论著

文章编号:1000-5404(2005)10-0978-03

Rho激酶与大鼠不稳定膀胱关系的实验研究

贾卓敏,卢根生,宋 波,李文刚,文前军,江海红 (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 探讨Rho激酶与不稳定膀胱发生之间的关系。**方法** 建立不稳定膀胱大鼠模型;采用RT-PCR方法测定不稳定膀胱及对照组逼尿肌Rho激酶亚型密度的变化;Rho激酶特异选择性抑制剂Y-27632对逼尿肌肌条自发性收缩频率和收缩力的影响。**结果** ①DI组ROCKⅠ mRNA的表达(0.93±0.14)明显高于对照组(0.60±0.03)($P<0.01$);②DI组ROCKⅡ mRNA的表达(0.75±0.07)与正常对照组(0.67±0.10)之间无明显差异($P>0.05$);③Rho激酶抑制剂Y-27632(3 μmol/L)可以显著降低DI组膀胱的自发性收缩频率和自发性收缩张力,对照组无明显影响。**结论** Rho激酶与不稳定膀胱的发生有关。

关键词: 不稳定膀胱;Rho激酶;Y-27632;大鼠

中图法分类号: Q555.7; R322.62; R694.02 **文献标识码**: A

Study of relationship between Rho kinase and unstable urinary bladder in rats

JIA Zhuo-min, LU Gen-sheng, Song Bo, LI Wen-gang, WEN Qian-jun, JIANG Hai-hong (Urinary Surgery Research Center, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the relation between Rho kinase and the formation of unstable urinary bladder in rats. **Methods** The rat model of unstable bladder was established. The density of the subtype of Rho kinase in the detrusor of the rats of the unstable bladder group and the control group was determined with RT-PCR. The effect of Rho kinase inhibitor, Y-27632, on the spontaneous frequency and contractility of the smooth muscle of the bladder of the rats of 2 groups was observed. **Results** The expression of the ROCKⅠ mRNA was significantly higher in rats of the unstable bladder group than in those of the control ($P<0.01$). Y-27632 (3 μmol/L) could obviously inhibit the frequency and tension of the spontaneous contraction of the smooth muscle of the unstable bladder. **Conclusion** Rho kinase results in the formation of unstable urinary bladder.

Key words: unstable urinary bladder; Rho kinase; Y-27632; rat

不稳定膀胱(unstable bladder)又称为逼尿肌不稳定(detrusor instability, DI),是最常见的膀胱功能障碍类型之一,表现为尿频、尿急和紧迫性尿失禁,临床发病率高,发病机制不清楚,治疗效果不理想。据文献[1,2]报道,在冠状动脉痉挛方面的研究中发现,Rho-Rho激酶途径在血管平滑肌的异常收缩中有重要作用。本研究通过测定DI膀胱中Rho激酶mRNA表达及Rho激酶抑制剂Y-27632对膀胱兴奋性及收缩性的影响,探究Rho激酶在不稳定膀胱产生中的作用,为临床治疗提供指导。

1 材料与方法

1.1 逼尿肌不稳定大鼠模型的建立

SD大鼠,50只,雌性,平均体质量为(224±34)g(购自第三军医大学大坪医院实验动物中心),分为2组,对照组20只和实验组30只,戊巴比妥那(40 mg/kg)腹腔麻醉,大鼠取仰卧位,乙醇消毒腹部及会阴部,以直径1 mm的硬膜外导管圆头端从尿道插入膀胱,依次剪开腹部,暴露膀胱颈,钝性分离双侧膀胱下动脉与尿道间隙,用3-0丝线结扎尿道,松紧以刚好容纳硬膜外导管又可轻易拔出为度,缝合皮肤。假手术组方法同上,只是不结扎尿道。所有动物术后保持清洁饲养6周。

1.2 充盈性膀胱测压

术后6周,戊巴比妥那(40 mg/kg)腹腔麻醉,采用膀胱造瘘的方法将硬膜外导管插入膀胱顶,经三通管与尿动力仪及微量灌注泵相连,以生理盐水恒速(0.2 ml/min)膀胱灌注下测定膀胱压力的变化。所有动物均行充盈性膀胱测压。在膀胱低压充盈期出现造成膀胱内压升高超过15 cmH_2O(1 cmH_2O = 0.98 kPa)的逼尿肌收缩时即为DI。根据有无DI将动物分成逼尿肌不稳定组(DI)和逼尿肌稳定组(DS)[3]。

1.3 逼尿肌两种Rho激酶亚型含量的测定

1.3.1 引物的合成 通过Genebank查出大鼠Rho激酶两种亚型ROCKⅠ(NM-031098)和ROCKⅡ(NM-013022)的mRNA序列,应用引物设计软件设计引物,北京赛百盛基因技术有限公

作者简介:贾卓敏(1977-),男,吉林省白城市人,硕士研究生,医师,主要从事膀胱功能障碍疾病方面的研究。电话:(023)68765841

通讯作者:卢根生,电话:(023)68765841

收稿日期:2005-04-01;修回日期:2005-04-20

司合成，引物序列及扩增片断见表 1。β-actin 作为内参照。

表 1　两种 Rho 激酶亚型和 β-actin 的 PCR 引物序列

Tab 1　PCR primers for two Rho kinase subtypes and β-actin

Primers	Upstream/downstream	Expected length (bp)
ROCK Ⅰ	TGC TGA TGA GAC TGA CGG A AA T	441
	GCT GGA AAG TGG TAG AGG GTA G	
ROCK Ⅱ	ATG TGA TTG TAA GCA GCA AGA AGA	299
	GTT GGT TGG GAA GTG ATA AAG AGT	
β-actin	CTG CCG CAT CCT CTT CCT C	398
	CTC CTG CTT GCT GAT CCA CAT	

1.3.2　核酸分离　使用北京天为时代公司的 RNA 抽提试剂盒，从大鼠逼尿肌中提取总 RNA，用不含有 RNA 酶的水进行溶解，通过电泳检测，18 S 条带是 28 S 条带的 2 倍，测 D 值，D_{260}/D_{280} 为 1.7～2.0。

1.3.3　逆转录(RT)　取总 RNA 2 μg，Oligo(dT) 1 μg 经逆转录生成相应的 cDNA。

1.3.4　PCR 反应　RT 产物 4 μl 加入 25 μl PCR 体系液中(Buffer 2.5 μl，Mg^{2+} 2 μl，dNTP 1 μl，上下游引物各 1 μl，*Taq* 聚合酶 0.5 μl，消毒双蒸水 13 μl)混匀，ROCK Ⅰ反应按照 94 ℃ 50 s，49 ℃ 50 s，72 ℃ 1 min，35 个循环后 72 ℃再延伸 10 min；ROCK Ⅱ反应按照 94 ℃ 50 s，48 ℃ 50 s，72 ℃ 1 min，35 个循环后 72 ℃再延伸 10 min。取 5 μl PCR 产物加入 1 μl Loading buffer 经 2.5%的琼脂糖凝胶电泳，5 μg/mL 的 EB 染色。结果照相，通过图像分析测量软件，PCR 产物的量以"吸光度 × 面积"表示。以目的产物量与 β-actin 产物量的比值表示最终结果。

1.4　离体逼尿肌条实验

1.4.1　离体逼尿肌条制备　充盈性膀胱测压第 2 天，断头处死大鼠，立即取出膀胱，放入盛有 4 ℃ Krebs 营养液的培养皿中，取膀胱体部组织，去除粘膜及粘膜下组织，纵行切成 10 mm × 3 mm 肌条，每个膀胱可做 2～3 根肌条。肌条两端以丝线结扎，下端固定于盛有 37 ℃ Krebs 液的浴槽底部，Krebs 液中通以 95% O_2、5% CO_2 混合气体，肌条全部浸入 Krebs 液中，上端经拉力传感器的小钩连至可调节肌条初长度的微调螺旋上，拉力传感器与四通道多功能生理信号放大器相连，检测信号输入计算机。

1.4.2　体外肌条的药理学实验　Rho 激酶特异选择性抑制剂 3 μmol/L 的 Y-27632 在基础张力为 1.0 g 时，对逼尿肌肌条自发性收缩频率和收缩力的影响，每次更换孵育液时均以 37 ℃ 空白 Krebs 液多次冲洗肌条，待肌条的收缩活动恢复平衡后在进行重复性观察。

1.5　统计学处理

所有结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示，用 Microsoft Excel 统计软件行 t 检验。

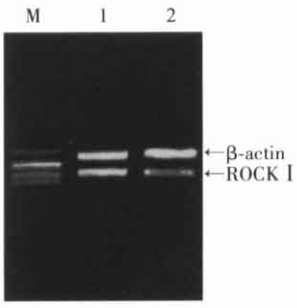
2　结果

2.1　尿动力学检查

实验组 30 只大鼠，膀胱出口梗阻后 6 周行充盈性膀胱测压，23 只出现逼尿肌不稳定，逼尿肌不稳定发生率为 76.7%，而对照组大鼠无逼尿肌不稳定发生。DI 组大鼠膀胱容量(1.835 ± 0.052) ml 与正常对照组(1.03 ± 0.026) ml 相比明显增大($P < 0.05$)。

2.2　Rho 激酶亚型 mRNA 含量的变化

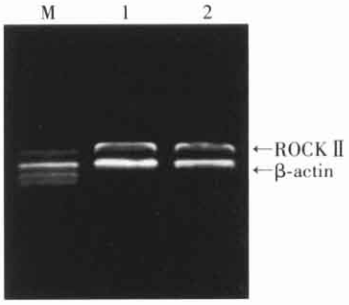
DI 组和对照组膀胱逼尿肌组织均含有 ROCK Ⅰ和 ROCK Ⅱ的 mRNA 表达；DI 组 ROCK Ⅰ mRNA 的表达(0.93 ± 0.14)明显高于对照组(0.60 ± 0.03)($P < 0.01$)；DI 组 ROCK Ⅱ mRNA 的表达(0.75 ± 0.07)略高于正常对照组(0.67 ± 0.10)，但无显著性差异($P > 0.05$)，见图 1、2。



M: Marker; 1: DI; 2: Control

图 1　ROCK Ⅰ mRNA 的表达

Fig 1　ROCK Ⅰ mRNA expression



M: Marker; 1: Control; 2: DI

图 2　ROCK Ⅱ mRNA 的表达

Fig 2　ROCK Ⅱ mRNA expression

2.3　Y-27632 对逼尿肌兴奋性及收缩性的影响

Rho 激酶特异选择性抑制剂 Y-27632 干预实验显示，Y-27632 可以显著抑制 DI 逼尿肌的自发性收缩频率和自发性收缩张力($P < 0.01$)；对正常组逼尿肌自发性收缩频率和自发性收缩张力无明显抑制作用。Y-27632 对于 DI 组收缩频率变化和自发性张力的抑制要显著强于对照组($P < 0.01$)，见图 3。

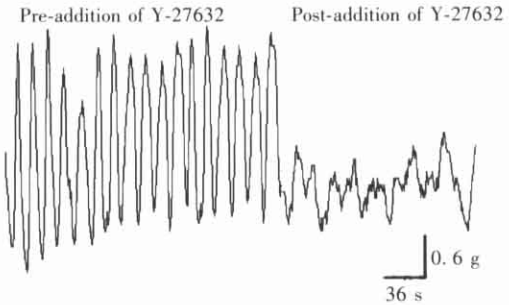


图 3　Y-27632 可以显著抑制 DI 逼尿肌的自发性收缩频率和自发性收缩张力

Fig 3　Y-27632 could obviously inhibit frequency and tension of spontaneous contraction of the smooth muscle of unstable bladder

3 讨论

膀胱是一种具有良好顺应性的空腔器官，在充盈和排空时能够自我调节以适应膀胱容量的改变，并能保持一定的压力和形态。当发生不稳定膀胱时，膀胱的一系列生物力学特征就发生了改变，兴奋性增高，收缩性增强。发生 DI 的过程包括很多中间环节，如逼尿肌的兴奋及兴奋调节、兴奋的传递、兴奋收缩耦联等，其中兴奋收缩耦联是一重要的调节因素[4]。

平滑肌细胞兴奋收缩耦联机制与骨骼肌不完全相同，除了细胞膜机械电压耦联外，还包括不依赖于细胞膜电位改变的受体效应耦联机制。肌球蛋白轻链激酶导致的肌球蛋白轻链磷酸化与肌球蛋白磷酸酶导致的肌球蛋白轻链去磷酸化是决定平滑肌收缩与舒张的关键因素。受体效应耦联机制是激动剂作用于受体，通过两种途径诱发平滑肌收缩，一方面增加细胞内 Ca^{2+} 浓度，同时又产生 Ca^{2+} 致敏效应。当细胞内 Ca^{2+} 浓度升高时，Ca^{2+} 与钙调蛋白结合，激活肌球蛋白轻链激酶，使肌球蛋白轻链磷酸化，平滑肌收缩。通过研究平滑肌收缩张力与细胞内 Ca^{2+} 浓度比值表明：由细胞膜受体激动剂诱发的平滑肌收缩其比值明显高于由细胞膜去极化产生的平滑肌收缩的比值，这种现象被称作 Ca^{2+} 致敏。进一步研究表明 Ca^{2+} 致敏效应主要是通过 Rho-Rho 激酶途径调节的，此途径通过抑制肌球蛋白磷酸酶的活性，使肌球蛋白轻链去磷酸化程度减弱，间接使肌球蛋白轻链磷酸化程度增强，达到促使平滑肌收缩的作用[5]。本研究显示，DI 组逼尿肌肌条的自发性收缩频率及自发性收缩张力明显高于对照组，Rho 激酶特异选择性抑制剂 Y-27632 对逼尿肌肌条兴奋性及自发性收缩张力均具有显著的抑制作用，在对照组无明显差异；通过比较 Y-27632 对于 DI 组和对照组的收缩频率变化和自发性张力变化的比较，表明 Y-27632 对于 DI 组的抑制要显著强于在对照组中的作用，说明在正常大鼠的膀胱活动中，Rho 激酶对于兴奋性的作用并不明显，但在 DI 大鼠的膀胱活动中 Rho 激酶的作用则显著增强。

Rho 是一种具有 GTP 酶活性的单体 G 蛋白，它的功能涉及细胞运动，胞质分裂，轴突的回缩和平滑肌的收缩等一系列生物学效应。Rho 蛋白是如何调节平滑肌的收缩，最近研究揭示：Rho 蛋白的一个下游效应因子 Rho 激酶在 Ca^{2+} 致敏作用和抑制肌球蛋白磷酸酶活性中扮演着重要角色[6]。Rho 激酶有两个亚型，分别是 ROCKⅠ和 ROCKⅡ，不同组织含量不同，与心脏、脑组织、主动脉、肝脏、肾脏及骨骼肌的含量相比，大鼠逼尿肌中的 ROCKⅡ含量最丰富，而 ROCKⅠ的含量则仅次于主动脉[7]。

Y-27632 作为 Rho 激酶的特异选择性抑制剂，对 ROCKⅠ和 ROCKⅡ具有相同的高效性，它被有效地用于检验 Rho 激酶在平滑肌收缩中的作用[8]。但在逼尿肌收缩效应中，哪种亚型的作用重要一些？本实验还通过 RT-PCR 方法研究显示：Rho 激酶亚型 ROCKⅠ和 ROCKⅡ在 DI 大鼠膀胱 mRNA 的表达中，ROCKⅠ的含量明显增多，ROCKⅡ的含量变化不明显。Tahara 等[9]对妊娠过程中，子宫平滑肌 Rho 激酶亚型含量的研究也发现了类似结果。从目前对 ROCKⅠ和 ROCKⅡ的亚型的认识中，还没有关于两种亚型具体功能差别的报道，但从本实验结果显示，ROCKⅠ在不稳定膀胱发生中具有重要作用。

综上所述，我们认为 Rho-Rho 激酶途径在大鼠逼尿肌不稳定发生中起着重要作用，对治疗 DI 有一定的价值。ROCKⅠ和 ROCKⅡ两种亚型是如何协调功能，在分子水平是如何导致 ROCKⅠ的增加，我们将作进一步的研究。

参考文献：

[1] Shimokawa H. Cellular and molecular mechanisms of coronary artery spasm: lessons from animal models[J]. Jpn Circ J, 2000, 64(1): 1-12.

[2] Kandabashi T, Shimokawa H, Miyata K, *et al*. Inhibition of myosin phosphatase by upregulated Rho-kinase plays a key role for coronary artery spasm in a porcine model with interleukin-1β[J]. Circulation, 2000, 101(11): 1319-1323.

[3] 卢根生，宋 波，熊恩庆，等. 大鼠不稳定膀胱与 MR 亚型密度改变关系的实验研究[J]. 第三军医大学学报，2002，24(12)：1437-1438.

[4] 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.

[5] Takahashi R, Hishimura J, Hirano K, *et al*. Ca^{2+} sensitization in contraction of human bladder smooth muscle[J]. J Urol, 2004, 172(2): 748-752.

[6] Fukata Y, Amano M, Kaibuchi K, *et al*. Rho-Rho-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells[J]. Trends Pharmacol Sci, 2001, 22(1): 32-39.

[7] Wibberlery A, Chen Z, Hu E, *et al*. Expression and functional role of Rho-kinase in rat urinary bladder smooth muscle[J]. Br J Pharmacol, 2003, 138(5): 757-766.

[8] Breitenlechner C, Gassel M, Hidaka H, *et al*. Protein kinase A in complex with Rho-kinase inhibitors Y-27632, Fasudil, and H-1152P: Structural basis of selectivity[J]. Structure (Camb), 2003, 11(12): 1595-1607.

[9] Tahara M, Morishige K, Sawada K, *et al*. RhoA/Rho-kinase cascade is involved in oxytocin-induced rat uterine contraction[J]. Endocrinology, 2002, 143(3): 920-929.

（编辑 薛国文）