

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2022.18.004
文章编号: 1005-8982 (2022) 18-0025-07

中枢神经系统损伤专题·论著

通腑茯苓饮联合电针治疗大鼠骶上脊髓损伤后神经源性膀胱的作用机制研究*

张昱¹, 孔繁林¹, 吴磊²

[1. 山西白求恩医院(山西医学科学院), 山西 太原 030032;
2. 山西农业大学 生命科学学院, 山西 晋中 030801]

摘要: **目的** 探究通腑茯苓饮联合电针通过神经生长因子(NGF)-神经生长因子受体(TrkA)信号通路对大鼠骶上脊髓损伤(SSCI)后神经源性膀胱(NB)的影响及其作用机制。**方法** 采用随机数字表法将45只雌性大鼠分为对照组(8只)和实验组(37只)。实验组37只大鼠先复制SSCI模型,再复制SSCI后NB模型,其中5只大鼠模型复制失败,其余32只大鼠随机分为模型组、通腑茯苓饮组、电针组及联合组,每组8只。通腑茯苓饮组给予通腑茯苓饮6.25 g/(kg·d)灌胃处理;电针组对长强穴和维胞穴进行电针治疗,留针20 min,1次/d;联合组同时予以2种治疗;对照组与模型组给予等量的生理盐水,均连续治疗14 d。检测各组大鼠膀胱重量、残余尿量及尿流动力学指标,苏木精-伊红(HE)染色观察脊髓组织病理变化并进行病理学评分,实时荧光定量聚合酶链反应和Western blotting检测大鼠脊髓组织NGF、TrkA mRNA和蛋白的表达。**结果** 与对照组比较,模型组、通腑茯苓饮组、电针组及联合组大鼠膀胱重量、残余尿量增加,膀胱漏尿点压力、病理评分升高($P < 0.05$),膀胱顺应性降低,膀胱最大容量减少,NGF、TrkA mRNA和蛋白相对表达量降低($P < 0.05$);与模型组比较,通腑茯苓饮组、电针组及联合组的膀胱重量、残余尿量减少,膀胱漏尿点压力、病理评分降低($P < 0.05$),膀胱顺应性升高,膀胱最大容量增加,NGF、TrkA mRNA和蛋白相对表达量升高($P < 0.05$);与通腑茯苓饮组比较,电针组及联合组的膀胱重量、残余尿量减少,膀胱漏尿点压力、病理评分降低($P < 0.05$),膀胱顺应性升高,膀胱最大容量增加,NGF、TrkA mRNA和蛋白相对表达量升高($P < 0.05$);与电针组比较,联合组的膀胱重量、残余尿量减少,膀胱漏尿点压力、病理评分降低($P < 0.05$),膀胱顺应性升高,膀胱最大容量增加,NGF、TrkA mRNA和蛋白相对表达量升高($P < 0.05$)。**结论** 通腑茯苓饮联合电针能改善SSCI后NB大鼠膀胱功能,其作用机制可能与NGF-TrkA信号通路有关。

关键词: 骶上脊髓损伤;神经源性膀胱;通腑茯苓饮;电针;神经生长因子;神经生长因子受体;大鼠
中图分类号: R651.2;R694 **文献标识码:** A

Mechanism of Tongfu Fuling Decoction combined with electroacupuncture in treating neurogenic bladder after suprasacral spinal cord injury in rats*

Yu Zhang¹, Fan-lin Kong¹, Lei Wu²

[1. Shanxi Bethune Hospital (Shanxi Academy of Medical Sciences), Taiyuan, Shanxi 030032, China;
2. School of Life Sciences, Shanxi Agricultural University, Jinzhong, Shanxi 030801, China]

Abstract: Objective To explore whether Tongfu Fuling Decoction combined with electroacupuncture affects neurogenic bladder (NB) after suprasacral spinal cord injury (SSCI) through nerve growth factor (NGF)-tyrosine kinase (TrkA) signaling pathway in rats. **Methods** Eight rats were randomly selected as the control group

收稿日期: 2022-02-21

* 基金项目: 山西省重点研发计划项目(No.: 201803D31146)

by random number table method, and the remaining rats were used to establish the SSCI model followed by NB modeling, among which 5 rats were failed to establish the models. The rats successfully modelled were randomly divided into model group, Tongfu Fuling Decoction group, electroacupuncture group and combination group, with 8 rats in each group. The Tongfu Fuling Decoction group was given Tongfu Fuling Decoction at a dose of 6.25 g/(kg·d) by gavage. In the electroacupuncture group, acupuncture at Changqiang and Weibao acupoints was performed, and the needles were retained for 20 minutes, once a day. The combination group was given the two treatments at the same time. The control group and the model group were given the same amount of normal saline for 14 consecutive days. After treatment, bladder weight, residual urine volume, and urodynamics were detected. The histopathological changes in the spinal cord tissues were observed under H&E staining, and the pathological scores were evaluated. The mRNA and protein expressions of NGF and TrkA in spinal cord tissues of rats were detected by qRT-PCR and Western blotting, respectively. **Results** Compared with the control group, the bladder weight, residual urine volume, bladder leak point pressure, and the pathological score were increased, and the bladder compliance, the maximal bladder capacity, and the relative mRNA and protein expressions of NGF and TrkA were decreased in the model group, Tongfu Fuling Decoction group, electroacupuncture group and combination group ($P < 0.05$). Compared with the model group, the bladder weight, residual urine volume, bladder leak point pressure, and the pathological score were decreased, and bladder compliance, the maximal bladder capacity, and the relative mRNA and protein expressions of NGF and TrkA were increased in the Tongfu Fuling Decoction group, the electroacupuncture group and the combination group ($P < 0.05$). Compared with the Tongfu Fuling Decoction group, the bladder weight, residual urine volume, bladder leak point pressure, and the pathological score were decreased, and bladder compliance, the maximal bladder capacity, and the relative mRNA and protein expressions of NGF and TrkA were increased in the electroacupuncture group and the combination group ($P < 0.05$). Compared with the electroacupuncture group, the bladder weight, residual urine volume, bladder leak point pressure, and the pathological score were decreased, and bladder compliance, the maximal bladder capacity, and the relative mRNA and protein expressions of NGF and TrkA were increased in the combination group ($P < 0.05$). **Conclusions** Tongfu Fuling Decoction combined with electroacupuncture can improve the bladder function of rats with NB after SSCI, and its mechanisms may be related to the NGF-TrkA signaling pathway.

Keywords: suprasacral spinal cord injury; neurogenic bladder; Tongfu Fuling Decoction; electroacupuncture; nerve growth factor; nerve growth factor receptor; rats

神经源性膀胱 (neurogenic bladder, NB) 是由于中枢神经系统损伤导致的膀胱尿道功能障碍, 主要表现为尿不畅或潴留, 严重时引发尿路感染或肾衰竭, 造成死亡^[1]。脊柱损伤是造成 NB 的主要原因, 其中以骶上脊髓损伤 (suprasacral spinal cord injury, SSCI) 最常见^[2]。中医将其归为“癃闭”“遗溺”等范畴^[3]。目前 NB 主要采用手术和保守治疗, 但手术效果有限且创伤较大, 中医以汤药与针灸治疗最常见。目前针对 SSCI 后 NB 采用针刺较多, 而汤药与针灸联合治疗的研究较少, 且尚无确切的作用机制^[4]。为提高疗效, 本研究选用中药与电针联合治疗。汤药选用通腑茯苓饮进行调理, 该药方是根据《金匱要略》中葵子茯苓散加减而来, 具有通调水道、行气利水的功效^[5]。针刺则选用长强穴和维胞穴进行电针治疗。长强穴属督脉, 位于脊柱骨的尾端, 督阳初始之处, 能够增强督脉阳气, 调畅通淋, 治疗大小便难解; 维胞穴则位于下腹部, 主治遗尿,

尿潴留等, 具有调理冲任, 行气止痛的功效^[6]。为探究其联合治疗的效果及作用机制, 本研究复制 SSCI 后 NB 大鼠模型, 探究通腑茯苓饮联合电针治疗大鼠 SSCI 后 NB 的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

45 只 SPF 级、SD 雌性大鼠, 体重 190 ~ 220 g, 平均 (205 ± 15) g, 购自斯贝福 (北京) 生物技术有限公司, 实验动物生产许可证号: SCXK (京) 2016-0002, 实验动物使用许可证号: SYXK (京) 2019-0030。

1.2 主要试剂与仪器

1.2.1 主要试剂 通腑茯苓饮所用药材 (山西国药医药集团有限公司), 戊巴比妥钠 (CAS 号: 57-33-0, 上海谱析生物科技有限公司, 货号: XY-T-P276000), 中性甲醛 (CAS 号: 50-00-0, 上海远慕生物科技有限公司, 货号: YR0267), TRIzol 试剂盒 (武

汉纯度生物科技有限公司,货号:CD-13433-ML),实时荧光定量聚合酶链反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)试剂盒(广州市锐博生物科技有限公司,货号:MQPS),神经生长因子(nerve growth factor, NGF)、神经生长因子受体(nerve growth factor receptor, TrkA)单克隆抗体(北京安诺伦生物科技有限公司,NGF 抗体货号:LM12882;TrkA 抗体货号:LM21146)。

1.2.2 主要仪器 咬骨钳(苏州威邦医疗器械有限公司),一次性针灸针(型号:25mm,北京汉医医疗器械中心),SDZ-II 型华佗牌电针治疗仪(苏州医疗用品厂有限公司),基础电泳仪(型号:Mini-protean tetra mini,美国 Bio-Rad 公司),真空干燥箱(型号:FD8-3T,美国 GOLD-SIM 公司),紫外分光光度计(型号:BioSpectrometerD30,德国 Eppendorf 公司)。

1.3 方法

1.3.1 SSCI 模型的复制及分组 所有大鼠饲养于 SPF 区域,温度保持在 20℃ 左右,湿度为 55%~60%,大鼠食量一般为 100 g/(kg·d),每日给予充足的饲料和水。根据 Hassan Shakerl 脊髓横断法^[7],复制大鼠 SSCI 模型。采用随机数字表法将 45 只雌性大鼠分为对照组(8 只)和实验组(37 只)。实验组大鼠腹腔注射 1% 戊巴比妥钠(40 mg/kg)麻醉后复制 SSCI 模型。将大鼠俯卧固定,脊柱胸椎下段消毒、备皮,找到 T₁₀ 椎体,从此处切开皮肤,分离皮下组织,暴露 T₁₀、T₁₁ 棘突及椎板,用咬骨钳咬除 T₁₀ 椎板及两侧关节突,暴露出脊髓并将其切断(可反复切割,确保脊髓完全切断,无神经纤维残留),观察大鼠生命体征后缝合。大鼠清醒后,采用病理评分评估大鼠脊髓横断情况^[7]:0 分(后肢瘫痪,无任何运动)表明脊髓横断成功。术后抗感染治疗 7 d,每日手法排尿,并记录尿量。2 周后膀胱出现尿潴留,表明大鼠 SSCI 后 NB 模型复制成功。实验组 5 只大鼠模型复制失败(3 只死亡,2 只未出现尿潴留),其余大鼠随机分为模型组、通腑茯苓饮组、电针组及联合组,每组 8 只。

1.3.2 药物处理 通腑茯苓饮组方:茯苓 10 g、车前子 15 g、乌药 6 g、琥珀 3 g、黄芪 30 g、白术 20 g、泽泻 10 g、冬葵子 10 g、通草 6 g、滑石 10 g、牛膝 15 g,制成生药含量为 1 g/mL 的通腑茯苓饮,备用。模型复制成功后,根据人与大鼠的体重及给药剂量换算公

式^[9],通腑茯苓饮组给予通腑茯苓饮 6.25 g/(kg·d),连续服用 14 d;电针组采用 0.3 mm×25.0 mm 的电针,对长强穴和维胞穴进行针刺,电针仪参数设定为 10/50 Hz(疏波 10 Hz/5 s,密波 50 Hz/9 s),留针 20 min,1 次/d,连续 14 d。

1.3.3 标本采集及处理 最后一次治疗后对大鼠进行尿流动力学检测。检测后所有大鼠腹腔注射 1% 戊巴比妥钠(40 mg/kg)麻醉,采用手法辅助大鼠排尿,记录其残余尿量。在麻醉状态下剥离大鼠背部皮肤、肌肉及组织,分离暴露胸椎段 T₈~T₁₂ 脊髓,切除 T₉~T₁₀ 脊髓后用生理盐水冲洗,每组 4 只大鼠的脊髓于 4% 中性甲醛中固定,用于苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色;另 4 只大鼠的脊髓置于-80℃ 冷冻保存,用于检测 mRNA 和蛋白的表达。

1.3.4 大鼠尿流动力学检测 排空膀胱后,大鼠仰卧位固定,将三通导管中的空气排空,一端由尿道插入膀胱并固定,一端连接测压通道,另一侧连接微量灌注泵,记录膀胱基础压力后,向膀胱中匀速注入温生理盐水(0.2 mL/min),密切观察膀胱压力变化,当尿道口有液体流出时,记录此时压力值,为膀胱漏尿点压力,此时注入的生理盐水容量为膀胱最大容量。液体流出后继续注入温生理盐水,至逼尿肌压力稳定,根据公式计算得出膀胱顺应性。膀胱顺应性=膀胱容量的变化/压力变化。

1.3.5 大鼠脊髓组织 HE 染色及病理学评分 取固定好的脊髓组织标本,70% 乙醇脱水,透明,石蜡包埋,切片厚约 4 μm,HE 染色,封片后置于光镜下观察脊髓组织病理变化,并进行病理学评分。0 分:无炎症细胞浸润,1 分:炎症细胞仅出现在血管周围;2~4 分:脊髓周围出现轻、中、重度炎症细胞浸润^[10]。

1.3.6 qRT-PCR 检测大鼠脊髓组织 NGF、TrkA mRNA 的表达 取部分冷冻保存的脊髓组织,根据 TRIzol 试剂盒说明书提取脊髓组织总 RNA,采用紫外吸收法检测纯度及浓度,以总 RNA 为模板,逆转录为 cDNA,qPCR 反应体系:SYBR 4 μL,正反向引物各 1 μL,cDNA 模板 4 μL,H₂O 加至 20 μL;扩增条件:95℃ 预变性 2 min;95℃ 变性 10 s,58℃ 退火 15 s,72℃ 延伸 10 s,共 40 个循环。β-actin 为内参基因,采用 2^{-ΔΔCT} 法计算脊髓组织 NGF、TrkA mRNA 相对表达量,NGF、TrkA 及内参引物序列见表 1。

1.3.7 Western blotting 检测大鼠脊髓组织 NGF、

表 1 qRT-PCR 引物序列

| 基因 | 引物序列 | 引物长度/bp |
|----------------|-----------------------------------|---------|
| NGF | 正向: 5'-CACAGATAGCAATGTCCAGAGG-3' | 339 |
| | 反向: 5'-TAAATCCAGAGTGTCCGAAGAGG-3' | |
| TrkA | 正向: 5'-GCCACATCATGGAGAACCCA-3' | 218 |
| | 反向: 5'-AATGATGCTCTGGCGCTTGA-3' | |
| β -actin | 正向: 5'-CATCCTGCGTCTGGACCTGG-3' | 114 |
| | 反向: 5'-TAATGTCACGCACGATTTCC-3' | |

TrkA 蛋白的表达 取冷冻保存的脊髓组织研磨匀浆,加入裂解液对组织进行裂解,测定蛋白浓度,电泳分离目的蛋白,采用 PVDF 膜进行转膜,用 Western 洗涤液洗去转膜液,封闭 1 h,按一抗说明书进行稀释,加入一抗 NGF、TrkA 及内参后在 4℃ 条件下,摇床孵育过夜,再加入山羊抗兔二抗,孵育 2 h,最后显影得到结果^[1]。蛋白相对表达量=目的蛋白积分光密度值(IOD)/ β -Actin IOD。

1.4 统计学方法

数据分析采用 SPSS 22.0 统计软件。符合正态分布的计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,比较用单因素方差分析,进一步两两比较用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠膀胱重量、残余尿量比较

对照组、模型组、通腑茯苓饮组、电针组及联合组大鼠膀胱重量、残余尿量比较,经方差分析,差异有统计学意义($F = 90.861$ 和 27.951 , 均 $P = 0.000$)。进一步两两比较结果:与对照组比较,模型组、通腑茯苓饮组、电针组及联合组的膀胱重量、残余尿量增加($P < 0.05$);与模型组比较,通腑茯苓饮组、电针组及联合组的膀胱重量、残余尿量减少($P < 0.05$);与通腑茯苓饮组比较,电针组及联合组的膀胱重量、残余尿量减少($P < 0.05$),与电针组比较,联合组的膀胱重量、残余尿量减少($P < 0.05$)。见表 2。

2.2 各组大鼠尿流动力学指标比较

对照组、模型组、通腑茯苓饮组、电针组及联合组大鼠膀胱漏尿点压力、膀胱顺应性及膀胱最大容量比较,经方差分析,差异有统计学意义($F = 25.988$ 、 23.317 和 63.828 , 均 $P = 0.000$)。进一步两两

表 2 各组大鼠膀胱重量、残余尿量比较 ($n = 8, \bar{x} \pm s$)

| 组别 | 膀胱重量/g | 残余尿量/mL |
|--------|---------------------------------|---------------------------------|
| 对照组 | 0.18 \pm 0.04 | 0.16 \pm 0.04 |
| 模型组 | 0.86 \pm 0.08 ^① | 3.25 \pm 1.08 ^① |
| 通腑茯苓饮组 | 0.79 \pm 0.03 ^{①②} | 2.26 \pm 0.62 ^{①②} |
| 电针组 | 0.68 \pm 0.07 ^{①②③} | 1.65 \pm 0.47 ^{①②③} |
| 联合组 | 0.56 \pm 0.13 ^{①②③④} | 1.16 \pm 0.39 ^{①②③④} |
| F 值 | 90.861 | 27.951 |
| P 值 | 0.000 | 0.000 |

注: ①与对照组比较, $P < 0.05$; ②与模型组比较, $P < 0.05$; ③与通腑茯苓饮组比较, $P < 0.05$; ④与电针组比较, $P < 0.05$ 。

比较结果:与对照组比较,模型组、通腑茯苓饮组、电针组及联合组的膀胱漏尿点压力升高,膀胱顺应性降低、膀胱最大容量减少($P < 0.05$);与模型组比较,通腑茯苓饮组、电针组及联合组的膀胱漏尿点压力降低,膀胱顺应性升高、膀胱最大容量增加($P < 0.05$);与通腑茯苓饮组比较,电针组及联合组的膀胱漏尿点压力降低,膀胱顺应性升高、膀胱最大容量增加($P < 0.05$),与电针组比较,联合组的膀胱漏尿点压力降低,膀胱顺应性升高、膀胱最大容量增加($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 各组大鼠尿流动力学指标比较 ($n = 8, \bar{x} \pm s$)

| 组别 | 膀胱漏尿点压力/ cmH ₂ O | 膀胱顺应性/ (mL/cmH ₂ O) | 膀胱最大容量/ mL |
|--------|----------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|
| 对照组 | 36.18 \pm 2.34 | 0.31 \pm 0.11 | 4.58 \pm 1.04 |
| 模型组 | 53.46 \pm 5.71 ^① | 0.03 \pm 0.01 ^① | 0.66 \pm 0.15 ^① |
| 通腑茯苓饮组 | 46.68 \pm 3.63 ^{①②} | 0.08 \pm 0.03 ^{①②} | 1.12 \pm 0.17 ^{①②} |
| 电针组 | 42.64 \pm 3.56 ^{①②③} | 0.13 \pm 0.05 ^{①②③} | 1.85 \pm 0.21 ^{①②③} |
| 联合组 | 38.97 \pm 2.63 ^{①②③④} | 0.20 \pm 0.07 ^{①②③④} | 2.56 \pm 0.55 ^{①②③④} |
| F 值 | 25.988 | 23.317 | 63.828 |
| P 值 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |

注: ①与对照组比较, $P < 0.05$; ②与模型组比较, $P < 0.05$; ③与通腑茯苓饮组比较, $P < 0.05$; ④与电针组比较, $P < 0.05$ 。

2.3 各组大鼠脊髓组织病理变化及评分比较

HE 染色结果显示,对照组脊髓结构完整,神经细胞核膜清晰,分布均匀,无明显炎症细胞浸润;模型组可见炎症细胞浸润,血管周围可见“管套状”结构;与模型组比较,通腑茯苓饮组、电针组及联合组炎症细胞浸润减少,局部可见“管套状结构”。见图 1。

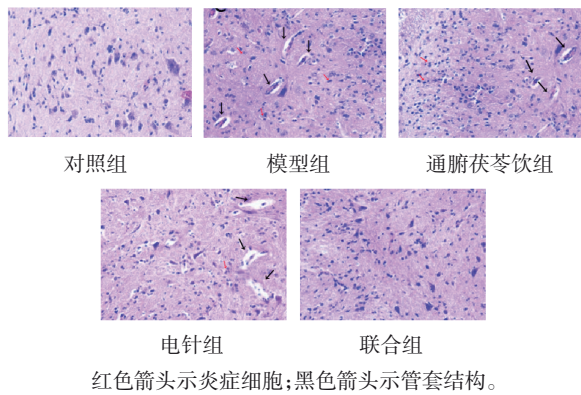


图 1 各组大鼠脊髓组织病理切片 (HE 染色 × 200)

对照组、模型组、通腑茯苓饮组、电针组及联合组大鼠脊髓组织病理评分分别为 (0.00+0.00) 分、(3.61 ± 0.38) 分、(2.68 ± 0.28) 分、(1.91 ± 0.20) 分和 (1.02 ± 0.11) 分, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F=143.713, P=0.000$)。进一步两两比较结果: 与对照组比较, 模型组、通腑茯苓饮组、电针组及联合组病理评分升高 ($P<0.05$); 与模型组比较, 通腑茯苓饮组、电针组及联合组病理评分降低 ($P<0.05$); 与通腑茯苓饮组比较, 电针组及联合组病理评分降低 ($P<0.05$), 与电针组比较, 联合组病理评分降低 ($P<0.05$)。

2.4 各组大鼠脊髓组织 NGF、TrkA mRNA 相对表达量比较

对照组、模型组、通腑茯苓饮组、电针组及联合组大鼠脊髓组织 NGF、TrkA mRNA 相对表达量比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F=63.286$ 和 141.237 均 $P=0.000$)。进一步两两比较结果: 与对照组比较, 模型组、通腑茯苓饮组、电针组及联合组 NGF、TrkA mRNA 相对表达量降低 ($P<0.05$); 与模型组比较, 通腑茯苓饮组、电针组及联合组 NGF、TrkA mRNA 相对表达量升高 ($P<0.05$); 与通腑茯苓饮组比较, 电针组及联合组 NGF、TrkA mRNA 相对表达量升高 ($P<0.05$), 与电针组比较, 联合组 NGF、TrkA mRNA 相对表达量升高 ($P<0.05$)。见表 4。

2.5 各组大鼠脊髓组织 NGF、TrkA 蛋白相对表达量比较

对照组、模型组、通腑茯苓饮组、电针组及联合组大鼠脊髓组织 NGF、TrkA 蛋白相对表达量比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F=239.253$ 和 72.746 均 $P=0.000$)。进一步两两比较结果: 与对照组比较, 模型组、通腑茯苓饮组、电针组及联合组

表 4 各组大鼠脊髓组织 NGF、TrkA mRNA 相对表达量比较 ($n=4, \bar{x} \pm s$)

| 组别 | NGF mRNA | TrkA mRNA |
|--------|-----------------------------|-----------------------------|
| 对照组 | 0.94 ± 0.04 | 1.37 ± 0.06 |
| 模型组 | 0.56 ± 0.02 ^① | 0.66 ± 0.04 ^① |
| 通腑茯苓饮组 | 0.71 ± 0.03 ^{①②} | 0.83 ± 0.04 ^{①②} |
| 电针组 | 0.82 ± 0.05 ^{①②③} | 1.10 ± 0.09 ^{①②③} |
| 联合组 | 0.87 ± 0.04 ^{①②③④} | 1.22 ± 0.05 ^{①②③④} |
| F 值 | 63.286 | 141.237 |
| P 值 | 0.000 | 0.000 |

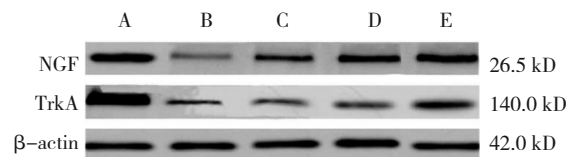
注: ①与对照组比较, $P<0.05$; ②与模型组比较, $P<0.05$; ③与通腑茯苓饮组比较, $P<0.05$; ④与电针组比较, $P<0.05$ 。

NGF、TrkA 蛋白相对表达量降低 ($P<0.05$); 与模型组比较, 通腑茯苓饮组、电针组及联合组 NGF、TrkA 蛋白相对表达量升高 ($P<0.05$); 与通腑茯苓饮组比较, 电针组及联合组 NGF、TrkA 蛋白相对表达量升高 ($P<0.05$), 与电针组比较, 联合组 NGF、TrkA 蛋白相对表达量升高 ($P<0.05$)。见表 5 和图 2。

表 5 各组大鼠脊髓组织 NGF、TrkA 蛋白相对表达量比较 ($n=4, \bar{x} \pm s$)

| 组别 | NGF 蛋白 | TrkA 蛋白 |
|--------|-----------------------------|-----------------------------|
| 对照组 | 1.43 ± 0.04 | 2.04 ± 0.25 |
| 模型组 | 0.71 ± 0.05 ^① | 0.47 ± 0.05 ^① |
| 通腑茯苓饮组 | 0.89 ± 0.04 ^{①②} | 0.72 ± 0.09 ^{①②} |
| 电针组 | 0.97 ± 0.03 ^{①②③} | 0.84 ± 0.08 ^{①②③} |
| 联合组 | 1.31 ± 0.03 ^{①②③④} | 1.30 ± 0.16 ^{①②③④} |
| F 值 | 239.253 | 72.746 |
| P 值 | 0.000 | 0.000 |

注: ①与对照组比较, $P<0.05$; ②与模型组比较, $P<0.05$; ③与通腑茯苓饮组比较, $P<0.05$; ④与电针组比较, $P<0.05$ 。



A: 对照组; B: 模型组; C: 通腑茯苓饮组; D: 电针组; E: 联合组。

图 2 各组大鼠脊髓组织 NGF、TrkA 蛋白的表达

3 讨论

SSCI 后 NB 是由中枢神经系统受损导致, 中医认为 SSCI 后 NB 的病机为淤血凝滞、督脉不同。电

针能够促进内源性神经干细胞增殖分化,有利于神经细胞的恢复。中医常用电针治疗NB,其在穴位功效的基础上,采用电刺激,在穴位之间形成电流,更深度刺激穴位发挥功效。廖福金等^[12]研究显示,针刺长强穴能够改善SSCI后NB大鼠的排尿能力,改善膀胱功能。因此,本研究选用长强穴和维胞穴进行电针刺刺激,2个穴位能够在体内形成一条电流,起到通督补肾、恢复膀胱气化的作用^[13]。加之通腑茯苓饮的利尿、理气加速代谢的作用,通过多方面对SSCI后NB进行调理,但其作用机制尚不明确。NGF、TrkA对中枢神经元的发育、再生及功能特性的表达均有一定的调控作用。有研究证实,NGF、TrkA能够加速神经元的修复^[14],因此推测NGF-TrkA信号通路在NB中发挥一定作用。

本研究通过Hassan Shakerl脊髓横断法复制SSCI模型,该方法能够完全横断脊髓并准确定位脊髓损伤部位,有利于后续切片观察,且较为简便。采用通腑茯苓饮、电针及两者联合对SSCI后NB的作用进行比较,结果表明通腑茯苓饮、电针治疗SSCI后NB均有一定疗效,其中联合治疗对于膀胱功能及尿流动力学指标的改善效果更明显。本研究中大鼠脊髓组织病理变化及病理评分结果同样证实联合治疗对大鼠脊髓组织的修复作用更明显,能减少炎症细胞浸润。分析其原因为通腑茯苓饮由茯苓、车前子、乌药、琥珀、黄芪、白术、泽泻、冬葵子、通草、滑石、牛膝组成;其中茯苓健脾利水;车前子利尿通淋;乌药温肾行气,肾气化生,致膀胱气化,尿液排出;琥珀宣窍;重用黄芪补气升阳,健脾益肺,利尿消肿、活血化瘀,于补益中兼具通泻之功;白术、泽泻健脾利水,佐以冬葵子、滑石、通草,增强滑窍利尿通淋之功;牛膝通经活血、利尿通淋、祛除邪结^[15]。通腑茯苓饮联合电针刺刺激长强穴及维胞穴,能够发挥通调水道、行气利水的功效,同时强督脉阳气,调畅通淋,多种作用途径增强膀胱功能,使其效果显著优于通腑茯苓饮及电针单独治疗。

NGF是神经营养因子中的一种,对神经的生长、损伤过程均有一定影响。此外,NGF还可以保护细胞免受氧化应激损伤,TrkA是NGF受体,能够促进神经元出芽,修复受损的神经回路^[16]。当脊髓受损时,NGF能促进神经细胞凋亡。本研究结果表明,SSCI后NB大鼠脊髓组织NGF、TrkA mRNA和蛋

白相对表达量降低,可能是检测时NGF、TrkA已处于高峰后的下降时期。经电针或通腑茯苓饮治疗后,NGF、TrkA mRNA和蛋白相对表达量升高,而两者联合治疗后NGF、TrkA mRNA和蛋白相对表达量接近正常水平。分析原因为NGF与受体TrkA特异性结合后激活NGF,能够维持神经元活性,加速突触成熟,使轴突延长,促进中枢神经系统的发育和修复^[17]。通腑茯苓饮可能通过激活P13K/Akt信号通路,抑制脊髓损伤神经细胞的凋亡,促进神经元的出芽及神经回路的重建,加速神经再生,从而减轻脊髓损伤^[18]。本研究结果提示通腑茯苓饮联合电针能够有效激活NGF-TrkA信号通路,减轻SSCI后NB对大鼠膀胱及脊髓的损伤。

综上所述,通腑茯苓饮联合电针能够改善SSCI后NB大鼠膀胱功能,其作用机制可能与NGF-TrkA信号通路有关。未来可对NGF、TrkA上下游蛋白进行深入研究,进一步验证通腑茯苓饮联合电针对NGF-TrkA信号通路的调控作用,为治疗SSCI后NB提供科学依据。

参 考 文 献 :

- [1] HAN X K, GAO Y, WANG S J, et al. Effect of electroacupuncture on diabetic neurogenic bladder: a randomized controlled trial protocol[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2020, 99(17): e19843.
- [2] XU L, FU C Y, ZHANG Q, et al. Efficacy of biofeedback, repetitive transcranial magnetic stimulation and pelvic floor muscle training for female neurogenic bladder dysfunction after spinal cord injury: a study protocol for a randomised controlled trial[J]. *BMJ Open*, 2020, 10(8): e034582.
- [3] 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.
- [4] ABOLHASANPOUR N, HAJEBRAHIMI S, EBRAHIMI-KALAN A, et al. Urodynamic parameters in spinal cord injury-induced neurogenic bladder rats after stem cell transplantation: a narrative review[J]. *Iran J Med Sci*, 2020, 45(1): 2-15.
- [5] 孟如, 张家礼, 项平. 金匱要略选读[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1997: 142.
- [6] 张昱, 孔繁林. 针刺维胞、长强治疗马尾神经受损后尿潴留[J]. *中国民间疗法*, 2020, 28(13): 21-22.
- [7] 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.
- [8] 马善峰, 马奎, 吕合作. 运动诱发电位和BBB评分在大鼠脊髓损伤功能评价中的相关性研究[J]. *中华解剖与临床杂志*, 2019, 24(3): 299-304.

- [9] 贺生中, 李荣誉, 裴春生. 动物药理[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2011: 325-327.
- [10] LI J, CHEN W A, LI Y, et al. Transplantation of olfactory ensheathing cells promotes partial recovery in rats with experimental autoimmune encephalomyelitis[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(9): 11149-11156.
- [11] 许明, 张泓, 张健, 等. 电针对骶上脊髓损伤后神经源性膀胱大鼠尿流动力学及脊髓组织中半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 表达的影响[J]. *中国康复医学杂志*, 2017, 32(12): 1338-1344.
- [12] 廖福金, 曾红文, 杨海涛, 等. 针刺长强穴对大鼠脊髓损伤后神经源性膀胱顺应性的影响[J]. *广州中医药大学学报*, 2019, 36(5): 697-701.
- [13] 王金玲, 夏建国, 单衍丽. 独取维胞穴治疗尿潴留 36 例[J]. *中国针灸*, 1997(11): 686.
- [14] 吕山河, 胡碧浓, 黄梓铭, 等. 电针对骶上脊髓损伤大鼠膀胱尿流动力学和逼尿肌肌电图振幅的影响[J]. *湖南中医药大学学报*, 2020, 40(11): 1355-1360.
- [15] ZHANG T, YU J F, HUANG Z Q, et al. Electroacupuncture improves neurogenic bladder dysfunction through activation of NGF/TrkA signaling in a rat model[J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(6): 9900-9905.
- [16] CHEN S F, JIANG Y H, KUO H C. Single onabotulinumtoxinA 200U dose improved clinical symptoms but not urothelial dysfunction in neurogenic detrusor overactivity due to spinal cord injury[J]. *J Formos Med Assoc*, 2019, 118(1 Pt 1): 125-133.
- [17] LU J Y, CHENG B, LIN L, et al. Urodynamic findings in patients with complete and incomplete suprasacral spinal cord injury at different stages after injury[J]. *Ann Palliat Med*, 2021, 10(3): 3171-3178.
- [18] LU J Y, YING X W, CHEN X L, et al. Effects of electroacupuncture at different acupoints on the histomorphology of neurogenic bladder and the expression of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels in interstitial cells of Cajal in a rat model of suprasacral spinal cord injury[J]. *Ann Palliat Med*, 2020, 9(6): 3830-3838.

(童颖丹 编辑)

本文引用格式: 张昱, 孔繁林, 吴磊. 通腑茯苓饮联合电针治疗大鼠骶上脊髓损伤后神经源性膀胱的作用机制研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2022, 32(18): 25-31.

Cite this article as: ZHANG Y, KONG F L, WU L. Mechanism of Tongfu Fuling Decoction combined with electroacupuncture in treating neurogenic bladder after suprasacral spinal cord injury in rats[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2022, 32(18): 25-31.