

·针灸推拿·

本文引用: 张雨辰, 许明, 刘琼, 胡碧浓, 唐丽亚, 张泓, 艾坤. 电针通过调节膀胱及尿道平滑肌中的血清素受体表达改善骶上脊髓损伤大鼠的排尿功能[J]. 湖南中医药大学学报, 2024, 44(2): 307-313.

电针通过调节膀胱及尿道平滑肌中的血清素受体表达改善 骶上脊髓损伤大鼠的排尿功能

张雨辰, 许明, 刘琼, 胡碧浓, 唐丽亚, 张泓*, 艾坤*
湖南中医药大学针灸推拿与康复学院, 湖南长沙 410208

[摘要] 目的 观察电针治疗后骶上脊髓损伤(suprasacral cord injury, SSCI)大鼠的膀胱最大容量(maximum cystometric capacity, MCC)、漏尿点压力(leakage point pressure, LPP), 结合分析逼尿肌、内尿道括约肌(internal urethral sphincter, IUS)中血清素(5-hydroxytryptamine, 5-HT)不同亚型受体的表达, 探讨电针治疗通过突触后5-HT受体调节逼尿肌-尿道括约肌协同失调(detrusor sphincter dyssynergia, DSD)大鼠排尿功能的效应机制。方法 36只SD雌性大鼠, 随机抽取12只作为空白组, 剩余24只采用改良Hassan Shaker脊髓横断法在T10脊髓节段全横断制作SSCI大鼠模型, 成模后随机分为模型组和电针组, 每组12只。电针组取次髂、中极、三阴交穴予持续电针刺刺激40 min, 1次/d, 连续治疗7 d; 空白组与模型组只捆绑不治疗。采用膀胱造瘘法进行尿流动力学检测; 处死大鼠后取逼尿肌和近端尿道组织, 采用Western blot法检测5-HT受体含量。结果 模型组大鼠MCC、LPP显著高于空白组($P<0.01$); 电针组MCC显著低于模型组且高于空白组($P<0.01$), LPP显著低于模型组($P<0.01$)。与空白组比较, 5-HT_{1A}受体在模型组大鼠逼尿肌中表达显著降低($P<0.01$), IUS中显著增高($P<0.01$); 电针组大鼠逼尿肌中5-HT_{1A}受体显著高于模型组($P<0.01$), IUS中5-HT_{1A}受体低于模型组($P<0.05$), 但仍显著高于空白组($P<0.01$)。模型组大鼠逼尿肌中5-HT_{2B}受体表达高于空白组($P<0.05$); 电针组大鼠逼尿肌中5-HT_{2B}受体表达低于模型组和空白组($P<0.05$)。与空白组比较, 5-HT₇受体在模型组大鼠逼尿肌中表达显著降低($P<0.01$), IUS中表达显著增高($P<0.01$); 电针组大鼠逼尿肌和IUS中5-HT₇受体的表达均低于模型组($P<0.05$)。结论 电针刺刺激SSCI后DSD大鼠次髂、三阴交、中极穴引起膀胱及尿道平滑肌中5-HT受体表达变化, 5-HT_{1A}和5-HT_{2B}受体可能通过Ca²⁺流入使平滑肌产生相性和/或强直性收缩, 5-HT₇受体可能通过环磷酸腺苷(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)途径影响大电导Ca²⁺激活K⁺(big-conductance Ca²⁺-activated K⁺, BK)通道活性介导平滑肌松弛, 电针治疗由此抑制逼尿肌过度活动, 增加其收缩能力并协调尿道阻力以改善SSCI后DSD大鼠下尿路功能。

[关键词] 神经源性膀胱; 膀胱平滑肌; 膀胱部分出口梗阻; 外尿道括约肌爆发模式; 尿道Cajal间质细胞; 机械拉伸; 平滑肌张力

[中图分类号] R245.9

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2024.02.019

Improvement of electroacupuncture in urinary function of rats with suprasacral cord injury by regulating the expressions of serotonin receptors in the smooth muscles of the bladder and urethra

ZHANG Yuchen, XU Ming, LIU Qiong, HU Binong, TANG Liya, ZHANG Hong*, AI Kun*
School of Acupuncture-moxibustion, Tuina and Rehabilitation, Hunan University of Chinese Medicine,
Changsha, Hunan 410208, China

[Abstract] **Objective** To observe the maximum cystometric capacity (MCC) and leakage point pressure (LPP) of rats with suprasacral cord injury (SSCI) after electroacupuncture (EA) treatment, and to analyze the expressions of different subtypes of serotonin

[收稿日期] 2023-10-18

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81874510); 国家自然科学基金青年项目(82205255); 湖南省自然科学基金青年项目(82019JJ50437, 2022JJ40312); 湖南省教育厅科研项目(20C1432); 湖南省大学生创新创业训练计划项目(S202110541019)。

[通信作者]* 艾坤, 男, 教授, 博士研究生导师, E-mail: aikun650@qq.com; 张泓, 男, 教授, 博士研究生导师, E-mail: zh5381271@sina.com。

5-hydroxytryptamine (5-HT) receptors in the detrusor and internal urethral sphincter (IUS), so as to explore the effect mechanism of EA in regulating the urinary function of rats with detrusor sphincter dyssynergia (DSD) through postsynaptic 5-HT receptors. **Methods** Twelve of 36 SD female rats were randomly selected as blank group. The remaining 24 rats were made into SSCI models by modified Hassan Shaker spinal cord transection at T10 segment, which were randomized into model group and EA group after modeling, with 12 rats in each. EA group was given continuous EA stimulation at the acupoints of "Ciliao (BL32)" "Zhongji (CV3)" and "Sanyinjiao (SP6)" for 40 min, once a day, for consecutive seven days; blank and model groups were only bound without any treatment. The urodynamic test was performed by cystostomy. After the rats were sacrificed, tissues of the detrusor and proximal urethra were taken, then Western blot was used to check the content of 5-HT receptors in them. **Results** The MCC and LPP of model group were significantly higher than those of blank group ($P<0.01$); the MCC of EA group was significantly lower than that of model group and higher than that of blank group ($P<0.01$), and the LPP was significantly lower than that of model group ($P<0.01$). Compared with blank group, the expression of 5-HT1A receptor showed a significant decrease in the detrusor of model group ($P<0.01$) and a significant increase in the IUS ($P<0.01$). The expression of 5-HT1A receptor in the detrusor of EA group was significantly higher than that of model group ($P<0.01$), and its expression in the IUS of EA group was lower than that of model group ($P<0.05$), but still significantly higher than that of blank group ($P<0.01$). The expression of 5-HT2B receptor in the detrusor of model group was higher than that of blank group ($P<0.05$); its expression in the detrusor of EA group was lower than that of model and blank groups ($P<0.05$). Compared with blank group, the expression of 5-HT7 receptor in the detrusor significantly decreased ($P<0.01$) and that in the IUS significantly increased ($P<0.01$) in the model group; its expression in the detrusor and IUS of EA group was lower than that of model group ($P<0.05$). **Conclusion** EA stimulation at the acupoints of "Ciliao (BL32)" "Sanyinjiao (SP6)" and "Zhongji (CV3)" of DSD rats after SSCI can induce changes in the expressions of 5-HT receptors in the smooth muscles of the bladder and urethra. 5-HT1A and 5-HT2B receptors may cause phasic and/or tonic contractions of smooth muscles through Ca^{2+} influx; 5-HT7 receptor may mediate the smooth muscle relaxation by altering the big conductance Ca^{2+} -activated K^+ (BK) channel activity through cyclic adenosine monophosphate (cAMP) pathway. EA treatment may improve the lower urinary tract function in DSD rats after SSCI by inhibiting overactivity of the detrusor, increasing its contractility, and coordinating urethral resistance through the above mechanism.

[**Keywords**] neurogenic bladder; bladder smooth muscle; partial bladder outlet obstruction; external urethral sphincter bursting activity; urethral Cajal mesenchymal cell; mechanical stretch; smooth muscle tension

骶上脊髓损伤(suprasacral cord injury, SSCI)破坏了协调逼尿肌和尿道功能的正常反射通路。损伤部位在脊髓节段 T6 至 S2 之间,脊髓休克期后储尿过程中膀胱平滑肌(urinary bladder smooth muscle, UBSM)出现不可抑制性收缩,称为膀胱过度活动(overactivity bladder, OAB)或逼尿肌过度活动(detrusor overactivity, DO);排尿过程中出现 UBSM 与外尿道括约肌(external urethral sphincter, EUS)活动不协调,称为逼尿肌-括约肌协同障碍(detrusor sphincter dyssynergia, DSD),两者同时收缩导致排尿效率低下和高残余量^[1]。损伤高于脊髓 T6 水平,则可能出现 UBSM 与内尿道括约肌(internal urethral sphincter, IUS)协同障碍和自主神经反射亢进^[2]。目前,现代医学的治疗措施主要是针对慢性 SSCI 后 DSD 患者,使用抗毒蕈碱药物、肉毒杆菌毒素注射和经皮胫神经刺激(percutaneous tibial nerve stimulation, PTNS)减轻 OAB、尿频、尿失禁的症状,使用骶神经调节(sacral neuromodulation, SNM)和导尿术改善排尿效率低下、尿潴留^[3]。本课题组既往研究证实,电针治疗可以改善 SSCI 后 DSD 大鼠急性期排尿功能障碍^[4-6]。

血清素又名 5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT),是中枢神经系统的一种关键神经递质。中枢神经系统中参与排尿功能的脊髓反射回路表现出密集的 5-HT 能神经支配。5-HT 作为神经递质,大多存在于中枢神经系统之外,通过激活突触后 5-HT 受体发挥效应。KADEKAWA 等^[7]认为,反射性 EUS 爆发模式是大鼠失去脊髓上控制后能部分实现有效排尿的重要原因。而 5-HT1A 受体激动剂应用于 T8 挫伤大鼠,可减少排尿期间 EUS 的紧张性活动,提高排尿效率^[8]。对 5-HT 受体激动剂和拮抗剂的研究认为,5-HT1A 和 5-HT2 受体可诱导膀胱体逼尿肌收缩,5-HT7 受体可诱导膀胱颈松弛^[9]。但其在大鼠下尿路平滑肌(UBSM 和 IUS)中的具体效应机制,以及各受体如何协调配合改善 SSCI 后 DSD 大鼠排尿功能,值得深入探讨。

1 材料与方法

1.1 实验动物

雌性 SD 成年大鼠 36 只,SPF 级,体质量 230~250 g。湖南中医药大学动物实验中心提供,许可证号:SCXK(湘)2019-0004,合格证号:1107271911006889。

分笼饲养于湖南中医药大学动物中心实验室,饲养温度 24~26 ℃,湿度 50%~70%。实验单位使用许可证号:SYXK(湘)2019-0009,伦理审批号:LL2019092303。

1.2 主要试剂、药物和仪器

10%水合氯醛溶液(国药集团化学试剂有限公司,批号:20181120);青霉素钠(华北制药集团有限责任公司,批号:H13020657);象皮生肌膏(湖南中医药大学第一附属医院药剂科自制);5-HT1A受体、5-HT7受体(美国 Abcam 公司,批号:ab64994、ab128892);5-HT2B受体(爱必信生物科技有限公司,批号:abs136963);总蛋白抽提试剂盒、BCA 蛋白定量试剂盒、KC™ 化学发光试剂盒(上海康成生物工程公司,批号:KC-415、KC-430、KC-420)。

多通道生理记录仪(美国 Biopac 公司,型号:MP150-WSW);双通道微量注射泵(史密斯医学仪器有限公司,型号:WZ-50C6);电针治疗仪(苏州医疗用品厂有限公司,型号:SDZ-V);低温离心机(美国 Scilogex 公司,型号:D3024R);酶标仪(美国 Thermo 公司,型号:FC);电泳仪(北京六一仪器厂,型号:DYCZ-24EN)。

1.3 动物分组与造模

1.3.1 分组 36 只大鼠随机编号后,采用随机数字表法分组。首先选取 12 只作为空白组,其余 24 只大鼠在 T10 脊髓节段采用改良 Hassan Shaker 脊髓横断法^[10]制作完全性 SSCI 模型,造模成功后再分为模型组和电针组,每组 12 只。

1.3.2 造模方法 大鼠术前 24 h 禁食不禁水,术前 2 h 腹腔注射 20 万 IU 青霉素钠预防感染。称重后,用 10%水合氯醛 300 mg/kg 行腹腔麻醉,随后将大鼠俯卧固定于鼠板上备皮。采用改良 Hassan Shaker 脊髓横断法制作完全性 SSCI 模型。脊髓横断部位选取 T10 脊髓节段(相当于 T8 椎骨的位置),通过浮肋连接的 T13 作为骨性标志向上具体定位。确定手术部位后做标记并消毒皮肤,以标记点为中心沿背部正中中线做长约 3 cm 的纵向切口,依次切开表皮和皮下筋膜,使用玻璃分针钝性分离两侧竖脊肌,充分暴露棘突和椎板。用显微咬骨器从尾侧向头侧咬除 T8 椎板直至两侧椎弓根,使脊髓充分暴露,用牙科钩沿横断椎间隙横向小幅度钩出脊髓,手术刀切断脊髓后反复刮扫以确定脊髓完全横断,且无神经纤维残留,则表明脊髓完全横断^[11]。最后由内层向外逐层缝合完成手术。手术全程要求严格消毒及无菌操作,术后观察大鼠的生命体征是否平稳。

1.4 术后护理

(1)体温管理:术后立即置于电热毯上防止体温过低,以肛温上升到 37 ℃以上为佳,大鼠均单笼饲

养。(2)抗感染护理:术后 48 h 内,腹腔注射青霉素钠 20 万 U/12 h;48 h 后至术后 7 d,20 万 U/24 h;从术后第 8 天开始,如大鼠出现脓尿、血尿,则注射 20 万 U/24 h 以抗感染,直至尿液澄清;术后每 24 小时在伤口周围使用碘酊进行皮肤消毒 3 次。(3)Crede 手法排尿:每 8 小时(早、中、晚)用 Crede 法对大鼠进行人工辅助排尿,注意手法和力度,防止损伤膀胱;密切观察大鼠的生命体征,每日总饮水量应小于 30 mL,防止因膀胱大量尿潴留导致肾脏及膀胱壁损伤。(4)压疮防护:用 50%乙醇溶液擦拭大鼠的身体(腹部及双下肢)以防止压疮;有压疮形成的用象皮生肌膏涂抹以促进伤口愈合。(5)自残防护:因术后大鼠下肢感觉缺失,部分老鼠会出现撕咬手术部位和下肢的自残行为,可涂上苦苹果防舔防咬喷剂防止自残。

1.5 纳入及剔除标准

1.5.1 纳入标准 (1)运动功能评估:采用 Basso-Beattie-Bresnahan(BBB)评分法^[12],评估大鼠后肢运动功能恢复情况,0 分为双后肢拖行。(2)排尿功能评估:脊髓休克后,虽能不自主、间断地少许排尿,但膀胱内仍潴留大量尿液,Crede 手法辅助排尿时触及胀大的膀胱在两手拇指指腹间滚动并感觉排尿有阻力。同时满足以下两项条件:BBB 评分为 0 分和采用 Crede 手法辅助排尿时感到阻力,则认为模型成功,纳入实验。

1.5.2 剔除标准 造模后,大鼠出现双后肢自主运动、脊髓休克期后完全尿潴留或自主排尿、大鼠自残或死亡的情况,均予以剔除。模型组、电针组各 1 只大鼠因死亡剔除实验,最后纳入 34 只大鼠,进行尿流动力学检测。

1.6 治疗方案

1.6.1 处理方法 术后第 14 天开始实施干预,电针组大鼠取次髎、中极、三阴交穴予持续电针刺激,空白组与模型组大鼠只捆绑固定。均干预 40 min/次,1 次/d,连续 7 d。

1.6.2 取穴方法 参照“十三五”国家规划统编教材《实验针灸学》^[13]大鼠标准穴位图谱定位,并模拟人体腧穴骨度分寸法量取次髎、中极、三阴交穴。

1.6.3 电针方法 (1)针刺方法:各穴均用 30 号 1 寸针直刺,深度分别为次髎 15 mm、中极 5 mm、三阴交 5 mm。(2)穴位对接:大鼠仰卧位固定,中极与三阴交一组(三阴交左右两穴隔日交替进行),电针刺激时间 20 min;俯卧位固定,次髎与大鼠尾根部一组(次髎左右两穴隔日交替进行),电针刺激时间 20 min。(3)电针刺激参数:SDZ-V 型华佗牌电针治疗

仪,疏密波 10/50 Hz,强度以肢体轻颤并耐受为度。

1.7 指标检测

1.7.1 尿流动力学检测 治疗 7 d 后,所有大鼠采用膀胱造瘘法行尿流动力学检测。大鼠麻醉后,用 Crede 手法排空膀胱后进行膀胱造瘘,用眼科剪在膀胱顶部造一小口插入 F3 导尿管,深度 1~2 cm,用 4-0 丝线将切口部位膀胱与导管捆绑固定防止渗漏。将导尿管、MP150-WSW 型 16 通道生理记录仪与 WZ-50C6 微量注射泵通过三通管相连接。始终保持导尿管水平放置,与尿道平行。设置 MP150 主机压力基线为零。打开微量注射泵,灌注速度为 6 mL/h,灌注的生理盐水温度为 25~35 ℃。观察并记录大鼠首次尿液溢出时的膀胱压力即为漏尿点压力(leakage point pressure, LPP),最大膀胱容量(maximum cystometric capacity, MCC)则为从开始灌注到尿液首次溢出期间所灌注的液体总量。

1.7.2 Western blot 检测大鼠逼尿肌和 IUS 中各亚型 5-HT 受体蛋白含量 每组随机选取 6 只,共 18 只大鼠处死;取膀胱和尿道组织各一小块(约 250 mg)放入管中,裂解提取组织总蛋白;配制 BCA 工作液测量蛋白浓度;进行电泳,直至溴酚蓝出胶底部;准备好 Bio-Rad 蛋白转移装置夹板,4 ℃过夜转移;5% BSA 溶液中室温孵育 2 h 以封闭膜;分别加入 5HT1A(1:1 000 稀释)、5HT2B(1:1 000 稀释)、5HT7(1:1 000 稀释)和 GAPDH(1:5 000 稀释),4 ℃过夜;TBST 洗膜,5 min×6 次;采用 TBST 稀释 HRP 标记的二抗(1:5 000 稀释),室温孵育膜 1 h;TBST 洗膜,5 min×6 次;KC™ 化学发光试剂盒显色,以 CCD 相机曝光、扫描拍摄;并用 Image J 分析软件将图片上每个特异条带灰度值数字化,并进行比对。

1.8 统计方法

使用 SPSS 22.0 进行数据处理。计量资料以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,所有资料均进行正态性和方差齐性检验:符合正态分布者采用单因素方差分析;不符合正态分布者采用非参数检验。均以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 尿流动力学检测结果

与空白组相比,模型组大鼠 MCC 和 LPP 显著增大($P<0.01$)。电针组大鼠 MCC 和 LPP 较模型组均显著降低($P<0.01$);且 LPP 较空白组差异无统计学意义($P>0.05$),但 MCC 仍显著高于空白组($P<0.01$)。详见表 1。

表 1 各组大鼠尿流动力学参数比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	MCC/mL	LPP/mmHg
空白组	12	0.435±0.275	19.363±6.309
模型组	11	4.722±1.239**	40.345±10.658**
电针组	11	2.142±0.598** [#]	24.237±12.395 [#]
F 值		29.119	18.010
P 值		0.000	0.000

注:与空白组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.01$ 。

2.2 逼尿肌和 IUS 中各亚型 5-HT 受体蛋白的表达

2.2.1 5-HT1A 蛋白相对表达量比较 与空白组比较,5-HT1A 受体在模型组大鼠逼尿肌中的表达明显降低($P<0.01$),IUS 中表达明显增高($P<0.01$);与模型组比较,电针组大鼠逼尿肌中 5-HT1A 受体显著增高($P<0.01$),IUS 中 5-HT1A 受体降低($P<0.05$),但仍显著高于空白组($P<0.01$)。详见表 2、图 1。

表 2 各组大鼠逼尿肌和 IUS 中 5-HT1A 蛋白表达的比较($n=6, \bar{x}\pm s$)

组别	逼尿肌中 5-HT1A/GAPDH	IUS 中 5-HT1A/GAPDH
空白组	0.743±0.101	0.497±0.093
模型组	0.525±0.106**	0.693±0.058**
电针组	0.709±0.064 [#]	0.603±0.051***

注:与空白组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.05$,*** $P<0.01$ 。

2.2.2 5-HT2B 蛋白相对表达量比较 与空白组比较,5-HT2B 受体在模型组大鼠逼尿肌中表达增高($P<0.05$),在 IUS 中表达降低($P<0.05$);电针组大鼠逼尿肌中 5-HT2B 受体低于模型组和空白组($P<0.05$),IUS 中 5-HT2B 受体与其他组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。详见表 3、图 1。

表 3 各组大鼠逼尿肌和 IUS 中 5-HT2B 蛋白表达的比较($n=6, \bar{x}\pm s$)

组别	逼尿肌中 5-HT2B/GAPDH	IUS 中 5-HT2B/GAPDH
空白组	0.598±0.227	0.180±0.055
模型组	1.573±0.692*	0.091±0.040*
电针组	0.202±0.068**	0.131±0.069

注:与空白组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,[#] $P<0.05$ 。

2.2.3 5-HT7 蛋白相对表达量比较 与空白组比较,5-HT7 受体在模型组大鼠逼尿肌中表达显著降低($P<0.01$),在 IUS 中表达显著增高($P<0.01$);电针组大鼠逼尿肌中 5-HT7 受体表达低于模型组($P<0.05$)且显著低于空白组($P<0.01$),IUS 中 5-HT7 受体表达低于模型组($P<0.05$),较空白组差异无统计学意义($P>0.05$)。详见表 4、图 1。

表4 各组大鼠逼尿肌和 IUS 中 5-HT7 蛋白表达的比较($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	逼尿肌中 5-HT7/GAPDH	IUS 中 5-HT7/GAPDH
空白组	0.781±0.188	0.106±0.051
模型组	0.407±0.201**	0.206±0.066**
电针组	0.180±0.056**#	0.124±0.054#

注:与空白组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,# $P<0.05$ 。

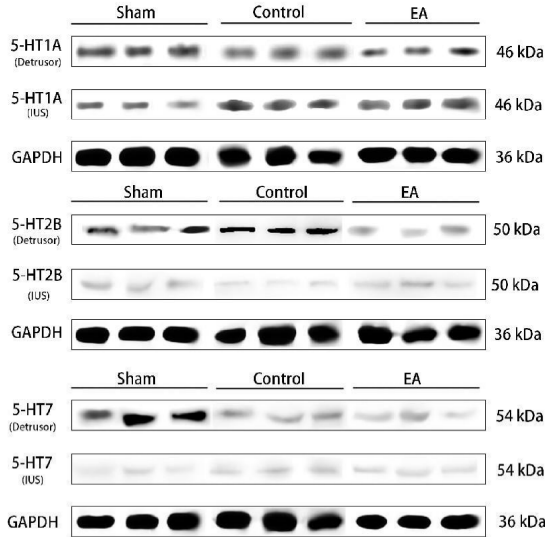


图1 各组大鼠逼尿肌和 IUS 中 5-HT1A/2B/7 蛋白电泳图
注:Sham.空白组;Control.模型组;EA.电针组;Detrusor.逼尿肌;IUS.尿道内括约肌。

3 讨论

尿液的储存和定期排泄需要一个复杂的神经控制系统来协调逼尿肌、IUS 和 EUS 的活动。尿液储存阶段,EUS 处于强直活动状态;排尿时,EUS 强直活动短暂切换为相位活动(EUS 爆发性放电)。EUS 爆发活动是啮齿动物有效排尿的基本特征,其模式发生器位于大鼠 L3~L4 脊髓节段^[14]。若 L3~L4 以上脊髓节段 SSCI,脊髓休克期后大鼠逼尿肌收缩力降低,且 DO、IUS 协同收缩或松弛伴持续的 EUS 强直活动;SSCI 损伤后 3~6 周 EUS 爆发活动再次出现,爆发频率及活动持续时间影响 SSCI 后 DSD 大鼠膀胱排空效率^[15]。

三阴交穴为足太阴脾经、足少阴肾经和足厥阴肝经交会穴,从浅到深分布有隐神经、胫神经和腓深神经,其中隐神经起源于 L3~L4 神经根。CHANG 等^[16]研究证实,L3 节段脊髓硬膜外刺激可抑制强直性 EUS 活性并引发 EUS 爆发。次髎穴位于骶尾部第2骶后孔处,八髎穴之一,属膀胱经,临近骶部脊髓排尿中枢,其下有骶神经 S2~S4 走行。REDSHAW 等^[17]认为,SCI 后立即接受骶神经刺激可防止神经源性 DO 并保持膀胱容量和顺应性。中极穴是膀胱的募穴,

位于下腹部正中线上。JIANG 等^[18]研究发现,电刺激导致腹部肌肉收缩引起腹压突然升高,压力传递到膀胱和近端尿道,改变尿道阻力,但不引起膀胱收缩。本研究发现,模型组大鼠膀胱 MCC 和 LPP 均显著增大($P<0.01$),说明膀胱压力高、排空效率低、膀胱容量被动增大,符合 T8 椎体水平脊髓横断后 DSD 的表现。脊髓休克期后立即介入治疗,电针组大鼠 MCC、LPP 明显低于模型组($P<0.01$),说明电针刺激 SSCI 后 DSD 大鼠次髎、中极、三阴交穴可能通过抑制膀胱过度活动、调节尿道阻力、促进 EUS 爆发活动,提高排尿效率以避免损伤早期膀胱过度膨胀,降低膀胱压力、保留顺应性,从而改善大鼠下尿路功能。

细胞外钙、细胞内钙和钙敏化共同影响平滑肌收缩活动。而膀胱逼尿肌的收缩 70% 依赖于细胞外钙, Ca^{2+} 通过 CaV 通道内流使细胞内 Ca^{2+} 浓度快速增加。 Ca^{2+} 内流激活的信号级联通路是导致平滑肌收缩的关键^[19]。 Ca^{2+} 通过 L 型电压依赖性 Ca^{2+} 通道进入 UBSM 细胞,可诱发逼尿肌的相位性收缩。OAB 患者的 UBSM 细胞: Ca^{2+} 浓度上升,自发性 Ca^{2+} 振荡的幅度也更大^[20]。MIRONOVA 等^[21]证实,5-HT2B 受体激动剂可诱导大鼠主动脉平滑肌细胞内 Ca^{2+} 轻度增高,增强 Ca^{2+} 信号传导,引起血管收缩。本研究中,大鼠造模后逼尿肌 5-HT2B 受体表达增高($P<0.05$),可能引起平滑肌细胞内 Ca^{2+} 浓度增加,导致膀胱自发相位性收缩增多,符合 SSCI 后 DSD 大鼠 OAB 的表现。与模型组比较,电针组大鼠逼尿肌 5-HT2B 受体表达降低($P<0.05$),表明 OAB 改善。

尿液储存阶段 UBSM 电生理活动需维持在静息状态,大电导 Ca^{2+} 激活 K^+ (big-conductance Ca^{2+} -activated K^+ ,BK)通道作为唯一被细胞内 Ca^{2+} 增加激活的 K 通道,触发 UBSM 动作电位的复极化,介导逼尿肌松弛^[22]。5-HT 诱导平滑肌松弛的长期效应,5-HT7 受体的激活是必须的^[23]。5-HT7 受体可与 Gs 蛋白偶联导致环磷酸腺苷(cyclic adenosine monophosphate,cAMP)浓度升高。UBSM 细胞内 cAMP 信号通路的激活,可增加 BK 通道活性,从而介导逼尿肌松弛^[24]。BK 通道的总体生理功能是降低膜兴奋性,降低肌源性和神经诱发的 UBSM 收缩,破坏 BK 通道会诱导大鼠 OAB^[25]。本研究中,模型组大鼠逼尿肌中 5-HT7 受体表达显著低于空白组($P<0.01$),表明 SSCI 后大鼠逼尿肌中 BK 通道活性降低,导致 OAB 或 DO。膀胱部分出口梗阻(partial bladder outlet obstruction,PBOO)使整个膀胱产生代偿性功能变化,使 UBSM 的受力 Ca^{2+} 敏感性和最大缩短速度明显降低^[26]。DSD

引起的 EUS 持续强直活动即为神经源性的部分膀胱出口梗阻。大鼠在 PBOO 的病理条件下, BK 通道活性降低导致 UBSM 收缩力增加^[27]。本研究中, 电针组大鼠逼尿肌中 5-HT7 受体低于模型组 ($P < 0.05$), 提示电针治疗可降低 SSCI 后 DSD 大鼠逼尿肌中 5-HT7 受体表达及其偶联的 cAMP 活性, 以抑制 BK 通道活性, 诱导逼尿肌收缩能力增加、排空功能增强。

SSCI 后, 大鼠出现 DO 则 IUS 协同松弛。IUS 张力起源于尿道 Cajal 间质细胞 (interstitial cells of Cajal, ICC) 产生传播 Ca^{2+} 波的能力^[28]。研究发现, 小鼠尿道平滑肌的张力与电压无关, 而依赖于钙库操纵的钙内流 (store-operated Ca^{2+} entry, SOCE) 通道^[29], 且阻断 SOCE 会终止 ICCs 的起搏活性^[30]。cAMP 激活 PKA 或 Epac 蛋白会耗尽细胞内钙储存, 并降低 SOCE 活性, 诱导平滑肌松弛^[31]。本研究中, 造模后大鼠 IUS 中 5-HT7 受体表达显著增高 ($P < 0.01$), 可激活 cAMP 途径, 导致 IUS 张力降低, 符合 SSCI 后 DSD 大鼠 IUS 协同松弛的特征。与模型组比较, 电针组大鼠 IUS 中 5-HT7 受体表达降低 ($P < 0.05$), 提示电针治疗可能通过减少 cAMP 活性导致 SOCE 激活, 增强 ICCs 的起搏活性, 致使 IUS 受损的张力恢复。

5-HT1A 受体已被证明, 可通过 G 蛋白偶联抑制腺苷酸环化酶 (adenylyl cyclase, AC) 降低 cAMP 水平, 并激活磷脂酶 C (phospholipase C, PLC)。cAMP 在 β -肾上腺素受体介导的膀胱松弛中发挥作用。毒蕈碱刺激膀胱平滑肌收缩的主要途径涉及 PLC 的激活, 诱导肌醇-1,4,5-三磷酸 (inositol-1,4,5-trisphosphate, IP3) 生成导致 Ca^{2+} 释放^[32]。故 5-HT1A 受体的激活, 有助于诱导逼尿肌的持续收缩及张力维持。本研究中, 造模后大鼠 5-HT1A 受体在逼尿肌表达显著降低 ($P < 0.01$), 表明 SSCI 后大鼠逼尿肌收缩力降低、排空能力减弱。此时, IUS 应表现为协同收缩。研究证实, 激活 PLC 依赖的 Ca^{2+} 释放途径可提高 ICCs 的起搏活性^[33]。模型组大鼠 5-HT1A 受体在 IUS 表达显著高于空白组 ($P < 0.01$), 表明 IUS 收缩增强。经电针治疗后, 5-HT1A 受体在逼尿肌表达显著增高 ($P < 0.01$), 在 IUS 表达降低 ($P < 0.05$), 说明电针治疗可使 SSCI 后 DSD 大鼠逼尿肌收缩能力增强、IUS 协同松弛, 有利于膀胱排空。

电针刺激 SSCI 后 DSD 大鼠次髂、中极、三阴交穴, 可能通过骶神经、隐神经传入及腹压变化的刺激诱导 EUS 爆发活动, 导致膀胱及尿道平滑肌中 5-HT 受体表达改变, 从而抑制膀胱过度活动, 增加逼尿肌收缩能力并协调尿道阻力, 提高排尿效率以

避免损伤早期膀胱过度膨胀, 降低膀胱压力、保留顺应性, 从而改善大鼠下尿路功能。膀胱中 5-HT7 受体可能通过激活 cAMP 途径以增加 BK 通道活性, 调节 UBSM 张力以介导逼尿肌松弛; 5-HT1A 受体则可抑制 cAMP 并激活 PLC 释放 Ca^{2+} , 从而介导逼尿肌收缩及其张力维持; 5-HT2B 受体诱导的 UBSM 内 Ca^{2+} 浓度增高可能引起逼尿肌相性收缩。尿道中 5-HT1A 和 5-HT7 受体可能分别通过激活 PLC 依赖的 Ca^{2+} 释放和激活 cAMP 降低 SOCE 通道活性, 调节 ICCs 的起搏活性, 介导尿道平滑肌的收缩和松弛。

膀胱张力调节不完全依赖于神经支配, 也与膀胱壁机械拉伸特性有关, 在特定长度处施加可变量张力, 而自发的节律性收缩叠加在基础张力之上。SSCI 后 DSD 大鼠 EUS 的持续强直活动造成 PBOO, 开始表现为逼尿肌收缩力增加伴充盈期 DO; 随着梗阻持续, 出现逼尿肌活动不足伴大量排尿后残余尿量^[34]。UBSM 被拉伸首先会施加更大的张力, 持续拉伸则张力逐渐降低, 拉伸改变了 UBSM 的膜电位及对收缩刺激的反应。由于 5-HT1A 和 5-HT2B 受体可能涉及 Ca^{2+} 流入, 其表达与下尿路平滑肌收缩 (相性和/或强直性) 正相关。而 5-HT7 受体可能涉及的 BK 通道, 其激活也与胞质 Ca^{2+} 信号和去极化膜电位相关。故 5-HT7 受体对下尿路平滑肌收缩及张力的影响, 与平滑肌机械拉伸特性也密切相关。总之, 下尿路平滑肌的张力变化是个极其复杂的协调过程, 关于 5-HT 各亚型受体的独立及联合调控效应仍有待更深入的研究, 阐明其机制。

参考文献

- [1] HU H Z, GRANGER N, JEFFERY N D. Pathophysiology, clinical importance, and management of neurogenic lower urinary tract dysfunction caused by suprasacral spinal cord injury [J]. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 2016, 30(5): 1575-1588.
- [2] MAHFOUZ W, CORCOS J. Management of detrusor external sphincter dyssynergia in neurogenic bladder [J]. *European Journal of Physical and Rehabilitation Medicine*, 2011, 47(4): 639-650.
- [3] WHITE N, IGLESIA C B. Overactive bladder [J]. *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America*, 2016, 43(1): 59-68.
- [4] 艾坤, 刘琼, 许明, 等. 电针对骶上脊髓损伤后神经源性膀胱尿流动力学及逼尿肌垂体腺苷酸环化酶/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.
- [5] 许明, 刘笑萌, 艾坤, 等. 电针对骶上脊髓损伤后神经源性膀胱大鼠膀胱功能及髓内 NGF 和 NT-3 的影响 [J]. *湖南中医药大学学报*, 2021, 41(2): 252-258.
- [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]. *湖南中医药大学学报*, 2022, 42(9): 1426-1433.

- [7] KADEKAWA K, YOSHIMURA N, MAJIMA T, et al. Characterization of bladder and external urethral activity in mice with or without spinal cord injury: A comparison study with rats[J]. *American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 2016, 310(8): R752–R758.
- [8] LIN C Y, SPARKS A, LEE Y S. Improvement of lower urinary tract function by a selective serotonin 5-HT_{1A} receptor agonist, NLX-112, after chronic spinal cord injury[J]. *Experimental Neurology*, 2020, 332: 113395.
- [9] MATSUMOTO-MIYAI K, YOSHIZUMI M, KAWATANI M. Regulatory effects of 5-hydroxytryptamine receptors on voiding function[J]. *Advances in Therapy*, 2015, 32(Suppl 1): 3–15.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] 李忠仁. 实验针灸学[M]. 2版. 北京: 中国中医药出版社, 2007: 255–257.
- [14] 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): F1032–F1040.
- [15] KARNUP S. Spinal interneurons of the lower urinary tract circuits[J]. *Autonomic Neuroscience: Basic & Clinical*, 2021, 235: 102861.
- [16] CHANG H H, YEH J C, ICHIYAMA R M, et al. Mapping and neuromodulation of lower urinary tract function using spinal cord stimulation in female rats[J]. *Experimental Neurology*, 2018, 305: 26–32.
- [17] REDSHAW J D, LENHERR S M, ELLIOTT S P, et al. Protocol for a randomized clinical trial investigating early sacral nerve stimulation as an adjunct to standard neurogenic bladder management following acute spinal cord injury[J]. *BMC Urology*, 2018, 18(1): 72.
- [18] JIANG H H, SALCEDO L B, DAMASER M S. Quantification of neurological and other contributors to continence in female rats[J]. *Brain Research*, 2011, 1382: 198–205.
- [19] KALRA J, ARTAMONOV M, WANG H, et al. p90RSK2, a new MLCK mediates contractility in myosin light chain kinase null smooth muscle[J]. *Frontiers in Physiology*, 2023, 14: 1228488.
- [20] SUI G, FRY C H, MALONE-LEE J, et al. Aberrant Ca²⁺ oscillations in smooth muscle cells from overactive human bladders[J]. *Cell Calcium*, 2009, 45(5): 456–464.
- [21] MIRONOVA G Y, AVDONIN P P, GONCHAROV N V, et al. Inhibition of protein tyrosine phosphatases unmasks vasoconstriction and potentiates calcium signaling in rat aorta smooth muscle cells in response to an agonist of 5-HT_{2B} receptors BW723C86[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2017, 483(1): 700–705.
- [22] LEE S, CHAE M R, LEE B C, et al. Urinary bladder-relaxant effect of kurarinone depending on potentiation of large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels[J]. *Molecular Pharmacology*, 2016, 90(2): 140–150.
- [23] SEITZ B M, FINK G D, WATTS S W. Activation of the 5-HT₇ receptor but not nitric oxide synthase is necessary for chronic 5-hydroxytryptamine-induced hypotension[J]. *Experimental Physiology*, 2020, 105(12): 2025–2032.
- [24] XIN W K, LI N, CHENG Q P, et al. BK channel-mediated relaxation of urinary bladder smooth muscle: A novel paradigm for phosphodiesterase type 4 regulation of bladder function[J]. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2014, 349(1): 56–65.
- [25] JO H, BAE E J, LEE N, et al. Discovery and characterization of a potent activator of the BKCa channel that relieves overactive bladder syndrome in rats[J]. *European Journal of Pharmacology*, 2022, 927: 175055.
- [26] STANTON M C, CLEMENT M, MACARAK E J, et al. Partial bladder outlet obstruction alters Ca²⁺ sensitivity of force, but not of MLC phosphorylation, in bladder smooth muscle[J]. *American Journal of Physiology Renal Physiology*, 2003, 285(4): F703–F710.
- [27] PETKOV G V. Central role of the BK channel in urinary bladder smooth muscle physiology and pathophysiology[J]. *American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 2014, 307(6): R571–R584.
- [28] DRUMM B T, LARGE R J, HOLLYWOOD M A, et al. The role of Ca(2+) influx in spontaneous Ca(2+) wave propagation in interstitial cells of Cajal from the rabbit urethra[J]. *The Journal of Physiology*, 2015, 593(15): 3333–3350.
- [29] DRUMM B T, REMBETSKI B E, COBINE C A, et al. Ca²⁺ signalling in mouse urethral smooth muscle in situ: Role of Ca²⁺ stores and Ca²⁺ influx mechanisms[J]. *The Journal of Physiology*, 2018, 596(8): 1433–1466.
- [30] YOUM J B, ZHENG H F, KOH S D, et al. Na–K–2Cl cotransporter and store-operated Ca²⁺ entry in pacemaking by interstitial cells of Cajal[J]. *Biophysical Journal*, 2019, 117(4): 767–779.
- [31] CUÍÑAS A, GARCÍA-MORALES V, VIÑA D, et al. Activation of PKA and Epac proteins by cyclic AMP depletes intracellular calcium stores and reduces calcium availability for vasoconstriction[J]. *Life Sciences*, 2016, 155: 102–109.
- [32] HAN J S, KIM S J, NAM Y, et al. The inhibitory mechanism on acetylcholine-induced contraction of bladder smooth muscle in the streptozotocin-induced diabetic rat[J]. *Biomolecules & Therapeutics*, 2019, 27(1): 101–106.
- [33] SHIN D H, KIM M W, CHOI S, et al. Regulation of the pacemaker activity of colonic interstitial cells of Cajal by protease-activated receptors: Involvement of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide channels[J]. *Pharmacology*, 2016, 98(3/4): 171–182.
- [34] LI Y H, HE M K, LIN W Y, et al. Responses of bladder smooth muscle to the stretch go through extracellular signal-regulated kinase (ERK)/p90 ribosomal S6 protein kinase (p90RSK)/Nuclear factor-κB (NF-κB) Pathway[J]. *Neurourology and Urodynamics*, 2019, 38(6): 1504–1516.