

·针灸推拿·

本文引用: 向晶, 卓越, 艾坤, 邓石峰, 许明, 刘琼, 熊明月, 张泓. 电针调节 P2X7R 介导的细胞焦亡途径对骶上脊髓损伤后尿潴留型神经源性膀胱大鼠膀胱排尿功能的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2024, 44(8): 1391-1400.

## 电针调节 P2X7R 介导的细胞焦亡途径对骶上脊髓损伤后尿潴留型神经源性膀胱大鼠膀胱排尿功能的影响

向晶<sup>1</sup>, 卓越<sup>1</sup>, 艾坤<sup>1</sup>, 邓石峰<sup>1</sup>, 许明<sup>1</sup>, 刘琼<sup>1</sup>, 熊明月<sup>2\*</sup>, 张泓<sup>1\*</sup>

1. 湖南中医药大学, 湖南长沙 410208; 2. 永州市中心医院康复医学科, 湖南永州 425000

**[摘要]** **目的** 观察电针对骶上脊髓损伤后尿潴留型神经源性膀胱大鼠排尿功能的影响, 并探讨电针调节嘌呤能离子通道型受体 7(purinergic ligand-gated ion channel 7 receptor, P2X7R)介导的细胞焦亡途径在其中的潜在效应机制。**方法** 从 48 只雌性 SD 大鼠中随机抽取 12 只纳入假手术组, 剩余大鼠以 T8 完全性脊髓横断法建立尿潴留型神经源性膀胱大鼠模型, 将已成模的 27 只大鼠二次随机分为模型组与电针组, 每组 12 只, 剩余 3 只模型大鼠用于实验候补。电针组于术后第 19 天开始干预, 连续 10 d, 其余两组予以捆绑。干预结束后, 各组大鼠先行尿流动力学检测, 随后快速分离膀胱组织待检, 应用 HE 染色观察膀胱组织形态学变化, 透射电镜观察膀胱组织超微结构变化, TUNEL 染色检测膀胱组织中细胞损伤情况, ELISA 检测膀胱组织中三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)水平, 免疫组织化学法和 Western blot 法检测膀胱组织中 P2X7R、NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3(NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3, NLRP3)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1(cysteinyl aspartate specific proteinase-1, Caspase-1)、白细胞介素-1 $\beta$ (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )蛋白表达情况。**结果** 与假手术组比较, 模型组大鼠膀胱漏尿点压力、膀胱最大压力、膀胱最大容量显著升高( $P<0.01$ ), 以膀胱体积增大伴尿潴留为主要表现; 模型组大鼠膀胱组织存在明显的炎症反应且病理改变显著, 膀胱组织超微结构可见明显肿胀、变形等细胞损伤, 膀胱组织细胞损伤率显著增加( $P<0.01$ ), 膀胱组织中 ATP 含量、P2X7R、NLRP3、Caspase-1、IL-1 $\beta$  的阳性表达及蛋白表达水平均显著升高( $P<0.01$ )。与模型组比较, 电针组大鼠膀胱漏尿点压力、膀胱最大压力、膀胱最大容量降低( $P<0.05$ ), 尿潴留症状较轻, 膀胱排尿功能改善; 电针组大鼠膀胱组织的炎症反应及病理损伤减轻, 膀胱组织超微结构变化明显改善, 膀胱组织细胞损伤率显著减少( $P<0.01$ ), 膀胱组织中 ATP 含量、P2X7R、NLRP3、Caspase-1、IL-1 $\beta$  的阳性表达及蛋白表达水平均显著降低( $P<0.01$ )。**结论** 电针可有效改善骶上脊髓损伤后尿潴留型神经源性膀胱大鼠的膀胱排尿功能, 缓解尿潴留症状, 减轻膀胱组织病理损伤程度及其炎症反应, 其机制与抑制膀胱组织中 P2X7R/NLRP3 信号通路焦亡蛋白的表达有关。

**[关键词]** 骶上脊髓损伤; 神经源性膀胱; 尿潴留; 电针; 嘌呤能离子通道型受体 7; 细胞焦亡

**[中图分类号]** R245.9

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2024.08.006

## Effects of electroacupuncture on bladder voiding function in rats with neurogenic bladder featuring urinary retention after suprasacral spinal cord injury through regulation of P2X7R-mediated pyroptosis pathway

XIANG Jing<sup>1</sup>, ZHUO Yue<sup>1</sup>, AI Kun<sup>1</sup>, DENG Shifeng<sup>1</sup>, XU Ming<sup>1</sup>, LIU Qiong<sup>1</sup>,

XIONG Mingyue<sup>2\*</sup>, ZHANG Hong<sup>1\*</sup>

**[收稿日期]** 2024-02-08

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(82274666); 湖南省自然科学基金项目(2022JJ30036, 2023JJ50425)。

**[通信作者]** \* 张泓, 男, 教授, 博士研究生导师, E-mail: zh5381272@sina.com; 熊明月, 女, 副主任技师, E-mail: xiongmingyue2182@163.com。

1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. Department of Rehabilitation Medicine, Yongzhou Central Hospital, Yongzhou, Hunan 425000, China

**[Abstract] Objective** To observe the effects of electroacupuncture on bladder voiding function in rats with neurogenic bladder (NB) featuring urinary retention after suprasacral spinal cord injury (SCI), and to explore the potential mechanisms of electroacupuncture in regulating the pyroptosis pathway mediated by purinergic receptor P2X ligand-gated ion channel 7 (P2X7R). **Methods** Twelve from 48 female SD rats were randomly selected as the sham-operated group. The remaining rats were used to establish a rat model of NB featuring urinary retention by T8 complete spinal cord transection. Of the 27 successfully modeled rats, 24 were randomized into model group and electroacupuncture group, with 12 rats in each group, and the remaining three model rats were reserved for experimental backups. The electroacupuncture group received intervention on the 19th day after operation for 10 consecutive days, while the other two groups were only restrained. After the intervention, urodynamic tests were first performed on the rats in each group, followed by rapid separation of bladder tissue for examination. HE staining was used to observe the morphological changes in bladder tissue; transmission electron microscopy was used to observe the ultrastructural changes of bladder tissue; TUNEL staining was used to examine cell damage in bladder tissue; ELISA was used to check the level of adenosine triphosphate (ATP) in bladder tissue; immunohistochemistry and Western blot were used to examine the protein expression levels of P2X7R, NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3 (NLRP3), cysteinyl aspartate specific proteinase-1 (Caspase-1), and interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) in bladder tissue. **Results** Compared with the sham-operated group, the bladder leak point pressure, maximum bladder pressure, and maximum bladder capacity in the model group significantly increased ( $P<0.01$ ), with bladder volume increase accompanied by urinary retention as the main manifestations. The model group rats showed significant inflammatory reaction and pathological changes in bladder tissue, with obvious swelling, deformation, and other signs of cell damage in the ultrastructure of bladder tissue, and a significantly increased cell damage rate ( $P<0.01$ ). The ATP content, the positive expression and protein expression levels of P2X7R, NLRP3, Caspase-1, and IL-1 $\beta$  in bladder tissue significantly increased ( $P<0.01$ ). Compared with the model group, the bladder leak point pressure, maximum bladder pressure, and maximum bladder capacity of the rats in the electroacupuncture group decreased ( $P<0.05$ ), with milder symptoms of urinary retention and improved bladder voiding function. The electroacupuncture group showed alleviated inflammatory reaction and pathological damage, significantly improved ultrastructural changes, significantly reduced cell damage rate ( $P<0.01$ ), and significantly reduced ATP content, positive expression and protein expression levels of P2X7R, NLRP3, Caspase-1, and IL-1 $\beta$  in the bladder tissue ( $P<0.01$ ). **Conclusion** Electroacupuncture can effectively improve the bladder voiding function in rats with NB featuring urinary retention after suprasacral SCI, alleviate the symptoms of urinary retention, and reduce the degree of pathological damage and inflammatory response in bladder tissue. Its mechanism is related to the inhibition of the expression of pyroptosis protein in P2X7R/NLRP3 signaling pathway in bladder tissue.

**[Keywords]** suprasacral spinal cord injury; neurogenic bladder; urinary retention; electroacupuncture; purinergic receptor P2X ligand-gated ion channel 7; cell pyroptosis

神经源性膀胱(neurogenic bladder, NB)是由于神经系统病变引起膀胱和尿道功能障碍,继而导致各种下尿路症状的疾病总称<sup>[1]</sup>。流行病学资料显示,全球约80%的NB患者是因脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)所致,其中又以骶上SCI最为常见<sup>[2-3]</sup>。T8椎体下SCI后,由于低位脊髓交感-副交感排尿中枢与高位皮质-脑桥排尿中枢之间协同支配出现

异常,导致膀胱逼尿肌与膀胱括约肌反射亢进伴逼尿肌-括约肌协同失调,病理表现以储尿期内膀胱高内压、排尿期内逼尿肌收缩过程中括约肌舒张不能导致残余尿量增多、排尿功能下降为主,即尿潴留型NB<sup>[4]</sup>。该类NB易于引发上尿路损害以及泌尿系感染,成为临床上影响这类患者生存及生活质量的主要因素<sup>[5-6]</sup>。

目前研究表明,焦亡与膀胱排尿功能障碍的发生发展密切相关,T8 SCI 所致的尿潴留型 NB 由于膀胱过度充盈、膀胱内压增加,当膀胱细胞应激增加超过其代偿反应的能力,就会激活细胞焦亡,引起膀胱平滑肌细胞变性、死亡,膀胱组织形态结构受到损害,最终影响膀胱排尿功能<sup>[7]</sup>。研究表明,焦亡在膀胱重塑中有着重要作用,是一种与炎症密切相关、新的细胞程序性死亡方式<sup>[8]</sup>。组织细胞在受到高压作用下引发损伤细胞释放高含量的三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP),在病理条件下,ATP 可作为一种损伤相关的分子模式(damage associated molecular patterns, DAMPs)。嘌呤能离子通道型受体 7(purinergic ligand-gated ion channel 7 receptor, P2X7R)是一种离子受体,P2X7R 在平滑肌和尿路上皮表达丰富,膀胱在尿液充盈不断被机械扩张时,尿路上皮释放大量的 ATP 和 P2X7R 相结合产生寡聚化反应,使离子通道开放,激活 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3(NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3, NLRP3),进而将无活性的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1(cysteiny aspartate specific proteinase-1, Caspase-1)转化为裂解的 Caspase-1,引发细胞焦亡,释放炎症因子白细胞介素-1 $\beta$ (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )<sup>[9-10]</sup>。膀胱组织过度焦亡造成细胞损伤,同时加剧膀胱内的炎症反应,炎症亦是骶上 SCI 后 NB 排尿功能障碍的重要因素,可刺激邻近膀胱平滑肌增生、肥大及细胞死亡,导致膀胱组织发生纤维化和去神经化,影响膀胱平滑肌收缩,进一步加重膀胱功能障碍,形成恶性循环<sup>[11]</sup>。

目前,针对 SCI 后 NB 患者尚缺乏完全满意的治疗及康复方法,如药物治疗、手术治疗、导尿术等均存在一定的毒副作用或风险性。临床上,电针治疗膀胱功能障碍疾病因其疗效可观、绿色安全的优势而被广泛关注。本课题前期研究已发现,T8 椎体下脊髓完全性横断后 NB 大鼠以尿潴留为主要表现,电针干预可减轻膀胱病理损害程度、改善膀胱平滑肌的舒缩协调能力,从而促进膀胱功能恢复<sup>[12]</sup>。故本研究以此为基础,以电针调节 P2X7R 介导的细胞焦亡途径为切入点,以期证实电针改善骶上 SCI 后尿潴留型 NB 大鼠膀胱排尿功能的治疗效应,并为其效应机制研究提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物及分组

由湖南中医药大学动物实验中心提供并分笼饲养的 SPF 级健康成年 Sprague-Dawley 雌性大鼠 48 只(由前期研究<sup>[4]</sup>成模率 72.2%以上计算所得),体质量(220 $\pm$ 20) g,湖南中医药大学伦理审批号:LL2021091504,许可证号:SYXK(湘)2019-0004。控制动物饲养的温度 24~26 °C、湿度 50%~70%。术前喂养 1 周,根据随机数字表法将大鼠分为假手术组 12 只和造模组 36 只,造模成功的大鼠再随机分为模型组与电针组,每组不低于 12 只,整个实验过程严格遵循《关于善待实验动物的指导性意见》。

### 1.2 主要试剂与仪器

异氟烷(深圳市瑞沃德生命科技有限公司,批号:R510-22);青霉素钠(哈药集团有限公司,批号:220106);乳酸钠林格注射液(安徽环球药业股份有限公司,批号:20211218-2);葡萄糖注射液(贵州天地药业有限公司,批号:20080802); $\beta$ -actin 抗体、NLRP3 抗体、Caspase-1 抗体、IL-1 $\beta$  抗体(江苏亲科生物研究中心有限公司,批号:AF7018、DF7438、AF4005、AF4006);P2X7R 抗体、山羊抗兔二抗(武汉三鹰生物技术有限公司,批号:28207-1-AP/SA00001-2);ECL 发光液(美国 Advansta 公司,批号:K-12045-D50);大鼠 ATP 酶联免疫吸附法检测试剂盒(厦门仑昌硕生物科技有限公司,批号:LCSJJZF30726)。

MP-150 多通道生理记录仪(美国 BIOPAC 公司,型号:MP150-WSW);微量注射泵(浙江史密斯医学仪器有限公司,型号:WZ-50C6);包埋机(武汉俊杰电子有限公司,型号:JB-P5);病理切片机(上海徕卡仪器有限公司,型号:RM2016);烤箱(天津市莱玻璃仪器设备有限公司,型号:GFL-230),正置光学显微镜(日本尼康,型号:Nikon Eclipse E100);酶标分析仪(美国 Thermo 公司,型号:Rayto RT-6100)。

### 1.3 模型制备、术后护理及模型评估

1.3.1 模型制备 采用 Hassan Shaker 脊髓横断法<sup>[13]</sup>并结合本团队前期研究<sup>[4]</sup>制备 T8 椎体下脊髓完全性横断尿潴留型 NB 大鼠模型。本实验脊髓完全性横断为 T8 椎体下,约对应脊髓 T10 节段<sup>[14]</sup>。异氟烷麻醉大鼠并备皮,沿大鼠脊柱棘突向下触摸到明显宽大凸出的棘突为 T10 棘突,以此为骨性标志向上

定位2个棘突的椎体为T8。分离T8/T9椎体两侧皮肤及肌肉,直至其两侧棘突及椎弓完全暴露,咬断T8棘突及椎弓根,完整暴露椎管内脊髓后用眼科剪快速地横断脊髓,确保无残留的神经纤维后,止血清创与缝合。假手术组大鼠仅暴露T8椎体棘突及椎弓,后立即缝合。

**1.3.2 术后护理** 将手术完成的大鼠置于电热毯上复温,复温后苏醒的大鼠转移至笼内喂养10 mL葡萄糖注射液,补充能量的同时减轻肠道及膀胱负担。术后第1~3天,给予少量饲料及葡萄糖注射液喂养,第4天恢复常规喂养。术后第1~3天,预防术后大鼠感染,给予腹腔注射青霉素钠(20万U/只);避免术后大鼠电解质紊乱,给予皮下注射乳酸盐林格溶液(20 mL/kg);每天将大鼠的下肢喷涂Grannick苹果喷雾,预防其自残。术后每天每隔8 h(早、中、晚)进行人工手法辅助排尿。

**1.3.3 模型评估** (1)成模时间评估:SCI平面越高其脊髓休克期就越长,休克期内的大鼠间模型有较大差异且各项体征情况不稳定。前期研究发现,术后1周左右模型大鼠度过脊髓休克期,术后第18天模型趋于稳定<sup>[4]</sup>。故剔除成模不标准大鼠,成模大鼠于术后第19天行电针干预。(2)后肢运动功能评估:脊髓休克期内的大鼠后肢运动功能处于完全丧失状态,进行BBB评分(Basso, Beattie & Bresnahan locomotor rating scale, BBB scale)<sup>[15]</sup>为0分,大鼠呈现双下肢拖拽状态,则造模成功;反之,说明造模不成功,应剔除。(3)膀胱排尿功能评估:脊髓休克期,大鼠膀胱显著肿大并触之紧张,出现自行排尿困难,需手法辅助排尿;脊髓休克期结束后,大鼠膀胱肿大程度虽有所减轻,但无法自行排尿,大鼠双下肢、尿道口周围或笼内垫料偶有潮湿现象,呈尿潴留为主的表现,则造模成功,纳入为本实验的研究对象。

**1.3.4 造模结果** 假手术组12只大鼠生命体征稳定;36只造模组大鼠因手术期死亡、术后感染、腹胀、自噬或不符合成模标准等原因予以剔除9只,剩余27只造模成功的大鼠二次随机分为模型组、电针组各12只,剩余3只模型大鼠用于实验候补,各组大鼠均存活至实验结束。

#### 1.4 腧穴定位与电针方法

前期研究发现,术后1周左右模型大鼠度过脊髓休克期,术后第18天模型趋于稳定,故成模大鼠

于术后第19天行电针干预。假手术组、模型组大鼠仅捆绑20 min。电针组选取次髂、中极和三阴交行电针干预,参考国家“十三五”规范统编教材《实验针灸学》中大鼠标准穴图谱定位。电针组大鼠仰卧位固定于鼠板上,使用无菌针灸针斜刺中极5 mm、直刺三阴交5 mm,中极和三阴交为一组电针穴位,并每天交替干预三阴交左右两穴,设置电针仪参数为疏密波(10 Hz/50 Hz),以大鼠双下肢轻度震颤并耐受为适宜电流强度;大鼠再行俯卧位固定,直刺两侧次髂10~15 mm,两穴连接电针,参数同前。以上电针干预时间均为20 min,1次/d,连续干预10 d。

#### 1.5 观察指标

干预结束后,选取每组6只大鼠进行尿流动力学检测,待检完毕后迅速取膀胱组织冻存,用于本实验酶联免疫吸附法检测及Western blot检测。取材当天剩余每组6只大鼠,取新鲜膀胱组织用于HE染色、TUNEL染色、透射电镜及免疫组织化学检测。

**1.5.1 尿流动力学检测** 手法排空大鼠膀胱内尿液并仰卧位固定麻醉大鼠,经三通管将MP-150的压力换能器与微量注射泵、F3导尿管相连接。打开麻醉后大鼠的腹腔并暴露膀胱,膀胱穹窿处剪开小口后,插入F3导管并固定,静置30 min后以6.0 mL/h的速度灌注生理盐水。使用电脑记录并计算膀胱漏尿点压力、膀胱最大压力、膀胱最大容量等各项指标。

**1.5.2 HE染色观察** 各组大鼠膀胱组织形态学变化 用4%多聚甲醛固定剪取的膀胱组织48 h,通过梯度浓度的乙醇脱水、浸蜡包埋后行HE染色,最后置于100倍光学显微镜下观察。

**1.5.3 透射电镜观察** 各组大鼠膀胱组织超微结构变化 取材时切下大小为1 mm<sup>3</sup>的新鲜膀胱组织,置于装有预冷电镜固定液的EP管中,4℃保存,PBS洗3次,各15 min。置于1%锇酸避光室温固定2 h,PBS洗3次,经乙醇梯度脱水、渗透包埋、聚合、80 nm的超薄切片,用2%醋酸铀饱和乙醇溶液避光染色,最后置于透射电子显微镜下观察。

**1.5.4 TUNEL染色检测** 各组大鼠膀胱组织中细胞损伤情况 依次将膀胱石蜡切片脱蜡、蛋白酶K修复、破膜、室温平衡。反应液取TUNEL试剂盒内适量TdT酶、dUTP、buffer按1:5:50比例混合,覆盖组织并放于湿盒内,37℃孵育1 h,经DAPI复染细胞核后封片。每张切片置于荧光显微镜下200倍视野

拍照观察并采集图像,细胞损伤率=(阳性细胞数÷活细胞数)×100%。

1.5.5 ELISA 检测各组大鼠膀胱组织中 ATP 含量 膀胱组织称重后,按混合比例 1:9 加入提取液。置于离心机 3 000 r/min 半径 8 cm 离心 10 min 后,取上清液,-80 °C 储存,按照 ELISA 试剂盒操作说明检测样本 ATP。

1.5.6 免疫组织化学法检测各组大鼠膀胱组织中 P2X7R、NLRP3、Caspase-1、IL-1 $\beta$  的表达水平 先将膀胱石蜡切片放入脱蜡液脱蜡,抗原修复,加入 3%过氧化氢溶液室温孵育,加入 3%BSA 封闭。随后滴加 P2X7R、NLRP3、Caspase-1、IL-1 $\beta$  一抗,4 °C 孵育过夜,PBS 洗片,滴加 IgG 抗体,37 °C 孵育 50 min 后 PBS 洗片。最后滴加 DAB 显色液、复染、脱水封片,置于显微镜(×400)观察结果。应用 Image J 软件分析结果,阳性染色为棕黄色或褐色,分析 P2X7R、NLRP3、Caspase-1、IL-1 $\beta$  的蛋白平均吸光度值。

1.5.7 Western blot 法检测各组大鼠膀胱组织中 P2X7R、NLRP3、Caspase-1、IL-1 $\beta$  的表达水平 先称取-80 °C 保存的膀胱组织,加裂解液提取组织总蛋白并测定蛋白浓度;上样行电泳,SDS-PAGE 分离蛋白 P2X7R (65 kDa)、NLRP3 (110 kDa)、Caspase-1 (20 kDa)、IL-1 $\beta$  (18 kDa)、 $\beta$ -Actin (42 kDa) 转至 PVDF 膜转膜 90 min,脱脂奶粉封闭 90 min,分别加入 P2X7R、NLRP3、Caspase-1、IL-1 $\beta$ 、 $\beta$ -Actin 的一抗,4 °C 下孵育过夜,漂洗后常温下用二抗孵育 90 min,最后洗膜、显影。使用 Image J 软件分析 P2X7R、NLRP3、Caspase-1、IL-1 $\beta$ 、 $\beta$ -Actin 的灰度值,以目的蛋白与内参两者灰度比值作为 P2X7R、NLRP3、

Caspase-1、IL-1 $\beta$  的相对表达量,其结果做均一化处理。

## 1.6 统计学分析

采用 SPSS 23.0 软件行各项实验数据的统计学分析。计量资料以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示;若数据服从正态性和方差齐性,多组间比较采用单因素方差分析;若不符合正态分布或方差不齐,则采用非参数检验。以  $P<0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组大鼠尿流动力学的比较

与假手术组比较,模型组大鼠膀胱漏尿点压力、膀胱最大压力、膀胱最大容量均显著升高( $P<0.01$ );与模型组比较,电针组大鼠膀胱漏尿点压力、膀胱最大压力、膀胱最大容量均降低( $P<0.05$ )。详见图1。

### 2.2 各组大鼠膀胱组织形态表现

假手术组大鼠膀胱组织无固有层充血、水肿,无炎性细胞浸润,肌纤维排列清晰、紧密;与假手术组比较,模型组大鼠膀胱组织出现明显的炎性反应,固有层充血、水肿,平滑肌肌层明显增厚、肥大,肌纤维排列紊乱;与模型组比较,电针组膀胱组织炎性反应减少,固有层充血、水肿减少,平滑肌肌层增厚减少,肌纤维排列较整齐。详见图2。

### 2.3 各组大鼠膀胱组织超微结构变化

假手术组膀胱组织平滑肌细胞排列平行,细胞核为长梭形,占整个细胞的大部分,核膜完整且界限分明,线粒体呈圆形或椭圆形且未见肿胀;与假手术比较,模型组膀胱组织平滑肌细胞排列紊乱,细胞核

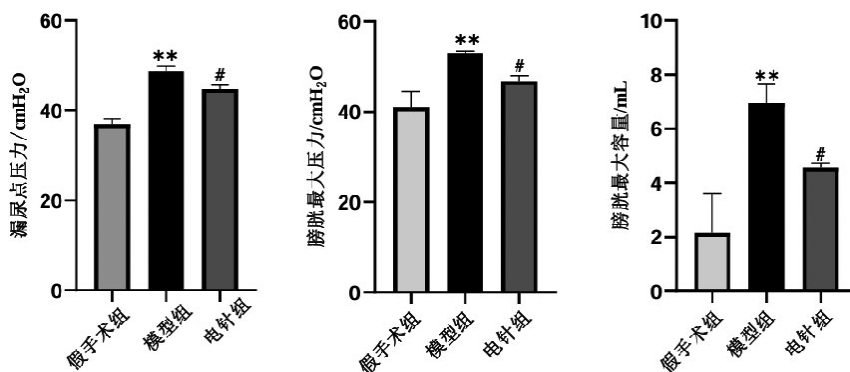


图1 各组大鼠尿流动力学检测结果比较( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

Fig.1 Comparison of urodynamic test results of rats in each group ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

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

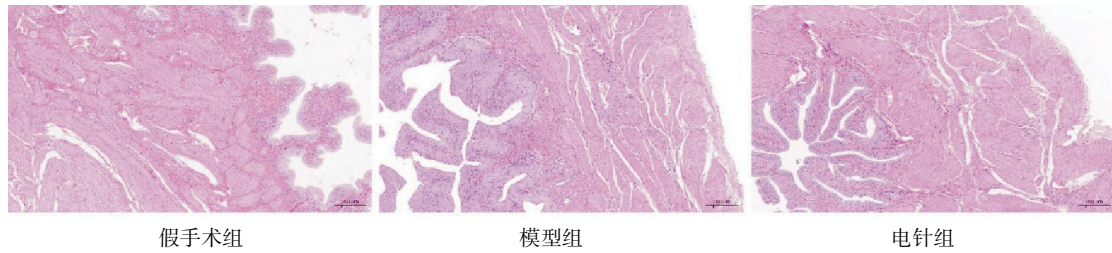


图 2 各组大鼠膀胱组织 HE 染色结果( $\times 100$ )

Fig.2 HE staining results of bladder tissue in each group ( $\times 100$ )

大体呈椭圆形,核膜边界断裂、染色质边聚,线粒体损伤、肿胀变形、嵴被破坏,出现空泡样改变;与模型组比较,电针组膀胱组织平滑肌细胞排列较整齐,细胞核为梭形,核膜完整但局部有内陷,线粒体轻度肿胀、嵴完整但模糊。详见图 3。

#### 2.4 各组大鼠膀胱组织中细胞损伤情况

与假手术组比较,模型组大鼠膀胱组织中损伤细胞增多,细胞损伤率显著增加( $P < 0.01$ );与模型组比较,电针组大鼠膀胱组织中损伤细胞减少,细胞损伤率显著减少( $P < 0.01$ )。详见图 4—5。

#### 2.5 各组大鼠膀胱组织中 ATP 含量表达

与假手术组比较,模型组大鼠膀胱组织中 ATP 含量显著增加( $P < 0.01$ );与模型组比较,电针组大鼠膀胱组织中 ATP 含量显著减少( $P < 0.01$ )。详见图 6。

#### 2.6 各组大鼠膀胱组织中 P2X7R、NLRP3、Caspase-1、IL-1 $\beta$ 的阳性表达情况

假手术组膀胱组织中可见 P2X7R、NLRP3、Caspase-1、IL-1 $\beta$  少量的浅阳性表达。与假手术组比较,模型组膀胱组织中 P2X7R、NLRP3、Caspase-1、IL-1 $\beta$  平均光密度值相对表达量显著增高( $P < 0.01$ );与模型组比较,电针组膀胱组织中 P2X7R、NLRP3、Caspase-1、IL-1 $\beta$  平均光密度值相对表达量显著降低( $P < 0.01$ )。详见图 7—8。

#### 2.7 各组大鼠膀胱组织中 P2X7R、NLRP3、Caspase-1、IL-1 $\beta$ 的蛋白表达情况

与假手术组比较,模型组的膀胱组织中 P2X7R、NLRP3、Caspase-1、IL-1 $\beta$  蛋白表达显著上调( $P < 0.01$ );与模型组比较,电针组的膀胱组织中 P2X7R、NL-

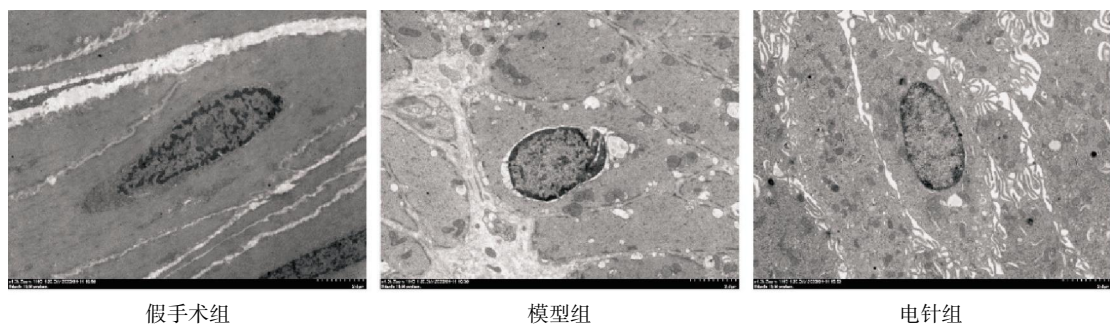


图 3 各组大鼠膀胱组织超微结构比较(电镜, $\times 4\ 000$ )

Fig.3 Ultrastructural comparison of bladder tissue in each group (electron microscope,  $\times 4\ 000$ )

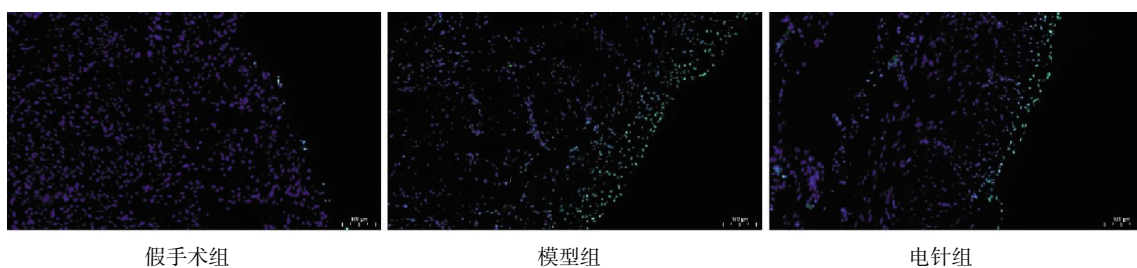


图 4 各组大鼠膀胱组织 TUNEL 染色结果( $\times 200$ )

Fig.4 TUNEL staining results of bladder tissue in each group ( $\times 200$ )

注:绿色荧光细胞为损伤细胞,蓝色荧光细胞为活细胞。

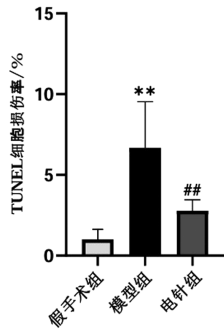


图 5 各组大鼠膀胱组织中细胞损伤率比较( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

Fig.5 Comparison of cell injury rate in bladder tissue of rats in each group ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

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

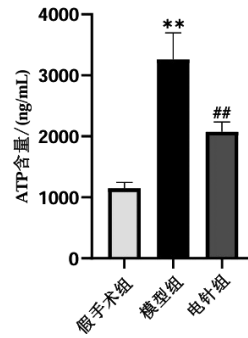


图 6 各组大鼠膀胱组织中 ATP 含量表达( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

Fig.6 The expression of ATP content in bladder tissue of rats in each group ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

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

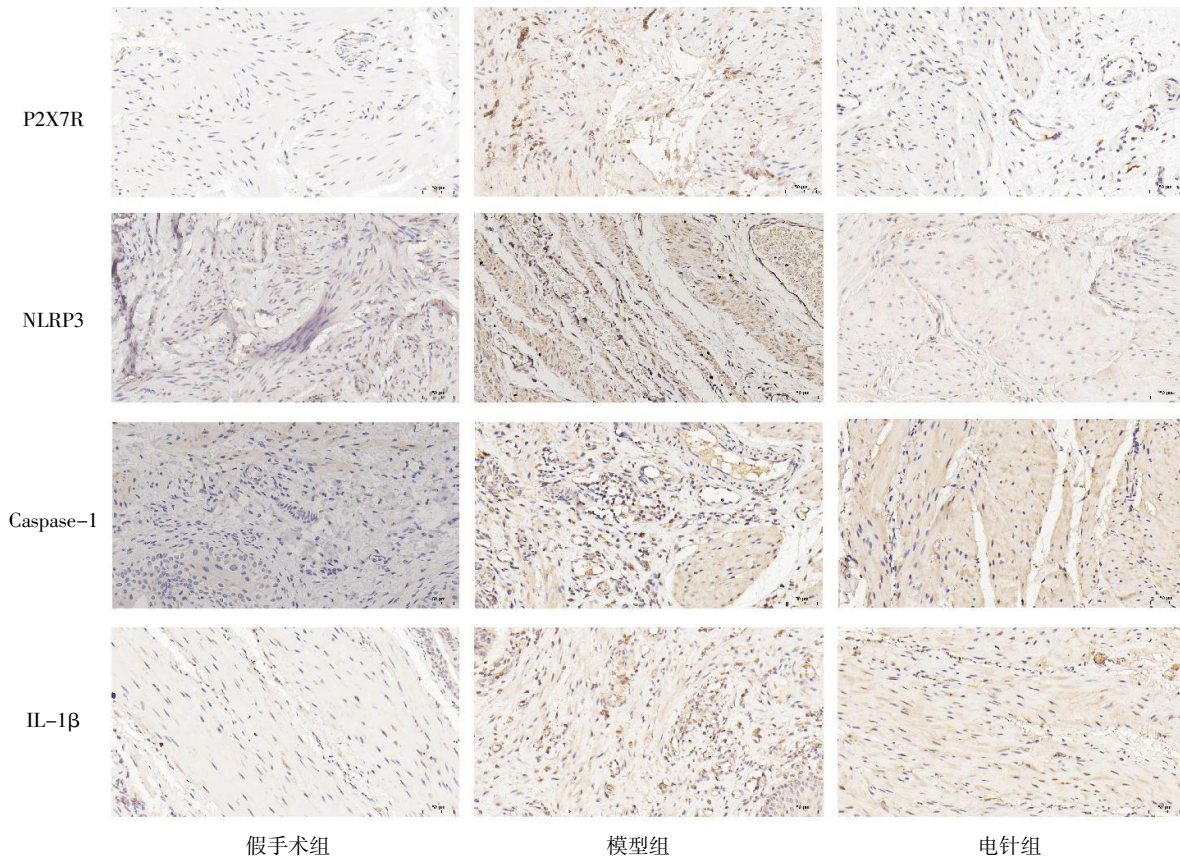


图 7 各组大鼠膀胱组织中 P2X7R、NLRP3、Caspase-1、IL-1 $\beta$  阳性表达情况( $\times 400$ )

Fig.7 The positive expression of P2X7R, NLRP3, Caspase-1 and IL-1 $\beta$  in bladder tissue of rats in each group ( $\times 400$ )

注:膀胱组织中 P2X7R、NLRP3、Caspase-1、IL-1 $\beta$  阳性表达为棕黄色或深褐色。

RP3、Caspase-1、IL-1 $\beta$  蛋白表达显著下调( $P<0.01$ )。详见图 9。

### 3 讨论

尿液的储存和定期排出取决于膀胱逼尿肌与括约肌的协调活动,其过程是高位皮质-脑桥中枢协

调低位脊髓交感神经、副交感神经和躯体神经系统活动共同作用的结果。膀胱平滑肌和尿道内括约肌受 T11-L2 的交感神经和 S2-S4 的副交感神经共同支配,当膀胱平滑肌感受到骶髓副交感神经核传递的神经冲动时,促发逼尿肌收缩,引起排尿。高位皮质-脑桥中枢抑制胸腰段(T11-L2)交感中枢,使尿

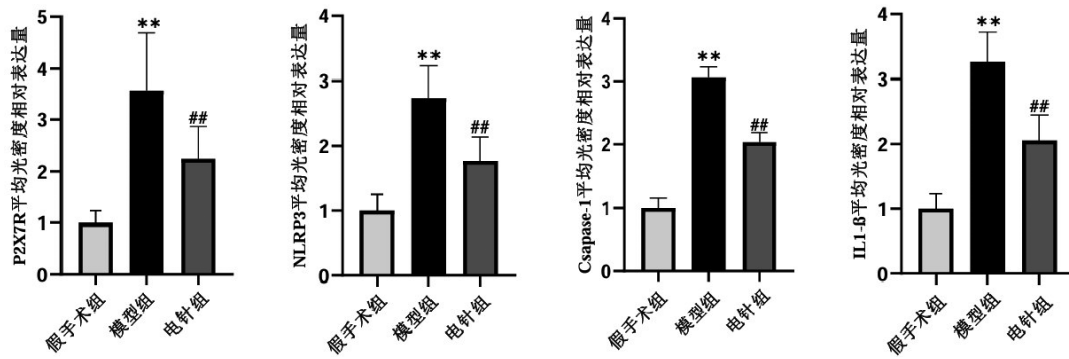


图 8 各组大鼠膀胱组织中 P2X7R、NLRP3、Caspase-1、IL-1β 蛋白表达量比较 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Fig.8 Comparison of protein expression of P2X7 R, NLRP3, Caspase-1 and IL-1β in bladder tissues of rats in each group ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

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

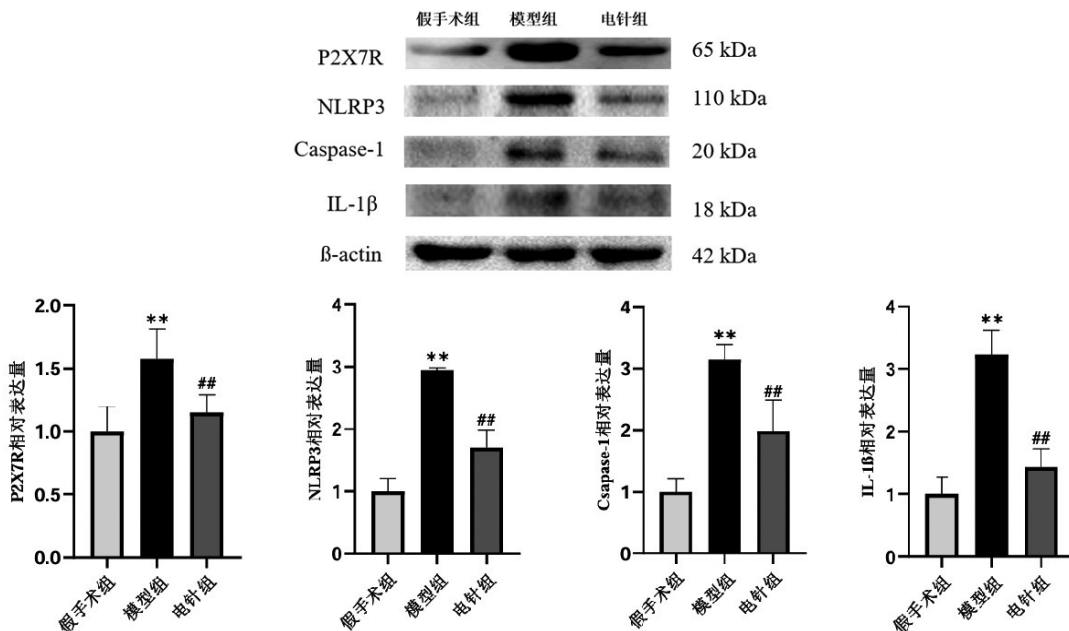


图 9 各组大鼠膀胱组织中相关蛋白相对表达情况比较 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Fig.9 Comparison of relative expression of related proteins in bladder tissue of rats in each group ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

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

道内括约肌松弛,促进尿液排空<sup>[16]</sup>。T8 的 SCI 后,骶部排尿反射弧失去了高位排尿中枢的抑制作用,排尿期逼尿肌收缩过程中括约肌舒张不能,从而导致尿液排出受阻及残余尿量增多,排尿功能下降,呈现尿潴留型 NB<sup>[14]</sup>。随着病情进一步发展,还会导致上尿路损伤甚至肾衰竭等严重后果。

T8 椎体下 SCI 所致尿潴留型 NB,因其膀胱逼尿肌-括约肌的高兴奋性及尿液排出障碍和大量残余尿的存在,导致膀胱呈持续性高内压状态。相关研究表明,膀胱组织承受高压而过度伸展时会加剧细胞焦亡,并使膀胱组织形态结构发生病变,如膀

胱组织内大量炎性细胞浸润、平滑肌肌层明显增厚肥大及肌纤维排列紊乱等,进而影响膀胱平滑肌舒缩,最终损害膀胱排尿功能<sup>[17]</sup>。焦亡是一种促炎性的程序性细胞死亡方式,其特点包括细胞膜破裂、细胞器肿胀、TUNEL 染色阳性,导致膀胱组织纤维化、炎症反应显著、组织肥大及膀胱重塑,这些都是影响膀胱功能的重要原因<sup>[7,18]</sup>。有研究表明,线粒体损伤与焦亡的发生密切相关<sup>[19]</sup>。本研究 HE 染色结果显示,模型组大鼠膀胱组织炎症反应显著;透射电镜结果显示,模型组大鼠膀胱组织中部分线粒体肿胀破坏;TUNEL 染色结果显示,模型组大鼠膀胱组织中细



胞损伤显著增高。这些均表明膀胱组织可能发生了焦亡,为进一步验证,故本研究选取了 P2X7R/NLRP3/Caspase-1 焦亡通路进行验证。

P2X7R 属于 P2X 嘌呤受体家族,是 ATP 门控阳离子通道,广泛分布在膀胱组织之中。ATP 是一种反应化合物,受机械牵拉释放参与激活 P2X7R,而 P2X7R 是 NLRP3 炎症小体的有效刺激因子之一,NLRP3 炎症小体可促进 Caspase-1 成熟转化,引发细胞焦亡,释放炎症因子 IL-1 $\beta$ <sup>[9-10]</sup>。相关研究发现,NB 模型大鼠膀胱组织中焦亡相关因子 NLRP3、Caspase-1、IL-1 $\beta$  水平明显上升,膀胱损伤细胞会产生炎症因子 IL-1 $\beta$ ,通过刺激平滑肌细胞增殖影响膀胱排尿功能<sup>[11,20]</sup>。下调焦亡相关因子的表达水平,可明显改善大鼠膀胱组织中细胞损伤程度、降低膀胱组织炎性细胞浸润程度、减轻膀胱平滑肌异常增生与肥大、提高膀胱排尿效率。因此,通过影响焦亡减轻膀胱组织病理损伤、减轻膀胱组织炎症、减轻膀胱组织增生与肥大、修复膀胱排尿结构、改善膀胱尿潴留症状,是保护骶上 SCI 后膀胱功能的重要措施。

本研究尿流动力学检测结果显示,模型组大鼠膀胱漏尿点压力、膀胱最大压力、膀胱最大容量显著升高,电针组大鼠膀胱漏尿点压力、膀胱最大压力、膀胱最大容量相对降低,提示电针可部分提高 NB 大鼠的排尿效率,这与其他相关研究的结果一致。本研究 HE 染色及透射电镜结果显示模型组大鼠膀胱组织形态结构受到损害,结合 TUNEL 染色显示模型组大鼠膀胱组织中细胞损伤显著增高,Western blot 法检测及免疫组织化学法结果显示模型组大鼠膀胱组织中 P2X7R、NLRP3、Caspase-1、IL-1 $\beta$  相对表达量均明显升高,提示模型组大鼠膀胱组织发生了细胞焦亡,其炎性反应刺激膀胱组织明显增厚、肥大及肌纤维紊乱,是影响膀胱排尿功能的重要原因之一<sup>[21-22]</sup>。电针组膀胱组织中细胞损伤显著降低,P2X7R、NLRP3、Caspase-1、IL-1 $\beta$  蛋白表达下调,且与本次研究的电针组大鼠膀胱尿流动力学结果、膀胱组织形态学检测结果一致,提示调节 P2X7R 介导的细胞焦亡途径是电针改善骶上 SCI 大鼠膀胱排尿功能的机制之一。有临床研究和动物试验证明,电针能减轻膀胱组织病理损伤,改善膀胱排尿功能<sup>[23-24]</sup>。本次实验也证明,骶上 SCI 后 NB 与焦亡联系紧密,激活焦亡相关因子表达的同时又会进一步加重膀胱

组织炎症和膀胱组织结构损害,从而限制膀胱排尿功能及效率。因此,通过影响焦亡,能有效保护膀胱排尿功能的结构基础,提高膀胱排尿效率。

中医学认为,骶上 SCI 后所致尿潴留型 NB 属于“癃闭”范畴,该病主要由于经脉受损、气滞血瘀、肾气亏虚所致。次髎常用于临床治疗尿潴留,是膀胱经分布于腰骶部的重要腧穴,针法以深刺为主,具有调理膀胱的作用。次髎深层有第 2 骶神经根通过,刺激该穴可调节膀胱平滑肌与内括约肌有节律的运动,改善膀胱排尿困难<sup>[25-26]</sup>。三阴交是次髎的优势配穴,具有益肾利水的作用。中极是膀胱的募穴,具有补肾、清热利湿的作用。中极和三阴交为一组远近配伍取穴,中极与自主神经的传入神经有关,三阴交位于 L4~S3 神经节段支配区域内,给予电刺激可调节神经的兴奋性,调节膀胱活动<sup>[27-28]</sup>。相关研究表明,电刺激应用于临床治疗膀胱障碍疾病的疗效可观<sup>[29-31]</sup>。故本研究以电针为干预手段,发现电针能相对减轻膀胱的病理损伤程度,延缓本病的发展进程,减低模型大鼠膀胱漏尿点压力、膀胱最大压力、膀胱最大容量,减轻尿潴留程度,提高其排尿效率,部分重建膀胱的排尿功能。

综上所述,电针次髎、中极、三阴交可有效改善骶上 SCI 后尿潴留型 NB 大鼠的膀胱排尿功能,缓解尿潴留症状,减轻膀胱组织病理损伤程度及其炎症反应,其机制与抑制 P2X7R 介导的细胞焦亡途径上 P2X7R、ATP、NLRP3、Caspase-1、IL-1 $\beta$  的表达有关。该研究为电针治疗本病的效应机制研究提供了部分科学依据,有助于应用电针治疗该病的进一步临床推广。然而,本研究也存在一定不足,如实验样本量尚小、电针干预观察时间尚短以及对于 P2X7R 介导的细胞焦亡途径上下游信号通路激活机制研究还可继续深入等,可在后续研究中进一步探索。

## 参考文献

- [1] GINSBERG D. The epidemiology and pathophysiology of neurogenic bladder[J]. *The American Journal of Managed Care*, 2013, 19(10 Suppl): s191-s196.
- [2] TRUZZI J C, DE ALMEIDA F G, SACOMANI C A, et al. Neurogenic bladder—concepts and treatment recommendations[J]. *International Braz j Urol*, 2022, 48(2): 220-243.
- [3] POWELL C R. Not all neurogenic bladders are the same: A proposal for a new neurogenic bladder classification system[J].

- Translational Andrology and Urology, 2016, 5(1): 12-21.
- [4] 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.
- [5] EVES F J, RIVERA N. Prevention of urinary tract infections in persons with spinal cord injury in home health care[J]. Home Healthcare Nurse, 2010, 28(4): 230-241.
- [6] 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.
- [7] LI Q, HONG Y F, CHEN J, et al. Hypoxia-induced HIF-1 $\alpha$  expression promotes neurogenic bladder fibrosis via EMT and pyroptosis[J]. Cells, 2022, 11(23): 3836.
- [8] HOU J W, HSU J M, HUNG M C. Molecular mechanisms and functions of pyroptosis in inflammation and antitumor immunity[J]. Molecular Cell, 2021, 81(22): 4579-4590.
- [9] ROSSATO M, VINCENZO A D, PAGANO C, et al. The P2X7 receptor and NLRP3 axis in non-alcoholic fatty liver disease: A brief review[J]. Cells, 2020, 9(4): 1047.
- [10] SVENNERSTEN K, HALLÉN-GRUFMAN K, DE VERDIER P J, et al. Localization of P2X receptor subtypes 2, 3 and 7 in human urinary bladder[J]. BMC Urology, 2015, 15: 81.
- [11] HALDAR S, DRU C, BHOWMICK N A. Mechanisms of hemorrhagic cystitis[J]. American Journal of Clinical and Experimental Urology, 2014, 2(3): 199-208.
- [12] 卓越, 艾坤, 许明, 等. 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[J]. 中国康复医学杂志, 2023, 38(5): 577-588.
- [13] SHAKER H, MOURAD M S, ELBIALY M H, et al. Urinary bladder hyperreflexia: A rat animal model[J]. Neurourology and Urodynamics, 2003, 22(7): 693-698.
- [14] INSKIP J A, RAMER L M, RAMER M S, et al. Autonomic assessment of animals with spinal cord injury: Tools, techniques and translation[J]. Spinal Cord, 2009, 47(1): 2-35.
- [15] 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.
- [16] PEREZ N E, GODBOLE N P, AMIN K, et al. Neurogenic bladder physiology, pathogenesis, and management after spinal cord injury[J]. Journal of Personalized Medicine, 2022, 12(6): 968.
- [17] WANG K, CHEN L, YANG J, et al. Urethral meatus stricture BOO stimulates bladder smooth muscle cell proliferation and pyroptosis via IL-1 $\beta$  and the SGK1-NFAT2 signaling pathway[J]. Molecular Medicine Reports, 2020, 22(1): 219-226.
- [18] CHEN J, LI Q, HONG Y F, et al. Inhibition of the NF- $\kappa$ B signaling pathway alleviates pyroptosis in bladder epithelial cells and neurogenic bladder fibrosis[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(13): 11160.
- [19] 曹子彤, 陈彦君, 谈世铭, 等. 氧化型脂蛋白(a)通过抑制细胞色素 b 表达促进血管内皮细胞焦亡[J]. 中国动脉硬化杂志, 2024, 32(7): 558-566.
- [20] 王岳. NLRP3 炎症小体在糖尿病膀胱粘膜细胞凋亡的作用研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2020.
- [21] 刘玲玲, 梅继林, 李诺, 等. 夹脊电针调控 P2X7R/NLRP3 信号通路相关因子改善脊髓损伤大鼠微环境炎症反应的作用机制研究[J]. 针灸临床杂志, 2021, 37(3): 72-79.
- [22] 匡静之, 张泓, 艾坤, 等. 电针对骶上脊髓损伤后神经源性膀胱大鼠膀胱最大容量和组织形态的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2014, 34(1): 47-50.
- [23] 张伟娜, 陈欢, 刘志顺. 电针减少复发性膀胱炎发作次数: 1 例病例报告[J]. 世界针灸杂志: 英文版, 2021, 31(4): 251-253.
- [24] 李炆, 张润宁, 刘欣. 电针次髂穴治疗脊髓损伤后神经源性膀胱作用机制的实验研究[J]. 山东中医杂志, 2020, 39(2): 171-176.
- [25] 刘丛丛. 电针次髂/中髂穴兴奋逼尿肌效应及其传入和传出神经调控机制[D]. 北京: 中国中医科学院, 2014.
- [26] 龙子临, 刘志顺. 基于数据挖掘浅析次髂穴主治病症及配伍规律[J]. 中国针灸, 2022, 42(4): 459-463.
- [27] 李丹, 吴霞, 肖四旺. 针灸治疗产后尿潴留的选穴规律分析[J]. 中医药导报, 2021, 27(2): 151-154, 159.
- [28] 徐建文, 张永臣, 贾红玲. 基于数据挖掘技术的针刺治疗术后尿潴留选穴规律探析[J]. 辽宁中医杂志, 2023, 50(9): 1-4.
- [29] 郭文, 冷军, 田梦, 等. 电刺激治疗神经源性膀胱研究现状[J]. 现代中西医结合杂志, 2020, 29(21): 2386-2389.
- [30] 王舟怡, 黄桂晓, 杨亚梅, 等. 经皮穴位电刺激联合药物治疗膀胱过度活动症的疗效观察及对患者焦虑抑郁的影响[J]. 上海针灸杂志, 2023, 42(2): 153-157.
- [31] 郭艳, 鲍以嘉, 顾志娟. 三阴交穴位按摩联合低频脉冲反馈电刺激对产后压力性尿失禁患者盆底功能、尿失禁次数的影响[J]. 世界中西医结合杂志, 2023, 18(9): 1826-1830, 1835.

(本文编辑 匡静之)