

隔姜隔盐灸“神阙”介导 ATP 敏感性钾通道调节逼尿肌反射亢进大鼠膀胱兴奋性的作用机制

杨 骏^{1,2}, 刘慧林^{1,2}, 李 彬^{1,2}, 邢国刚³, 蔡 捷³, 肖文迅^{1,2}, 刘 璐^{1,2}, 付渊博^{1,2},
廖宇翔⁴, 陈 鹏^{1,2}

(¹首都医科大学附属北京中医医院针灸科, 北京 100010; ²针灸神经调控北京市重点实验室, 北京 100010; ³北京大学医学部神经科学研究所, 北京 100191; ⁴成都中医药大学附属第五人民医院, 成都 611130)

【摘要】 目的:探究隔姜隔盐灸“神阙”是否通过调控 ATP 敏感性钾通道(K_{ATP})改善逼尿肌反射亢进(DH)大鼠膀胱兴奋性。方法:雌性 SD 大鼠随机分为假手术组 8 只和手术组 27 只,采用胸 10 横断法构建 DH 模型。将造模成功的 24 只大鼠随机分为模型组、艾灸组及抑制剂组,每组 8 只。隔姜隔盐灸组大鼠予以隔姜隔盐灸“神阙”,每次 20 min,每日 1 次,共干预 14 d。抑制剂组在灸法干预前腹腔注射 K_{ATP} 通道特异性拮抗剂格列本脲(10 $\mu\text{g}/\text{kg}$)。检测各组大鼠尿流动力学及逼尿肌肌电指标,提取原代逼尿肌细胞并采用免疫荧光染色法进行鉴定,采用膜片钳及钙成像技术检测大鼠膀胱逼尿肌细胞 K_{ATP} 通道电流变化及胞内钙离子活动。结果:与假手术组比较,模型组大鼠膀胱首次漏尿点压力($P<0.0001$)及漏尿点压力($P<0.01$)均升高,排尿间隔缩短($P<0.001$),膀胱顺应性降低($P<0.01$),排尿时逼尿肌肌电振幅及中值频率显著降低($P<0.0001$), K_{ATP} 通道电流密度降低($P<0.0001$),细胞内相对钙荧光变化比值升高($P<0.0001$)。与模型组比较,隔姜隔盐灸组上述指标均逆转($P<0.05, P<0.001, P<0.0001$)。与隔姜隔盐灸比较,抑制剂组上述指标均逆转($P<0.05, P<0.01, P<0.001, P<0.0001$)。结论:隔姜隔盐灸“神阙”可降低膀胱漏尿点压力,延长排尿间隔,提高膀胱顺应性和排尿时逼尿肌收缩振幅及中值频率,该作用可能通过提升 K_{ATP} 通道电流密度,提高通道开放程度和效率,促使 K^+ 外流增多和细胞膜超极化,降低细胞内钙离子浓度,抑制膀胱收缩得以实现。

【关键词】 逼尿肌反射亢进;隔姜隔盐灸; K_{ATP} 通道

Moxibustion improves bladder excitability by up-regulating ATP-sensitive potassium channel in rats with detrusor hyperreflexia

YANG Jun^{1,2}, LIU Hui-lin^{1,2}, LI Bin^{1,2}, XING Guo-gang³, CAI Jie³, XIAO Wen-xun^{1,2}, LIU Lu^{1,2}, FU Yuan-bo^{1,2}, LIAO Yuxiang⁴, CHEN Peng^{1,2} (¹Department of Acupuncture and Moxibustion, Beijing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100010, China; ²Beijing Key Laboratory of Acupuncture Neuromodulation, Beijing 100010; ³Institute of Neuroscience, Peking University Health Science Center, Beijing 100191; ⁴The Fifth People's Hospital Affiliated to Chengdu University of Chinese Medicine, Chengdu 611130)

【ABSTRACT】 Objective To observe the effect of ginger-salt-partitioned moxibustion on bladder excitability and bladder ATP-sensitive potassium (K_{ATP}) channel in detrusor hyperreflexia (DH) rats. **Methods** Female SD rats were randomly divided into sham operation, model, moxibustion and inhibition groups ($n=8$ in each group). Thorax (T) 10 spinal cord transection was performed by surgery. Ginger-salt-partitioned moxibustion was applied to “Shenque” (CV8) for 20 min, once daily for 14 consecutive days. Rats of the inhibition group received intraperitoneal injection of glibenclamide (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 15 min before moxibustion intervention. Urodynamic tests were performed after treatment.

【DOI】10.13702/j.1000-0607.20250324

引用格式:杨骏,刘慧林,李彬,等.隔姜隔盐灸“神阙”介导 ATP 敏感性钾通道调节逼尿肌反射亢进大鼠膀胱兴奋性的作用机制[J].针刺研究,2026,51(4):484-492.

项目来源:国家自然科学基金项目(No.81973925、81873352)

通信作者:刘慧林, E-mail: liuhuilin@bjzhongyi.com

The detrusor myoelectric activities (frequency and amplitude) were recorded by using Powerlab multichannel physiograph. Primary detrusor muscle cells were extracted and identified by immunofluorescence staining. The changes in K_{ATP} channel currents and intracellular Ca^{2+} dynamics of bladder detrusor muscle cells were detected using patch-clamp and calcium imaging techniques. **Results** Compared with the sham operation group, the first leakage pressure ($P<0.000 1$) and the leakage point pressure after stable urination ($P<0.01$) were increased, the urination interval was shortened ($P<0.001$), the bladder compliance was decreased ($P<0.01$), the amplitude and median frequency of detrusor electromyography during urination were significantly decreased ($P<0.000 1$), the current density of K_{ATP} channel was decreased ($P<0.000 1$), and the ratio of intracellular relative calcium fluorescence change was increased ($P<0.000 1$). After the treatment and compared with the model group, the above-mentioned indicators in the moxibustion group were all reversed ($P<0.05$, $P<0.000 1$). Compared with moxibustion group, all the above indicators in the inhibitor group were reversed ($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.001$, $P<0.000 1$). **Conclusion** Ginger-salt-partitioned moxibustion can increase the leakage point pressure, prolong the urination interval, improve bladder compliance, and increase the amplitude and median frequency of detrusor contraction during urination in DH rats, which may be associated with increasing the current density of K_{ATP} channel, improving the efficiency of channel opening, promoting the outflow of K^+ and cell membrane hyperpolarization, reducing intracellular Ca^{2+} concentration, thereby inhibiting bladder contraction.

【KEYWORDS】 Detrusor hyperreflexia; Ginger-salt-partitioned moxibustion; K_{ATP} channel

逼尿肌反射亢进(DH)是膀胱兴奋性异常导致排尿功能障碍的泌尿系统疾病,临床以尿频、尿急、急迫性尿失禁为主要表现。长期膀胱内高压性收缩易导致上尿路损害,生活质量降低,严重影响患者的身心健康^[1]。改善患者膀胱过度收缩症状、延长排尿间隔、提高膀胱顺应性、改善膀胱功能以提高患者的生存质量,是目前康复医学领域关注的焦点。团队前期临床试验显示隔姜隔盐灸神阙可改善中风后急迫性尿失禁患者排尿频次,提高患者生活质量^[2]。

膀胱兴奋性收缩调控的主流观点围绕神经源性及肌源性展开,膀胱逼尿肌既具有复式平滑肌的外来神经依赖性,又具有单式平滑肌的自律性。跨膜电位及离子通道可调控细胞兴奋性^[3], Ca^{2+} 是触发膀胱平滑肌收缩的核心信号分子, K^+ 外流是细胞膜电位维持、复极化、超极化现象产生的物质基础, K^+ 通道的开放阻断跨膜 Ca^{2+} 内流则将抑制或消除细胞兴奋性。ATP敏感性钾通道(K_{ATP})作为一类具有内向整流特性的钾离子通道,在能量代谢稳态与电生理活动的生物偶联过程中发挥重要作用,同时也是调控膀胱组织兴奋性传导与机械收缩动力学特征的关键离子通道^[4]。 K_{ATP} 通道由内向整流钾通道亚基(Kir6.x)和磺酰脲受体亚基(SUR)组成异源八聚体^[5],本团队前期研究证明艾灸干预可上调膀胱组织磺酰脲类受体2B表达^[6],然而该疗法对 K_{ATP} 通道整体门控特性及细胞内钙活动的影响尚不明确。因此本研究采用膜片钳及钙成像技术检测DH大鼠膀胱逼尿肌细胞 K_{ATP} 通道电流变化及胞内

Ca^{2+} 活动,为隔姜隔盐灸神阙临床治疗DH提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

35只7周龄清洁级健康SD雌性大鼠,体质量(180 ± 20)g,购自斯贝福(北京)生物技术有限公司,动物生产许可证号:SCXK(京)2019-0010。实验开始前于中国中医科学院针灸研究所动物房适应性喂养1周,室温 $20\sim 24\text{ }^{\circ}\text{C}$,相对湿度(50 ± 5)%,每日光照12h,自由摄食饮水。大鼠随机分为假手术组8只和手术组27只,采用胸(T)10脊髓横断法建立DH模型,借助尿流动力检测评估造模情况,将造模成功的24只大鼠随机分为模型组、隔姜隔盐灸组及抑制剂组,每组8只。本实验通过北京中医医院动物伦理委员会批准(批准号:2020120102),操作均符合实验动物伦理标准。

1.2 主要试剂及仪器

异氟烷(深圳瑞沃德),青霉素钠(上海阿拉丁),蕲艾绒(黄冈蕲春), α -肌动蛋白(SMA)一抗(武汉三鹰),Alexa Fluor 488标记的山羊抗小鼠IgG(H+L)二抗(北京中杉金桥),II型胶原酶(上海吉至),胰酶抑制剂(安徽白鲨),Fluo-4(美国Thermo Fisher),格列本脲、配制电极内液及细胞外液的试剂(美国Sigma)。

小动物麻醉机(深圳瑞沃德),微量注射泵(美国Kent Scientific),压力传感器(成都仪器厂),PL3580型Powerlab多通道生物信号记录仪(澳大

利亚 AD Instruments), NL900D 型 Neurolog 测控系统(英国 Digitimer), NL844 型 Neurolog 神经微电极放大器(英国 Digitimer), Axio Imager 2 荧光显微镜(德国 Carl Zeiss AG), 体视显微镜(深圳浩鑫达), Heracell 240i CO₂ 培养箱(美国 Thermo Fisher), EPC-10 单细胞膜片钳系统(德国 HEKA), 微电极拉制仪(美国 Sutter), CSU-W1 Nikon 转盘共聚焦成像系统(日本 Nikon)。

1.3 造模方法

手术组采用脊髓横断法制备 DH 模型^[7]。方法如下:术前禁食 12 h, 3% 异氟烷诱导麻醉, 连接呼吸面罩以 1.5% 异氟烷维持麻醉。背部剃毛备皮, 碘伏消毒, 以 T10 棘突为中心, 沿脊柱方向行 2~3 cm 纵行切口, 依次切开皮肤、筋膜, 钝性分离两侧肌肉。去除 T10 椎板, 暴露脊髓, 使用显微眼科剪将脊髓完全剪断, 充分止血后, 依次缝合肌肉皮肤后予抗感染处理。假手术组大鼠采用与手术组相同手术流程, 仅切开皮肤、筋膜与肌肉, 暴露脊髓 5 min, 不损伤脊髓。确认伤口无活动性出血后将大鼠放至恒温电热毯复温待其苏醒, 术后每 24 h 腹腔注射青霉素钠(2×10⁵ U/只)1 次以抗感染, 直至尿液澄清。大鼠分笼饲养, 3 只/笼, 采用 Crede 手法辅助大鼠排尿排便(每日至少 3 次)。每日观察大鼠伤口、排尿及活动状况, 及时更换垫料保证笼内干燥。手术组大鼠术后双下肢瘫痪, 自主运动消失, BBB 评分为 0~3 分, 脊髓休克期过后, 排尿反射重新建立, 表现为尿失禁。术后第 14 天尿流动力学检测显示膀胱充盈过程中出现期相性收缩为造模成功^[8]。假手术组大鼠术后排尿及双下肢活动正常, 若出现排尿障碍及下肢活动受限则为造模失败。造模后经尿流动力学筛选, 不符合造模成功标准的大鼠 3 只, 符合造模成功标准的大鼠 24 只。假手术组无大鼠死亡, 符合标准大鼠 8 只。造模成功的 DH 模型大鼠随机分为模型组、隔姜隔盐灸组及抑制剂组, 每组 8 只。

1.4 干预方法

隔姜隔盐灸组操作方法同课题组前期研究^[6]方法, 将大鼠固定于自制的固定器内, 施灸前适应 5 min。“神阙”位于第 4、5 对乳头中点连线的上 1/3 处^[9], 在“神阙”处敷少许食用盐(直径约 1.5 cm, 厚约 0.1 cm), 将当日制作新鲜生姜片(直径约 1.5 cm, 厚约 5 mm, 用一次性针灸针在姜片中间点刺多个小孔, 以便于热力的传导)覆盖于食用盐上, 随后放置提前制备的艾炷(直径 7 mm, 高 9 mm 圆锥形)。

点燃施灸, 持续 20 min, 每日 1 次, 共治疗 14 d。抑制剂组每日施灸前 15 min 予以腹腔注射格列本脲 10 μg/kg^[10], 再接受与隔姜隔盐灸组同样的操作, 共 14 d。模型组与假手术组大鼠仰卧位固定于固定器内, 不做其他处理, 共 14 d。

1.5 观察指标及检测方法

尿流动力学及肌电检测: 末次干预结束后, 采用 Cred 手法排空膀胱, 腹腔注射 10% 乌拉坦(10 mL/kg)麻醉, 将导尿管置入尿道。腹部备皮, 碘伏消毒, 在大鼠耻骨联合上约 5~20 mm 处做 10~15 mm 纵行切口, 依次切开, 充分暴露膀胱。将自制银丝电极置入膀胱体两侧肌层, 另一端分别连接到前置放大器的正负极, 针灸针刺入大鼠尾部连接地线。Neurolog 测控系统参数设置: 高通滤波 10 Hz, 低通滤波 1 kHz。三通阀一端连接微量注射泵, 将一通道压力值调零后, 向膀胱内以 0.2 mL/min 速度注入预热的 0.9% 氯化钠溶液, 另一端连接压力传感器及多通道生物信号记录仪, 记录大鼠膀胱充盈过程中, 尿液从尿道外口漏出时的膀胱内压力为膀胱漏尿点压, 首次漏尿压力即为首次膀胱漏尿点压力; 计算连续两次排尿的间隔, 膀胱在充盈过程中压力与容量的变化关系为膀胱顺应性, 记录大鼠 3~5 个排尿周期, 取平均值; 在观察大鼠排尿过程时同步记录所对应的肌电活动, 即排尿时膀胱肌肉收缩平均振幅及中值频率, 记录大鼠 3~5 个排尿周期肌电数据, 取平均值。

大鼠膀胱逼尿肌细胞的原代提取及鉴定: 末次干预结束后, 大鼠颈椎脱臼处死, 剖腹取出膀胱, 立即置于 4 °C 预冷的 D-Hank's 液中。在体视镜下将膀胱黏膜层及外膜剥离。清洗膀胱数次后转移至装有预热的 0.2% 消化酶的离心管内。将膀胱分为大小约 0.5 mm×0.5 mm×0.5 mm 组织块, 再将含有组织的消化酶转移到 6 孔板内, 每孔 500 μL。每孔内再添加 1 mL 的 0.2% 消化酶, 于 37 °C、5% CO₂ 培养箱内孵育 10 min。当镜下看到较多的梭形细胞, 吸取上清转移至 15 mL 的离心管内, 加入 2 倍体积 10% 培养基, 轻柔吹打混匀中止消化。将 6 孔板内膀胱组织加入新的消化酶 500 mL 继续消化, 重复上述吹打, 吸取上清, 终止消化的步骤, 如此反复多次。将中止消化的上清液放入离心机中离心 8 min。弃去上清, 加入 10% 的细胞培养液, 轻柔吹打, 重悬细胞, 用 200 目筛网过滤, 再将细胞悬液接种于细胞爬片上, 于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。待细胞生长至 80%~90% 时进行细胞鉴定。吸弃培养基, 用

PBS轻柔清洗2次,每次5 min。加入4℃的4%多聚甲醛,室温固定15 min,吸弃固定液,用PBS清洗2次,每次5 min。加入封闭液室温孵育40 min。吸弃封闭液,添加稀释后的 α -SMA一抗(1:1 000)4℃孵育过夜。吸弃一抗,用PBS清洗3次,每次5 min。滴加荧光素标记的二抗(1:250)37℃避光孵育1 h,最后5 min加入10 μ L的DAPI溶液。弃去溶液,用PBS避光洗涤细胞3次,每次5 min,镜下观察细胞。

全细胞膜片钳记录:细胞贴壁培养24 h后,将细胞爬片转移至膜片钳记录的浴槽内,加入细胞外液(pH=7.4、渗透压为300 mOsm/L) 2 mL,连接地线。拉制玻璃微电极,将充液后的玻璃电极固定于膜片钳放大器上,另一端连接1 mL的注射器用于负压吸引目标细胞,通过倒置相差显微镜,先在低倍视野中筛选贴壁、边界清晰、表面平滑、形态规则、立体感较强的逼尿肌细胞,将其调至镜头中央位置,随后切换至高倍镜便于镜下操作。打开PatchMaster软件操作界面,充液玻璃微电极(pH=7.2、渗透压为295 mOsm/L)入液后电阻控制在2~5 M Ω 之间,细胞与电极形成G Ω 封接,电容自动补偿后稍给负压以破膜,随后进行串连电阻60%~80%补偿。全细胞电压钳模式下进行记录,钳制电位为-40 mV,刺激脉冲从-80 mV去极化至+80 mV,每10 mV为一个步阶,时隔15 ms,频率0.25 Hz,实验室温维持在18~24℃,记录背景电流。向浴槽内加入K_{ATP}通道特异性开放剂吡那地尔50 μ mol,5 min稳定后记录细胞电流。以电流密度(pA/pF)表示电流数值,绘制电压-电流(I-V)曲线。

细胞内钙成像检测:将培养48 h的细胞镜下观察,选取贴壁良好,形态规则的细胞进行实验。将选取的细胞爬片转移至共聚焦皿内,用PBS清洗5 min。避光解冻Fluo-4储备液,用基础培养基将其稀释为5 μ mol的工作液,将染料工作液加入共聚焦皿内,37℃避光孵育30 min。孵育结束后吸弃染料,D-Hank's清洗2次,每次5 min。共聚焦皿内加入1 mL的D-Hank's液,放置于避光保湿盒中准备上机。共聚焦显微镜设置激发光波长为488 nm,时间序列每2 s采集1帧图像,采集时间为2 min。镜下选取细胞形态完整,染色均匀,分布密度高的区域进行扫描。扫描第10秒,向培养皿内加入100 μ L稀释后的格列本脲,继续采集图像。使用NIS-Elements AR 4.6软件进行图像分析,在图像中手动选择感兴趣的细胞区域,得到在时间变化下细胞荧光强度的

数值。将扫描前10 s数据均值为基线钙荧光强度F₀,通道激活后钙荧光强度为F₁,F₁/F₀为钙荧光强度变化,相对钙荧光强度为 $\Delta F/F_0=(F_{1max}-F_0)/F_0$ 。

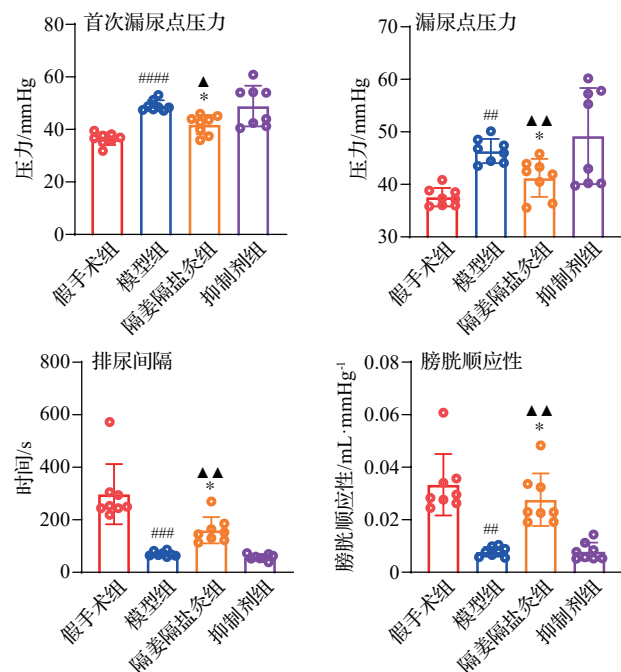
1.6 统计学方法

应用GraphPad Prism 8.0.1软件对数据进行统计,计量数据采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,数据符合正态分布和方差齐性,使用单因素方差分析进行多重比较,继以LSD检验进行两两比较;数据不满足正态性或方差齐性,则选用Kruskal-Wallis检验。以P \leq 0.05为差异有统计学意义的标准。

2 结果

2.1 各组大鼠尿流动力学参数变化

与假手术组比较,模型组大鼠首次漏尿点压力(P<0.000 1)及漏尿点压力(P<0.01)升高,排尿间隔缩短(P<0.001),膀胱顺应性降低(P<0.01);与模型组比较,隔姜隔盐灸组大鼠膀胱首次漏尿点压力及漏尿点压力降低(P<0.05),排尿间隔延长(P<0.05),膀胱顺应性提高(P<0.05);与抑制剂组比较,隔姜隔盐灸组大鼠首次漏尿点压力(P<0.05)及漏尿点压力(P<0.01)降低,排尿间隔延长(P<0.01),膀胱顺应性提高(P<0.01)。见图1。



注:1 mmHg \approx 0.133 kPa。与假手术组相比, #P<0.01, ###P<0.001, ####P<0.000 1;与模型组相比, *P<0.05;与抑制剂组相比, ^P<0.05, ^^P<0.01。

图1 各组大鼠尿流动力学参数比较($\bar{x} \pm s$, 8只鼠/组)

Fig. 1 Comparison of changes in urodynamic parameters of rats in the 4 groups($\bar{x} \pm s$, 8 rats/group)

2.2 各组大鼠膀胱逼尿肌肌电变化

假手术组尿流动力曲线和肌电活动呈现出一定的规律性,排尿时逼尿肌能强有力地进行收缩。模型组与抑制剂组尿流曲线密集,呈“锯齿状”,排尿活动频繁,排尿时逼尿肌小幅度收缩。隔姜隔盐灸组排尿间隔延长,膀胱逼尿肌收缩力增强。与假手术组比较,模型组膀胱逼尿肌收缩平均振幅及中值频率降低($P<0.0001$)。隔姜隔盐灸组排尿时肌肉收缩振幅($P<0.001$)与中值频率($P<0.0001$)均高于模型组及抑制剂组。见图2。

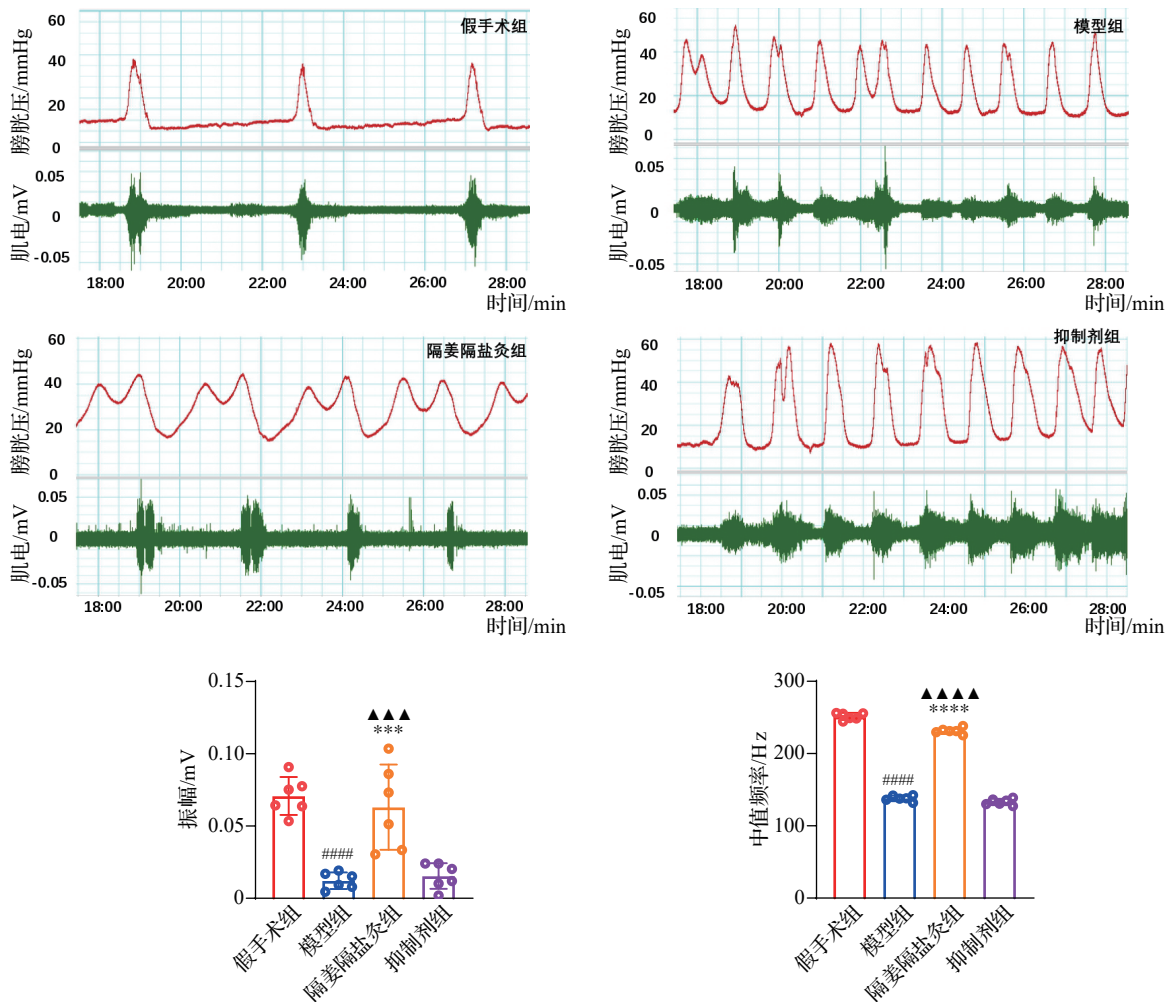
2.3 大鼠膀胱原代逼尿肌细胞形态

低倍镜下细胞排列密集,呈梭状及短棒状,高倍镜下细胞的形态清晰,细胞核的轮廓明显,细胞质内可见到细小的颗粒状结构,这些可能是细胞内的肌丝和细胞器。荧光染色显示细胞呈长梭形或多边形,边界清晰, α -SMA(绿色)标记的肌丝沿细

胞长轴排列,形成平行条纹或网状结构,细胞核呈椭圆形或长杆状,位于中央。见图3。

2.4 各组大鼠逼尿肌细胞 K_{ATP} 通道电流变化比较

在正常记录钾电流灌流液中,各组电流密度均处于低水平状态,模型组背景电流密度最低,细胞通过电流及转运 K^+ 能力较弱。给予 K_{ATP} 通道特异性开放剂吡那地尔激活后,可见 K_{ATP} 通道的I-V曲线随着电压增加,各组电流密度随之增加,模型组电流改变缓慢,假手术组抬升最为明显,隔姜隔盐灸组次之。在电压顶点80 mV时,各组电流密度差异最为显著,因此我们选取电压顶点值(即脉冲电压为80 mV)时对应的电流值进行数据分析。当给予细胞正常记录钾电流灌流液时,记录到背景电流密度模型组较假手术组降低($P<0.0001$)。与模型组比较,隔姜隔盐灸干预后背景电流密度上升($P<0.0001$),抑制剂组背景电流密度低于隔姜隔盐灸



注:与假手术组相比,#### $P<0.0001$;与模型组相比,*** $P<0.001$,**** $P<0.0001$;与抑制剂相比,▲▲ $P<0.001$,▲▲▲ $P<0.0001$ 。

图2 各组大鼠膀胱逼尿肌肌电变化比较($\bar{x}\pm s$,6只鼠/组)

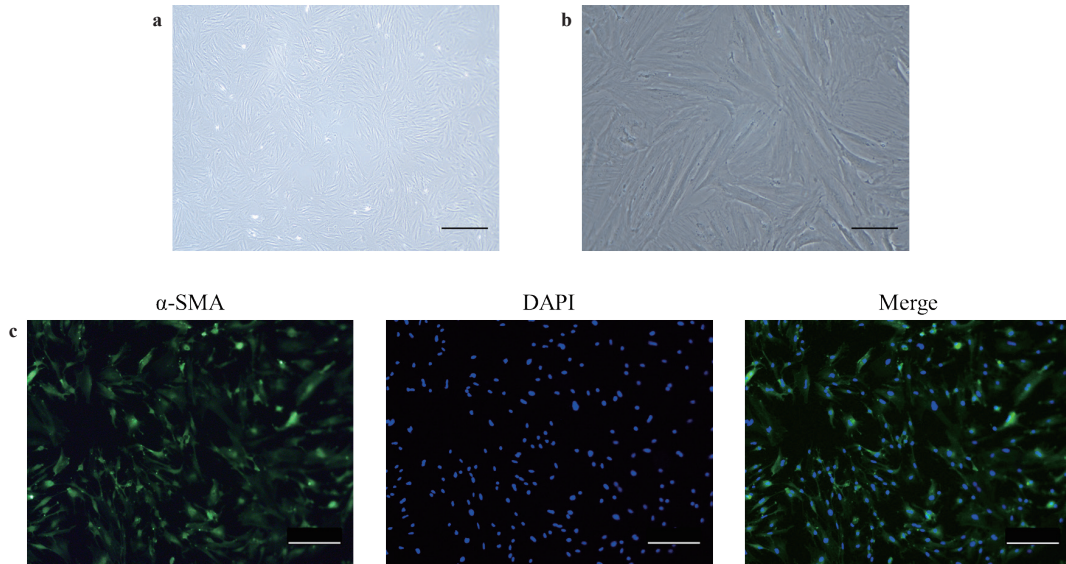
Fig. 2 Comparison of electromyographic changes in the detrusor muscle of the bladder of rats in the 4 groups ($\bar{x}\pm s$, 6 rats/group)

组($P<0.0001$)。给予吡那地尔激活后,模型组电流密度仍显著低于假手术组($P<0.0001$)。与模型组相比,隔姜隔盐灸组可上调 K_{ATP} 通道电流密度($P<0.0001$);抑制剂组可抑制艾灸对 K_{ATP} 通道电

流密度的升高($P<0.0001$)。见图4。

2.5 各组大鼠细胞内钙离子活动变化比较

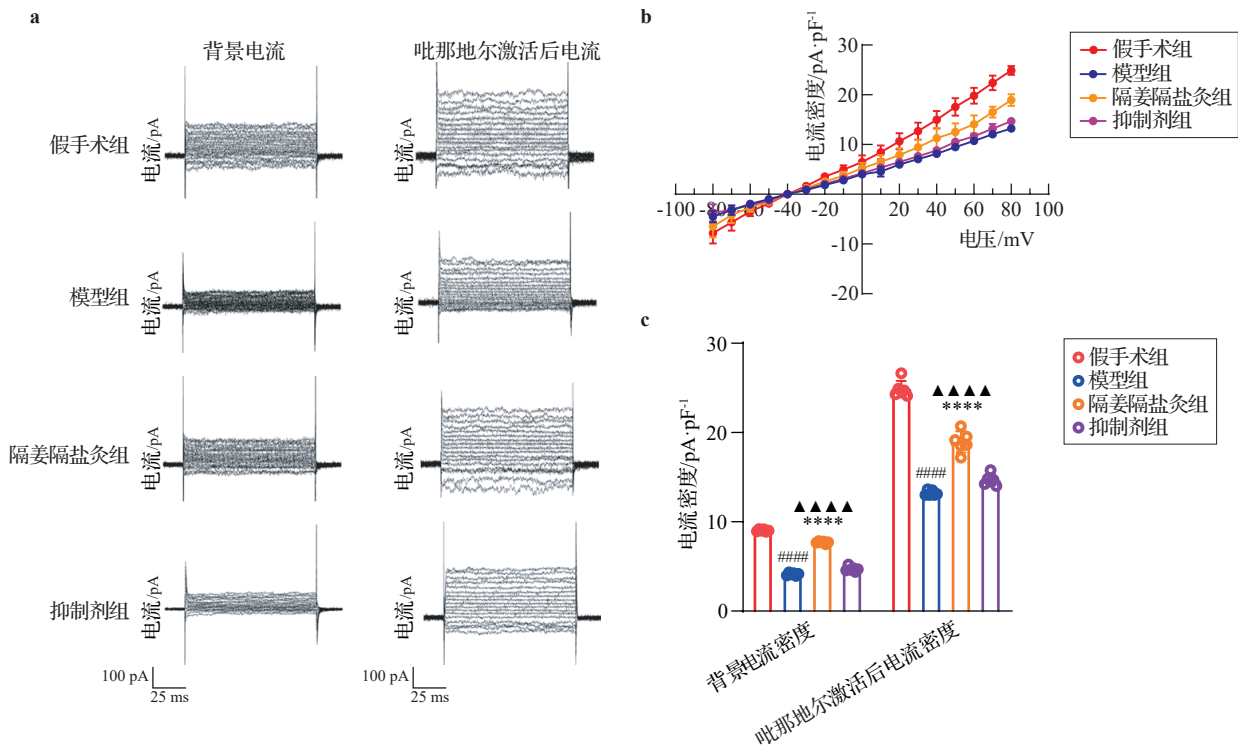
与假手术组比较,模型组细胞内相对钙荧光变化比值升高($P<0.0001$)。与模型组比较,隔姜隔



注:α-SMA为α-肌球蛋白。a为明场,标尺=400 μm;b为明场,标尺=80 μm;c为免疫荧光染色,标尺=200 μm。

图3 大鼠膀胱原代逼尿肌细胞

Fig. 3 Primary detrusor muscle cells of rat bladder



注:a为各组 K_{ATP} 通道吡那地尔激活前背景电流及吡那地尔激活后电流;b为各组 K_{ATP} 通道吡那地尔激活后的I-V曲线;c为各组80 mV脉冲电压下吡那地尔激活前后 K_{ATP} 通道电流密度。与假手术组相比,#### $P<0.0001$;与模型组相比,**** $P<0.0001$;与抑制剂组相比,▲▲▲ $P<0.0001$ 。

图4 各组大鼠逼尿肌细胞 K_{ATP} 通道电流变化比较($\bar{x}\pm s$,5只鼠/组)

Fig. 4 Comparison of current changes in K_{ATP} channels in detrusor cells of rats in the 4 groups($\bar{x}\pm s$, 5 rats/group)

盐灸干预后细胞钙荧光变化比值降低($P<0.0001$), 抑制剂组较隔姜隔盐灸组细胞内钙荧光变化比值增加($P<0.0001$)。细胞钙荧光点强度变化热图同步印证模型组及抑制剂组细胞内钙离子活动活跃, 有数个钙活动峰值, 且持续时间较长。见图5。

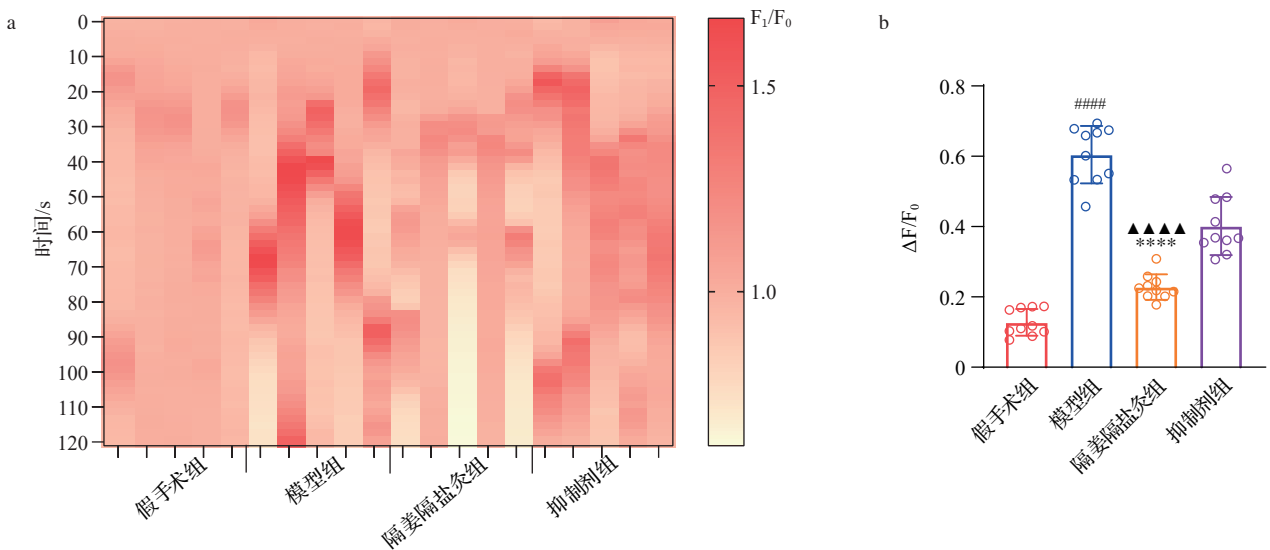
3 讨论

DH是由多种原因引起的逼尿肌过度收缩的症状, 抗胆碱药作为一线用药多联合 β_3 肾上腺素受体激动剂使用, 但 β_3 肾上腺素受体激动剂易造成心率加快及胃肠道反应, 长期使用胆碱能药物会加速大脑老化^[11]。针灸在治疗该病中发挥着积极作用, 一项关于近10年针灸治疗成人膀胱过度活动症的Meta分析结果显示, 针灸能减少24h内的排尿次数, 且不良反应低于口服药物^[12]。DH在中医中属“遗溺”范畴, 病位在膀胱, 其核心病机为肾阳虚衰, 膀胱失约, 下元亏虚, 膀胱不得温养, 气化功能失司则尿频、尿急, 肾气不固, 膀胱失约则尿失禁, 逼尿肌失于制约而亢进。治疗上当以温补肾阳, 固摄下焦, 李梴《医学入门》云:“灸法, 虚者灸之使火气助元气。”

隔物灸通过在艾炷与皮肤之间放置特定的间隔物, 借助灸法的热力将药物的有效成分导引至相应的腧穴及病灶, 在内外妇儿等多领域应用^[13-15]。神阙位于肚脐中央, 属任脉腧穴, 冲脉所系, 通于五

脏, 是人体生命重要枢纽。现代医学表明肚脐是胚胎发育过程中腹壁最后闭合处, 是人体经穴中唯一具备血管横断面结构特征的腧穴, 其下分布丰富的神经网络和血管网, 形成独特的“脉管系统”, 为生命活动提供丰富物质基础^[16]。脐部表皮角质层薄, 无皮下脂肪, 在接受同样条件的温热刺激下, 神阙具备微循环的特殊性与优越性, 可避开首过效应, 有利于药物渗透吸收进入循环系统^[17]。临床显示相比于非脐部经皮给药, 肚脐部位经皮给药的生物利用率、药物累计渗透和保留度都更高^[18-19]。《本草纲目》载:“盐为百药之主, 能下行入肾, 调和脏腑。”生姜性辛温, 可温经散寒, 走窜特性助艾火透达经络, 其温热之性可驱散下焦寒湿, 促进气血运行, 两者合用共奏温补肾阳, 通利水道之功。

临床研究显示隔姜隔盐灸联合盆底肌电刺激生物反馈治疗可减轻产后压力性尿失禁症状, 提高盆底肌肌力, 减少混合性尿失禁患者排尿次数, 降低患者并发症发生率^[20-21]。本研究结果显示, 2周隔姜隔盐灸干预可在一定程度上改善大鼠的排尿功能, 降低漏尿点压力, 延长排尿间隔, 提高膀胱顺应性。肌电结果显示隔姜隔盐灸干预后大鼠逼尿肌收缩振幅及中值频率增加, 膀胱主动排空能力增强。特异性阻断 K_{ATP} 通道可加剧膀胱过度收缩现象, 逼尿肌收缩振幅及中值频率降低, 膀胱内始终处于“高压低排”状态, 提示隔姜隔盐灸干预与 K_{ATP}



注: a为各组膀胱逼尿肌细胞荧光强度变化的代表性热图; b为各组膀胱逼尿肌细胞相对荧光强度变化图。F₀为基线钙荧光强度, F₁为通道激活后钙荧光强度, F₁/F₀为钙荧光强度变化, ΔF为钙荧光强度的变化量, ΔF/F₀为相对钙荧光强度。与假手术组相比, #### $P<0.0001$; 与模型组相比, **** $P<0.0001$; 与抑制剂组相比, ▲▲▲▲ $P<0.0001$ 。

图5 各组大鼠膀胱逼尿肌细胞内钙离子活动变化 ($\bar{x}\pm s$, 5只鼠/组)

Fig. 5 Changes in intracellular calcium activity in bladder detrusor muscle cells of rats from different groups ($\bar{x}\pm s$, 5 rats/group)

通道密切相关。

本研究采用急性分离酶消化进行原代细胞的提取,通过 α -SMA特异性抗体染色阳性验证该法的可行性。 K_{ATP} 通道通过调节细胞膜电位和细胞内外 K^+ 的浓度,从而影响细胞的兴奋性。膜片钳结果显示与模型组比较,隔姜隔盐灸可增加通道电流密度,在电压80 mV条件下观察到通道电流密度升高,逼尿肌细胞转运 K^+ 效率提高, K^+ 外流增多,细胞膜超极化和细胞兴奋性降低。钙成像结果显示,艾灸干预后细胞内钙荧光强度降低,胞内钙活动水平下降,钙浓度峰值数量减少且持续时间缩短,细胞的兴奋性被抑制,膀胱过度收缩得以调节。抑制剂组细胞上通道密度低于隔姜隔盐灸组,隔姜隔盐灸作用大部分被格列本脲所抑制,通道 K^+ 转运效率降低,细胞膜静息状态被打破发生去极化,细胞兴奋性升高, Ca^{2+} 内流增多,表现为数个钙浓度峰值,持续时间长,细胞内钙活动增加,膀胱收缩亢进。既往研究显示在野生型小鼠趾长伸肌中, K_{ATP} 激动剂匹那酸可使动作电位幅度下降30%,单次强直收缩力降低约25%^[22],右美托咪啶可通过抑制大鼠心室肌细胞 K_{ATP} 通道达到抗心律失常效果^[23]。 K_{ATP} 缺陷小鼠的肌纤维在疲劳过程中表现出更快的胞质钙(Ca^{2+})浓度下降,野生型小鼠在37℃疲劳期间, K_{ATP} 阻断剂格列本脲作用于趾短屈肌纤维可使 Ca^{2+} 下降时间缩短50%^[24]。上述研究结果同步印证 K_{ATP} 通道在参与细胞兴奋-收缩耦联及钙信号调控中的作用。

综上所述,隔姜隔盐灸可降低膀胱漏尿点压力,延长排尿间隔,提高膀胱顺应性,逼尿肌收缩耐力增强。隔姜隔盐灸后大鼠的逼尿肌细胞 K_{ATP} 通道电流密度升高,通道开放程度效率提升, K^+ 外流增多,细胞膜超极化,细胞内钙离子浓度降低,抑制膀胱收缩增加。抑制 K_{ATP} 后,隔姜隔盐灸对膀胱功能的改善作用受到抑制。

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突。

参考文献

- [1] KARSY M, HAWRYLUK G. Modern medical management of spinal cord injury[J]. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 2019, 19(9): 65.
- [2] 温雅丽,张露芬,付渊博,等.隔姜隔盐灸神阙穴治疗缺血性中风后急性尿失禁45例随机对照临床观察[J].*中医杂志*, 2014, 55(19): 1648-1651.
WEN Y L, ZHANG L F, FU Y B, et al. Clinical observation on ginger-salt-separated moxibustion on Shenque (CV 8) for 45 cases of urge incontinence after ischemic stroke: a random control trial (in Chinese) [J]. *Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2014, 55(19): 1648-1651.
- [3] 宋波.逼尿肌兴奋性及逼尿肌不稳定[J].*第三军医大学学报*, 2003, 25(22): 1969-1971.
SONG B. Detrusor excitability and instability (in Chinese) [J]. *Acta Academiae Medicinae Militaris Tertiae*, 2003, 25(22): 1969-1971.
- [4] 邵丽静,赵伟,陈渊.ATP敏感性钾通道的研究进展[J].*中国生物制品学杂志*, 2021, 34(8): 994-1001.
SHAO L J, ZHAO W, CHEN Y. Progress in research on ATP-sensitive potassium channel (in Chinese) [J]. *Chinese Journal of Biologicals*, 2021, 34(8): 994-1001.
- [5] FLAGG T P, ENKVETCHAKUL D, KOSTER J C, et al. Muscle KATP channels: recent insights to energy sensing and myoprotection[J]. *Physiol Rev*, 2010, 90(3): 799-829.
- [6] 廖宇翔,刘璐,付渊博,等.隔姜隔盐灸“神阙”对逼尿肌过度活动大鼠膀胱ATP敏感性钾离子通道的影响[J].*针刺研究*, 2024, 49(8): 814-820.
LIAO Y X, LIU L, FU Y B, et al. Effect of moxibustion on ATP-sensitive potassium channel (K_{ATP}) of bladder in detrusor overactivity rats (in Chinese) [J]. *Acupuncture Research*, 2024, 49(8): 814-820.
- [7] SHAKER H, MOURAD M S, ELBIALY M H, et al. Urinary bladder hyperreflexia: a rat animal model [J]. *Neurourol Urodyn*, 2003, 22(7): 693-698.
- [8] KAJBAFZADEH A M, MOHAMMADINEJAD P, HOJJAT A, et al. The timing of established detrusor hyperreflexia in a rat model of neuropathic bladder[J]. *J Surg Res*, 2012, 178(1): 346-351.
- [9] 纪峰,林莺,张木兰,等.成年雌性大鼠“神阙”穴定位方法探析[C]//第十七届针灸对机体功能的调节机制及针灸临床独特经验研讨会会议论文集.兰州,2014: 28-30.
JI F, LIN Y, ZHANG M L, et al. Analysis of the localization method of the “Shenque” acupoint in adult female rats (in Chinese) [C]// Proceedings of the 17th Symposium on the Regulatory Mechanism of Acupuncture on Body Functions and Unique Clinical Experience of Acupuncture. Lanzhou, 2014: 28-30.
- [10] SIMARD J M, YUROVSKY V, TSYMBALYUK N, et al. Protective effect of delayed treatment with low-dose glibenclamide in three models of ischemic stroke[J]. *Stroke*, 2009, 40(2): 604-609.
- [11] CAI X Y, CAMPBELL N, KHAN B, et al. Long-term anticholinergic use and the aging brain [J]. *Alzheimers Dement*, 2013, 9(4): 377-385.
- [12] LI W, HU J W, JIN Z, et al. Meta-analysis of acupuncture-moxibustion treatment of overactive bladder in adults in the past decade[J]. *J Acupunct Tuina Sci*, 2023, 21(1): 82-90.
- [13] 翟春涛,田岳凤.基于现代文献隔盐灸临床应用研究[J].*中国中医基础医学杂志*, 2017, 23(10): 1453-1455.
ZHAI C T, TIAN Y F. Clinical application research on separated-salt moxibustion based on modern literature research (in Chinese) [J]. *Chinese Journal of Basic Medicine in*

- Traditional Chinese Medicine, 2017, 23(10): 1453-1455.
- [14] 熊娅萌, 丁悦. 隔姜灸对脾虚型泄泻患儿的症状改善作用[J]. 中国中医药现代远程教育, 2024, 22(24): 121-123.
XIONG Y M, DING Y. Effect of ginger moxibustion on improving the symptoms of diarrhea in children with spleen deficiency (in Chinese) [J]. Chinese Medicine Modern Distance Education of China, 2024, 22(24): 121-123.
- [15] 孟昱琼, 高强, 翟婷婷, 等. 暖宫调经汤口服联合八髎穴隔姜灸治疗阳虚宫寒型卵巢早衰患者65例临床观察[J]. 中医杂志, 2025, 66(1): 59-64.
MENG Y Q, GAO Q, ZHAI T T, et al. Nuangong Tiaojing decoction (暖宫调经汤) combined with ginger moxibustion at Baliao (八髎) acupoints for patients with premature ovarian failure of yang-deficiency uterus-coldness syndrome: 65 cases clinical observation (in Chinese) [J]. Journal of Traditional Chinese Medicine, 2025, 66(1): 59-64.
- [16] 姜劲峰, 徐旺芳, 俞兴根, 等. 基于血管生物学的神阙穴特异性解析[J]. 中国针灸, 2017, 37(12): 1304-1308.
JIANG J F, XU W F, YU X G, et al. Analysis of specificity of Shenque(CV 8) based on vascular biology (in Chinese)[J]. Chinese Acupuncture & Moxibustion, 2017, 37(12): 1304-1308.
- [17] 蒋颖, 戴文君, 姜劲峰. 腹部常用穴区微循环血流灌注量的差异及不同温度艾灸的影响[J]. 南京中医药大学学报, 2017, 33(4): 339-343.
JIANG Y, DAI W J, JIANG J F. Effect of moxibustion at different temperatures on the difference of microcirculatory blood perfusion at commonly-used abdominal points area (in Chinese) [J]. Journal of Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, 2017, 33(4): 339-343.
- [18] JASWANTH GOWDA B H, AHMED M G, HUSAIN A. Transfersosomal in situ gel administered through umbilical skin tissues for improved systemic bioavailability of drugs: a novel strategy to replace conventional transdermal route [J]. Med Hypotheses, 2022, 161: 110805.
- [19] WEI L, LUO Y M, ZHANG X P, et al. Topical therapy with rhubarb navel plasters in patients with chronic constipation: results from a prospective randomized multicenter study[J]. J Ethnopharmacol, 2021, 264: 113096.
- [20] 陶琴芳, 钱彩锋, 陆雅萍. 隔姜隔盐灸联合盆底电刺激生物反馈治疗产后压力性尿失禁的随机对照观察[J]. 中国中医药科技, 2024, 31(6): 1100-1102.
TAO Q F, QIAN C F, LU Y P. Randomized controlled observation on the treatment of postpartum stress urinary incontinence with ginger-separated moxibustion combined with pelvic floor electrical stimulation biofeedback (in Chinese)[J]. Chinese Journal of Traditional Medical Science and Technology, 2024, 31(6): 1100-1102.
- [21] 黄月娥, 赵格格. 金樱固肾缩泉汤联合隔姜隔盐灸治疗女性混合性尿失禁临床观察[J]. 四川中医, 2019, 37(10): 151-153.
HUANG Y E, ZHAO G G. Clinical observation on the treatment of female mixed urinary incontinence with Jinying Gushen Suoquan decoction combined with ginger-separated and salt-separated moxibustion (in Chinese) [J]. Journal of Sichuan of Traditional Chinese Medicine, 2019, 37(10): 151-153.
- [22] GONG B, LEGAULT D, MIKI T, et al. KATP channels depress force by reducing action potential amplitude in mouse EDL and soleus muscle[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2003, 285(6): C1464-C1474.
- [23] 成红. 右美托咪定对大鼠心室肌细胞膜ATP敏感性钾通道电流的影响[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2017.
CHENG H. The effect of dexmedetomidine on ATP-sensitive potassium channel currents in rat ventricular muscle cell membranes (in Chinese) [D]. Shijiazhuang: Hebei Medical University, 2017.
- [24] CIFELLI C, BOURASSA F, GARIÉPY L, et al. KATP channel deficiency in mouse flexor digitorum brevis causes fibre damage and impairs Ca²⁺ release and force development during fatigue in vitro [J]. J Physiol, 2007, 582 (Pt 2): 843-857.

收稿日期: 2025-03-30 修回日期: 2025-07-03
网络首发: 2026-01-13 编辑: 刘婉宁