DOI:10.16016/j.1000-5404.201512060

尿源干细胞促进脊髓损伤后神经源性膀胱恢复

张 腾[1],董兴有[1],刘 骞[1],吴 超[1],李 佳[1],夏六兵[1],胡晓燕[1],宋 波[2],邓建平[1],李龙坤[1] (400037 重庆,第三军医大学新桥医院泌尿外科[1];400038 重庆,第三军医大学西南医院全军泌尿外科研究所[2])

[摘要] **目的** 观察大鼠神经源性膀胱模型功能和组织学变化,探索尿源干细胞对大鼠神经源性膀胱的修复治疗作用。**方法** 45 只健康清洁的正常 SD 大鼠按照完全随机法分为正常组、损伤组、干细胞组,每组 15 只。治疗组建模 7 d 后,尾静脉注射尿源性干细胞。28 d 后,尿动力学检测大鼠尿动力各项指标,肌条实验观察膀胱收缩情况,Western blot 观察 P2Y4 在膀胱中的表达,TUNEL 染色观察细胞凋亡情况。**结果** 干细胞组大鼠膀胱湿质量(0.31 ±0.01)g 和膀胱湿质量/体质量值(1.19 ±0.41)、尿动力指标[收缩时间(112.75 ±16.52)s、离体膀胱逼尿肌肌条指标[收缩时间(16.47 ±2.29)s]、膀胱肌细胞凋亡率(28.22 ±11.08)%均优于损伤组[膀胱湿质量(0.66 ±0.07)g,膀胱湿质量/体质量值(2.30 ±0.26),尿动力指标:收缩时间(59.00 ±5.68)s,离体膀胱逼尿肌肌条指标:收缩时间(19.80 ±3.77)s,膀胱肌细胞凋亡率(59.80 ±14.18)%]。Western blot 检测结果显示干细胞组的蛋白 P2Y4 的表达低于损伤组。**结论** 尿源干细胞可促进脊髓损伤后大鼠神经源性膀胱的功能恢复。

[关键词] 神经源性膀胱;尿源干细胞;P2Y4;凋亡
[中图法分类号] R-332; R651.2;R694.505 [文献标志码] A

Effect of urine-derived stem cell transplantation on recovery of neurogenic bladder in rats after spinal cord injury

Zhang Teng[1], Dong Xingyou[1], Liu Qian[1], Wu Chao[1], Li Jia[1], Xia Liubing[1], Hu Xiaoyan[1], Song Bo[2], Deng Jianping[1], Li Longkun[1]([1]Department of Urology, Xinqiao Hospital, Third Military University, Chongqing, 400037; [2]Institute of Urinary Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To observe the function and histological changes of neurogenic bladder, and investigate the effect of urine-derived stem cell transplantation on the neurogenic bladder in rats after spinal cord injury (SCI). **Methods** Forty-five Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into normal group, SCI-induced group, and SCI-induced and urine-derived stem cell transplantation group (n = 15 for each group). On the 7th day after induction of SCI, the rats in the stem cell transplantation group were injected with urine-derived stem cells. After 28 d, urodynamic test, *in vitro* detrusor smooth muscle strips and bladder wet weight were used to measure the function of bladder. Western blotting was employed to detect the expression of P2Y4 in each group. TUNEL assay was performed to test the apoptosis ratio of bladder cells. **Results** The SCI-induced and urine-derived stem cell transplantation group was better in bladder wet weight (0.31 ± 0.01 g), bladder wet weight/body mass (1.19 ± 0.41), urodynamic parameter (contraction intermittence 112.75 ± 16.52 s), *in vitro* detrusor smooth muscle strips (contraction intermittence 16.47 ± 2.29 s), and bladder cell apoptosis ratio [(28.22 ± 11.08)%] compared with the SCI-induced group [0.66 ± 0.07 g, 2.30 ± 0.26, 59.00 ± 5.68 s, 19.80 ± 3.77 s, (59.80 ± 14.18)%, P < 0.05]. Western blot analysis showed that the expression of P2Y4 was reduced in the bladder of the SCI-induced and urine-derived

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81170704);国家自然科学基金青年科学基金(81300630)
[通信作者] 宋 波,E-mail:Songb-mr@vip.sina.com
邓建平,E-mail:surgeond@126.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20160314.1439.001.html (2016-03-14)

stem cell transplantation group. **Conclusion** Urine-derived stem cells can promote recovery of neurogenic bladder in rats after SCI.

[**Key words**] neurogenic bladder; urine-derived stem cells; P2Y4; spinal cord injury; apoptosis

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81170704) and the National Natural Science Foundation for Young Scholars of China (81300630). Corresponding author: Song Bo, E-mail: Songb-mr@vip.sina.com; Deng Jianping, E-mail: surgeond@126.com

神经源性膀胱(neurogenic bladder,NB)是由于神经控制机制出现紊乱而导致下尿路功能障碍,通常患者会存在神经系统病变或创伤[1]。不同的神经节段和损伤程度,神经源性膀胱会有不同的临床表现。虽然目前有干细胞治疗法、骶髓电刺激法、盆底肌电刺激法等,但神经源性膀胱的恢复与治疗仍是一道世界性的难题。目前在促进神经源性膀胱恢复的动物实验中,注射干细胞的实验方法与电刺激、针刺疗法、盆底肌电刺激等比较,不仅能一定程度上促进神经源性膀胱的恢复,而且还能缓解脊髓的细胞凋亡,并有分化成神经细胞的可能,从而更好地修复脊髓损伤和神经源性膀胱。Park 等[2]用骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cell, BMSC)进行了恢复神经源性膀胱功能的实验。Cho 等[3]提取口腔黏膜干细胞(oral mucosa stem cell)进行实验,发现其能有助于促进神经源性膀胱的恢复。新近发现一种于自然排出的尿液中提取的细胞,具有与其他干细胞同样的多向分化潜能和自我更新能力,被称为尿源干细胞(urine-derived stem cells, USCs)[4]。尿源干细胞避免了伦理问题,具有取材无创,与泌尿系统的器官具有更高的同源性等诸多优势,成为目前应用于泌尿系统疾病最为理想的成体干细胞[5]。本研究采用自制 Allen's 砸伤装置建立 SD 大鼠的神经源性膀胱模型,使用尿源干细胞干预模型大鼠,探讨尿源性干细胞在促进大鼠神经源性膀胱恢复的影响及其作用。

1 材料与方法

1.1 主要材料

乌拉坦(Sigma,美国),兔抗大鼠 P2Y4 抗体(Novus,加拿大),羊抗兔二抗(博士德,中国),TUNEL 试剂盒(Roche,德国),ECL 化学发光显色液(Thermo,美国),1% 青-链霉素(碧云天,中国),胎牛血清(Gibco,美国),其余试剂均为进口分析纯。多通道生理信号采集处理系统(成都仪器厂),微量灌注泵(3M,美国)。

1.2 实验动物与分组

2 月龄健康雌性清洁 Sprague-Dawley(SD)雌性大鼠 45 只,体质量 180 ~ 220 g,购于第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心。大鼠在相同环境下喂养。SD 大鼠完全随机分为正常组、损伤组、干细胞组,每组 15 只。

1.3 细胞培养

USCs(由美国维克森林大学张元原教授提供)细胞用含 10% 胎牛血清、1% 青-链霉素的 DMEM/高糖培养液,置于 37 ℃含 5% CO_2的培养箱中培养。在倒置光学显微镜下观察细胞的生长情况,0.25% 胰蛋白酶消化传代,取 3 代细胞用于后续实验。

1.4 动物模型

手术方案:取损伤组和干细胞组大鼠,采用 10% 水合氯醛(0.33 mL/100 g)腹腔麻醉。麻醉后,大鼠以俯卧位固定,取背部正中切口,完全暴露 T9 ~ T11 棘突,在解剖显微镜下咬除 T10 全椎板,显露脊髓。采用自制 Allen's 打击装置,将质量为 10 g 的砝码在 5.0 cm 的高度垂直做自由落体运动撞击硬膜囊,造成 T10 段脊髓的撞击伤,撞击后依次缝合肌肉、筋膜、皮肤并且消毒。砝码撞击脊髓后,脊髓立刻出现明显血肿,大鼠身体抖动,双后肢抽搐,尾巴甩动,并且在脊髓休克期后,只有前肢参与行走,后肢处于拖动状态,挤压膀胱仅有少量或无尿液排出,表示脊髓损伤模型建模成功[6]。术后大鼠分组饲养,围手术期连续 3 d 肌注青霉素 20 万 IU/kg 预防感染;每日进行人工排尿,3 次/d,直至大鼠自主排尿功能恢复。于建模成功后 1 周,再次麻醉干细胞组大鼠,将 1×10^6尿源干细胞悬浮于 500 μL 的 PBS 中经尾静脉注射。

1.5 尿动力学检测

20% 乌拉坦(1 g/kg)腹腔注射麻醉。大鼠仰卧位固定四肢,75% 酒精对尿道外口及下腹部进行消毒,将长约 15 cm 的 PE50 导管经尿道插入膀胱,轻压大鼠下腹部,排空膀胱,将导管经三通管与压力传感器及微量灌注泵相连,微量灌注泵以 10 mL/h 的速度将 37 ℃生理盐水泵入膀胱,于 RM6240C 型多通道生理信号采集处理系统上记录膀胱的压力曲线。统计分析大鼠膀胱基压(BP)、膀胱峰压(PP)、收缩间歇(ICI)、排尿量(UV)。

1.6 膀胱湿质量和膀胱湿质量/体质量值检测

各组大鼠 5 只,于处死结束 48 h 内称取体质量,并断颈处死后迅速取出膀胱,称取膀胱湿质量,计算膀胱湿质量/体质量值(mg/g)。

1.7 离体逼尿肌肌条实验

大鼠断颈处死,剪开下腹部,取出膀胱,即刻置入4 ℃ Krebs液的玻璃皿中。剪开膀胱,轻柔剔除黏膜层,纵行切取8 mm×2 mm×12 mm肌条。离体肌条垂直平衡于盛有15 mL 37 ℃ Krebs液的浴槽中,上端与张力传感器相连,下端固定于浴槽底部,张力传感器与多通道生理信号采集器相连,记录肌条收缩波形。浴槽中通以95% O_2、5% CO_2混合气体。

1.8 TUNEL染色

将收集的大鼠膀胱标本沿膀胱纵轴切开,一半用于TUENL检测,一半用于蛋白检测。将用于TUNEL检测的膀胱置于4%多聚甲醛中固定后,石蜡包埋切片。实验步骤按照TUNEL试剂盒的说明书进行。过氧化物酶DAB显色,阳性细胞为细胞核中有棕黄色颗粒。在Olympus光学显微镜下观察并计数TUNEL标记的阳性细胞。

1.9 P2Y4的表达检测

实验采用蛋白提取试剂盒提取膀胱组织总蛋白,BCA法检测各组蛋白浓度。依据蛋白浓度调整各组标本上样量,并行10% SDS-PAGE凝胶电泳分离,将蛋白转到PVDF膜上。3% BSA封闭2 h。4 ℃,P2Y4抗体(兔抗大鼠)孵育过夜,TBST洗膜3次,每次10 min。二抗(羊抗兔)室温下摇床孵育2 h,TBST洗膜3次,每次10 min。ECL化学发光试剂盒凝胶成像仪中检测蛋白的表达情况。

1.10 统计学处理

计量资料数据以$\bar{x} \pm s$表示,采用SPSS 19.0统计软件,多组间单因素方差分析。

2 结果

2.1 膀胱湿质量和膀胱湿质量/体质量值检测

与正常组相比,干细胞组和损伤组膀胱湿质量和膀胱湿质量/体质量值增加,其中损伤组更为严重($P<0.05$);干细胞组和损伤组相比,膀胱湿质量和膀胱湿质量/体质量值显著降低($P<0.05$,表1)。

表1 各组大鼠膀胱湿质量和膀胱湿质量/体质量比较($n=5,\bar{x} \pm s$)

组别	膀胱湿质量(g)	膀胱湿质量/体质量
正常组	0.15±0.03	0.61±0.13
损伤组	0.66±0.07[a]	2.30±0.26[a]
干细胞组	0.31±0.01	1.19±0.41

a:$P<0.01$,与正常组和干细胞组比较

2.2 尿动力学表现

尿动力学检测表明,干细胞组模型大鼠尿动力学指数较损伤组模型有明显改善,但仍未恢复正常排尿(表2,图1)。干细胞组出现不正常的排尿节律,收缩时间较正常组明显缩短($P<0.01$),较损伤组膀胱功能亢进的现象明显改善($P<0.01$)。干细胞组的排尿量高于损伤组($P<0.01$),仍低于正常组($P<0.01$)。损伤组和干细胞的膀胱基压均明显高于正常组($P<0.01$);干细胞组略低于损伤组,差异无统计学意义($P>0.05$)。干细胞组膀胱峰压明显高于正常组和损伤组($P<0.01$)。

表2 各组大鼠尿动力学指标比较($n=5,\bar{x} \pm s$)

组别	收缩时间(s)	排尿量(mL)	膀胱基压(cmH_2O)	膀胱峰压(cmH_2O)
正常组	255.25±31.63	0.71±0.09	3.85±0.76	37.65±2.90
损伤组	59.00±5.68[b]	0.16±0.02[b]	32.51±4.58[b]	32.71±0.84[a]
干细胞组	112.75±16.52[b]	0.31±0.05[b]	29.89±4.79[b]	52.45±7.27[b]

a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与正常组比较

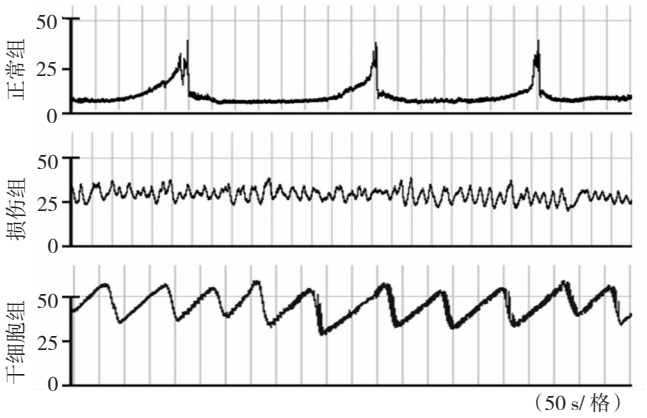


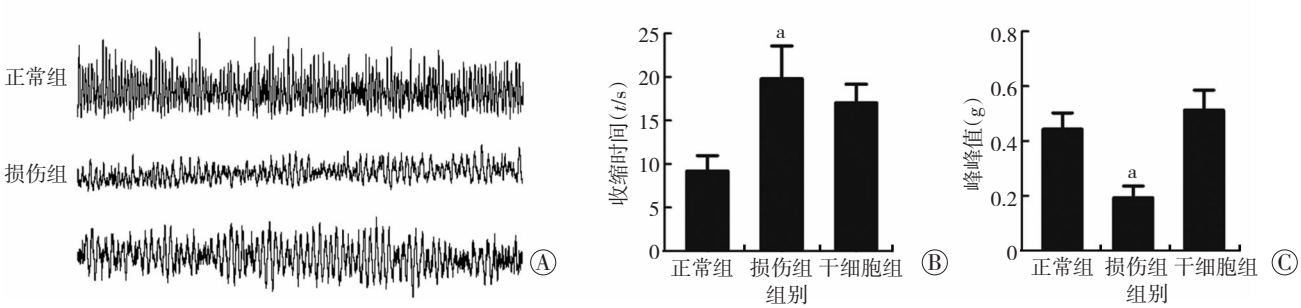
图1 各组大鼠尿动力学表现

2.3 离体逼尿肌肌条实验

离体逼尿肌肌条实验检测结果显示,损伤组的收缩时间和峰峰值与正常组、干细胞组比较差异均有统计学意义($P<0.05$)。损伤组的收缩时间明显长于正常组与干细胞组($P<0.01$),峰峰值明显小于正常组与干细胞组($P<0.01$),提示损伤组的膀胱收缩能力最弱,干细胞组膀胱收缩功能的恢复好于损伤组。干细胞组与正常组的收缩时间和峰峰值相比差异有统计学意义($P<0.01$,图2),提示治疗组的膀胱功能未能恢复到正常水平。

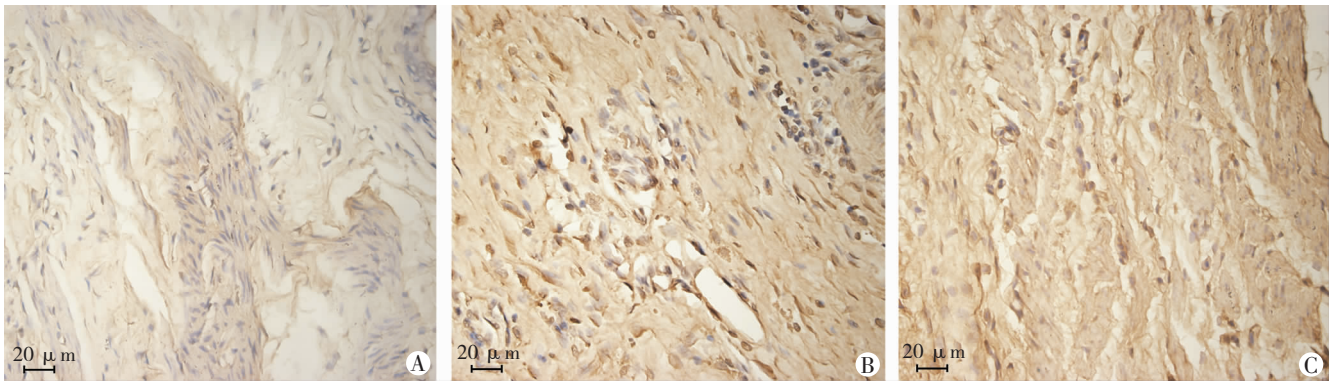
2.4 Western blot检测P2Y4在膀胱中的表达变化

P2Y4蛋白表达经半定量分析后损伤组(0.83±0.11)较正常组(0.46±0.12)和干细胞组(0.57±0.11)明显增高($P<0.05$,$P<0.01$),正常组与干细胞组比较差异无统计学意义($P>0.05$,图3)。



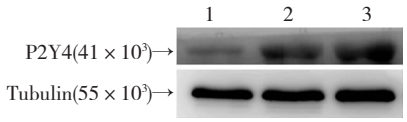
A:各组大鼠膀胱肌条分析;B:各组大鼠收缩时间比较;C:各组大鼠峰峰值变化 a:$P<0.05$,与正常组、干细胞组比较

图 2 各组大鼠离体膀胱逼尿肌肌条实验结果



A:正常组;B:损伤组;C:干细胞组

图 4 各组大鼠膀胱肌细胞凋亡情况(TUNEL)



1:正常组;2:干细胞组; 3:损伤组

图 3 Western blot 检测各组大鼠膀胱蛋白 P2Y4 表达

2.5 膀胱细胞凋亡情况

TUNEL 染色的凋亡细胞(阳性细胞)为细胞核染成棕黄色,非凋亡细胞(阴性细胞)胞核为蓝色。正常组可见少量阳性细胞,损伤组(59.80±14.18)%则可以见大量阳性细胞,凋亡率与正常组(8.20±3.13)%相比差异有统计学意义($P<0.01$)。干细胞组(28.22±11.08)%的阳性细胞稍多于正常组,凋亡率与正常组相比差异无统计学意义($P>0.05$),明显少于损伤组的阳性细胞数量,凋亡率与损伤组相比差异有统计学意义($P<0.01$,图 4)。

3 讨论

神经源性膀胱的特点是储存和排空功能失调,主要是由于外伤,神经病变和先天性疾病等引起神经损害造成。骶髓以下的神经损伤导致骶髓排尿中枢不能支配膀胱,膀胱容量增大,尿液潴留,压力降低。在神经源性膀胱的动物模型中,有 Allen's 撞击模型,Hassan Shaker 脊髓横断法,脊髓缺血再灌注模型,化学诱导模型等。本实验采用自制 Allen's 撞击装置建立大鼠砸伤模型,保留膀胱功能的低级神经调控[7],是模拟脊髓在车祸、重物撞击下最佳损伤模型。

干细胞是一类具有自我更新和多向分化潜能的细胞,已经被广泛运用于全身各个器官的基础和临床研究中。目前应用于研究中的干细胞主要是成体干细胞,其特点是广泛存在于已分化组织中,维持组织器官结构和功能稳态,在特定条件下能够分化并产生各种组织细胞类型。成体干细胞较容易被获取,并且避免了伦理限制、细胞来源不足、免疫排斥等不利因素,因而在基础和临床研究中被广泛重视和利用[7],例如骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells,MSCS),肌源性干细胞(muscle-derived stem cells,MDSCs),脂肪干细胞(adipose-derived stem cells,ADSCs),尿源干细胞(urine-derived stem cells,USCs)[4,8-12]。尿源干细胞来源于泌尿系统中,可从人的新鲜尿液中获取。尿源干细胞克隆端粒酶呈阳性,并能增殖 60~70 倍,在体外适当的条件下能被诱导分化成不同细胞[13]。目前,尿源干细胞已经被用于泌尿系统的器官重建,取得良好效果[4]。本实验利用尿源干细胞促进神经源性膀胱大鼠模型的修复,因其对泌尿系统有较好的组织相容性,不仅可以在靶器官转分化为各类成体细胞起到再生作用,而且还能分泌各种营养因子发挥调节免疫

和抗炎作用。本研究推测,尿源干细胞对神经源性膀胱的修复作用是因为尿源干细胞分泌神经营养因子促进了损伤段神经的修复,转分化为相关神经细胞,加强了膀胱与大脑排尿系统之间的联系。

P2Y4 受体主要作用在运动神经纤维中,并且参与了周围神经损伤修复[14]。同时,相关研究也证实脊髓损伤时中枢嘌呤反应增强,P2Y4 受体的表达持续增加[15]。本研究中 Western blot 检测结果显示,干细胞组 P2Y4 蛋白表达量与正常组相比无统计学差异,而与损伤组相比则明显降低($P<0.05$),说明干细胞组模型的膀胱功能较损伤组有所恢复。并且,从尿动力学检查可见干细胞组的大鼠模型出现模型的排尿规律,收缩时间和排尿量和损伤组相比有一定的恢复作用,膀胱基压也相对降低。离体膀胱逼尿肌肌条实验显示,损伤组的收缩时间和峰峰值情况均弱于干细胞组和正常组,干细胞组的膀胱功能恢复较正常组仍有差距,但已恢复一定的膀胱收缩功能。综合尿动力学实验和离体膀胱逼尿肌肌条实验可以得出,干细胞组大鼠模型的膀胱功能恢复良好,较损伤组而言已经具有一定的自主排尿能力。TUNEL 检测细胞凋亡发现损伤组的肌细胞凋亡率最高,干细胞组则相对降低,证明了尿源干细胞能够缓解神经源性膀胱的细胞凋亡,改善膀胱功能的情况。并且,干细胞组大鼠模型的膀胱湿质量和膀胱湿质量体质量比值均明显小于损伤组大鼠模型,趋近于正常组大鼠,说明膀胱水肿减轻,扩张减小,从侧面证明尿源干细胞能够促进神经源性膀胱的恢复。

综上所述,尿源性干细胞能够促进神经源性膀胱的功能恢复,为尿源性干细胞的治疗提供了潜在可能。本研究通过尾静脉注射干细胞,并未完全恢复膀胱的收缩功能,未来可探索新的治疗注射方案以期膀胱收缩得到更好的恢复。同时,本研究未阐明尿源性干细胞促进神经源性膀胱恢复的作用机制,联合其他神经生长因子是否有更好的恢复效果,都有待进一步的研究和探索。

参考文献:

[1] Goldmark E, Niver B, Ginsberg D A. Neurogenic bladder: from diagnosis to management[J]. Curr Urol Rep, 2014, 15(10): 448. DOI:10.1007/s11934-014-0448-8

[2] Park W B, Kim S Y, Lee S H, *et al*. The effect of mesenchymal stem cell transplantation on the recovery of bladder and hindlimb function after spinal cord contusion in rats[J]. BMC Neurosci, 2010, 11:119. DOI:10.1186/1471-2202-11-119

[3] Cho Y S, Ko I G, Kim S E, *et al*. Oral mucosa stem cells alleviates spinal cord injury-induced neurogenic bladder symptoms in rats[J]. J Biomed Sci, 2014, 21:43. DOI: 10.1186/1423-0127-21-43

[4] Lang R, Liu G, Shi Y, *et al*. Self-renewal and differentiation capacity of urine-derived stem cells after urine preservation for 24 hours[J]. PLoS One, 2013, 8(1): e53980. DOI: 10.1371/ journal.pone. 0053980

[5] 李龙坤,赵江. 干细胞在下尿路疾病修复和重建中的运用前景[J]. 第三军医大学学报, 2015, 37(6): 489-494. DOI:10.16016/j.1000-5404.20141211

[6] AR A. Surgery for experimental lesions of spinal cord equivalent to crush injury of fracture dislocation of spinal column: a preliminary report[J]. JAMA, 1911, 57(11): 878-880. DOI:10.1001/jama. 1911. 04260090100008

[7] 李芮志, 周谋望, 曾凡硕. 大鼠脊髓损伤痉挛性膀胱中神经肽含量的观察[J]. 中华医学杂志, 2012, 92(15): 1058-1061. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0376-2491.2012.15.013

[8] Yu A, Campeau L. Bone marrow mesenchymal stem cell therapy for voiding dysfunction [J]. Curr Urol Rep, 2015, 16(7): 49. DOI:10.1007/s11934-015-0516-8

[9] Zhang Y, Lin H K, Frimberger D, *et al*. Growth of bone marrow stromal cells on small intestinal submucosa: an alternative cell source for tissue engineered bladder[J]. BJU Int, 2005, 96(7): 1120-1125. DOI:10.1111/j.1464-410X.2005.05741.x

[10] Tamaki T. Bridging long gap peripheral nerve injury using skeletal muscle-derived multipotent stem cells[J]. Neural Regen Res, 2014, 9(14): 1333-1336. DOI:10.4103/1673-5374.137582

[11] Feisst V, Meidinger S, Locke M B. From bench to bedside: use of human adipose-derived stem cells[J]. Stem Cells Cloning, 2015, 8: 149-162. DOI:10.2147/ SCCAA.S64373

[12] Qin D, Long T, Deng J, *et al*. Urine-derived stem cells for potential use in bladder repair[J]. Stem Cell Res Ther, 2014, 5(3): 69. DOI:10.1186/scrt458

[13] Bharadwaj S, Liu G, Shi Y, *et al*. Multipotential differentiation of human urine-derived stem cells: potential for therapeutic applications in urology[J]. Stem Cells, 2013, 31(9): 1840-1856. DOI:10.1002/stem.1424

[14] Jacobson K A, Paoletta S, Katritch V, *et al*. Nucleotides Acting at P2Y Receptors: Connecting Structure and Function [J]. Mol Pharmacol, 2015, 88(2): 220-230. DOI: 10.1124/mol.114.095711

[15] Gomez-Villafuertes R, Rodriguez-Jimenez F J, Alastrue-Agudo A, *et al*. Purinergic Receptors in Spinal Cord-Derived Ependymal Stem/Progenitor Cells and Their Potential Role in Cell-Based Therapy for Spinal Cord Injury[J]. Cell Transplant, 2015, 24(8): 1493-1509. DOI: 10.3727/096368914X682828

(**收稿**:2015-12-14;**修回**:2016-01-08)

(编辑 龙 亮)