

文章编号:1005-0957(2023)05-0535-08

• 动物实验 •

# 电针对逼尿肌过度活动大鼠膀胱 ICCs 相关 HCN 亚型及钙离子震荡特性的影响

张安冬<sup>1</sup>, 冯戟玮<sup>2</sup>, 刘建党<sup>3</sup>, 李雯<sup>4</sup>, 谢旭彬<sup>3</sup>, 陈跃来<sup>2</sup>

(1. 上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院, 上海 200437; 2. 上海中医药大学附属龙华医院, 上海 200032; 3. 上海中医药大学, 上海 201203; 4. 上海市第七人民医院, 上海 200137)

**【摘要】 目的** 观察电针对逼尿肌过度活动 (detrusor overactivity, DO) 大鼠膀胱 Cajal 间质细胞 (interstitial cells of cajal, ICCs) 超极化激活环核苷酸门控阳离子通道 (hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channels, HCN) 相关亚型表达水平及细胞内钙离子震荡特性的影响。**方法** 40 只 Wistar 雌性大鼠随机分为对照组、模型组、电针组和药物组, 每组 10 只。除对照组外, 其余大鼠均采用环磷酸腺苷腹腔注射制备 DO 模型, 电针组在模型基础上给予电针刺激和会阳, 每日 1 次, 每次 20 min, 连续 3 d; 药物组予甲磺酸伊马替尼灌胃, 每日 1 次, 连续 3 d。对照组、模型组和药物组大鼠同电针组予以对照捆绑固定 20 min, 对照、模型和电针组同药物组予以同等体质量计量的饮用水灌胃处理, 均每日 1 次, 连续 3 d。采用 Western Blot 和 RT-PCR 检测 HCN1-4 4 种亚型的表达, 运用钙离子成像技术检测电针对 ICCs 内钙离子震荡特性的影响。**结果** 与对照组比较, 模型组大鼠膀胱 ICCs 相关 HCN1 和 HCN2 的蛋白和 mRNA 表达均升高 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 电针组和药物组 HCN1 和 HCN2 的蛋白和 mRNA 表达均降低 ( $P < 0.05$ ); 4 组 HCN3、HCN4 比较差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。与对照组比较, 模型组大鼠膀胱 ICCs 内钙离子震荡幅度、频率和宽度明显升高 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 电针组和药物组膀胱 ICCs 内钙离子震荡频率和幅度均下降 ( $P < 0.05$ ), 而钙离子震荡宽度无明显变化 ( $P > 0.05$ )。**结论** 电针可能通过抑制 DO 大鼠膀胱 ICCs 起搏通道相关 HCN1 和 HCN2 的表达, 及降低 ICCs 内钙离子震荡的幅度和频率, 达到调控 DO 的作用。

**【关键词】** 电针; 逼尿肌过度活动; Cajal 间质细胞; 超极化激活环核苷酸门控阳离子通道; 大鼠

**【中图分类号】** R2-03 **【文献标志码】** A

DOI:10.13460/j.issn.1005-0957.2022.13.2026

**Impact of electroacupuncture on ICCs-associated HCN subtypes and calcium ion oscillation features in the bladder of detrusor overactivity rats** ZHANG Andong<sup>1</sup>, FENG Jiwei<sup>2</sup>, LIU Jiandang<sup>3</sup>, LI Wen<sup>4</sup>, XIE Xubin<sup>3</sup>, CHEN Yuelai<sup>2</sup>. 1.Yueyang Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200437, China; 2.Longhua Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China; 3.Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 4.Shanghai Seventh People's Hospital, Shanghai 200137, China

**[Abstract] Objective** To observe the effects of electroacupuncture (EA) on the expression levels of the subtypes of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channels (HCN) and intracellular calcium ion oscillation characteristics of the interstitial cells of Cajal (ICCs) in rats with detrusor overactivity (DO). **Method** Forty female Wistar rats were randomized into a control group, a model group, an EA group, and a medication group, with 10 rats in each group. Except for the control group, rats in the other groups underwent DO modeling with an intraperitoneal

**基金项目:** 国家自然科学基金项目 (81674090)

**作者简介:** 张安冬 (1990—), 女, 医师, Email: winterhalf@163.com

**通信作者:** 陈跃来 (1965—), 男, 教授, Email: chenylai@163.com

injection of Cyclophosphamide; besides, the EA group was given EA at Ciliao (BL32) and Huiyang (BL35) points, 20 min each time, once daily for 3 consecutive days, and the medication group received intragastric administration of Imatinib mesylate, once daily for 3 consecutive days. Rats in the control, model, and medication groups were fixed for 20 min as those in the EA group, and rats in the control, model, and EA groups received intragastric administration of drinking water with the amount calculated based on the body mass just in the same way as in the medication group, once daily for 3 successive days. Western Blot and RT-PCR were adopted to detect the expression of HCN1-4 subtypes, and the impact of EA on the features of ICCs intracellular calcium ion oscillation was examined using calcium imaging technology. **Result** Compared with the control group, the protein and mRNA expression levels of ICCs-associated HCN1 and HCN2 in the bladder of model group rats increased ( $P < 0.05$ ); compared with the model group, the protein and mRNA expression levels of HCN1 and HCN2 decreased in the EA and medication groups ( $P < 0.05$ ); there were no significant differences in the expression of HCN3 or HCN4 among the four groups ( $P > 0.05$ ). Compared with the control group, the bladder ICCs intracellular calcium ion oscillation amplitude, frequency, and width were heightened in the model group rats ( $P < 0.05$ ); compared with the model group, the bladder ICCs intracellular calcium ion oscillation amplitude and frequency dropped in the EA and medication groups ( $P < 0.05$ ), while the differences in the calcium ion oscillation width were statistically insignificant ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** EA may modulate DO by inhibiting the expression of HCN1 and HCN2, associated with the ICCs pacemaker channel in the bladder of DO rats, and down-regulating the amplitude and frequency of calcium ion oscillations in ICCs.

**[Key words]** Electroacupuncture; Detrusor overactivity; Interstitial cells of Cajal; Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channels; Rats

逼尿肌过度活动 (detrusor overactivity, DO) 是指尿动力学检查过程中, 在充盈期出现自发的或可激发的逼尿肌不自主收缩<sup>[1]</sup>。约 50% 的女性膀胱过度活动症 (overactive bladder, OAB) 患者被证实存在逼尿肌过度活动<sup>[2]</sup>。DO 的发病机制并不是十分明确, 主要可分为肌源性和神经源性<sup>[3]</sup>。肌源性认为是由于膀胱逼尿肌本身的病理变化导致了逼尿肌无法随意收缩。神经源性认为膀胱逼尿肌不随意收缩的产生, 是由于中枢及外周神经两者的神经传入和传出功能发生紊乱而引起的。但大多数情况下的逼尿肌过度活动原因不明。近年来膀胱 Cajal 间质细胞 (interstitial cells of cajal, ICCs) 的发现和关注为解决这一难题打开了一个切入口, 研究发现 ICCs 不仅具备感受牵张力的功能, 同时还具有传导和调节神经电信号的能力<sup>[4]</sup>, 认为 ICCs 可能成为连接肌源性和神经源性两种发病机制的重要中间纽带<sup>[5]</sup>。进一步研究发现与 ICCs 起搏功能相关的电流通路, 超极化激活环核苷酸门控阳离子通道 (hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channels, HCN) 对逼尿肌兴奋调节起到重要作用。

电针作为常用临床治疗方法, 以膀胱经次髎与会阳为组穴在治疗 OAB 患者中显示出了良好的疗效, 且研究证实电针可有效抑制 OAB 患者逼尿肌过度活动, 改善尿频、尿急等排尿异常症状<sup>[6-8]</sup>。为进一步阐明其效应机制, 前期课题组以 DO 大鼠为研究对象, 证实电针可有效提高 DO 大鼠膀胱有效容量和储尿时间, 增加离体逼尿肌收缩幅度, 稳定逼尿肌收缩频率, 且电针干预后第 24 h 效应最佳<sup>[9]</sup>, 但其具体的有效调控机制尚未被阐明。因此, 本研究以 ICCs 为切入点, 观察电针对 DO 大鼠膀胱 ICCs 起搏功能相关的 HCN1-4 4 种亚型及细胞内钙离子震荡特性的影响, 探究电针调节膀胱逼尿肌过度活动的相关机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物和分组

雌性 SPF 级 Wistar 大鼠, 体质量 ( $230 \pm 20$ ) g, 9 周龄, 共 40 只, 购于北京维通利华实验动物有限责任公司, 实验动物生产许可证编号 SCXK (京) 2016-0011。大鼠饲养室内保持恒温 ( $22 \pm 2$ ) °C, 湿度 60%~70%, 饲养环境安静, 规律光照每日 12 h, 自由饮水饮食。每笼平均饲养

5只大鼠,为保持饲养环境清洁干燥需每日更换1次垫料,所有大鼠均委托饲养于上海中医药大学实验动物中心。本动物实验方案已通过上海中医药大学动物实验伦理委员会审查,所涉及操作均符合实验动物伦理标准,伦理编号为PZSHUTCM190315011。

## 1.2 主要试剂与仪器

0.9%氯化钠注射液(华裕制药有限公司);2.5%环磷酰胺(Baxter Oncology GmbH);1 mg·mL<sup>-1</sup>甲磺酸伊马替尼(石药集团欧意药业有限公司);10%水合氯醛(国药集团);电针治疗仪(华佗牌SDZ-V型;苏州医疗用品厂有限公司);Anti-HCN1抗体(ab84816, Abcam公司);Anti-HCN2抗体(ab84817, Abcam公司);Anti-HCN3抗体(ab84818, Abcam公司);Anti-HCN4抗体(ab66501, Abcam公司); $\beta$ -actin鼠抗(#3700, CST);反转录试剂盒(6110A, TakaRA公司);RIPA蛋白抽提试剂(碧云天生物技术有限公司);SYBR® Green实时荧光定量PCR预混液(RR420A, TakaRA公司);PCR扩增仪(Biometra公司);荧光定量PCR仪(ABI PRISM® 7900HT Sequence Detection System);蛋白质电泳仪(伯乐生命医学产品有限公司);青链霉素(西格玛奥德里奇贸易有限公司);DMEM/F12培养基(E15-813, Invitrogen公司);II型胶原酶(49H11339, Worthington Biochemical公司)。

## 1.3 模型制备

参考文献<sup>[10]</sup>的造模方法,以及前期课题的研究形成了稳定的D0大鼠模型方案<sup>[11]</sup>。取200 mg环磷酰胺溶于8 mL生理盐水制备成2.5%的环磷酰胺,充分混匀后于4℃冰箱保存待用。造模前将2.5%的环磷酰胺常温放置0.5 h,然后按照0.6 mL·(100 g·bw)<sup>-1</sup>进行大鼠腹腔注射,48 h后测定尿动力学判断模型情况。尿动力学主要检测指标包括膀胱有效容量和储尿时间,若大鼠在膀胱充盈期出现膀胱不稳定性收缩,主要表现为膀胱有效容量显著减小,同时储尿期时间显著缩短,表明大鼠膀胱出现期向性的压力波,说明模型制备成功<sup>[12]</sup>。

## 1.4 动物分组与处理

40只SPF级雌性Wistar大鼠,随机分为对照组、模型组、电针组和药物组,每组10只。对照组不进行造模;模型组进行D0模型建立;电针组在D0模型成功后,针刺次髂和会阳<sup>[13]</sup>,次髂位于第二腰骶后孔,会阳位于第一尾椎棘突旁0.3 cm。并连接电针仪,设定为连续波(频率30 Hz,强度1 mA),每日1次,每次20 min,连续3 d;

药物组在模型成功后,按1 mg·(100 g·bw)<sup>-1</sup>予甲磺酸伊马替尼灌胃,每日1次,连续3 d。对照组、模型组和药物组大鼠同电针组予以捆绑固定20 min,对照组、模型组和电针组同药物组予以同等体质量计量的饮用水灌胃处理,均每日1次,连续3 d。干预后24 h,尿动力学测定完成后立即脱颈处死大鼠,取下完整膀胱备用。

## 1.5 样品制备和原代膀胱ICCs培养

分离4组大鼠膀胱组织,根据提取和培养ICCs的方法<sup>[14]</sup>,使用D-Hanks液洗净,去净表面黏附脂肪与黏膜组织,用眼科剪剪成小碎块。加入10 mL II型胶原酶置于37℃混匀器混匀7 min后,取上清,重复上述步骤6~8次,直至消化完全,将收集的上清液过200目筛网后,4℃1 500 r·min<sup>-1</sup>离心5 min,收集细胞。使用细胞培养液重悬细胞,细胞接种密度为1×10<sup>5</sup>个·mL<sup>-1</sup>,接种完成后立即置于细胞培养箱培养。

## 1.6 指标检测

### 1.6.1 尿动力学测定

干预后24 h麻醉大鼠并进行尿动力学测定,具体操作方法见本实验室前期发表文章<sup>[15]</sup>。

### 1.6.2 Western blot法检测大鼠膀胱组织中HCN1、HCN2、HCN3、HCN4蛋白表达

将膀胱组织置于离心管中,加入100  $\mu$ L RIPA裂解液进行细胞裂解,进一步采用超声破碎仪将组织样本破碎30 min,后于4℃,13 200 r·min<sup>-1</sup>条件下离心15 min,取上清分装于预冷的1.5 mL离心管中保存备用。经BCA蛋白浓度测定后,进行SDS-PAGE凝胶电泳,初步设定80 V进行电泳,观察样品位置待其进入分离胶后,重新设定120 V继续电泳,观察溴酚兰位置,待其接近凝胶末端位置时停止电泳。按照吸水纸、滤纸、凝胶、PVDF膜、滤纸、吸水纸顺序,准备蛋白转移装置夹板,设定200 mA,转膜2 h 20 min。转移完成后,用含5%牛奶的PBST进行封闭,室温孵育一抗2 h(抗体稀释比例分别为HCN1为1:2 000;HCN2为1:100;HCN3为1:500;HCN4为1:500; $\beta$ -actin为1:5 000),洗膜,加入二抗,室温孵育2 h。最后用ECL试剂盒,逐步完成显影和定影操作。数据采集系统为ClinuxChemiscope Mini Series WB成像系统,利用ImageJ软件进行数据分析。

### 1.6.3 RT-PCR法检测大鼠膀胱组织中HCN1、HCN2、HCN3、HCN4 mRNA表达

利用Trzol进行组织匀浆,后利用氯仿进行RNA提

取,经分光光度计测定RNA纯度。采用反转录试剂盒进行反转录。采用的是Primer3在线引物设计平台对目的基因和内参基因进行引物设计,详见表1。引物特异性校正均在Primer-Blast中完成,所有引物的生产和合成均委托生工生物工程(上海)有限公司完成。

表1 RT-PCR引物序列

| 引物名称  | 序列(5' -3' )              | 长度(bp) |
|-------|--------------------------|--------|
| GAPDH | F_TCCTGCACCACCACTGCTTAG  | 102    |
|       | R_AGTGGCAGTGATGGCATGGACT |        |
| HCN1  | F_AGCGTGTCACCTTGTT       | 130    |
|       | R_GCATCTGGGTCTTTATT      |        |
| HCN2  | F_GACCTACGACCTGGCAAGCG   | 69     |
|       | R_TGGCAGAGCAGCAGCATCA    |        |
| HCN3  | F_TTCGGCAGCCACAAAGC      | 250    |
|       | R_CAGTTCGGAAGTTGAGCACC   |        |
| HCN4  | F_CTAAGGGCAACAAGGAGACC   | 119    |
|       | R_TGAGTAGAGGCGGCAGTAAG   |        |

将反转录好的样品,按照SYBR® Green实时荧光定量PCR预混液说明书,按照20  $\mu$ L反应体系进行RT-PCR检测,共进行41个反应循环,其中40个循环反应条件为设定为95  $^{\circ}$ C反应45 s;60  $^{\circ}$ C反应30 s,1个循环的反应条件为95  $^{\circ}$ C反应15 s,60  $^{\circ}$ C反应30 s,95  $^{\circ}$ C反应15 s。以GAPDH为内参基因,通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析目的mRNA相对表达量。

#### 1.6.4 原代膀胱ICCs内钙离子震荡特征检测

细胞培养4 h后,在倒置显微镜下进行细胞形态观察,ICCs胞体形态为梭形,首尾各有1个细长突起。将未贴壁的逼尿肌细胞转移到另一培养皿中,分盘继续培养。分盘培养24 h后对贴壁的细胞进行钙离子震荡特征检测,步骤为加入预热的NT液后,均匀上下左右摇晃培养皿,将细胞轻柔清洗2遍,每次约10 s,再加入Fluo-4/AM工作液,37  $^{\circ}$ C温箱避光孵育20 min,再次使用预热的NT液清洗2遍,每次10 s,最后加入1 mL NT液进行上机检测,每秒拍摄2张,观测1 000 s共连续拍摄2 000张后进行数据分析。

#### 1.7 统计学方法

采用SPSS24.0统计软件对数据进行统计学分析。若统计数据为计量资料且符合正态分布时,以均数 $\pm$ 标准差进行统计学描述,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用Post Hoc检验;当统计数据为计量资料但不符合正态分布时,采用中位数(下四分位数,上

四分位数)进行统计学描述,组间数据比较采用秩和检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 4组尿动力学比较

与对照组比较,模型组大鼠的膀胱有效容量、储尿时间均显著降低( $P<0.05$ ),提示D0模型建立成功。与模型组比较,电针和药物组D0大鼠膀胱有效容量、储尿时间均显著升高( $P<0.05$ )。与电针组比较,药物组大鼠膀胱有效容量和储尿时间均无明显变化( $P>0.05$ ),提示电针与药物均可有效恢复D0大鼠尿动力,但两者之间效应无显著差异。

### 2.2 4组膀胱组织HCN1-4蛋白表达比较

与对照组比较,模型组大鼠膀胱HCN1和HCN2的蛋白表达显著升高( $P<0.05$ )。与模型组比较,电针组和药物组D0大鼠膀胱中HCN1和HCN2的蛋白表达显著降低( $P<0.05$ )。与电针组比较,药物组大鼠膀胱HCN1和HCN2表达变化无明显变化( $P>0.05$ )。4组HCN3、HCN4表达比较差异均无统计学意义( $P>0.05$ ),提示D0模型大鼠具有膀胱HCN1和HCN2表达增高的特点,并且电针及药物治疗均可有效抑制该模型大鼠膀胱中HCN1和HCN2的表达。详见图1和表2。

### 2.3 4组膀胱HCN1-4 mRNA表达比较

与对照组比较,模型组膀胱HCN1、HCN2和HCN4的mRNA表达水平显著升高( $P<0.05$ );模型组HCN3的mRNA表达水平有升高趋势,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。与模型组比较,电针组和药物组膀胱HCN1和HCN2 mRNA表达水平下降并趋于正常水平( $P<0.05$ ),HCN4 mRNA表达水平无明显变化( $P>0.05$ )。提示D0模型可能与HCN1、HCN2和HCN4的mRNA表达水平有关,而与HCN3无关,而电针和药物均可调节HCN1和HCN2 mRNA表达,但对HCN4的mRNA表达无明显影响。详见表3。

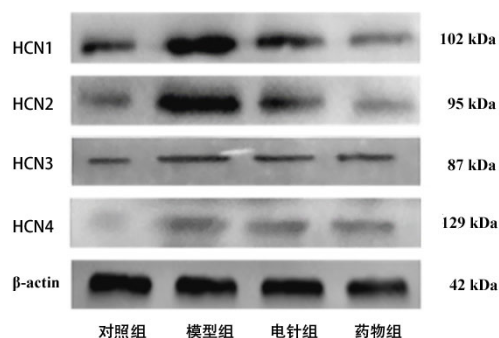


图1 4组膀胱HCN1-4蛋白表达条带图

表2 4组膀胱HCN1-4蛋白相对表达量比较( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别  | <i>n</i> | HCN1                      | HCN2                      | HCN3        | HCN4        |
|-----|----------|---------------------------|---------------------------|-------------|-------------|
| 对照组 | 6        | 0.492±0.111               | 0.515±0.143               | 0.628±0.114 | 0.661±0.044 |
| 模型组 | 6        | 1.144±0.064 <sup>1)</sup> | 1.377±0.079 <sup>1)</sup> | 0.853±0.104 | 0.809±0.127 |
| 电针组 | 6        | 0.587±0.118 <sup>2)</sup> | 1.003±0.081 <sup>2)</sup> | 0.833±0.084 | 0.834±0.098 |
| 药物组 | 6        | 0.465±0.062 <sup>2)</sup> | 0.747±0.121 <sup>2)</sup> | 0.668±0.175 | 0.811±0.190 |

注:与对照组比较<sup>1)</sup> $P<0.05$ ;与模型组比较<sup>2)</sup> $P<0.05$ 。

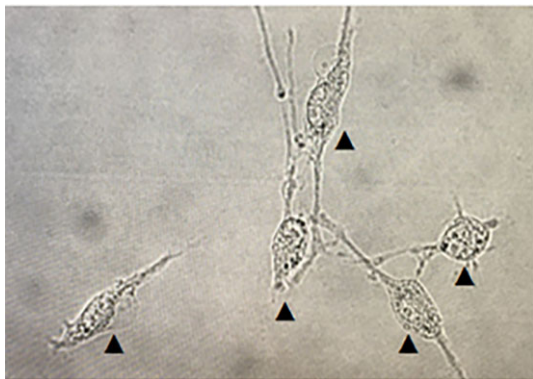
表3 4组膀胱HCN1-4 mRNA相对表达量比较( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别  | <i>n</i> | HCN1                      | HCN2                      | HCN3        | HCN4                      |
|-----|----------|---------------------------|---------------------------|-------------|---------------------------|
| 对照组 | 6        | 1.214±0.051               | 0.968±0.135               | 1.235±0.042 | 1.024±0.112               |
| 模型组 | 6        | 1.521±0.212 <sup>1)</sup> | 1.480±0.216 <sup>1)</sup> | 1.436±0.255 | 1.440±0.211 <sup>1)</sup> |
| 电针组 | 6        | 1.242±0.188 <sup>2)</sup> | 1.141±0.251 <sup>2)</sup> | 1.574±0.343 | 1.712±0.131 <sup>1)</sup> |
| 药物组 | 6        | 1.064±0.067 <sup>2)</sup> | 1.159±0.115 <sup>2)</sup> | 1.401±0.311 | 1.540±0.287 <sup>1)</sup> |

注:与对照组比较<sup>1)</sup> $P<0.05$ ;与模型组比较<sup>2)</sup> $P<0.05$ 。

## 2.4 原代膀胱 ICCs 形态学特征

倒置显微镜观察结果显示, ICCs 细胞核较大, 形态为长梭样, 细胞两端延伸出明显突触, 细胞与细胞之间可相互连接。详见图2。



注:“▲”所标注为 ICCs。

图2 油镜40倍下 ICCs 细胞图

## 2.5 4组膀胱 ICCs 内钙离子震荡特征比较

大鼠膀胱 ICCs 内钙离子震荡特征由钙震荡幅度、频率和宽度3个参数构成。钙离子震荡幅度、频率数据结果显示, 与对照组比较, 模型组大鼠膀胱 ICCs 内钙离子震荡幅度和频率均明显升高( $P<0.05$ ); 与模型组比较, 电针和药物组中大鼠膀胱 ICCs 内钙离子震荡的幅度和频率显著下降( $P<0.05$ ); 与电针组比较, 药物组中大鼠膀胱 ICCs 内钙离子震荡的幅度和频率均无明显变化( $P>0.05$ )。钙震荡宽度数据结果显示, 与对照组比较, 模型组、电针组和药物组的大鼠膀胱 ICCs 钙震荡

宽度均明显升高( $P<0.05$ ); 与模型组比较, 电针组和药物组的大鼠膀胱 ICCs 钙震荡宽度无明显变化( $P>0.05$ )。提示电针和药物对 D0 大鼠的膀胱 ICCs 钙震荡宽度无影响, 详见表4、表5和表6。将采集的4组膀胱 ICCs 内钙离子震荡数据进行进一步拟合, 构建4组膀胱 ICCs 内钙离子震荡特征模式图, 结果显示, 与对照组比较, 模型组 ICCs 内钙离子震荡波形差异明显, 模型组具有典型波峰和波谷特征。与模型组比较, 电针与药物组无典型波峰和波谷特征, 提示电针和药物干预均可稳定 D0 膀胱 ICCs 内钙离子震荡活动。详见图3。

表4 4组膀胱 ICCs 内钙离子震荡幅度比较( $M(P_{25}, P_{75})$ )

| 组别  | <i>n</i> | 荧光比值                               |
|-----|----------|------------------------------------|
| 对照组 | 4        | 0.349 (0.164, 0.467)               |
| 模型组 | 4        | 1.221 (0.950, 2.495) <sup>1)</sup> |
| 电针组 | 4        | 0.480 (0.353, 0.698) <sup>2)</sup> |
| 药物组 | 4        | 0.500 (0.143, 1.182) <sup>2)</sup> |

注:与对照组比较<sup>1)</sup> $P<0.05$ ;与模型组比较<sup>2)</sup> $P<0.05$ 。

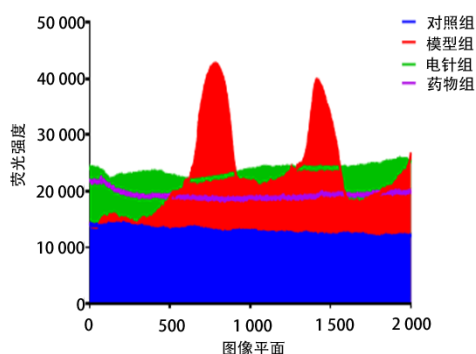
表5 4组膀胱 ICCs 钙震荡频率比较( $M(P_{25}, P_{75})$ )

| 单位:个·1 000 s <sup>-1</sup> |          |                              |
|----------------------------|----------|------------------------------|
| 组别                         | <i>n</i> | 震荡频率                         |
| 对照组                        | 4        | 1.0 (0.5, 1.0)               |
| 模型组                        | 4        | 4.0 (3.0, 4.0) <sup>1)</sup> |
| 电针组                        | 4        | 1.0 (1.0, 2.0) <sup>2)</sup> |
| 药物组                        | 4        | 0.0 (0.0, 1.5) <sup>2)</sup> |

注:与对照组比较<sup>1)</sup> $P<0.05$ ;与模型组比较<sup>2)</sup> $P<0.05$ 。

表6 4组膀胱ICCs钙震荡宽度比较( $\bar{x} \pm s$ )

| 单位:s |   |                           |
|------|---|---------------------------|
| 组别   | n | 震荡宽度                      |
| 对照组  | 4 | 74.2±41.3                 |
| 模型组  | 4 | 146.9±76.2 <sup>1)</sup>  |
| 电针组  | 4 | 147.5±61.0 <sup>1)</sup>  |
| 药物组  | 4 | 148.8±111.4 <sup>1)</sup> |

注:与对照组比较<sup>1)</sup>P<0.05

注:横坐标为每秒拍摄2张,观测1 000 s,共2 000张图像平面。

图3 4组ICCs内钙离子震荡波形模式图

### 3 讨论

在中医学中,有关逼尿肌过度活动(DO)相关描述可见于《灵枢·本输》:“三焦者,足少阳、太阴之所将,太阳之别也,上踝五寸,别入贯膈肠,出于委阳,并太阳之正,入络膀胱,约下焦,实则闭癃,虚则遗溺,遗溺则补之,闭癃则泻之。”中医学认为此病可纳入“遗溺”或“淋证”的范围中。对此病因病机最早在《素问·灵兰秘典论》记载:“膀胱者,州都之官,津液藏焉,气化则能出矣。”认为正是由于肾和膀胱的气化功能无法正常发挥才导致此病的发生,肾气的固摄功能正常才能保证膀胱发挥正常的贮尿功能,一旦肾气不固,膀胱不约,则出现遗尿、小便不禁等症状。本研究团队在多年的临床实践中,逐渐形成了经典穴位组合的治疗方案(膀胱经的会阳和次髎为主穴),其中会阳穴具有益肾固带、疏调腰脊、温阳利水、助膀胱气化的功能,次髎穴属膀胱经络肾,可调节肾的气化,促进膀胱开合。该方法目前已通过临床试验验证<sup>[16]</sup>。

但是目前DO具体发病机制尚不明确,针刺如何发挥对DO的疗效机制尚未可知。近年来膀胱ICCs的发现为DO研究打开了一个切入口。研究发现ICCs所产生的

胆碱能神经兴奋,可以启动逼尿肌的收缩功能。从结构上看,ICCs的细胞核较大,细胞内分布诸多线粒体,且分布较多的中间丝,ICCs的细胞形态类似纺锤或者梭形,细胞周围会伸出树枝样的触角,超微结构可观察到膀胱ICCs和平滑肌细胞之间存在着连接性的结构<sup>[17]</sup>,可以说明ICCs具备引起逼尿肌收缩的结构基础。从功能上看,已有研究发现大鼠膀胱ICCs中存在两种毒覃碱神经受体亚型M2和M3,M2和M3具有接收乙酰胆碱神经递质信号的功能,大鼠在排尿时可有效激活胆碱能受体,从而引发逼尿肌收缩现象<sup>[18-19]</sup>。说明ICCs与逼尿肌收缩功能有着直接关系。此外,研究发现膀胱ICCs表达HCN1-4的4个亚型<sup>[20]</sup>,HCN可介导Ih电流的产生,该电流的产生被认为是起搏细胞的重要特征<sup>[21-23]</sup>。已有研究利用HCN阻滞剂ZD7288对膀胱ICCs进行实验,发现ZD7288可通过特异性阻断细胞内T型钙离子通道的电流,从而引起逼尿肌收缩的幅度和频率的显著降低<sup>[24]</sup>,所以认为HCN源性的ICCs细胞兴奋是引起膀胱兴奋性产生和调节的关键。而HCN通道介导电流的产生与钙离子通道密切相关。钙离子是生命体中极为重要的第二信使,在细胞中主要负责细胞内信号传导,在神经活动信号传导中承担着重要的角色,与此同时,钙离子还是肌肉收缩的必要条件,在肌细胞活动中有着重要的作用<sup>[25]</sup>。HCN开放时会形成内向离子流,引发钙瞬变,造成钙离子通道的开放,进一步触发动作电位,所以HCN引起的钙瞬变是导致动作电位的重要因素。HCN可通过调控钙离子轴产生动作电位,从而影响膀胱ICCs细胞的兴奋性,进一步影响逼尿肌的功能,由此可知,HCN源性的ICCs兴奋调节,是调控膀胱兴奋性的关键环节之一。

前期研究利用体外培养DO大鼠膀胱ICCs,观察到与正常大鼠比较,DO模型ICCs中胞内游离的钙离子浓度和钙离子荧光表达强度均显著增加,但是经过电针治疗后均显著降低<sup>[15]</sup>,提示电针治疗DO与ICCs中钙离子密切相关,但电针调节钙离子震荡的特征并不明确。同时,电针是否通过调节HCN1-4来影响ICCs尚不清楚。因此,本研究中进一步观察电针对DO大鼠膀胱ICCs起搏电流通道HCN1-4亚型的表达水平及细胞内钙离子震荡特性的影响,本次实验结果显示,电针治疗DO大鼠模型可显著下调膀胱中HCN1和HCN2蛋白表达,降低HCN1和HCN2两种蛋白mRNA的表达,且电针可显著下调膀胱ICCs内钙离子震荡的幅度和频率。目前HCN1-4这4种不同亚型在DO疾病中具体调控功能尚

未十分明确,但是已有研究报道HCN1对D0疾病的发展至关重要<sup>[26]</sup>,关于HCN1,已知它在4种亚型中有着最快的通道动力学效应,同时其电压依赖性也非常高,在-140~-95 mV的电压下,其激活时间为30~300 ms<sup>[27]</sup>。HCN2和HCN4在心脏中有着重要作用,研究发现HCN2敲除的小鼠,会出现窦性心律不齐<sup>[28]</sup>,HCN4产生的I<sub>h</sub>电流,被认为是心律形成的关键<sup>[29]</sup>。HCN3的研究表明其在中枢系统和传导系统中表达均较低<sup>[30-31]</sup>。目前这3种亚型在D0中的作用研究较少。本次研究发现电针对HCN1和HCN2具有显著调控作用,但其背后的深入机制尚不知晓,深入探索电针调控HCN1和HCN2通道在膀胱兴奋调控中的机制具有重要意义。

此外,本次实验发现电针和药物干预均可稳定D0膀胱ICCs内钙离子震荡活动,药物干预后ICCs内钙离子震荡活动模式更接近于对照组。同时,研究发现电针和药物对HCN1和HCN2蛋白和mRNA的调控作用类似。本次实验中选用的药物是甲磺酸伊马替尼,实验研究证实甲磺酸伊马替尼可抑制引起过度活跃的逼尿肌平滑肌收缩和自发活动<sup>[32]</sup>,尤其在环磷酸胺诱导的大鼠D0模型中<sup>[33]</sup>,但是目前无法运用于临床。针刺是中医常用治疗疗法,在多种疾病中显示了良好的安全性<sup>[34]</sup>、有效性<sup>[35]</sup>,且兼有简、便、廉等特点,利于临床的使用。

目前,在泌尿学术研究领域,ICCs的研究热潮从未停歇,近些年来,ICCs已在除膀胱的其他器官组织中被陆续发现,对于ICCs在不同组织器官中发挥的不同作用引起了诸多学者的兴趣,目前ICCs的研究仍然是一个热点研究方向<sup>[36-37]</sup>。本研究也证实了ICCs在电针治疗D0中发挥了重要作用并阐明了相关机制,然而,针灸效用是一个复杂而多靶点效应的综合体,仍然存在诸多未知领域需要在未来的研究工作中继续探究。

### 参考文献

- [1] HAYLEN B T, DE RIDDER D, FREEMAN R M, *et al.* An International Urogynecological Association (IUGA)/International Continence Society (ICS) joint report on the terminology for female pelvic floor dysfunction[J]. *Neurourol Urodyn*, 2010, 29(1):4-20.
- [2] PEYRONNET B, MIRONSKA E, CHAPPLE C, *et al.* A comprehensive review of overactive bladder pathophysiology: on the way to tailored treatment[J]. *Eur Urol*, 2019, 75(6):988-1000.
- [3] MCCLOSKEY K D, GURNEY A M. Kit positive cells in the guinea pig bladder[J]. *J Urol*, 2002, 168(2):832-836.
- [4] DAIGO Y, TAKAYAMA I, WARD S M, *et al.* Isolation of novel mouse genes that were differentially expressed in W/W(V) mouse fundus[J]. *J Gastroenterol*, 2004, 39(3):238-241.
- [5] 陈跃来,岑珏,侯文光,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.
- [6] 侯文光,邢曼,哈力甫,等.电针对肾虚型急性尿失禁患者尿动力学的影响[J].*上海中医药大学学报*, 2011, 25(6):50-52.
- [7] HUANG Q R, CHEN Y L. Clinical observations on electroacupuncture treatment of unstable bladder[J]. *J Acupunct Tuina Sci*, 2005, 3(5):56-58.
- [8] 张安冬.基于膀胱ICCs起搏功能的针刺调节逼尿肌过度活动的肌源性机制研究[D].上海:上海中医药大学, 2019.
- [9] BON K, LICHTENSTEIGER C A, WILSON S G, *et al.* Characterization of cyclophosphamide cystitis, a model of visceral and referred pain, in the mouse: species and strain differences[J]. *J Urol*, 2003, 170(3):1008-1012.
- [10] FENG Q F, ZHANG A D, XING M, *et al.* Electroacupuncture alleviates bladder overactivity via inhibiting bladder P2X3 receptor[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2020, 2020:4080891.
- [11] CHAPPLE C R, SMITH D. The pathophysiological changes in the bladder obstructed by benign prostatic hyperplasia[J]. *Br J Urol*, 1994, 73(2):117-123.
- [12] 余曙光,郭义.实验针灸学[M].上海:上海科学技术出版社, 2014:287.
- [13] 张安冬,冯戟玮,刘建党,等.逼尿肌过度活动大鼠电针后不同时间点的尿动力与离体逼尿肌条收缩性研究[J].*上海中医药杂志*, 2022, 56(7):68-73.
- [14] 苏同生,刘保延,刘志顺,等.电针与盆底肌训练治疗女性压力性尿失禁多中心随机对照试验[J].*中医杂志*, 2021, 62(5):414-418.
- [15] FENG Q F, HOU Y H, HOU W G, *et al.* The effects of acupuncture on bladder interstitial cells of cajal

- excitability in rats with overactive bladder[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013, 2013:261217.
- [16] DRAKE M J, FRY C H, EYDEN B. Structural characterization of myofibroblasts in the bladder[J]. *BJU Int*, 2006, 97(1):29-32.
- [17] NELSON C P, GUPTA P, NAPIER C M, *et al.* Functional selectivity of muscarinic receptor antagonists for inhibition of M3-mediated phosphoinositide responses in guinea pig urinary bladder and submandibular salivary gland[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2004, 310(3):1255-1265.
- [18] 贾卓敏. M受体对膀胱 ICC 细胞兴奋性的影响及在膀胱收缩功能中作用的探讨[D]. 重庆:第三军医大学, 2009.
- [19] DIFRANCESCO J C, DIFRANCESCO D. Dysfunctional HCN ion channels in neurological diseases[J]. *Front Cell Neurosci*, 2015, 6:174.
- [20] DU L, WANG S J, CUI J, *et al.* The role of HCN channels within the periaqueductal gray in neuropathic pain[J]. *Brain Res*, 2013, 1500:36-44.
- [21] HU L, SANTORO B, SAPONARO A, *et al.* Binding of the auxiliary subunit TRIP8b to HCN channels shifts the mode of action of cAMP[J]. *J Gen Physiol*, 2013, 142(6):599-612.
- [22] KIM Y H, HOLT J R. Functional contributions of HCN channels in the primary auditory neurons of the mouse inner ear[J]. *J Gen Physiol*, 2013, 142(3):207-223.
- [23] HAWKINS V E, HAWRYLUK J M, TAKAKURA A C, *et al.* HCN channels contribute to serotonergic modulation of ventral surface chemosensitive neurons and respiratory activity[J]. *J Neurophysiol*, 2015, 113(4):1195-1205.
- [24] KUO K H, DAI J, SEOW C Y, *et al.* Relationship between asynchronous  $Ca^{2+}$  waves and force development in intact smooth muscle bundles of the porcine trachea[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2003, 285(6):L1345-L1353.
- [25] LIU Q, LONG Z, DONG X, *et al.* Cyclophosphamide-induced HCN1 channel upregulation in interstitial Cajal-like cells leads to bladder hyperactivity in mice[J]. *Exp Mol Med*, 2017, 49(4):e319.
- [26] PADILLA-FLORES T, LÓPEZ-GONZÁLEZ Z, VACA L, *et al.* “Funny” channels in cardiac mitochondria modulate membrane potential and oxygen consumption[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 524(4):1030-1036.
- [27] STIEBER J, HOFMANN F, LUDWIG A. Pacemaker channels and sinus node arrhythmia[J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2004, 14(1):23-28.
- [28] HENNIS K, BIEL M, FENSKE S, *et al.* Paradigm shift: new concepts for HCN4 function in cardiac pacemaking[J]. *Pflugers Arch*, 2022, 474(7):649-663.
- [29] WAHL-SCHOTT C, BIEL M. HCN channels: structure, cellular regulation and physiological function[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2009, 66(3):470-494.
- [30] 邓天星. HCN 通道在 D0 大鼠膀胱 ICC 细胞上的表达和电生理特性研究[D]. 重庆:第三军医大学, 2015.
- [31] POPESCU L M, VIDULESCU C, CURICI A, *et al.* Imatinib inhibits spontaneous rhythmic contractions of human uterus and intestine[J]. *Eur J Pharmacol*, 2006, 546(1-3):177-181.
- [32] SANCHO M, TRIGUERO D, LAFUENTE-SANCHIS A, *et al.* Proliferation of interstitial cells in the cyclophosphamide-induced cystitis and the preventive effect of imatinib[J]. *Biomed Res Int*, 2017, 2017:3457093.
- [33] QI W C, FU H J, SUN R R, *et al.* Effectiveness and safety of acupuncture for angina pectoris: an overview of systematic reviews[J]. *Integr Med Res*, 2022, 11(3):100864.
- [34] LI M, NIU J, YAN P, *et al.* The effectiveness and safety of acupuncture for depression: an overview of meta-analyses[J]. *Complement Ther Med*, 2020, 50:102202.
- [35] DRUMM B T, HANNIGAN K I, LEE J Y, *et al.*  $Ca^{2+}$  signalling in interstitial cells of Cajal contributes to generation and maintenance of tone in mouse and monkey lower oesophageal sphincters[J]. *J Physiol*, 2022, 600(11):2613-2636.
- [36] HUIZINGA J D, HUSSAIN A, CHEN J H. Interstitial cells of Cajal and human colon motility in health and disease[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2021, 321(5):G552-G575.