

IGF-1 基因及电刺激治疗对产后压力性尿失禁大鼠模型的影响

黄健, 程明军, 陈义松, 丁景新, 华克勤*

(复旦大学附属妇产科医院妇科, 上海 200011)

【摘要】 目的 研究 IGF-1 基因治疗对产后压力性尿失禁大鼠模型的影响, 探索对该疾病理想的治疗方法。**方法** 对 240 只 SD 雌鼠水囊阴道扩张法建模, 从 185 只成功模型中随机选取 148 只并分为 5 组, 分别进行 IGF-1 基因治疗、氨哮素药物治疗、电刺激治疗、空质粒载体注射和未治疗, 另选未建模大鼠 20 只作为空白对照, 各组分别于治疗后 1、21、42 和 63 d 进行尿动力学检测、血清生化指标 (LDH, CK) 检测等, 并在光镜下观察耻尾肌肌纤维的变化。**结果** 在治疗后 21 d 时, 无论是最大膀胱容量、漏尿点压力还是收缩力/肌重比, IGF-1 组、电刺激组治疗效果更佳; 而 IGF-1 组与电刺激组两组之间比较差异无显著性 ($P > 0.05$)。**结论** IGF-1 基因治疗和电刺激治疗对产后压力性尿失禁大鼠模型的效果优于药物治疗等其他组。

【关键词】 IGF-1; 基因治疗; 产后压力性尿失禁; 大鼠模型

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2015)06-0617-05

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2015.06.014

Effect of IGF-1 gene and electric stimulation therapy on the rat model of postpartum stress urinary incontinence

HUANG Jian, CHENG Ming-jun, CHEN Yi-song, DING Jing-xin, HUA Ke-qin*

(Department of Gynecology, Affiliated Obstetrics and Gynecology Hospital of Fudan University, Shanghai 200021, China)

【Abstract】 Objective To study the effect of IGF-1 gene therapy and electric stimulation therapy on the rat models of postpartum stress urinary incontinence, and explore the ideal treatment for this disease. **Methods** 240 SD female rats were used to establish the model of postpartum stress urinary incontinence by water sac vaginal dilation. 148 model rats were randomly selected from 185 successful models and divided into 5 groups: IGF-1 gene therapy, clenbuterol treatment, electric stimulation therapy, injection of empty vector plasmid, and untreated groups. Besides, 20 non-modeled rats were used as blank control group. Urodynamic test was performed, pelvic floor pubococcygeus muscle/muscle weight ratio was calculated, and serum biochemical indices (LDH, CK) were detected, and the morphological changes of pubococcygeus muscle fibers were observed by light microscopy at 1, 21, 42 and 63 days after treatment. **Results** At 21 days after treatment, the maximum bladder capacity, leak point pressure, the contractile force/muscle weight ratio in the IGF-1 group and electric stimulation treatment group were significantly better ($P > 0.05$), and the differences between the IGF-1 group and electric stimulation group were not significant ($P > 0.05$). **Conclusions** The effect of IGF-1 gene therapy and electric stimulation on the rat models of postpartum stress urinary incontinence is better than that in the drug therapy group and other groups.

【Key words】 IGF-1; Gene therapy; Postpartum stress urinary incontinence; Rat model; Electric stimulation

【基金项目】 上海市卫生局青年科研项目 (编号: 20124Y054); 上海市科委西医引导类项目 (编号: 124119a5501); 上海市申康医院管理集团新兴前沿项目 (编号: SHDC12013120)。

【作者简介】 黄健 (1978 -), 男, 主治医师, 博士生, 主要从事妇科研究。Email: huangjian102@sina.com

【通讯作者】 华克勤 (1962 -), 女, 主任医师, 博士生导师, 主要从事妇产科研究。Email: huakeqin@126.com

压力性尿失禁属妇科常见病,表现为腹压突然增加导致的尿液不自主漏出。产后压力性尿失禁(postpartum stress urinary incontinence, PPSUI)是指继发于妊娠和分娩后出现的压力性尿失禁症状,发病率为 10%~60%^[1-2],在很大程度影响着产妇的生活质量。近年来,随着妇科泌尿学和盆底重建手术方式不断普及,其术后并发症也屡见不鲜,远期疗效更是难以预估。因此 SUI 的非手术治疗较前受到临床更多的重视。

由于盆底肌肉和神经损伤在其发病机制中占有主导地位,因此营养神经肌肉和增强肌肉的收缩力可能预防和治疗产后压力性尿失禁的发生发展成为当前的热门课题。Kerns 等^[3]证明人重组胰岛素样生长因子(IGF-1)能够提高神经损伤远端肌肉的结构和功能的恢复;Bellini^[4]认为应用腺病毒载体转移人重组胰岛素样生长因子在治疗神经肌肉疾病有重大潜力。本研究在之前提高建模成功率的动物实验基础上^[5],试图从基因治疗、电刺激治疗、药物治疗的疗效评估,来探索压力性尿失禁理想的非手术治疗方案。

1 材料与方法

1.1 动物模型的制作和鉴定

1.1.1 动物模型的制作

实验动物及分组:SPF 级 Sprague-Dawley 雌性未产大鼠 260 只,鼠龄 6 个月,体重 310~340 g,来源于上海斯莱克实验动物有限责任公司[SCXK(沪)2012-0002]。无菌术在复旦大学医学院实验动物部屏障动物实验设施进行并按实验动物使用的 3R 原则给予人道关怀。按照随机原则分为 6 组,240 只大鼠建模,20 只为正常对照。建模大鼠给予乌拉坦腹腔内注射,仰卧位固定在手术台,将 8Fr 弗莱氏尿管插入大鼠阴道 2~3 cm,气囊中注入 5 mL 生理盐水,给予平行阴道径向的拉力 300 g,8 h 后取出水囊导尿管。空白对照组不予处理。

1.1.2 动物模型的鉴定

喷嚏实验和尿动力学检测大鼠的膀胱排空后将硬膜外导管经尿道插入膀胱,外侧末端接动物实验尿动力学检测仪(AD Instruments-BIO Amp CF, QUAD Bridge),采用 Power LAB-Chart v5. 2. 1 尿动力学检测软件测定,通过微量泵以 10 mL/h 速度注入 37℃ 含美蓝的生理盐水,当尿道外口出现第一滴

蓝色尿液时,记录具体时间以及膀胱内压力;通过微量泵注入速度乘以时间计算出最大膀胱容量,即刻的膀胱内压力为漏尿点压力(leak point pressure, LPP),反复测量三次取平均值。再次排空膀胱后注入最大膀胱容量一半的美蓝生理盐水。剪取一段鼠须,伸入大鼠鼻孔内,致其出现喷嚏反射,当有蓝色液体从尿道外口溢出时为喷嚏实验阳性。

1.2 实验分组及处理

对建模成功的大鼠随机选取 148 只,128 只平均每组 32 只分入 4 组:胰岛素样生长因子基因治疗(IGF-1)组,物理(电刺激)治疗组,氨苄素药物治疗组,未治疗组。另设空质粒注射组 20 只和未建模的空白对照组 20 只。

处理方法:第一组(IGF-1 组):耻尾肌内注射,每侧注射 0.1 mL(总量为每只 1.5 μ g);注射于尿道外口旁 0.5 cm 处,与表皮斜角 45°进针,深度为 0.5 cm。IGF-1 质粒来源于吉满生物科技(上海)有限公司。第二组(物理治疗组):将电极插入雌性大鼠阴道后壁进行电刺激治疗(参数:刺激电压 1.5 V,频率为 1 Hz,波宽 0.1 ms,串长 2 s),每周两次,每次 20 min,共 3 周。第三组(药物治疗组):饮水中加 30 μ g/mL 氨苄素治疗,共 3 周。第四组(未治疗组):不予处理。第五组(空质粒对照组):方法同基因治疗组,耻尾肌中注射同等量的空载体质粒 0.1 mL/只,共 1 次。第六组(空白对照组):未建模。

在模型建立后 1、21、42 和 63 d 分别随机选取实验组 8 只、空载质粒组和空白对照组各 5 只进行检测。

1.3 血清生化检测

采用眼球取血法取得大鼠眼底血液,经离心获取血清约 0.5 mL,使用全自动生化分析仪采用 JSCC 标准化对应法测定血清乳酸脱氢酶(LDH)、肌酸激酶(CK)。

1.4 盆底肌纤维光镜下观察

牺牲大鼠后取各组大鼠盆底两侧耻尾肌并做成病理切片,经伊红-苏木素染色法(HE)染色,梯度酒精脱水、二甲苯透明、中性树胶封片,镜下观察盆底耻尾肌纤维的损伤情况。

1.5 统计学处理

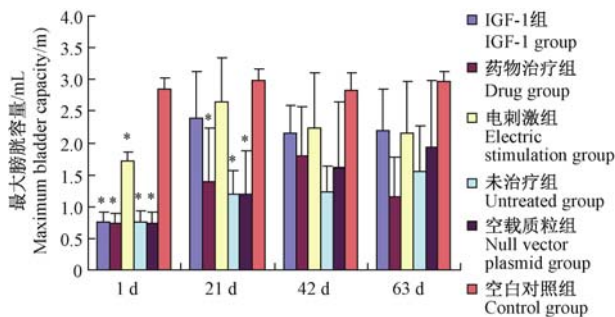
数据应用 SPSS 13.0 统计分析软件处理,结果以 MEAN $\pm$ SD 表示,组间比较用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 大鼠模型的鉴定

200 只 SD 大鼠按 8 h 水囊牵引法建立 PPUI 大鼠模型后,喷嚏实验阳性和尿动力学检测均为异常 185 只,成功率为 77.1% (185/240),对照组为 0 (0/20)。鉴定完成后按前述的方法分组。

结果显示,与空白对照相比,治疗后 1 d 时其他各组尿动力学检测,最大膀胱容量和漏尿点压力均下降 ($P < 0.05$),随后逐渐恢复(见图 1、2)。其中,21 d 时 IGF-1 组、电刺激组与药物治疗组、未治疗组、空载质粒组、空白对照组比较恢复更好,且与空白对照组差异无显著性 ($P < 0.05$),说明治疗效果更佳;而 IGF-1 组与电刺激组两组之间比较,差异无显著性 ($P > 0.05$)。

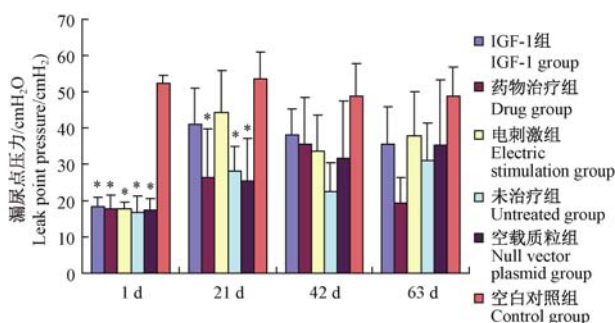


注: * 同次检测各实验组与未治疗组比较, $P < 0.05$ 。

图 1 最大膀胱容量的变化

Note. * Comparison between experimental and untreated groups at the same time points.

Fig. 1 Changes of maximum cystometric capacity in the rats.



注: * 同次检测各实验组与空白对照组比较, $P < 0.05$ 。

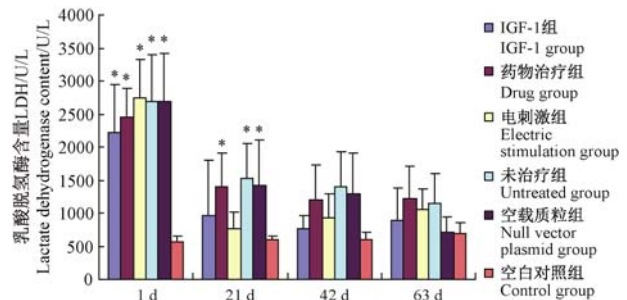
图 2 漏尿点压力的变化

Note. * Comparison between experimental and control groups at the same time points, $P < 0.05$.

Fig. 2 Changes of Valsalva leak point pressure in the rats at different time points

2.2 血清生化检测

从图 3 和图 4 中我们可以发现,治疗后 1 d 时其他各组的大鼠的 LDH、CK 含量与空白对照组相比差异有显著性 ($P < 0.05$),21 d 时 IGF-1 基因治疗和电刺激治疗组与空白对照组差异无显著性,随后其他组逐渐恢复(见图 3、4)。

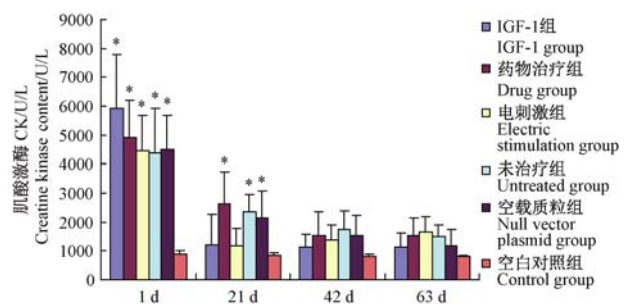


注: * 同次检测各实验组与空白对照组比较, $P < 0.05$ 。

图 3 乳酸脱氢酶 (LDH)

Note. * Comparison between experimental and control groups at the same time points, $P < 0.05$.

Fig. 3 Changes of lactate dehydrogenase in the rats at different time points



注: * 同次检测各实验组与空白对照组比较, $P < 0.05$ 。

图 4 肌酸激酶 (CK)

Note. * Comparison between experimental and control groups at the same time points, $P < 0.05$.

Fig. 4 Changes of creatine kinase in the rats at different time points.

2.3 盆底肌纤维光镜下观察

大鼠耻尾肌光镜下观察,IGF-1 组肌肉纤维的损伤情况如下(见图 5):治疗 1 d 时,肌肉严重损伤,肌细胞排列紊乱,变细,呈灶性分布;21 d 时肌肉损伤略有恢复,肌细胞排列仍紊乱明显;42 d 肌肉损伤恢复较好,肌细胞较少紊乱;63 d 时,肌肉损伤基本恢复或接近正常。

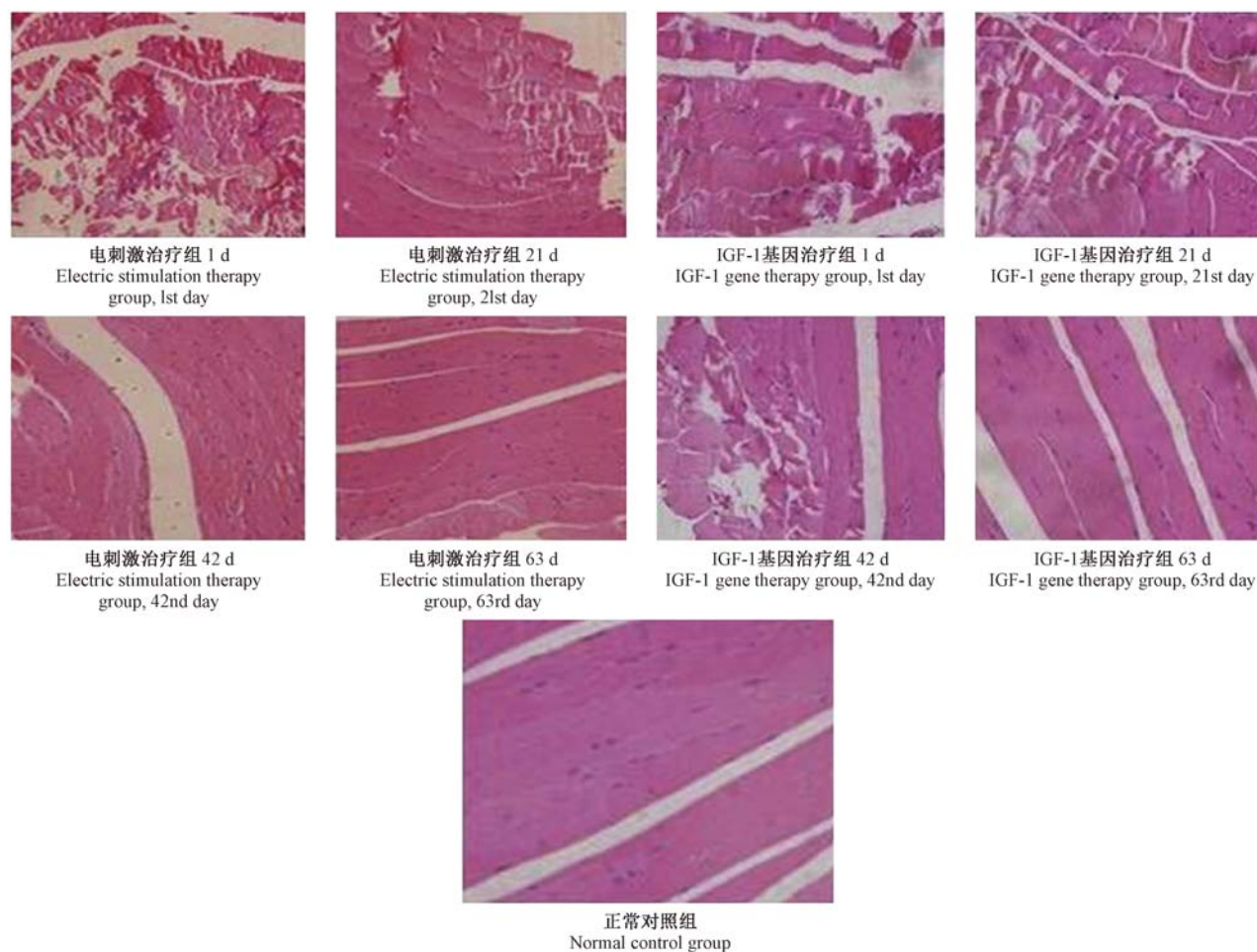


图 5 基因治疗组盆底肌肉纤维 H&E 染色 ($\times 400$)

Fig. 5 Histology of the pelvic floor muscle fibers in the gene therapy group at different time points. H&E staining.

3 讨论

目前压力性尿失禁非手术治疗较前已有一定进展,主要包括:盆底肌肉训练(凯格尔训练)、生物反馈治疗、电刺激治疗、药物治疗、子宫托和针灸疗法等。其中凯格尔训练(Kegel exercise)是治疗 SUI 常用的非手术治疗方法,但该方法需要长期锻炼,如患者难以坚持而造成治疗效果不理想^[6]。盆底电刺激治疗和生物反馈联合应用能够提高治疗效果,但患者需要在一定时间内多次往返医疗机构使用特定的仪器才能治疗,依从性并不理想。药物治疗如氨苄青霉素、雌激素替代疗法等,由于长期药物治疗副作用较大造成难以在临床推广^[7]。近期 Carr 等^[8]、李爱斌等^[9]学者提出尿道周围局部注射自源性干细胞的方法来治疗 SUI,取得了一定的疗效,但该方法技术要求高,程序繁琐,临床应用难度较大;而局部注射药物治疗 SUI 的方法,已逐渐进入临床工作者的考虑范围^[10,11]。目前观点认为,盆底功能康复治疗

几乎没有禁忌症,即便病情重的患者选择手术治疗后,仍可用康复锻炼来巩固疗效,其症状改善率大于 50%^[6]。

IGF-1 是由肝脏合成和分泌的胰岛素家族的一种多肽,在细胞的分化、增殖和个体的生长发育、尤其是肌组织的生长和修复过程中具有重要的促进作用^[12]。作为刺激因子,可以促进细胞的有丝分裂,抑制细胞的凋亡,增强机体免疫功能等生物活性。因此,IGF-1 成为基因治疗某些疾病的理想靶点^[13],我们设想将 IGF-1 基因注入盆底肌组织,用于治疗产后压力性尿失禁如盆底肌肉群组织损伤,促进创伤修复以期具有更好的治疗效果。

本研究采用人重组 IGF-1 质粒局部注射的方法治疗 PPSUI,以电刺激治疗和氨苄青霉素药物治疗做对照,探讨基因治疗 PPSUI 的可行性。结果显示:在建模后,最大膀胱容量、漏尿点压力、收缩力/肌重比均下降,乳酸脱氢酶(LDH)、肌酸激酶(CK)均升高(P 均 < 0.05),随后逐渐恢复,与我们之前的实验

结果相符。在治疗后 21 d 时,无论是最大膀胱容量、漏尿点压力还是收缩力/肌重比,IGF-1 组、电刺激组与药物治疗组、未治疗组、空载质粒组、空白对照组比较,恢复情况更好 ($P < 0.05$),说明了更佳的治疗效果;血清 LDH 和 CK 在 IGF-1 基因治疗和电刺激治疗组于 21 d 后就与对照组差异无显著性而区别于其他各组,显示出接受这两种治疗的大鼠模型在血清肌损指标方面有了明显的较早改善,而 IGF-1 组与电刺激组两组之间比较差异无显著性 ($P > 0.05$)。由于本研究只是单纯采用两侧耻尾肌单点注射方法,可能不利于药物的扩散和吸收,从而影响了基因治疗的优势体现。

综上所述,对于 PPSUI 重组人 IGF-1 基因治疗和电刺激治疗的效果相似,且优于氨苄素药物治疗等其他组,本研究在进一步证实电刺激治疗的安全性外,也体现出 IGF-1 基因治疗对产后压力性尿失禁模型大鼠的初步效果,但能否用于临床患者尚需要更深入的基础和临床研究。

参 考 文 献

- [1] Anderson KM, Davis K, Flynn BJ. Urinary incontinence and pelvic organ prolapse [J]. Med Clin North Am, 2015, 99(2): 405–416.
- [2] Rodríguez-Mías NL, Martínez-Franco E, Aguado J, et al. Pelvic organ prolapse and stress urinary incontinence, do they share the same risk factors? [J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2015, 190: 52–57.
- [3] Kerns JM, Shott S, Brubaker L. Effects of IGF-I gene therapy on the injured rat pudendal nerve [J]. Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct, 2003, 14(1): 2–7.
- [4] Bellini MJ, Hereñú CB, Goya RG, et al. Insulin-like growth factor-I gene delivery to astrocytes reduces their inflammatory response to lipopolysaccharide [J]. J Neuroinflammation, 2011, 8: 21.
- [5] 黄健, 华克勤, 程明军, 等. 大鼠产后压力性尿失禁模型的建立与探讨 [J]. 中国实验动物学报, 2012, 20(2): 21–25.
- [6] 乔建红, 董文霞, 赵莹, 等. 女性盆底功能障碍知信行的研究进展 [J]. 中国实用护理杂志, 2014, 30(11): 68–69.
- [7] 刘荣军, 刘素云, 郭小玲, 等. 盆底康复配合阴道局部应用雌激素治疗盆底功能障碍性疾病的研究 [J]. 中国妇幼保健, 2011, 26(12): 1917–1918.
- [8] Carr LK, Steele D, Steele S, et al. 1-year follow-up of autologous muscle-derived stem cell injection pilot study to treat stress urinary incontinence [J]. Int Urogynecol J, 2008, 19(6): 881–883.
- [9] 李爱斌, 王玲瓏, 吕胜启, 等. 肌源性干细胞注射对压力性尿失禁的治疗作用 [J]. 中华实验外科杂志, 2007, 24(6): 724–726.
- [10] 马翠, 王志莲, 郝敏. 局部注射 BDNF 对压力性尿失禁模型大鼠 LPP 及 EUS 内 BDNF 的影响 [J]. 中国医学创新, 2014, 11(15): 25–28.
- [11] 杜小文, 吴慧玲, 朱永锋, 等. 骨髓间充质干细胞、肌样细胞藻酸钙复合凝胶在压力性尿失禁大鼠尿道周围的成肌效应研究 [J]. 中华泌尿外科杂志, 2012, 33(2): 138–142.
- [12] O'Neill BT, Lauritzen HP, Hirshman MF, et al. Differential role of insulin/IGF-I receptor signaling in muscle growth and glucose homeostasis [J]. Cell Rep, 2015, 11(8): 1220–1235.
- [13] Tang Y, Leng Q, Xiang X, et al. Use of ultrasound-targeted microbubble destruction to transfect IGF-I cDNA to enhance the regeneration of rat wounded Achilles tendon in vivo [J]. Gene Ther, 2015, 22(8): 610–618.

[收稿日期] 2015-05-28