文章编号:1000-5404(2005)09-0825-03

论著

不稳定逼尿肌 Cx43 基因表达及其与逼尿肌细胞间缝隙连接通讯功能的关系研究

封建立,宋 波 (第三军医大学西南医院全军泌尿外科中心,重庆 400038)

提 要: 目的 研究连接蛋白 Cx43 基因在体外培养不稳定逼尿肌细胞中的表达及不稳定逼尿肌细胞间缝隙连接通讯(gap junction intercelluar communication, GJIC)功能的变化,初步探讨二者与逼尿肌不稳定(destrusor instability, DI)的关系。**方法** 健康雌性 Wistar 大鼠 40 只,分为 DI 组和正常组。RT-PCR 及 Western blot 法检测各组逼尿肌细胞中 Cx43 mRNA 及蛋白表达变化,划痕标记荧光染料示踪技术(SLDT)检测各组逼尿肌细胞间 GJIC 功能变化。**结果** RT-PCR 及 Western blot 检测结果显示 DI 组逼尿肌细胞中 Cx43 mRNA 及蛋白含量明显高于正常组($P<0.01$),SLDT 结果表明 DI 组逼尿肌细胞间 GJIC 明显强于正常组($P<0.01$)。**结论** 体外培养不稳定逼尿肌细胞中 Cx43 基因表达增加,细胞间 GJIC 增强,二者可能与 DI 的发生有密切关系。

关键词: 缝隙连接;连接蛋白 Cx43;逼尿肌不稳定;缝隙连接通讯
中图法分类号: R329.27; R394.2; R694.02 **文献标识码**: A

Expression of connexin 43 gene and the gap junction intercellular communication among cultured unstable detrusor cells

FENG Jian-li, SONG Bo (Urinary Surgery Research Center, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the expression changes of connexin 43 (Cx43) gene and the functional changes of the gap junction intercellular communication (GJIC) among cultured unstable detrusor cells and their roles in the development of detrusor instability (DI). **Methods** Forty healthy female Wistar rats were divided into two groups: DI group and normal control group. RT-PCR and Western blot techniques were employed to detect the expression of Cx 43 mRNA and protein in the cultured detrusor cells. Scrape loading dye transfer (SLDT) technique was used to monitor the GJIC among cultured detrusor cells. **Results** The expression of Cx43 mRNA and protein in DI group was much higher than that in normal control group ($P<0.01$). The results of SLDT indicated that GJIC among unstable detrusor cells was much stronger than that among normal detrusor cells. **Conclusion** The expression of Cx 43 gene was significantly increased and the GJIC was functionally up-regulated in the cultured unstable detrusor cells, which might have a close relationship with DI.

Key words: detrusor instability; connexin 43; detrusor instability; gap junction intercellular communication

逼尿肌不稳定(detrusor instability, DI)是临床最常见的膀胱功能障碍,研究表明逼尿肌肌源性兴奋性增加是其重要的发生机制[1,2]。但是并非每个逼尿肌细胞都有神经支配,单细胞兴奋必须借助于某种细胞间兴奋快速传递机制才能引起全膀胱的快速频繁收缩,导致 DI 的发生。缝隙连接是介导细胞间兴奋快速传递的惟一通道,我们的前期研究证实其在 DI 情况下大量增加,是不稳定逼尿肌细胞间兴奋传递的重要途径,可能是 DI 发生的肌源性结构基础[3]。逼尿肌细胞间缝隙连接由多种连接蛋白组成,DI 情况下以连接蛋白 Cx43 增加较为显著[4],可能是不稳定逼尿肌细胞间缝隙连接的主要组成蛋白。本实验我们应用 RT-PCR 以及 Western blot 方法,从转录及翻译水平检测 Cx43 mRNA 及其蛋白在体外培养不稳定逼尿肌细胞中的表达变化,应用荧光划痕染料示踪技术检测不稳定逼尿肌细胞间 GJIC 的变化情况,探讨 Cx43 基因表达、逼尿肌细胞间 GJIC 变化与 DI 发生的关系。

1 材料与方法

1.1 实验对象

健康雌性清洁级 Wistar 大鼠 40 只,2~3 月龄,体质量 180

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30271304)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30271304)
作者简介:封建立(1976-),男,河南省太康县人,硕士研究生,医师,主要从事膀胱功能障碍方面的研究。电话:(023)60735314
通讯作者:宋 波, E-mail: songb-mr@vip.sina.com
收稿日期:2005-01-06;**修回日期**:2005-04-12

~210 g,购自第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心。近端尿道结扎法建立膀胱出口梗阻(BOO)动物模型[3],6周后行充盈性膀胱测压,根据测压结果确定23只为DI组,选定同龄正常大鼠14只为对照组。

1.2 主要试剂

小鼠抗大鼠Cx43单克隆抗体购自Santa公司,RT-PCR试剂盒购自Promega公司,Cx43以及内参β-actin的引物由上海博亚公司设计合成。

1.3 大鼠逼尿肌细胞体外原代培养

断颈处死Wistar大鼠,无菌条件下切取大鼠膀胱,按照酶消化法常规分离逼尿肌细胞,常规培养、传代[3],经α-平滑肌肌动蛋白免疫细胞化学法鉴定,第2~3代细胞应用于本实验。

1.4 半定量RT-PCR检测培养细胞中Cx43 mRNA的含量

Tripue(Promega公司)常规提取各组细胞总RNA。取各组总RNA各2 μg作为模板进行逆转录,设计扩增用Cx43上游引物:5′-GCGGCTTGCTGAGAACCTACA-3′,下游引物:5′-CGTTG-GTCCACGATGGCTAAT-3′。目的片段为640 bp,以β-actin为内对照。循环参数:94 ℃ 5 min,94 ℃ 30 s,56 ℃ 1 min,68 ℃ 2 min,共30个循环,68 ℃ 7 min。反应结束后行2%琼脂糖凝胶电泳,采用Quantity one图像分析系统分析计算曲线下面积,以Cx43/β-actin光密度比值表示Cx43 mRNA相对表达水平。

1.5 Western blot检测Cx43蛋白的含量

1×SDS上样缓冲液常规提取各组细胞总蛋白质。取各组细胞总蛋白各50 μg进行SDS-PAGE电泳,电转移至硝酸纤维素膜(Promega公司)。以5%脱脂奶-PBS室温封闭2 h,加入小鼠抗大鼠IgG1单克隆抗体(1:500),室温30 min,4 ℃过夜。PBST洗涤3次(15 min/次),加入辣根过氧化物酶标记的兔抗小鼠IgG(1:500),37 ℃孵育1 h,PBST洗涤3次(15 min/次),DAB染色,适时终止,光密度扫描,Quantity one图像分析系统分析显色条带。

1.6 划痕标记荧光染料示踪(SLDT)[5]检测逼尿肌细胞间GJIC变化

3.5 cm培养皿培养逼尿肌细胞至90%融合,PBS漂洗3遍,加入1.5 ml 0.05% Lucifer yellow(LY, Sigma公司)和0.75% Rhodamine-dextran(RD, Sigma公司,分子量40×10^3,作对照荧光),以手术刀片在培养皿中央做交叉划痕,暗室放置2 min,PBS漂洗3遍,4%多聚甲醛固定30 min,荧光显微镜下观察LY扩散情况,采用LSM510META激光共聚焦显微镜自带图像分析软件分析划痕一侧平均荧光像素强度。

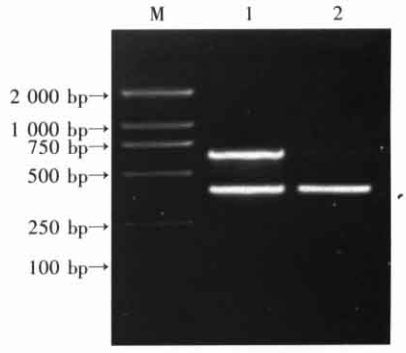
1.7 统计学方法

计量资料采用$\bar{x}\pm s$表达,采用独立样本t检验。

2 结果

2.1 半定量RT-PCR检测Cx43 mRNA表达

图1为Cx43和内参β-actin RT-PCR结果的凝胶成像,由图中可以看到640 bp(Cx43)及400 bp(β-actin)处均有条带出现,640 bp处的条带DI组较正常组明显为亮。Quantity one图像分析软件分析结果表明:DI组Cx43 mRNA相对表达量(0.953±0.035)较正常组(0.321±0.016)高,有非常差异显著($P<0.01$)。



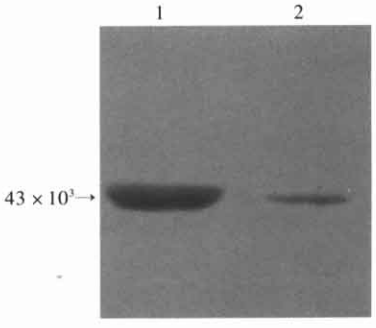
M: Marker; 1: DI group; 2: Normal control group

图1 RT-PCR检测逼尿肌细胞中Cx43 mRNA表达量

Fig 1 RT-PCR analysis of the expression of Cx43 mRNA in cultured detrusor cells

2.2 Western blot检测Cx43蛋白表达

图2为Cx43蛋白Western blot检测结果,由图中可以看出DI组和正常组均在43×10^3处出现着色带,DI组较正常组条带颜色明显为深。Quantity one图像分析软件分析结果表明:DI组条带的灰度平均值(76.67±3.68)明显较正常组(24.35±2.35)高,有非常显著差异($P<0.01$),提示不稳定膀胱情况下Cx43蛋白的表达量较正常膀胱明显增加。



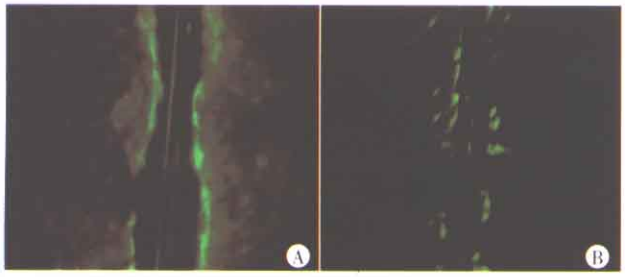
1: DI group; 2: Normal control group

图2 Western blot检测逼尿肌细胞中Cx43蛋白表达量

Fig 2 Western blot analysis of the expression of Cx 43 protein in cultured detrusor cells

2.3 SLDT检测逼尿肌细胞间GJIC

图3A为不稳定逼尿肌细胞间SLDT检测结果荧光显微镜成像。图3B为正常细胞间SLDT检测结果倒置荧光显微镜成像。由图3A、B可以看出不稳定逼尿肌细胞中荧光亮度较正常细胞明显为高,荧光扩散距离也更远。LSM510META激光共聚焦显微镜自带图像分析结果表明:正常组逼尿肌细胞间GJIC平均荧光像素强度平均值(3.33±0.58)明显较DI组(18.67±1.15)弱,有非常显著差异($P<0.01$),提示DI情况下逼尿肌细胞间GJIC较正常逼尿肌明显增加。



A: DI group; B: Normal control group

图 3　SLDT 检测逼尿肌细胞间 Dye coupling 情况　（倒置荧光显微镜 × 200）

Fig 3　SLDT analysis of GJIC among cultured detrusor cells
(Invert fluorescence microscope × 200)

3　讨论

细胞间连接是细胞间兴奋传递的结构基础，包括中间连接和缝隙连接，中间连接主要介导细胞间的机械耦联，缝隙连接则主要介导细胞间的电耦联和新陈代谢耦联。缝隙连接普遍存在于哺乳动物细胞间，连接着相邻细胞间 2 ~ 3 nm 的间隙，允许分子量小于 1×10^3 的代谢物质、次级信使 cAMP、无机盐（K^+、Na^+、Ca^{2+}）和其它亲水性小分子通过，使得这些物质不用暴露在胞外空间而直接进行转运，从而使细胞间的电耦联和代谢耦联加强，使多细胞行为趋于协调统一[6]。缝隙连接是目前发现的惟一介导细胞间直接通讯的膜通道结构，其介导的细胞间信息交流称为缝隙连接细胞间通讯（GJIC）。细胞间 GJIC 对于心脏、子宫等具有同步性收缩活动的器官具有重要意义，其功能活动的异常可以导致相关脏器疾病的发生[7,8]。DI 情况下不稳定逼尿肌的收缩也是同步性的，但是有关 DI 情况下不稳定逼尿肌细胞间兴奋传递的研究却很少。

前已述及，膀胱逼尿肌是一种特殊的平滑肌，其神经支配和逼尿肌细胞之间不是一对一的关系，并非每个逼尿肌细胞都有神经支配，单个逼尿肌细胞的兴奋必须借助于某种特殊的细胞间兴奋快速传递机制才能引起全膀胱的快速频繁收缩，导致 DI 的发生。因此，细胞间兴奋传递对于 DI 的发生有着重要意义。逼尿肌组织电镜超微结构显示，正常情况下逼尿肌细胞间主要是中间连接，缝隙连接很少[9]；DI 情况下，逼尿肌细胞间缝隙连接大量增加，细胞间 GJIC 增强，而应用缝隙连接通道阻滞剂后则明显降低逼尿肌细胞间 GJIC 功能[3]。这一发现提示缝隙连接是 DI 情况下逼尿肌细胞间兴奋传递的重要途径，可能是 DI 发生的肌源性结构基础，逼尿肌细胞间 GJIC 功能增强可能是 DI 发生的直接原因。

缝隙连接的基本组成单位是连接蛋白（Cx），目前在哺乳动物膀胱组织发现的连接蛋白已达 10 余种，DI 情况下逼尿肌细胞间以 Cx43 基因表达增加较为显著[4]，故而推测其可能是不稳定逼尿肌细胞间缝隙连接的主要组成蛋白，是 GJIC 增强的重要原因。

本研究我们在前期组织水平研究工作的基础上，以体外培养逼尿肌细胞为实验对象来研究 Cx43 在正常及不稳定逼尿肌细胞中的表达以及 DI 情况下不稳定逼尿肌细胞间 GJIC 的变化情况。RT-PCR 及 Western blot 检测结果显示，DI 组逼尿肌细胞中 Cx43 基因及其蛋白表达量均较正常组明显增高，但增高幅度较组织水平稍低，这可能与体外培养情况下细胞生物学性状发生一定改变有关，但总体变化趋势和在体情况保持一致。另外，SLDT 结果也显示 DI 组不稳定逼尿肌细胞间 GJIC 功能较正常逼尿肌显著增强，可能与 Cx43 表达大量增加有关。本研究从细胞水平证明，与 Cx43 增加相关的 GJIC 功能增强可能参与了 DI 的发生。但其详细作用及意义有待于进一步研究。此外，本研究还提示体外细胞培养的方法可以作为细胞水平研究 DI 的平台，为进一步的基因水平研究打下了基础。

参考文献：

[1] 邱功阔，宋　波，金锡御，等. 膀胱出口梗阻对逼尿肌兴奋性、收缩性及顺应性影响的实验研究[J]. 中华泌尿外科杂志，2000，21(7)：421 - 423.

[2] 李新，宋　波，李益人，等. M 受体及其亚型与逼尿肌功能的关系研究[J]. 第三军医大学学报，2002，24(2)：164 - 166.

[3] 周逢海，宋　波，金锡御，等. 逼尿肌不稳定缝隙连接介导细胞间通讯的研究[J]. 中华泌尿外科杂志，2004，5(4)：260 - 262.

[4] Christ G J, Day N S, Day M, *et al*. Increased connexin43-mediated intercellular communication in a rat model of bladder overactivity *in vivo*[J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2003, 284(5): R1241 - R1248.

[5] el-Fouly M H, Trosko J E, Chang C C. Scrape-loading and dye transfer. A rapid and simple technique to study gap junctional intercellular communication[J]. Exp Cell Res, 1987, 168(2): 422 - 430.

[6] Kumar N M, Gilula N B. The gap junction communication channel[J]. Cell, 1996, 84(3): 381 - 388.

[7] Jongsma H J, Wilders R. Gap junctions in cardiovascular disease[J]. Circ Res, 2000, 86(12): 1193 - 1197.

[8] Garfield R E, Ali M, Yallamplli C, *et al*. Role of gap junctions and nitric oxide in control of myometrial contractility[J]. Semin Perinatol, 1995, 19(1): 41 - 51.

[9] 金锡御，宋　波. 临床尿动力学[M]. 北京：人民卫生出版社，2002. 12 - 13.

（编辑　薛国文）