

# 五苓散对骶髓损伤后神经源性膀胱大鼠膀胱组织 NGF/TrkA信号通路的影响

张琳,王杨,刘铭泽,王振亮

(河南中医药大学,河南 郑州 450046)

**摘要:**目的 观察五苓散对骶髓损伤后神经源性膀胱大鼠膀胱组织中神经生长因子(NGF)及其受体(TrkA)信号通路的影响,探讨五苓散改善骶髓损伤休克期后逼尿肌无反射型膀胱功能的可能机制。方法 将60只雌性SD大鼠按随机数字表法分为假手术组( $n=10$ )和造模组( $n=50$ )。假手术组仅咬除椎板不横断脊髓,造模组采用改良的Hassan Shaker脊髓横断法建立骶髓损伤大鼠模型,选取32只造模成功的大鼠随机分为模型组和五苓散高、中、低剂量组,每组8只。中药治疗组从造模后第15天予以五苓散灌胃治疗,1次/d,连续治疗14 d。干预结束后取材,HE染色法观察膀胱组织病理形态学变化,免疫组织化学法检测膀胱组织NGF、TrkA的表达,Western blot法检测NGF、TrkA蛋白表达,实时荧光定量PCR法测定NGF、TrkA mRNA表达。结果 模型组和五苓散高、中、低剂量组大鼠膀胱NGF、TrkA阳性表达、蛋白和mRNA相对表达量,与假手术组相比升高( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ );五苓散中、高剂量组膀胱逼尿肌NGF、TrkA阳性表达、蛋白及mRNA表达水平较模型组升高( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),其中五苓散高剂量组显著升高( $P<0.01$ );与低剂量组比较,五苓散高剂量组的阳性表达、蛋白和mRNA表达量显著升高( $P<0.01$ );与五苓散中剂量比较,高剂量组阳性表达、蛋白和mRNA表达有所增加( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。结论 五苓散改善骶髓损伤后神经源性膀胱大鼠膀胱功能,其机制可能与五苓散上调膀胱组织NGF、TrkA表达,激活NGF/TrkA信号通路,帮助逼尿肌收缩相关。

**关键词:** 五苓散; 神经源性膀胱; NGF; TrkA; 逼尿肌

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1673-842X(2024)10-0035-06

## Effect of Wuling Powder (五苓散) on the NGF/TrkA Signaling Pathway in Bladder Tissue of Rats with Neurogenic Bladder after Sacral Cord Injury

ZHANG Lin, WANG Yang, LIU Mingze, WANG Zhenliang

(Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, Henan, China)

**Abstract: Objective** To observe the effect of Wuling Powder (五苓散) on the nerve growth factor (NGF)/ and its receptor (TrkA) signaling pathway in bladder tissue of neurogenic bladder rats with sacral cord injury, and to explore the possible mechanism of Wuling Powder improving the non reflex bladder function of detrusor muscle after shock phase of sacral cord injury. **Methods** Sixty female SD rats were randomly divided into a sham surgery group ( $n=10$ ) and a modeling group ( $n=50$ ) using a random number table method. The modeling group used the improved Hassan Shaker spinal cord transection method to establish a rat model of sacral cord injury. 32 successfully modeled rats were randomly divided into a model group and a high, medium, and low dose group of Wuling Powder, with 8 rats in each group. The traditional Chinese medicine treatment group was treated with Wuling Powder by gavage from the 15th day after modeling, once a day, for 14 consecutive days. After the intervention, samples were collected and HE staining was used to observe the pathological changes in the bladder detrusor tissue. Immunohistochemical staining was used to detect the expression of NGF and TrkA in the detrusor muscle. Western blot was used to detect the relative expression levels of NGF and TrkA proteins in the detrusor muscle, and real-time fluorescence quantitative PCR was used to determine the mRNA expression of NGF and TrkA. **Results** The positive expression of NGF and TrkA, as well as the relative expression of protein and mRNA in the bladder of rats in the model group, high, medium, and low dose groups of Wuling Powder, were higher than those in the sham operation group ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ); The positive expression levels of NGF and TrkA in the bladder detrusor muscle, as well as protein and mRNA expression levels, were higher in the medium and high dose groups of Wuling Powder compared to the model group ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), with a significant increase in the high-dose group of Wuling Powder ( $P<0.01$ ); Compared with the low-dose group, the positive expression, protein and mRNA expression levels of the high-dose group of Wuling Powder were significantly increased ( $P<0.01$ ); Compared with the medium dose of Wuling Powder, the high dose group showed an increase in positive expression, protein and mRNA expression ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). **Conclusion** Wuling Powder can improve bladder function in rats with neurogenic

基金项目: 郑州市协同创新专项(2023XTCX049)

作者简介: 张琳(1999-),女,河南周口人,硕士在读,研究方向: 仲景理法方药的临床应用。

通讯作者: 王振亮(1965-),男,河南林州人,教授、主任医师,博士,研究方向: 仲景理法方药辨治风湿免疫系统疾病。

bladder after sacral cord injury, and its mechanism may be related to the upregulation of NGF and TrkA expression in the detrusor muscle, activation of the NGF/TrkA signaling pathway, and assistance in detrusor muscle contraction.

**Keywords:** Wuling Powder (五苓散); neurogenic bladder; NGF; TrkA; detrusor muscle

神经源性膀胱(neurogenic bladder, NB)是由于中枢神经系统或周围神经受损而引发的下尿路功能障碍,病因多样<sup>[1]</sup>。脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)是其常见病因,约有70%~84%的SCI患者会出现NB<sup>[2]</sup>。SCI后NB患者易出现膀胱尿道反流、上尿路损伤或感染、肾积水、尿路结石,严重者还会导致肾功能损害和终末期肾病,造成患者死亡<sup>[3]</sup>,其肾衰风险为一般成年人的5倍<sup>[4]</sup>。在SCI中,泌尿系统的排尿反射异常和膀胱功能障碍取决于损伤程度和损伤所在水平的不同<sup>[5]</sup>。骶上病变的特征即逼尿肌(DSM)过度活动或DSM括约肌协同障碍,而骶髓病变通常与DSM活动不足产生的尿潴留有关,其典型表现为DSM无反射,膀胱容量增大,尿液无法排出等。SCI后神经源性膀胱功能障碍是一种难治性疾病,通常不可逆,此乃世界范围内的主要医学难题之一<sup>[6]</sup>。下尿路功能的恢复为SCI后NB的治疗重心,现代医学多采用间歇导尿管插入术<sup>[7]</sup>、口服药物<sup>[8]</sup>、手术治疗<sup>[9]</sup>、神经调控<sup>[10]</sup>以及电刺激疗法<sup>[11]</sup>等,但因对其机制知之甚少,远期效果并不十分理想,存在毒副作用大、不良反应多、患者预后不佳等问题<sup>[12]</sup>。中医治疗以针灸和中药为主要手段,临床研究表明<sup>[13-16]</sup>五苓散单用或联合他法治疗尿潴留疗效确切,能明显改善患者尿潴留症状。中药具有疗效确切、成本低廉,无明显不良反应等优势,探索中药治疗SCI后NB,对于提高患者生活质量、重建患者的膀胱功能及降低病死率具有重要意义。

大量研究表明,神经生长因子(NGF)能促进SCI后神经损伤的修复,NGF与其与高亲和力受体(TrkA)和低亲和力受体(p75NTR)相互作用参与神经元存活<sup>[17]</sup>。靶点来源的NGF与交感神经和感觉神经元轴突末端质膜上的TrkA结合,并激活TrkA信号转导途径。它的诱导内吞作用形成NGF/TrkA信号内体,并沿着轴突启动逆行运输和信号转导到体细胞,信号转导持续激活神经元存活所必需的靶基因表达<sup>[18]</sup>。本实验选择腰(L)2~3水平脊髓损伤的大鼠,在脊髓休克期后予以五苓散治疗,观察大鼠膀胱组织NGF、TrkA的表达情况,初步探讨五苓散能否通过NGF/TrkA信号通路调节逼尿肌收缩。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

60只SD大鼠,雌性,SPF级,体质量180~220 g,8周龄,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供, [实验动物生产许可证号:SCXK(京)2021-0006]。于河南中医药大学动物实验中心饲养,温度(22±2)℃,湿度45%~65%,12 h昼夜光照交替,动物自由进水、进食,适应性喂养1周后进行实验。本实验通过河南中医药大学实验动物福利伦理委员会审核批准(审批编号: IACUC-202302037)。

### 1.2 主要试剂与仪器

实验试剂:NGF抗体(abclonal公司,货号

A14216)、TrkA抗体(abclonal公司,货号A15618); PBS缓冲液(G0002)、TBS缓冲液(G0001-2L)、PVDF膜(WGPVDF45)、RIPA裂解液(G2002-100ML)、引物(G3320)、BCA蛋白定量检测试剂盒(G2026)、苏木素染液(G1004)、DAB显色剂(G1212)、HRP标记的IgG二抗(GB23303)、RNA提取液(G3013)、超敏ECL化学发光试剂盒(Servicebio,10006818);硫酸庆大霉素注射液(哈药集团制药总厂,货号QDMS002);三氯乙醛(麦克林,批号C804539);创易合苦味喷剂(法国维克);异丙醇(货号80109218)、无水乙醇(货号10009218)、三氯甲烷(货号10006818)、氯化钠注射液(国药集团化学试剂有限公司,批号LS2021)。

实验仪器:酶标仪(Rayto,型号RT-6100),荧光定量PCR仪(Bio-rad,货号CFX Connect),台式高速冷冻离心机(DRAGONLAB,型号D3024R),转印电泳仪(SVT-2),研磨仪(Servicebio, KZ-III-FP),PCR仪(北京东胜创新生物科技有限公司,货号ETC811),脱色摇床(Servicebio,型号DS-3D100)。

## 1.3 方法

### 1.3.1 动物模型复制及术后护理

参照Hassan Shaker<sup>[19-22]</sup>脊髓横断法。造模前1 d禁食大鼠,术前2 h腹腔注射0.2 mL的硫酸庆大霉素。以10%水合氯醛(300 mg/kg)腹腔注射进行麻醉,于大鼠腰背部脱毛,俯卧位固定并备皮、消毒,注意手术过程无菌操作。具体步骤:将L2节段作为定位点,沿后正中中线纵向剪开2~3 cm,然后逐层分离筋膜和肌肉。剪开皮下浅筋膜和深筋膜,找到L2棘突位置后剔除两侧竖脊肌,暴露L2、L3椎体的棘突和椎板。放入撑开器扩大视野并固定脊柱两侧肌肉,手术剪剔除L2、L3棘突间肌肉。关键点和难点即使用咬骨钳咬除L2椎板,使硬脊膜完全暴露,脊髓露出,过程中避免损伤附近神经组织。然后左手用玻璃分针将S2~3节段脊髓从底部慢慢勾出,右手随即剪断脊髓,且反复刮扫以避免神经纤维残留,确保L2~L3椎间隙处脊髓彻底横断。等充分止血后先缝合肌肉、筋膜,后缝合皮肤,滴0.2 mL硫酸庆大霉素防止感染,并用碘伏消毒伤口附近。

术后前3 d每日2次腹腔注射硫酸庆大霉素预防感染,0.2 mL/次;若有大鼠出现脓尿、血尿,仍注射硫酸庆大霉素直至尿液澄清。以Crede法人工辅助大鼠排尿每日2次,注意手法和力度。另外因手术后大鼠下肢感觉缺失,在其后肢喷苦味喷剂防止自噬。骶髓损伤后DSM无反射型大鼠模型造模成功的标准为:大鼠后肢无法行走呈拖动爬行,膀胱胀大充盈且出现尿潴留。

### 1.3.2 药物制备

所有中药均由河南中医药大学第一附属医院提供,参照《伤寒论》和《中华人民共和国药典》的记载配制五苓散成散剂:泽泻250 g,茯苓150 g,猪苓150 g,白术150 g,桂枝100 g。根据Meerh-Rubner

公式计算实验动物表面积,得出五苓散各组给药剂量分别为:低剂量组0.13 g/mL,中剂量组0.26 g/mL,高剂量组0.52 g/mL。于实验前用纯水配成相应的浓度。

### 1.3.3 取材及处理

灌胃14 d后进行标本采集,麻醉后用手术剪在大鼠下腹部沿正中线作纵向切口,逐层打开腹腔,暴露腹腔后持镊提起膀胱进行摘除,放置冰上用生理盐水冲洗干净,用眼科剪沿膀胱颈将膀胱剪为两部分,将一部分膀胱置于冻存管,液氮速冻后放-80℃低温冰箱保存待用(WB、RT-qPCR检测);另一部分置于4%多聚甲醛固定,放于常温备用,以待组织病理学观察(HE染色、免疫组化)。

### 1.3.4 HE染色观察膀胱组织形态

每组随机选择3只大鼠的膀胱组织,且每只选取两个切片进行HE染色。首先把组织固定在4%的多聚甲醛中24 h,石蜡切片乙醇脱水后,冰冻切片复温固定,将切片放入苏木素染液3~5 min,分化液分化,返蓝液返蓝,流水冲洗,依次放入85%、95%的梯度酒精脱水各5 min,放入伊红染液染色5 min,乙醇脱水,透明处理后封片,最后于显微镜下分析膀胱组织的形态改变。

### 1.3.5 免疫组化法检测膀胱组织NGF、TrkA阳性表达

置各组大鼠切片于二甲苯中脱蜡,梯度酒精水化,高压热抗原修复,3%双氧水溶液室温孵育25 min,阻断内源性过氧化物酶,组化圈内滴加3% BSA,室温封闭30 min。滴加一抗(效价1:1000),4℃孵育过夜,PBS洗片3次,每次5 min。滴加HRP标记的山羊抗兔IgG抗体,室温孵育50 min,PBS洗片3次,每次5 min,于切片滴加DAB显色液,显微镜下显色充分后,及时水冲停止显色;苏木素复染细胞核3 min,流水冲洗,返蓝,水冲,将切片梯度酒精逐级脱水,二甲苯透明,封片胶封片。于显微镜下镜检进行结果判读,苏木素染细胞核为蓝色,阳性为棕黄色反应,并分析NGF、TrkA的平均光密度值。

### 1.3.6 RT-qPCR检测大鼠膀胱组织NGF、TrkA mRNA的表达

取100 mg膀胱组织,充分研磨,提取膀胱组织总RNA,以总RNA为模板,使用Nanodrop 2000检测RNA浓度及纯度,并将浓度稀释为200 ng/ $\mu$ L。逆转录反应体系配制(20  $\mu$ L),反转录为cDNA,qPCR反应体系:2  $\times$  SYBR 7.5  $\mu$ L,2.5  $\mu$ M基因引物1.5  $\mu$ L,cDNA 2  $\mu$ L,无酶水加至4  $\mu$ L;在荧光定量PCR仪上完成扩增:95℃预变性30 s;95℃变性15 s,60℃退火/延伸30 s,共40个循环;65℃ $\rightarrow$ 95℃,每升温0.5℃,采集一次荧光信号。内参为 $\beta$ -actin,用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算NGF、TrkA的mRNA的相对表达量,NGF、TrkA及内参引物序列见表1。

表1 引物序列

基因	引物序列(5'-3')	片段长度/bp
NGF	上游 CATCACTGTGGACCCCAAACCTGT	247
	下游 GTCCGTGGCTGTGCTCTTATCTC	
TrkA	上游 AAGCCTAACCATCGTGAAGAGTG	196
	下游 GAGCCACAATAGGGCACAGG	
GAPDH	上游 CTGGAGAAACCTGCCAAGTATG	138
	上游 GGTGAAGAATGGGAGTTGCT	

### 1.3.7 Western blot法检测大鼠膀胱组织NGF、TrkA蛋白的表达

将冷冻的膀胱组织研磨匀浆,RTPA裂解,进行膀胱组织总蛋白提取;配置BCA蛋白工作液测定蛋白浓度;进行蛋白变性;SDS-PAGE电泳分离目的蛋白,进行电泳至溴酚蓝里最底部大约1 cm终止电泳;采用PVDF膜转膜30 min,转印完的膜在TBST的孵育槽中涮洗,封闭30 min;根据一抗说明书进行稀释,分别加入NGF、TrkA(1:500稀释)和 $\beta$ -Actin(1:2000稀释)的一抗,4℃孵育摇床过夜;孵育结束,TBST洗3次,每次5 min;把山羊抗兔二抗用TBST按1:5000稀释,室温孵育30 min;孵育结束,TBST洗5 min $\times$ 3次;ECL显色曝光;最后显影得到结果。软件分析NGF、TrkA和内参 $\beta$ -Actin蛋白的灰度值,两者灰度比值为NGF、TrkA的相对表达量。

### 1.4 统计学处理

数据使用SPSS 26.0统计软件进行分析。若计量资料符合正态分布,则以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,比较用单因素方差分析;若方差齐,进一步两两比较用LSD-t检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 五苓散对大鼠膀胱组织形态的影响

模型组细胞结构紊乱,水肿明显,黏膜上皮细胞疏松且厚薄不均,可见少量血管扩张,广泛固有层及肌层异常出血,肌层排列不规则,大量中性粒细胞浸润;假手术组膀胱组织结构完整,逼尿肌细胞大小一致,上皮细胞分布均匀,纤维和肌束之间层次清晰,各层细胞形态正常,无细胞空泡或炎症细胞浸润,无血管充血、破裂;五苓散低剂量组黏膜上皮细胞大面积增生,胞质疏松、脱落且多处坏死,胞核固缩、碎裂,少量粒细胞浸润,固有层多灶性水肿,少量血管扩张,偶见中度出血,结缔组织有炎症细胞浸润,肌层排列不规则;中剂量组可见多量黏膜上皮细胞增生,胞质疏松,少量血管扩张,肌层排列不规则,未见明显出血、炎症细胞浸润等异常;高剂量组少量黏膜上皮细胞疏松、脱落,肌层排列规则,未见明显出血、炎症细胞浸润等异常。见封三图1。

### 2.2 五苓散对大鼠膀胱组织免疫组化的影响

假手术组阳性反应表达较弱,与假手术组比较,模型组TrkA有一定程度的升高( $P<0.05$ ),模型组的NGF阳性反应表达较高( $P<0.01$ ),而五苓散高、中、低组NGF、TrkA的平均光密度值(MOD)明显升高( $P<0.01$ );与模型组比较,五苓散中剂量组NGF、TrkA MOD较高( $P<0.05$ ),高剂量组表达量明显升高( $P<0.01$ ),而低剂量组差异无统计学意义( $P>0.05$ );与低剂量组相比,高剂量组MOD升高( $P<0.01$ ),中剂量组( $P>0.05$ );与中剂量组相比,高剂量组MOD升高( $P<0.05$ )。见表2、封三图2—图3。

表2 各组大鼠NGF与TrkA阳性表达的平均光密度值(MOD)

组别	n	NGF MOD	TrkA MOD
高剂量组	3	0.0144 $\pm$ 0.0021*** $\Delta\Delta\Delta$	0.0395 $\pm$ 0.0026*** $\Delta\Delta\Delta$
中剂量组	3	0.0114 $\pm$ 0.0019**	0.0308 $\pm$ 0.0035**
低剂量组	3	0.0094 $\pm$ 0.0008**	0.0259 $\pm$ 0.0029**
模型组	3	0.0083 $\pm$ 0.0005**	0.0230 $\pm$ 0.0038*
假手术组	3	0.0037 $\pm$ 0.0005	0.0164 $\pm$ 0.0017

注:\*\*与假手术组比较, $P<0.01$ ; $\#$ 与模型组比较, $P<0.05$ ; $\Delta\Delta$ 与低剂量组比较, $P<0.01$ ; $\Delta$ 与中剂量组比较, $P<0.05$ 。

2.3 各组大鼠膀胱组织 NGF、TrkA mRNA 相对表达量比较

假手术组,模型组,五苓散高、中、低剂量组 NGF、TrkA mRNA 相对表达量比较,通过方差分析,差异有统计学意义( $F=18.162$ 和 $20.172$ 均 $P=0.000$ )。与假手术组比较,模型组的 TrkA mRNA 表达水平有一定的升高( $P<0.05$ ),五苓散各组的 NGF、TrkA mRNA 以及模型组的 NGF mRNA 相对表达量均有显著性统计学意义( $P<0.01$ );与模型组比较,五苓散高剂量组 NGF、TrkA mRNA 以及中剂量组 TrkA mRNA 水平明显升高( $P<0.01$ ),中剂量组 NGF mRNA 表达升高( $P<0.05$ ),而低剂量组差异无统计学意义( $P>0.05$ );与五苓散低剂量组比较,高剂量组 NGF、TrkA mRNA 相对表达量升高( $P<0.01$ ),中剂量组差异不显著( $P>0.05$ );与中剂量组比较,高剂量组 NGF、TrkA mRNA 相对表达量升高( $P<0.05$ )。见表3。

表3 各组大鼠 NGF、TrkA mRNA 相对表达量

组别	n	NGF mRNA	TrkA mRNA
高剂量组	5	2.18 ± 0.17***△△▲	2.60 ± 0.42***△△▲
中剂量组	5	1.79 ± 0.31***	2.08 ± 0.35***
低剂量组	5	1.53 ± 0.28**	1.69 ± 0.33**
模型组	5	1.47 ± 0.20**	1.45 ± 0.20*
假手术组	5	1.01 ± 0.12	1.00 ± 0.11

注:\*与假手术组比较, $P<0.05$ ;\*\*与假手术组比较, $P<0.01$ ;#与模型组比较, $P<0.05$ ;##与模型组比较, $P<0.01$ ;△△与低剂量组比较, $P<0.01$ ;▲▲与中剂量组比较, $P<0.05$ 。

2.4 各组大鼠膀胱组织 NGF、TrkA 蛋白相对表达量比较

与假手术组相比,模型组及五苓散高、中、低剂量组 NGF、TrkA 蛋白均明显升高,差异显著( $P<0.01$ );与模型组比较,五苓散中、高剂量组 NGF、TrkA 蛋白表达明显升高( $P<0.01$ ),低剂量组不具有统计学意义( $P>0.05$ );与五苓散低剂量组比较,高剂量组明显升高( $P<0.01$ ),中剂量组不具有统计学意义( $P>0.05$ );与五苓散中剂量组比较,高剂量组具有显著性统计学意义( $P<0.01$ )。见表4。

表4 各组大鼠 NGF、TrkA 蛋白相对表达量

组别	n	NGF	TrkA
高剂量组	4	0.94 ± 0.11***△△▲▲	0.56 ± 0.05***△△▲▲
中剂量组	4	0.71 ± 0.12***	0.42 ± 0.04***
低剂量组	4	0.57 ± 0.12**	0.34 ± 0.08**
模型组	4	0.49 ± 0.06**	0.25 ± 0.09**
假手术组	4	0.28 ± 0.02	0.11 ± 0.02

注:\*\*与假手术组比较, $P<0.01$ ;##与模型组比较, $P<0.01$ ;△△与低剂量组比较, $P<0.01$ ;▲▲与中剂量组比较, $P<0.01$ 。

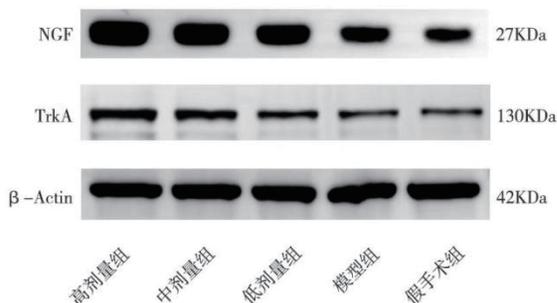


图4 各组大鼠膀胱组织 NGF、TrkA 蛋白表达

3 讨论

中医没有神经源性膀胱的病名,根据骶髓损伤

后的症状可将其归于“癃闭”的范畴。癃闭之名,首见于《内经》,又称“水闭”“胞痹”“小便闭”等,以小便量少、排尿困难甚则闭塞不通为主症<sup>[23]</sup>。《素问·灵兰秘典论篇》记载:“膀胱者,州都之官,津液藏焉,气化则能出矣。”膀胱司开阖,发挥通调水道的功能。《素问·标本病传论篇》言:“膀胱病,小便闭。”其尿液之排与留,全在气之化与不化,化则出,不化则闭。人体尿液的正常排出依赖膀胱气化作用,膀胱气化失司是导致癃闭的关键<sup>[24]</sup>。本病病位在膀胱,但与肺、脾、肾、三焦等脏腑关系密切。肺为水之上源,通调水道,肃降不及,则不能下输膀胱;脾主升清,为气机升降枢纽,脾虚则不能升清降浊;肾司二便,与膀胱互为表里,肾阳亏虚,则气不化水;三焦疏通水道,三焦失调则水液运行受阻。诸脏腑均可引起膀胱气化失常而形成癃闭<sup>[25]</sup>。而脊髓损伤大多由外伤导致,机械金刃等创伤使血溢脉外,水道瘀阻,经脉堵塞,督脉受损,进而导致阳气亏虚,肺脾肾阳气虚衰,气血运行失常,三焦气化无权,膀胱气化无力,开阖失司,出现小便不利、下腹胀满等症状。故应以温阳化气、利水渗湿为主要治法。五苓散有温阳化气利水之功,为治疗“气化不利,水液内停”的主方。方中重用泽泻为君,《神农本草经》言其有“消水”之功,《名医别录》更是直言其能“逐膀胱三焦停水”,引领诸药直趋下焦肾与膀胱;辅以味甘平的茯苓、猪苓,均能“利小便”“利水道”,增其渗利之功;白术健脾运化水湿,固护中焦,且“利腰脐间血”,与茯苓相须为用;膀胱气化亦需阳气蒸腾,佐以桂枝温阳化气以助利水,气化更捷。诸药合用,则津液得以敷布,膀胱气化有节,令膀胱得“气化则能出矣”,自然清升浊降,小便畅利。

正常的排尿过程需要大脑和脊髓以及膀胱和尿道之间的神经元回路的协调。骶排尿中枢(S2~S4)、脑桥排尿中枢和大脑皮层负责促进和抑制排尿。S2~S4 骶髓通过盆腔神经的副交感神经传出物为膀胱提供兴奋性输入<sup>[26]</sup>。骶髓作为低位排尿中枢,该段中枢损伤会导致骶髓初级排尿中枢受损或其周围神经(副交感和体神经)病变<sup>[27]</sup>,通常与逼尿肌活动不足有关,导致逼尿肌功能减退/反射消失伴括约肌无力。本实验结果表明,骶髓损伤后 NB 大鼠膀胱生理性的 NGF 表达水平有所增加,促进受损神经细胞的修复,但模型组 NGF 及其受体 TrkA 水平仍然较低。说明中枢神经系统受损会增加 NGF 的分泌,在挽救受损神经元的继发性损伤和死亡方面具有一定作用,且有助于神经纤维再生。若不采取治疗措施,内源性 NGF 的表达量对于中重度损伤远不能达到保护和修复的程度,且时效性短暂<sup>[28]</sup>。使用五苓散干预 2 周后,低剂量组 NGF、TrkA 的阳性表达、蛋白及 mRNA 表达水平与模型组差异不明显,但中、高剂量组表达显著升高,且高剂量组优于中剂量组。证实五苓散高剂量组治疗骶髓损伤后 NB 大鼠效果较好。其作用机制可能与五苓散干预骶髓损伤后 NB 大鼠能诱导膀胱 NGF 的表达,促进 NGF 及其受体 TrkA 表达水平提高有关。五苓散促进受损膀胱神经再生,激发神经元轴突的生长并且刺激产生新的轴突联系,有利于恢复反射通路,加速神经营养因子的传输,提高神经元的存活质量,从

而达到改善尿潴留的效果。

研究发现电针针刺督脉能够改善脊髓损伤大鼠的 BBB 评分结果,上调 NGF、TrkA 因子的表达,进而促进神经细胞的修复<sup>[29]</sup>。ZHANG 等<sup>[30]</sup>证明骶骨电针治疗能提高损伤脊髓局部神经中 NGF/TrkA 和 AKT 信号转导的表达,保护神经细胞,抑制受损脊髓的凋亡,利于受损神经的恢复,同时促进排尿反射的协调,改善 SCI 后 NB 的功能。VIZZARD<sup>[31]</sup>证实急性或慢性环磷酸腺苷诱导的膀胱炎后,膀胱神经营养因子 mRNA 水平显著增加。目前神经生长因子和膀胱功能障碍的关系得到更多的关注,神经营养因子 (NTs) 能够诱导控制膀胱功能的神经元回路发生可塑性变化,使受损的膀胱功能得到修复<sup>[32]</sup>,在神经元存活和再生中起关键作用,包括 NGF、神经胶质细胞源性神经营养因子 (GDNF) 和脑源性神经营养因子 (BDNF)<sup>[33-34]</sup>。NGF 在促使轴突延伸以及刺激外周感觉和交感神经元的生长、分化、存活和维持方面发挥重要作用,对 SCI 后神经功能恢复、重建具有重要意义<sup>[35-37]</sup>。在泌尿系统中,NGF 主要源自膀胱的尿路上皮细胞和平滑肌细胞<sup>[38-39]</sup>。当膀胱功能障碍时,NGF 的水平因炎症或去神经支配而升高<sup>[40]</sup>,并对下尿路功能产生影响。原肌球蛋白相关激酶受体 (Trk) 负责介导 NGF 家族神经营养因子的营养作用,包括 TrkA、TrkB 和 TrkC,但 NGF 对后两者亲和力较低<sup>[41]</sup>。TrkA 受体被赋予激酶活性,这是一种在所有主要 NGF 靶标中鉴定的受体,被 NGF 特异性识别<sup>[42]</sup>。即 NGF 选择性地与高亲和力受体 TrkA 结合参与神经元的存活,通过激活酪氨酸激酶信号传递系统,产生诱导神经细胞合成蛋白和酶,诱导轴突生长等多种生物学功能,由此产生对中枢神经系统的发育、修复及再生等生物效应<sup>[43-46]</sup>。细胞表面 TrkA 受体的激活,引起细胞质结构域中酪氨酸残基的磷酸化,这反过来又募集信号分子并激活涉及 PLC- $\gamma$  1、MAPK 和 PI3K 的多种信号通路,参与神经发生和神经生长因子的保护作用<sup>[47]</sup>。

综上,可以认为五苓散通过调节 NGF/TrkA 信号通路促进膀胱组织细胞修复及进一步增殖,对于交感神经和感觉神经元的存活及轴突树突生长,发挥重要作用,使受损的膀胱功能得到一定程度的改善,从而实现对骶髓损伤后 NB 尿潴留的治疗,为 SCI 后 NB 的治疗提供参考。但本次实验尚无法说明五苓散对 NGF/TrkA 通路的深层次作用机制,且五苓散对骶髓损伤后 NB 逼尿肌 NGF/TrkA 不同时期表达的影响有待进一步研究,后续当深入探讨。◆

#### 参考文献

- [1] 蔡文智,孟玲,李秀云.神经源性膀胱护理实践指南(2017年版)[J].护理学杂志,2017,32(24):1-7.
- [2] 周慧宇,邓欣,双卫兵.脊髓损伤后神经源性膀胱治疗的研究进展[J].泌尿外科杂志(电子版),2020,12(3):6-12.
- [3] GROEN J, PANNEK J, CASTRO DIAZ D, et al. Summary of European Association of Urology (EAU) guidelines on neuro-urology[J]. Eur Urol, 2016, 69(2): 324-333.
- [4] FERREIRA A, NASCIMENTO D, CRUZ CD. Molecular Mechanism Operating in Animal Models of Neurogenic Detrusor Overactivity: A Systematic Review Focusing on Bladder Dysfunction of Neurogenic Origin[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(4): 3273.
- [5] A J WEIN, L R KAVOUSSI, A W PARTIN, et al. Campbell-Walsh Urology Tenth Edition Review[J]. Elsevier Philadelphia, 2011, 65: 351-359.
- [6] REDSHAW JD, LENHERR SM, ELLIOTT S P, et al. Protocol for a randomized clinical trial investigating early sacral nerve stimulation as an adjunct to standard neurogenic bladder management following acute spinal cord injury[J]. BMC Urol, 2018, 18(1): 72.
- [7] VELAER KN, WELK B, GINSBERG D, et al. Time Burden of Bladder Management in Individuals With Spinal Cord Injury[J]. Top Spinal Cord Inj Rehabil, 2021, 27(3): 83-91.
- [8] KRHUTJ, ZACHOVAIR, MIKAD, et al. Efficacy and safety of mirabegron for the treatment of neurogenic detrusor overactivity Prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled study[J]. NeuroUrol Urodyn, 2018, 1: 1-8.
- [9] CHENG PJ, MYERS JB. Augmentation cystoplasty in the patient with neurogenic bladder[J]. World J Urol, 2020, 38(12): 3035-3046.
- [10] CHEN L, LI Y. Efficacy of the magnetic stimulation of sacral nerve roots combined with Tui-na on neurogenic bladder after spinal cord injury: preliminary short-term results[J]. Eur Spine J, 2023, 32(7): 2441-2447.
- [11] 周停,王红星.脊髓损伤后神经源性膀胱电刺激治疗应用进展[J].中华物理医学与康复杂志,2018,40(7):547-550.
- [12] 彭茜,李舍予,安振梅,等.美国泌尿协会症状指数评分在女性 2 型糖尿病神经性膀胱患者中的应用价值研究[J].四川大学学报(医学版),2019,50(4):566-570.
- [13] 王利淑,荆警提,徐超,等.加减五苓散配合穴位中频电刺激对老年髋部骨折术后尿潴留的护理观察[J].当代护士(下旬刊),2019,26(4):107-108.
- [14] 侯梓桐,刘桂荣.国医大师张志远教授对五苓散的临床应用经验[J].中国中医药现代远程教育,2017,15(22):84-86.
- [15] 张茜,石玉生,李正飞,等.五苓散配合腹部推拿治疗脊髓损伤后尿潴留临床研究[J].河北中医,2019,41(12):1815-1818.
- [16] 刘玉玲,李艳芳,左学洁.加味五苓散防治产后尿潴留的临床疗效观察[J].广州中医药大学学报,2021,38(4):712-716.
- [17] YAN T, ZHANG Z, LI D. NGF receptors and PI3K/AKT pathway involved in glucose fluctuation-induced damage to neurons and  $\alpha$ -lipoic acid treatment[J]. BMC Neurosci, 2020, 21(1): 38.
- [18] MARLIN MC, LI G. Biogenesis and function of the NGF/TrkA signaling endosome[J]. Int Rev Cell Mol Biol, 2015, 314: 239-257.
- [19] 罗静,邓石峰,余雨荷,等.完全性骶髓损伤后大鼠神经源性膀胱模型的制备与观察[J].中国康复,2022,37(7):387-391.
- [20] 卢壮,黄钰岚,阮成志,等.电针对骶髓损伤后神经源性膀胱尿潴留大鼠尿动力学的影响和机制研究[J].检验医学与临床,2020,17(19):2841-2845,2849.
- [21] 李正飞,张任,赵国瑞,等.电针通过增强 AMPK/mTOR 通路介导的自噬治疗神经源性尿潴留[J].中南大学学报(医学版),2022,47(4):488-496.
- [22] 李冰,王永福,任亚锋,等.艾灸对骶髓损伤后逼尿肌无反射型神经源性膀胱大鼠膀胱组织 M2、P2X3 受体的影响[J].中国针灸,2022,42(3):291-297.
- [23] 吴勉华,石岩.中医内科学[M].北京:中国中医药出版社,2021:290.
- [24] 邝雪辉,康玉闻.电温针八髎穴治疗脊髓损伤后神经源性膀胱的临床观察[J].中国中医急症,2018,27(11):2017-2020.
- [25] 陈荣良,全仁夫.脊髓损伤后尿潴留的针灸治疗进展[J].医学综述,2011,17(23):3627-3629.
- [26] TAWHEEL WA, SEYAM R. Neurogenic bladder in spinal cord injury patients[J]. Res Rep Urol, 2015, 7: 85-99.
- [27] 李景兴,张泓,艾坤,等.电针对骶髓损伤后神经源性膀胱容量及其组织形态学的影响[J].中国组织工程研究,2013,17(50):8697-8702.
- [28] WIDENFALK J, LUNDSTRÖMER K, JUBBRAN M, et al. Neurotrophic factors and receptors in the immature and adult spinal cord after mechanical injury or kainic acid[J]. J Neurosci, 2001, 21(10): 3457-3475.
- [29] 熊义合,周宾宾,夏伟华,等.电针干预脊髓损伤大鼠督脉脊髓受损节段的神经营养因子 NGF、TrkA 的表达[J].四川中医,2022,40(8):42-46.

# 灵芝多糖对葡聚糖硫酸钠诱导小鼠溃疡性结肠炎的影响

李艾欣, 国立东, 于栋华, 于静文, 于肇麒, 于纯森

(黑龙江中医药大学, 黑龙江 哈尔滨 150040)

**摘要:** **目的** 探究灵芝多糖(GLP)对葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导的小鼠溃疡性结肠炎(UC)的影响。**方法** 36只雄性KM小鼠随机分为正常组、模型组、美沙拉秦组和灵芝多糖低、中、高剂量组,每组6只。灵芝多糖低、中、高剂量组分别灌胃50、100、200 mg/kg灵芝多糖溶液,美沙拉秦组灌胃300 mg/kg美沙拉秦混悬液,正常组和模型组灌胃等量生理盐水,持续21 d,每日1次。前14 d,所有小鼠均饮用正常水,后7 d,除正常组外,其他组小鼠均采用自由饮用3% DSS溶液7 d构建UC模型。造模期间记录小鼠体质量并进行疾病活动指数(DAI)评分;取材后测量小鼠结肠长度并称重;HE染色法观察小鼠结肠组织病理学变化;ELISA法测定小鼠结肠组织样本中炎症因子TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 、IL-10含量。**结果** 与模型组比较,灵芝多糖中、高剂量组能够在一定程度上延缓体质量下降和DAI上升( $P<0.01$ ),结肠长度显著增加( $P<0.01$ ),结肠重量显著减少( $P<0.01$ ),结肠组织病理学损伤程度减轻,炎性细胞浸润减少,结肠组织中TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 含量显著降低( $P<0.01$ ),IL-10含量显著升高( $P<0.01$ )。**结论** 灵芝多糖对DSS所导致的UC小鼠结肠组织病理损伤具有改善作用,可能与其调控促炎因子和抗炎因子分泌水平的平衡有关。

**关键词:** 灵芝多糖; 溃疡性结肠炎; 葡聚糖硫酸钠; 炎症因子

**中图分类号:** R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-842X(2024)10-0040-05

## Effect of Ganoderma Lucidum Polysaccharides on Dextran Sodium Sulfate induced Ulcerative Colitis in Mice

LI Aixin, GUO Lidong, YU Donghua, YU Jingwen, YU Zhaoqi, YU Chunmiao

(Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, Heilongjiang, China)

**Abstract: Objective** To explore the effect of Ganoderma lucidum polysaccharides (GLP) on dextran

**基金项目:** 黑龙江省自然科学基金项目(LH2022H088); 黑龙江省博士后科研启动金项目(LBH-Q19186)

**作者简介:** 李艾欣(1998-),女,黑龙江绥化人,硕士在读,研究方向:中药保健食品研制与开发。

**通讯作者:** 于纯森(1978-),男,黑龙江哈尔滨人,副教授,博士,研究方向:中药保健食品研制与开发。

- [30] ZHANG T, YU J, HUANG Z, WANG G, 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.
- [31] VIZZARD MA. Changes in urinary bladder neurotrophic factor mRNA and NGF protein following urinary bladder dysfunction[J]. Exp Neurol, 2000, 161(1): 273-284.
- [32] CRUZ CD. Neurotrophins in bladder function: what do we know and where do we go from here?[J]. NeuroUrol Urodyn, 2014, 33(1): 39-45.
- [33] DENK F, BENNETT DL, MCMAHON SB. Nerve Growth Factor and Pain Mechanisms[J]. Annu Rev Neurosci, 2017, 40: 307-325.
- [34] PEZET S, MCMAHON SB. Neurotrophins: mediators and modulators of pain[J]. Annu Rev Neurosci, 2006, 29: 507-538.
- [35] OCHODNICKY P, CRUZ CD, YOSHIMURA N, et al. Neurotrophins as regulators of urinary bladder function[J]. Nat Rev Urol, 2012, 9(11): 628-637.
- [36] HUANG F, DONG X, ZHANG L, et al. The neuroprotective effects of NGF combined with GM1 on injured spinal cord neurons in vitro[J]. Brain Res Bull, 2009, 79(1): 85-88.
- [37] HAJEBRAHIMI Z, MOWLA SJ, MOVAHEDIN M, et al. Gene expression alterations of neurotrophins, their receptors and prohormone convertases in a rat model of spinal cord contusion[J]. Neurosci Lett, 2008, 441(3): 261-266.
- [38] PERSSON K, STEERS WD, TUTTLE JB. Regulation of nerve growth factor secretion in smooth muscle cells cultured from rat bladder body, base and urethra[J]. J Urol, 1997, 157(5): 2000-2006.
- [39] COELHO A, WOLF-JOHNSTON AS, SHINDE S, et al. Urinary bladder inflammation induces changes in urothelial nerve growth factor and TRPV1 channels[J]. Br J Pharmacol, 2015, 172(7): 1691-1699.
- [40] KUO HC, LIU HT, CHANCELLOR MB. Can urinary nerve growth factor be a biomarker for overactive bladder?[J]. Rev Urol, 2010, 12(2/3): e69-e77.
- [41] 何良志, 路凡, 滕飞, 等. NGF/TrkA信号轴在骨关节炎中的研究进展[J]. 中国矫形外科杂志, 2020, 28(11): 933-936.
- [42] HUANG EJ, REICHARDT LF. NEUROTROPHINS: ROLES IN NEURONAL DEVELOPMENT AND FUNCTION[J]. ANNU REV NEUROSCI, 2001, 24: 677-736.
- [43] COSKER KE, SEGAL RA. Neuronal signaling through endocytosis[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2014, 6(2): a020669.
- [44] JOSEPHSON A, WIDENFALK J, TRIFUNOVSKI A, et al. GDNF and NGF family members and receptors in human fetal and adult spinal cord and dorsal root ganglia[J]. J Comp Neurol, 2001, 440(2): 204-217.
- [45] YAMAGUCHI J, AIHARA M, KOBAYASHI Y, et al. Quantitative analysis of nerve growth factor (NGF) in the atopic dermatitis and psoriasis horny layer and effect of treatment on NGF in atopic dermatitis[J]. J Dermatol Sci, 2009, 53(1): 48-54.
- [46] ODERFELD-NOWAK B, ZAREMBA M, LIPKOWSKI AW, et al. High-affinity NGF receptor in the rat spinal cord during acute and chronic phases of experimental autoimmune encephalomyelitis: a possible functional significance[J]. Arch Ital Biol, 2003, 141(2/3): 103-116.
- [47] SKAPER SD. The neurotrophin family of neurotrophic factors: an overview[J]. Methods Mol Biol, 2012, 846: 1-12.