文章编号:1000-5404(2005)13-1345-03

论著

正常与不稳定大鼠膀胱逼尿肌T型Ca^{2+}通道亚型对比研究

范立新,宋 波,李龙坤,金锡御,文前军,李 蕾 (第三军医大学西南医院泌尿外科中心,重庆 400038)

提 要:目的 探讨正常与不稳定大鼠逼尿肌T型Ca^{2+}通道亚型基因的表达和T型Ca^{2+}电流密度差异。**方法** RT-PCR法与膜片钳检测逼尿肌细胞T型Ca^{2+}亚型通道基因表达和电流密度。**结果** ①在T型Ca^{2+}通道亚型α_1I、α_1G、α_1H中,正常逼尿肌表达α_1I,DI逼尿肌表达α_1I与α_1G,二者均无α_1H表达;②正常与DI逼尿肌均存在T型Ca^{2+}电流;③DI组峰值电流(peak I)幅度和密度均大于正常组。**结论** DI逼尿肌胞外钙离子通过T型Ca^{2+}通道的内流增加,这种变化可能与DI逼尿肌T型Ca^{2+}亚型通道基因的异常表达有关。

关键词:逼尿肌;T型Ca^{2+}通道;全细胞膜片钳;RT-PCR
中图法分类号:R322.62; R329.25; R694.02 **文献标识码**:A

Comparative study of the T-type calcium channel isoforms of normal and instability detrusor muscle

FAN Li-xin, SONG Bo, LI Long-kun, JIN Xi-yu, WEN Qian-jun, LI Lei (Urinary Surgery Research Center, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To detect the isoforms expression and calcium current density of the T-type calcium channel in Wistar rat with a normal detrusor or a detrusor of bladder instability. **Methods** The isoforms expression and calcium current density of the T-type calcium channel were examined by the reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and the whole-cell patch clamp. **Results** ① Among the three subfamilies of T-type calcium channels (α_1I, α_1G, and α_1H), α_1I was expressed in both normal detrusor and the detrusor of bladder instability. However, α_1G was only expressed in the detrusor of bladder instability, and α_1H was absent in both normal detrusor cells and that of bladder detrusor. ② T-type calcium current occurred in normal detrusor cells and that of bladder detrusor. ③ Peak current and density of whole-cell T-type calcium in the detrusor of bladder instability were larger than those in the normal detrusor. **Conclusion** Calcium influx through voltage-dependent T-type calcium channels is enhanced in detrusor cells of bladder instability, which may be probably associated with discrepant isoforms expression of the T-type calcium channel.

Key words: detrusor; T-type calcium channel; whole-cell patch clamp; RT-PCR

T型Ca^{2+}通道为低电压激活Ca^{2+}通道,参与多种可兴奋细胞的兴奋性产生。逼尿肌中存在T型Ca^{2+}电流,但T型Ca^{2+}通道在逼尿肌兴奋-收缩中的作用机制尚不清楚,对逼尿肌T型Ca^{2+}通道的研究将为临床选择更具特异性的Ca^{2+}通道拮抗剂治疗DI提供理论指导。我们采用全细胞膜片钳技术及逆转录-多聚酶链反应(RT-PCR)法检测了正常与逼尿肌不稳定(detrusor instability, DI)时逼尿肌T型Ca^{2+}电流和T型Ca^{2+}通道亚型基因(α_1I、α_1G、α_1H)的表达情况,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 不稳定膀胱模型建立

采用第三军医大学实验动物中心提供的雌性Wistar大鼠32只,体质量120~150 g,用随机数字表法分为两组,正常组8只,手术组24只。手术组采用改良Yaksh法(1993)建立膀胱出口梗阻模型,对梗阻6周后大鼠经尿流动力学分析仪进行膀胱功能测定,筛选出不稳定膀胱动物,为不稳定膀胱组。

1.2 试剂及引物

HEPES、CsCl、CsOH、TEACl、TEAOH、Mg-ATP、GTP、Ⅰ型胶原

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30371429)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30371429)
作者简介:范立新(1966-),男,湖南省冷水江市人,博士,主治医师,主要从事尿流动力学、逼尿肌不稳定方面的研究。E-mail:lixin19661@hotmail.com
通讯作者:宋 波,电话:(023)68754186
收稿日期:2003-12-23;**修回日期**:2004-05-06

酶、番木瓜蛋白酶、牛血清白蛋白均为 Sigma 公司产品，RNA 提取试剂 Tripure 为 Roche 公司产品，RT-PCR 试剂盒为美国 Promega 公司出品，其余生化试剂为国产。T 型 Ca^{2+} 通道亚型 α_1I、α_1G、α_1H 基因引物由上海生物有限公司合成，序列及目的基因片段大小见表 1。

表 1 T 型 Ca^{2+} 通道 α_1 亚单位引物序列及其扩增片段长度

Tab 1 Primer sequence and amplified fragment of T calcium channel α_1 subtype

Gene	Sequence	Nucleotides	GeneBank accession No	bp
α_1G	5′-CGGATATCCGCTCATGCTGCCACCACC -3′	1 769 – 1 785	AF126966	333
	5′-GAAGGCCTTCCACCTGTACTCTGTGTC -3′	2 086 – 2 102	AF126966	
α_1H	5′-C GGATATCCGGTTCGAGCTCGGCGTGTCAC -3′	203 – 222	AF051946	877
	5′-GAAGGCCTTCCGTTGCGTGCAGCGCCACC -3′	1 061 – 1 080	AF051946	
α_1I	5′-CGGATATCCGCAAGCGGATGTGGCCTTGCC -3′	742 – 761	AF129133	245
	5′-GAAGGCCTTCTAGTAACGGTTCCAGTTGAC -3′	949 – 968	AF129133	

1.3 溶液

无 Ca^{2+} HEPES 液（mmol/L）：105.4 NaCl，22.3 $NaHCO_3$，3.6 KCl，0.9 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$，0.4 $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$，19.5 HEPES，5.4 mmol/L 葡萄糖 + 4.5 mmol/L 丙酮酸钠（pH 7.1，NaOH 调节）；含 Ca^{2+} HEPES 液（mmol/L）：无 Ca^{2+} HEPES 液 + 1.8 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$；酶消化液：Ⅰ型胶原酶 1 mg/ml + 番木瓜蛋白酶 1 mg/ml + 白蛋白 1 mg/ml；电流记录浴槽液（mmol/L）：2 $CaCl_2$，160 TEACl，10 HEPES（pH 7.4，TEAOH 调节）；电极灌充液（mmol/L）：130 CsCl，10 EGTA，10 HEPES，3 $MgCl_2$，3 Mg-ATP，0.6 GTP（pH 7.2，CsOH 调节）。

1.4 方法

1.4.1 样本制备 动物断颈处死，立即切取膀胱，一部分用于 RNA 提取，另一部分立即置入无 Ca^{2+} HEPES 液中，剔除膀胱外膜与粘膜，剪成 1～2 mm 小块，37 ℃酶解分离，获取单个膀胱逼尿肌细胞。细胞 4 ℃保存于含 Ca^{2+} HEPES 液中，12 h 内用完。

1.4.2 RT-PCR 按试剂盒说明提取组织总 RNA 并进行 cDNA 合成，PCR 参数为：94 ℃ 1 min，59 ℃ 30 s，72 ℃ 1 min，37 个循环，最后 1 个循环完毕后于 72 ℃继续延伸 10 min。

1.4.3 PCR 产物分析 1.0% 琼脂糖制胶后，取 10 μl 扩增产物加入适量加样缓冲液混匀后，加样电泳（1 × TBE，5 V/cm），2～3 h 后在紫外灯下观察结果并拍照。照片经扫描后，图像分析仪测量 DNA 区带整合光密度值。根据 cDNA 的整合光密度值计算其相对含量。对比 cDNA 的量反映其 mRNA 的表达水平。

1.4.4 T 型 Ca^{2+} 电流记录 采用全细胞膜片钳记录方式，应用 Axopatch 200B 放大器，在 Win98 操作系统运行 Pclamp8.0 软件（美国 Axon Instruments 公司），低通滤波 5 kHz，p/-5 程序扣除漏电流与电容电流。电极阻抗 3～5 MΩ，封接阻抗 2～5 GΩ，钳制电压（HP）– 90 mV，检测电压（TP）– 50 mV，时程 250 ms，实验温度 21 ℃。电流大小以单位膜电容上的跨膜电流表示（pA/pF）。

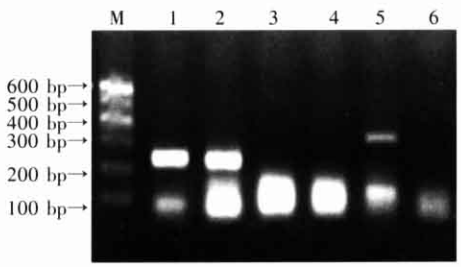
1.5 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 pCLAMP8.0（Axon Instruments）和 Excel（Microsoft）软件行 t 检验。

2 结果

2.1 T 型 Ca^{2+} 通道亚型基因表达

应用 T 型 Ca^{2+} 通道 α_1I 亚型基因引物，DI 大鼠逼尿肌组织和正常大鼠的逼尿肌组织均扩增出 245 bp 的目的基因片段；应用 T 型 Ca^{2+} 通道 α_1H 亚型基因引物，DI 与正常大鼠逼尿肌组织均未扩增出 877 bp 的目的基因片段；应用 T 型 Ca^{2+} 通道 α_1G 亚型基因引物，DI 大鼠逼尿肌组织扩增出 333 bp 的目的基因片段，而正常大鼠的逼尿肌组织无此目的基因片段出现（图 1）。



M：Marker；1：DI α_1I；2：Normal α_1I；3：DI α_1H；4：Normal α_1H；5：DI α_1G；6：Normal α_1G

图 1 正常及不稳定膀胱逼尿肌 T 型 Ca^{2+} 通道亚型基因表达

Fig 1 Expression of T-type calcium channel gene subtypes in normal and unstable detrusor

2.2 α_1G、α_1H、α_1I 基因 cDNA 的表达水平

正常与 DI 大鼠 α_1I 亚型基因 cDNA 量分别为（38.02 ± 2.75）和（36.47 ± 3.01），二者间比较无明显差异（$P > 0.05$）；α_1H 在正常与 DI 大鼠均未见扩增，其光密度值与测量时所用对照相同，为 0；而 α_1G 亚型基因 cDNA 量在正常大鼠为 0，在 DI 大鼠为（5.20 ± 0.44）；DI 大鼠 α_1I 与 α_1G 比较，两者相差显著（$P < 0.01$）。见表 2。

表 2 α_1I、α_1H、α_1G 亚型基因 cDNA 表达水平（$\bar{x} \pm s$）

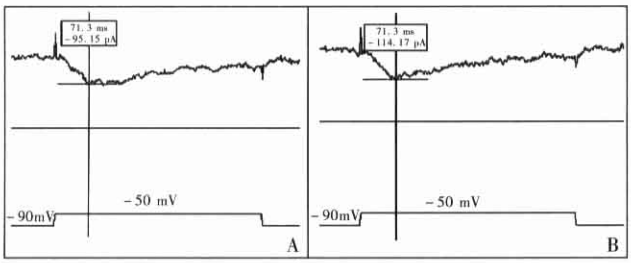
Tab 2 cDNA expression of α_1I, α_1H, α_1G gene（$\bar{x} \pm s$）

Group	n	α_1I	α_1H	α_1G
Normal	8	38.02 ± 2.75	0	0
DI	21	36.47 ± 3.01	0	5.20 ± 0.44**

** ：$P < 0.01$，*vs* normal

2.3 膜电容、膜电位以及电流幅度与密度

正常逼尿肌细胞膜电容为（46 ± 8）（$n = 12$），膜电位为（48 ± 12.4）（$n = 21$），而 DI 逼尿肌细胞膜电容为（51 ± 17.9）（$n = 16$），膜电位为（56 ± 15.1）（$n = 28$），DI 逼尿肌细胞膜电位向阴性偏移，膜电容增大，两组间比较具有显著性差异（$P < 0.05$）；正常与不稳定逼尿肌细胞均具有 T 型 Ca^{2+} 电流（图 2），在 HP = – 90 mV、TP = – 50 mV 时，正常与不稳定逼尿肌细胞 T 型 Ca^{2+} 电流幅度具有显著性差异（$P < 0.05$），T 型 Ca^{2+} 电流密度增强。为免除标本细胞体积差异，将膜电流幅度用相应的膜电容标化，以电流密度相比较，二者仍呈显著性差异（$P < 0.01$）



A: Normal detrusor cell; B: DI detrusor cell

图 2　逼尿肌细胞 T 型 Ca^{2+} 内向电流

Fig 2　Inward current of T-type calcium of detrusor cells

3　讨论

逼尿肌不稳定(detrusor instability, DI)是最常见的一种膀胱功能障碍，指储尿期发生逼尿肌无抑制性收缩，引起尿频、尿急、急迫性尿失禁等临床症状，严重者导致肾、输尿管积水和肾功能损害[1]。DI 的发生是多种病变(如神经疾病、膀胱出口梗阻、不明原因男、女性尿频、泌尿系感染等)的最终病理生理环节，目前其机制尚不清楚，但越来越多的证据显示逼尿肌离子通道与受体、细胞间连接状态的改变对 DI 发生起着非常重要的作用。

逼尿肌不稳定主要是由于逼尿肌细胞兴奋性增加所致，而 Ca^{2+} 内流对逼尿肌细胞的兴奋起着关键性作用，Ca^{2+} 内流增加将使细胞的兴奋性增加[2]。体外实验表明，当逼尿肌细胞外 Ca^{2+} 浓度为 0 时，细胞即使接受电刺激也不能产生动作电位。目前认为通过 L-型 Ca^{2+} 通道的 Ca^{2+} 内向电流是逼尿肌细胞的主要 Ca^{2+} 电流，参与动作电位的形成与超射。但临床上应用的 L-型 Ca^{2+} 通道如异博定对 DI 的治疗并无良好疗效，目前原因不明。

Wu 等[3]发现：逼尿肌动作电位去极化依赖于细胞外 Ca^{2+} 浓度，内向电流为 Ca^{2+} 电流，主要由高电压激活的 L-型 Ca^{2+} 通道进入细胞，但在静息电位 - 60 mV 时，应用毒蕈碱受体激动剂可使细胞内 Ca^{2+} 增加，因此推测逼尿肌细胞在低膜电位下可能还存在其它的 Ca^{2+} 内流途径。Sui 等[4]应用膜片钳证实在正常逼尿肌细胞中同时存在 L 与 T 型 Ca^{2+} 电流，本研究也发现 T 型 Ca^{2+} 通道是一种低膜电位激活的 Ca^{2+} 通道，有以下特性：①低膜电位激活；②快速失活和缓慢关闭动力学；③低单通道电导；④较强的 Ni^{2+} 选择性阻滞作用；⑤对 Ca^{2+}、Ba^{2+} 的相对渗透作用。Perez-Reyes 等[5]首次发现编码 T 型 Ca^{2+} 通道的基因为 3 种同源 Ca^{2+} 通道，分别为 α_1G、α_1H 和 α_1I，Monteil 等[6]进一步的研究表明 T 型 Ca^{2+} 通道亚型 Ca^{2+} 电流模式具有各自的独特性，电流的激活与失活动力学、稳态特性、以及关闭动力学与复活均存在明显差异，形成了 T 型 Ca^{2+} 通道门控行为的功能多样性特点，此外，α_1G、α_1H 和 α_1I 亚型对特异性 T 型 Ca^{2+} 通道拮抗剂的敏感性也各自不同。目前，α_1G、α_1H 和 α_1I 亚型蛋白的表达与分离尚未获得成功，α_1G、α_1H 和 α_1I 亚型表达的检测手段主要是通过 RT-PCR 法。T 型 Ca^{2+} 通道低膜电位激活特性，使其在动作电位的起始阶段发挥着重要作用，研究证实，心肌起搏细胞及神经细胞的兴奋启动都与 T 型 Ca^{2+} 通道作用密切相关，某些病理状态，如癫痫、高血压、心律失常等，存在 T 型 Ca^{2+} 电流密度增强[7]。

目前逼尿肌 T 型 Ca^{2+} 通道的研究才刚刚起步，逼尿肌 T 型 Ca^{2+} 通道亚型的表达情况尚少见有报道，Sui 等[4]发现急性分离的正常逼尿肌细胞中存在 T 型 Ca^{2+} 电流，而培养的逼尿肌细胞缺乏 T 型 Ca^{2+} 电流，二者的兴奋性具有明显的差异，Chow 等[8]在逼尿肌的肌条实验中也证明 T 型 Ca^{2+} 通道阻断剂($NiCl_2$)可显著减低逼尿肌的兴奋性。为了解 DI 的发生是否与 T 型 Ca^{2+} 通道有关，本研究检测了 DI 逼尿肌组织中 3 个 T 型 Ca^{2+} 通道亚型基因的表达，并与正常逼尿肌组织进行了对比，发现 DI 与正常逼尿肌均有 T 型 Ca^{2+} 通道 α_1I 亚型基因表达，两者均无 α_1H 亚型基因表达，α_1G 亚型基因在 DI 逼尿肌表达阳性，而正常逼尿肌则无此亚型基因表达；定量分析表明 α_1I 是 DI 与正常逼尿肌组织的主要 T 型 Ca^{2+} 通道亚型。同时，应用膜片钳检测正常与不稳定逼尿肌细胞 T 型 Ca^{2+} 电流，发现不稳定逼尿肌细胞 T 型 Ca^{2+} 电流密度明显增强，这种增强作用是否与 α_1G 亚型基因表达异常有关，以及是否是导致逼尿肌不稳定的主要因素，还有待于进一步研究。

参考文献：

[1] Jabs C F, Stanton S L. Urge incontinence and detrusor instability[J]. Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct, 2001, 12(1): 58 - 68.

[2] 宋　波，李　新，邱功阔，等. 逼尿肌不稳定的机制研究——神经源性？肌源性？[J] 解放军医学杂志，2003，28(2)：131 - 133.

[3] Wu C, Fry C H. The role of the L-type Ca^{2+} channel in cholinergic pathways in guinea-pig detrusor smooth muscle[J]. J Physiol, 1997, 499(1): 7 - 8.

[4] Sui G P, Wu C, Fry C H. The electrophysiological properties of cultured and freshly isolated detrusor smooth muscle cells[J]. J Urol, 2001, 165(2): 627 - 632.

[5] Perez-Reyes E, Cribbs L L, Daud A, *et al*. Molecular characterization of a neuronal low-voltage-activated T-type calcium channel[J]. Nature, 1998, 391(6670): 896 - 900.

[6] Monteil A, Chemin J, Bourinet E, *et al*. Molecular and functional properties of the human α_1G subunit that forms T-type calcium channels[J]. J Biol Chem, 2000, 275(9): 6090 - 6100.

[7] Nargeot J. A tale of two (Calcium) channel[J]. Circ Res, 2000, 86(3): 613 - 615.

[8] Chow K Y, Wu C, Sui G P, *et al*. Role of the T-type Ca^{2+} current on the contractile performance of guinea pig detrusor smooth muscle[J]. Neurourol Urody, 2003, 22(1): 77 - 82.

(编辑　薛国文)