Eur J Radiol, 2007, 61(2): 202 -211.
[2] 张秀梅, 严昆, 陈敏华, 等. 原发性肝癌及肝转移癌局部治疗后超声造影表现类型及其诊断价值[J]. 中华医学超声杂志: 电子版, 2009, 6(1): 31 -41.
[3] 郭晓霞, 甄艳华, 王雁. BI-RADS-US 在乳腺肿块超声鉴别诊断中的应用[J]. 中国临床医学影像杂志, 2011, 22(12): 874 -875.
[4] 侯新燕, 高宇, 黄晓玲, 等. 乳腺影像报告数据系统在乳腺超声中的应用[J]. 中华医学超声杂志: 电子版, 2011, 8(6): 1227 -1233.
[5] 江虹虹, 李安华. 肿瘤血管生成与超声造影成像相关性研究进展[J]. 中国医学影像技术, 2007, 23(3): 466 -468.
[6] 钱晓芹, 杨光, 夏泽, 等. 实时超声造影成像结合多普勒血流频谱形态评价乳腺良恶性肿块的血流动力学特性[J]. 中国临床医学影像杂志, 2006, 17(6): 327 -330.
[7] 肖祎炜, 张江宇, 罗葆明, 等. 乳腺肿块超声造影与微血管密度相关性研究[J]. 宁夏医学杂志, 2010, 32(4): 327 -328, 封 2.
[8] 张翠明, 王泽, 聂宏娟, 等. 乳腺肿瘤超声造影与微血管密度相关性的研究[J]. 实用医技杂志, 2009, 16(1): 5 -7.
[9] 赵红佳, 董宝玮, 许荣, 等. 声诺维在乳腺癌早期诊断中的应用价值[J]. 福建中医学院学报, 2009, 19(1): 1 -3.
[10] 许小云, 杜联芳, 李凡, 等. 超声造影在乳腺良恶性肿瘤鉴别诊断中的价值[J]. 中国超声医学杂志, 2008, 24(12): 1076 -1078.
[11] 刘赫, 姜玉新, 刘吉斌, 等. 超声造影增强形式对乳腺病变的诊断价值[J]. 中华超声影像学杂志, 2009, 18(5): 414 -417.
[12] 项霞青, 周锋盛, 陈俊, 等. 乳腺肿瘤实时超声造影增强方式的研究[J]. 临床超声医学杂志, 2011, 13(1): 33 -35.
[13] 尤厚成, 刘健, 尤楠. 超声造影对乳腺良恶性肿块鉴别诊断的价值[J]. 中国普外基础与临床杂志, 2011, 18(8): 861 -865.

(**收稿**:2013-11-15;**修回**:2014-01-17)
(编辑 栾 嘉)

文章编号:1000-5404(2014)13-1433-04

短篇论著

膀胱出口梗阻对逼尿肌收缩力的影响及其与神经支配的关系

封建立,孙道冬,蒙明森,颜加强,刘元丰,康元上,舒 勇,高 瑾,孙丹宁 (400020 重庆,解放军第 324 医院泌尿外科)

[**摘要**] **目的** 观察膀胱出口部分梗阻(partial bladder outlet obstruction,PBOO)不同阶段逼尿肌收缩力及神经纤维密度的改变,探讨 PBOO 对逼尿肌收缩力的影响及其与神经支配的关系。**方法** 近端尿道结扎法建立大鼠 PBOO 模型,实验动物分为 4 组:假手术 6 周组及 8 周组、梗阻 6 周组及 8 周组。通过测定膀胱排尿压及顺应性以及离体逼尿肌条收缩幅度评估逼尿肌收缩力;应用神经递质乙酰胆碱 M 受体阻滞剂阿托品以及激动剂卡巴可观察其对逼尿肌收缩的影响;采用免疫荧光组化法检测逼尿肌神经纤维表达。**结果** 梗阻 6 周组膀胱排尿压[(25.7 ±2.3) cmH_2O]及顺应性[(0.24 ±0.03) mL/cmH_2O]较假手术组排尿压[(18.7 ±1.6) cmH_2O]及顺应性[(0.15 ±0.02) mL/cmH_2O]显著增高($P<0.01$);梗阻 8 周组膀胱排尿压[(10.8 ±1.7) cmH_2O]及顺应性[(0.11 ±0.02) mL/cmH_2O]较假手术组膀胱排尿压[(19.2 ±2.1) cmH_2O]及顺应性[(0.17 ±0.02) mL/cmH_2O]显著降低($P<0.01$)。梗阻 6 周组逼尿肌条收缩幅度较假手术组显著增高[(0.31 ±0.03) g *vs* (0.15 ±0.02) g, $P<0.01$],加入阿托品后逼尿肌条收缩幅度明显降低($P<0.05$),但仍较假手术组高($P<0.01$);梗阻 8 周组逼尿肌条收缩幅度较假手术组显著降低[(0.09 ±0.01) g *vs* (0.16 ±0.02) g, $P<0.01$],加入卡巴可后无明显改善($P>0.05$)。梗阻组逼尿肌中神经纤维密度随梗阻时间延长明显降低($P<0.05$)。**结论** 持续膀胱出口部分梗阻可以导致逼尿肌收缩力呈双向性改变,神经支配在此过程中影响有限,可能主要源于自身肌源性因素改变。

[**关键词**] 膀胱出口部分梗阻;逼尿肌;神经支配
[**中图法分类号**] R334.3; R694.202 [**文献标志码**] A

膀胱出口部分梗阻(partial bladder outlet obstruction,PBOO)是指膀胱颈和近端尿道处各种原因导致的尿液流出道阻力升高,通常继发于良性前列腺增生等疾病。PBOO 可以导致多种膀胱功能障碍性疾病,比如过度活动膀胱(overactive bladder,OAB)、逼尿肌活动低下(detrusor underactive,DU)等,严重影响患者生活质量。目前,PBOO 导致 OAB 或者 DU 的发生机制不清楚,既往国内外对 OAB 研究较多[1-2],DU 研究

[**基金项目**] 重庆市自然科学基金(CSTC2012jjA1566)
[**通信作者**] 封建立, E-mail:f-jianli@163.com
[**优先出版**] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140618.1743.006.html(2014-06-18)

较少[3]，近年来随着DU发病率提高，人们对其关注度逐渐提升。临床尿动力学检查结果表明，前列腺增生患者膀胱功能可以表现为OAB或者DU，其本质上是逼尿肌两种相反的功能状态，因此我们推测其可能系PBOO后不同阶段逼尿肌功能的体现，可以作为整体研究。逼尿肌收缩活动受逼尿肌自身因素及其神经支配的影响。我们前期研究发现PBOO可导致OAB[4]，但OAB后持续梗阻对逼尿肌功能的影响不清楚。我们还发现PBOO后OAB的发生与自身肌源性改变关系密切[5-7]，但对其与神经的关系研究较少。本研究拟通过大鼠PBOO模型观察PBOO后不同阶段逼尿肌收缩力及其神经纤维密度改变情况，同时通过应用乙酰胆碱M受体(muscarinic receptor)阻滞剂及激动剂来观察其对逼尿肌收缩力的影响，探讨PBOO后逼尿肌功能改变特点及其与神经的关系，以期为进一步研究OAB及DU的发生机制打下基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

清洁级健康雌性SD大鼠24只，3月龄，体质量170～200 g，购自第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心。采用近端尿道结扎法建立PBOO动物模型[6]。按随机数字表法分为4组($n=6$)：假手术6、8周组及梗阻6、8周组。假手术组仅分离近端尿道，不结扎。

1.2 主要试剂

兔抗大鼠anti-PGP 9.5(protein gene product 9.5)购自Abcam公司，Alexa 594标记的驴抗兔二抗购自Invitrogen公司，细胞核染料DAPI购自碧云天生物公司，M受体抑制剂阿托品、激动剂卡巴可购自Sigma公司。

1.3 逼尿肌收缩力检测

1.3.1 在体膀胱充盈性测压　将大鼠以25%乌拉坦行腹腔内注射麻醉(1.1 g/kg)，取仰卧位，纵行剖开腹腔，暴露膀胱(梗阻组解除梗阻)，先观察其排尿情况，记录尿量，然后将外径为1 mm的硬膜外导管经尿道外口插入膀胱，轻压腹部，测量残余尿，计算膀胱容量(尿量+残余尿量)。导管经三通管与压力传感器及微量灌注泵相连。灌注速率为0.2 mL/min。检测参数：排尿压(排尿最大压－排尿阈压)、膀胱顺应性(膀胱容量/排尿阈压)。

1.3.2 离体逼尿肌条收缩检测　断颈处死大鼠，于膀胱侧壁切取2 mm×7 mm肌条，置于38 ℃ Krebs溶液中，通以95% O_2和5% CO_2，平衡30 min后将肌条垂直固定于肌槽内，顶端通过张力传感器与电脑连接，通过RM6240生理信号采集处理系统进行记录。测定时为等张收缩，张力为0.3 g，每个肌条检测20～30 min。6周梗阻组检测后依次加入10^{-9}、10^{-7}、10^{-5} mol/L阿托品；8周梗阻组检测后依次加入10^{-9}、10^{-7}、10^{-5} mol/L卡巴可，每次更换孵育液时均以37 ℃空白Krebs液多次冲洗肌条，待肌条的收缩活动恢复平衡后向孵育液中加入下一种浓度药物。

1.4 神经纤维密度检测

1.4.1 逼尿肌组织铺片制作　断颈处死大鼠，结扎双侧输尿管，向膀胱内灌注4%多聚甲醛后结扎膀胱颈。固定10 min后将膀胱取下并浸泡于4%多聚甲醛中常温过夜。于膀胱侧壁剪取约3 mm×4 mm组织，0.1 mol/L PBS中常温过夜，撕去黏膜层、浆膜层以及部分肌层，0.01 mol/L PBS后漂洗后留做免疫组化。

1.4.2 免疫荧光检测神经纤维的表达　将薄层逼尿肌组织片于含1% BSA的0.01 mol/L PBS中封闭1 h，漂洗3次；加入1∶100兔抗大鼠anti-PGP 9.5一抗稀释液，4 ℃孵育过夜；漂洗3次；加入1∶100驴抗兔二抗稀释液，常温避光孵育1 h；漂洗3次；然后于DAPI中常温避光孵育10 min，漂洗3次后将组织片平铺于载玻片上，甘油封片。激光共聚焦显微镜下观察并记录。对照实验以羊血清代替二抗。每个标本检测5个视野，取其平均值。

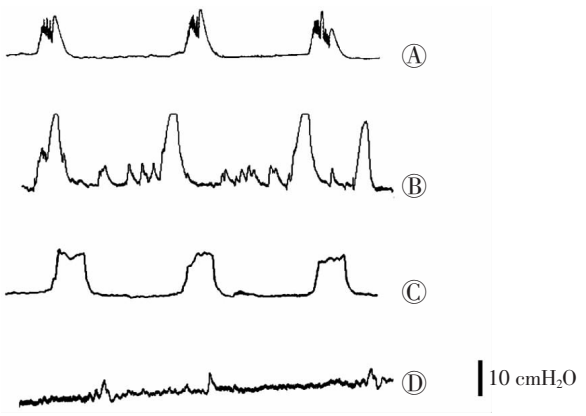
1.5 统计学方法

计量资料以$\bar{x}\pm s$表达，采用SPSS 19.0统计软件进行方差分析及t检验。

2 结果

2.1 膀胱排尿压及顺应性改变

如梗阻不同阶段膀胱充盈性测压曲线(图1)所示，梗阻6周组膀胱排尿收缩幅度(即排尿压)较假手术组明显增高($P<0.01$)；而梗阻8周组排尿收缩幅度较假手术组明显降低($P<0.01$)。梗阻6周组膀胱测压可见较多不稳定收缩，但压力基线平坦，顺应性较假手术组明显增强($P<0.01$)；而梗阻8周组膀胱测压显示压力基线呈明显倾斜向上，顺应性较假手术组明显降低($P<0.01$，表1)。



A：假手术6周组；B：梗阻6周组；C：假手术8周组；D：梗阻8周组

图1 各组大鼠梗阻不同阶段膀胱充盈性测压曲线

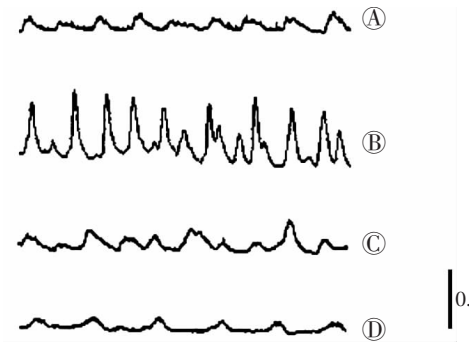
表 1 各组大鼠梗阻不同阶段膀胱排尿压及膀胱顺应性变化($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

组别	排尿压(cmH_2O)	膀胱顺应性(mL/cmH_2O)
假手术 6 周组	18.7 ± 1.6	0.15 ± 0.02
梗阻 6 周组	25.7 ± 2.3[a]	0.24 ± 0.03[a]
假手术 8 周组	19.2 ± 2.1	0.17 ± 0.02
梗阻 8 周组	10.8 ± 1.7[b]	0.11 ± 0.02[b]

a:$P<0.01$,与假手术 6 周组比较; b:$P<0.01$,与假手术 8 周组比较

2.2 离体逼尿肌条收缩功能改变及 M 受体活性对其影响

如离体逼尿肌条等张收缩曲线(图 2)所示,梗阻 6 周组肌条收缩幅度较假手术组明显增大($P<0.01$);加入阿托品后梗阻 6 周组肌条收缩幅度明显降低($P<0.05$),呈剂量依赖性;达到一定浓度后不再降低,但仍高于假手术组($P<0.01$,表 2)。梗阻 8 周组较假手术组肌条收缩幅度明显减小($P<0.01$),加入卡巴可后收缩幅度无明显改善($P>0.05$,表 2)。



A:假手术 6 周组;B:梗阻 6 周组;C:假手术 8 周组;D:梗阻 8 周组

图 2 各组大鼠梗阻不同阶段离体逼尿肌肌条等张收缩曲线

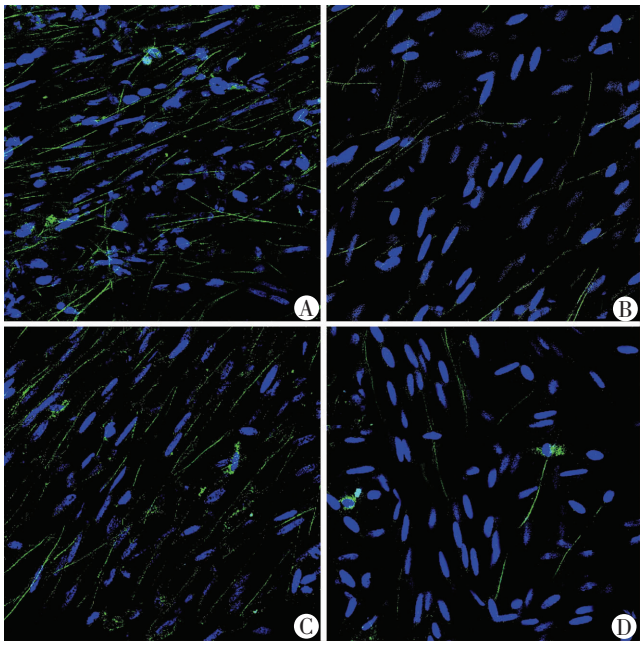
表 2 不同梗阻时间逼尿肌条收缩幅度以及 M 受体活性药物对其影响(g,$n=6$,$\bar{x}\pm s$)

时间	假手术组	梗阻组	阿托品或卡巴可[d]		
			10^{-9} mol/L 组	10^{-7} mol/L 组	10^{-5} mol/L 组
6 周	0.15 ± 0.02	0.31 ± 0.03[a]	0.27 ± 0.03[ab]	0.22 ± 0.02[abc]	0.23 ± 0.02[abc]
8 周	0.16 ± 0.02	0.09 ± 0.01[a]	0.11 ± 0.02	0.09 ± 0.01	0.10 ± 0.01

a:$P<0.01$,与假手术组比较;b:$P<0.05$,与梗阻组比较;c:$P<0.05$,与 10^{-9} mol/L 组比较;d:6 周梗阻组加阿托品,8 周梗阻组加卡巴可

2.3 神经纤维密度表达改变

激光共聚焦显微镜检测结果显示,神经纤维广泛分布于逼尿肌细胞间,走行与肌细胞大致平行。梗阻 6 周组及 8 周组逼尿肌组织中神经纤维密度[分别为(18.36 ± 2.37、9.52 ± 1.59)根/视野]较对应假手术组[(80.45 ± 7.60、79.57 ± 6.90)根/视野]明显减低($P<0.01$)。梗阻 8 周组较梗阻 6 周组亦明显减低($P<0.05$,图 3)。假手术组标本均为阴性。



蓝色为细胞核

A:假手术 6 周组;B:梗阻 6 周组;C:假手术 8 周组;D:梗阻 8 周组

图 3 各组大鼠梗阻不同阶段逼尿肌中神经纤维免疫组织化学荧光染色观察 (×200)

3 讨论

膀胱出口梗阻常常导致 OAB 及 DU 等膀胱功能障碍。根据国际尿控协会定义,OAB 是一种以尿急为特征的症候群,伴或不伴有急迫性尿失禁,尿动力学检查可表现为逼尿肌不稳定。而 DU 是指由于逼尿肌收缩力减弱或者收缩持续时间缩短导致的膀胱排空延迟或者不能完全排空。OAB 和 DU 虽然发病本质不同,但均可导致明显的下尿路症状,甚至严重肾功能损害。目前,OAB 和 DU 还没有统一的诊断标准,主要依据尿流动力学检测结果。治疗方面,OAB 主要是 M 受体阻滞剂以及 α_1 受体阻滞剂,但这些药物有很多副作用,且对一些顽固性 OAB 效果欠佳。DU 的疗法更是有限,现有药物效果有限,亦具有明显的副作用[8]。

膀胱出口梗阻导致 OAB 和 DU 的发病机制目前尚未阐明。我们前期研究发现:①不稳定逼尿肌中细胞间缝隙连接通讯增强[5];②逼尿肌中钙、钾通道等发生改变与过度活动膀胱的发生密切相关[6-7];③大鼠不稳定膀胱中 ICC(interstitial cells of Cajal)样细胞增多,呈网络化趋势[9]。上述结果提示不稳定膀胱的发生跟肌源性因素改变密切相关,但并不排斥神经因素在此过程中的作用。有研究认为,OAB的发生与神

经调节异常有关,但研究结果报道不一[10-11]。目前,学术界对于OAB后持续PBOO对逼尿肌收缩力的影响缺乏系统研究,对于神经因素在PBOO所致逼尿肌收缩力改变过程中的作用亦报道较少。

为系统观察持续PBOO对逼尿肌收缩力的影响以及在此过程中神经因素与逼尿肌收缩力改变的关系,本课题在制作大鼠PBOO模型的基础上,观察不同梗阻阶段逼尿肌收缩力以及逼尿肌神经纤维密度的改变。由于乙酰胆碱M受体是支配逼尿肌的最主要神经递质受体,本课题在梗阻不同阶段还采用M受体激动剂或阻滞剂来观察神经因素改变对逼尿肌收缩力的影响。实验中,我们采用PGP 9.5来标记逼尿肌中神经纤维,其可以与任何有髓或无髓神经纤维结合[12-13]。此外,为更好的反应逼尿肌收缩功能,本实验同时利用在体膀胱充盈性测压实验观察不同梗阻阶段膀胱排尿压及顺应性改变情况,间接反映逼尿肌功能。

本研究结果表明,PBOO后6周膀胱逼尿肌收缩力显著增强,应用M受体阻滞剂虽然可以导致逼尿肌收缩力降低,但增大阻滞剂浓度不能使其降至正常水平,提示此阶段逼尿肌收缩力增强虽然有神经因素的参与,但主要可能还是源于自身肌源性因素的改变。此阶段神经因素参与的具体机制可能与逼尿肌神经纤维密度降低即出现去神经支配后导致M受体代偿性增加,进而导致胆碱能神经超敏有关,但由于M受体代偿数量有限,即使完全阻断其功能,逼尿肌收缩力仍高于正常水平。本研究结果显示,梗阻8周后逼尿肌收缩力显著降低,伴随逼尿肌神经纤维密度明显降低,应用M受体激动剂对逼尿肌收缩力无明显提升作用,其可能机制如下:①逼尿肌失代偿,丧失收缩能力;②神经纤维密度降低的同时M受体表达失代偿,数量明显减少,对激动剂反应减弱;③逼尿肌细胞间信号传导障碍,不能引起有效收缩反应。因此,此阶段逼尿肌收缩力降低的原因可能与神经源性因素及肌源性因素均有关,有待进一步研究。

在既往及本研究结果的基础上,我们推测PBOO导致OAB及DU发生的可能机制如下(其中某些机制可同时或单独出现):PBOO早期,膀胱内压增高,膀胱壁缺血缺氧,导致逼尿肌去神经化,神经受体表达代偿性增多,逼尿肌细胞代偿性肥大、增生,细胞间通讯代偿性增强,相关离子通道表达增加或活性增强,ICC样细胞增多,逼尿肌收缩力增强,进而导致OAB;随着梗阻时间的延长,逼尿肌去神经化进一步加重,神经受体表达失代偿,数量减少,逼尿肌细胞出现失代偿,细胞扭曲、肥大,细胞间通讯受损,相关离子通道表达降低或活性减弱,ICC样细胞减少,最终导致逼尿肌收缩力受损,发生DU。根据该假说,OAB及DU是在PBOO这一致病因素前提下不同阶段的逼尿肌功能表现,其发生过程有神经因素参与,但各个阶段参与的程度可能不同,尤其与PBOO晚期DU发生的关系尚不清楚,需要进一步研究。

参考文献:

[1] Phe V, Behr-Roussel D, Oger-Roussel S, *et al*. Involvement of connexins 43 and 45 in functional mechanism of human detrusor overactivity in neurogenic bladder[J]. Urology, 2013, 81(5): 1108.e1-1108.e6.

[2] Banakhar M A, Al-Shaiji T F, Hassouna M M. Pathophysiology of overactive bladder[J]. Int Urogynecol J, 2012, 23(8): 975-982.

[3] Miyazato M, Yoshimura N, Chancellor M B. The other bladder syndrome: underactive bladder[J]. Rev Urol, 2013, 15(1): 11-22.

[4] 季惠翔, 王永权, 江海红, 等. 膀胱出口梗阻所致逼尿肌过度活动的神经电生理研究[J]. 中华外科杂志, 2010, 48(23): 1781-1784.

[5] Li L, Jiang C, Hao P, *et al*. Changes of gap junctional cell-cell communication in overactive detrusor in rats[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2007, 293(5): C1627-C1635.

[6] Li L, Jiang C, Song B, *et al*. Altered expression of calcium-activated K and Cl channels in detrusor overactivity of rats with partial bladder outlet obstruction[J]. BJU Int, 2008, 101(12): 1588-1594.

[7] Li L, Jiang C, Hao P, *et al*. Changes in T-type calcium channel and its subtypes in overactive detrusor of the rats with partial bladder outflow obstruction[J]. Neurourol Urodyn, 2007, 26(6): 870-878.

[8] Barendrecht M M, Oelke M, Laguna MP, *et al*. Is the use of parasympathomimetics for treating an underactive urinary bladder evidence-based?[J]. BJU Int, 2007, 99(4): 749-752.

[9] 封建立, 李龙坤, 杨景, 等. 不稳定逼尿肌中ICCs细胞与逼尿肌收缩的关系[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(10): 894-896.

[10] Matsumoto Y, Miyazato M, Yokoyama H, *et al*. Role of M2 and M3 muscarinic acetylcholine receptor subtypes in activation of bladder afferent pathways in spinal cord injured rats[J]. Urology, 2012, 79(5): 1184.e15-1184.e20.

[11] Kanai A, Wyndaele J J, Andersson K E, *et al*. Researching bladder afferents-determining the effects of β(3)-adrenergic receptor agonists and botulinum toxin type-A[J]. Neurourol Urodyn, 2011, 30(5): 684-691.

[12] Suganuma S, Tada K, Hayashi K, *et al*. Uncultured adipose-derived regenerative cells promote peripheral nerve regeneration[J]. J Orthop Sci, 2013, 18(1): 145-151.

[13] Bailey J F, Liebenberg E, Degmetich S, *et al*. Innervation patterns of PGP 9.5-positive nerve fibers within the human lumbar vertebra[J]. J Anat, 2011, 218(3): 263-270.

(**收稿**:2014-02-24;**修回**:2014-03-25)

(编辑 龙 亮)