

· 论 著 ·

高压氧结合电针治疗对脊髓损伤后大鼠膀胱功能的影响

王晓红,邵 彬,黄礼群

(广州军区武汉总医院康复理疗科,武汉 430070)

摘 要:目的 观察高压氧结合电针治疗对脊髓损伤(SCI)后大鼠神经源性膀胱功能的影响及机制分析。方法 将雌性 SD 大鼠 60 只,随机分为对照组、高压氧组及高压氧结合电针组(结合电针组),每组 20 只。所有大鼠用 Allen's 重物撞击法制造 SCI 模型,其中对照组不接受任何治疗,高压氧组及结合电针组在造模成功 12 h 后每天接受高压氧治疗或高压氧结合电针治疗 1 次。各组大鼠分别于术后 24 h、3、7、14 d 在乌拉坦麻醉下尿道置管行尿流动力学检查后处死。观察比较 3 组大鼠脊髓中及膀胱组织中神经型一氧化氮合酶(nNOS)表达及尿流动力学指标。结果 在各时间点上,高压氧组及结合电针组脊髓及膀胱组织中 nNOS 表达明显高于对照组($P<0.01$),结合电针组脊髓及膀胱组织中 nNOS 表达明显高于高压氧组($P<0.05$);尿流动力学结果结合电针组显著优于高压氧组及对照组($P<0.05$)。结论 高压氧结合电针治疗对 SCI 后大鼠的神经元具有保护作用,并能很好改善大鼠的膀胱功能。

关键词:高压氧;电针;脊髓损伤;神经型一氧化氮合酶;尿流动力学

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.25.004

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)25-2577-04

Effects of hyperbaric oxygen combined electroacupuncture on bladder function in SD rats after spinal cord injury

Wang Xiaohong, Shao Bin, Huang Liqun

(Department of Rehabilitation and Physiotherapy, Wuhan General Hospital of Guangzhou Military Region,

Wuhan, Hubei 430070, China)

Abstract: Objective To study the effects of hyperbaric oxygen(HBO) combined electroacupuncture on the bladder function in SD rats after spinal cord injury(SCI). **Methods** 60 SD rats were randomized into 3 groups: control group($n=20$), HBO group($n=20$) and HBO combined electroacupuncture group($n=20$). All rats were constructed the SCI model by adopting Allen's heavy dropping method, in which none of treatment was given to the control group, while the other two groups accepted the HBO therapy or HBO combined electroacupuncture once per day after 12 h of establishing model. Rats in various groups were performed the urodynamic examination under urethane anesthesia at 24 h, 3, 7, 14 d after operation and then killed. Expression of neuronal nitric oxide synthase(nNOS) and the urodynamic indexes were observed. **Results** In each time point, the nNOS expression in the tissues of spinal cord and bladder in the HBO combined electroacupuncture group and the HBO group were significantly higher than that in the control group, and the nNOS expression in the HBO combined electroacupuncture group was obviously higher than that in the HBO group. The urodynamic results showed that the HBO combined electroacupuncture group was significantly superior to the HBO group and the control group($P<0.05$). **Conclusion** HBO combined electroacupuncture could protect the neuron cells and improve the bladder function greatly after SCI in rats.

Key words: hyperbaric oxygenation; oxygen; electroacupuncture; spinal cord injury; injuries; neuronal nitric oxide synthase; urodynamics

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)可引起下尿路排尿功能障碍(神经源性膀胱),严重时可伴发致死性尿路感染或慢性肾衰竭^[1]。临床实践已证实高压氧是治疗 SCI 的重要方法,但高压氧治疗神经源性膀胱的机制尚不清楚,其可能的机制是高压氧可以保护神经细胞,促进神经纤维再生^[2],从而诱发或重建正常的排尿反射;电针可以通过多环节延缓和减轻 SCI 的程度,改善损伤后并发症^[3],同时大量临床实践也证实电针在改善 SCI 后排尿功能方面具有独特疗效^[4-5],本文旨在观察高压氧结合电针治疗对 SCI 后大鼠膀胱功能的影响,从而为临床治疗 SCI 后神经源性膀胱提供一定的实验依据。

1 材料与方

1.1 材料 实验动物为健康雌性 SD 大鼠 60 只(鼠龄 4~6 周),体质量 250~350 g,按随机数字表法分为 3 组:对照组、高压氧组和高压氧结合电针组(结合电针组),每组 20 只;各组又按手术后相应时间点分为 24 h、3 d、7 d、14 d 组,每组 5 只。实

验动物由广州军区武汉总医院医学实验中心提供,饲养温度为 20~23 ℃,湿度为 50%~60%,大鼠在笼内自由进食饮水。

1.2 方法

1.2.1 实验动物模型制备 采用 Allen's 重物撞击法制造大鼠 SCI 模型。称取大鼠体质量后,给予 10%水合氯醛溶液按 4 mL/kg 腹腔内注射麻醉,然后用电子剃毛器剃去大鼠背部毛发,以 T₁₂ 为中心显露直径约为 0.5 cm 的圆形无菌区,作为 SCI 区。将大鼠固定在鼠台上,以 T₁₂ 棘突为中心背部正中纵行切口,长约 3 cm,显露脊柱后,在 T_{11~12} 间用血管钳小心咬除棘突和双侧椎板,露出白色的脊髓后,用致伤量为 50 g/cm² 的 Allen's 重物撞击法损伤脊髓,大鼠的双下肢出现回缩性扑动、尾巴呈痉挛性摆动后双下肢瘫痪,表明造模成功,然后依层次缝合。术后给予青霉素腹腔注射预防感染。所有大鼠均接受 Allen's 重物撞击法制造 SCI 模型,造模成功后 12 h 按不同组别给予相应治疗,其中对照组不接受任何治疗,高压氧组仅接

受高压氧治疗,结合电针组接受高压氧及电针治疗。

1.2.2 高压氧治疗 高压氧组及结合电针组大鼠于术后 12 h 进舱,先用纯氧洗舱 10 min,使舱内氧浓度大于 95%,20 min 内缓慢加压至 0.25 MPa。在高压下停留 60 min,其间用纯氧通风 10 min,停留结束后在 20 min 内匀速减压至常压,结束治疗。高压氧治疗每天 1 次。

1.2.3 电针治疗 结合电针组大鼠于高压氧治疗后开始电针治疗,电针治疗参数:输出电压 4~6 V,疏波 4 Hz,密波 20 Hz,留针 20 min,每天 1 次。取穴及针刺方法^[6]:大椎穴,背中线上,C₇ 与 T₁ 棘突间,顺棘突间直刺 5 mm;肾俞穴,L₂ 棘突下两旁,直刺 6 mm;三阴交穴,后肢内踝尖直上 10 mm,直刺 5 mm。

1.2.4 尿流动力学检查 大鼠称体质量后,先以 25%乌拉坦按 1.0 g/kg 腹腔注射麻醉^[7],30 min 后经尿道插入 3 号输尿管导管,将大鼠放入测压笼内,设置室温为 30 ℃。输尿管导管接上三通,用注射器抽出膀胱内尿液后,三通一端与微量灌注泵相接,另一端接尿动力仪的膀胱压力传感器,体内置零。再以 0.2 mL/min 的速度向膀胱内灌注室温下生理盐水,至大鼠开始排尿时停止注水。测定排尿量,以 1 mL 注射器抽出膀胱内残余尿。连续测量 3 次。膀胱测量指标为膀胱容量(灌注速度×灌注时间)、排尿量、残余尿量(膀胱容量-排尿量)、排尿速率、最大排尿压。

1.2.5 取材 分别在造模后 24 h、3、7、14 d 处死大鼠。处死前大鼠完成尿流动力学检测,检测后开胸暴露心脏,心脏灌注冰生理盐水至流出液为清亮后给予 4%的多聚甲醛溶液继续灌注,灌注完成后取出受损脊髓节段头端 3 mm、尾端 3 mm 的脊髓组织,及大鼠膀胱标本放入相同灌注液中,置入 4 ℃冰箱过夜。乙醇脱水石蜡包埋并切片,其中脊髓切片为头端 5 μm,尾端 5 μm 各一张。

1.2.6 神经型一氧化氮合酶(Neuronal nitric oxide synthase, nNOS)表达检测 根据 GENE TECH 公司两步法抗兔/鼠通用型免疫组化试剂盒说明书进行,石蜡切片置于 65 ℃烘箱中,烘片 2 h,脱蜡至水,用 PBS(pH 7.4)冲洗 3 次,每次 5 min;高压热修复:在沸水中加入 Na2EDTA(pH 9.0)。盖上不锈钢锅

盖,但不能锁定。将玻片置于金属染色架上,缓慢加压,使玻片在缓冲液中浸泡 5 min,然后将盖子锁定,小阀门将会升起来。10 min 后除去热源,自然冷却。切片放入 3%过氧化氢溶液,室温下孵育 10 min,以阻断内源性过氧化物酶。PBS(pH 7.4)冲洗 3 次,每次 5 min;甩去 PBS 液,第一抗体 1:100 浓度稀释。每张切片加入 50 μL 稀释液,4 ℃过夜;PBS 冲洗 3 次,每次 5 min;甩去 PBS 液,每张切片加 50~100 μL A 液(Chem-MateTMEVision+/HRP),室温下孵育 45 min;PBS 冲洗 3 次,每次 3 min;甩去 PBS 液,每张切片加 50~100 μL 新鲜配制的 DAB 溶液,室温下孵育 5 min,显微镜控制显色;显色完全后,蒸馏水或自来水冲洗,苏木素复染,0.1%盐酸分化,自来水冲洗,PBS 冲洗返蓝;切片经过梯度乙醇(70%~100%)脱水干燥,二甲苯透明,中性树胶封固;用 PBS 代替一抗做阴性对照,高倍视野(×400)下计算阳性细胞率,即每张切片随机取出 10 个不重叠高倍视野,算出阳性细胞率。

1.3 统计学处理 应用 SPSS13.0 统计软件进行统计分析,先对数据进行正态性检验(One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test),均满足正态性检验时,计量数据描述采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,先进行两因素方差分析,再进行两个独立样本 *t* 检验和单因素方差分析(One-Way ANOVA),组间两两比较采用 Tukey 法。以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 nNOS 在脊髓及膀胱组织中的表达 在各时间点上,对照组、高压氧组及结合电针组的脊髓及膀胱组织中均有表达(封 2 图 1),阳性细胞即为细胞质内棕黄色染色颗粒;免疫组化结果显示,在各时间点上,高压氧组及结合电针组 nNOS 阳性细胞表达均高于对照组(*P*<0.01),结合电针组的阳性细胞数显著高于高压氧组(*P*<0.05),见表 1。

2.2 尿流动力学分析 尿流动力学结果显示,对照组、高压氧组及结合电针组尿流动力学指标在术后 24 h 比较,差异无统计学意义(*P*>0.05);术后 3 d 及以上,高压氧组及结合电针组各项尿流动力学指标均优于对照组,差异有统计学意义(*P*<0.05);术后 7、14 d,结合电针组的尿流动力学指标明显优于高压氧组,差异有统计学意义(*P*<0.05),见表 2。

表 1 nNOS 在脊髓及膀胱组织中阳性细胞率的表达($\bar{x} \pm s, \%$)

术后时间	脊髓中表达			逼尿肌中表达		
	对照组	高压氧组	结合电针组	对照组	高压氧组	结合电针组
24 h	21.18±2.19	36.21±9.71*	39.28±8.20*#	3.23±0.78	3.54±0.26*	3.97±0.06*#
3 d	30.36±3.15	43.75±8.14*	48.51±3.19*#	12.05±2.47	21.49±3.52*	23.12±1.78*#
7 d	17.12±3.07	31.23±2.96*	37.47±5.37*#	15.20±2.15	28.37±3.21*	31.98±5.76*#
14 d	14.82±1.92	32.07±2.76*	35.34±5.48*#	9.27±3.20	22.34±5.87*	32.91±3.57*#

*:*P*<0.01,与对照组比较;#:*P*<0.05,与高压氧组比较。

表 2 各组尿流动力学的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	膀胱容量(mL)	排尿量(mL)	残余尿量(mL)	最大排尿压(cm H ₂ O)	排尿效率(%)
对照组					
24 h	1.39±0.27	1.18±0.34	0.27±0.05	44.31±4.75	81.51±3.12
3 d	0.85±0.59	0.81±0.55	0.03±0.06	37.54±7.32	96.23±5.24
7 d	1.98±0.34	1.72±0.66	0.16±0.25	25.21±4.85	94.89±9.61

续表 2 各组尿流动力学的影响(±s)

组别	膀胱容量(mL)	排尿量(mL)	残余尿量(mL)	最大排尿压(cm H ₂ O)	排尿效率(%)
14 d	2.34±0.71	2.15±0.93	0.08±0.28	25.49±5.26	95.44±3.16
高压氧组					
24 h	1.40±0.37	1.12±0.76	0.28±0.07	46.54±3.0	81.76±2.18
3 d	1.37±0.24*	1.04±0.78*	0.02±0.52*	41.23±6.89*	97.85±7.32*
7 d	2.76±1.13*	2.69±0.94*	0.07±0.71*	48.31±3.69*	96.44±8.31*
14 d	3.48±0.85**	3.43±0.96**	0.04±0.32**	52.21±5.79**	98.27±4.72**
结合电针组					
24 h	1.39±0.41	1.16±0.57	0.30±0.02	43.87±4.46	80.65±3.45
3 d	1.56±0.67*	1.28±0.45*	0.02±0.46*	42.58±3.76*	97.22±9.64*
7 d	3.05±1.76***#	2.95±1.34***#	0.04±0.72***#	51.04±5.87***#	98.01±7.59***#
14 d	4.09±1.02***#	4.06±0.73***#	0.02±0.41***#	56.69±5.22***#	98.73±9.71***#

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$, 与对照组比较; #: $P<0.05$, 与高压氧组比较。

3 讨 论

由于控制膀胱的中枢或周围神经伤病所引起的排尿功能障碍,称为神经源性膀胱,它是 SCI 的常见合并症之一^[8]。神经源性膀胱引起严重尿潴留、尿路感染、膀胱内高压、膀胱-输尿管反流,甚至发生慢性肾衰竭,是截瘫患者的首位死亡原因。1987~1988 年,中国康复研究中心对唐山地震后因 SCI 造成截瘫死亡的 374 例患者进行调查,发现肾衰竭占死因的 40% 以上。

国内外研究表明,氮能神经递质合成减少在神经源性膀胱发病过程中起重要作用。由于一氧化氮(nitric oxide, NO)的化学性质极不稳定,目前主要是通过检测一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)及其降解产物的含量间接了解 NO 的变化。NOS 阳性神经纤维广泛分布于膀胱及尿道组织,NO 通过 NO-cGMP 信号途径舒张下尿路平滑肌,降低正常排尿时的尿道压,对维持正常的膀胱储、排尿功能有重要意义^[9-11]。敲除 nNOS 基因的小鼠膀胱-尿道括约肌功能紊乱,有排尿困难、尿频等症状^[12]。神经源性膀胱逼尿肌、膀胱颈平滑肌中氮能神经递质含量明显下降,从而使逼尿肌兴奋性升高,膀胱收缩与舒张功能失调,导致排尿障碍^[13]。国内研究报道电针治疗使 SCI 后大鼠膀胱逼尿肌及膀胱颈平滑肌中 nNOS 表达增加,从而改善大鼠排尿功能^[14-15];高压氧治疗可以促进损伤后脊髓的神经细胞再生^[16-17],在本文的前期研究中,发现高压氧能够显著减少 SCI 大鼠神经元细胞凋亡的同时,还能改善 SCI 大鼠的肢体功能及行为学评分^[18]。

本实验结果表明,在术后各时间点上,高压氧组及结合电针组 nNOS 阳性细胞表达均高于对照组($P<0.01$),结合电针组的阳性细胞数显著高于高压氧组($P<0.05$);术后 7、14 d,结合电针组的尿流动力学指标明显优于高压氧组,差异有统计学意义($P<0.05$),说明高压氧及电针治疗都能改善 SCI 后大鼠尿流动力学指标,且都与脊髓及膀胱组织中氮能神经递质的合成与释放增加有关。所以本研究认为高压氧与电针相结合治疗 SCI 后神经源性膀胱,能够更好地改善 SCI 后大鼠的膀胱功能。其机制可能是:(1)高压氧能明显增加损伤脊髓组织氧张力,调节微循环功能,减轻脊髓水肿,保护神经细胞,促进神经纤维再生,同时高压氧也能提高脊髓对缺氧的耐受性^[19],使

脊髓神经元细胞缺血缺氧状态得到改善,继而使更多残存的神经细胞免于继发性损伤,更多地保留支配膀胱的神经功能。(2)中医认为 SCI 的病因病机是由于督脉受损,电针督脉(大椎穴)可以改善 SCI 局部组织的血液微循环,又能促进脑脊液流动,减轻 SCI 部位的水肿和血肿的压迫及粘连,从而扼制了脊髓继发性损伤的进行^[20];三阴交是足三阴经交会穴,三阴经循行少腹或阴器,能通调下焦之气机,推测电针刺激通过反射弧到脊髓后根激发腰骶部排尿中枢,引起反射性排尿;肾俞穴内有第 1、2 腰髓侧角发出的交感神经纤维,可使尿道内括约肌收缩,而使膀胱容量增大,减少排尿次数。同时电针治疗具有清除自由基和抑制氧化应激反应的作用,从而提高氧化能力,改善急性 SCI,这也可能是电针改善 SCI 作用途径之一^[21]。(3)本实验数据表明,高压氧结合电针治疗使 nNOS 表达显著增加,使氮能神经递质合成增加,并使膀胱和尿道组织中抑制性神经递质水平升高,尿道及膀胱颈痉挛减轻,平滑肌舒张,尿道阻力降低,逼尿肌舒张,无抑制收缩频率减少,膀胱顺应性提高,由此改善大鼠尿流动力学指标,排尿障碍症状改善。总之,高压氧结合电针治疗对 SCI 后大鼠的神经元具有保护作用,并能很好改善大鼠的膀胱功能。

参考文献:

[1] 侯春林. 脊髓损伤后膀胱功能重建[J]. 解放军医学杂志, 2008,28(8):663-665.

[2] Ishibara H, Kanamori M, Kawaguchi Y, et al. Prediction of neurologic outcome in patients with spinal cord injury by using hyperbaric oxygen therapy[J]. J Orthop Sci, 2001,6(5):385-389.

[3] 刘莹莹,陈向华. 电针治疗脊髓损伤机制研究进展[J]. 安徽中医学院学报, 2011,30(3):76.

[4] 周凌云,李杰,李春梅,等. 电针八髎、会阳治疗脊髓损伤性尿潴留疗效观察[J]. 中国针灸, 2006,26(4):237-239.

[5] 吴东,曾立志,朱崇田,等. 针灸配合膀胱功能训练治疗脊髓损伤后尿潴留 35 例[J]. 上海针灸杂志, 2006,25(10):33.

[6] 林文注,王珮. 实验针灸学[M]. 上海:上海科学技术出版

- 社,1994:288-290.
- [7] 孙双权,陈忠,叶章群,等.两种大鼠膀胱测压方法的比较[J].中国比较医学杂志,2008,18(7):50-53.
 - [8] Xiao CG. Reinnervation for neurogenic bladder: historic review and introduction of a somatic-autonomic reflex pathway procedure for patients with spinal cord injury or spinal bifida[J]. Eur Urol,2006,49(1):22-28.
 - [9] Gillespie JI,Markerink-Van Ittersum M,de Vente J. Endogenous nitric oxide/cGMP signalling in the guinea pig bladder:evidence for distinct populations of sub-urothelial interstitial cells[J]. Cell Tissue Res,2006,325(2):325-332.
 - [10] Hedlund P. Nitric oxide/cGMP-mediated effects in the out-flow region of the lower urinary tract—is there a basis for pharmacological targeting of cGMP? [J]. World J Urol, 2005,23(6):362-367.
 - [11] Poladia DP,Bauer JA. Nitric oxide in the urinary bladder: involvement of auto-relaxation[J]. Nitric Oxide,2004,10(1):51-52.
 - [12] Burnett AL,Calvin DC,Chamness SL,et al. Urinary bladder-urethral sphincter dysfunction in mice with targeted disruption of neuronal nitric oxide synthase models idiopathic voiding disorders in humans[J]. Nat Med,1997,3(5):571-574.
 - [13] Diniz P,Soejima K,Ito G. Nitric oxide mediates the effects of pulsed electromagnetic field stimulation on the osteoblast proliferation and differentiation[J]. Nitric Oxide,2002,7(1):18-23.
 - [14] 陈跃来,岑珏,候文光,等.电针对大鼠不稳定膀胱逼尿肌及膀胱颈氮能神经递质的影响[J].中西医结合学报,2006,4(1):73-75.
 - [15] 黄昭明,李静,郑少斌.脊髓损伤后膀胱氮能神经变化的动物实验研究[J].解放军医学杂志,2001,26(10):743-744.
 - [16] 王钢,刘世清.高压氧对鼠损伤脊髓内神经生长相关蛋白表达的影响[J].中华物理医学与康复杂志,2004,26(12):712-714.
 - [17] 王钢,刘世清,王石顺.高压氧对损伤脊髓 GAP-43 mRNA 表达影响的实验研究[J].中华航海医学与高气压医学杂志,2004,11(4):217-219.
 - [18] 王晓红,邵彬,王琴,等.高压氧治疗对脊髓损伤后大鼠神经细胞凋亡及行为学评分的影响[J].重庆医学,2010,39(8):935-936.
 - [19] Dong H,Xiong L,Zhu Z,et al. Preconditioning with hyperbaric oxygen and hyperoxi induces tolerance against spinal cord ischemia in rabbits[J]. Anesthesiology,2002,96(40):907-912.
 - [20] 徐斌.脊髓针为主综合治疗法治疗外伤性截瘫 286 例疗效观察[J].中国针灸,1990,10(2):7-9.
 - [21] 宋琳,李晓宁,王莹威,等.电针对急性脊髓损伤大鼠氧化应激反应的影响[J].针灸临床杂志,2011,27(1):55-57.

(收稿日期:2012-02-09 修回日期:2012-05-22)

(上接第 2576 页)

- F1326-1336.
- [6] 郭辰虹,王玉炯,舒畅,等.宁夏地区回族和汉族人群 4 个 STR 位点的遗传多态性分析[J].山东大学学报:医学版,2005,43(3):192-194.
 - [7] McIntire JJ,Umetu SE,Macauba SC,et al. Immunology: hepatitis A virus link to atopic disease[J]. Nature,2003,425(6895):576.
 - [8] Chae SC,Park YR,Shim SC,et al. The polymorphisms of Th1 cell surface gene Tim-3 are associated in a Korean population with rheumatoid arthritis[J]. Immunol Lett, 2004,95(1):91-95.
 - [9] Chae SC,Park YR,Song JH,et al. The polymorphisms of Tim-1 promoter region are associated with rheumatoid arthritis in a Korean population[J]. Immunogenetics,2005,56(10):696-701.
 - [10] Chae SC,Song JH,Heo JC,et al. Molecular variations in the promoter and coding regions of human tim1 gene and their association in Koreans with asthma[J]. Hum Immunol,2003,64(12):1177-1182.
 - [11] Khademi M,Illes Z,Gielen AW,et al. T cell Ig-and mucin-domain-containing molecule-3 (TIM-3) and TIM-1 molecules are differentially expressed on human Th1 and Th2 cells and in cerebrospinal fluid-derived mononuclear cells in multiple sclerosis[J]. J Immunol,2004,172(11):7169-7176.
 - [12] 王长青,彭诗东. Tim-3 基因的多态性与变应性鼻炎的相关性[J].山西医药杂志,2008,37(8):688-690.
 - [13] 张才成,吴健民,崔天益,等. Tim-3 启动子区基因多态性与类风湿关节炎之间关系的研究[J].中华风湿病学杂志,2005,9(9):526-529.
 - [14] Xu JR,Yang Y,Liu XM,et al. Polymorphisms of the TIM-1 gene are associated with rheumatoid arthritis in the Chinese Hui minority ethnic population[J]. Genet Mol Res, 2012,11(1):61-69.
 - [15] Xu JR,Yang Y,Liu XM,et al. The -1541 C>T and +4259 G>T of TIM-3 polymorphisms are associated with rheumatoid arthritis susceptibility in a Chinese Hui population [J]. Int J Immunogenet,2011,38(6):513-518.

(收稿日期:2012-01-09 修回日期:2012-04-22)