

# 胫神经电刺激对脊髓损伤大鼠神经源性膀胱及辣椒素受体表达的影响\*

曹小玉<sup>1</sup> 宋娟<sup>1</sup> 张阿康<sup>1</sup> 高晓平<sup>1,2</sup>

## 摘要

**目的:**研究胫神经电刺激对脊髓损伤大鼠神经源性膀胱及膀胱中辣椒素受体(transient receptor potentia vanilloid 1, TRPV1)通道蛋白表达的变化,以期探究其可能存在的机制。

**方法:**将24只SD大鼠随机分成四组,每组6只:正常组,假手术组,脊髓损伤组,干预组。对于脊髓损伤组及干预组,使用改良Allen's打击法进行脊髓损伤造模。同时在2周后对干预组进行电刺激,每日2次,每次20min,每周5天,持续4周;实验第6周以尿流动力学指标及膀胱组织HE染色衡量干预效果,使用实时定量PCR及Western Blot方法检测膀胱中TRPV1通道蛋白的表达。

**结果:**干预组膀胱顺应性为 $0.05 \pm 0.01$ (ml/cmH<sub>2</sub>O),脊髓损伤组大鼠膀胱顺应性为 $0.03 \pm 0.01$ (ml/cmH<sub>2</sub>O),干预组较脊髓损伤组相比膀胱低顺应状态明显改善( $P < 0.05$ ),膀胱组织炎性细胞浸润明显减轻,与此同时干预组TRPV1通道蛋白在转录及翻译水平均明显升高( $P < 0.05$ )。

**结论:**胫神经电刺激有效促进了脊髓损伤大鼠膀胱中TRPV1通道蛋白的表达,并对于神经源性膀胱功能恢复起到了明显的促进作用。

**关键词** 神经源性膀胱;胫神经电刺激;脊髓损伤;辣椒素受体

**中图分类号:**R454.1, R651.2, R493 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2021)-09-1053-07

Effects of posterior tibial nerve stimulation on neurogenic bladder and TRPV1 expression in rats with spinal cord injury/CAO Xiaoyu, SONG Juan, ZHANG Akang, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2021, 36(9): 1053—1059

## Abstract

**Objective:** To study the changes of posterior tibial nerve stimulation on neurogenic bladder and TRPV1 expression in rats with spinal cord injury and to explore its possible mechanism.

**Method:** Twenty four SD rats were randomly divided into four groups with 6 rats in each group including normal group, sham operation group, spinal cord injury group(SCI group) and intervention group. Spinal cord injury model was established by modified Allen's method and posterior tibial nerve stimulation was performed in SCI group at 2 weeks after modeling (20 minutes twice a day, 5 days a week, lasting 4 weeks). Urodynamic indexes and HE staining of bladder tissue were used to evaluate the therapeutic effect at 6 weeks after modeling. The expression of TRPV1 channel protein in bladder was detected by real-time PCR and Western Blot.

**Result:** The bladder compliance in intervention group was  $0.05 \pm 0.01$ (ml/cmH<sub>2</sub>O), while  $0.03 \pm 0.01$ (ml/cmH<sub>2</sub>O) in SCI group. It suggested that the low compliance of bladder in intervention group significantly improved compared with SCI group( $P < 0.05$ ). And the infiltration of inflammatory cells in bladder tissue was significantly re-

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2021.09.001

\*基金项目:安徽省科技重大专项(17030901029)

1 安徽医科大学第一附属医院康复医学科,安徽省合肥市,230022; 2 通讯作者

第一作者简介:曹小玉,女,硕士研究生; 收稿日期:2021-01-01

duced. At the same time, the level of TRPV1 channel protein in the treatment group was significantly higher than that in the control group( $P<0.05$ ).

**Conclusion:** Posterior tibial nerve stimulation can effectively promote the expression of TRPV1 channel protein in bladder of rats with spinal cord injury, and play a significant role in promoting the recovery of neurogenic bladder function.

**Author's address** Dept. of Rehabilitation Medicine, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei, Anhui, 230022

**Key word** neurogenic bladder; posterior tibial nerve stimulation; spinal cord injury; transient receptor potential vanilloid 1

脊髓损伤可导致运动神经和感觉神经严重且不可逆的功能障碍。全世界大约有200万人患有脊髓损伤<sup>[1]</sup>。有相关研究表明,约95%的脊髓损伤患者会出现神经源性膀胱,其中约50%的患者会出现严重的泌尿系统并发症<sup>[2]</sup>。骶上脊髓损伤后的脊髓休克期,膀胱处于无张力状态,主要表现为膀胱逼尿肌舒张导致的尿潴留,脊髓休克期后,神经源性膀胱随脊髓的继发性损伤进展,可出现神经源性逼尿肌过度活动(neurogenic detrusor overactivity, NDO)和逼尿肌括约肌协同失调(detrusor sphincter dyssynergia, DSD),进而导致膀胱容量和顺应性下降,并增加膀胱逼尿肌的压力,从而出现尿失禁,严重影响患者的生存质量。胫神经包含L4—S3成分的混合神经,同支配膀胱和盆底的神经起自相同的脊髓节段,因此,可以通过电刺激该部位改善膀胱的功能<sup>[3]</sup>。该方法已于2000年被FDA批准用于临床,但对其作用机制仍缺乏更深层次的研究。

相关研究表明,扩张激活尿路上皮表达的瞬时受体电位(transient receptor potential, TRP)通道,释放ATP,然后作用于尿路上皮下感觉神经上的嘌呤能受体,向中枢神经系统传递感觉和/或伤害性信号<sup>[4]</sup>。尿路上皮和膀胱感觉神经纤维可表达TRPV1通道蛋白,并被多种刺激激活<sup>[5]</sup>。本研究设想胫神经电刺激可通过调节TRPV1通道改善脊髓损伤大鼠的神经源性膀胱。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物和分组

24只SPF级雌性SD大鼠,年龄2个月,体重(220±20)g,由安徽省实验动物中心提供,饲养于安徽医科大学动物实验中心,室内温度(22±2)℃,昼

夜12/12。将24只SD大鼠适应性饲养2周后使用随机数字表法分为4组( $n=6$ ):正常组、假手术组、脊髓损伤组、干预组。本实验由安徽医科大学动物伦理委员会批准。

### 1.2 脊髓损伤造模

脊髓损伤组和干预组采用10%水合氯醛麻醉大鼠后,固定并备皮,定位胸10椎体,以T10棘突为中心沿背侧正中线纵行作一长约3cm切口,钝性分离筋膜及肌肉组织,显露相邻上下胸椎的棘突和椎板。用咬骨钳小心去除T10椎板和两侧棘突并暴露硬脊膜。本研究采用改良Allen's打击法进行脊髓损伤造模<sup>[6]</sup>。将一根10g重的直径5mm金属棒从50mm的高度跌落,使暴露的脊髓受到50g/cm的冲击伤,即刻见大鼠双下肢抽搐,尾巴甩动,随后松弛。建模中可见大鼠脊髓硬膜下出现血肿,充分止血后以明胶海绵填充并逐层缝合肌肉、皮下组织及皮肤。脊髓损伤造模成功标志:大鼠BBB评分为0分,术后12h大鼠下腹部可触及隆起膀胱。术后大鼠在加热毯上至苏醒后放回单笼饲养,每2日更换垫料。术后1周予大鼠大腿内侧每日肌注适量阿莫西林抗感染处理。术后1—2周每日辅助排尿排便两次(Crede手法)<sup>[7]</sup>,并记录尿量及观察排尿习惯。假手术组同样暴露脊髓后直接缝合,其余同上。

### 1.3 胫神经电刺激干预

假手术组、脊髓损伤组和干预组在脊髓损伤造模后植入自制铂神经袖套电极<sup>[8]</sup>。从小腿内侧开一个头侧到脚踝约2cm的手术切口,钝性分离小腿肌肉暴露胫后神经,植入双极电极(电极间距离=5mm)。电极的远端穿过皮下,从颈后部取出。最后,用3/0缝线将电极固定在皮肤上。伤口分两层缝合。电极连接到便携式电刺激器(P2-9632,凡科,中

国),它可以不同的振幅和频率提供恒定电流脉冲(0.2ms,方形脉冲)。选择性电刺激足底内侧和外侧支是通过在起始切口处小心地分割胫神经主干来实现的。然后将神经电极放在任何一个分支上,通过6-0缝线固定。刺激幅度缓慢增加,以确认可观察到的足部抽搐。刺激诱发的脚趾和外侧趾的抽搐分别表明足底内侧支和外侧支的选择性激活。待休克期过后约脊髓损伤后第15天开始电刺激,使用便携式电刺激器进行2次/d、20min/次的刺激,持续28天,周末休息。对于假手术组的大鼠,将电极仅连接到便携式刺激器上,但电源按钮仍然关闭。只有干预组接受电刺激干预。所传递的刺激是双相对称脉冲,频率为20Hz,脉冲持续时间为0.1ms,占空比为6s开,3s关。单个大鼠的刺激幅度是可变的。它们被设置为诱导可见后肢运动的值的300%。在刺激过程中,大鼠没有表现出任何不适,正常给予食物和水。

#### 1.4 BBB评分(Basso, Beattie Bresnahan locomotor rating scale, BBB scale)

各组大鼠运动评分采用BBB评分进行评估<sup>[9]</sup>。评估时将大鼠放在开放的围栏中,由2名观察者根据BBB评分标准进行评分,旨在确定胸部脊髓损伤后的后肢运动恢复,0表示没有后肢运动,21代表正常大鼠的运动。动物试验在受伤后7天开始,每周进行,持续6周。

#### 1.5 尿动力学检查

在干预组大鼠电刺激干预4周后,对4组大鼠进行清醒状态下的尿动力学检查。大鼠麻醉后,在腹部中线切口暴露膀胱。于膀胱顶部造瘘,然后将3F硬膜外麻醉导管的尖端(预处理成项圈形状)植入,并在显微镜下对导管进行荷包缝合,缝合后用盐水填充膀胱至泄漏点,以确保植入部位不会发生泄漏;导管另一端穿出,腹部分两层缝合并固定导管。待大鼠复苏后将其置于代谢笼中,将导管一端通过T形旋塞连接到微量注射泵(WZ-50C6,史密斯,中国)和压力传感器(RM6240E,成仪,中国),以便将

室温盐水注入膀胱并记录膀胱内压力。使用EM6240E信号采集器及处理系统2.5版采集尿动力学相关指标并处理。每次输液开始前,人工排空膀胱。用微量注射泵将室温生理盐水以0.1ml/min的速度持续注入膀胱。记录每只大鼠60—120min的可重复排尿周期,平均包含3—4次排尿事件,记录膀胱内压变化以评估和比较不同实验组的尿动力学参数,排尿率通过计算排尿量与膀胱最大容量比值得出。以下参数用于评估膀胱功能:膀胱基础压力(cmH<sub>2</sub>O)、膀胱最大压力(cmH<sub>2</sub>O)、漏尿点压力(cmH<sub>2</sub>O)、膀胱最大容量(ml)、排尿率(%)、膀胱顺应性(ml/cmH<sub>2</sub>O)。

#### 1.6 HE染色

膀胱测量完成后,使用10%水合氯醛对大鼠进行过量麻醉,剖取膀胱,用冰生理盐水冲洗后,在冰上截取膀胱逼尿肌平滑肌1mm×1mm,置于4%多聚甲醛中固定48h以上后行HE染色,并于×200倍光镜(BX53,OLUMPUS,日本)下观察染色结果。

#### 1.7 实时荧光定量PCR

HE染色取材后将剩余膀胱组织放入冻存管中,存放于-80℃低温冰箱,用于检测。根据制造商的说明,使用TRIpure裂解液(RP1001, BioTeke, 北京)从样本中提取总RNA,并用紫外分光光度计(NANO 2000, Thermo, 美国)NANO 2000测定各样本中RNA的浓度。将上述所得到的RNA样本使用PCR仪器进行反转录以得到对应的cDNA,使用荧光定量仪(Exicycler™ 96, BIONEER公司, 韩国)进行荧光定量分析。引物的详细序列位于表1。每种标记与β-actin基因的比率用于统计分析,再将实验结果利用2<sup>-ΔΔCT</sup>方法进行分析。

#### 1.8 蛋白免疫印迹 Western Blot

将-80℃冰箱中保存的膀胱组织置于室温中融化,根据每个样本的质量及体积加入相应体积的蛋白裂解液,在低温冷冻离心机中分离提取蛋白提取物,用BCA蛋白浓度测定试剂盒(Wanleibio, WLA004, 中国)进行蛋白定量。将等量的分离的蛋

表1 实时定量PCR引物列表

|         | Forward                   | Reverse                   |
|---------|---------------------------|---------------------------|
| TRPV1   | TCTTCCGAGGGATTCAATAT      | CCACATACTCCTTGCGTTG       |
| β-actin | GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTAGC | GGCCGGACTCATCGTACTCCTGCTT |

白质在 10%SDS-PAGE 上分离并转移到 PVDF 膜 (Millipore, IPVH00010, 美国) 上, 将其在室温下用 TBST 缓冲液配置的 5% 脱脂奶粉封闭, 而后分别孵育一抗, 并进一步与羊抗兔 IgG-HRP (Wanleibio, WLA023, 中国) 进行二抗孵育。用 ECL 化学发光试剂盒 (Wanleibio, WLA003, 中国) 显影。将显影后的 PVDF 膜进行抗体剥离, 并依次进行封闭、孵育内参  $\beta$ -actin、孵育二抗、显影等步骤。最后将胶片进行扫描, 用凝胶图像处理系统 (Gel-Pro-Analyzer 软件) 分析目标条带的光密度。

### 1.9 统计学分析

运用 SPSS 20.0 统计软件进行统计分析, 计量资料以均数 $\pm$ 标准差表示, 结果采用单一因素方差分析,  $P<0.05$  为差异有显著性意义。

## 2 结果

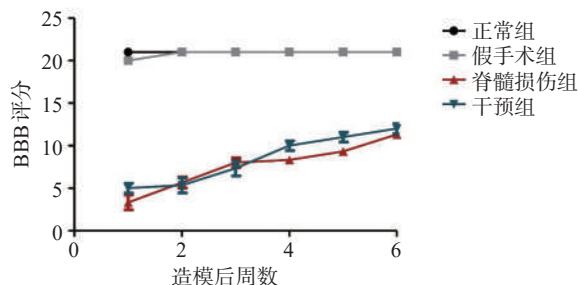
### 2.1 改良 Allen's 打击法成功建立了脊髓损伤模型

本实验造模采用改良 Allen's 打击法制造脊髓损伤模型, 为了验证造模是否成功, 我们分别于造模后 1、2、3、4、5 及 6 周进行了大鼠下肢 BBB 评分。造模后 1 周 BBB 评分结果 (图 1) 说明, 干预组与脊髓损伤组大鼠脊髓损伤模型建立成功, 与正常组和假手术组相比, 差异有显著性意义。术后 6 周干预组及脊髓损伤组大鼠 BBB 评分均较前增加, 说明大鼠下肢功能较前有所恢复, 但两组间差异无显著性意义, 并不能说明胫神经电刺激改善了脊髓损伤大鼠下肢运动功能。

采用 BBB 评分对其进行每周评估, 造模后 1 周脊髓损伤组及干预组较正常组及假手术组 BBB 评分均明显降低, 差异具有显著性意义 ( $P<0.05$ )。造模后 6 周干预组与脊髓损伤组 BBB 评分均较前增加, 但两组间差异无显著性意义 ( $P>0.05$ )。

### 2.2 胫神经电刺激改善了脊髓损伤大鼠膀胱的低顺应性状态

图 1 四组大鼠双下肢运动情况



尿流动力学结果 (表 2) 显示: 假手术组与正常组相比, 尿流动力学相关指标  $P>0.05$ , 无显著性意义, 排除无关变量影响。脊髓损伤组分别与正常组相比, 膀胱基础压力, 膀胱最大压力, 漏尿点压力均明显升高, 膀胱最大容量升高, 排尿效率降低, 残余尿量升高, 膀胱顺应性降低 ( $P<0.05$ )。干预组与脊髓损伤组相比, 膀胱基础压力, 膀胱最大压力, 漏尿点压力降低, 膀胱最大容量降低, 排尿效率升高, 残余尿量降低, 膀胱顺应性降低 ( $P<0.05$ )。从尿流动力学结果可以看出, 在膀胱充盈过程中, 脊髓损伤组膀胱内压变化较正常组及假手术组升高明显, 呈低顺应膀胱状态; 而干预组较脊髓损伤组升高幅度降低。提示胫神经电刺激可改善脊髓损伤大鼠膀胱的低顺应性状态。

### 2.3 胫神经电刺激明显改善脊髓损伤大鼠膀胱组织炎性细胞浸润

肉眼观察膀胱及上尿路的大体形态可发现: 与正常组及假手术组相比, 脊髓损伤组与干预组大鼠的膀胱体积明显增大, 膀胱壁粗糙、增厚, 部分大鼠的输尿管出现明显扩张, 肾盂有少量积水, 尤以脊髓损伤组大鼠明显。光镜下观察四组大鼠膀胱粘膜层组织形态学如图 2 所示: 正常组和假手术组大鼠移行上皮细胞 5—7 层, 整齐紧密排列, 固有膜完整; 脊

表 2 尿流动力学指标比较

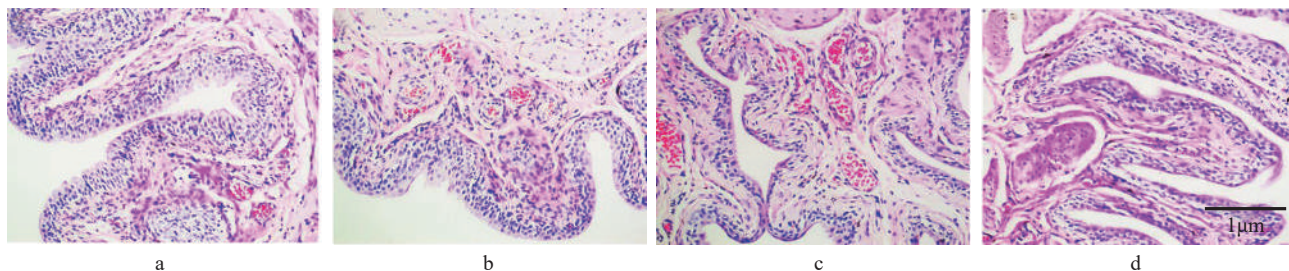
( $\bar{x}\pm s$ )

| 组别    | 例数 | 膀胱基础压力<br>(cmH <sub>2</sub> O) | 膀胱最大压力<br>(cmH <sub>2</sub> O) | 漏尿点压力<br>(cmH <sub>2</sub> O) | 膀胱最大容量<br>(ml)               | 排尿率<br>(%)                  | 膀胱顺应性<br>(ml/cmH <sub>2</sub> O) |
|-------|----|--------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|------------------------------|-----------------------------|----------------------------------|
| 正常组   | 6  | 7.25 $\pm$ 1.36                | 24.58 $\pm$ 5.33               | 17.76 $\pm$ 0.68              | 1.27 $\pm$ 0.35              | 94.1 $\pm$ 4.4              | 0.07 $\pm$ 0.01                  |
| 假手术组  | 6  | 8.02 $\pm$ 1.85                | 25.87 $\pm$ 4.46               | 18.46 $\pm$ 1.35              | 1.35 $\pm$ 0.39              | 93.3 $\pm$ 4.7              | 0.07 $\pm$ 0.01                  |
| 脊髓损伤组 | 6  | 20.52 $\pm$ 3.69 <sup>①</sup>  | 46.74 $\pm$ 8.36 <sup>①</sup>  | 37.58 $\pm$ 8.58 <sup>①</sup> | 3.58 $\pm$ 0.87 <sup>①</sup> | 23.6 $\pm$ 6.8 <sup>①</sup> | 0.03 $\pm$ 0.01 <sup>①</sup>     |
| 干预组   | 6  | 14.68 $\pm$ 2.74 <sup>②</sup>  | 34.68 $\pm$ 5.64 <sup>②</sup>  | 24.56 $\pm$ 3.57 <sup>②</sup> | 2.44 $\pm$ 0.56 <sup>②</sup> | 48.6 $\pm$ 7.3 <sup>②</sup> | 0.05 $\pm$ 0.01 <sup>②</sup>     |

注: ①脊髓损伤组与正常组比  $P<0.05$ , ②干预组与脊髓损伤组比  $P<0.05$

图2 造模6周后各组大鼠膀胱组织HE染色

(×200)



a正常组与b假手术组移行上皮排列整齐,固有层无炎性细胞浸润;c脊髓损伤组移行上皮细胞排列紊乱,细胞层数明显变少,粘膜层较多中性粒细胞炎性浸润及微血管破裂出血;d干预组较脊髓损伤组上皮细胞排列较整齐,粘膜层中性粒细胞等炎性浸润减少

髓损伤组大鼠膀胱的移行上皮细胞层数明显减少,细胞排列紊乱,固有膜被破坏,细胞间隙明显增大,固有层细胞中较多中性粒细胞及单核细胞浸润,组织水肿明显,部分区域伴有微血管破裂出血改变,红细胞明显增多;与脊髓损伤组比较,干预组上皮细胞层数稍多,细胞排列较为整齐,固有层的炎症反应程度有所好转,单核细胞浸润数量减少,组织的水肿程度有所减轻,血管破裂情况也较轻。

#### 2.4 胫神经电刺激干预促进了脊髓损伤大鼠膀胱中TRPV1 mRNA的增加

我们采用实时定量PCR检测了造模后6周各组大鼠膀胱中TRPV1转录水平的变化,如图3。结果表明,在膀胱中,脊髓损伤组及干预组大鼠TRPV1的mRNA较正常组和假手术组均明显降低,差异均有显著性意义,这说明脊髓损伤使大鼠膀胱中TRPV1的mRNA降低。而干预组TRPV1的mRNA较脊髓损伤组有所增加,说明胫神经电刺激促进了脊髓损伤大鼠膀胱中TRPV1 mRNA的增加。

#### 2.5 胫神经电刺激增加了脊髓损伤大鼠膀胱

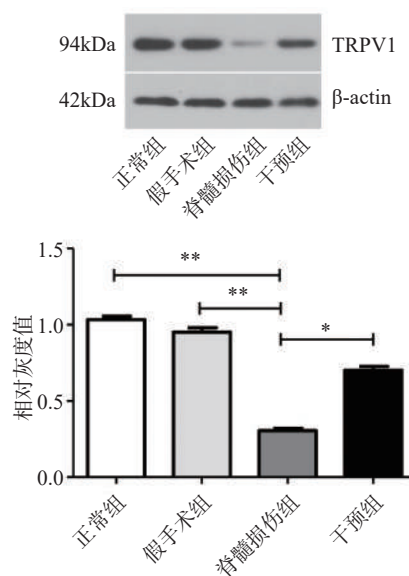
#### TRPV1蛋白的表达量

我们还利用Western Blot法检测了造模后6周各组大鼠TRPV1在蛋白表达水平的变化,实验结果如图4。结果表明,造模后6周,在膀胱中,脊髓损伤组及干预组大鼠TRPV1的蛋白表达均较正常组和假手术组有明显降低,差异有显著性意义,这说明脊髓损伤降低了大鼠膀胱中TRPV1的蛋白表达。而干预组与脊髓损伤组比较,TRPV1蛋白表达有所增加,差异有显著性意义,这说明胫神经电刺激促进了脊髓损伤大鼠膀胱中TRPV1蛋白表达的增加。

### 3 讨论

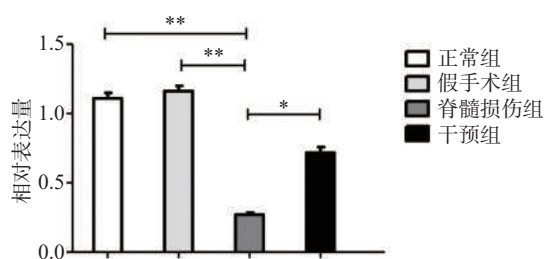
神经源性膀胱是脊髓损伤后最常见的功能障碍

图4 造模后6周各组大鼠膀胱中TRPV1蛋白表达水平



β-actin作为内参。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$

图3 造模后6周各组大鼠膀胱中TRPV1的mRNA水平



\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$

碍,主要表现为储尿或排尿功能障碍,进而产生一系列下尿路症状及并发症,而其引起的肾功能衰竭是导致脊髓损伤患者死亡的最主要原因。目前临床上对神经源性膀胱的治疗手段主要包括药物治疗、行为治疗、盆底肌功能训练、生物反馈、盆底电刺激及手术治疗等。胫神经电刺激是一种治疗膀胱功能障碍的电调节技术,该技术安全有效,且无创或微创、便于患者操作,在临床上已得到了较为普遍的应用。Schneider MP等<sup>[11]</sup>通过系统回顾总结,认为该治疗方法对神经源性下尿路功能障碍是有效的,一般认为其通过调节排尿反射的脊髓传入来改善膀胱功能,阻止神经源性膀胱病理反射的发展<sup>[10]</sup>,但对其治疗神经源性膀胱的作用机制缺乏更深层次的研究。本研究将胫神经电刺激作用于大鼠脊髓损伤后神经源性膀胱的治疗,并观察其疗效作用,探讨其可能的作用机制。

已有研究证实,改良Allen's打击法是一种简便可靠且准确性高的大鼠脊髓损伤造模方法<sup>[12]</sup>,本实验采用改良Allen's打击法成功建立了大鼠脊髓损伤模型。而BBB评分是一种通过评估脊髓损伤大鼠后肢恢复过程中的行为学变化,体现脊髓损伤恢复的全过程。因其能够准确反映大鼠后肢的细微变化,如尾部上翘,后爪位置等,且评分结果与损伤程度有明显的相关性,故可通过BBB评分评估脊髓损伤的程度及造模是否成功。本研究发现造模后6周脊髓损伤组大鼠BBB评分较正常组相比明显下降,证明大鼠脊髓损伤模型成功建立。

有研究<sup>[13-14]</sup>发现,脊髓损伤后大鼠膀胱上皮细胞会有不同程度的排列紊乱、炎性浸润、细胞充血及脱落样改变等变化,固有层也会出现出血、细胞结构破坏、散在肥大细胞等情况,可能与膀胱的失神经支配、失用、营养障碍等有关。本研究HE染色结果发现脊髓损伤组大鼠较正常组膀胱移行上皮细胞排列紊乱,层数减少,且固有层炎性细胞浸润,考虑其形态学变化可能与脊髓损伤大鼠膀胱呈低顺应性状态时,出现的尿失禁、输尿管反流等因素有关<sup>[15]</sup>。干预组大鼠较脊髓损伤组上述改变明显好转,说明当脊髓损伤大鼠膀胱呈低顺应性状态时,胫神经电刺激可能会刺激膀胱组织,减轻甚至恢复这种组织形态学损伤,从而改善神经源性低顺应性膀胱的功能。

瞬时受体电位TRP离子通道是一类在外周和中枢神经系统分布很广泛的通道蛋白。TRP通道家族包含七个亚族,其中来自不同亚科的多个TRP通道,包括TRPV1、TRPV2、TRPV4、TRPM7、TRPM8和TRPA1均在膀胱中表达,在下尿路中具有特定的组织分布,被许多外源和内源性介质激活<sup>[16]</sup>,并且可能在排尿反射中起作用。就其在膀胱功能中的作用而言,TRPV1是研究得最广泛的TRP通道蛋白。有研究<sup>[17]</sup>发现TRPV1通道蛋白可感受膀胱机械膨胀并引起局部反应,从而传导充盈信号至中枢神经,即TRPV1作为机械门控通道可调控排尿和储尿行为,TRPV1表达高低可表示膀胱机械感受功能的强弱。因此,本实验设想胫神经电刺激可通过调控TRPV1的表达改善脊髓损伤大鼠神经源性膀胱功能。尿动力学结果示脊髓损伤组大鼠较正常组大鼠残余尿量增加,排尿效率降低,膀胱呈低顺应性状态,而干预组大鼠残余尿量,排尿效率均有了明显的改善,大鼠储尿及排尿功能的明显改善证明胫神经电刺激可有效改善神经源性膀胱的低顺应性状态。在本研究的WB及PCR结果中发现脊髓损伤组较正常组大鼠膀胱中的TRPV1通道蛋白在转录和翻译水平均明显减少,TRPV1通道蛋白低表达,说明脊髓损伤后TRPV1通道蛋白表达降低,而干预组大鼠膀胱中TRPV1通道蛋白的表达量较脊髓损伤组增加。各组大鼠膀胱中TRPV1通道蛋白在翻译及转录水平的表达差异提示TRPV1通道蛋白参与的神经通路可能是胫神经电刺激改善神经源性膀胱的机制之一。已有大量研究证明了TRPV1通道蛋白在排尿反射中的重要作用。Birder等<sup>[18]</sup>报道TRPV1基因敲除小鼠在膀胱充盈期间膀胱收缩频率较高,反射性排尿较少。此外,TRPV1基因敲除小鼠在急性膀胱炎症期间没有表现出膀胱过度活动,这表明TRPV1参与了炎症诱导的膀胱反射亢进。也有相关研究发现激活TRPV1通道,可以提高神经源性膀胱起搏细胞功能,增强膀胱的机械感受功能,并促进膀胱感觉神经与逼尿肌细胞信号传导联系,从而提高膀胱顺应性<sup>[19]</sup>。

本研究发现胫神经电刺激可改善脊髓损伤后大鼠神经源性膀胱的低顺应性状态,促进排尿功能的恢复;同时发现胫神经电刺激可激活脊髓损伤大鼠

膀胱中TRPV1通道蛋白的表达,提高膀胱机械感受敏感性,增强膀胱与脊髓间的信号传导。由此推断大鼠脊髓损伤后神经源性膀胱的改善可能与TRPV1通道的激活有关,为临床上胫神经电刺激治疗神经源性膀胱提供理论依据。但本研究仍存在一定的局限性,仅研究了胫神经电刺激脊髓损伤大鼠过程中TRPV1这一种通道蛋白表达变化情况,后续仍需要进一步的研究TRPV1通道蛋白上下游信号的表达来探索其具体的作用机制。

### 参考文献

- [1] Gomes-Osman J, Cortes M, Guest J, et al. A systematic review of experimental strategies aimed at improving motor function after acute and chronic spinal cord injury[J]. *J Neurotrauma*, 2016, 33(5):425—438.
- [2] Stampas A, Gustafson K, Korupolu R, et al. Bladder neuromodulation in acute spinal cord injury via transcutaneous tibial nerve stimulation: cystometrogram and autonomic nervous system evidence from a randomized control pilot trial [J]. *Front Neurosci*, 2019, 13:119.
- [3] 刘良乐,戴鸣海,汤呈宣,等.电刺激应用于脊髓损伤后神经源性膀胱治疗的现状与展望[J]. *中国康复医学杂志*, 2017, 32(12):1420—1423.
- [4] 姜先洲,赵海峰.下尿路的神经调控[J]. *山东大学学报(医学版)*, 2018, 56(3):19—23.
- [5] Merrill L, Gonzalez EJ, Girard BM, et al. Receptors, channels, and signalling in the urothelial sensory system in the bladder[J]. *Nat Rev Urol*, 2016, 13(4):193—204.
- [6] 杨超,申才良,宋旒文,等.辛伐他汀促进大鼠脊髓损伤的修复[J]. *安徽医科大学学报*, 2018, 53(4):571—575.
- [7] Ward PJ, Hubscher CH. Persistent polyuria in a rat spinal contusion model[J]. *J Neurotrauma*, 2012, 29(15):2490—2498.
- [8] 金海峰,叶挺,刘杰民,等.骶神经电刺激对大鼠肠道炎症的抑制作用及机制[J]. *中华中医药杂志*, 2019, 34(8):3705—3710.
- [9] 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.
- [10] Gupta P, Ehlert MJ, Sirls LT, et al. Percutaneous tibial nerve stimulation and sacral neuromodulation: an update[J]. *Curr Urol Rep*, 2015, 16(2):4.
- [11] Schneider MP, Gross T, Bachmann LM, et al. Tibial nerve stimulation for treating neurogenic lower urinary tract dysfunction: a systematic review[J]. *Eur Urol*, 2015, 68(5):859—867.
- [12] 吴杨鹏,范筱,张俐.急性脊髓损伤动物模型的建立与评估[J]. *中国组织工程研究*, 2016, 20(49):7341—7348.
- [13] 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.
- [14] 张雨辰,张泓,艾坤,等.大鼠脊髓损伤后神经源性膀胱模型的制备[J]. *中国康复医学杂志*, 2014, 29(6):542—546.
- [15] 邵海涛.大鼠脊髓损伤致神经源性膀胱不同时期膀胱顺应性改变与形态学研究[D].天津医科大学, 2015.
- [16] Deruyver Y, Voets T, Ridder DD, et al. Transient receptor potential channel modulators as pharmacological treatments for lower urinary tract symptoms (LUTS): myth or reality? [J]. *BJU Int*, 2015, 115(5):686—697.
- [17] Franken J, Uvin P, Ridder DD, et al. TRP channels in lower urinary tract dysfunction[J]. *Br J Pharmacol*, 2014, 171(10):2537—2551.
- [18] Birder LA, Nakamura Y, Kiss S, et al. Altered urinary bladder function in mice lacking the vanilloid receptor TRPV1 [J]. *Nat Neurosci*, 2002, 5(9):856—860.
- [19] Birder L, Wolf-Johnston A, Sun Y, et al. Alteration in TRPV1 and Muscarinic (M3) receptor expression and function in idiopathic overactive bladder urothelial cells[J]. *Acta Physiologica (Oxford, England)*, 2013, 207(1):123—129.