论著

文章编号:1000-5404(2013)18-1936-05

阿米替林对大鼠间质性膀胱炎的治疗作用

李兆飞,徐 晨,邢 菲,姚志勇,王 红 (400016 重庆,重庆医科大学生命科学研究院)

[摘要] **目的** 探索小剂量环磷酰胺长期慢性腹腔注射建立大鼠间质性膀胱炎(interstitial cystitis, IC)模型的方法,并研究阿米替林对IC的治疗作用。**方法** 42只SD大鼠,采用随机数字表法分为7组:对照组,4、48 h模型组,10、30、45 d模型组和治疗组。模型组和治疗组腹腔注射环磷酰胺(cyclophosphamide, CYP)40 mg/kg,治疗组于第31天开始给予阿米替林10 mg/(kg·d)灌胃,持续15 d。观察膀胱组织大体、光镜及电镜形态学表现。通过ELISA检测对照组和30、45 d模型组以及治疗组血清中IL-6、IL-10、IL-17A水平的变化。**结果** 模型组大鼠表现出IC的病理学变化。30、45 d模型组血清中IL-6、IL-10、IL-17A水平均较对照组升高($P<0.05$);治疗组较45 d模型组降低,但高于对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 环磷酰胺小剂量慢性作用可构建大鼠IC模型,阿米替林可以改善IC大鼠的病理学表现。

[关键词] 阿米替林;环磷酰胺;间质性膀胱炎;动物模型;大鼠
[中图法分类号] R-332;R694.3;R979.5 [文献标志码] A

Therapeutic effect of amitriptyline on phenotype-induced interstitial cystitis in rats

Li Zhaofei, Xu Chen, Xing Fei, Yao Zhiyong, Wang Hong (Institute of Life Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To explore a method of establishing interstitial cystitis (IC) in rats by intraperitoneal injection of long-term low-dose cyclophosphamide (CYP), and to determine the therapeutic effects of amitriptyline on IC. **Methods** A total of 42 Sprague Dawley rats were randomly divided into 7 groups, control, 4-hour model group, 48-hour model group, 10-day model group, 30-day model group, 45-day model group and treatment group, with 6 rats in each group. The rats in IC model were treated with intraperitoneal injection of 40 mg/kg CYP once per 3 d. From the 31st day, the rats in treatment group were given intragastrical injection of normal saline containing 10 $mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$ amitriptyline for 15 continuous days. After the rats were sacrificed at the corresponding time points, their bladder was taken for gross observation. The morphological changes of bladder tissue were observed by light microscopy and transmission electron microscopy. And the serum levels of IL-6, IL-10, and IL-17A were detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) in the control group, 30-day model group, 45-day model group and treatment group. **Results** The bladder of the model groups showed the morphological changes as the IC bladder. The levels of IL-6, IL-10, and IL-17A were significantly higher in the serum of 30-day and 45-day model groups than that of normal control ($P<0.05$). But compared with 45-day model group, the levels in the treatment group were decreased ($P<0.05$), but still higher than those of the control group ($P<0.05$). **Conclusion** Long-term low-dose CYP induces IC model in rats. Amitriptyline attenuates the bladder inflammatory responses in IC rats.

[**Key words**] amitriptyline; cyclophosphamide; interstitial cystitis; animal model; rats

Supported by the Key Project of Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2009BA5081). Corresponding author: Xu Chen, Tel: 86-23-68485046, E-mail: xuchen@cqmu.edu.cn

间质性膀胱炎(interstitial cystitis, IC)是一种慢性非细菌性膀胱炎症性疾病,男女均可发病,但好发于女性。临床表现主要为尿频、尿急和/或膀胱区疼痛,且发病机制不明,在临床上诊断和治疗都十分棘手,严重

[基金项目] 重庆市自然科学基金重点项目(CSTC2009BA5081)
[通信作者] 徐 晨,电话:(023)68485046,E-mail:xuchen@cqmu.edu.cn
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130701.0925.008.html(2013-07-01)

影响患者的生活质量。阿米替林是一种三环类抗抑郁药,临床上常联合常规疗法治疗IC患者,能取得良好效果[1-2],但其机理不详。本研究中我们首先确立IC大鼠模型的构建,并探讨阿米替林对IC的保护作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

SPF级SD大鼠42只,雌雄各半,体质量200~250 g[购于重庆医科大学实验动物中心,合格证号:SCXK(渝)20070001]。饲养条件:室内温度20~26 ℃,湿度50%~70%,昼夜节律用日光灯控制,光照12 h/d,自由摄食、水。采用随机数字表法将大鼠分为7组:对照组,4、48 h模型组,10、30、45 d模型组和治疗组。

1.2 动物造模

模型组和治疗组动物在乙醚麻醉下,腹腔注射环磷酰胺(美国Sigma公司)40 mg/kg,每3天注射1次。对照组同法注射等量生理盐水。治疗组于第31天开始给予阿米替林10 mg/(kg·d)灌胃,持续15 d。

1.3 膀胱组织取材

分别于动物造模后4、48 h,10、30、45 d取材。采用10%的水合氯醛(3 mL/kg)腹腔麻醉大鼠后,心脏穿刺取血并制备血清,剪开大鼠下腹部,取大鼠膀胱组织。

1.4 大体病理学观察

切除膀胱后称量,观察膀胱大体形态,并剖开膀胱观察其黏膜水肿充血出血情况。

1.5 光学显微镜观察

取各组大鼠2/3部分膀胱组织,4%的多聚甲醛固定24 h,常规酒精梯度脱水,二甲苯透明,石蜡包埋切片,切片厚4 μm,HE染色中性树脂封片后,光学显微镜下观察各组膀胱组织结构的组织病理学变化并拍照,利用北航CM-2000生物医学图像分析系统测量各组膀胱壁厚度。

1.6 透射电镜观察

取各组大鼠1/3部分膀胱组织,4%戊二醛4 ℃固定过夜,1%四氧化锇后固定,常规乙醇丙酮梯度脱水,环氧树脂包埋,0.5 μm厚半薄切片定位后再制备60 nm超薄切片,枸橼酸铅染色,Hitachi-7500透射电镜观察。

1.7 ELISA检测血清中IL-6、IL-10、IL-17A

ELISA试剂盒购于上海沪尚生物科技有限公司,测定方法及步骤按说明书进行操作。IC属慢性病程,因此,本实验检测30、45 d模型组、治疗组血清中IL-6、IL-10、IL-17A的水平。

1.8 统计学分析

采用SPSS 17.0统计软件,数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 膀胱大体形态及膀胱湿质量/体质量

2.1.1 大体形态 与对照组比较,4、48 h模型组大鼠膀胱表现为水肿、充血;10 d模型组膀胱黏膜面见出血点,30、45 d模型组膀胱壁增厚、变硬;治疗组膀胱变硬。

2.1.2 湿质量/体质量 与对照组比较,各模型组膀胱湿质量明显增加,各模型组膀胱湿质量/体质量增加,其中4 h、48 h、30 d和45 d模型组大鼠膀胱湿质量/体质量与对照组比较差异有显著性($P<0.05$)。与45 d模型组比较,治疗组膀胱湿质量和湿质量/体质量呈下降趋势,差异无统计学意义($P>0.05$)。见表1。

表1 各组大鼠膀胱湿质量及湿质量/体质量($n=6$, $\bar{x} \pm s$)

组别	膀胱湿质量(g)	膀胱湿质量/体质量(‰)
对照组	0.084 4±0.014 7	0.452 2±0.047 5
4 h模型组	0.125 0±0.016 7[a]	0.599 8±0.074 2[a]
48 h模型组	0.143 4±0.024 9[a]	0.637 0±0.120 2[a]
10 d模型组	0.114 3±0.017 8[a]	0.522 4±0.043 6
30 d模型组	0.140 0±0.029 7[a]	0.588 6±0.128 2[a]
45 d模型组	0.131 7±0.027 9[a]	0.612 4±0.079 1[a]
治疗组	0.120 0±0.015 8[a]	0.516 3±0.069 9

a: $P<0.05$,与对照组比较

2.2 光镜下膀胱组织形态变化及膀胱壁厚度测定

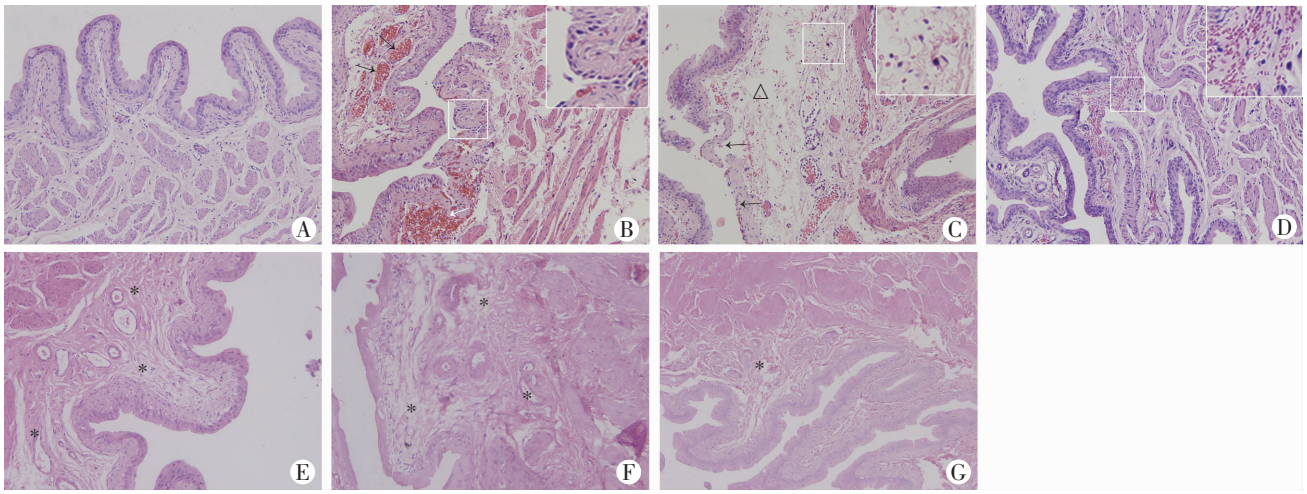
2.2.1 膀胱组织病理学变化 对照组膀胱黏膜上皮完好,细胞排列整齐,无炎症细胞浸润,固有层无水肿,黏膜下未见毛细血管扩张充血及出血,未见炎症细胞浸润,肌层无纤维化(图1A)。4 h模型组膀胱可查见局灶黏膜下出血及黏膜上皮脱落,黏膜下层出现水肿,毛细血管扩张充血,血管周见散在肥大细胞(图1B)。48 h模型组黏膜上皮脱落明显(图1C),黏膜下层水肿明显,肥大细胞浸润增多。10 d模型组见黏膜下层仍有局灶性水肿和出血(图1D)。30 d模型组肌层开始出现纤维化,肥大细胞少见(图1E)。45 d模型组膀胱间质纤维化明显增多,肥大细胞少见(图1F)。治疗组膀胱上皮较完好,黏膜下层胶原纤维增生(图1G)。

2.2.2 膀胱壁厚度测量结果 造模后4 h膀胱壁厚度开始增加,随时间的延长,膀胱壁厚度增加明显,与对照组比较差异有统计学意义($P<0.05$)。与45 d模型组比较,治疗组膀胱壁厚度变薄,但仍高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表2、图2。

表2 各组膀胱壁厚度(μm, $n=6$, $\bar{x} \pm s$)

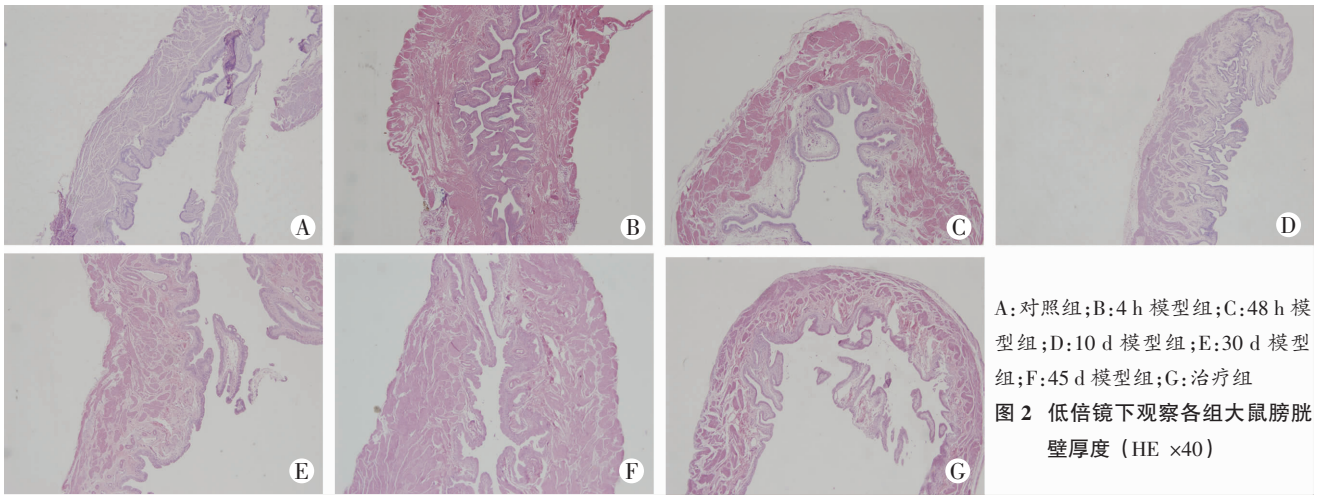
组别	膀胱壁厚度
对照组	85.919 2±13.529 6
4 h模型组	121.096 5±6.369 3[a]
48 h模型组	126.145 7±4.362 3[a]
10 d模型组	113.779 0±5.561 1[ac]
30 d模型组	139.762 1±15.234 4[abcd]
45 d模型组	155.554 8±6.851 6[abcde]
治疗组	120.120 8±21.048 4[af]

a: $P<0.05$,与对照组比较;b: $P<0.05$,与4 h模型组比较;c: $P<0.05$,与48 h模型组比较;d: $P<0.05$,与10 d模型组比较;e: $P<0.05$,与30 d模型组比较;f: $P<0.05$,与45 d模型组比较



A:对照组 膀胱黏膜上皮完好,上皮细胞排列整齐;B:4 h模型组 放大方框为局灶膀胱黏膜上皮脱落,白色箭头示出血灶,黑色箭头示黏膜下血管扩张充血;C:48 h模型组 三角形示黏膜下水肿出血,箭头示黏膜上皮脱落,方框为炎症细胞;D:10 d模型组 方框为局部出血灶,其中见散在肥大细胞;E、F:分别为30 d和45 d模型组 * 示为胶原纤维;G:治疗组 上皮细胞较完好,* 示为胶原纤维

图1 各组大鼠膀胱组织病理变化 (HE ×200)



A:对照组;B:4 h模型组;C:48 h模型组;D:10 d模型组;E:30 d模型组;F:45 d模型组;G:治疗组

图2 低倍镜下观察各组大鼠膀胱壁厚度 (HE ×40)

2.3 膀胱超微结构观察

对照组膀胱黏膜上皮自上而下依次由伞状细胞、中间细胞和基底细胞组成,相邻伞状细胞之间存在紧密连接(图3A)。4 h模型组,膀胱上皮部分伞状细胞顶部细胞膜不连续(图3B),细胞之间连接复合体消失,细胞质内可见髓样结构形成;肌层中可见脱颗粒的肥大细胞(图3C),平滑肌细胞中可见线粒体肿胀,髓样结构形成。48 h模型组,上皮细胞间隙增宽,局部伞状细胞坏死脱落,甚至累及基底细胞层,中间细胞内质网扩张(图3D)。10 d模型组,伞状细胞内线粒体嵴内间隙肿胀(图3E),见脱颗粒肥大细胞,肌层有坏死。30 d模型组,肌层间质中胶原纤维增多,甚至出现坏死,形成髓样结构,肌细胞细胞质中见髓样结构及线粒体肿胀(图3F)。45 d模型组,黏膜下层和肌层胶原纤维增多,甚至肌层出现坏死,形成髓样结构,部分平滑肌细胞细胞核异染色质边集,线粒体肿胀(图3G)。治疗组,上皮形态较完好,细胞间紧密连接形态正常,黏膜下层胶原纤维增多(图3H)。

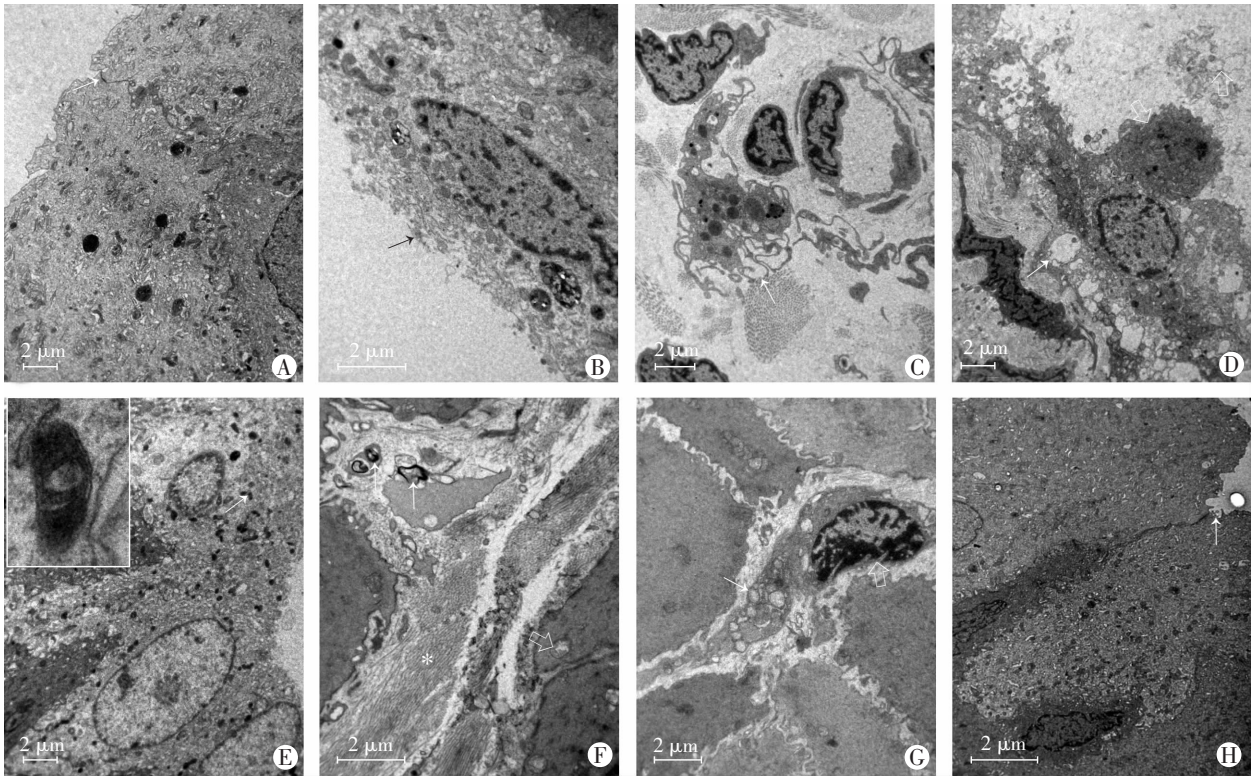
2.4 血清中IL-6、IL-10、IL-17A水平

与对照组比较,30、45 d模型组、治疗组血清中IL-6、IL-10、IL-17A均明显增加,差异有统计学意义($P<0.05$)。与45 d模型组比较,治疗组血清IL-10水平升高,IL-6、IL-17A水平降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表3。

表3 各组大鼠血清中细胞因子表达水平 (pg/mL, $n=6$, $\bar{x}\pm s$)

组别	IL-6	IL-10	IL-17A
对照组	42.08±6.15	29.64±4.86	9.57±1.50
30 d模型组	71.94±11.09[a]	52.81±13.42[a]	17.51±2.56[a]
45 d模型组	133.09±10.81[ab]	54.24±11.06[a]	30.34±2.48[ab]
治疗组	87.27±7.92[ac]	95.85±10.53[ac]	21.68±1.90[ac]

a: $P<0.05$,与对照组比较;b: $P<0.05$,与30 d模型组比较;c: $P<0.05$,与45 d模型组比较



A:对照组 ↑:紧密连接;B:4 h模型组 ↑:伞状细胞表层破坏;C:4 h模型组 ↑:脱颗粒肥大细胞;D:48 h模型组 ⇧:中间细胞脱落,局部伞状细胞脱落,↑:中间细胞内质网扩张;E:10 d模型组 ↑:线粒体嵴内间隙肿胀,方框为其局部放大;F:30 d模型组 ↑:肌层髓样结构,⇧:线粒体肿胀,*:胶原纤维;G:45 d模型组 ↑:肿胀的线粒体,⇧:异染色质边集;H:治疗组 ↑:紧密连接

图3 透射电镜观察各组大鼠膀胱超微结构

3 讨论

IC是一种慢性疾病,主要表现为长期的盆腔会阴区疼痛、膀胱上皮变薄或形成溃疡、夜尿增多、尿频、尿急和膀胱壁纤维化,目前的治疗方案疗效都十分有限[3-4],是困扰当今泌尿外科医师的一难题。IC发病机制不明确,目前有许多假说对其进行阐述,包括感染学说、上皮功能障碍学说、肥大细胞激活学说、自身免疫炎症学说、神经源性炎症学说等[5],但是没有一种学说能完全解释IC复杂的临床症状。

上皮功能障碍学说是目前比较认可一种学说。正常膀胱移行上皮表面覆盖一层氨基葡聚糖(GAG),GAG层构成了膀胱壁与尿液之间的一道保护屏障,可以防止尿液以及尿液中的有毒成分渗透尿路上皮损伤膀胱组织。而在间质性膀胱炎患者中,膀胱移行上皮均有脱落或形成溃疡,导致膀胱壁GAG层遭到破坏,膀胱上皮功能障碍,引起上皮渗透性增加,以致尿液中的溶质尤其是钾离子渗透入膀胱黏膜下层和肌层,从而产生疼痛、尿频、尿急等临床症状[6]。此外,临床上采用GAG层药物替代疗法,包括膀胱内灌注肝素和透明质酸钠以及口服硫酸戊聚糖[7],均能较好的改善IC患者的症状,这从一定意义上也佐证了IC患者存在着上皮膀胱功能障碍。

目前构建IC动物模型的方法有许多,包括膀胱内灌注硫酸鱼精蛋白、脂多糖、丙烯醛、乙酸等,以及腹腔注射较大剂量的环磷酰胺,但这些方法模拟的大都是急性炎症,不符合IC的慢性病过程。也有学者采用免疫佐剂方法来构建IC动物模型[8-9],但是技术复杂,且费用较高。环磷酰胺是一种抗肿瘤药,在肾脏分解代谢为丙烯醛,通过尿液积聚在膀胱中,环磷酰胺代谢产物对腹腔其他脏器不产生毒性作用,只对膀胱上皮产生毒性作用,从而使膀胱上皮屏障遭到破坏,最终导致炎症反应和内脏痛[4]。目前常用于建立急性出血性膀胱炎动物模型。本研究中,我们选用小剂量环磷酰胺长期腹腔注射来构建IC的病理学变化。膀胱上皮在急性损伤后第3天开始进行自我修复,第5天上皮功能基本恢复[10],所以我们采取每3天腹腔注射1次的方法。

研究[11]表明,IC的病理学变化主要表现为膀胱黏膜上皮部分或全部脱落,炎症细胞浸润,黏膜下有毛细血管充血出血,间质纤维化等,电镜下可见伞状细胞缺如,细胞间隙增宽,肥大细胞脱颗粒。本研究结果表明,小剂量环磷酰胺长期腹腔注射后,大鼠膀胱黏膜上皮脱落,上皮下出现水肿、毛细血管充血出血,肥大细

胞浸润;随着造模时间的延长,膀胱黏膜下层和肌层出现纤维化。电镜结果显示,造模早期,伞状细胞胞膜受到破坏,甚至完全脱落;细胞连接遭到破坏,细胞间隙增宽;膀胱上皮间质中可见脱颗粒的肥大细胞;平滑肌细胞出现线粒体肿胀,髓样结构形成。随造模时间的延长,肌层胶原纤维增多。这与IC的临床病理学变化相符合。同时,我们的研究结果提示,小剂量环磷酰胺可破坏膀胱黏膜上皮紧密连接,导致膀胱黏膜上皮的屏障功能丧失。有研究[12-13]证明,正常尿液中含有的低分子量阳离子毒性溶质或毒性因子对体外培养的膀胱上皮细胞产生明显的毒性作用。在动物实验中,膀胱黏膜层暴露在毒性因子和硫酸鱼精蛋白中,导致膀胱上皮功能缺失[6,12],而膀胱上皮屏障功能的缺失又会导致尿液中溶质尤其是钾离子进入膀胱壁间质中,刺激传入神经纤维敏感性上调,刺激膀胱壁平滑肌收缩,引起下路症状。我们还观察到,在急性期,膀胱间质中脱颗粒肥大细胞增多。研究[14]表明,上皮损伤毒性物质渗透入膀胱壁,刺激感觉神经纤维释放P物质,激活肥大细胞,肥大细胞活化后释放组织胺、白介素等化学介质,又作用于膀胱炎症损伤。本研究中发现,随造模时间的延长,IC模型主要表现为黏膜下层和肌层胶原纤维增多,可致使膀胱容量减少,这可能是IC尿频、尿急症状的一个原因。这与IC晚期表现相同[15],并且纤维化与IC的进展和膀胱壁的慢性炎症相关。给予阿米替林治疗后,其膀胱湿质量/体质量、膀胱壁厚度均有所下降,膀胱上皮细胞形态较正常,但肌层仍见纤维化,提示阿米替林可在一定程度上改善IC模型大鼠膀胱的病理学改变。

细胞因子是炎症反应应答的重要调节机制之一,可调节局部和全身免疫反应。IL-6和IL-17A是促炎性细胞因子,促进炎症反应;IL-10是抗炎性细胞因子,可抑制炎症的发展,也可促进组织的修复和再生。有研究报道,在IC患者中膀胱组织中IL-6高表达。本研究结果显示:与对照组比较,30、45 d模型组、治疗组血清中IL-6、IL-10、IL-17A均明显增加;与45 d模型组比较,治疗组血清IL-10水平升高,IL-6、IL-17A水平降低。这与文献[16]报道三环类抗抑郁药能抑制促炎性细胞因子IL-6、TNF-α等产生,促进抗炎性细胞因子IL-10产生一致。临床上,采用阿米替林联合常规疗法治疗IC患者,能取得较好的疗效。主要作用机制推测是通过拮抗H1受体减少肥大细胞释放炎症介质,抑制5-HT的再摄取,从而改善IC症状[17]。

本实验结果表明,长期腹腔注射小剂量环磷酰胺(40 mg/kg)构建IC动物模型的方法简单可靠,且符合IC慢性病程表现,可为IC的进一步研究提供实验依据。阿米替林可以改善IC模型大鼠膀胱的病理学改变及免疫状态,但具体机制有待进一步研究。有关大鼠尿流动力学、行为学研究以及神经中枢疼痛相关因子和受体差异性表达可在此模型基础上进行,以进一步深入研究阿米替林对环磷酰胺致大鼠IC的治疗效果的分子机制。

参考文献:

[1] 朱绪辉, 杜鹏, 善辉, 等. 阿米替林联合透明质酸钠治疗膀胱疼痛综合征/间质性膀胱炎的临床研究:附58例报告[J]. 临床泌尿外科杂志, 2012, 27(2): 117-120, 123.

[2] 贺大林, 李旭东, 刘润明, 等. 阿米替林与二甲基亚砜治疗间质性膀胱炎的临床研究[J]. 现代泌尿外科杂志, 2009, 14(1): 50-52.

[3] Persu C, Cauni V, Gutue S, *et al*. From interstitial cystitis to chronic pelvic pain[J]. J Med Life, 2010, 3(2): 167-174.

[4] Wantuch C, Piesla M, Leventhal L. Pharmacological validation of a model of cystitis pain in the mouse[J]. Neurosci Lett, 2007, 421(3): 250-252.

[5] Yoost J L, Hertweck S P, Loveless M. Diagnosis and treatment of interstitial cystitis in adolescents[J]. J Pediatr Adolesc Gynecol, 2012, 25(3): 162-171.

[6] Parsons C L. The role of the urinary epithelium in the pathogenesis of interstitial cystitis/prostatitis/urethritis[J]. Urology, 2007, 69(4, Suppl): 9-16.

[7] 肖恒军, 高新. 间质性膀胱炎临床研究进展(二)[J]. 中华腔镜泌尿外科杂志:电子版, 2007, 1(2): 120-122.

[8] Lin Y H, Liu G, Kavran M, *et al*. Lower urinary tract phenotype of experimental autoimmune cystitis in mouse: a potential animal model for interstitial cystitis[J]. BJU Int, 2008, 102(11): 1724-1730.

[9] Altuntas C Z, Daneshgari F, Sakalar C, *et al*. Autoimmunity to uroplakin II causes cystitis in mice: a novel model of interstitial cystitis[J]. Eur Urol, 2012, 61(1): 193-200.

[10] Lavelle J, Meyers S, Ramage R, *et al*. Bladder permeability barrier: recovery from selective injury of surface epithelial cells[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2002, 283(2): F242-F253.

[11] 张卫, 史刚刚, 韩瑞发. 间质性膀胱炎膀胱黏膜组织病理和超微病理的相关研究[J]. 天津医药, 2010, 38(9): 750-753.

[12] Stein P, Rajasekaran M, Parsons C L. Tamm-Horsfall protein protects urothelial permeability barrier[J]. Urology, 2005, 66(4): 903-907.

[13] Parsons C L, Bautista S L, Stein P C, *et al*. Cyto-injury factors in urine: a possible mechanism for the development of interstitial cystitis[J]. J Urol, 2000, 164(4): 1381-1384.

[14] Anand P, Singh B, Jaggi A S, *et al*. Mast cells: an expanding pathophysiological role from allergy to other disorders[J]. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2012, 385(7): 657-670.

[15] Neuhaus J, Schwalenberg T, Horn L C, *et al*. New aspects in the differential diagnosis and therapy of bladder pain syndrome/interstitial cystitis[J]. Adv Urol, 2011, 2011: 639-479.

[16] Chourbaji S, Urani A, Inta I, *et al*. IL-6 knockout mice exhibit resistance to stress-induced development of depression-like behaviors[J]. Neurobiol Dis, 2006, 23(3): 587-594.

[17] 贺大林, 李旭东. 膀胱疼痛综合症/间质性膀胱炎研究进展[J]. 现代泌尿外科杂志, 2009, 14(6): 403-407.

(**收稿**:2013-04-24;**修回**:2013-05-10)

(编辑 吴培红)