

·基础研究·

电针对骶上脊髓损伤后神经源性膀胱大鼠尿流动力学及脊髓组织中半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3表达的影响*

许明¹ 张泓^{1,2} 张健¹ 刘继生¹ 尹秀婷¹ 艾坤¹ 邓石峰¹

摘要

目的:观察电针对骶上脊髓损伤后神经源性膀胱大鼠尿流动力学、髓内细胞凋亡率及脊髓组织中Caspase-3表达的影响。

方法:从60只雌性SD大鼠中随机抽取36只,按脊髓横断法制作神经源性膀胱模型后,将符合要求的模型大鼠24只随机分为模型组、电针组各12只,其余24只随机分为空白组、假手术组各12只;术后第19天取“次髂”“中极”“三阴交”“大椎”行电针干预,连续治疗7天后行尿流动力学检测,并用TUNEL法测定髓内细胞凋亡率、Western Blot法测定脊髓组织中Caspase-3蛋白的表达情况。

结果:①尿流动力学,与空白组及假手术组比较:模型组、电针组的膀胱基础压力、膀胱最大压力、漏尿点压力升高($P < 0.05$),膀胱最大容量及顺应性降低($P < 0.01$);与模型组比较:电针组的膀胱基础压力、膀胱最大压力、漏尿点压力均降低($P < 0.05$),膀胱最大容量及顺应性均升高($P < 0.01$);②髓内细胞凋亡率,与空白组及假手术组比较:模型组及电针组的脊髓组织TUNEL阳性率明显升高($P < 0.01$);与模型组比较:电针组的脊髓组织TUNEL阳性率明显降低($P < 0.01$);③Caspase-3蛋白表达,与空白组及假手术组比较:模型组、电针组脊髓组织中Caspase-3蛋白表达明显升高($P < 0.01$);与模型组比较:电针组脊髓组织中的Caspase-3蛋白表达下降($P < 0.05$)。

结论:电针“次髂”“中极”“三阴交”“大椎”可改善骶上脊髓损伤后神经源性膀胱大鼠的膀胱压力、最大容量及顺应性,降低受损脊髓组织的凋亡率,其作用机制可能与脊髓组织中凋亡效应蛋白Caspase-3的表达下调有关。

关键词 电针;骶上脊髓损伤;神经源性膀胱;尿流动力学;半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3

中图分类号:R744, R245, R683 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2017)-12-1338-05

Effect of electroacupuncture on urodynamics and expression of Caspase-3 in spinal tissue in rats with neurogenic bladder after complete supersacral spinal cord injury/XU Ming, ZHANG Hong, ZHANG Jian, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2017, 32(12): 1338—1344

Abstract

Objective: To explore the effect of electroacupuncture (EA) on urodynamics, apoptosis rate and Caspase-3 in spinal tissue after completely supersacral spinal cord injury.

Method: Among the total of 60 adult female Sprague-Dawley rats, 36 were randomly selected for supersacral spinal cord transection model, 24 compliance model rats were randomly divided into model group and electroacupuncture group with 12 cases in each. Other rats randomly divided into control group, sham operation group with 12 cases in each. electroacupuncture group received electroacupuncture 7 days on "Ciliao" "Zhongji" "Sanyinjiao" "Dazhui" acupoints 19 days after model operation. Urodynamic test for bladder function, and the expres-

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2017.12.004

*基金项目:国家自然科学基金面上项目(81473753)

1 湖南中医药大学,长沙,410208; 2 通讯作者

作者简介:许明,男,硕士研究生; 收稿日期:2016-08-30

1338 www.rehabi.com.cn

sion of Caspase-3 in the spinal cord was detected with Western blotting, apoptosis rate by TUNEL.

Result: Compared with control group and sham operation group, bladder pressure, maximum bladder pressure, leak point pressure increased ($P < 0.05$), maximum bladder capacity and compliance decreased ($P < 0.01$) in the model group and electroacupuncture group, compared with the model group, bladder pressure, maximum bladder pressure, leak point pressure were decreased ($P < 0.05$), maximum bladder capacity and compliance increased ($P < 0.01$) in electroacupuncture group. Compared with control group and sham operation group, the positive rate of TUNEL in spinal cord tissue increased ($P < 0.01$) in the model group and electroacupuncture group decreased ($P < 0.01$) in electroacupuncture group. The expression of Caspase-3 was significantly higher in model group and electroacupuncture group than control group and sham operation group ($P < 0.01$), but the electroacupuncture group was significantly lower than model group ($P < 0.05$).

Conclusion: Electroacupuncture on "Ciliao" "Zhongji" "Sanyinjiao" "Dazhui" acupoints could improve the bladder pressure, maximum capacity and compliance of neurogenic bladder, and inhibit the rate of apoptosis in injured spinal cord tissue, the mechanism may be related to the inhibited expression of Caspase-3.

Author's address Hunan University of TCM, Changsha, 410208

Key word electroacupuncture; supersacral spinal cord injury; neurogenic bladder; urodynamics; Caspase-3

骶上脊髓损伤(supersacral spinal cord injury, SSCI)引起脑桥排尿中枢和骶段脊髓之间的联系中断,正常的抑制机制被破坏,将导致逼尿肌反射亢进^[1-2],由此形成神经源性膀胱(neurogenic bladder, NB)是脊髓损伤患者的主要并发症之一,严重危及患者的生命,目前没有行之有效的方法及药物对逼尿肌进行神经调控^[3]。细胞凋亡导致神经元的大量丢失是脊髓继发性损伤的重要病理机制^[4]。研究发现,脊髓损伤后半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)的表达与神经细胞凋亡水平呈正相关^[5-7]。目前电针治疗脊髓损伤后神经源性膀胱已从单纯的临床观察进入到实验研究阶段,尿流动力学是评价膀胱功能的“黄金指标”,研究表明,电针可改善脊髓损伤后神经源性膀胱的尿流动力学参数^[8-9]。本研究通过建立完全性骶上脊髓损伤后NB模型,观察电针次髂、中极、三阴交、大椎穴对骶上脊髓损伤后NB大鼠尿流动力学改变和脊髓组织中Caspase-3蛋白表达水平的影响,探讨电针治疗SSCI后神经源性膀胱的可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物:由湖南斯莱克实验动物有限责任公司提供SPF级健康雌性SD大鼠60只(许可证号:SCXK(湘)2013-0004),体质量(220 ± 20)g,均饲养于湖南中医药大学动物实验中心实验室(使用许可

证号编号:SYXK(湘)2013-0005)。控制实验室背景噪音30—50db、光暗周期为12h/12h、室温为24—26℃、湿度为50%—70%,自由饮水与摄食。适应性饲养1周至体质量(250 ± 20)g后进行实验研究。实验过程中对动物处置符合2006年科学技术部发布的《关于善待实验动物的指导性意见》^[10]。

1.1.2 主要实验试剂与仪器:①主要实验试剂:水合氯醛,分析纯,批号20131031:国药集团化学试剂有限公司。青霉素钠,批号15050401-2:哈药集团制药总厂。Rabbit抗体,HRP goat anti-mouse IgG:美国Proteintech。超敏发光液:美国Thermo pierce。显影液、定影液:中国WellBiology。Tunel试剂盒,标号KGA7045:凯基生物。②主要实验仪器:微量注射泵WZ-50C6,编号150202698:浙江史密斯医学仪器有限公司。F3导尿管,批号150301J:上海上医康鸽医用器材有限责任公司。MP150-WSW型16通道生理记录仪:美国BIOPAC公司。电动玻璃匀浆器,编号DY89-1:日本新芝。台式冷冻离心机,货号TGL-18R:中国深圳黑马。电泳仪,编号164-5050:美国Bio-rad。转膜仪,编号:DYCZ-40A:中国北京六一仪器厂。包埋机,编号BMJ-A:常州中威电子仪器。SDZ-V型华佗牌电针治疗仪:苏州医疗用品厂有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 模型制作:采用改良的脊髓横断法^[11]制作骶上脊髓损伤后神经源性膀胱模型,方法如下:①术前

禁食 24h, 术前 2h 腹腔注射青霉素钠 $2 \times 10^5 \text{U}$ 以抗炎, 以 10% 水合氯醛 350mg/kg 行腹腔麻醉; ②备皮、消毒后, 沿脊柱长轴在 T10—T11 做长约 2—3cm 的纵向切口, 依次切开皮肤、筋膜, 钝性分离两侧竖脊肌, 暴露椎弓; ③去除 T10 椎板至暴露脊髓, 快速切断牙探针轻勾的脊髓, 轻抬脊椎断端确保脊髓完全横断; ④观察大鼠的心跳和呼吸无异常后依次缝合肌肉、筋膜和皮肤, 5% 络合碘消毒切口, 适量青霉素粉予伤口及周边以抗感染; ⑤术后采用大笼单笼饲养, 定时翻身与清洁护理, Crede 手法辅助排尿^[1], 定时定量饮水计划: 每 6h (1:00、7:00、13:00、19:00) 给水 1 次, 水量为 4ml/次, 皮下注射乳酸盐林格溶液 20ml/kg 防酸碱失衡和电解质紊乱, 腹腔注射青霉素钠 $2 \times 10^5 \text{U}$ 抗感染; ⑥观察造模大鼠双后肢运动功能状态及膀胱情况, 双后肢自主运动或自主排尿、自噬或死亡的大鼠, 不纳入实验。假手术组切开皮肤、筋膜与肌肉, 暴露脊髓 10min 后依次缝合后予抗感染处理, 空白组不做处理。

1.2.2 成模标准及剔除标准。成模标准: ①对后肢运动功能的评估: 模型大鼠后肢不能参与行走, 只有在前肢行走时处于拖动状态, BBB 评分为 0 分, 则认为对本实验来说是成功的骶上脊髓损伤大鼠模型。②对膀胱排尿功能的评估: 模型大鼠在手术麻醉及脊髓休克期, 膀胱处于潴留状态, 膀胱胀大明显, 不能自行排尿。而脊髓休克期过后表现为膀胱容量下降, 膀胱胀大不明显, 无需手法辅助排尿, 且大鼠下腹部及笼内垫料潮湿, 再结合尿流动力学检测证实模型大鼠膀胱逼尿肌已经产生了无抑制性收缩。

剔除标准: 模型大鼠中如出现双后肢自主运动, 休克期后尿潴留或自主排尿、自噬或死亡的情况, 则不纳入实验研究。

1.2.3 动物分组: 从 60 只雌性 SD 大鼠中按随机数字表抽取 12 只作为空白组, 12 只作为假手术组, 剩下的 36 只采用脊髓横断法制作神经源性膀胱模型后, 经后肢运动功能及膀胱排尿情况评价确定成功的神经源性膀胱模型大鼠随机抽取 24 只分为模型组、电针组各 12 只。

1.2.4 腧穴定位及电针方法: 参照“十五”国家规划统编教材《实验针灸学》大鼠标准穴位图谱^[12]及相关资料^[13]定位, 准确定取“次髎”: 第 2、3 骶骨的棘突间隙正

中偏上处旁开 5—10mm; “中极”: 腹正中线上, 胸锁联合与耻骨联合上缘连线的上 3/4 与下 1/4 的交点定位为神阙穴, 神阙穴与耻骨联合上缘连线的上 4/5 与下 1/5 的交点为中极穴; “三阴交”: 后肢内踝尖直上方 1cm 处; “大椎”: 背部正中第 7 颈椎和第 1 胸椎间。

电针组大鼠俯卧位固定于鼠架上, 用 30 号 1 寸针, 次髎直刺 15mm, 中极斜刺 5mm, 三阴交直刺 5mm, 大椎直刺 10mm。进针后接用 SDZ-V 型华佗牌电针治疗仪, 中极穴与三阴交穴一组 (左右三阴交穴隔日交替), 次髎穴与大椎穴一组 (左右次髎穴隔日交替)。电针刺激参数: 疏密波 (密波 50Hz, 疏波 10Hz), 强度以肢体轻颤并耐受为度。留针时间 20min, 于造模后第 19 天^[14]开始连续 7d 的电针干预, 每日 1 次。其余三组均以相同方式束缚 20min, 但不进行电针干预。

1.2.5 一般情况的观察: 各组大鼠活动及进食、饮水、排尿、排便、自噬和死亡等一般情况的观察。

1.2.6 尿流动力学检查: 电针干预 7d 后对各组大鼠行尿流动力学检测, 各组平行交替进行, 记录膀胱压力曲线。用 10% 水合氯醛 350mg/kg 腹腔注射大鼠, 麻醉满意后取仰卧位, 多通道生理记录仪与微量灌注泵及 F3 导尿管通过三通管连接, 排空膀胱后将 F3 导管经尿道轻导入大鼠膀胱, 以 0.1ml/min 速率^[14]注入温度为 25—35℃ 的生理盐水, 同步记录随容积增加的膀胱压力。膀胱基础压为导管置入膀胱后的初始压力值, 膀胱最大压为整个检测过程中压力图的峰值, 尿道口首次流出液体时的灌注容积记为膀胱最大容量, 此时的压力值记为漏尿点压, 膀胱顺应性为膀胱容量的变化与压力变化的比值。

1.2.7 取材与脊髓组织 TUNEL 阳性率的检测: 所有动物于尿流动力学检测后, 以 10% 水合氯醛腹腔过量麻醉后, 取手术损伤 T10 节段脊髓组织上下各 0.5—1cm, 经 4℃ 生理盐水漂净, 滤纸吸干, 一部分脊髓组织 -80℃ 冰箱冻存用于 Western Blot 法检测脊髓组织中 Caspase-3 表达, 另一部分经 10% 中性甲醛后做石蜡切片, 上下随机各取 3 个切片, 行末端脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记法 (TUNEL) 检测髓内细胞凋亡情况。采像为普通的电脑采像, 图像分析软件为 IPP (Image-Pro-Plus), 以 400 倍视野下平均计数阳性细胞所占视野下的细胞核总数的比

值作为细胞凋亡阳性率,每张切片取10个“视野间不重叠且阳性清晰特异”的视野进行计数后取均值。

1.2.8 脊髓组织中 Caspase-3 表达的检测:采用 Western Blot法,按照 RIPA 裂解液说明书提取细胞总蛋白,用于检测 Caspase-3 蛋白的表达水平;按 BCA 蛋白定量试剂盒(Wellbio)使用说明操作,测定蛋白浓度;开始电泳,浓缩胶电泳电压为 80V,分离胶电泳电压为 120V。待溴酚蓝电泳至胶底部时终止电泳;切胶 Caspase-3(17KD) β -actin(42KD)后转移至 PVDF 膜上,以 5%脱脂奶粉室温封闭 1h;取各组胞浆蛋白,分别加入兔抗 Caspase-3 抗体(1:500 稀释)和鼠抗 β -actin 抗体(1:4000 稀释),4℃孵育过夜;37℃复温 1h 后, TBST 洗涤 3 次,每次 15min,加入 HRP 标记的二抗,孵育 45—60min; TBST 洗涤 3 次,每次 15min, ECL 显色曝光。将曝光后的底片扫描,并用 Quantity One 专业灰度分析软件进行分析目的蛋白和内参 β -actin 蛋白的灰度值,以两者灰度值的比值作为 Caspase-3 蛋白的相对表达量。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 17.0 软件进行处理,实验数据用均数 \pm 标准差表示。所有资料进行正态性检验,符合正态分布者,多组计量资料组间比较采用单因素方差分析,方差齐者用 LSD 法,方差不齐者用 Dunnett T3 法;不符合正态分布者,采用独立样本比较的秩和检验。显著性水平为 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 一般情况的观察

手术造模 36 只大鼠存活 30 只,共死亡 5 只,包括术中死亡 1 只,术后感染死亡 2 只,血块堵塞尿道致膀胱破裂 1 只,腹水死亡 1 只。另外自噬大鼠 1 只,后肢运动功能基本正常大鼠 1 只,均予剔除。造模 18 天后,符合模型要求的 29 只大鼠各项体征逐步稳定,手法排尿和腹部按摩观察到大鼠腹部有长条状的质地较硬的肌肉条索,并且排尿次数增多,每次尿量减少,因脊髓损伤后大鼠饮食减少,体质量有所下降。假手术组大鼠没有死亡且伤口基本恢复,其活动及进食饮水、排尿排便等和空白组无明显差别。

2.2 各组大鼠尿流动力学指标的比较

与空白组比较:假手术组的膀胱基础压力、膀胱

最大压力、漏尿点压力的差异无显著性意义($P > 0.05$);与假手术组比较:模型组及电针组的膀胱基础压力、膀胱最大压力、漏尿点压力均明显升高,差异有显著性意义($P < 0.05$);与模型组比较:电针组的膀胱基础压力、膀胱最大压力、漏尿点压力均明显降低,差异有显著性意义($P < 0.05$)。见表 1。

与空白组比较:假手术组的膀胱最大容量及顺应性差异无显著性意义($P > 0.05$);与假手术组比较:模型组及电针组的膀胱最大容量及顺应性均明显降低,差异有显著性意义($P < 0.01$);与模型组比较:电针组的膀胱最大容量及顺应性明显升高,差异有显著性意义($P < 0.01$)。见图 1—2。

2.3 各组大鼠脊髓组织 TUNEL 阳性率的比较

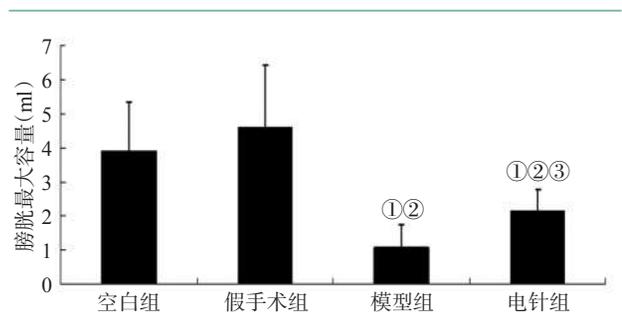
如图 3,箭头标示为阳性细胞,细胞核核染成棕(黄)色或褐色,空白组和假手术组脊髓组织中可见少量散在的 TUNEL 阳性细胞,模型组和电针组大鼠的脊髓组织中有较多的阳性细胞。如图 4,与空白组比较:假手术组的脊髓组织 TUNEL 阳性率的差异无显著性意义($P > 0.05$),与假手术组比较:模型组及电针组的脊髓组织 TUNEL 阳性率明显升

表 1 各组大鼠膀胱基础压力、最大压力及漏尿点压力的比较 ($\bar{x}\pm s, \text{cmH}_2\text{O}$)

| 组别 | 例数 | 膀胱基础压力 | 膀胱最大压力 | 漏尿点压力 |
|------|----|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| 空白组 | 12 | 24.456 \pm 1.995 | 44.279 \pm 5.812 | 39.383 \pm 7.097 |
| 假手术组 | 12 | 24.762 \pm 2.508 | 43.443 \pm 4.649 | 39.926 \pm 6.227 |
| 模型组 | 12 | 35.847 \pm 7.041 ^{②④} | 55.207 \pm 3.764 ^{②④} | 50.619 \pm 4.272 ^{②④} |
| 电针组 | 12 | 28.912 \pm 3.488 ^{②③⑤} | 48.193 \pm 3.229 ^{①③⑥} | 45.300 \pm 5.397 ^{①③⑤} |
| F | | 18.768 | 17.281 | 9.759 |
| P | | 0.000 | 0.000 | 0.000 |

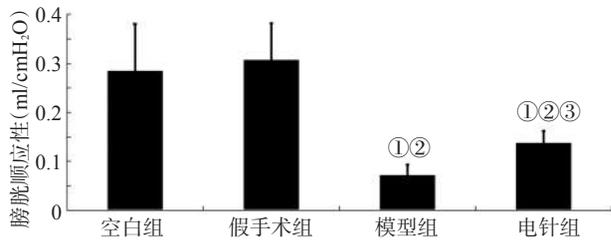
与空白组比较:① $P < 0.05$;② $P < 0.01$;与假手术组比较:③ $P < 0.05$;④ $P < 0.01$;与模型组比较:⑤ $P < 0.05$;⑥ $P < 0.01$

图 1 各组大鼠膀胱最大容量的比较



与空白组比较:① $P < 0.01$;与假手术组比较:② $P < 0.01$;与模型组比较:③ $P < 0.01$

图2 各组大鼠膀胱顺应性的比较



与空白组比较:① $P < 0.01$;与假手术组比较:② $P < 0.01$;与模型组比较:③ $P < 0.01$

高,差异有显著性意义($P < 0.01$);与模型组比较:电针组的脊髓组织 TUNEL 阳性率明显降低,差异有显著性意义($P < 0.01$)。

2.4 各组大鼠脊髓 Caspase-3 蛋白的表达情况

与空白组比较:假手术组的脊髓组织中 Caspase-3 蛋白表达差异无显著性意义($P > 0.05$);与假手术组比较:模型组及电针组的脊髓组织中 Caspase-3 蛋白表达明显升高,差异有显著性意义($P < 0.05$);与模型组比较:电针组的脊髓组织中 Caspase-3 蛋白表达明显降低,差异有显著性意义($P < 0.05$)。见表2,图5。

图3 各组大鼠脊髓组织 TUNEL 染色结果

($\times 400$)

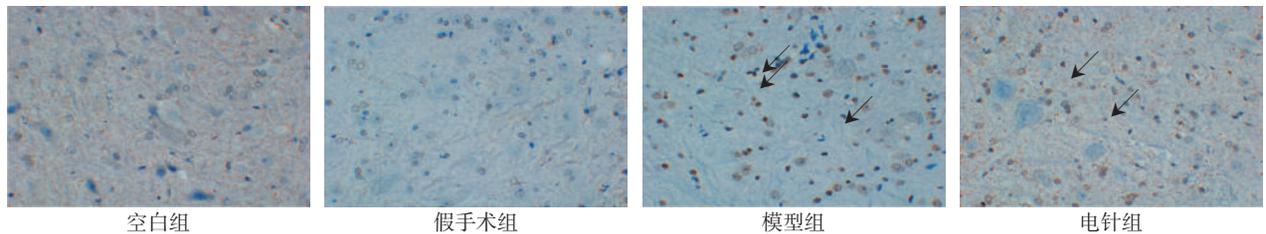
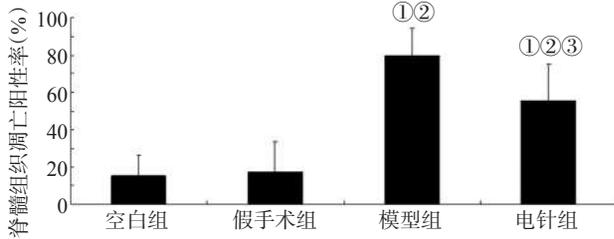


图4 各组大鼠脊髓组织 TUNEL 阳性率的比较



与空白组比较:① $P < 0.01$;与假手术组比较:② $P < 0.01$;与模型组比较:③ $P < 0.01$

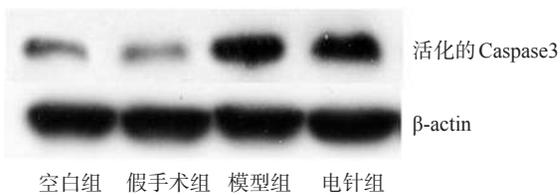
表2 各组大鼠脊髓组织中 Caspase-3 蛋白表达条带的灰度值比较

($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 例数 | 活化的 Caspase-3 |
|----------|----|----------------------------------|
| 空白组 | 12 | 0.253 \pm 0.098 |
| 假手术组 | 12 | 0.338 \pm 0.139 |
| 模型组 | 12 | 0.553 \pm 0.135 ^{①③} |
| 电针组 | 12 | 0.440 \pm 0.090 ^{①②④} |
| <i>F</i> | | 14.573 |
| <i>P</i> | | 0.000 |

与空白组比较:① $P < 0.01$;与假手术组比较:② $P < 0.05$;③ $P < 0.01$;与模型组比较:④ $P < 0.05$

图5 各组大鼠脊髓组织中 Caspase-3 蛋白表达情况



3 讨论

祖国医学根据临床表现,把骶上脊髓损伤后逼尿肌反射亢进所致的尿失禁归为中医“遗溺”“小便不禁”范畴,《诸病源候论·小便不禁》中记载“小便不

禁者,肾气虚”、“不能温制其水液,故小便不禁也”。早在《灵枢·九针十二原》中就明确指出,针灸的治疗作用主要在于“通其经脉,调其血气,营其逆顺出入之会”,临床针灸治疗中多选用膀胱经穴或膀胱局部穴位,针感直至病所,以通经理气、调补肾气,促进肾和膀胱对水液的气化固摄。本研究中选择“大椎”“次髎”“中极”“三阴交”穴进行电针干预,其中“大椎”穴位于督脉,电针督脉可增加损伤局部脊髓源性神经生长因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)、NT-3 的表达,促进神经修复和功能康复^[15],电针大椎穴可以改善 SCI 局部组织的血液微循环,减轻水肿和血肿的压迫及粘连,从而扼制了脊

髓继发性损伤的进行,改善膀胱的神经支配^[16]。次髎穴为排尿低级中枢神经出口部位,电针刺激该部,可将刺激信号传入排尿低级中枢,调控膀胱的排尿功能;三阴交为足三阴经交会穴,能通调下焦之气机;中极为膀胱的募穴,可以起到益气、补肾、固涩的功效,改善膀胱功能。因此,电针刺激以上四穴治疗骶上脊髓损伤后神经源性膀胱可奏“标本同治”之效,对于改善膀胱神经支配,保护膀胱功能有积极意义。

尿流动力学检查是目前公认的SCI后神经源性膀胱的诊断及疗效评价标准,能比较精确客观地反映下尿路的功能状态,同时能将主观的观察结果与膀胱储存和排尿功能联系起来,为神经源性膀胱的诊断和疗效评价提供一系列参数。目前国内外常用的尿动力学膀胱测压方法——插管法及造瘘法^[17],本研究中采用的是经尿道插管法,尽管插管法一定程度上会阻碍尿液排出而使膀胱压力值增加,随机对照实验中所有实验大鼠均采用同一方法测定,不影响对电针疗效的评估及作用机制的探讨,且插管法具有符合临床,对腹压无影响,也不会破坏膀胱正常的生理结构等优点。研究结果显示,骶上SCI后NB模型大鼠的膀胱基础压,膀胱最大压力,膀胱漏尿点压相比于假手术组均有升高,而电针干预后,大鼠的膀胱基础压,膀胱最大压力,膀胱漏尿点压相比于模型组显著降低;另一方面,相比于假手术组,模型大鼠储尿能力下降,尿流动力学表现为膀胱最大容量的下降和膀胱顺应性的减少,而电针干预可显著增加膀胱最大容量及膀胱顺应性。本研究的尿流动力学评价参数提示电针干预可以使膀胱实现“低压储尿”,并能增加膀胱最大容量和改善膀胱顺应性,达到提高膀胱“储尿—控尿—排尿”能力的目的。细胞凋亡是指在特定的信号诱导下,细胞内的死亡级联反应被触发后的程序性死亡现象,其机制相当复杂,主要受内源性基因、酶和信号传导途经等激活与调控。阻止髓内细胞继发凋亡或减轻细胞凋亡发生的程度,对于改善盆底肌及膀胱的神经支配,保护膀胱功能和盆底肌的协调有着重要意义。本研究观察到大鼠损伤后的脊髓出现凋亡病理改变,正常及假手术组大鼠的髓内细胞凋亡率较低,模型大鼠的髓内细胞凋亡率明显高于空白组与假手术组,且电针组的髓内凋亡率比模型组降低,说明电针可缓解

损伤脊髓组织的凋亡。

半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶家族在细胞凋亡过程中起着重要的作用,Caspase-3是Caspase家族中重要一员。Nomura J等^[18-19]研究发现细胞的凋亡主要由两条信号传导通路控制,虽然启动位置和激活原理不一致,但是最终都能激活Caspase-3而引起凋亡。SCI后各系统功能的恢复与脊髓组织功能的重塑有密切关系。李晓宁等^[20]用电针刺激小鼠双侧心膈、脾膈穴,结果显示电针可抑制Caspase-3在大鼠脊髓损伤神经元中表达,抑制神经细胞凋亡,减轻脊髓继发性损伤,促进神经功能恢复,本课题组前期研究显示电针可提高脊髓中神经生长因子(nerve growth factor, NGF)及其酪氨酸激酶受体A(TrkA)的表达,从而抑制脊髓损伤局部神经细胞凋亡^[21]。本研究检测到骶上脊髓损伤后神经源性膀胱大鼠脊髓组织中存在凋亡蛋白Caspase-3表达量的上调和活性增强,且电针干预对脊髓组织中Caspase-3的表达有明显抑制作用,所以电针治疗骶上SCI后神经源性膀胱可能机制是通过抑制脊髓组织中凋亡蛋白Caspase-3表达,促进脊髓功能的重塑,调节膀胱及盆底的神经支配,从而改善盆底肌群的协调性,抑制逼尿肌亢进、调节膀胱功能。

临床上治疗骶上脊髓损伤后神经源性膀胱的方法有很多种,应用上各有优劣,安全、不良反应小且有满意疗效的治疗方式是临床和基础研究的热点^[22]。本研究中,电针“次髎”“中极”“三阴交”“大椎”可抑制脊髓组织中凋亡效应蛋白Caspase-3的激活,缓解脊髓继发性损伤,从而改善大鼠骶上脊髓损伤后膀胱及盆底肌群的神经支配,结合尿流动力学评价结果,说明抑制细胞凋亡可能是电针干预改善膀胱神经支配,保护膀胱功能的重要环节。本研究仅从电针对脊髓组织内凋亡效应蛋白的表达变化,结合尿流动力学参数,部分阐述了其对神经源性膀胱的可能效应机制,其上下游的调控机制仍有待进一步研究。

参考文献

- [1] 廖利民. 神经源性膀胱的治疗现状和进展[J]. 中国康复医学杂志, 2011, 26(3): 201—205.
- [2] Sheriff MK, Shah PJ, Fowler C, et al. Neuromodulation of detrusor hyper-reflexia by functional magnetic stimulation of

- sacral roots[J]. Br J Urol, 1996, 78(1):39—46.
- [3] 孙迎春,李建军,程先宽,等.不同部位电针刺激对脊髓损伤逼尿肌无反射型神经源性膀胱逼尿肌压力的影响[J].中国康复理论与实践,2014,20(8):734—737.
- [4] Whalley K, O'Neill P, Ferretti P. Changes in response to spinal cord injury with development: vascularization, hemorrhage and apoptosis[J]. Neuroscience, 2006, 137(3):821—832.
- [5] 方超,徐祝军,杨民,等.不同时间点应用甲氨蝶呤对大鼠脊髓损伤后神经细胞凋亡的影响[J].中国修复重建外科杂志,2016,30(4):466—472.
- [6] 于秋红,郁军超,吉康祥,等.大剂量高压氧对脑梗死大鼠细胞色素 Ccaspase-3 的影响[J].中国康复理论与实践,2016,22(5):540—543.
- [7] Wen XR, Tang M, Qi DS, et al. Butylphthalide suppresses neuronal cells apoptosis and inhibits JNK-Caspase3 signaling pathway after brain ischemia/reperfusion in rats[J]. Cell Mol Neurobiol, 2016, 36(7):1087—1095.
- [8] 刘志顺,王晶.电针治疗脊髓源性逼尿肌活动过度尿失禁的疗效观察[J].中国康复医学杂志,2009,24(1):79—80.
- [9] 朱毅,李凝,励建安,等.脊髓损伤后神经源性膀胱尿潴留的针刺康复临床研究[J].中华全科医学杂志,2010,8(12):1495—1497.
- [10] 中华人民共和国科学技术部.关于善待实验动物的指导性意见[Z].国科发财字[2006]398号,2006-09-30.
- [11] 许明,张泓,刘继生,等.完全性骶上脊髓损伤后神经源性膀胱大鼠模型的建立及尿流动力学分析[J].中国康复理论与实践,2016,22(8):869—875.
- [12] 李忠仁.实验针灸学[M].北京:中国中医药出版社,2003.327—329.
- [13] 于金娜,刘金顺,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.
- [14] Shea VK, Cai R, Crepps B, et al. Sensory fibers of the pelvic nerve innervating the Rat's urinary bladder[J]. J Neurophysiol, 2000, 84(4):1924—1933.
- [15] 蒋松鹤,林海燕,何蓉,等.督脉、夹脊电针对脊髓损伤大鼠功能康复的影响[J].中华针灸电子杂志,2015,4(1):7—12.
- [16] 韩清民,谢杰,柴生颢,等.电针督脉对实验性脊髓损伤大鼠水通道蛋白-4的影响[J].中国中西医结合杂志,2005,25(7):637—639.
- [17] 赖焕玲,梁志健,吴清和,等.不同灌注速度及方法对大鼠膀胱容量、压力及神经传入电活动测定的影响[J].中国病理生理杂志,2015,31(2):379—384.
- [18] Nomura J, Matsumoto K, Iguchi-Ariga SM, et al. Mitochondria-independent induction of Fas-mediated apoptosis by MSSP[J]. Oncol Rep, 2005, 14(5):1305—1309.
- [19] Snigdha S, Smith ED, Prieto GA, et al. Caspase-3 activation as a bifurcation point between plasticity and cell death[J]. Neurosci Bull, 2012, 28(1):14—24.
- [20] 李晓宁,刘玲玲.电针对大鼠脊髓损伤后细胞凋亡 Caspase-3 影响的研究[J].中医药信息,2011,28(3):119—121.
- [21] 艾坤,张泓,匡静之,等.电针对骶上脊髓损伤后神经源性膀胱大鼠脊髓组织中神经生长因子和酪氨酸激酶受体 A 表达的影响[J].中国康复医学杂志,2014,29(10):948—950.
- [22] 匡静之,张泓,李景兴,等.脊髓损伤后神经源性膀胱临床治疗与机制的研究探讨[J].湖南中医药大学学报,2014,22(2):267—269.

(上接第 1337 页)

- BDNF-Induced neuromodulation in uninjured and injured spinal cord[J]. Neural Plasticity,2016,2016:1—19.
- [22] Andero R, Choi DC, Ressler KJ. Chapter six - BDNF-TrkB receptor regulation of distributed adult neural plasticity, memory formation, and psychiatric disorders[J]. Progress in Molecular Biology and Translational Science,2014,122:169—192.
- [23] Fu J, Wang H, Deng L, et al. Exercise training promotes functional recovery after spinal cord injury[J]. Neural Plasticity,2016,2016(2):1—7.
- [24] 李萌,陈银海,张慧,等.早期运动训练对脊髓损伤大鼠后肢运动功能影响及相关机制研究[J].中国康复医学杂志,2015,(4):318—323.
- [25] 李惠兰,刘兰群,卢虎英,等.减重步行训练和督脉电针对脊髓损伤大鼠神经营养因子及生长相关蛋白-43 表达的影响[J].中国康复理论与实践,2012,(10):930—933.
- [26] 杨燕兴,李灵玲,刘鹏民,等.电针联合游泳训练对脊髓全横断大鼠脊髓神经营养因子-3 及血清谷丙转氨酶、谷草转氨酶的影响[J].中国康复医学杂志,2016,31(6):641—646.
- [27] Cobianchi S, Arbat-Plana A, Lopez-Alvarez VM, et al. Neuroprotective effects of exercise treatments after injury: the dual role of neurotrophic factors[J]. Curr Neuropharmacol, 2017,15(4):495—518.
- [28] Sandrow-Feinberg HR, Houllé JD. Exercise after spinal cord injury as an agent for neuroprotection, regeneration and rehabilitation[J]. Brain Research,2015,1619:12—21.
- [29] Cao C, Rioultpedotti MS, Migani P, et al. Impairment of TrkB-PSD-95 signaling in Angelman syndrome[J]. Plos Biology,2013,11(2):e1001478.
- [30] Tartaglia N, Du J, Tyler WJ, et al. Protein synthesis-dependent and -independent regulation of hippocampal synapses by brain-derived neurotrophic factor[J]. Journal of Biological Chemistry,2001,276(40):37585—37593.
- [31] Harvey AR, Lovett SJ, Majda BT, et al. Neurotrophic factors for spinal cord repair: Which, where, how and when to apply, and for what period of time?[J]. Brain Research, 2015,1619:36—71.
- [32] Boyce VS, Mendell LM. Neurotrophic factors in spinal cord injury in: Handbook of Experimental Pharmacology [M]. Berlin: Springer Press,2014,220:443—460.
- [33] Awad BI, Carmody MA, Steinmetz MP. Potential role of growth factors in the management of spinal cord injury[J]. World Neurosurgery,2013,83(1):120—131.
- [34] de Leon RD. Could Neurotrophins Replace treadmill training as locomotor therapy following spinal cord injury? focus on "neurotrophic factors promote and enhance locomotor recovery in untrained spinalized cats"[J]. Journal of Neurophysiology,2007,98(4):1845—1846.