

## · 基础研究 ·

## 塞来昔布对压力性尿失禁模型大鼠的效果及作用机制

王 鸿, 齐振阳, 王 建

(河南省南阳市第一人民医院泌尿外科, 河南南阳 473010)

## Effects and mechanism of celecoxib on model rats of stress urinary incontinence

WANG Hong, QI Zhen-yang, WANG Jian

(Department of Urology, Nanyang First People's Hospital, Nanyang 473010, China)

**ABSTRACT:** Objective To explore the effects and mechanism of celecoxib on stress urinary incontinence in rats. Methods

Rat models of stress urinary incontinence were established and divided into model group ( $n=18$ ), celecoxib group ( $n=18$ ) and normal group ( $n=10$ ). Rats in celecoxib group were intervened with celecoxib. Rats in model group and normal group were intervened with sterile distilled water of equal volume. The urodynamic indexes were detected with sneeze test. Then the pressure of leaking point (LPP) and abdominal leaking point (ALPP) were measured. The pathomorphological characteristics were observed. The expressions of transforming growth factor- $\beta$  1 (TGF- $\beta$ 1) and connective tissue growth factor (CTGF) pathway protein were determined with Western blot. The levels of cyclooxygenase-2 (COX-2), lipid oxidase (LOX), and matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) were detected with enzyme-linked immunosorbent assay. Results The positive rate of sneezing test was higher in model group than in celecoxib group (66.67% vs. 27.78%,  $P<0.05$ ). The levels of LPP, ALPP, TGF- $\beta$ 1, CTGF and LOX were model group < celecoxib group < normal group (all  $P<0.05$ ). The levels of COX-2 and MMP-2 were model group > celecoxib group > normal group (all  $P<0.05$ ). Conclusion Celecoxib has a significant effect on model rats of stress urinary incontinence. Regulating the TGF- $\beta$ /CTGF pathway protein can improve the levels of COX-2, LOX and MMP-2 in rats, which provides a direction for research on the treatment and prevention of stress urinary incontinence.

**KEY WORDS:** celecoxib; stress urinary incontinence; urodynamics

**摘要:** 目的 研究塞来昔布对压力性尿失禁模型大鼠的干预效果及作用机制。方法 建立压力性尿失禁大鼠模型后分为模型组和塞来昔布组各 18 只, 正常组 10 只。塞来昔布组大鼠采用塞来昔布进行干预, 模型组和正常组大鼠采用等体积的无菌蒸馏水干预, 设置喷嚏试验, 检测尿流动力学指标, 然后测定漏尿点压力(LPP)、腹部漏尿点压力(ALPP), 观察 3 组大鼠病理形态学特征, Western blot 检测转化生长因子- $\beta$ 1(TGF- $\beta$ 1)、结缔组织生长因子(CTGF)通路蛋白表达, 酶联免疫吸附试验法检测环氧酶 2(COX-2)、脂肪氧化酶(LOX)、基质金属蛋白酶-2(MMP-2)蛋白水平。结果 喷嚏实验阳性率模型组 66.67%, 显著大于塞来昔布组的 27.78%, 差异具有显著性统计学意义( $P<0.05$ ); LPP、ALPP、TGF- $\beta$ 1、CTGF 水平及 LOX 蛋白水平均为模型组 < 塞来昔布组 < 正常组( $P$  均 < 0.05), COX-2、MMP-2 蛋白水平均为模型组 > 塞来昔布组 > 正常组( $P$  均 < 0.05)。结论 塞来昔布对压力性尿失禁模型大鼠的治疗效果显著, 通过调控 TGF- $\beta$ 1/CTGF 通路蛋白, 可以改善大鼠 COX-2、LOX、MMP-2 水平, 对于治疗和预防压力性尿失禁的研究提供了方向。

**关键词:** 塞来昔布; 压力性尿失禁; 尿流动力学**中图分类号:** R691**文献标志码:** A**DOI:** 10.3969/j.issn.1009-8291.2020.01.016

压力性尿失禁由国际尿控协会定义为喷嚏或咳嗽等腹压增高时出现不自主的尿液自尿道外口渗漏, 症状表现为强体力活动、喷嚏、大笑等腹压增加时不自主地溢尿行为<sup>[1]</sup>。压力性尿失禁在中老年女性群体中发病率较高, 长期不自主漏尿容易导致患者产生抑郁、自卑等负面情绪, 严重影响其身心健康以及生活质量。目前临床医学关于药物治疗压力性尿失禁的研究一直未取得突破性进展, 病情严重程度较轻、

不愿接受手术治疗的患者对药物治疗的需求较高, 因此寻找一种有效的药物对压力性尿失禁进行治疗具有重要意义。压力性尿失禁动物模型是研究压力性尿失禁的发病机制及临床疗效的载体, 现阶段存在的压力性尿失禁动物模型种类多样, 例如: 阴部神经损伤、模拟分娩、尿道周围组织破坏等都是建立压力性尿失禁模型的主要方法, 然而这些方法各有其优缺点, 怎样去探索一种操作简便、稳定性高的动物模型对研究压力性尿失禁病理机制就显得尤为重要<sup>[2-3]</sup>。最新研究发现, 塞来昔布可改善女性压力性尿失禁患者漏尿程度, 但是关于塞来昔布治疗压力性尿失禁的

收稿日期: 2019-03-12

修回日期: 2019-09-23

作者简介: 王鸿, 副主任医师, 研究方向: 临床泌尿外科。

E-mail: wpfow77@163.com

作用机制尚未研究透彻<sup>[4]</sup>。本研究建立压力性尿失禁大鼠模型,并使用塞来昔布进行干预,旨在探究塞来昔布对压力性尿失禁动物模型大鼠的干预效果及作用机制。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 选取50只雌性、健康、未育SD大鼠;体重250~300 g,平均(265.5±15.5)g;月龄2~3月,平均(2.5±0.2)月。所有大鼠在无病原菌的干净笼子里喂养,所饮用的水和食物均进行过高温及高压消毒。本文研究均经过我院伦理委员会批准。

### 1.2 方法

**1.2.1 压力性尿失禁模型建立** 参照张淑静<sup>[5]</sup>研究中建模方法并进行适当改进,选取40只大鼠建立压力性尿失禁模型,另外10只不作处理。所有大鼠保持仰卧位,用10%的水合氯醛对大鼠进行麻醉,并使用输尿管引流尿液。使用去头的气囊尿管制作扩张气囊,将其置入阴道内2 cm,并缝合固定。向气囊内注入生理盐水4 mL,4 h后将输尿管及扩张气囊拔出并进行消毒。之后对所有大鼠饲养30 d,并进行尿流动力学检测以及喷嚏实验判断压力性尿失禁模型建立成功情况,最终建模成功36只。

**1.2.2 分组及给药** 建模过程中36只大鼠建模成功,随机分为模型组和塞来昔布组各18只,正常组10只。塞来昔布组大鼠采用塞来昔布进行治疗,所有大鼠均采用灌胃的形式,剂量为200 mg/d,每日早晚各1次;模型组和正常组大鼠采用等体积的无菌蒸馏水进行灌胃,连续治疗1个月。3组大鼠平均体重、平均年龄比较均无统计学意义( $P>0.05$ ),具有可比性。

**1.2.3 喷嚏试验** 在大鼠口鼻部位撒少量胡椒粉对大鼠进行刺激,以诱发喷嚏动作,观察是否尿液自尿

道口溢出,有尿液溢出为阳性,否则为阴性。若胡椒粉刺激未能诱发喷嚏,则使用鼠须刺激大鼠鼻孔以诱发喷嚏动作。

**1.2.4 尿流动力学指标检测** 对3组大鼠都进行膀胱顶导管植入术,并且测定漏尿点压力(leak point pressure, LPP)、腹部漏尿点压力(abdominal leak point pressure, ALPP)。

**1.2.5 切片处理及HE染色** 使用30 mg/kg戊巴比妥钠对3组大鼠进行腹腔注射麻醉处理,取各组大鼠尿道组织,液氮冷冻后进行切片处理,并进行HE染色。

**1.2.6 指标监测** Western blot检测转化生长因子- $\beta$ 1(transforming growth factor- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 1)/结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)通路蛋白TGF- $\beta$ 1、CTGF相对表达量;酶联免疫吸附试验法检测环氧化酶2(cyclooxygenase 2, COX-2)、脂肪氧化酶(lipoxygenase, LOX)、基质金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinases, MMP-2)蛋白水平,检测过程严格按照ELISA试剂盒说明书进行。

**1.3 统计学处理** 采用SPSS19.0统计软件包进行统计分析处理。计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 描述,多组间比较采用 $F$ 检验;计数资料采用例数和百分率进行描述。 $P<0.05$ 为具有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 3组大鼠喷嚏实验阳性率比较** 正常组未见尿液从尿道口流出,模型组12只大鼠喷嚏时见尿液自尿道口流出,塞来昔布组有5只大鼠尿道口流出尿液。喷嚏实验阳性率模型组66.67%,显著大于塞来昔布组的27.78%,差异具有统计学意义( $P<0.05$ ,表1)。

表1 3组大鼠喷嚏实验阳性、尿流动力学及Western blot检测指标比较

组别	n	喷嚏实验[例(%)]		尿流动力学( $\bar{x}\pm s$ )		Western blot( $\bar{x}\pm s$ )	
		阳性	阴性	LPP(kPa)	ALPP(kPa)	TGF- $\beta$ 1	CTGF
正常组	10	0(0.00)	10(100.00)	3.82±0.51	5.21±0.30	0.61±0.05	0.72±0.11
模型组	18	12(66.67)	6(33.33)	1.78±0.29	2.11±0.29	0.29±0.01	0.28±0.02
塞来昔布组	18	5(27.78)	13(82.22)	2.11±0.31	3.15±0.32	0.56±0.03	0.63±0.01
$\chi^2/F$ 值		13.33		15.43	38.65	27.26	19.15
$P$ 值		<0.05		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

**2.2 3组大鼠尿流动力学指标比较** 3组大鼠LPP以及ALPP比较,具有统计学差异( $P$ 均<0.05)。进一步进行两两比较显示:LPP以及ALPP水平均为模型组<塞来昔布组<正常组( $P$ 均<0.05,表1)。

**2.3 3组大鼠病理组织学观察** 如图1所示,正常

组:组织学上呈现出肌束结构很完整,肌纤维横切面大小不同,与圆形或是多边形相似的形状,肌浆嗜酸性。模型组:组织学上呈现出神经元细胞发生变性肿胀,肌纤维也开始肿胀,横纹消失、着色不好,胞质淡染,靶状纤维发生改变。塞来昔布组:组织学上呈现

肌纤维多个扁圆形细胞核,位于每条肌纤维的周边,

显示出明暗相间的周期性横纹。



A:正常组;B:模型组;C:塞来昔布组。

图1 3组大鼠病理组织图(HE,×200)

**2.4 3组大鼠 TGF- $\beta$ 1/CTGF 通路蛋白水平比较** 3组大鼠 TGF- $\beta$ 1、CTGF 水平比较具有统计学差异( $P < 0.05$ )。进一步进行两两比较显示:TGF- $\beta$ 1、CTGF 水平均为 模型组 < 塞来昔布组 < 正常组( $P$  均 < 0.05,表 1)。

**2.5 3组大鼠 COX-2、LOX、MMP-2 蛋白水平比较**

3组大鼠 COX-2、LOX、MMP-2 蛋白水平比较具有统计学差异( $P < 0.05$ )。进一步进行两两比较显示:COX-2、MMP-2 蛋白水平均为 模型组 > 塞来昔布组 > 正常组( $P$  均 < 0.05,表 2);LOX 蛋白水平则是模型组 < 塞来昔布组 < 正常组( $P$  均 < 0.05,表 2)。

表2 3组大鼠 COX-2、LOX、MMP-2 蛋白水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	<i>n</i>	COX-2	LOX	MMP-2
正常组	10	0.20±0.01	0.73±0.07	0.26±0.04
模型组	18	0.41±0.03	0.38±0.24	0.40±0.03
塞来昔布组	18	0.29±0.02	0.62±0.16	0.31±0.02
<i>F</i> 值		39.77	10.12	12.37
<i>P</i> 值		<0.05	<0.05	<0.05

### 3 讨论

压力性尿失禁又被称为“社交癌”,严重影响到女性的正常社交生活并且极易引起心理障碍,给家庭增加了沉重的经济负担。具体表现为腹压突然增加时尿液不自主地流出,原因是腹压增加致使膀胱内压力增高,而尿道的阻力对抗不了尿液外流。本文研究中、压力性尿失禁大鼠模型的建立,其方法操作简单、技术要求低,模型建立时间快。

国内外学者认为,最为理想的鉴定方法是尿道膀胱造影及尿动力学等综合性检验<sup>[6-7]</sup>。本研究采用了尿流动力学检测以及可简单操作的喷嚏实验来判断此次大鼠压力性尿失禁模型是否成功。有研究显示运用尿动力学检测 ALPP 是检测压力性尿失禁模型尿道阻力的最为可靠的方法,而喷嚏试验又能够作为压力性尿失禁的判断指标<sup>[8]</sup>,与本次研究结果基本相符。同时在模拟腹压增高时产生漏尿的压力性尿失

禁病理发生过程中,测得的 LPP 反映出尿道阻力以及尿道肌肉结构、功能的整体性,有学者对尿失禁大鼠模型几种不同方式测量漏尿点压力的方法进行比较后发现,诱发喷嚏从而引起 LPP 测压的方法和被动增加膀胱内压力这两种测压方法,均可以用于检测不同机制下产生的压力性尿失禁<sup>[9]</sup>。人体和动物模型在解剖组织结构上还是存在着差异,怎样在动物模型上更好地去反映出压力性尿失禁的发病机制还需要去深入研究,同时压力性尿失禁大鼠模型的建立方法、鉴定方法及建模的稳定性是继续下一步研究压力性尿失禁的方向<sup>[10-11]</sup>。

塞来昔布是一种昔布类的非甾体抗炎药,通过成分中高选择性的 COX-2,阻碍前列腺素产生,临床常用于类风湿性关节炎等症状的治疗<sup>[12]</sup>,关于其对压力性尿失禁症状治疗效果的研究还鲜有报道。近年来,有学者对 COX-2 抑制剂用来治疗下尿路疾病的潜在价值进行研究<sup>[13]</sup>。虽然 COX-2 抑制剂治疗压力性尿失禁这个方法没有广为流传,但有学者在临床实践中发现合并其他症状服用塞来昔布之后的压力性尿失禁患者漏尿症状可以得到一定改善,间接验证了 COX-2 抑制剂对压力性尿失禁具有一定的干预效果。本次前期基础研究也发现了在压力性尿失禁的大鼠模型中 COX-2 的表达呈现上升趋势,推测出 COX-2 参与了压力性尿失禁病理过程的发生与发展<sup>[14]</sup>。

COX-2 主要在膀胱黏膜层中表达,有学者发现 COX-2 能够促进前列腺素 E2 的分泌,对机体膀胱上皮组织完整性造成破坏<sup>[15]</sup>;且还有学者在研究中表示,使用 COX-2 抑制剂对压力性尿失禁模型大鼠进行干预,能够明显缓解尿失禁症状<sup>[16]</sup>,出现这一研究结果的原因可能是 COX-2 抑制剂阻断了 COX-2 催化花生四烯酸产生 PGE2 而破坏膀胱黏膜<sup>[17]</sup>。

还有学者在研究中表示,压力性尿失禁症状的发生发展与神经系统传导具有一定相关性。COX-2 抑制剂塞来昔布能够抑制外周性 C 纤维的神经传导,

从而对神经源性逼尿肌过度的活动进行抑制<sup>[18]</sup>。膀胱基层以平滑肌为主,其收缩会导致机体膀胱压力上升,超出尿道闭合压时会导致尿漏。COX-2抑制剂塞来昔布能够阻断机体膀胱压力上升,此外,塞来昔布还能够抑制外周性C纤维的神经传导,从而抑制神经源性逼尿肌过度活动,提升尿道阻力。因此COX-2抑制剂可能增加改善膀胱颈的阻力从而改善压力性尿失禁症状<sup>[19-20]</sup>。

压力性尿失禁与盆底组织损伤密切相关,组织损伤的修复涉及细胞与细胞外基质间的相互作用,TGF- $\beta$ 1正是这种相互作用的重要调节因子,能增加基质再生,增加角膜细胞增殖,促进肌成纤维母细胞分化,在成纤维细胞分化中扮演着重要的角色。CTGF是早期基因CCN家族成员之一,可刺激成纤维细胞增殖和分泌胶原。目前国内外对于CTGF的研究主要在心、肝及皮肤瘢痕等组织中,其过度表达会导致某些增生性或纤维化性疾病的发生。本文研究结果显示,使用塞来昔布对压力性尿失禁大鼠进行干预,TGF- $\beta$ 1、CTGF蛋白表达出现明显的上升,说明塞来昔布能够调控TGF- $\beta$ 1/CTGF通路蛋白的表达,减轻大鼠组织损伤严重程度。本文研究还对TGF- $\beta$ 1/CTGF通路下游蛋白COX-2、LOX、MMP-2的表达进行检测,结果显示,使用塞来昔布进行干预的大鼠COX-2、MMP-2表达明显下降,LOX表达明显上升,出现这一现象的原因可能是塞来昔布调控TGF- $\beta$ 1/CTGF通路,从而对TGF- $\beta$ 1/CTGF通路下游蛋白COX-2、LOX、MMP-2的表达产生了一定的调控作用,进而起到干预效果。

综上所述,塞来昔布对压力性尿失禁模型大鼠的效果显著,通过调控TGF- $\beta$ 1/CTGF通路蛋白,可以改善大鼠COX-2、LOX、MMP-2水平,对于治疗和预防压力性尿失禁的医学研究提供了方向。

#### 参考文献:

- [1] 张志红,胡孟彩,鲍颖洁,等. 盆腔器官脱垂及压力性尿失禁的相关因素分析[J]. 实用妇产科杂志,2017,33(7):530-533.
- [2] 戴星. 生物反馈治疗绝经后妇女压力性尿失禁的效果[J]. 中国老年学杂志,2016,36(24):6214-6215. DOI:10.3969/j.issn.1005-9202.2016.24.080.
- [3] 王天行,陈跃来,尹平,等. 压力性尿失禁动物模型:正确选择与研究目的相关实验动物模型的构建方法[J]. 中国组织工程研究,2018,22(28):4557-4561.
- [4] 郭小鹏,王鹏,成俊,等. 老年女性压力性尿失禁两种尿道吊带手术治疗对比[J]. 中国老年学杂志,2016,36(7):1672-1673,1674. DOI:10.3969/j.issn.1005-9202.2016.07.063.
- [5] 张淑静,于芳,汪司右,等. 从核心蛋白聚糖和基质金属蛋白酶-1探讨电针对压力性尿失禁大鼠盆底组织胶原蛋白代谢的影响[J]. 上海针灸杂志,2013,32(6):520-522. DOI:10.3969/j.issn.

- 1005-0957.2013.06.520.
- [6] 初茂林,张春影,修有成,等. 切断阴部神经建立女性压力性尿失禁大鼠模型的可行性实验研究[J]. 现代泌尿外科杂志,2015,20(10):741-744. DOI:10.3969/j.issn.1009-8291.2015.010.016.
- [7] 李骥,张谦,李沪平,等. 浅表膀胱颈切开联合尿道瓣膜电切术治疗后尿道瓣膜症[J]. 中华小儿外科杂志,2018,39(2):96-100. DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-3006.2018.02.005.
- [8] KOIKE Y,FURUTA A,SUZUKI Y,et al. Pathophysiology of urinary incontinence in murine models[J]. Int J Urol,2014,20(1):64-71. DOI:10.1111/j.1442-2042.2012.03225.x. Epub 2012 Nov 6.
- [9] NECHIPORENKO AN,SAVITSKI MW,NECHIPORENKO NA. Uroflowmetry in examination of the female with stress urinary incontinence[J]. Urologia,2016,6:71-75.
- [10] 程明军,曹云桂,丁景新,等. 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[J]. 中国实验动物学报,2016,24(4):408-413. DOI:10.3969/j.issn.1005-4847.2016.04.014.
- [11] 李洋,洪莉,刘成,等. 压力性尿失禁小鼠模型造模方法的对比[J]. 中华实验外科杂志,2017,34(1):158-161. DOI:10.3760/cma.j.issn.1001-9030.2017.01.049.
- [12] 高冠民,李艳敏,郑晓龙,等. 艾罗昔布和塞来昔布对中枢脊柱关节炎疗效及血清 Dickkopf 相关蛋白 1 水平的影响[J]. 中华风湿病学杂志,2016,20(12):836-840. DOI:10.3760/cma.j.issn.1007-7480.2016.12.010.
- [13] 李江,刘上,陈伟康,等. 塞来昔布在治疗压力性尿失禁中的疗效及安全性[J]. 昆明医科大学学报,2017,38(1):70-74. DOI:10.3969/j.issn.1003-4706.2017.01.015.
- [14] 杨智明,方克伟. 诱导型一氧化氮合酶/环氧合酶 2 在女性压力性尿失禁中的研究进展[J]. 医学研究生学报,2015,28(3):323-328. DOI:10.3969/j.issn.1008-8199.2015.03.024.
- [15] MARENTETTE J O,HURST R E,MCHOWAT J. Impaired expression of prostaglandin E2 (PGE2) synthesis and degradation enzymes during differentiation of immortalized urothelial cells from patients with interstitial cystitis/painful bladder syndrome [J]. PLoS One,2015,10(5):e129466. DOI:10.1371/journal.pone.0129466. eCollection 2015.
- [16] JUAN Y S,LEE Y L,LONG C Y,et al. Translocation of NF- $\kappa$ B and expression of cyclooxygenase-2 are enhanced by ketamine-induced ulcerative cystitis in rat bladder [J]. Eur Urol Supplements,2015,185(8):2269-2285. DOI:10.1016/j.ajpath.2015.04.020. Epub 2015 Jun 12.
- [17] 詹磊,程良斌,蔡岳,等. 塞来昔布抑制 COX-2 和 PD-1 发挥抗肿瘤作用[J]. 中国免疫学杂志,2018,34(4):595-599. DOI:10.3969/j.issn.1000-484X.2018.04.022.
- [18] 卢燕燕,蒋美萍. 多种因素对女性压力性尿失禁的影响研究[J]. 中国妇幼保健,2014,29(17):2705-2707. DOI:10.7620/zgfybj.j.issn.1001-4411.2014.17.20.
- [19] KALEJAIYE O,VIJ M,DRAKE MJ. Classification of stress urinary incontinence[J]. World J Urol,2015,33(9):1215-1220.
- [20] FUSCO F,ABDEL-FATTAH M,CHAPPLE CR,et al. Updated systematic review and meta-analysis of the comparative data on colposuspensions, pubovaginal slings, and midurethral tapes in the surgical treatment of female stress urinary incontinence[J]. Eur Urol,2017,72(4):567-591. DOI:10.1016/j.eururo.2017.04.026.

(编辑 何宏灵)