健康成年雌性SD大鼠购自西安交通大学动物实验中心。许可证编号:SCXK(陕)2012-003。体质量220~250g,饲养1周待大鼠适应环境,随机分为假手术组、对照组、模型组、电针组各10只。②主要试剂与仪器:华佗牌针灸针,电针仪,四通道多功能生理信号放大器,微量灌注泵,激光共聚焦显微镜(德国LEICA公司),羊抗鼠c-kit抗体(Santa Cruz生物技术),兔抗羊二抗(中山公司,中国北京),辣根过氧化物酶标记的兔抗羊二抗(武汉谷歌生物),DAPI(武汉谷歌生物),PVDF膜(millipore),BCA蛋白定量检测试剂盒(武汉谷歌生物)等。

1.2 方法 ①造模方法:除对照组外的所有大鼠通过注射10%水合氯醛(300mg/kg)腹膜内诱导全身麻醉。大鼠肋平T13,故以T13作为体表定位标志,骶髓上损伤的脊髓节段为T10~L2(对应脊柱T8~T12节段),本实验统一手术位置为T10。备皮,逐层切开右侧皮肤及皮下组织,切口约1~2cm,找到并咬开关节突,暴露脊髓,假手术组不离断脊髓,而电针、模型组快速切断,为确保脊髓纤维完全断开,在两断端之间填塞凝胶海绵,逐层缝合肌肉、筋膜、皮肤。术后保暖,至麻醉苏醒后放大笼中单笼饲养。脊髓横断后脊休克期Crede手法辅助排尿(3次/日);10ml生理盐水腹腔注射,每日1次,防止脱水;腹腔注射庆大霉素(2mg/kg)预防感染,1次/d,连续7d。若脊髓横断后双后肢有自

主活动,术后无尿潴留即出现自主排尿,自噬或死亡,则排除。②干预措施:术后10~14d大鼠渡过脊休克期,于第14天给予电针治疗。腧穴定位,次髂^[5];第2、3骶骨的棘突间隙正中偏上处旁开5~10mm,直刺15mm。将经过手法排尿后的大鼠置于自制简易电针治疗辅助装置,1.5寸毫针刺入双侧“次髂穴”,深度约为15mm,直至刺入骶2神经孔;电针仪两个电极分别连接在两侧“次髂穴”的针灸针上,设定为疏密波(密波20Hz,疏波4Hz),刺激强度以肢体不发生颤动为度。电针时间15min,连续14d,每天1次。其余3组放置于简易装置内15min,不行电针治疗。

1.3 检测项目 ①尿流动力学测定:电针治疗14d后行尿流动力学检测,用10%水合氯醛300mg/kg腹膜诱导麻醉,手法排空膀胱,借助石蜡油将硬膜外导管经尿道轻导入大鼠膀胱,通过三通管将导好的尿管、微量注射泵、尿流动力学分析仪连接,以0.2ml/min的速率进行输注温盐水(37℃~38℃)进行膀胱测压。并记录膀胱压力和收缩频率曲线。②Western blotting:取大约100mg膀胱壁组织,切碎,均质化和解离进入放射性免疫沉淀测定裂解缓冲液中,4℃30min。4℃,12kg,离心5min,收集上清液并用作总蛋白质。取上清液2ul,用BCA法进行蛋白定量。蛋白质通过SDS-PAGE电泳并转移到PVDF膜,封闭1h,加入羊抗鼠c-kit抗体(1:200, Santa Cruz Biotechnology),在4℃孵育过夜。洗涤3次,后加辣根过氧化物酶标记的二抗,室温下孵育30min后,洗涤3次。ECL成像和Alpha软件系统用于处理目标带的光密度值。③免疫荧光:切下的膀胱壁组织用4%多聚甲醛固定,将固定的组织切成小块,冷冻保存,切片(5mm),然后与山羊抗鼠c-kit抗体(1:100稀释)一起温育2h。洗去未结合的一抗,将切片稍微干燥,加入兔抗羊二抗(1:200稀释)室温避光孵育50min。洗涤,DAPI染液进行核染色,黑暗下室温孵育10min。清洗切片,封片。标本成像使用激光共聚焦显微镜观察,每个标本随机选取3个视野,用Image-Pro Plus 6.0图像处理软件分析,计算每个视野ICC数量。

1.4 统计学分析 使用SPSS 23.0统计软件进行统计分析。所测数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较应用单因素方差分析,组间均数比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况 术后1只自噬,1只后肢有自主运

动,均不纳入实验。造模后 14d 有 18 只大鼠符合模型要求。模型组、电针组较对照组、假手术组排尿次数增加(笼内垫料更潮湿,且会阴部皮毛长时间处于潮湿状态),饮食减少,体重下降。

2.2 尿流动力学检测 与对照组和假手术组比较,模型组和电针组膀胱最大容量及膀胱顺应性均降低($P<0.05$),膀胱基础压力和漏尿点压力增加($P<0.05$)。与模型组比较,电针组的膀胱最大容量及膀胱顺应性明显增加($P<0.05$),膀胱基础压力和漏尿点压力降低($P<0.05$)。对照组与假手术组各项无显著性差异。见表 1。

表 1 尿流动力学检测结果

组别	n	$\bar{x} \pm s$			
		膀胱最大容量 (ml)	膀胱基础压力 (cmH ₂ O)	漏尿点压力 (cmH ₂ O)	膀胱顺应性 (ml/cmH ₂ O)
对照组	10	2.18±0.20	20.96±1.85	33.74±2.79	0.33±0.10
假手术组	10	2.02±0.22	22.09±2.63	36.05±2.17	0.27±0.10
模型组	9	0.97±0.22 ^a	29.14±4.22 ^a	46.11±2.99 ^a	0.16±0.03 ^a
电针组	9	1.34±0.24 ^{ab}	24.55±2.98 ^{ab}	40.45±3.58 ^{ab}	0.23±0.06 ^{ab}

与对照组和假手术组比较,^a $P<0.05$ 。与模型组比较,^b $P<0.05$

2.3 C-kit 蛋白的表达 对照组 C-kit 蛋白相对表达量为(0.38±0.19),假手术组为(0.37±0.16),模型组为(0.86±0.06),电针组为(0.68±0.14),组间差异有统计学意义($F=23.99, P<0.01$);其中,模型组较对照组 C-kit 蛋白相对表达量增高($t=-7.43, P<0.01$);电针组较模型组 C-kit 蛋白相对表达量降低($t=3.48, P<0.01$),见图 1。

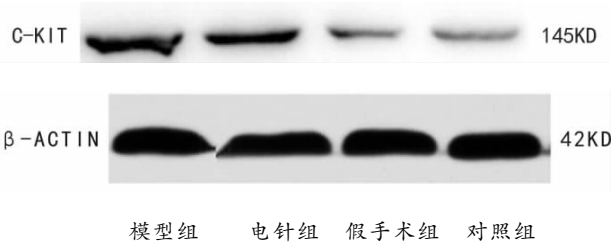


图 1 4 组 C-kit 蛋白的表达

2.4 膀胱 ICC 数量 镜下观察到的 ICC 如图 2 所示。对照组膀胱 ICC 数量为(3.3±0.9),假手术组为(4.1±1.2),模型组为(9.0±2.0),治疗组为(6.0±1.2),组间差异有统计学意义($F=30.61, P<0.01$);其中模型组较对照组增多($t=7.58, P<0.01$),治疗组较模型组减少($t=3.82, P<0.01$)。

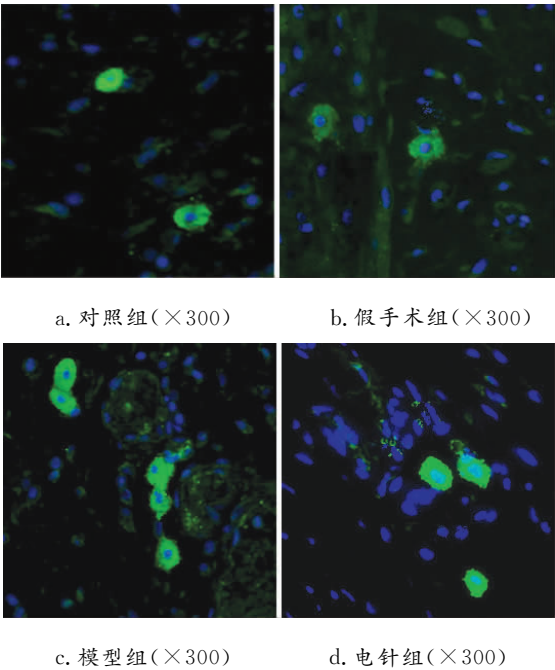


图 2 a~d 4 组膀胱 ICC 数量

3 讨论

祖国医学认为脊髓损伤后尿失禁相当于“遗溺”“小便不禁”范畴,《素问·灵兰秘典论》云:“膀胱者,州都之官,津液藏焉,气化则能出矣,故“遗溺”原因多是膀胱气化不利所致。次髎穴属膀胱经,进行电针干预调节膀胱气化功能而达到治疗“遗溺”的目的。现代医学认为急性骶上脊髓损伤最初伴随着脊髓休克^[6,18],在此期间膀胱是无反射的,数周后出现脊髓反射通路,导致逼尿肌过度活动和潜在的逼尿肌-括约肌协同失调。大鼠交感神经的低级中枢在脊髓 L1~L2 节段,副交感神经和躯体神经的低级中枢均在脊髓 L6~S1 节段^[7-8]。研究表明电刺激 L6 腹侧根在产生逼尿肌收缩方面最有效,而 S1 背根最能抑制排尿反射^[19]。骶神经调节的动物实验研究表明将电刺激导管置于 S1、S2、S3 孔可以治疗大鼠膀胱功能障碍^[9-10],电针 S2 孔的次髎穴其直接作用是刺激骶神经调节排尿反射而改善膀胱功能^[11]。实验中,电针组的膀胱最大容量及膀胱顺应性较模型组增加,膀胱基础压力和漏尿点压力降。表明电针次髎穴对神经源性膀胱的疗效是确切的,但是下游机制还需进一步探讨。

ICC 是在人体具有蠕动活性器官中发现的起搏细胞,它们可以在神经信号传输至平滑肌细胞的过程中起到起搏器或中间体的作用^[12]。一些研究表明 ICCs 广泛分布于动物尿道^[13,14],虽然胃肠和膀胱 ICC 似乎具有相同的形态和受体表达,但他们的功能不同。C-kit 是酪氨酸激酶受体蛋白家族的重要成员之一,是一种跨膜蛋白,是 ICC 的特异性标志物。c-kit 蛋白及其

配体干细胞因子(stem cell factor, SCF)构成 C-kit/SCF 信号系统与 ICCs 的增殖、分化和维持密切相关, 阻断 c-kit 受体可降低逼尿肌平滑肌的自发兴奋性及离子通道活性, 且可观察到 ICC 的数量可逆地减少^[3,15,17]。我们观察到模型组 c-kit 蛋白相对表达量增多、ICC 数量增多, 膀胱出现无抑制收缩; 电针治疗后电针组 ICC 数量、c-kit 蛋白相对表达量较模型组下降, 膀胱功能得到改善。说明膀胱的不同功能状态可能与 ICC 数量及 c-kit 蛋白表达的变化有关, 这与其他实验结果一致^[3,16]。因此, C-kit 的表达与 ICC 数量变化密切相关, 至于 C-kit 蛋白的表达是如何变化的, 其机制是什么, 尚需实验研究进一步证实。

综上, 我们认为电针次髎穴治疗神经源性膀胱其作用机制之一可能是通过抑制 C-kit 表达, 减少 ICC 数量而减少了逼尿肌兴奋的启动来源, 降低逼尿肌的兴奋性, 减少膀胱的无抑制收缩。至于是如何降低 ICC 数量及 c-kit 蛋白表达, 通过何种方式降低, 其作用机制还需进一步的实验研究。

【参考文献】

- [1] Jaggi A, Fatoye F. Real world treatment patterns in the neurogenic bladder population: a systematic literature review: [J]. *Translational Andrology & Urology*, 2017, 6(6):1175-1183.
- [2] Goldmark E, Niver B, Ginsberg D A. Neurogenic bladder: from diagnosis to management[J]. *Current Urology Reports*, 2014, 15(10):448-455.
- [3] Deng J, Zhang Y, Wang L, et al. The effects of Glivec on the urinary bladder excitation of rats with suprasacral or sacral spinal cord transection. [J]. *Journal of Surgical Research*, 2013, 183(2):598-605.
- [4] 许明, 张泓, 刘继生, 等. 电针对完全性脊髓损伤后神经源性膀胱大鼠脊髓组织中 Caspase-9、细胞色素 C 及凋亡蛋白酶激活因子-1 表达的影响[J]. *中国康复理论与实践*, 2017, 23(6):628-633.
- [5] 于金娜, 刘志顺, 马晓晶, 等. 大鼠“次髎”穴的定位和解剖结构[J]. *针刺研究*, 2007, 32(5):334-334.
- [6] Frias B, Santos J, Morgado M, et al. The role of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the development of neurogenic detrusor overactivity (NDO). [J]. *Journal of Neuroscience the Official Journal of the Society for Neuroscience*, 2015, 35(5):2146-2151.
- [7] Abud E M, Ichiyama R M, Havton L A, et al. Spinal stimulation of the upper lumbar spinal cord modulates urethral sphincter activity in rats after spinal cord injury. [J]. *American Journal of Physiology Renal Physiology*, 2015, 308(9):1032-1040.
- [8] Inskip J A, Ramer L M, Ramer M S, et al. Autonomic assessment of animals with spinal cord injury: tools, techniques and translation. [J]. *Spinal Cord*, 2009, 47(1):2-35.
- [9] Hyun S J, Lee C H, Ji W K, et al. Comparative Analysis Between Thoracic Spinal Cord and Sacral Neuromodulation in a Rat Spinal Cord Injury Model: A Preliminary Report of a Rat Spinal Cord Stimulation Model[J]. *Korean Journal of Spine*, 2013, 10(1):14-20.
- [10] Shi P, Fang Y, Yu H. Bladder response to acute sacral neuromodulation while treating rats in different phases of complete spinal cord injury: a preliminary study[J]. *International Brazilian Journal of Urology Official Journal of the Brazilian Society of Urology*, 2015, 41(6):1194-1201.
- [11] Ping S, Xueyan Zhao M S, Jinwu Wang M D, et al. Effects of Acute Sacral Neuromodulation on Bladder Reflex in Complete Spinal Cord Injury Rats[J]. *Neuromodulation*, 1900, 16(6):583-589.
- [12] McCloskey KD, Gurney AM. Kit positive cells in the guinea pig bladder. [J]. *The Journal of Urology*, 2002, 168(2):832-836.
- [13] Ross A, Davidso N, Karen D, et al. Morphology and localization of interstitial cells in the guinea pig bladder: structural relationships with smooth muscle and neurons. [J]. *The Journal of Urology*, 2005, 173(4):1385-1390.
- [14] Piasecznapiotrowska A, Dzieciecka M, Samolewicz E, et al. Distribution of interstitial cells of Cajal in the neurogenic urinary bladder of children with myelomeningocele. [J]. *Advances in Medical Sciences*, 2013, 58(2):388-393.
- [15] Ren K, Yong C, Yuan H, et al. TNF- α inhibits SCF, ghrelin, and substance P expressions through the NF- κ B pathway activation in interstitial cells of Cajal[J]. *Brazilian Journal of Medical & Biological Research*, 2018, 51(6):7065-7073.
- [16] Mccloskey K D. Bladder interstitial cells: an updated review of current knowledge[J]. *Acta Physiologica*, 2012, 207(1):7-15.
- [17] Zhu Y, Yang Y, Guo J, et al. Abdominal Manual Therapy Repairs Interstitial Cells of Cajal and Increases Colonic c-Kit Expression When Treating Bowel Dysfunction after Spinal Cord Injury [J]. *Biomed Research International*, 2017, 2017(3):1-11.
- [18] Biarreau X, Przydacz M, Aharony S, et al. Early Fesoterodine Fumarate Administration Prevents Neurogenic Detrusor Overactivity in a Spinal Cord Transected Rat Model: [J]. *Plos One*, 2017, 12(1):1690-1694.
- [19] Ni J, Wang X, Cao N, et al. Efficacy of different spinal nerve roots for neuromodulation of micturition reflex in rats[J]. *Oncotarget*, 2018, 9(17):13382-13389.