

电针对骶上脊髓损伤后大鼠神经源性膀胱及血清外泌体miRNA差异表达的影响*

卓越¹ 艾坤¹ 许明¹ 彭嘉颖¹ 邓石峰¹ 刘琼¹ 周睿璇¹ 张泓^{1,2}

摘要

目的:观察电针对骶上脊髓损伤致尿潴留型神经源性膀胱大鼠的效果,并观察电针对血清外泌体miRNA差异表达的影响。

方法:从48只成年雌性SD大鼠中随机抽取12只为假手术组,剩余36只大鼠进行T8椎体下脊髓完全横断手术造模,制备尿潴留型神经源性膀胱模型,将评估成模大鼠二次随机分为模型组与电针组,各12只。电针组从术后第19天开始干预,共10天。随后,各组行尿流动力学检测后取膀胱组织行HE染色,应用miRNA-seq技术筛选三组血清外泌体中共同差异表达miRNA后,对其靶基因进行生信分析,并行qRT-PCR验证。

结果:与假手术组比,肉眼观下的模型组大鼠膀胱明显肥大,电针组较模型组减轻;与假手术组比,模型组大鼠漏尿点压、灌注时间、膀胱最大容量、膀胱最大压力显著升高($P < 0.01$),而电针组较模型组显著降低($P < 0.01$);HE染色见假手术组膀胱组织基本正常,模型组膀胱病理改变明显,电针组病理改变部分减轻;筛选出三组共同差异表达miRNA共11个,6个上调,5个下调,电针治疗作用主要富集在调节细胞代谢、细胞通讯与信号转导、RNA调控、神经发育及损伤等方面,并与轴突导向、肌动蛋白细胞骨架、自噬、缝隙连接、胆碱能代谢等信号通路相关;qRT-PCR结果表明本测序结果可靠性较高。

结论:本研究初步证实了电针对T8椎体下脊髓损伤致尿潴留型神经源性膀胱的效果,并发现其作用的发挥与影响血清外泌体miRNA差异表达密切相关。此外,筛选出了电针在治疗该病机制中的关键miRNA,并对其靶基因进行了全面的基因功能和通路富集分析,为深入研究电针治疗该病的效应机制提供了科学基础。

关键词 电针;神经源性膀胱;外泌体;微小核糖核酸;生物信息学分析

中图分类号:R245,R681 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2023)-05-0577-12

Efficacy of electroacupuncture in treatment for neurogenic bladder after suprasacral spinal cord injury and its effect on differential expression of serum exosomal miRNA/ZHUO Yue, AI Kun, XU Ming, et al. //Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2023, 38(5): 577—588

Abstract

Objective: To observe the therapeutic effect of electroacupuncture in treatment for urinary retention type neurogenic bladder after suprasacral spinal cord injury and to observe the effect of electroacupuncture on the differential expression of serum exosomal miRNA.

Method: Twelve rats were randomly selected from 48 adult female SD rats as the sham-operated group, and the remaining 36 rats were surgically modelled by complete transection of the spinal cord under the 8th thoracic vertebra to prepare a neurogenic bladder model with urinary retention. The adult rats with successful model were randomized into a model group and an electroacupuncture group, 12 rats each. The electroacupuncture

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2023.05.001

*基金项目:国家自然科学基金面上项目(82274666);湖南省自然科学基金面上项目(2022JJ30036);湖南省教育厅科学研究重点项目(20A363);长沙市自然科学基金项目(kq2007041);湖南省研究生科研创新重点项目(CX20210682);湖南中医药大学中西医结合一流学科项目(2021ZXYJH15,2020ZXYJH37)

1 湖南中医药大学针灸推拿与康复学院,湖南省长沙市,410208; 2 通讯作者

第一作者简介:卓越,男,博士研究生; 收稿日期:2022-04-17

group was given electroacupuncture treatment for 10 days from the 19th day postoperation. Subsequently, the bladder tissues were taken for HE staining after urodynamic testing. The miRNA-seq technique was applied to screen common differentially expressed miRNAs of serum exosomes in the three groups, and their target genes were analyzed by bioinformatic and validated by qRT-PCR.

Result: Compared with the sham-operated group, the bladder in the model group was significantly hypertrophied under visual observation, while the bladder in the electro-acupuncture group was less hypertrophied than that in the model group; compared with the sham-operated group, the leakage point pressure, perfusion time, maximum bladder capacity and maximum bladder pressure in the model group were significantly higher ($P < 0.01$), while the electro-acupuncture group was significantly lower ($P < 0.01$) than that in the model group; HE staining showed that the bladder tissue in the sham-operated group was basically normal, while the bladder tissue in the model group had obvious pathological changes which were partially alleviated in the electroacupuncture group. The miRNA-seq technique revealed a total of 11 differentially expressed miRNAs in the three groups, in which 6 were up-regulated and 5 were down-regulated, and the therapeutic effects of electroacupuncture were mainly enriched in the regulation of cell metabolism, cell communication and signal transduction, RNA regulation, neurological development & injury, and were associated with axon guidance, actin backbone, autophagy, gap linkage and cholinergic metabolism pathways. In addition, the qRT-PCR indicated that the sequencing results were highly reliable.

Conclusion: This study initially confirmed the promising therapeutic effect of electroacupuncture on neurogenic bladder caused by spinal cord injury under the 8th thoracic vertebra, and found that its therapeutic effect was closely related to the differential expression of serum exosomal miRNA. In addition, the key miRNAs were screened and comprehensive gene function and pathway enrichment analyses of their target genes were performed. The present study provided a scientific basis for in-depth research of electroacupuncture in the treatment of neurogenic bladder.

Author's address College of Acupuncture & Tuina and Rehabilitation, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan, 410208

Key word electroacupuncture; neurogenic bladder; exosomes; microrna; bioinformatic analysis

神经源性膀胱(neurogenic bladder, NB)是神经系统病变引发膀胱和尿道功能障碍,进而产生一系列下尿路症状的综合征,脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)是其重要病因^[1]。目前,全球每年每百万人中就有12到65例SCI患者,且该比例还在不断攀升^[2],约有70%—84%的SCI患者并发NB,成为影响患者生存质量和社会参与的重要因素^[3]。临床上,根据损伤节段不同常将SCI分为骶上脊髓损伤型和骶髓损伤型,前者占比超过八成^[4]。骶上脊髓损伤会导致高位排尿中枢对低位脊髓交感-副交感排尿中枢协调性支配异常,可出现以尿潴留为主要临床症状的逼尿肌-括约肌协同失调型NB,其病程迁延,治疗及康复难度较大,是该领域当前研究重点^[5]。

本团队在前期研究中^[6],通过T8椎体下脊髓完全性横断,建立了尿潴留型NB大鼠模型。电针作为一种传统针刺与现代电刺激结合的中医针灸疗

法,已被广泛应用于膀胱功能障碍疾病的临床治疗中,并显示出疗效可靠、安全便捷、易于接受、能提高患者生存质量的重要优势^[7]。实验研究表明,电针可改善SCI后NB膀胱储排尿功能及部分减轻膀胱病理损害程度,其作用机制与抑制神经元凋亡及其继发性损伤^[8],调节相关神经递质合成与释放^[9],改善膀胱平滑肌的舒缩功能等相关^[10],但其作用程序及效应载体尚不完全明确。

外泌体,是一种细胞主动胞吐分泌的脂质双层膜结构的微囊泡,可稳定存在于各类细胞外液中并携带包括miRNA在内的多种生物分子参与细胞间信息通讯与物质交换,在机体的多种生理病理过程中均具有重要作用^[11]。目前,随着“针刺后血清外泌体”及“针刺网络药”等理论^[12]的提出,外泌体已成为针灸治疗作用上游环节以及效应载体研究的可行方向,电针影响各类疾病中外泌体miRNA差异表达亦

被逐步证实。

因此,电针对于T8椎体下SCI后尿潴留型NB的治疗效果及其对血清外泌体miRNA差异表达的影响值得深入探索,以便为电针治疗该病的具体效应机制提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

雌性SD大鼠48只(根据前期研究中72.2%的成模率计算得出^[6]),SPF级,10—12周龄,体质量250—280g,由湖南医药大学动物实验中心提供与饲养[许可证号:SYXK(湘)2019-0004]。动物在温度24—26℃,湿度50%—70%,12h明暗交替,食水自取的环境下适应性喂养1周后进行分组。首先,按随机数字表法从48只大鼠中抽取12只作为假手术组,剩下的36只大鼠在造模及确定成模后行二次随机,抽取24只分为模型组、电针组,每组12只。本研究中实验动物条件符合《实验动物管理条例》要求,且实验过程中对动物的处置严格依照《关于善待实验动物的指导性意见》执行。本实验方案已获得湖南中医药大学实验动物伦理委员会批准(伦理编号:LL2021091504)。

1.2 主要仪器与试剂

异氟烷(深圳市瑞沃德生命科技有限公司)、青霉素钠(哈药集团有限公司)、乳酸钠林格注射液(安徽环球药业股份有限公司)、苦苹果防舔防咬喷剂(美国Grannick公司)、4%多聚甲醛(上海索莱宝生物科技有限公司)、RNA酶抑制剂及MMLV反转录酶(美国Epicentre公司)、F3导尿管(上海上医康鸽医用器材有限责任公司)、环球牌一次性无菌针灸针(苏州针灸用品有限公司);MP-150多通道生理记录仪(美国BIOPAC公司,MP150-WSW);微量注射泵(浙江史密斯医学仪器有限公司,WZ-50C6);华佗牌电针治疗仪(苏州医疗用品厂有限公司,SDZ-V型)等。

1.3 造模方法及术后管理

手术方法:在Hassan Shaker脊髓横断法^[13]基础上结合本团队前期探索出的改良法^[6,14—15]进行模型制备。具体如下:使用异氟烷吸入法麻醉大鼠;以大鼠头后正中线下沿脊柱棘突依次触摸到的第2个

明显宽大突出处为T10棘突作为骨性标志,再向上倒摸2个棘突的椎体为T8进行定位,本实验中脊髓完全性横断处统一为T8椎体下,约对应脊髓T10节段^[16];切开相应皮肤肌肉,咬开T8椎板及两侧椎弓根,使椎管内脊髓充分暴露,用眼科剪整齐迅速地横断脊髓后行清创止血及逐层缝合;假手术组大鼠仅切开并暴露相应节段棘突与相邻椎弓后缝合。

术后管理:①存活管理:术后立即将大鼠转至电热毯复温;待其苏醒及生命体征平稳后转至单笼饲养。②喂养管理:术后第1天仅予以10ml 5%葡萄糖注射液对口滴食以补充能量,减轻消化及泌尿系统负担;术后2—3天,逐渐辅以少量饲料喂养;术后第4天,逐渐恢复正常喂养。③并发症管理:术后第1—3天,每隔12h皮下注射乳酸钠林格注射液(20ml/kg)以避免电解质紊乱及酸碱失衡,并每隔12h腹腔注射青霉素钠(20万U/只)以抗感染;每日在大鼠后肢喷涂Grannick苦苹果喷雾以预防其自残。④二便管理:术后第1天开始,每隔8h(6:00, 14:00, 22:00)手法辅助大鼠排尿,并配合分阶段少量供水;排尿结束后使用顺时针手法揉按大鼠下腹部5—10min,从而促进排便及避免胃肠胀气。

1.4 模型评估

脊髓休克期及成模时间:大鼠术后即进入脊髓休克期,通常SCI平面越高,脊髓休克期则越长,该时期内大鼠生命体征及模型表征差异较大且不稳定,故只有在脊髓休克期结束后才可产生稳定性较高的实验动物模型。本团队通过前期观察发现该类模型大鼠约在术后1周度过脊髓休克期^[6],并于术后第18天左右趋于稳定成模。因此,剔除不符合该标准的大鼠后,对成模大鼠从术后第19天开始进行干预。

后肢运动功能:造模术后至脊髓休克期内,大鼠后肢运动能力完全性丧失,即在前肢行走时后肢始终处于被动拖拽状态。使用BBB评分(Basso, Beattie, Bresnahan locomotor rating scale, BBB scale)进行评估,其评分范围为0—21分,0分为双后肢活动不可见,满分则代表活动正常^[17]。在本研究中,大鼠术后至脊髓休克期内的BBB评分应为0分;反之,则说明脊髓横断存在不完全或个体差异过大,应予以剔除。

膀胱触诊及排尿功能:造模术后至脊髓休克期,

大鼠膀胱显著胀大,无法自主排尿,需进行手法辅助;而脊髓休克期结束后,该类模型大鼠膀胱仍存在胀大情况,虽较休克期有所减轻,但仍无法恢复正常自主排尿功能,仅偶有下腹部及笼内垫料潮湿,呈以尿潴留为主的症状表现,此类大鼠是本实验的主要纳入对象。反之,若脊髓休克期结束后,大鼠膀胱胀大明显减轻,下腹部及笼内垫料经常性潮湿,漏尿明显,呈尿失禁为主的症状表现,则予以剔除。

健康状态:脊髓横断损伤术后至实验结束期间内,若大鼠出现意外死亡或恢复正常自主排尿功能以及出现反复性严重脓血尿、明显自残或难以愈合性压疮等不良事件,则予以详细记录并剔除。

1.5 干预方法

腧穴定位:本次实验选取次髂、中极和三阴交作为电针穴位,根据国家“十三五”规划统编教材《实验针灸学》中大鼠标准穴位图谱进行定位,并模拟人体腧穴骨度分寸法量取。

干预方案:造模术后第19天开始对各组大鼠进行干预,假手术组、模型组仅捆绑固定,不予电针干预;电针组大鼠先以仰卧位捆绑固定于鼠板上予以电针中极与双侧三阴交;待腹侧穴位干预结束后再将其以俯卧位捆绑固定予以电针双侧次髂,1次/天,共干预10天;使用1.0寸(0.25mm×25mm)无菌针灸针,中极为针头朝向病所(膀胱)斜刺5mm,三阴交直刺5mm,次髂直刺15mm;将电针治疗仪调为疏密波,频率10Hz/50Hz,电流强度以大鼠肢体轻颤并能耐受为度;腹侧中极与三阴交接为一组(三阴交左右两穴隔日交替进行),背侧左右次髂穴为一组,每组均电针干预20min。

1.6 观测指标

尿流动力学:麻醉后固定大鼠并尽量排空其膀胱内尿液,将MP-150测压器与F3导管、微量注射泵相互连通待用;沿大鼠腹前正中中线耻骨联合上1cm处切开并轻挤暴露膀胱后,于膀胱穹窿处剪小口插入F3导管并固定;静置30min后以6.0ml/h速度灌注温0.9%氯化钠溶液。电脑重点记录大鼠尿道口首次液体流出时的膀胱内压(漏尿点压力)以及此刻的灌注量(膀胱最大容量)、此刻的时间(灌注时间)等指标。

HE染色:实验结束后,各组选3只大鼠行膀胱

组织取材,并于冰上剪取0.5cm×0.5cm大小的组织块后,用4%多聚甲醛固定48h,随后用乙醇梯度脱水、浸蜡并包埋,连续切片厚约4μm,每个样本选2张行HE染色后于100倍光镜下观察。

外泌体提取:用红头采血管经腹主动脉收集大鼠全血后室温下静置2h至明显分层;4℃,1200g离心10min后转移上清;再4℃,1800g离心10min收集上层血清;血清样本以4℃,2000g离心30min后收集上清,并经0.22μm滤膜过滤转至聚碳酸酯管内后放入超速离心机;随后,4℃,12000g离心45min收集上清后再次4℃,110000g离心2h;用PBS重悬后再次4℃,100000g超速离心1h;弃上清,收集管底沉淀;用PBS溶解并稀释提取的外泌体沉淀备用。

外泌体鉴定:①使用透射电镜法鉴定外泌体形态;②利用可视化纳米颗粒示踪分析仪Zetaview PMX 110对血清外泌体重悬液进行粒径分析;③Western Blot法检测血清外泌体标记蛋白,BCA法测定外泌体标记蛋白浓度,经制胶、电泳、转印蛋白后,一抗TSG101(1:4000)、CD81(1:2000)、CD9(1:2000),4℃孵育过夜,漂洗后孵育二抗(1:8000)1h后,洗膜,显影。

总RNA提取与质控:加入1ml Trizol吹打混匀血清外泌体于冰上静置5min后,加入氯仿200μl震荡30s于冰上静置15min至出现分层;4℃,13500g离心10min;将上层转移至无酶离心管后加入等体积预冷异丙醇,混匀后室温静置10min后再重复上一步离心过程;弃上清,使用等体积的75%乙醇清洗,再弃上清静置至乙醇挥发;加入无酶水20μl于-80℃备用;使用NanoDrop ND-1000仪测量总RNA准确浓度以及蛋白质污染情况,使用琼脂糖凝胶电泳检测RNA样本完整性。

miRNA文库构建:移除总RNA中rRNAs后,使用TruSeq Stranded Total RNA Library Prep Kit预处理RNA,构建测序文库。应用Agilent 2100 Bioanalyzer进行文库质量测定,混合好不同样品的测序文库,通过0.1M NaOH将文库变性为单链DNA分子,在Illumina flow cell上捕获,原位扩增为簇(cluster),并在Illumina HiSeq测序仪上进行50个循环测序。

测序分析:Illumina NextSeq 500产生的测序数

据为 raw sequencing data,经测序质量控制后将预处理过滤步骤产生的 trimmed data 比对到数据库中所有 miRNA 前体及成熟体序列比对,计算 miRNA 表达水平,采用 RPM 标准化。使用 edgeR 进行组间差异表达分析,设定阈值为 $|\log_2(\text{Fold Change})| \geq 1.5$,且 $P < 0.05$ 来筛选差异表达 miRNA。文库构建与测序分析由数谱(上海)生物科技有限公司完成。

miRNA 靶基因预测及功能分析:使用 miRDB 以及 miRanda 数据库对三组间共同差异表达 miRNA 进行靶基因预测,借助 R 包对差异 miRNA 的靶基因进行 GO 功能富集及 KEGG 通路富集分析。

GO 富集分析探索与差异表达 miRNA 靶基因显著相关生物过程(biological process, BP)、细胞组成(cellular component, CC)以及分子功能(molecular function, MF)。KEGG 分析差异表达 miRNA 靶基因富集的分子信号通路。

差异表达基因验证:使用 qRT-PCR 法对三组间共同差异表达 miRNA 进行验证以保证 miR-Seq 结果准确性。本研究通过选择表达丰度较高且组内均一性较好的 miRNA 进行验证,即 rno-miR-320-3p、rno-miR-20b-5p、rno-miR-30b-3p、rno-miR-142-3p、rno-miR-132-5p、rno-miR-211-5p,引物序列为表 1 所示。选择 U6 为内参,以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算基因相对表达量。

表 1 引物序列

基因名	双向引物序列	退火温度(°C)	产物长度(bp)
U6	F:5'GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT3' R:5'CGCTTCACGAATTTGCGTGCAT3'	60	89
rno-miR-320-3p	GSP:5'GGGAAAAGCTGGGTTGAGA3' R:5'GTGCGTGTCTGGAGTCG3'	60	63
rno-miR-20b-5p	GSP:5'GGACAAAGTGCTCATAGTGC3' R:5'CAGTGCGTGTCTGGAGT3'	60	66
rno-miR-30b-3p	GSP:5'GGCTGGGATGTGGATGTT3' R:5'CAGTGCGTGTCTGGAGT3'	60	64
rno-miR-132-5p	GSP:5'GGACCGTGGCTTTCGATT3' R:5'CAGTGCGTGTCTGGAGT3'	60	62
rno-miR-142-3p	GSP:5'ACCCCTGTAGTGTTCCTACTT3' R:5'GTGCGTGTCTGGAGTCG3'	60	67
rno-miR-211-5p	GSP:5'GGTTCCCTTTGTCATCCT3' R:5'CAGTGCGTGTCTGGAGT3'	60	64

注:GSP 为对应 miRNA 的特异引物,R 是与 RT 引物相匹配的引物。

1.7 统计学分析

使用 SPSS 23.0 统计软件进行数据分析,本次研究中数据结果以均数 $\pm$ 标准差形式表示。计量资料符合正态分布且方差齐,两组比较使用两样本均数 t 检验;三组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较用 LSD 检验;方差不齐时使用塔姆黑尼检验;不符合正态分布时采用秩和检验。以 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义, $P < 0.01$ 为差异有非常显著性意义。

2 结果

2.1 一般结果

假手术组 12 只大鼠一般情况良好,剩余 36 只大鼠在造模术中因失血过多死亡 1 只,术后体温过低死亡 2 只,脊髓休克期内因腹胀死亡 2 只,剩余 31 只造模大鼠度过脊髓休克期并存活。经模型评估不符

合标准而剔除 5 只(反复血尿、难愈压疮、漏尿明显)后,剩余 26 只合格模型大鼠。通过二次随机将 26 只模型大鼠分为模型组与电针组各 12 只,剩余 2 只模型大鼠候补。各组大鼠在术后第 19 天开始的干预至实验结束期间无死亡或不良情况出现。

2.2 膀胱肉眼观结果

与假手术组相比,模型组及电针组大鼠膀胱体积增大、肥厚明显;与模型组相比,电针组大鼠膀胱体积相对减小,肥厚情况相对减轻。

2.3 尿流动力学结果

见图 1。与假手术组相比,模型组及电针组大鼠漏尿点出现时间延迟,漏尿点压力增高;与模型组相比,电针组大鼠漏尿点出现时间相对提前,漏尿点压力相对降低。此外,假手术组大鼠排尿周期平稳规律,排尿效率较高;模型组大鼠排尿周期明显延

长,排尿效率低下;电针组大鼠排尿周期改善,趋于平稳,排尿效率相对提高。

与假手术组相比,模型组大鼠的漏尿点压、灌注时间、膀胱最大容量以及膀胱最大压力显著增大($P < 0.01$);与模型组相比,电针组大鼠的漏尿点压、

灌注时间、膀胱最大容量以及膀胱最大压力显著下降($P < 0.01$)。见图2。

2.4 HE染色结果

假手术组大鼠膀胱组织中移行上皮排列紧密整齐,固有膜完整,无炎性浸润及组织水肿改变,逼尿肌层肌纤维束排列规整、结构紧密,肌间隙弹性纤维丰富,无增生及纤维化改变。模型组大鼠膀胱组织移行上皮排列紊乱,固有膜结构疏松破坏,存在组织水肿及出血性改变,肌纤维排列紊乱,伴局部纤维结缔组织增生;电针组与模型组相比,上皮结构相对规则且完整,固有膜破坏减轻,水肿程度及出血性改变好转,肌纤维排列相对规整,境界清晰,仅少量纤维组织增生。见图3。

2.5 血清外泌体鉴定

图4A所示,透射电镜下观察

图1 各组大鼠尿流动力学压力曲线图

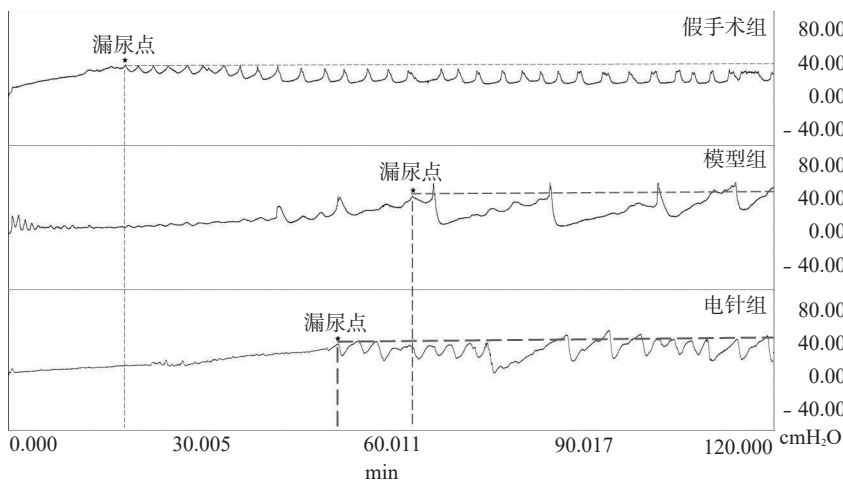
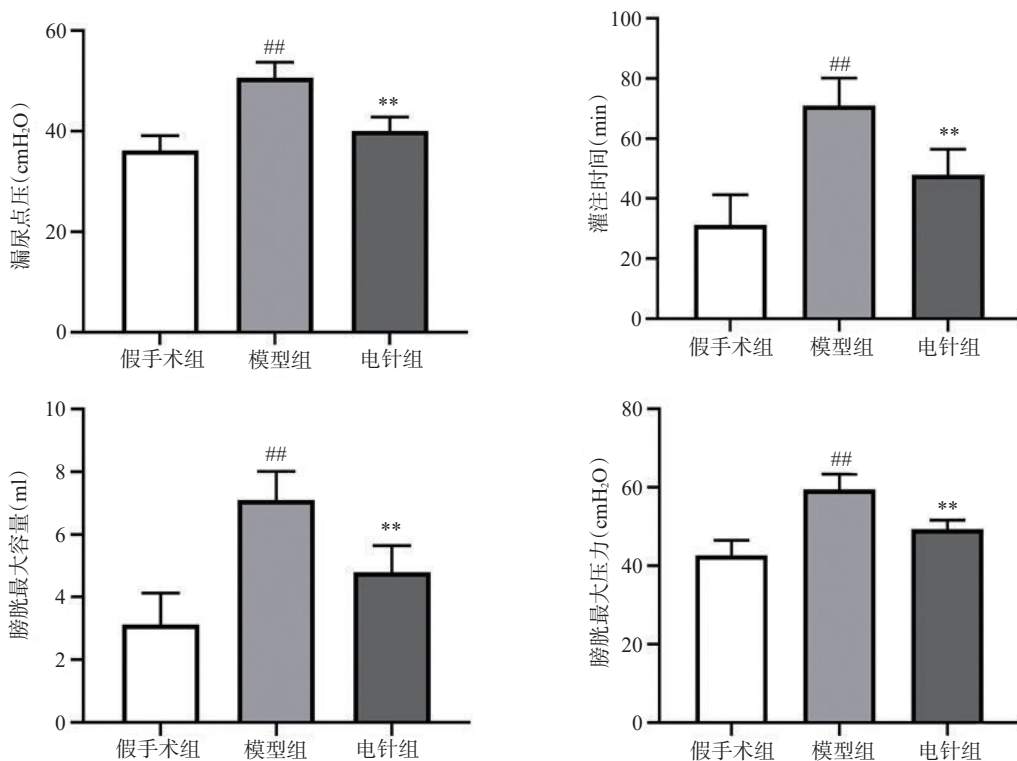


图2 各组大鼠尿流动力学指标比较

($\bar{x} \pm s, n=12$)



注:与假手术组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$;与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

血清外泌体形态,表现为明显膜性边界,并呈外泌体典型的茶托样形态。图4B所示,通过纳米颗粒跟踪分析技术发现,本次研究中外泌体粒径范围集中分布在70—200nm,符合外泌体粒径范围要求。

如图4C所示,Western Blot法检测血清外泌体标记蛋白TSG101、CD81、CD9,结果显示均在外泌体中有明显表达,证明外泌体分离成功。

2.6 差异性表达miRNA筛选

本研究共筛选到74个差异表达miRNA,其中模型组相较于假手术组上调的miRNA有20个,下

调15个(见图5A);电针组相较于模型组上调的miRNA有23个,下调16个(见图5B)。通过取两者交集进一步分析发现,假手术组、模型组、电针组三组间共同差异表达的miRNA有11个(见表2),其中在模型组与假手术组中下调,而在电针组与模型组中上调的miRNA有6个(Up组:rno-miR-351-3p、rno-miR-3064-5p、rno-let-7b-5p、rno-miR-30b-3p、rno-miR-20b-5p、rno-miR-320-3p);在模型组与假手术组中上调,而在电针组与模型组中下调的miRNA有5个(Down组:rno-miR-380-5p、rno-miR-376a、

图3 各组大鼠膀胱组织形态学比较

(HE,×100)

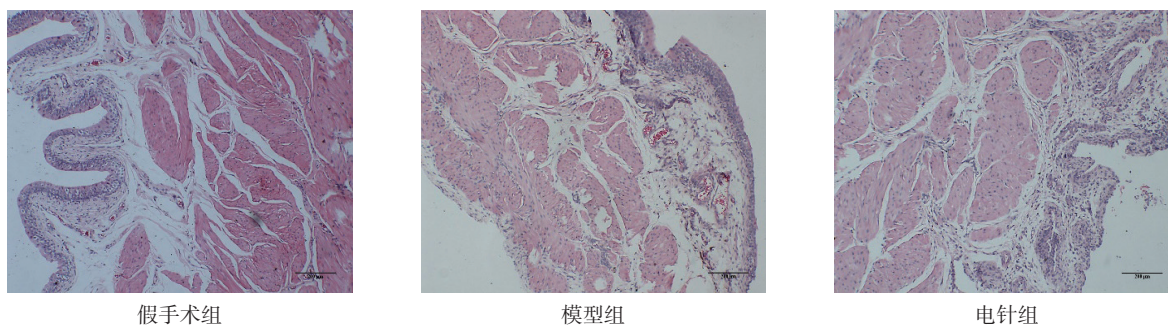


图4 大鼠血清外泌体鉴定

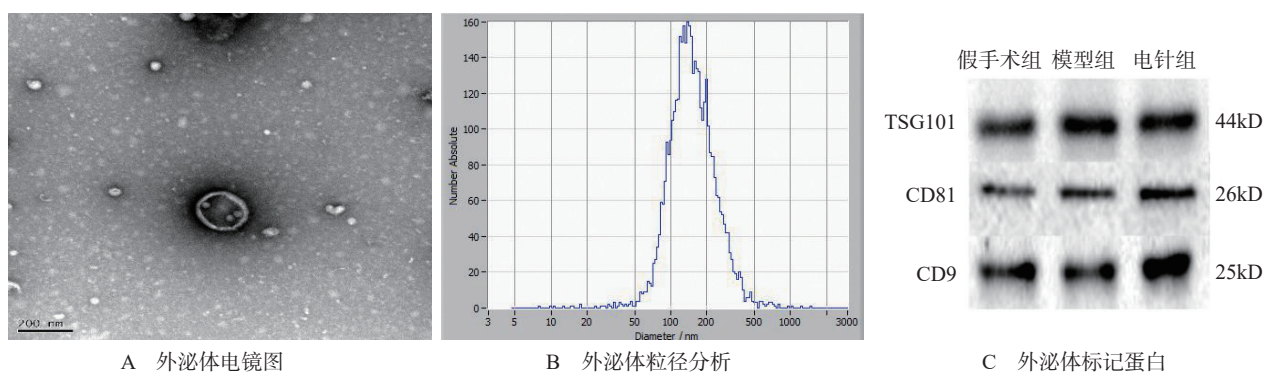
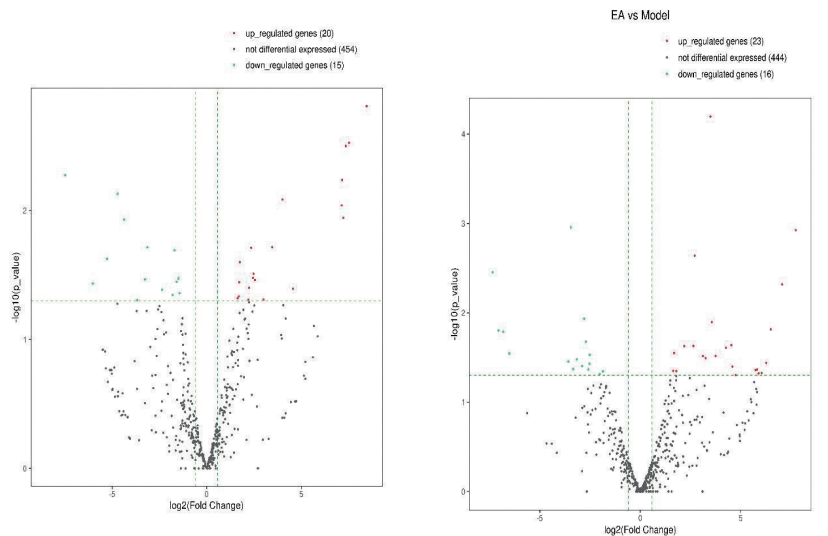


表2 三组间共同差异表达miRNA

组别	miRNA 名称	-log ₂ (Fold Change)/差异倍数		P值	
		模型 vs 假手术	电针 vs 模型	模型 vs 假手术	电针 vs 模型
Up组	rno-miR-351-3p	-7.486	5.890	0.005	0.047
Up组	rno-miR-3064-5p	-6.016	6.263	0.036	0.036
Up组	rno-let-7b-5p	-5.273	4.586	0.023	0.039
Up组	rno-miR-30b-3p	-4.705	4.532	0.007	0.022
Up组	rno-miR-20b-5p	-3.263	3.252	0.034	0.032
Up组	rno-miR-320-3p	-1.589	1.683	0.035	0.028
Down组	rno-miR-380-5p	7.344	-7.353	0.003	0.003
Down组	rno-miR-376a	4.554	-7.053	0.041	0.015
Down组	rno-miR-211-5p	4.002	-3.338	0.008	0.042
Down组	rno-miR-142-3p	2.349	-3.459	0.019	0.001
Down组	rno-miR-132-5p	2.233	-2.791	0.039	0.011

图5 大鼠血清外泌体组间差异表达miRNA火山图



A 模型组与假手术组差异表达miRNA

B 电针组与模型组中差异表达miRNA

rno-miR-211-5p、rno-miR-142-3p、rno-miR-132-5p)。该研究结果表明,电针对骶上脊髓损伤后尿滞留型NB模型大鼠血清外泌体miRNA表达水平有显著影响,其中组间共同差异表达的11个miRNA可能是电针治疗该病的关键基因。

2.7 基因功能和信号通路富集分析

应用miRDB和miRanda数据库对三组间共同差异表达的miRNA进行靶基因预测,然后进行GO分析以及KEGG通路富集分析。分别对在模型组与假手术组中下调、在电针组与模型组中上调的6个差异表达miRNA(Up组)与在模型组与假手术组中上调、在电针组与模型组中下调的5个差异表达miRNA(Down组)进行独立分析。

对Up组靶基因进行GO分析后发现其主要富集在调控细胞代谢,尤其是初级代谢过程、氮素化合物代谢、细胞代谢过程中RNA调控以及离子、蛋白质结合、嘌呤核苷酸结合、核糖核苷酸结合、转录调节器活性等方面(见图6A);KEGG分析显示其主要集中于轴突导向、自噬信号通路、胆碱能代谢信号通路、缝隙链接、FoxO信号通路、白细胞经内皮细胞迁移通路、醛固酮调节钠重吸收、mTOR信号通路、鞘脂蛋白等信号通路(见图6B)。

对Down组靶基因进行GO分析后发现其主要富集在细胞代谢与信号转导正向调控、调控细胞通

讯、神经系统发育及损伤以及离子-蛋白质-酶结合、嘌呤核苷酸结合、核糖核苷酸结合、蛋白激酶活性等方面(见图7A);KEGG分析显示其主要集中于免疫缺陷、轴突导向、肌动蛋白细胞骨架、Hedgehog信号通路、自噬信号通路、磷脂酶D信号通路、Relaxin信号通路、溶酶体、Apelin信号通路、cGMP-PKG等信号通路(见图7B)。

2.8 差异表达基因验证

在Up组与Down组中各选3个表达丰度较高且组内均一性较好的miRNA进行qRT-PCR验证。如图8所示为Up组中rno-miR-320-3p、rno-miR-20b-5p、rno-miR-

30b-3p的三组间基因相对表达量情况,与假手术组相比,模型组中该3个miRNA相对表达量均明显下降(均 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);与模型组相比,电针组中该3个miRNA相对表达量均显著上升(均 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。如图9所示为Down组中rno-miR-142-3p、rno-miR-132-5p、rno-miR-211-5p的三组间基因相对表达量情况,与假手术组相比,模型组中该3个miRNA相对表达量均明显升高(均 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);与模型组相比,电针组中该3个miRNA相对表达量均显著下降(均 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。以上结果与miRNA-Seq趋势一致,表明本实验结果具有较高可靠性。

3 讨论

正常膀胱排尿功能受到高位脑桥-皮质排尿中枢、低位脊髓交感-副交感排尿中枢以及外周神经系统协同支配,外周神经主要包括盆神经(主要支配膀胱逼尿肌及其兴奋性输入,大鼠出自L6-S1骶副交感核,人类出自S2-S4骶副交感核)、阴部神经(主要支配尿道外括约肌,大鼠出自L6-S1神经根,人类出自S2-S4神经根)以及腹下神经(主要支配尿道内括约肌及其兴奋性输入,大鼠出自L1-L2胸腰交感核,人类出自T11-L2胸腰交感核)^[18]。因此,T8椎体下

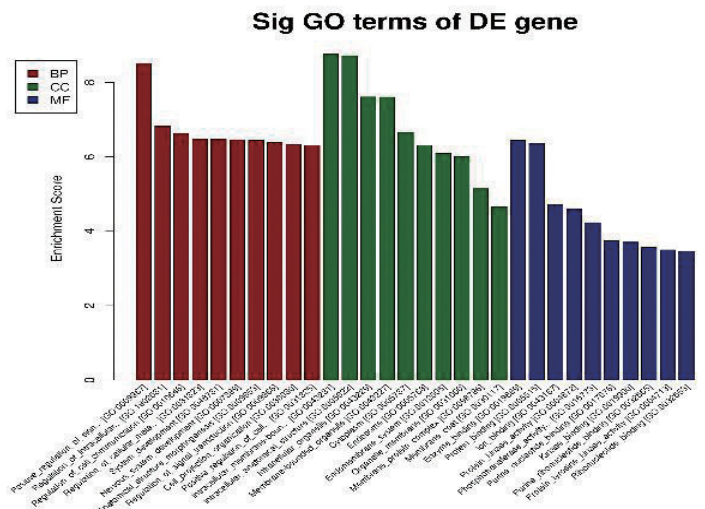


在中医学中,骶上脊髓损伤致尿潴留型NB主要归属于“癃闭”的范畴,而针灸历来是膀胱等下焦疾病的主要中医疗法,如《针灸大成》提出针灸八髎可“主大小便不利”,故本研究中我们选取八髎穴之一的“次髎”以求近道取穴之效;任脉上膀胱募穴之

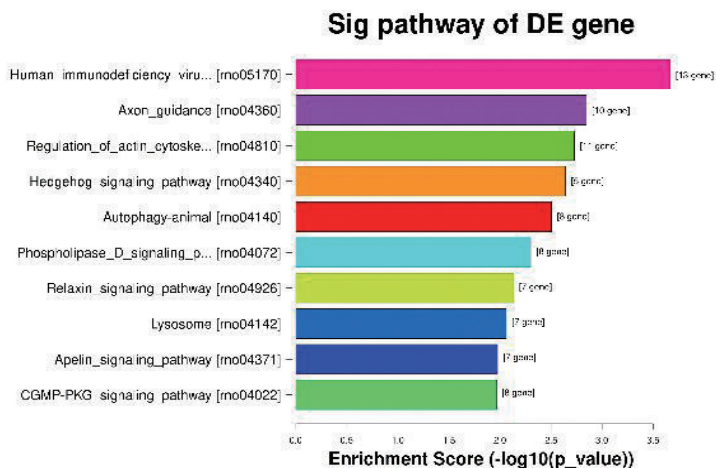
本研究以及国内外众多临床和实验研究^[8-10, 23]均表明电针对于SCI致NB具有良好治疗作用,其作用机制与调节神经、体液等系统网络有关,并具有多系统、多靶点的

www.rehabi.com.cn 585

图7 Down组差异表达miRNA靶基因的生物信息学分析图



A GO功能富集分析



B KEGG通路富集分析

能障碍的关键。已有研究发现,电针能改变外泌体miRNA表达水平并介导信号通路治疗疾病^[27]。本研究也首次证明电针治疗骶上脊髓损伤后尿潴留型NB与影响外泌体miRNA差异表达密切相关。

本研究通过miRNA-seq技术,筛选出了假手术组、模型组及电针组血清外泌体中共同差异表达的miRNA共11个,这11个miRNA可能是电针治疗骶上脊髓损伤后尿潴留型NB的重要靶点以及电针效应发挥的关键环节。其中,miR-320已被发现与小鼠脊髓缺血损伤后神经保护密切相关^[28]。miR-211-5p的下游靶基因为MAPK1,而miR-211-5p/

MAPK1轴在减轻SCI后炎症反应方面具有重要作用^[29];此外,miR-211-5p还被发现可通过直接靶向ATF-6和调节内质网应激来有效缓解SCI后神经元凋亡及相关炎症反应^[30]。值得注意的是,Kashyap等^[31]发现miR-132在膀胱肥大及过度活动中异常表达,且与神经生长因子NGF、各类炎症介质表达具有相关性,抑制miR-132的过度表达是缓解排尿功能障碍的重要靶点。进一步,本研究对共同差异表达miRNA进行靶基因预测及其生物信息学分析后发现电针治疗该病所涉及的系统功能丰富、信号通路多样,符合针灸基本治病特点。其中,基因功能分析中富集到的核糖核苷酸结合、调控细胞代谢与细胞通讯、蛋白激酶活性、神经系统发育及损伤等方面既与本研究思路不谋而合,也与国内外相关研究互为佐证^[32]。qRT-PCR结果也反映了本研究的可靠性与稳定性。此外,已有学者发现SCI后NB的病理本质和治疗关键与轴突导向^[33]、自噬信号通路^[34]、胆碱能代谢信号通路^[35]联系密切,而缝隙链接、肌动蛋白细胞骨架、Relaxin信号通路虽未见直接报道,但其与

膀胱平滑肌细胞兴奋性传递、膜上离子通道开合、突触神经递质释放以及平滑肌舒缩功能有直接关联,极可能是治疗SCI致NB过程中改善膀胱平滑肌功能异常的潜在关键途径。

4 结论

本研究初步证实了电针对T8椎体下SCI致尿潴留型NB的良好治疗效果,同时,筛选和验证了电针治疗该病的关键miRNA,并对其靶基因进行了较全面的生信分析。本研究为针灸治疗该病的效应机制的深入研究提供了科学依据,也为针灸未来细胞

图8 Up组差异表达基因相对表达量情况

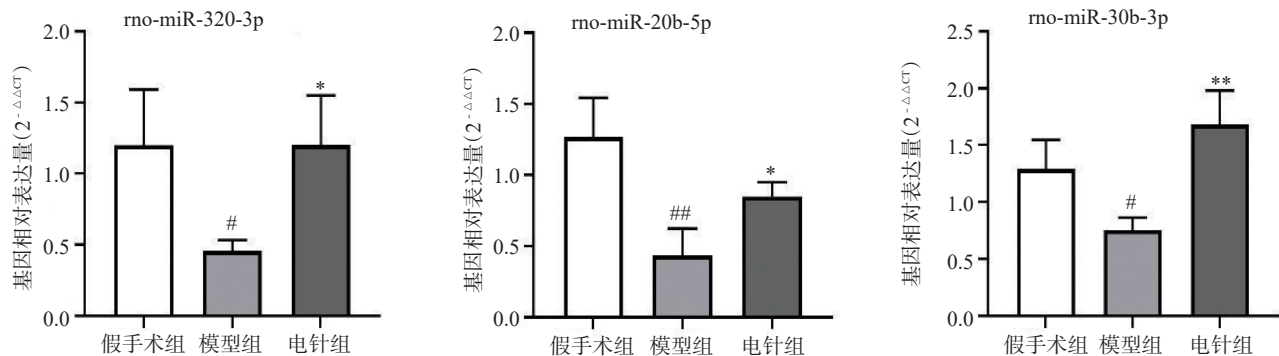
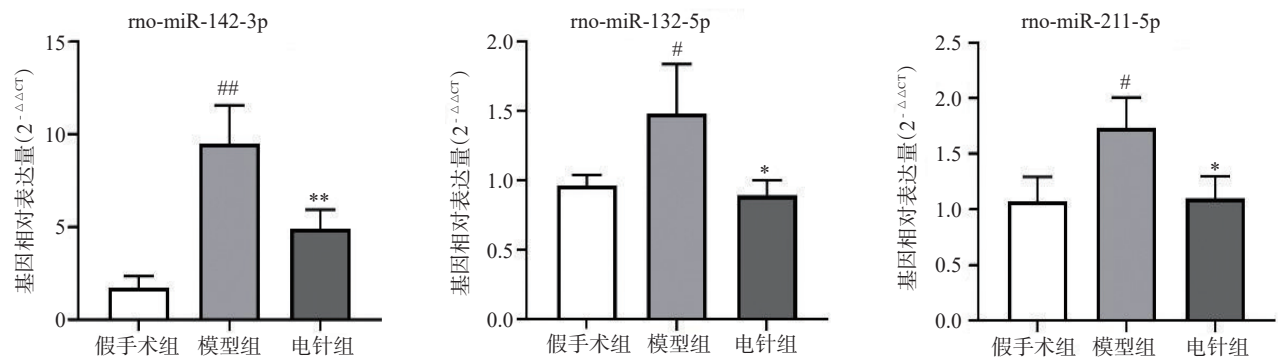
 $(\bar{x} \pm s, n=12)$ 注:与假手术组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$;与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

图9 Down组差异表达基因相对表达量情况

 $(\bar{x} \pm s, n=12)$ 注:与假手术组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$;与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

层面研究和临床转化提供了研究基础,具有一定前瞻性。但受限于实验观察周期尚短,样本量较少等限制,本研究结果还有待更深入的实验研究和临床验证。

参考文献

- [1] Tate DG, Wheeler T, Lane GI, et al. Recommendations for evaluation of neurogenic bladder and bowel dysfunction after spinal cord injury and/or disease[J]. J Spinal Cord Med, 2020, 43(2): 141—164.
- [2] Quadri SA, Farooqui M, Ikram A, et al. Recent update on basic mechanisms of spinal cord injury[J]. Neurosurg Rev, 2020, 43(2): 425—441.
- [3] Hamid R, Averbek MA, Chiang H, et al. Epidemiology and pathophysiology of neurogenic bladder after spinal cord injury[J]. World J Urol, 2018, 36(10): 1517—1527.
- [4] 胥少汀, 郭世级. 脊髓损伤基础与临床[M]. 第3版 北京:人民卫生出版社. 2012.
- [5] Zabbarova IV, Ikeda Y, Carder EJ, et al. Targeting p75 neurotrophin receptors ameliorates spinal cord injury-induced detrusor sphincter dyssynergia in mice[J]. NeuroUrol Urodyn, 2018, 37(8): 2452—2461.
- [6] 卓越, 许明, 邓石峰, 等. 大鼠骶上不同节段脊髓损伤后神经源性膀胱模型比较及尿流动力学分析[J/OL]. 湖南中医药大学学报: 1-11[2022-05-16]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/43.1472.R.20220316.1824.002.html>.
- [7] Liu Z, Liu Y, Xu H, et al. Effect of electroacupuncture on urinary leakage among women with stress urinary incontinence: a randomized clinical trial[J]. JAMA, 2017, 317(24): 2493—2501.
- [8] Liu XM, Xu M, Zhang H, et al. Effects of electroacupuncture on urodynamics, intramedullary apoptosis and bidirectional regulation of neurotrophic factors in neurogenic bladder rats after suprasacral spinal cord injury[J]. World J Acupunct Moxibustion, 2021, 31(2): 121—128.
- [9] 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.
- [10] 艾坤, 刘琼, 许明, 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.

- 膀胱流动力学及逼尿肌垂体腺苷酸环化酶激活肽/环磷酸腺苷/蛋白激酶A信号通路的影响[J]. 针刺研究, 2021, 46(9): 728—734+741.
- [11] Tkach M, Théry C. Communication by extracellular vesicles: where we are and where we need to go[J]. Cell, 2016, 164(6): 1226—1232.
- [12] 李柠岑, 郭义, 陈波, 等. “针刺网络药”——基于针刺网络调节特点的外泌体转化应用策略[J]. 针刺研究, 2021, 46(6): 464—468.
- [13] Shaker H, Mourad MS, Elbially MH, et al. Urinary bladder hyperreflexia: a rat animal model[J]. Neurourol Urodyn, 2003, 22(7): 693—698.
- [14] 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.
- [15] 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.
- [16] Inskip JA, Ramer LM, Ramer MS, et al. Autonomic assessment of animals with spinal cord injury: tools, techniques and translation[J]. Spinal Cord, 2009, 47(1): 2—35.
- [17] 陈向荣, 游思维, 金大地. BBB评分评估脊髓损伤大鼠后肢运动功能的探讨[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2004, 14(9): 547—549.
- [18] Hou SP, Rabchevsky AG. Autonomic consequences of spinal cord injury[J]. Comprehensive Physiology, 2014, 4(4): 1419—1453.
- [19] 金洵, 丁曙晴, 时飞跃, 等. CT三维重建下深刺八髎穴进针角度和效应深度的研究[J]. 针刺研究, 2017, 42(6): 537—541.
- [20] Abdel-Karim AM, Barthlow HG, Bialecki RA, et al. Effects of M274773, a neurokinin-2 receptor antagonist, on bladder function in chronically spinalized rats[J]. J Urol, 2005, 174(4 Pt 1): 1488—1492.
- [21] Brindley GS. The first 500 patients with sacral anterior root stimulator implants: general description[J]. Paraplegia, 1994, 32(12): 795—805.
- [22] 朱振杰, 邢钱伟, 郭爱松, 等. 功能性电刺激治疗脊髓损伤后神经源性膀胱尿潴留的临床疗效观察[J]. 中国地方病防治杂志, 2016, 31(9): 1046—1047.
- [23] 张海涛, 农秋萍, 韦林, 等. 雷火灸结合电针对脊髓损伤后神经源性膀胱患者尿流动力学的影响[J]. 针刺研究, 2021, 46(11): 958—962.
- [24] Cordes KR, Sheehy NT, White MP, et al. miR-145 and miR-143 regulate smooth muscle cell fate and plasticity[J]. Nature, 2009, 460(7256): 705—710.
- [25] Albinsson S, Sessa WC. Can microRNAs control vascular smooth muscle phenotypic modulation and the response to injury[J]. Physiol Genomics, 2011, 43(10): 529—533.
- [26] Park C, Yan W, Ward SM, et al. MicroRNAs dynamically remodel gastrointestinal smooth muscle cells[J]. PLoS One, 2011, 6(4): e18628.
- [27] Huang Y, Yu M, Kuma A, et al. Downregulation of let-7 by electrical acupuncture increases protein synthesis in mice[J]. Front Physiol, 2021, 12: 697139.
- [28] He F, Shi E, Yan L, et al. Inhibition of micro-ribonucleic acid-320 attenuates neurologic injuries after spinal cord ischemia[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2015, 150(2): 398—406.
- [29] An Q, Zhou Z, Xie Y, et al. Knockdown of long non-coding RNA NEAT1 relieves the inflammatory response of spinal cord injury through targeting miR-211-5p/MAPK1 axis[J]. Bioengineered, 2021, 12(1): 2702—2712.
- [30] Zhang H, Piao M, Guo M, et al. MicroRNA-211-5p attenuates spinal cord injury via targeting of activating transcription factor 6[J]. Tissue Cell, 2021, 68: 101459.
- [31] Kashyap M, Pore S, Chancellor M, et al. Bladder overactivity involves overexpression of MicroRNA 132 and nerve growth factor[J]. Life Sci, 2016, 167: 98—104.
- [32] Shang Z, Ou T, Xu J, et al. MicroRNA expression profile in the spinal cord injured rat neurogenic bladder by next-generation sequencing[J]. Transl Androl Urol, 2020, 9(4): 1585—1602.
- [33] Lin H, Hou C, Chen A, et al. Innervation of reconstructed bladder above the level of spinal cord injury for inducing micturition by contractions of the abdomen-to-bladder reflex arc[J]. Neurosurgery, 2010, 66(5): 948—952.
- [34] Zeng FS, Zhang L, Cui BJ, et al. Expression of autophagy in different stages of neurogenic bladder after spinal cord injury in rats[J]. Spinal Cord, 2017, 55(9): 834—839.
- [35] Wada N, Shimizu T, Takai S, et al. Combinational effects of muscarinic receptor inhibition and β 3-adrenoceptor stimulation on neurogenic bladder dysfunction in rats with spinal cord injury[J]. Neurourol Urodyn, 2017, 36(4): 1039—1045.