论著

文章编号:1000-5404(2005)08-0734-03

逼尿肌不稳定大鼠中 RyR 通道对自发性收缩影响的实验研究

江海红,卢根生,文前军,宋 波 (第三军医大学西南医院全军泌尿专科中心,重庆 400038)

提 要:目的 为探索逼尿肌不稳定(detrusor instability, DI)自发收缩过度活跃的肌源性基础,观察 RyR (ryanodine receptor, RyR)通道在 DI 及正常逼尿肌中对自发收缩调节的影响,以及 RyR 表达差异。**方法** 手术形成大鼠部分膀胱出口梗阻(partial bladder outlet obstruction, BOO),8 周后进行充盈性测压获得 DI 模型。新鲜膀胱镜下分离肌条,离体收缩实验用相应试剂干预记录收缩变化;RyR 蛋白表达差异用 Western blot 分析。**结果** RyR 阻滞剂 Ryanodine 干预后,正常肌条收缩频率明显增加,但此效应在 DI 没有发现。Western blot 分析提示 RyR 在 DI 逼尿肌表达显著减少。**结论** 研究提示 RyR 通道在逼尿肌自发收缩中负性作用机制可能在于 RyR 通道释放 Ca^{2+} 激活膜上钙敏感钾通道而降低收缩活性,此机制在 DI 明显减弱;这可能导致 DI 逼尿肌收缩过度活跃。

关键词: 逼尿肌不稳定;Ryanodine 受体通道;自发性收缩;肌浆网

中图法分类号: R334.3; R337; R694.02 **文献标识码:** A

Effects of ryanodine receptor channels on the spontaneous contractions of detrusor in rats of detrusor instability

JIANG Hai-hong, LU Gen-sheng, WEN Qian-jun, SONG Bo (Renal Diseases Research Center, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the myogenic basis of the increased excitability and contractile activity in detrusor instability (DI) and investigate the differences of spontaneous contractions by ryanodine receptor (RyR) channels regulation in sarcoplasmic reticulum (SR) between DI and normal bladder muscle and of the RyR channels protein expression. **Methods** DI model was confirmed by filling cystometry from rats that underwent partial bladder outlet obstruction (BOO) about 8 weeks ago. Muscle strips were dissected from fresh bladder under microscope and the isometric tension in DI and normal strips were detected. The contractions were recorded in these strips exposed to some agents. SR microsome protein was obtained from DI and normal bladder muscle preparations and was used for Western blot analysis to determinate RyR channels expression. **Results** Treated with RyR channels blocker ryanodine, the contractile frequence significantly increased in normal strips, but not in DI muscle. Western blot analysis showed that RyR channels expression in DI muscle was significantly less than that in normal preparations. **Conclusion** RyR channels act a negative role in spontaneous contractile activity and the presumed mechanism may involve in Ca^{2+} release of RyR channels which causes activation of Ca^{2+}-dependent K^+ channels to decrease contractility. But this crosstalk mechanism is weaken in DI muscle, which provides a chance for spontaneous contractile overactivity.

Key words: detrusor instability; ryanodine receptor channels; spontaneous contraction; sarcoplasmic reticulum

许多研究提示在动物及人的膀胱逼尿肌不稳定(detrusor instability, DI)中兴奋及收缩活性升高有肌源性基础[1],但确切机制仍有待研究。DI 是许多病因可以导致的膀胱过度活跃症状,以膀胱出口梗阻(bladder outlet obstruction, BOO)后引发最为常见[2]。自发收缩过程与自发动作电位产生及随后的兴奋收缩耦联密切相关,肌浆网上 RyR 通道是此过程中重要的调节环节[3]。RyR 通道释放钙库 Ca^{2+} 形成钙闪烁(calcium spark),这主要受膜上电压依赖型钙通道(voltage-dependent Ca^{2+} channels, VDCC)开放形成 Ca^{2+} 内流所激

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30277920)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30277920)

作者简介:江海红(1977-),男,安徽省桐城市人,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)65398434,E-mail: minijhh@hotmail.com

通讯作者:宋 波,电话:(023)68754186

收稿日期:2005-01-26;修回日期:2005-03-01

发，此过程也称为钙诱导的钙释放（Ca^{2+}-induced Ca^{2+} release，CICR）；同时钙闪烁负反馈影响膜上 VDCC 和激发钙敏感钾（Ca^{2+}-dependent K^+ channels，Kca）通道开放，形成自发外向电流（spontaneous transient outward currents，STOC），后者还包括大电导（BKca）、小电导（SKca）两种通道。自发性收缩也有赖于这些特征调节[4]。本研究结果提示 RyR 在 DI 中表达明显减弱，并且它在 DI 中对自发收缩调节失能。

1　材料与方法

1.1　模型制作

3～5 月龄雌性 Wistar 大鼠 42 只，体质量 160～180 g，来自第三军医大学实验动物中心。按常规 4-0 丝线结扎尿道内口形成 BOO，8 周后进行充盈性膀胱测压（Nidoc970 尿动力仪，美国 3M 微量泵），对出现非排尿性收缩波（3 次以上压力≥15 cmH_2O）的确定为 DI 模型[5]，正常非手术组同期喂养、同期测压。

1.2　肌条制备

摘取新鲜膀胱，冰浴 PSS 液（mmol/L：119 NaCl，4.7 KCl，24 $NaHCO_3$，1.2 KH_2PO_4，2.5 $CaCl_2$，1.2 $MgSO_4$，0.023 EDTA，11 葡萄糖；pH 7.4）漂洗干净后，手术显微镜下仔细剔除粘膜及浆膜，最后在体部获取肌条（0.8 mm×6 mm）[6]，进入本实验肌条，DI 组（$n=11$）及正常组（$n=8$）。剩余逼尿肌编号储存 -80 ℃。

1.3　收缩实验

显微镜下微小铝条固定肌条，放置 37 ℃恒温器官槽，丝线连于压力传感器并将等长收缩信号转化显示于监视器。肌条初始平衡负荷 2 mN 浸浴于周期置换的 PSS 液（2 ml，95% O_2-5% CO_2 持续恒量），稳定此状态 60～90 min 并出现稳定节律的自发收缩波后维持此状态进行实验，同时只有在加入 60 mmol/L KCl 后激发有可再生收缩反应才正式纳入研究。为最大程度消除神经递质影响[6]，应用含多种阻滞剂混合剂 cocktail，它包括（μmol/L）：1 atropine，1 phentolamine，1 propranolol，1 α，β-methylene ATP and 1 tetrodotoxin（河北水产研究所）。Ryanodine 溶于 DMSO（Sigma 公司，-20 ℃浓缩储存微量分装）。

1.4　SDS/PAGE 和 Western blot 分析

提取正常及 DI 大鼠膀胱逼尿肌肌浆蛋白，用改良 Lowry 法测定总蛋白量。各样品取 50 μg 总蛋白，加等量加样 buffer 95 ℃ 变性 5 min，进行 SDS/PAGE 凝胶电泳，后取胶进行恒流转移至 PVDF 膜上，上述过程参考文献[7]进行。用 4 %脱脂奶粉 PBS 封闭 3 h，加一抗（兔抗鼠 RyR 多克隆抗体，Santa Cruz 公司）4 ℃孵育过夜，洗脱后膜置于二抗（辣根过氧化物酶耦联羊抗兔 IgG，北京中山公司）中反应 2 h，PBS 充分洗涤后显色剂染色，显色后 H_2O_2 中止。光密度扫描仪测定印迹带相对光密度。本实验逼尿肌标本 DI 组（$n=6$）及正常组（$n=5$）。

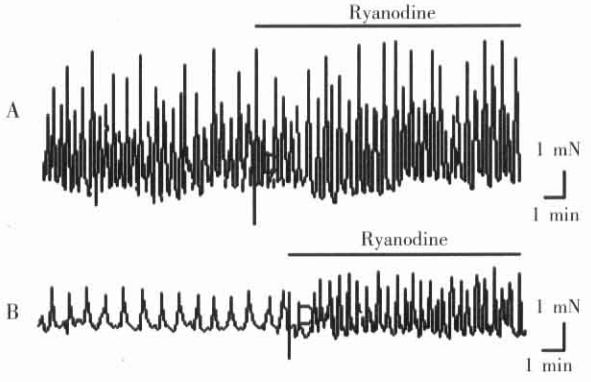
1.5　统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示；统计逼尿肌收缩波时，对所加试剂作 15 min 纪录并以最后的 5 min 为统计段，对照分析为加试剂前 5 min 段。组间差异用 t 检验及单因素方差分析。

2　结果

2.1　Ryanodine 对正常及 DI 肌条的影响

在逼尿肌细胞，Ryanodine 能有效抑制 RyR 通道的钙闪烁及随之相联系的 STOC 效应[8]。Ryanodine（终浓度 10 μmol/L）对 DI 及正常肌条影响如图 1，频率及幅度变化见表 1。Ryanodine 能上升正常肌条频率至原来的 2 倍左右，而对 DI 肌条无明显改变。



A：DI；B：Control

图 1　Ryanodine 对 DI 及正常肌条自发性收缩的影响

Fig 1　Effects of ryanodine on spontaneous contractions in DI and normal strips

表 1　Ryanodine 对 DI 及正常肌条自发收缩的影响

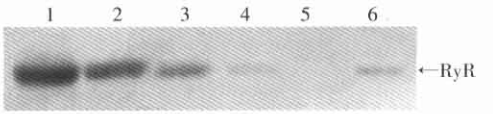
Tab 1　Effects of ryanodine on spontaneous contractions in DI and normal strips

	Before	After
Control	-	-
Frequency（contractions/min）	1.2±0.5	2.9±1.3*
Amplitude（mN）	1.86±0.49	2.01±0.54
DI	-	-
Frequency（contractions/min）	3.1±0.7#	3.4±0.8
Amplitude（mN）	4.02±1.22#	4.19±1.28#

*：$P<0.05$，*vs* before；#：$P<0.05$，*vs* control

2.2　Western blot 分析 RyR 表达变化

11 只大鼠 RyR 蛋白表达测试。通过扫描蛋白显色的光密度平均强度，结果提示 DI 样本显著降低（$P<0.05$），见图 2，正常及 DI 相对强度分别为（100±15）和（25±20），DI 逼尿肌中该蛋白表达量约只有正常 25%。



1，2：Normal；3-6：DI

图 2　Western bolt 分析 RyR 通道在 DI 及正常逼尿肌的表达差异

Fig 2　RyR channels protein expression in DI and normal strips by Western blot analysis

3 讨论

RyR 通道的钙闪烁能局部瞬时高 Ca^{2+} 浓度和膀胱平滑肌去极化时的胞内整体 Ca^{2+} 浓度变化是不致的，要显著高于后者并在一定时间内才被整体平均钙浓度所缓冲，于是提出“热点钙”(hot spot Ca^{2+})假设[9]，它和 Kca 通道电流呈密切平行关系并且在去极化开始后的 20 ms 内达峰值，而这时胞内的整体钙水平上升的明显缓慢的多；Kca 通道则是对逼尿肌细胞膜复极化、细胞兴奋及收缩活性有重要影响[10]，“热点钙”的机制可能解释为有些 SR 位置存在于质膜下的毗邻位置形成的。这说明局部钙闪烁对 Kca 通道激活影响是显著的，并且有邻近的位置基础[9]。RyR 通道产生的钙闪烁能降低兴奋性，即激活膜上 Kca 通道(STOC)和抑制钙继续内流，相应的也抑制和松弛它的收缩活性。这不难说明 RyR 通道释放钙闪烁是降低逼尿肌收缩性。

从实验可知 RyR 通道能降低自发收缩活性，这种负性效应在 DI 肌条中明显变弱。Ryanodine 干预前 DI 与正常肌条频率和幅度有显著不同，而干预后频率两组却无显著差异。一方面说明 Ryanodine 在正常肌条能易化自发收缩，可以推知 RyR 通道对收缩起抑制作用；另一方面 RyR 通道在 DI 中可能调节失能，至少在自发收缩上无明显改变，也就是说 RyR 通道在 DI 中没起到它原有的抑制收缩作用。由此我们设想 RyR 通道在 DI 中功能受抑制或表达降低使得它失去这些调节作用，后来 Western blot 证实 RyR 通道表达明显减少。这恰好能说明 DI 中过少的 RyR 通道为 DI 收缩频率升高提供可能。当然，在体膀胱 RyR 通道释放 Ca^{2+} 及负性调节可能很复杂并受多因素控制，进一步探查钙闪烁在 DI 和正常逼尿肌差异对于验证上述推断是必要的。

概括的说，本研究结果提供了 DI 离体肌条中 RyR 通道对自发收缩失能和它的表达明显减少的证据。正常逼尿肌中，应用 Ryanodine 表现出收缩频率增加趋势，这提示 RyR 通道在自发收缩中起负性作用，被推测的机制是 RyR 通道钙闪烁激活 Kca 通道而降低收缩活性[6]。我们认为这种负性作用机制在 DI 逼尿肌中明显削弱，因此给自发收缩过度活跃提供可能。最后，要支持此观点还需要更深入的基于离子通道电活动的研究。

参考文献：

[1] Fry C H, Skennerton D, Wood D, *et al*. The cellular basis of contraction in human detrusor smooth muscle from patients with stable and unstable bladders[J]. Urology, 2002, 59(5 Suppl 1): 3 - 12.

[2] Bulmer P, Abrams P. The unstable detrusor[J]. Urol Int, 2004, 72(1): 1 - 12.

[3] Collier M L, Ji G, Wang Y, *et al*. Calcium-induced calcium release in smooth muscle: loose coupling between the action potential and calcium release[J]. J Gen Physiol, 2000, 115(5): 653 - 662.

[4] Heppner T J, Herrera G M, Bonev A D, *et al*. Ca^{2+} sparks and K(Ca) channels: novel mechanisms to relax urinary bladder smooth muscle[J]. Adv Exp Med Biol, 2003, 539(Pt A): 347 - 357.

[5] 丘功阙，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.

[6] Herrera G M, Heppner T J, Nelson M T. Regulation of urinary bladder smooth muscle contractions by ryanodine receptors and BK and SK channels [J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2000, 279(1): R60 - R68.

[7] Tunwell R E, Wickenden C, Bertrand B M, *et al*. The human cardiac muscle ryanodine receptor-calcium release channel: identification, primary structure and topological analysis[J]. Biochem J, 1996, 318 (Pt 2): 477 - 487.

[8] Hashitani H, Brading A F. Ionic basis for the regulation of spontaneous excitation in detrusor smooth muscle cells of the guinea-pig urinary bladder [J]. Br J Pharmacol, 2003, 140(1): 159 - 169.

[9] Imaizumi Y, Torii Y, Ohi Y, *et al*. Ca^{2+} images and K^+ current during depolarization in smooth muscle cells of the guinea-pig vas deferens and urinary bladder[J]. J Physiol, 1998, 510(Pt 3): 705 - 719.

[10] Herrera G M, Heppner T J, Nelson M T. Voltage dependence of the coupling of Ca^{2+} sparks to BK(Ca) channels in urinary bladder smooth muscle[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2001, 280 (3): C481 - C490.

(编辑 栾 嘉)

血压计量单位恢复 mmHg 表示法

根据国家质量技术监督局和卫生部联合发出的质技监局量函[1998]《关于血压计量单位使用规定的补充通知》的精神，血压计量单位恢复使用毫米汞柱(mmHg)，但首次使用时应注明 mmHg 与千帕[斯卡](kPa)的换算系数

本刊编辑部