

电针刺激对脊髓损伤排尿障碍大鼠膀胱 c-Kit 表达的双向调控作用

朱毅¹ 杨雨洁² 邵清华³ 倪琰⁴ 郭佳宝⁵ 程洁⁶

¹郑州大学第五附属医院肌肉骨骼疼痛康复科, 郑州 450052; ²香港城市大学生物医学系, 香港 999077; ³南京中医药大学附属中西医结合医院(江苏省中西医结合医院)针灸科, 南京 210028; ⁴南京中医药大学中医学院·中西医结合学院, 南京 210023; ⁵徐州医科大学, 第二临床医学院, 徐州 221004; ⁶南京中医药大学针灸推拿学院·养生康复学院, 南京 210023
通信作者:程洁, Email: grace@njucm.edu.cn

【摘要】 目的 观察电针对不同平面脊髓损伤排尿障碍大鼠尿动力学及膀胱 c-Kit 的调控作用。**方法** 将 SD 雌性大鼠分别制作胸髓和骶髓全横断脊髓损伤模型。于实验第 22 天将造模成功并进入脊髓损伤后期的大鼠按随机数字表分为胸髓损伤组、胸髓损伤电针组、骶髓损伤组、骶髓损伤电针组, 每组取 10 只, 并与 10 只假手术组对照。2 个电针组均取关元、三阴交穴位电针刺激, 每日 15 min, 共 14 d。干预结束后, 对各组大鼠进行尿动力学检测, 采用 HE 染色观察膀胱形态学改变, 采用 Real-time qPCR 和 Western Blotting 检测膀胱 c-Kit 的表达。**结果** 与假手术组比较, 胸髓损伤组膀胱容量及顺应性均明显降低, 残余尿量明显增加 ($P<0.05$), 骶髓损伤组的残余尿量、膀胱容量及顺应性均明显增加 ($P<0.05$), 且 2 组膀胱的组织形态也发生了异常改变。胸髓损伤组大鼠的膀胱 c-Kit mRNA 和蛋白表达均明显升高 ($P<0.05$), 骶髓损伤组则明显降低 ($P<0.05$)。分别与 2 个造模组比较, 电针干预增加了胸髓损伤大鼠的膀胱容量和顺应性 ($P<0.05$), 电针干预还降低了骶髓损伤大鼠的残余尿量、膀胱容量和顺应性 ($P<0.05$), 改善了膀胱的组织形态结构; 并使胸髓损伤大鼠膀胱 c-Kit mRNA 及蛋白表达均明显降低 ($P<0.05$), 骶髓损伤大鼠则明显升高 ($P<0.05$)。**结论** 电针对膀胱 c-Kit 的良性双向调控作用, 可能是其改善不同平面脊髓损伤尿失禁及尿潴留的效应机制。

【关键词】 脊髓损伤; 膀胱; 电针

基金项目:国家自然科学基金(81403477, 81860875)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2022.05.002

Electroacupuncture can alter bladder c-Kit expression in rats with urination disorders after a spinal cord injury

Zhu Yi¹, Yang Yujie², Shao Qinghua³, Ni Ying⁴, Guo Jiabao⁵, Cheng Jie⁶

¹Department of Pain and Musculoskeletal Rehabilitation, the Fifth Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China; ²Department of Biomedical Sciences, City University of Hong Kong, Kowloon 999077, China; ³Affiliated Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210028, China; ⁴School of Traditional Chinese Medicine & Integrated Chinese and Western Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China; ⁵The Second Clinical Medical School, Xuzhou Medical University, Xuzhou 221004, China; ⁶School of Acupuncture and Tuina, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

Corresponding author: Cheng Jie, Email: grace@njucm.edu.cn

【Abstract】 Objective To observe any effects of electroacupuncture (EA) on urodynamics and bladder c-Kit expression in rats with urination disorders after spinal cord injury (SCI). **Methods** Complete spinal cord injury models were created in female Sprague-Dawley rats by transecting the spine at the thoracic or sacral level. On day 22 after the injury, the rats with successful modeling were randomized into a thoracic spinal cord injury (TSCI) group, a TSCI+EA group, a sacral spinal cord injury (SSCI) group and an SSCI+EA group, each of 10. Both EA groups were given 15 minutes of EA at the Guanyuan (CV4) and Sanyinjiao (SP6) points daily for 14 days. After the intervention, urination function was evaluated using bladder volume, compliance and residual urine volume. Hematoxylin and eosin staining was used to observe any morphological changes in bladder tissues. The gene and protein expression of c-Kit in bladder tissues were detected using real-time quantitative polymerase chain reactions and western blotting. **Results** Compared with the sham group, the bladder volume and compliance of the TSCI group decreased signifi-

cantly, while the average residual urine volume increased significantly. In the SSCI group the average residual urine volume, bladder volume and compliance all increased significantly. The modeling altered the morphology of the bladder in all of the SCI rats. The average expression of c-Kit mRNA and protein increased significantly in TSCI group, but both decreased significantly in the SSCI group. EA improved the histological structure of the SCI rats' bladders.

Conclusions EA can bi-directionally regulate bladder c-Kit expression, and that is a possible mechanism for improving urinary incontinence and urine retention after an SCI.

【Key words】 Spinal cord injury; Urinary bladder; c-Kit; Electroacupuncture

Funding: National Natural Science Foundation of China (81403477 and 81860875)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2022.05.002

脊髓损伤导致的排尿功能障碍是影响患者生活质量和寿命的重要因素^[1]。脊髓损伤平面不同,所导致的排尿障碍的临床症状亦不同,骶上脊髓损伤表现为储尿期尿失禁,骶髓损伤表现为排尿期尿潴留,其发病机制与膀胱逼尿肌活动的兴奋性改变有关^[2]。膀胱逼尿肌活动不仅受神经支配,本身也有一定的自主兴奋性^[3]。膀胱 Cajal 间质细胞(interstitial cells of Cajal, ICCs)是关键的起搏细胞^[4-5],酪氨酸激酶受体 c-Kit 是 ICCs 特异性标志物^[6]。c-Kit 及其配体干细胞因子的表达与 ICCs 的增殖、分化和表型维持密切相关^[7]。有研究表明,骶上脊髓损伤大鼠膀胱 c-Kit 表达、ICCs 数量及膀胱兴奋性均较正常大鼠明显增加,骶髓损伤大鼠膀胱 c-Kit 表达、ICCs 数量及膀胱兴奋性则均较正常大鼠减少^[8]。

电针不仅能改善脊髓休克期的尿潴留症状,也能改善脊髓损伤后期骶上脊髓损伤的尿失禁及骶髓损伤的尿潴留症状^[9-10]。电针对脊髓损伤尿失禁和尿潴留治疗效应的良性双向调节作用,是否与电针对膀胱 c-Kit 表达的调控作用有关值得深入探讨。因此,本研究以电针干预不同平面脊髓损伤(胸髓损伤、骶髓损伤)排尿障碍大鼠模型,在评价电针治疗效应的基础上,探讨电针对膀胱 c-Kit 的调控作用。

材料与方法

一、实验动物及分组

健康成年 SPF 级雌性 SD 大鼠 60 只,体重(220±20)g,购自上海西普尔必凯实验动物有限公司(许可证号 SCXK(沪)2008-0016),适应性饲养 1 周后进行实验研究。研究方案取得南京中医药大学伦理委员会的批准[ACU-21(20151201)]。

将实验大鼠分为假手术组、胸髓损伤组、胸髓损伤电针组、骶髓损伤组、骶髓损伤电针组,共 5 组。

二、各组脊髓损伤模型的制备

实验第 1 天,取 30 只大鼠建立胸髓损伤模型。10%水合氯醛(300 mg/kg)腹腔注射麻醉,碘伏消毒,从 Th₈₋₁₂ 作正中中线纵向切口,暴露棘突和椎板,咬除 Th₉₋₁₁ 椎板,以眼科剪横断 Th₁₀ 椎体水平的硬脊膜和脊

髓,以显微眼科镊可抬起脊髓两端证实脊髓完全横断。止血后依次关闭各层,并浸润庆大霉素。造模 24 h 后,根据改良 BBB 评分^[11]及在耻骨联合上缘触及胀大的膀胱确定造模成功。实验第 22 天,在耻骨联合上缘不再能触及膀胱,且出现急迫性自主排尿(即尿失禁),则确定大鼠进入脊髓损伤后期。术后 24 h, BBB 评分 29 只大鼠均为 0 分,且可触及胀大的膀胱,提示 29 只胸髓损伤大鼠造模成功。实验第 3~15 天,胸髓损伤大鼠死亡 2 只;实验第 22 天,3 只胸髓损伤大鼠可触及胀大的膀胱,表明仍处于脊髓休克期,予剔除;剩余的 24 只随机选取 20 只分为胸髓损伤组和胸髓损伤电针组,每组 10 只,然后进行下一步干预。

取 20 只大鼠建立骶髓损伤模型,脊髓横断部位在 L₃ 椎体水平,术后 24 h 内,20 只大鼠耻骨联合上缘均可触及胀大的膀胱,提示骶髓损伤大鼠均造模成功;实验第 22 天,随机分为骶髓损伤组和骶髓损伤电针组,每组 10 只。

剩余 10 只大鼠进行假手术处理,5 只暴露 Th₉₋₁₁ 棘突和椎板,5 只暴露 L₂₋₄ 棘突和椎板,不做任何损伤处理,5 min 后在手术伤口浸润庆大霉素直接缝合。假手术组(10 只)大鼠及骶髓损伤模型大鼠 BBB 评分均为 21 分,全部进入后继实验。

所有实验大鼠术后当天予腹腔注射庆大霉素 5000 U/kg 抗感染,1 次/日,持续 7 d。手法辅助尿潴留大鼠排尿,并按摩腹部帮助排便,保持动物笼清洁干燥。

三、电针干预

实验第 22 天,2 个电针组(胸髓损伤电针组、骶髓损伤电针组)大鼠取仰卧位固定,穴位皮肤碘伏消毒后,以一次性针灸针进行针刺操作。脐下 25 mm 处取关元穴,针尖朝耻骨联合方向斜刺 5 mm;后肢内踝尖直上 10 mm 处取三阴交穴,直刺 3 mm。华佗牌 SDZ-II 电针仪负极接关元穴,正极接三阴交穴(左右三阴交穴隔日交替使用)。采用 2/15 Hz 疏密波,电流强度 1~2 mA,持续电刺激每日 15 min,共 14 d。其余 3 组大鼠不予电针刺激,仅仰卧位固定每日 15 min,共 14 d。

四、尿动力学检测

实验第 37 天,麻醉大鼠后,手术暴露膀胱,将 4.5 号头皮针作为测压管穿刺插入膀胱顶部并固定,连接注射器,抽尽残余尿液。再将测压管经 T 型三通管与 RM6240 多道生理信号采集处理系统及 WZ-50C6 微量灌注泵相连。用微量灌注泵以 0.2 ml/min 速率向膀胱内灌注室温生理盐水,同步记录膀胱压力变化(包括漏尿点膀胱压);至尿道外口开始连续流出灌注液,停止灌注,并收集经尿道排出的尿液,记录排尿量;待大鼠排尿结束后,更换连接 1 ml 注射器,缓慢抽出膀胱内的残余尿液,记录残余尿量。膀胱容量=排尿量+残余尿量,膀胱顺应性=膀胱容量/漏尿点膀胱压。

五、形态学及分子生物学检测

完成尿动力学检测后处死大鼠,剪取膀胱尖组织,分为 2 份,一份平铺后固定于 4% 多聚甲醛,另一份冻存于液氮。

1. HE 染色观察:每组取 5 个经甲醛固定的样本,逐级酒精脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,防脱切片,常规 HE 染色,经脱水、透明、晾干,中性树胶封片。100 倍光镜下观察膀胱组织形态学改变,并拍照。

2. Real-time qPCR 检测:每组取 5 个冻存于液氮的样本,抽提 RNA,进行逆转录,以 β' -Actin 为内参,设 3 个复孔进行 qPCR 反应。

c-Kit 引物序列,上游 5'-GAAATCTCTCCCCACG-GACC-3',下游 5'-GTCAGACCGCATCCATTTC-3'。

β' -Actin 引物序列,上游 5'-TGGGTATGGAATCCT-GTGGCA-3',下游 5'-TGTTGGCATAGAGTCTT-TACGG-3'。

反应条件为:预变性 95 °C (10 min) 后;95 °C (5 s),60 °C (10 s),循环 40 次。测得 CT 值后,采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法计算 mRNA 的相对表达量。

3. Western blotting 检测:每组取 4 个冻存于液氮的样本,提取组织蛋白。蛋白定量后,电泳分离,转膜,

封闭后洗膜,再分别加入一抗 c-Kit (1 : 1000, bs3621, Biogot 公司), GAPDH (1 : 1000, KGAA002, EnoGene 公司) 4 °C 下摇床过夜。洗膜后,加入二抗羊抗兔 IgG-HRP (1 : 5000, KGAA35, EnoGene 公司) 室温孵育 1 ~ 2 h。洗膜、显色后,放入化学发光成像系统中扫描、拍片,分别读取 c-Kit 和内参 GAPDH 的灰度值,计算两者比值。

六、统计学方法

使用 SPSS 22.0 版统计软件对所得数据进行统计学分析处理,符合正态分布的计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,再用 LSD (符合方差齐性) 或 Dunnett's T3 (不符合方差齐性) 方法两两比较。 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

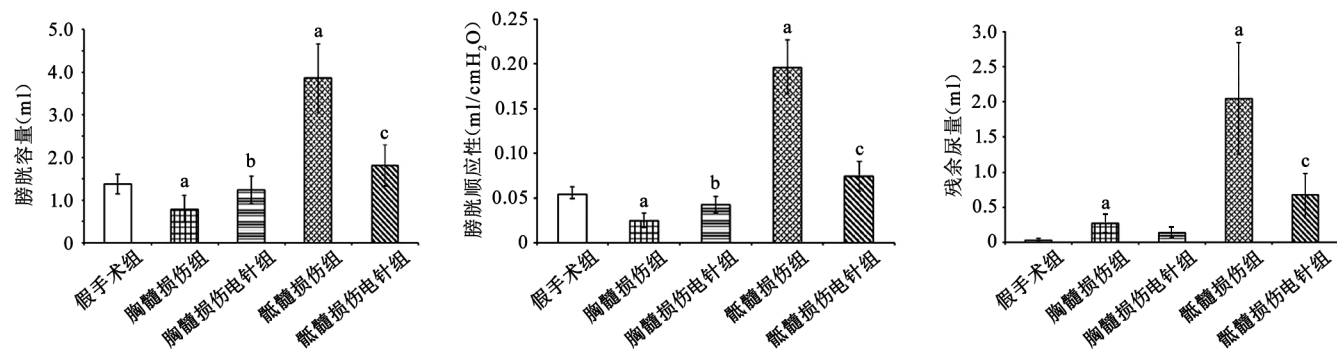
结 果

一、各组大鼠尿动力学检测

尿动力学检测显示,各组大鼠的膀胱容量、膀胱顺应性、残余尿量组间比较,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。与假手术组比较,胸髓损伤组的膀胱容量和膀胱顺应性均明显降低 ($P < 0.05$),残余尿量明显增加 ($P < 0.05$);骶髓损伤组的膀胱容量、膀胱顺应性及残余尿量均明显升高 ($P < 0.05$)。与胸髓损伤组比较,胸髓损伤电针组的膀胱容量和膀胱顺应性均明显升高 ($P < 0.05$),而残余尿量有所降低,但组间差异无统计学意义 ($P = 0.103$)。与骶髓损伤组比较,骶髓损伤电针组的膀胱容量、膀胱顺应性和残余尿量均明显降低 ($P < 0.05$)。如图 1 所示。

二、膀胱组织形态学的改变

假手术大鼠膀胱组织结构完整、层次分明,逼尿肌肌束排列较整齐。胸髓损伤和骶髓损伤大鼠均可见膀胱壁增厚、结构不完整,层次欠清,逼尿肌肌束排列紊乱,肌纤维断裂损坏。胸髓损伤大鼠膀胱壁增厚更明显,骶髓损伤大鼠黏膜上皮增生、炎细胞浸润、固有层



注:与假手术组比较,^a $P < 0.05$;与胸髓损伤组比较,^b $P < 0.05$;与骶髓损伤组比较,^c $P < 0.05$

图 1 各组大鼠各项尿动力学指标变化

充血更明显。电针治疗后,胸髓损伤和骶髓损伤大鼠膀胱壁结构层次有所改善。胸髓损伤电针组与胸髓损伤组相比,膀胱壁增厚、膀胱逼尿肌肌束排列紊乱、肌纤维断裂损坏均有所减轻。骶髓损伤电针组与骶髓损伤组相比,膀胱逼尿肌肌束排列紊乱、肌纤维断裂损坏及黏膜上皮增生、炎细胞浸润、固有层充血均有所减轻。如图 2 所示。

三、各组大鼠膀胱 c-Kit mRNA 及蛋白表达的比较
各组大鼠 c-Kit mRNA 及蛋白表达的组间差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。与假手术组比较, 胸髓损伤组的膀胱 c-Kit mRNA 及蛋白表达均明显升高 ($P<0.05$), 骶髓损伤组膀胱 c-Kit mRNA 及蛋白表达

则明显降低($P<0.05$)。与胸髓损伤组比较,胸髓损伤电针组膀胱 c-Kit mRNA 及蛋白表达明显降低($P<0.05$)。与骶髓损伤组比较,骶髓损伤电针组的 c-Kit mRNA 及蛋白表达显著升高($P<0.05$)。如图 3 所示。

讨 论

本研究中,胸髓损伤全横断手术位于 Th_{10} 椎体水平,损伤部位在圆锥以上,排尿虽然失去了大脑的意愿性控制,但是位于骶髓的排尿反射依然存在;骶髓损伤全横断手术位于 L_3 椎体水平(即排尿低级中枢所在部位 S_2 节段),损伤使排尿完全失去了中枢神经系统支

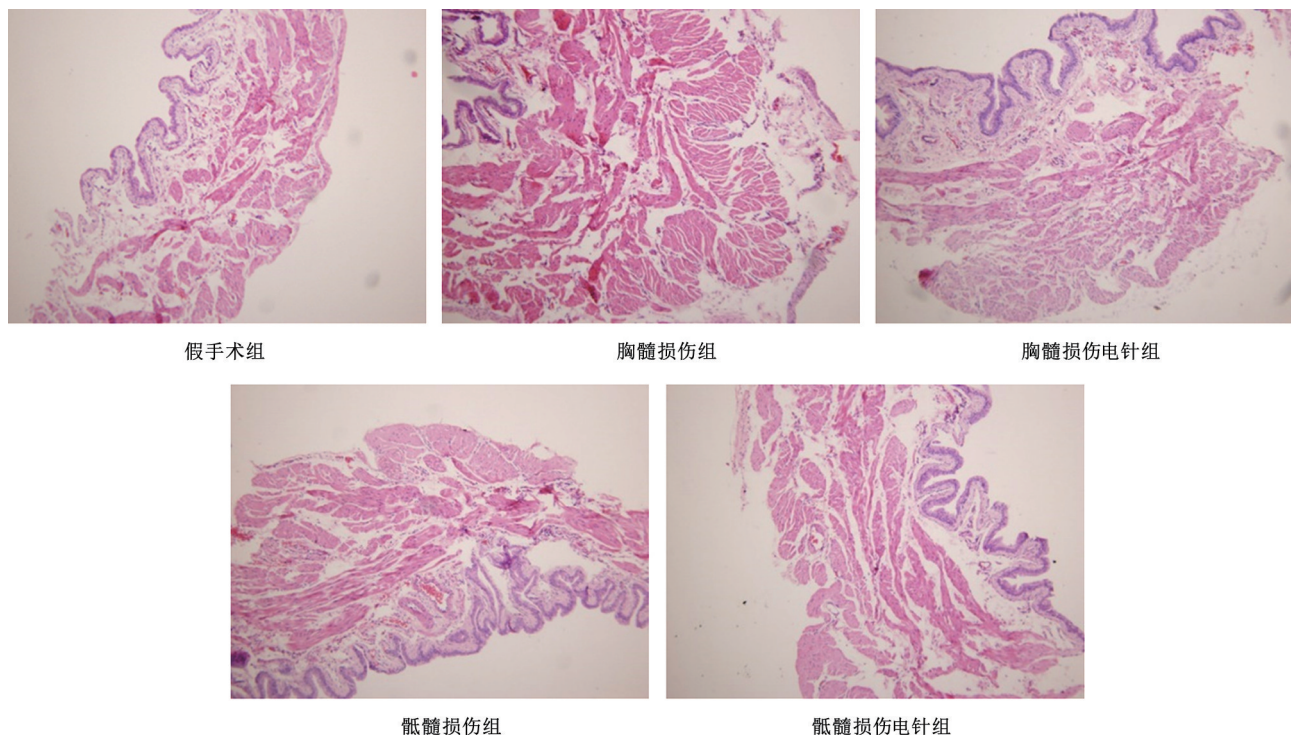
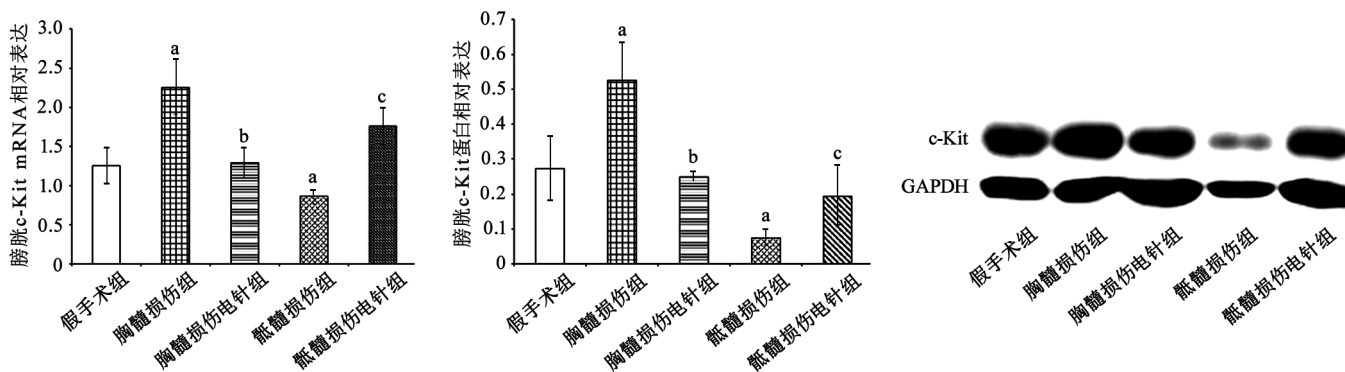


图2 各组膀胱组织形态学改变(HE染色,×100)



注:与假手术组比较,^a $P<0.05$;与胸髓损伤组比较,^b $P<0.05$;与骶髓损伤组比较,^c $P<0.05$

图3 各组大鼠 c-Kit mRNA 及蛋白表达的比较(条带图为 c-Kit 蛋白电泳图)

配。脊髓休克期结束后,胸髓损伤大鼠储尿期膀胱逼尿肌处于高反射状态,尿道括约肌协同障碍,表现为尿失禁;骶髓损伤大鼠排尿期膀胱逼尿肌处于低反射甚至无反射状态,膀胱不能正常收缩,出现了尿潴留。造模后尿动力学的改变表现为:胸髓损伤大鼠的膀胱容量及顺应性均明显降低,而骶髓损伤大鼠的膀胱残余尿量及膀胱容量明显增加,膀胱顺应性也相应增加,符合理论预期,也与以往的文献报道一致^[2,8]。而脊髓休克期尿潴留所导致的膀胱过度充盈也破坏了模型大鼠膀胱壁结构,HE 染色可见胸髓损伤和骶髓损伤大鼠膀胱发生了相应的组织形态学改变。

脊髓损伤后期,不同平面脊髓损伤导致的排尿功能障碍症状虽有不同,但治疗目标是一致的,即提高控尿排尿能力,减少残余尿量,预防感染,提高患者生活质量。针灸干预脊髓损伤排尿功能障碍的研究中,关元和三阴交均为常用穴,电针也是常用的干预手段^[9,12]。本研究中,经电针关元和三阴交穴的干预,不同平面损伤动物模型的控尿排尿功能均得到明显改善,电针后胸髓损伤大鼠的膀胱容量及顺应性良性升高,与此同时经过电针刺激的骶髓损伤大鼠膀胱容量和顺应性则良性降低,而残余尿量亦明显减少。这种电针相同穴组(关元-三阴交)对尿失禁和尿潴留产生两种相反的良性调节效应,在针灸学中被称为双向调节作用。而随着膀胱排尿功能的改善,电针也明显改善了胸髓损伤和骶髓损伤大鼠膀胱的形态学结构。

c-Kit 受体是 ICCs 的标志性膜分子蛋白,能维持 ICCs 的增殖分化和表型^[6-7]。c-Kit 被特异性阻断或中和时,ICCs 数量减少,膀胱的兴奋和收缩受到抑制;如施加因素被去除,ICCs 又能恢复增殖,膀胱的兴奋性也能得到恢复^[13-14]。本研究中,胸髓损伤膀胱 c-Kit 表达升高,骶髓损伤膀胱 c-Kit 表达降低,与以往的研究结果一致^[8]。经电针干预后,胸髓损伤膀胱异常增高的 c-Kit 表达得到降低,而骶髓损伤膀胱异常降低的 c-Kit 表达则得到升高。而这一结果,与尿动力学的改变一致。

综上所述,电针通过良性调控膀胱 c-Kit 的表达,影响了逼尿肌的自主兴奋性,这可能是其改善脊髓损伤后期控尿排尿功能部分效应的机制。而值得关注的是,本研究中,电针对膀胱 c-Kit 表达在分子层面发挥了良性双向调控作用。这在针灸学中也是一个有意义的发现,值得今后进一步探索。

参 考 文 献

[1] Adriaansen JJ, van Asbeck FW, Tepper M, et al. Bladder-emptying

methods, neurogenic lower urinary tract dysfunction and impact on quality of life in people with long-term spinal cord injury[J]. J Spinal Cord Med, 2017, 40 (1): 43-53. DOI: 10.1179/2045772315Y.0000000056.

- [2] Hamid R, Averbeck MA, Chiang H, et al. Epidemiology and pathophysiology of neurogenic bladder after spinal cord injury[J]. World J Urol, 2018, 36 (10): 1517-1527. DOI:10.1007/s00345-018-2301-z.
- [3] Fry CH, McCloskey KD. Spontaneous activity and the urinary bladder [J]. Adv Exp Med Biol, 2019, 1124: 121-147. DOI: 10.1007/978-981-13-5895-1_5.
- [4] McCloskey KD. Interstitial cells in the urinary bladder--localization and function[J]. NeuroUrol Urodyn, 2010, 29 (1): 82-87. DOI: 10.1002/nau.20739.
- [5] Koh SD, Lee H, Ward SM, et al. The mystery of the interstitial cells in the urinary bladder[J]. Ann Rev Pharmacol Toxicol, 2018, 58: 603-623. DOI: 10.1146/annurev-pharmtox-010617-052615.
- [6] Vahabi B, McKay NG, Lawson K, et al. The role of c-kit-positive interstitial cells in mediating phasic contractions of bladder strips from streptozotocin-induced diabetic rats [J]. BJU Int, 2011, 107 (9): 1480-1487. DOI: 10.1111/j.1464-410X.2010.09507.x.
- [7] Feng J, Gao J, Zhou S, et al. Role of stem cell factor in the regulation of ICC proliferation and detrusor contraction in rats with an underactive bladder[J]. Mol Med Rep, 2017, 16 (2): 1516-1522. DOI: 10.3892/mmr.2017.6749.
- [8] 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]. J Surg Res, 2013, 183 (2): 598-605. DOI: 10.1016/j.jss.2013.02.030.
- [9] Wang J, Zhai Y, Wu J, et al. Acupuncture for chronic urinary retention due to spinal cord injury: a systematic review[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2016, 2016: 9245186. DOI: 10.1155/2016/9245186.
- [10] Honjo H, Naya Y, Ukimura O, et al. Acupuncture on clinical symptoms and urodynamic measurements in spinal-cord-injured patients with detrusor hyperreflexia[J]. Urol Int, 2000, 65 (4): 190-195. DOI: 10.1159/000064874.
- [11] Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats[J]. J Neurotrauma, 1995, 12 (1): 1-21. DOI: 10.1089/neu.1995.12.1.
- [12] 刘会敏,冷军,郭文,等.基于数据挖掘技术分析针灸治疗脊髓损伤后神经源性膀胱的取穴规律[J].中国组织工程研究, 2020, 24 (26): 4237-4242. DOI: 10.3969/j.issn.2095-4344.2769
- [13] Min Y, He P, Wang Q, et al. The effects of the c-kit blocker glivec on the contractile response of urinary bladder[J]. J Surg Res, 2011, 171 (2): e193-e199. DOI: 10.1016/j.jss.2011.07.048.
- [14] Biers SM, Reynard JM, Doore T, et al. The functional effects of a c-kit tyrosine inhibitor on guinea-pig and human detrusor[J]. BJU Int, 2006, 97 (3): 612-616. DOI: 10.1111/j.1464-410X.2005.05988.x.

(修回日期:2022-02-25)

(本文编辑:汪 玲)