

雄性大鼠盆神经损伤神经源性膀胱动物模型的建立

葛庆宇¹, 肖峻², 沈洲²

作者单位:¹安徽医科大学附属省立医院泌尿外科, 安徽 合肥 230001;

²中国科学技术大学附属第一医院(安徽省立医院)泌尿外科, 安徽 合肥 230001

通信作者: 沈洲, 男, 副主任医师, 研究方向为神经泌尿外科学, E-mail: shenzhou_1005@163.com

基金项目: 安徽省自然科学基金资助项目(1708085QH179)

摘要: **目的** 建立盆神经损伤后神经源性膀胱的大鼠模型, 研究引起神经源性膀胱的相关因素。 **方法** 将 16 只雄性 SD 大鼠采用随机数字表法分为神经损伤组和假手术组, 每组 8 只, 神经损伤组损伤双侧盆神经, 假手术组仅显露神经但不做处理。4 周后行膀胱功能检测, 并留取膀胱组织行 Masson 染色及 VAcHT 阳性神经纤维免疫荧光染色。 **结果** 术后 4 周, 神经损伤组大鼠膀胱质量 (123.6 ± 16.8) mg 较假手术组 (87.2 ± 11.2) mg 显著增加 ($P < 0.05$)。神经损伤组大鼠膀胱最大容量 (3.45 ± 0.45) mL 较假手术组 (1.46 ± 0.11) mL 显著增加 ($P < 0.05$)。神经损伤组大鼠膀胱逼尿肌收缩力明显下降, 最大排尿压峰值为 (12.1 ± 6.5) mmHg, 明显低于假手术组 (42.9 ± 10.5) mmHg ($P < 0.05$)。Masson 染色示神经损伤组大鼠膀胱壁组织中平滑肌含量减少, 胶原纤维增生明显, 其胶原占比 (19.75 ± 5.46)% 显著高于假手术组 (9.95 ± 3.25)%, ($P < 0.05$)。免疫荧光结果显示神经损伤组膀胱壁内 VAcHT 阳性神经纤维占比 (7.46 ± 1.68)% 较假手术组 (12.67 ± 3.24)% 显著减少 ($P < 0.05$)。 **结论** 损伤大鼠双侧盆神经可成功建立神经源性膀胱动物模型, 表现为膀胱逼尿肌纤维化, VAcHT 阳性神经纤维减少及排尿功能受损。

关键词: 膀胱, 神经源性; 腹下丛/损伤; 排尿障碍; 大鼠, Sprague-Dawley

Establishment of a neurogenic bladder animal model through pelvic nerve injury in male rats

GE Qingyu¹, XIAO Jun², SHEN Zhou²

Author Affiliations: ¹Department of Urology, Provincial Hospital Affiliated to Anhui Medical University, Hefei, Anhui 230001, China; ²Department of Urology, The First Affiliated Hospital of USTC, Division of Life Science and Medicine, University of Science and Technology of China, Hefei, Anhui 230001, China

Abstract: Objective To establish a rat model of neurogenic bladder after pelvic nerve injury and study the related factors causing neurogenic bladder. **Methods** Sixteen male Sprague-Dawley rats were randomly divided into the nerve injury group and the sham operation group ($n = 8$ per group). Rats in the nerve injury group underwent bilateral pelvic nerve injury. Rats in the sham group underwent sham operation. Four weeks postoperatively, the bladder function was detected, and the bladder tissues were harvested for Masson staining and VAcHT-immunofluorescence staining. **Results** At 4 weeks postoperatively, bladder weight was significantly increased in the nerve injury group (123.6 ± 16.8) mg compared with the sham group (87.2 ± 11.2) mg ($P < 0.05$). The maximum bladder volume in the nerve injury group (3.45 ± 0.45) mL was significantly higher than that in the sham operation group (1.46 ± 0.11) mL ($P < 0.05$). The voiding function of rats was significantly decreased in the nerve injury group. The peak urinary pressure of the injured group was (12.1 ± 6.5) mmHg, which was significantly less than that in the sham group (42.9 ± 10.5) mmHg ($P < 0.05$). Masson staining of the bladder tissue showed a decrease of smooth muscle cells and an intensification of collagen in nerve injury group, and the proportion of collagen (19.75 ± 5.46)% was obviously higher than that in sham group (9.95 ± 3.25)% ($P < 0.05$). Immunofluorescence staining showed that the proportion of VAcHT-positive nerve fibers of the bladder wall in the nerve injury group (7.46 ± 1.68)% was significantly less than that in the sham group (12.67 ± 3.24)% ($P < 0.05$). **Conclusion** A neurogenic bladder animal model can be successfully established through bilateral pelvic nerve injury in male rats, characterized by bladder detrusor fibrosis, VAcHT positive nerve fiber reduction and impaired voiding function.

Key words: Urinary bladder, neurogenic; Hypogastric plexus/injuries; Urination disorders; Rats, sprague-dawley

近年来, 由于诊疗技术的不断提高, 更多的盆腔肿瘤如卵巢癌、直肠癌及前列腺癌等在疾病早期

即可被发现和诊断, 并接受根治性手术治疗^[1]。然而, 盆腔根治术中为了使病人获得更高的术后生存

率,手术范围相对较大,极易造成神经的牵拉、压迫、电刀灼热伤以及局部炎症反应的发生,其中就包括了支配膀胱功能的自主神经的损伤^[2-3]。自主神经又分为腹下神经和盆内脏神经,神经交叉走形之后汇合成盆丛。Aizawa等^[4]发现盆神经损伤后可导致膀胱逼尿肌收缩无力,同时伴有膀胱敏感度下降,从而引起膀胱排空障碍及尿潴留的发生,严重影响了病人的生活质量。因此,盆腔根治术后所致的神经源性膀胱(neurogenic bladder, NB)是一个亟待解决的医学难题,近些年来越来越被重视。我们自2017年6月至2018年6月建立了一种盆神经损伤后的神经源性膀胱动物模型,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组 选取雄性SPF级Sprague-Dawley大鼠(8周龄; $n=16$),体质量为250~300 g,在光照/黑暗周期为12 h、自由饮水和定期提供食物的条件下饲养。本研究所有动物均由安徽医科大学实验动物中心所提供。采用随机数字表法将16只大鼠随机分为两组:A为神经损伤组($n=8$),损伤双侧盆神经;B为假手术组($n=8$),显露但不损伤盆神经。

1.2 建模方法 10%水合氯醛腹腔注射(300 mg/kg)麻醉后,仰卧位固定大鼠,取下腹部正中切口,在手术显微镜下于前列腺背外侧显露大鼠双侧盆神经节,游离显露大鼠盆神经,血管钳钳夹2 min造成神经损伤大鼠模型。假手术组显露双侧盆神经但不损伤。检查大鼠腹腔内无活动性出血后逐层缝合关腹。每日定时进行人工挤尿,将大鼠抓起使之直立位后,两手食指从上向下挤压腹部到大鼠骨盆处,重复动作3次。

1.3 清醒状态下大鼠膀胱功能检测 术后4周,参照Gao W的方法对两组大鼠进行尿动力学检测^[5]。将大鼠以10%水合氯醛麻醉,取腹部正中切口,5F聚乙烯导管插入膀胱的顶部,并用荷包缝合适当固定。将导管从皮下穿过并用缝线固定在背部皮肤上,以防止导管被大鼠拉拽。微量注射泵、压力传感器与T形管相连,排空空气后,将压力传感器连接至BL-420生物机能实验系统(生物信号转换系统BL-420,成都泰盟科技有限公司,成都,中国),并进行调零。将大鼠置于限制笼内,待麻醉完全清醒后,轻压下腹部排空膀胱,调节灌注泵以0.2 mL/min速度向大鼠膀胱内灌注室温下的生理盐水,在尿液漏出时停止灌注,尿道口首次流出液体时的灌注容积记为膀胱最大容量。观察BL-420系统中记录出的膀胱压力曲线,记录最大膀胱排尿压(MVP)。重

复以上操作3次,取平均值进行统计学分析。

1.4 组织学检测 膀胱测压后,取两组大鼠膀胱称重,之后取材部分膀胱壁组织以4%多聚甲醛固定24 h,常规脱水、石蜡包埋,制备成厚约6 μm 的石蜡切片,分别进行Masson染色和VAcHt免疫荧光染色。Masson染色切片于显微镜下观察并拍照,蓝染的为胶原成分,红染的为平滑肌。VAcHt免疫荧光染色步骤:使用修饰的柠檬酸盐缓冲液(Target Retrieval solution; Dako, carpinteria, CA, USA)进行抗原修复并且淬灭内源性过氧化物酶。切片经3%山羊血清封闭,0.3% Triton X-100破膜后,加入VAcHt抗体(1:50; Mouse; Santa Cruz)4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, PBS漂洗后,加入二抗羊抗兔,室温孵育1 h, PBS漂洗。PBS漂洗后置于荧光显微镜下观察并拍照。

利用Image Pro Plus图像分析软件计算出各组大鼠膀胱逼尿肌组织Masson染色切片中胶原纤维的面积比值和VAcHt免疫荧光染色切片中VAcHt阳性神经纤维占比,组间进行比较。

1.5 统计学方法 应用SPSS 20.0统计软件分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两样本均数比较采用独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况 术后4周,神经损伤组8只大鼠其中1只因切口感染合并血尿而死亡,存活7只;假手术组8只大鼠均存活。取得膀胱组织,神经损伤组大鼠膀胱体积明显大于假手术组,神经损伤组大鼠膀胱质量(123.6 ± 16.8)mg较假手术组(87.2 ± 11.2)mg明显增加($t = 5.099, P = 0.000$)。

2.2 膀胱功能检测 膀胱功能检测中测得损伤组大鼠膀胱最大容量(3.45 ± 0.45)mL较假手术组(1.46 ± 0.11)mL明显增加($t = 12.150, P = 0.000$)。

图1是两组大鼠在清醒状态下膀胱最大排尿压(MVP)的结果。从图中可以看出损伤组大鼠排尿压上升幅度很小,其峰值为(12.1 ± 6.5)mmHg,而假手术组大鼠膀胱内压在排尿前达峰值为(42.9 ± 10.5)mmHg。因此,损伤组大鼠最大排尿压较假手术组明显降低($t = 7.054, P = 0.000$)。

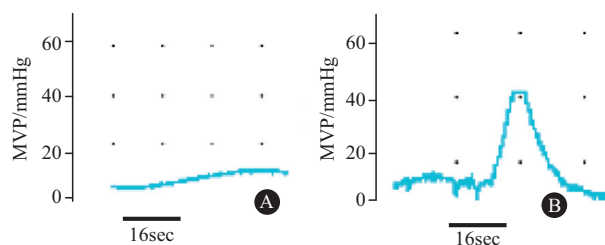


图1 两组大鼠清醒状态下最大排尿压(MVP):
A为神经损伤组,B为假手术组

2.3 组织学结果 如图2所示,膀胱组织的Masson染色显示神经损伤组(19.75 ± 5.46)%的胶原沉积面积比例较假手术组(9.95 ± 3.25)%明显增多($t = 4.362, P = 0.001$)。免疫荧光结果显示损伤组(7.46 ± 1.68)% VACHT 阳性神经纤维占比较假手术组(12.67 ± 3.24)%明显减少($t = 4.038, P = 0.001$)。

3 讨论

神经源性膀胱是由于神经控制机制出现紊乱而导致的下尿路功能障碍,通常需在存有神经病变的前提下才能诊断^[6]。病因包括中枢神经系统因素、外周神经系统因素、感染性疾病、医源性因素,其中盆腔根治性手术是最常见的医源性因素。研究显示50%以上的直肠癌经腹会阴直肠切除术病人术后会出现下尿路功能障碍,主要原因是手术过程中损伤了盆神经支配逼尿肌的纤维^[7]。Katepratoom等^[8]的一项调查显示,约62.9%的病人在根治性子宫颈切除术出现储尿期症状,如尿频、尿急、尿失禁等,42.9%的病人伴有排尿期症状,如排尿困难,尿潴留等。因此,建立盆腔根治术后的神经源性膀胱动物模型对于研究此类疾病和如何提升病人生活质量意义深远。

Hannan等^[9]曾通过夹闭雌性大鼠双侧盆神经丛发出支配膀胱神经15 s×3次建立神经源性膀胱模型,结果显示神经损伤后导致大鼠逼尿肌收缩力受损,逼尿肌纤维化。但由于夹闭时间较短,神经损伤可能不彻底,从而导致神经自我修复,以至恢复部分膀胱功能,影响实验结果,因此本实验通过延长夹闭时间至2 min,以消除客观因素可能对实验结果带来的影响。并且,雌性大鼠盆神经缺乏典型解剖标志,建立统一的模型较为困难,而雄性大鼠盆神经解剖标志明确,位于膀胱内上方、前列腺背外侧,由盆神经节发出,因此,本研究选用雄性SD大鼠研究,操作步骤较为简单,大鼠模型统一可靠。此外,长期以来神经源性膀胱动物模型的建立多选择Hassan Shaker脊髓横断法^[10],本研究采用的模型制备方案的优势在于:①本研究术后大鼠不会出现双后肢属于拖行状态不能参与行走的情况,避免了褥疮的发生;②双侧盆神经损伤更符合临床盆腔根治术后神经源性膀胱的发生情况,更具临床意义;③本研究术后大鼠避免了继发性脊髓感染等严重并发症的发生,降低了术后护理难度及减少了大鼠死亡率。

盆腔根治术后神经源性膀胱的根本原因在于逼尿肌纤维化,即大量胶原纤维沉积、平滑肌细胞凋亡,导致膀胱顺应性下降,逼尿肌收缩无力,因而出现膀胱贮尿和排空障碍。本研究中,损伤组大鼠

最大排尿压较假手术组明显降低,表明盆神经损伤后大鼠逼尿肌收缩力明显受损。Masson染色示神经损伤组逼尿肌中平滑肌减少而胶原含量增加,逼尿肌发生纤维化,免疫荧光示胆碱能(VACHT)阳性神经纤维明显减少,功能学和形态学均符合神经源性膀胱的特征。

众所周知,对于这种盆腔根治术后神经源性膀胱,临床上多数病人需行间歇导尿或接受耻骨上膀胱造瘘^[11],不仅容易造成反复感染,且生活质量严重低下。而近年来,越来越多的研究表明利用干细胞移植治疗可对脊髓损伤或糖尿病等原因所致神经源性膀胱有较明显的改善^[12-13]。这是由于干细胞一方面在体内或体外特定的诱导条件下,可定向分化为神经细胞、平滑肌细胞、基质细胞;另一方面干细胞可通过分泌多种促进神经生长修复的神经营养因子,促进神经的再生修复^[14]。因此后续可以通过干细胞移植治疗观察是否能够改善排尿功能,而具体选择何种干细胞和移植途径需要更深入的研究。

本研究证明通过损伤大鼠双侧盆神经以建立神经源性膀胱模型的方法是有效、简便且可重复的,为盆腔根治术后神经源性膀胱的研究提供了理论和实验依据。

(本文图2见插图5-1)

参考文献

- [1] FITZMAURICE C, DICKER D, PAIN A, et al. The global burden of cancer 2013[J]. JAMA Oncol, 2015, 1(4): 505-527.
- [2] DELACROIX SE, WINTERS JC. Voiding dysfunction after pelvic colorectal surgery[J]. Clin Colon Rectal Surg, 2010, 23(2): 119-127.
- [3] 孙海翔. 保留盆腔自主神经对男性直肠癌术后排尿功能的影响[J]. 安徽医药, 2018, 22(8): 1523-1525.
- [4] AIZAWA N, IGAWA Y. Pathophysiology of the underactive bladder[J]. Invest Clin Urol, 2017, 58(Suppl 2): S82-S82S89.
- [5] GAO W, HE X, LI Y, et al. The effects of FK1706 on nerve regeneration and bladder function recovery following an end-to-side neurorrhaphy in rats[J]. Oncotarget, 2017, 8(55): 94345-94357.
- [6] STÖHRER M, GOEPEL M, KONDO A, et al. The standardization of terminology in neurogenic lower urinary tract dysfunction: with suggestions for diagnostic procedures[J]. International Continence Society Standardization Committee[J]. Neurourol Urodyn, 1999, 18(2): 139-158.
- [7] HOLLABAUGH RS JR, STEINER MS, SELLERS KD, et al. Neuroanatomy of the pelvis: implications for colonic and rectal resection[J]. Dis Colon Rectum, 2000, 43(10): 1390-1397.
- [8] KATEPRATOOM C, MANCHANA T, AMORNWICHET N. Lower urinary tract dysfunction and quality of life in cervical cancer survivors after concurrent chemoradiation versus radical hysterectomy[J]. Int Urogynecol J, 2014, 25(1): 91-96.

- [9] HANNAN JL, POWERS SA, WANG VM, et al. Impaired contraction and decreased detrusor innervation in a female rat model of pelvic neuropathia[J]. Int Urogynecol J, 2017, 28(7): 1049-1056.
- [10] SHAKER H, MOURAD MS, ELBIALY MH, et al. Urinary bladder hyperreflexia: a rat animal model[J]. Neurourol Urodyn, 2003, 22(7): 693-698.
- [11] CHOI HJ, LEE CH, SHIN H. Ureteral rupture caused by a suprapubic catheter in a male patient with spinal cord injury: a case report[J]. Ann Rehabil Med, 2016, 40(6): 1140-1143.
- [12] LIANG CC, SHAW SS, HUANG YH, et al. Improvement in bladder dysfunction after bladder transplantation of amniotic fluid stem cells in diabetic rats[J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 2105.
- [13] LEE HJ, AN J, DOO SW, et al. Improvement in spinal cord injury-induced bladder fibrosis using mesenchymal stem cell transplantation into the bladder wall[J]. Cell Transplant, 2015, 24(7): 1253-1263.
- [14] ZHOU Z, CHEN Y, ZHANG H, et al. Comparison of mesenchymal stromal cells from human bone marrow and adipose tissue for the treatment of spinal cord injury[J]. Cytotherapy, 2013, 15(4): 434-448.

(收稿日期: 2019-02-27, 修回日期: 2019-04-15)

doi: 10.3969/j.issn.1009-6469.2020.05.008

◇临床医学◇

深刺针法联合手法推拿治疗神经根型颈椎病疗效及对实验室指标水平的影响

李明礼¹, 张晓贝², 谢磊³, 丁晓燕²作者单位:¹上海市第一康复医院疼痛科, 上海 200090; ²上海市嘉定区中医医院骨伤科, 上海 201800;³上海中医药大学附属上海市中医医院疼痛科, 上海 200000

通信作者: 丁晓燕, 女, 副主任医师, 研究方向为中西医结合疼痛与康复, E-mail: 13321985677@163.com

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81603485)

摘要:目的 探讨深刺针法联合手法推拿治疗神经根型颈椎病疗效及对实验室指标水平的影响。方法 选取2016年5月至2018年5月上海市第一康复医院收治神经根型颈椎病病人共140例, 采用随机数字表法分为对照组(70例)和观察组(70例), 两组均西医治疗, 同时对照组给予手法推拿, 而观察组则在对照组基础上加用深刺针法治疗, 比较两组临床疗效、治疗前后中医证候评分、视觉模拟疼痛(VAS)评分、颈椎病临床评价量表(CASCS)评分、全血黏度、血浆黏度、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素1 β (IL-1 β)及白细胞介素6(IL-6)水平。结果 观察组临床治疗总有效率92.86%显著高于对照组77.14%($P < 0.05$); 观察组治疗后中医证候评分及CASCS评分均显著优于对照组及治疗前($P < 0.05$), 观察组治疗后VAS疼痛评分(1.77 ± 0.36)分显著优于对照组(2.52 ± 0.58)分及治疗前(6.69 ± 1.53)分($P < 0.05$); 观察组治疗后血液流变学指标和血清炎症细胞因子水平均显著优于对照组、治疗前($P < 0.05$)。结论 深刺针法联合手法推拿治疗神经根型颈椎病可显著提高症状控制效果, 提高颈部活动能力, 降低血液黏稠度, 并有助于拮抗炎性细胞因子表达。

关键词: 颈椎病; 针刺疗法; 推拿, 脊柱; 血液黏度; 肿瘤坏死因子 α ; 白细胞介素1 β ; 白细胞介素6

Clinical effects of deep needling combined with manipulative massage in the treatment of patients with cervical spondylotic radiculopathy and its influence on laboratory indexes

LI Mingli¹, ZHANG Xiaobei², XIE Lei³, DING Xiaoyan²Author Affiliations: ¹Department of Pain, The First Rehabilitation Hospital of Shanghai, Shanghai 200090, China;²Department of Orthopedics, Jiading District Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shanghai201800, China; ³Department of Pain, Shanghai Municipal Hospital of Traditional Chinese Medicine

Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200000, China

Abstract: Objective To investigate the clinical effects of deep needling combined with manipulative massage in the treatment of patients with cervical spondylotic radiculopathy and the influence on laboratory indexes. **Methods** 140 patients with cervical spondylotic radiculopathy were chosen in the period from May 2016 to May 2018 and randomly divided into the control group (70 patients) with western medicine and the observation group (70 patients) with deep needling combined with manipulative massage on the basis of control group. The clinical efficacy, TCM syndrome score, VAS pain score, CASCS score, the levels of whole blood vis-