

隔姜灸对大鼠脊髓损伤后神经源性膀胱 M2、M3 乙酰胆碱 mRNA 及 P2X3 受体表达的影响

闫晓¹, 李在洺¹, 冯晓东^{1,2}, 白俊敏², 刘承梅^{1,2}

摘要:目的 探讨隔姜灸改善脊髓损伤大鼠神经源性膀胱症状的作用靶点,为脊髓损伤神经源性膀胱患者临床干预提供理论基础。方法 选取 SD 大鼠为实验动物,随机分组后,按照改良 Allen's 法建立 T₁₀ 脊髓损伤模型,根据评估标准,筛选符合脊髓损伤后神经源性膀胱标准的动物模型纳入模型组和隔姜灸组;假手术组仅切除 T₁₀ 椎板,不破坏脊髓;各组均纳入 10 只 SD 大鼠。三组术后均给予抗感染、创口护理及 Crede 手法辅助排尿。隔姜灸组同时行隔姜灸治疗,即术后第 1 天开始,每日 1 次,每次每个穴位灸 10 min,连续 12 d。结果 隔姜灸组治疗后嘌呤能 P2X3 受体的相对表达水平及 M2、M3 乙酰胆碱 mRNA 的相对表达水平显著高于模型组(均 $P < 0.05$)。结论 隔姜灸治疗可提高脊髓损伤大鼠脊髓神经节嘌呤能 P2X3 受体及膀胱组织中 M2、M3 乙酰胆碱 mRNA 的表达水平,从而有利于改善神经源性膀胱功能障碍。

关键词:SD 大鼠; 脊髓损伤; 神经源性膀胱; 隔姜灸; 嘌呤能 P2X3; M2 乙酰胆碱; M3 乙酰胆碱; 动物实验

中图分类号:R248;N33 **文献标识码:**A **DOI:**10.3870/j.issn.1001-4152.2020.19.001

Effect of ginger-partitioned moxibustion on the expression of M2- and M3- muscarinic acetylcholine receptor mRNAs and P2X3 receptor in rat model of neurogenic bladder after spinal cord injury Yan Xiao, Li Zaiming, Feng Xiaodong, Bai Junmin, Liu Chengmei. School of Rehabilitation Medicine, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China

Abstract: **Objective** To explore the target sites for improving bladder function in rat model of neurologic bladder after spinal cord injury (SCI) by employing ginger-partitioned moxibustion, and to provide a theoretical basis for clinical intervention. **Methods** Sprague-Dawley (SD) rat model of T₁₀ SCI was developed through modified Allen's method, then those met diagnosis of neurologic bladder after SCI were treated as the model group and the ginger-partitioned moxibustion group, with 10 rats in each group. Ten rats receiving removal of the T₁₀ lamina without damage of the spinal cord were treated as the sham group. All rats in the 3 groups received anti-infection treatment, wound care and Crede manoeuvre. Meanwhile, the ginger-partitioned moxibustion group was given indirect moxibustion using ginger once a day, 10 min for each acupoint at day 1 postoperatively for 12 consecutive days. **Results** After treatment, the expression levels of P2X3 receptor, M2- and M3- muscarinic acetylcholine receptor mRNAs in the ginger-partitioned moxibustion group were significantly higher than those in the model group ($P < 0.05$ for all). **Conclusion** Ginger-partitioned moxibustion could improve the expression levels of P2X3 receptor in spinal ganglion, M2- and M3- muscarinic acetylcholine receptor mRNAs in the urinary bladder tissue of rats with SCI, so as to ameliorate bladder function.

Key words: Sprague-Dawley rat; spinal cord injury; neurogenic bladder; ginger-partitioned moxibustion; purinergic P2X3; M2-muscarinic acetylcholine; M3-muscarinic acetylcholine; animal experiment

脊髓损伤(Spinal Cord Injury, SCI)是由各种因素造成损害的相应脊髓节段出现病理反射,肌张力异常及运动、感觉功能障碍的相应改变。神经源性膀胱是脊髓损伤患者最常见并发症,约占 65.96%^[1]。尿潴留、尿失禁及尿频、尿急等症状是神经源性膀胱的主要临床表现,易诱发泌尿系统感染及肾功能异常^[2]。由于患者膀胱功能障碍是不断变化的过程,故需对其膀胱功能整体情况进行实时评估和分型,早发

现、早处理、正确护理、终身护理和定期随访,最大限度地避免并发症的发生,提高生活质量。研究发现,隔姜灸可改善脊髓损伤后神经源性膀胱的相关症状^[3-6],但隔姜灸治疗的确切机制尚不明确。本研究拟探讨隔姜灸改善脊髓损伤后大鼠神经源性膀胱障碍的作用,了解隔姜灸对脊髓损伤后神经源性膀胱的作用靶点,阐明其作用机制,为临床干预提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 动物分组与处理 选取清洁级、健康、成年雄性、SD 大鼠为实验动物,体质量(260.00±20.00)g,由河南省实验动物中心提供[许可证号:SCXK(豫)2017-0001],于河南中医药大学第一附属医院中心实验室饲养,温度 22℃、湿度 50%~70%、模拟标准昼

作者单位:1. 河南中医药大学康复医学院(河南 郑州,450046);2. 河南中医药大学第一附属医院康复中心

闫晓:女,硕士在读,学生

通信作者:刘承梅,lcem0428@163.com

科研项目:河南省高等学校重点科研项目(18A360016)

收稿:2020-04-20;修回:2020-06-30

夜系统(12 h 光照+12 h 黑夜),给予 1 周适应喂养。随机分组制备动物模型后最终纳入假手术组、模型组、隔姜灸组各 10 只,共 30 只 SD 大鼠。动物实验已通过河南中医药大学第一附属医院伦理委员会批准,操作过程严格遵守国际动物保护和指南的规定,术后对三组动物均给予抗感染、创口护理及 Crede 手法^[7]协助排尿。

1.2 脊髓损伤制模 ①脊髓损伤模型制备。术前所有实验 SD 大鼠禁食 12 h,自由饮水,称重后采用 10%水合氯醛按 3.5 mL/kg 的标准腹腔注射麻醉。成功麻醉后,用剃毛器将 SD 大鼠背部手术区皮毛处理干净,将其俯卧位固定,消毒备皮。以 T₁₀ 棘突为中心作背部正中切口,长度 3~5 cm,依次切开皮肤、浅筋膜、深筋膜及其它皮下组织,钝性分离椎旁肌肉,用组织嵌夹持 T₉ 椎体固定脊柱,用蚊式有齿血管钳仔细咬除 T₁₀~T₁₁ 棘突及两侧椎板直至关节突,将脊髓暴露约 5 mm。在直径约 1.0 cm 的圆形区域,应用 IH-0400 型脊髓致伤仪(美国,PSI),采用改良 Allen's 垂直打击法设定打击力度为 200 g 建立 SD 大鼠 T₁₀ 节段脊髓损伤模型。撞击成功后见尾部痉挛样摆动,撞击部位脊髓充血水肿,麻醉清醒后出现双下肢瘫痪。假手术组仅切除 T₁₀ 椎板,不破坏脊髓。术后用温盐水纱布覆盖伤处数分钟,在无活动性出血后逐层缝合椎旁肌肉及组织,完毕将 SD 大鼠置于暖灯处,待其苏醒后单笼饲养。②脊髓损伤模型评估。成功脊髓损伤模型标准为动物麻醉清醒后,只有前肢参与行走,后肢处于拖动状态。③膀胱功能评估。脊髓损伤后神经源性膀胱模型建立成功的标准为脊柱休克期有尿潴留、膀胱充盈表现,腹部可触及胀大膀胱,无自主排尿,饲养笼内垫料干燥。

1.3 术后护理 术后给予 SD 大鼠创口护理并按照 0.2 mL/只的标准给予硫酸庆大霉素腹腔注射以预防感染,每天 1 次,连续 5 d;每日每只 SD 大鼠腹腔注射 5%葡萄糖氯化钠溶液 2 mL 以辅助饮食,上、下午各 1 次,直至能自行进食为止。给予 Crede 手法辅助排尿,于体表膀胱上方挤压膀胱协助排尿,每天上下午各 1 次,至可自主排尿为止。

1.4 干预措施 ①隔姜灸组。参考《实验针灸学》^[8]并结合人体穴位分布特点选取关元(脐下约 25 mm 处)、命门(背部后正中线上,第二腰椎棘突下凹陷处)、足三里(膝关节后外侧,在腓骨头下约 5 mm 处)、阴陵泉(在小腿内侧与阳陵泉相对,阳陵泉距足三里上外侧 5 mm 处)、八髎(位于第 1、2、3、4 骶后孔处)给予隔姜灸。灸前用宠物剃毛器将所灸穴位区皮毛剃除,关元、足三里、阴陵泉在隔姜灸操作时,将 SD 大鼠仰卧位固定;命门、八髎在隔姜灸操作时,将 SD 大鼠俯卧位固定。将已捣碎的生姜泥制成厚度为 0.5 cm 平铺于穴位上,用浸泡过生姜汁的湿纱布固定;将特制艾条分割成小体积点燃后放于适应穴位

区大小的温灸架和温筒器内,用弹力绷带固定于穴位上,每个穴位灸 10 min;每天 1 次,共 12 d。②模型组。术后单笼饲养,给予术后护理。③假手术组。术后单笼饲养,给予术后护理。

1.5 取材及检测

各组大鼠按 3.5 mL/kg 用 10%水合氯醛麻醉后,于下腹部作切口,迅速取出其膀胱并分装放入冻存管后转入盛有液氮的容器内速冻。膀胱取出后迅速断头暴露背部皮肤肌肉及相应的脊髓节段,取背神经节标本,分装于冻存管后放入液氮内速冻。之后将所有冻存管转至-80℃冰箱备用。

1.5.1 Western blot 检测脊髓神经节 P2X₃ 受体表达

按每 1 个 DRG 加入 20 μL 裂解液(每 1 mL RIPA 加入 10 μL PMSF)的比例加入裂解液用研磨器研磨,直至充分裂解,静止 10 min 后 12 000 g 离心 5 min。测浓度,获取上清液样本。取适量上清液以 60 V、30 min、80 V 电泳至溴酚蓝将要跑出分离胶时终止电泳,以 12 V、60 min 半干法转膜,结束后以 1×TBST 漂洗 3 次,每次 5 min,漂洗结束后将 PVDF 膜移至 5%脱脂奶粉封闭液中,室温摇床摇动封闭 1.5 h。结合一抗、二抗、化学发光显影后使用 Image Pro Plus 软件进行图像分析条带灰度值。以 GAPDH 为内参,并以每张膜的假手术组条带灰度值进行均一化校正,进而得到 P2X₃ 受体的相对表达量。

1.5.2 RT-PCR 检测膀胱组织 M₂、M₃ 乙酰胆碱 mRNA 的表达

①提总 RNA。取 100 mg 组织加入 1 mL 裂解液、研磨,按照总 RNA 提取试剂盒的操作说明提取 RNA,测浓度,按 1 μg 的上样量,计算体积。②RNA 逆转录反应。按照 HiScript[®] II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒操作说明书配制 20 μL 的逆转录反应体系(RNA=1 μg),轻微震荡离心后置于逆转录梯度 PCR 仪上。按设置的反应程序 25℃,5 min;50℃,15 min;85℃,2 min 进行反应。③qPCR 反应。反应体系为 20 μL,其中 cDNA 为 1 μL,Forward primers、Reverse primers 各 1 μL,PowerUP[™] SYBR[™] Green Master Mix (2X)为 10 μL,RNase free ddH₂O 为 7 μL。扩增参数设置:UDG 酶激活,50℃,2 min,1 个循环;预变性 95℃,5 min,1 个循环;变性、退火、延伸反应为 95℃,15 s,60℃,1 min,45 个循环;熔解反应,95℃,15 s,60℃,1 min,升温至 95℃,37℃,2 min,1 个循环。M₂ 乙酰胆碱、M₃ 乙酰胆碱基因相对表达定量分析采用 2^{-ΔΔCt} 法进行计算,Ct 值为扩增曲线达到设定阈值时的循环数,以 beta actin 为内参基因进行校正,计算 mRNA 相对表达量。

1.6 统计学方法 数据采用 SPSS22.0 软件进行处理,采用单因素方差分析,检验水准 α=0.05。

2 结果

三组大鼠嘌呤能 P2X₃ 受体蛋白及 M₂、M₃ 乙酰胆碱 mRNA 相对表达量比较,见表 1。

表 1 三组大鼠嘌呤能 P2X3 受体蛋白及 M2、M3 乙酰胆碱 mRNA 相对表达量比较 $\bar{x} \pm s$

组别	样本 (个)	嘌呤能 P2X3	乙酰胆碱 mRNA		
			样本(个)	M2	M3
假手术组	6	1.00±0.00	4	1.00±0.29	1.00±0.13
模型组	6	0.53±0.16	4	0.23±0.03	0.15±0.01
隔姜灸组	6	0.89±0.14	4	0.92±0.09	1.38±0.40
<i>F</i>		24.622		23.234	26.362
<i>P</i>		0.000		0.000	0.000

注:两两比较,嘌呤能 P2X3 及 M2,隔姜灸组显著高于模型组、低于假手术组,均 $P < 0.05$;M3,隔姜灸组显著高于模型组及假手术组,均 $P < 0.05$ 。

3 讨论

在中医学中,脊髓损伤后神经源性膀胱功能障碍归属于“癃闭”范畴,主要以小便量少甚则闭塞不通,排尿困难为主症,其病位在肾与膀胱,基本病机为膀胱气化功能失调,治疗主要按照“腑以通为用”的原则,根据证候不同而辨证论治^[9]。临床实践中,在恢复膀胱正常排尿反射,减少并发症,降低对患者正常生活影响的总体目标指导下,对神经源性膀胱患者的护理主要采用适应患者的导尿术^[10]、给予行为训练及辅助排尿等指导,施加盆底肌肉锻炼等方法^[11]。治疗上采用包括药物、针灸、手术、电刺激物理治疗、综合治疗等方法^[12]。在众多疗法中,以改善患者膀胱功能、促进自主排尿功能重建为目标的中医综合康复是解决脊髓损伤后神经源性膀胱尿潴留的有效手段^[13]。

中医综合康复中艾灸以其治疗方法简单、疗效好而被患者接受。艾灸是借灸火的温热刺激及药物作用在相应的经络腧穴发挥温皮通脉、温补气血、扶正祛邪、防治疾病作用的一种治疗方法。艾灸具有独特的疗效,有“灸治百病”之说^[14]。隔姜灸能发挥艾灸与姜片的双重作用,与一般灸法比较具有更好的温经通络、祛寒镇痛作用。在隔姜灸治疗中,正确选择腧穴至关重要,有研究发现,在关元、命门、足三里、阴陵泉、八髎等腧穴采用艾灸疗法对脊髓损伤后神经源性膀胱的疗效较好^[15]。中医理论认为,关元为元气所存之处^[16],是任脉与足三阴经交会穴,具有补下元、促气化的作用;阴陵泉为脾经合穴,具有清湿热、利小便的功效;八髎穴位于足太阳膀胱经上,主治小便不利等病症,足三里为胃之下合穴,为强壮保健的要穴,可以主治虚劳诸证。上述诸穴配伍使用结合隔姜灸对脊髓损伤后神经源性膀胱患者膀胱功能的改善有较好的疗效。

脊髓是排尿神经中枢,调节尿道括约肌和逼尿肌功能活动,构成神经传导通路。脊髓损伤破坏了自主控制和协调膀胱括约肌功能的正常反射途径。当脊髓损伤发生在骶髓以上时,骶髓排尿中枢失去骶髓以上排尿中枢的抑制作用,会造成逼尿肌反射亢进,膀胱最大容量减少、膀胱顺应性下降等病理生理变

化^[17]。在脊休克期损伤节段以下为迟缓性瘫痪状态,表现为感觉、运动、反射均消失,尿潴留;脊休克期结束后,各种反射活动依次恢复,此时损伤部位不同,膀胱障碍表现也不同^[18-19]。

P2X 受体为配体离子门控通道,是非肾上腺素非胆碱能(NANC)重要成员^[20],分为 P2X1~P2X7 共 7 个亚型,而 P2X3 受体主要在膀胱上皮表达,参与膀胱的传入神经活动和膀胱感觉功能的调节^[21]。本研究结果显示,隔姜灸组治疗后嘌呤能 P2X3 受体的表达水平显著高于模型组($P < 0.05$),提示脊髓损伤术后神经源性膀胱大鼠尿潴留、膀胱充盈的表现与嘌呤能 P2X3 受体的表达水平降低有关,而隔姜灸治疗可改善嘌呤能 P2X3 受体的表达水平,从而有利于膀胱功能的恢复。实验过程也发现,隔姜灸治疗后实验大鼠尿潴留、膀胱充盈的症状改善,有自主排尿的表现。与 Cockayne 等^[22]研究结果一致。分析作用机制可能为,隔姜灸通过温经通络促进膀胱上皮释放 ATP,激活嘌呤能 P2X3 受体的表达,从而改善脊髓损伤后神经源性膀胱大鼠尿潴留、膀胱充盈的症状。

支配膀胱逼尿肌的神经主要为胆碱能神经,该神经通过副交感神经节后纤维释放的乙酰胆碱作用于膀胱逼尿肌内 M 受体发挥作用。乙酰胆碱 M 受体分为 M1~M5 5 个亚型,M2、M3 受体在逼尿肌收缩活动中发挥重要作用。有学者认为,M3 受体发挥直接收缩作用,而 M2 受体则发挥间接介导作用^[23-24]。隔姜灸组治疗后 M2、M3 乙酰胆碱 mRNA 的表达水平显著高于模型组(均 $P < 0.05$)。提示隔姜灸治疗可改善脊髓损伤大鼠 M2、M3 乙酰胆碱 mRNA 的表达水平,从而增强膀胱逼尿肌收缩力,改善脊髓损伤后神经源性膀胱大鼠尿潴留、膀胱充盈的症状,与上述理论研究一致。

本实验结果表明,隔姜灸治疗可提高脊髓损伤大鼠脊髓神经节嘌呤能 P2X3 受体及膀胱组织中 M2、M3 乙酰胆碱 mRNA 的表达,有利于神经源性膀胱功能障碍的改善。隔姜灸可作为临床脊髓损伤神经源性膀胱患者治疗的借鉴;其理论探讨可作为相关研究的参照。今后研究可应用尿流动力学检测技术完善膀胱功能多项指标的检测,为脊髓损伤神经源性膀胱患者提供更详实的实证依据。

参考文献:

[1] 张娜,周谋望,刘楠,等. 2016 年度全国脊髓损伤康复医疗质量控制调查报告[J]. 中国康复医学杂志,2018,33(10):1137-1141.

[2] Myers J B, Mayer E N, Lenherr S. Management options for sphincteric deficiency in adults with neurogenic bladder[J]. Transl Androl Urol,2016,5(1):145-157.

[3] 林兆辉,车伟军,闫爱珍,等. 督脉隔姜灸治疗脊髓损伤后神经源性膀胱 30 例临床观察[J]. 国医论坛,2019,34(3):28-29.