

基因治疗与传统非手术治疗对产后压力性尿失禁模型大鼠的作用比较

程明军¹, 曹云桂¹, 丁景新², 黄健^{2,*}

(1. 上海市嘉定区妇幼保健院妇科, 上海 201821; 2. 复旦大学附属妇产科医院妇科, 上海 200011)

【摘要】 目的 研究 TGF- β 1 基因治疗对产后压力性尿失禁大鼠模型的作用, 探索该疾病理想的新型非手术治疗方法。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 TGF- β 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, 另外选取未建大鼠模型 20 只作为空白对照, 于治疗后 1、21、42 d 和 63 d 进行喷嚏实验、尿动力学检测、盆底耻尾肌的肌力/肌重比值、ELISA 法检测 TGF-1、免疫组化检测因子 TGF- β 1。结果 在治疗后的 21 d, 不论是最大膀胱容量、漏尿点压力还是收缩力/肌重比等, TGF- β 1 基因治疗组治疗效果更佳, 并且与电刺激组之间比较差异无显著性 ($P > 0.05$)。结论 TGF- β 1 基因治疗可能成为新型非手术治疗方法, 能对产后压力性尿失禁模型大鼠产生良好效果。

【关键词】 TGF- β 1; 基因治疗; 产后; 压力性尿失禁; 大鼠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016)04-0408-06

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2016.04.014

Comparison of the therapeutic effect of TGF- β 1 gene therapy and traditional nonsurgical treatment on the rat model of postpartum stress urinary incontinence

CHENG Ming-jun¹, CAO Yun-gui¹, DING Jing-xin², HUANG Jian^{2,*},

(1. Shanghai Jiading Maternal and Child Health Hospital, Shanghai 201821, China;

2. Obstetrics and Gynecology Hospital of Fudan University, Shanghai 200011)

【Abstract】 Objective To study the effect of TGF- β 1 gene therapy on the rat model of postpartum stress urinary incontinence and explore a novel non-operative treatment of this disease. **Methods** Two hundred and forty 6-month old SD female rats were used to prepare the model of postpartum stress urinary incontinence by vaginal dilation with a water sac. 148 rats from the 185 successfully prepared model rats were selected, and randomly divided into 5 groups: the TGF- β 1 gene therapy, clenbuterol treatment, electric stimulation therapy, injection of empty vector plasmid, and non-treated groups. In addition, 20 normal rats were selected as blank control group. Sneeze test and urodynamic test were conducted, the pelvic floor pubococcygeus muscle contractile force/muscle weight ratio was calculated, serum TGF-1 was detected by ELISA, and TGF-1 protein was detected by immunohistochemistry at 1, 21, 42 and 63 days after the treatment. **Results** At 21 days after treatment, all the maximum bladder capacity, leak point pressure, and urine or contractile force / muscle weight ratio of the TGF- β 1 gene therapy group showed even better effects than those of the electrical stimulation group, but the differences were statistically not significant ($P > 0.05$). **Conclusions** TGF- β 1 gene therapy shows good therapeutic effect on the rat models of postpartum stress urinary incontinence, suggesting that TGF- β 1 gene therapy may become a new type of non-surgical treatment for this disease.

【Key words】 TGF- β 1; Gene therapy; Stress urinary incontinence, postpartum; Rat

Corresponding author: HUANG Jian. E-mail: huangjian102@sina.com

[基金项目] 上海市申康医院管理集团新兴前沿项目(编号:SHDC12013120);上海市医学重点专科建设项目(编号:ZK2015B08)。

[作者简介] 程明军(1976-),男,主治医师,硕士研究生,主要从事妇科研究。Email: chengmingjun04@163.com

[通讯作者] 黄健(1978-),男,副主任医师,主要从事妇产科研究。Email: huangjian102@sina.com

产后压力性尿失禁 (postpartum urinary incontinence, PPUI), 表现为腹压突然增加导致的尿液不由自主漏出、发生于妊娠和分娩之后而出现的压力性尿失禁 (stress urinary incontinence, SUI), 发病率高达 10% ~ 60%^[1-2], 严重影响了广大妇女的身心健康和生活质量, 同时也带来了复杂的社会和家庭问题。近年来, SUI 患者的手术治疗方法越发普遍开展, 疗效褒贬不一, 尤其术后并发症没能有效规避, 远期疗效更是无大量临床依据支持, 于是 PPUI 的非手术治疗越来越受到广大临床医师的重视。

增强盆底支持组织的结构来预防和治疗产后压力性尿失禁的发生发展成为该领域研究的热门项目。转化生长因子 $\beta 1$ (transforming growth factor- $\beta 1$, TGF- $\beta 1$) 是一种多功能的、与胶原蛋白代谢关系最为密切的生长因子, 其生物作用广泛, 能促进成纤维细胞、内皮细胞的生长, 促进细胞外基质如胶原蛋白、纤粘连蛋白的表达和抑制其的降解, 有利于组织和细胞损伤的修复^[3]。其中, TGF- $\beta 1$ 对胶原蛋白的调控机制比较复杂, 主要包括基因水平的转录、转录后的加工修饰、翻译水平, 甚至维持蛋白质的稳定性等方面。最近的研究表明, TGF- $\beta 1$ 是组织细胞外基质合成的关键因子, 能促进其合成并减少其降解^[4], 从而可能加强产后盆底支持组织的结构, 减轻盆底疾病的症状。本研究拟通过压力性尿失禁模型大鼠 TGF- $\beta 1$ 基因治疗、电刺激物理治疗、药物治疗等的疗效评估, 来探讨产后压力性尿失禁最佳的非手术治疗方案。

1 材料与方法

1.1 大鼠模型的制作和鉴定

1.1.1 模型制作

实验动物及分组: SPF 级雌性, 未生产, 6 个月龄 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 260 只, 体重 310 ~ 350 g, 购自上海斯莱克实验动物有限责任公司 [SCXK (沪) 2012-0002]。无菌手术操作在复旦大学医学院实验动物部 [SYXK (沪) 2014-0029] 屏障系统内进行。按照随机的原则将所有大鼠分为 6 组, 240 只大鼠建模, 20 只不建模作为正常对照。根据之前报道的建模方法^[5], 建模大鼠在乌拉坦腹腔麻醉后消毒、固定, 将 8 Fr 弗莱氏导尿管插入阴道内 2 cm 左右, 阴道外口“8”缝合防水囊滑出, 注入生理盐水后扩张阴道, 给予阴道径向约 300 g 拉力, 8 h 后取出导尿管。而空白对照组不进行造模处理。

1.1.2 大鼠模型的鉴定: 喷嚏实验和尿动力学检测

大鼠排空膀胱后将输尿管外导管经过尿道口插入膀胱, 外侧末端连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 专用软件进行尿动力学检测, 试验中通过微量泵以 10 mL/h 的速度向大鼠膀胱内注入含美蓝的温生理盐水, 当观察到尿道外口出现第一滴蓝色的尿液时, 记录注入的时间以及即刻的膀胱内压力 (此值即为漏尿点压力), 以微量泵注入速度 (10 mL/h) 乘以注入时间即可得出最大膀胱容量; 如此反复测量三次, 取其平均值。再次排空大鼠膀胱后缓慢注入最大膀胱容量一半的美蓝生理盐水; 剪取一小段鼠须, 伸入大鼠鼻腔内, 诱其出现喷嚏反射, 当观察到再次有蓝色液体从尿道外口流出时为喷嚏实验阳性。

1.2 分组及处理

对建模成功的 185 只 SD 大鼠随机选取 128 只, 平均每组 32 只分入 4 组: 转移生长因子基因治疗 (TGF- $\beta 1$) 组, 物理 (电刺激) 治疗组, 氨苄素药物治疗组, 未治疗组。另取 20 只建模成功的大鼠作为空质粒注射组, 20 只未建模的大鼠作为空白对照组。处理方法: 第 1 组 (TGF- $\beta 1$ 组): 进行双侧耻尾肌内注射, 每侧注射 TGF- $\beta 1$ DNA 质粒 0.1 mL (总量为 50 μ g/只, 由上海吉满生物科技有限公司提供); 注射位置为尿道外口旁 0.5 cm、与表皮夹角 45°、深度 0.5 cm。第 2 组 (物理治疗组): 进行电刺激物理治疗 (参数: 刺激电压 1.5 V, 频率为 1 Hz, 波宽 0.1 ms, 串长 2 s), 电极插入阴道壁后壁顶端, 每周两次电刺激治疗, 每次持续 20 分钟, 共 3 周。第 3 组 (药物治疗组): 饮水中添加 30 μ g/mL 氨苄素, 供大鼠饮用 3 周。第 4 组 (未治疗组): 为造模成功的大鼠, 但不予处理。第 5 组 (空质粒对照组): 注射方法同基因治疗组, 每侧耻尾肌中注射同等量的空载体质粒 0.1 mL/只, 共 1 次。第 6 组 (空白对照组): 为未建模的正常大鼠。

在模型建立开始治疗后 1、21、42 d 和 63 d 时分别随机选取第 1 至第 4 组各 8 只、第 5 和第 6 组各 5 只进行检测。

1.3 ELISA 法检测血清 TGF- $\beta 1$ 值

用眼眦静脉取血法采血, 待血凝固后高速离心获得大鼠血清约 0.5 mL, -80°冰箱内冻存; 采用 ELISA 法检测血清 TGF- $\beta 1$ 浓度, 检测试剂盒来自美国 RB (Rapidbio) 公司, 采用北京普朗公司的

DNM-9602 型酶标仪检测;所有操作均严格按产品说明书进行。

1.4 免疫组化法检测

免疫组化法测定每组耻尾肌 TGF-β1 蛋白的表达:所有标本均于大鼠牺牲后 10 min 内收集,置于 4% 中性多聚甲醛液中固定后常规制作成石蜡切片,采用免疫组化 SABC 法(试剂盒购自麦约尔生物科技有限公司)测定耻尾肌 TGF-β1 的表达。TGF-β1 多克隆抗体(购自美国 Abcam 公司,ab92486)的工作浓度为 1:100;具体操作同说明书。每批染色均设阳性对照和阴性对照。

1.5 盆底耻尾肌单刺激收缩力测定

大鼠采血后消毒、固定、游离耻尾肌体部,尽量保留血供;沿耻尾肌远端切断肌腱,用丝线连接肌腱与张力换能器(JH-2),适度拉紧后保持连接线处于水平位置。张力换能器 SKY-A4 生物信号处理系统相连,采用 MFLab 3.01 功能学科实验软件(复旦大学上海医学院生理与病理生理学系编写)记录信号。用铂金丝双极电极在距入肌点 2 mm 处插入耻尾肌,调整好肌肉最适初长和阈上刺激电压,采 3.6 V 电压、1 Hz 频率、20 ms 脉宽的电流刺激耻尾肌,记录单次收缩的最大肌力。测试结束后切断该耻

尾肌进行称重,算出各组耻尾肌单刺激的最大收缩力与肌重的比值。

1.6 统计学处理

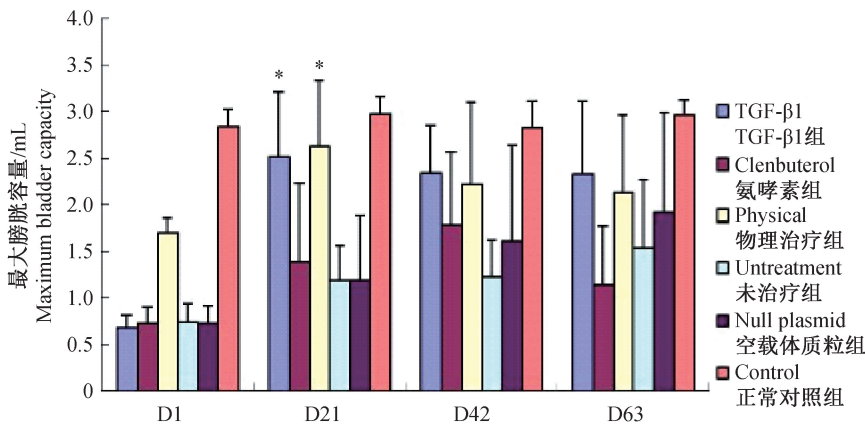
所有数据均采用 SPSS 13.0 统计分析软件处理,结果以 Mean ± SD 表示,组间比较用单因素方差分析,设 $P < 0.05$ 为有显著性差异。

2 结果

2.1 模型的鉴定与尿动力学测定

240 只 SD 大鼠建立 PPUI 模型后,进行喷嚏实验和尿动力学检测,结果有 185 只喷嚏实验阳性和尿动力学检测均为异常的大鼠,建模成功率为 77.1% (185/240),对照组为 0(0/20)。鉴定完成后再按前述的方法进行分组处理。

结果显示,与未造模的空白对照相比,治疗后 1 d 后其他各组大鼠的最大膀胱容量和漏尿点压力均下降($P < 0.05$),随后又逐渐恢复(见图 1、2)。其中,治疗 21 d 后的 TGF-β1 组、电刺激组,与药物治疗组、未治疗组、空载质粒组比较,恢复程度更好,差异有显著性($P < 0.05$),说明了更佳的治疗效果;而 TGF-β1 组与电刺激组之间比较,则差异无显著性($P > 0.05$)。



注: *: 与第 21 天同次检测的药物治疗组、未治疗组和空载质粒组比较, $P < 0.05$ 。

图 1 大鼠的最大膀胱容量

Note. *: Comparison between the clenbuterol, untreatment and null plasmid groups on D21, $P < 0.05$.

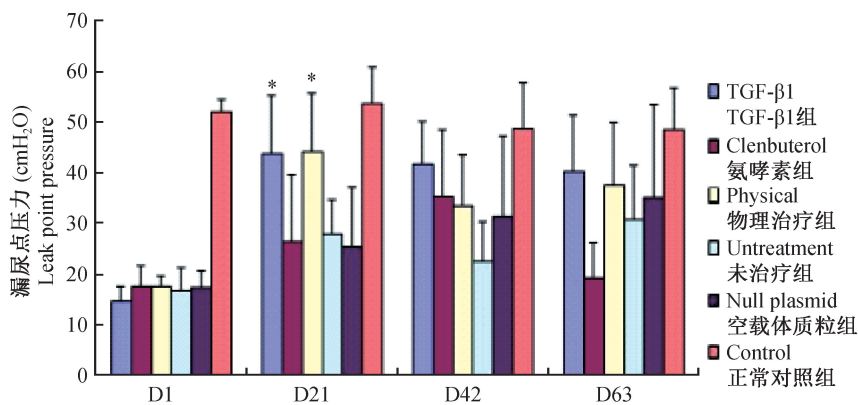
Fig. 1 comparison of the maximum bladder capacity of the rats

2.2 血清 TGF-β1 检测

大鼠血清 TGF-β1 检测结果显示(见图 3), TGF-β1 组与电刺激组、药物治疗组、未治疗组、空载质粒组和空白对照组比较,在 1 d 时 TGF-β1 表达明显升高($P < 0.05$),说明基因治疗后,外源性 TGF-β1 基因已经引起了肌肉等组织的 TGF-β1 并释放入血液,但之后的表达与其他各组差异无显著性($P < 0.05$)。

2.3 免疫组化法检测

TGF-β1 在耻尾肌组织的定位表达对照组中, TGF-β1 主要表达于肌纤维组织间的间质细胞,定位于细胞质,且呈局灶性表达;结果表明, TGF-β1 只表达在 1 d TGF-β1 组的肌组织中。而其他组耻尾肌组织均不表达 TGF-β1,与大鼠血清 TGF-β1 检测结果一致(见图 4)。

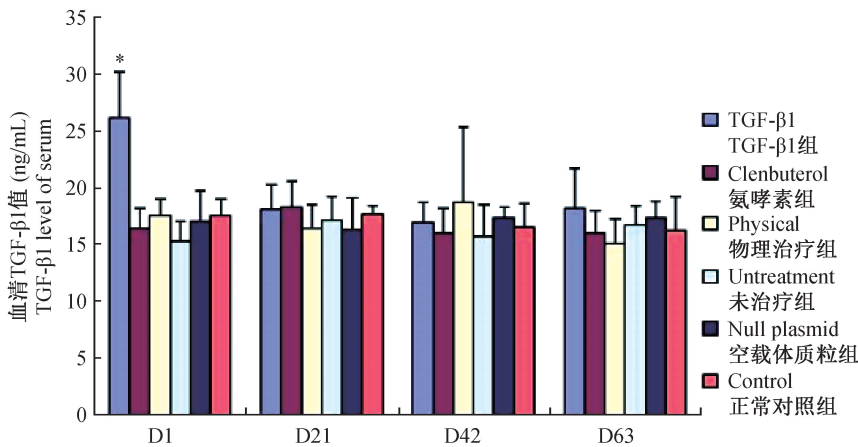


注：* 与第 21 天同次检测的药物治疗组、未治疗组和空载质粒组比较, $P < 0.05$ 。

图 2 大鼠的漏尿点压力

Note. *: Comparison between the clenbuterol, untreatment and null plasmid groups on day21, $P < 0.05$.

Fig. 2 Comparison of the leak point pressure of the rats

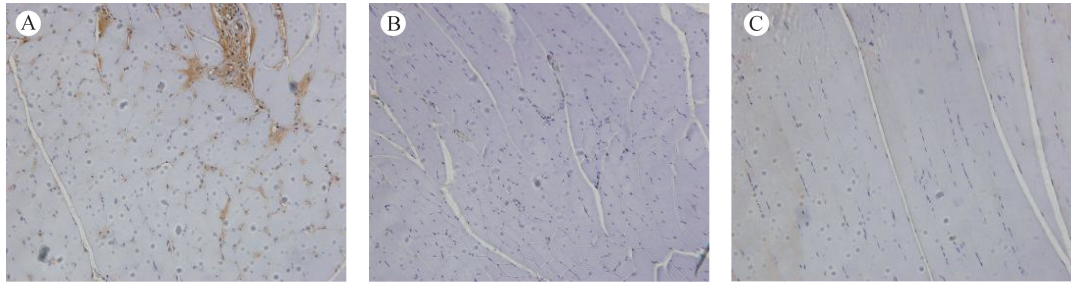


注：* 与第 1 天同次检测的药物治疗组、电刺激组、未治疗组和空载质粒组比较, $P < 0.05$ 。

图 3 血清 TGF-β1 含量

Note. *: Comparison between the clenbuterol, physical (electric stimulation), untreatment and null plasmid groups on day21, $P < 0.05$.

Fig. 3 Comparison of the serum TGF-β1 levels of the groups



注：A. TGF-β1 组；B. 未治疗组；C. 对照组。

图 4 耻尾肌组织 TGF-β1 表达 (均为治疗后 1 d, $\times 200$)

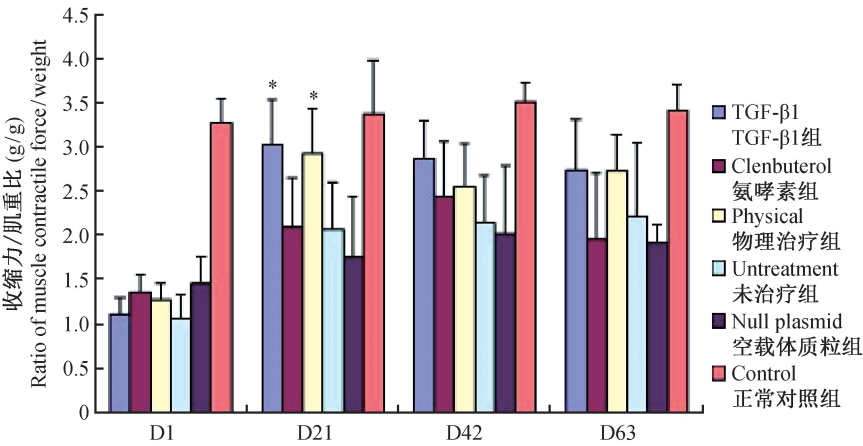
Note: A. TGF-β1 TGF-β1 group; B. Untreatment group; C. Control group. $\times 200$

Fig. 4 Expression of TGF-β1 in the pubococcygal muscle tissue at one day after treatment.

2.4 收缩力/肌重比

大鼠耻尾肌最大收缩力/肌重比结果显示(图5),除空白对照组之外其他各实验组盆底肌肉的肌力,在造模后均呈现出先下降、后逐渐恢复的趋势。在治疗后 1 d 时各肌力比较差异无显著性($P >$

0.05),治疗后 21 d 时 TGF- β 1 组、电刺激组与药物治疗组、未治疗组、空载质粒组比较,肌力恢复更好($P < 0.05$);而 TGF- β 1 组与电刺激组两组之间比较,同样差异无显著性($P > 0.05$)。该结果与尿动力检测结果相一致。



注: * 与第 21 天同次检测的药物治疗组、未治疗组和空载质粒组比较, $P < 0.05$ 。

图 5 收缩力与肌重比值

Note. *: Comparison between the clenbuterol, untreatment and null plasmid groups on day21, $P < 0.05$.

Fig.5 Ratios of muscle contractile force/weight in the rat groups

3 讨论

近年来压力性尿失禁认识和研究取得了很大的进展,尤其是手术治疗后各种并发症以及复发的陆续出现,使得非手术治疗再次成为研究的重点。目前被广泛接受的非手术治疗方法有盆底肌康复锻炼(包括 kegel 训练和隔肌锻炼法)、电刺激和生物反馈及瑜伽、药物治疗等方法^[6,7]。因产后哺乳以及身体恢复的特殊性加上治疗方案需要长期锻炼,使得患者难以坚持盆底肌康复锻炼,从而导致其疗效个体差异过大^[8]。生物反馈联合电刺激治疗的特点是针对性强,采用与生物电生理等医学高新技术相结合的方法,成为治疗盆底功能障碍的有力工具^[9]。可患者需要在一定时间内多次至医疗机构、并使用特定的仪器才能进行治疗,造成患者的不便,影响了治疗效果。那么有效又能减少患者多次往返就医的治疗方法逐渐使更多患者和医师产生了浓厚的兴趣。药物治疗如氨哮素等,由于长期药物治疗副作用较大如心悸头晕等,目前难以在临床推广^[10]。2008 年 Carr 等首次提出尿道周围局部注射自源性干细胞的方法来治疗 PPUI 以来,先后有学者采用骨髓干细胞、自体脂肪干细胞等应用于 PPUI 的治疗,且先后获得了一定的疗效^[11-13],但该方法

技术要求非常高、程序繁琐,目前临床应用和推广的难度很大;但局部注射基因治疗 SUI 的方法,已被临床工作者越发重视^[14,15]。

转化生长因子(transforming growth factor, TGF)是一种多功能生长因子,对脏器纤维化、炎症、创伤修复等疾病的发生发展中都具有十分重要的作用^[3];其中, TGF- β 有促进成纤维细胞生长、增殖和 ECM 合成的作用,其中 TGF- β 1 能够促进成纤维母细胞分化^[16]。近年来许多研究发现弹性蛋白及其影响因素的变化与盆底脏器脱垂和 PPUI 等多种疾病密切相关,胶原蛋白是一种结构蛋白也是盆底支持组织 ECM 的主要成分之一,其含量、构成及其超微结构的变化已经成为女性 PFD 发病机制研究中的一个热点^[17]。研究表明, TGF- β 1 是弹性蛋白和胶原蛋白合成最重要的的调控因子,能从分子水平调节弹性蛋白和胶原蛋白基因的表达^[18],所以 TGF- β 1 可能与 PFD 的发生发展密切相关。

本研究通过采用人重组 TGF- β 1 质粒耻尾肌局部注射的方法治疗 PPUI,并以电刺激的物理治疗和氨哮素的药物治疗做对照,探讨 TGF- β 1 基因治疗 PPUI 的可行性。结果显示,在治疗后 1 d,无论是大鼠血清,还是耻尾肌局部组织均有 TGF- β 1 表达,说明基因治疗是成功的。另外,在建模后,最大膀胱容

量、漏尿点压力、收缩力/肌重比均下降(P 均 < 0.05), 之后又逐渐恢复, 与我们之前的研究实验结果是一致的。且在治疗后 21 d 时, TGF- β 1 组、电刺激组, 与药物治疗组、未治疗组、空载质粒组比较, 不论是最大膀胱容量、漏尿点压力还是收缩力/肌重比等指标, 其恢复情况会更好($P < 0.05$), 说明了更佳的治疗效果; 但 21 d 后这些差异逐渐变小甚至消失, 可能与该基因治疗的质粒量因代谢消耗而逐渐下降有关; 而 TGF- β 1 组与电刺激组两组之间比较, 差异无显著性($P > 0.05$)。

综上所述, 采用 TGF- β 1 基因的质粒局部注射方法来治疗产后压力性尿失禁模型大鼠的盆底肌肉和神经以修复盆底组织, 观察模型大鼠的盆底肌肉功能和尿动力学等指标的变化, 提供较为丰富的动物实验基础数据, 以此为基础力争探索早期临床预防和治理产后压力性尿失禁的新型非手术方法。

参 考 文 献

- [1] Anderson KM, Davis K, Flynn BJ. Urinary incontinence and pelvic organ prolapsed [J]. Med Clin North Am. 2015, 99(2): 405–416.
- [2] Rodríguez-Mias 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(2015): 52–57.
- [3] 刘一, 隋丽华, 曾林, 等. BABL/c 小鼠感染大肠杆菌 O127 模型的建立及 TGF- β 1 因子的荧光定量检测 [J]. 中国实验动物学报. 2013, 21(2): 13–16.
- [4] Deng YL, Xiong XZ, Cheng NS. Organ fibrosis inhibited by blocking transforming growth factor- β signaling via peroxisome proliferator-activated receptor γ agonists [J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int. 2012, 11(5): 467–478.
- [5] 黄健, 程明军, 陈义松, 等. IGF-I 基因及电刺激治疗对产后压力性尿失禁大鼠模型的影响 [J]. 中国实验动物学报. 2015, 23(6): 617–621.
- [6] Huang AJ, Jenny HE, Chesney MA, et al. A group-based Yoga therapy intervention for urinary incontinence in women: a pilot randomized trial [J]. Female Pelvic Med Reconstr Surg. 2014, 20(3): 147–154.
- [7] Davidson Tracey, McDonald Alison, McPherson Gladys, et al. A comparison of an objective and subjective test of stress urinary incontinence (SUI) and their acceptability to participants [J]. Trials. 2015, 16(Suppl 2): 58.
- [8] 乔建红, 董文霞, 赵莹, 等. 女性盆底功能障碍知行行的研究进展 [J]. 中国实用护理杂志, 2014, 30(11): 68–69.
- [9] Vonthein R, Heimerl T, Schwandner T, et al. Electrical stimulation and biofeedback for the treatment of fecal incontinence; a systematic review [J]. Int J Colorectal Dis. 2013, 28(11): 1567–1577.
- [10] 陈彤, 胡彬, 张庆华. 盆底康复联合雌孕激素应用于围绝经期妇女盆底功能障碍性疾病的作用研究 [J]. 中国妇幼保健. 2014, 29(18): 2860–2861.
- [11] Carr L K, 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.
- [12] Gunetti M, Tomasi S, Giammò A, et al. Myogenic potential of whole bone marrow mesenchymal stem cells in vitro and in vivo for usage in urinary incontinence [J]. PLoS One. 2012, 7(9): e45538.
- [13] Tran C, Damaser MS. The potential role of stem cells in the treatment of urinary incontinence [J]. Ther Adv Urol. 2015, 7(1): 22–40.
- [14] 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): 25–27.
- [15] 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.
- [16] Noda K, Dabovic B, Takagi K, et al. Latent TGF- β binding protein 4 promotes elastic fiber assembly by interacting with fibulin-5 [J]. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013, 110(8): 2852–2857.
- [17] Colaco M, Mettu J, Badlani G. The scientific basis for the use of biomaterials in stress urinary incontinence (SUI) and pelvic organ prolapse (POP) [J]. BJU Int. 2015, 115(6): 859–866.
- [18] Liu X, Zhao Y, Pawlyk B, et al. Failure of elastic fiber homeostasis leads to pelvic floor disorders [J]. Am J Pathol. 2006, 168(2): 519–528.

[收稿日期] 2016-01-20