论著

文章编号:1000-5404(2005)21-2142-03

钙通道阻滞剂对大鼠离体不稳定逼尿肌收缩性和自律性的影响

张武合,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 探讨L型、T型钙通道阻滞剂对膀胱出口梗阻(bladder outlet obstruction, BOO)引起的不稳定逼尿肌的收缩性、自律性的影响。**方法** 建立SD雌性大鼠BOO动物模型,6周后行充盈性膀胱测压及离体逼尿肌条机械牵拉、钙通道阻滞剂刺激试验。**结果** BOO后逼尿肌不稳定(detrusor instability, DI)的发生率为75.9%;DI组与正常对照组相比,收缩性、自律性明显升高,收缩力增强;正常对照组、DI组逼尿肌条在L型、T型钙通道阻滞剂作用下,自律性、收缩力均明显降低,其中正常组更明显($P<0.05$)。**结论** DI的发生与逼尿肌自身的钙通道数量表达和功能改变有密切关系。

关键词:膀胱;梗阻;逼尿肌;钙通道阻滞剂

中图法分类号:R-332;R694;R983 **文献标识码**:A

Effect of calcium channel blocker on the contractility and autorhythmicity of isolated instable detrusor strip in rats

ZHANG Wu-he, SONG Bo (Urinary Surgery Research Center, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of L-type and T-type calcium channel blocker on detrusor autorhythmicity, contractility in order to elucidate the pathogenesis of detrusor instability (DI). Methods Animal models of bladder outlet obstruction (BOO) were established in 33 female SD rats and another 10 served as normal control. Six weeks later, the changes of detrusor autorhythmicity and contractility were examined by means of cystometry and the *in vitro* detrusor strip study. Results The incidence rate of DI was 75.9%. The detrusor autorhythmicity and contractility increased evidently after BOO ($P<0.05$). Both Nifedipine and $NiCl_2$ decreased the contractility and the frequency of the spontaneous contraction of detrusor strip in DI rats and normal controls of which the changes were more significant ($P<0.05$). Conclusion The mechanism of DI is closely related to the changes in function and quantity of calcium channels.

Key words: bladder; obstruction; detrusor; calcium channel blocker

逼尿肌不稳定是临床最常见的膀胱尿道功能障碍之一,与尿频、尿急、急迫性尿失禁等多种症状的产生有关,严重的逼尿肌不稳定还可影响上尿路尿液输送,甚至引起肾功能损害。引起逼尿肌不稳定的原因较多,其中膀胱出口梗阻是最常见的原因[1]。膀胱出口梗阻(bladder outlet obstruction, BOO)导致逼尿肌不稳定(detrusor instability, DI)的发病机制尚不完全清楚[2],本实验通过建立大鼠膀胱出口梗阻模型,进行充盈性膀胱测压和离体逼尿肌条机械牵拉试验、钙通道阻滞剂刺激试验,观察逼尿肌自律性以及收缩性变化,分析钙通道在逼尿肌不稳定的发病机制中的重要作用。现报告如下。

1 材料与方法

1.1 主要试剂、检测仪器

Nifedipine、$NiCl_2$均购自美国Sigma公司;拉力传感器、RM6240型四通道生理信号记录仪(成都仪器厂);Nidoc-970型尿动力仪(成都电子科技大学威信有限公司);微量灌注泵(美国3M公司);501型恒温水浴器官槽(重庆实验设备厂)。

1.2 动物分组

健康雌性SD大鼠43只,体质量180~220 g,3~4月龄,购自第三军医大学实验动物中心,分为实验组(33只)和对照组(10只)。

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:张武合(1974-),男,陕西省西安市人,硕士,主治医师,主要从事逼尿肌不稳定发病机制方面的研究,现在解放军323医院泌尿外科。电话:13594132643,E-mail:zwh74129@yahoo.com.cn

通讯作者:宋 波,电话:(023)68754186

收稿日期:2005-08-08;**修回日期**:2005-10-12

1.3　BOO 动物模型的建立

大鼠1%戊巴比妥腹腔麻醉（40 mg/kg）后，以直径为1 mm的探子插入尿道，取下腹部正中切口，切开显露膀胱，游离膀胱颈部与尿道交界处，分离尿道，2-0 丝线结扎，松紧以牵拉探子周围组织可移动，而探子又可以轻易拔出为度，拔除探子，缝合皮肤。与同龄对照组正常大鼠 10 只相同条件下饲养 6 周。

1.4　充盈性膀胱测压筛选 DI 大鼠

建立 BOO 动物模型 6 周后行充盈性膀胱测压，参照大鼠 DI 的判断标准，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 = 0.098 kPa）的逼尿肌无抑制性收缩时即为 DI。分出逼尿肌不稳定组及稳定组，以同龄正常大鼠做对照进行离体逼尿肌实验。

1.5　离体逼尿肌条试验

全切膀胱，制备成 10 mm × 3 mm × 3 mm 大小的肌条。置于器官槽内，肌条全部浸入 37 ℃ Krebs 营养液中，下端固定，上端连接拉力传感器，检测信号经生理记录仪输入计算机。营养液中通入 95% O_2、5% CO_2，肌条静置 30 min 后进行下列试验，每步试验更换肌条。

1.5.1　肌条自律性、收缩性试验　　先使肌条处于完全放松的无张力状态，调解微螺旋，逐渐缓慢牵拉肌条使肌条张力增加，直至出现自发收缩，此时张力的大小反映逼尿肌的兴奋性。继续牵拉肌条，至张力为 1.0 g 时固定肌条长度，连续记录肌条张力变化 15 min，记录收缩峰数。检测此长度下肌条自发性收缩频率以及收缩幅度。

1.5.2　L 型、T 型钙离子拮抗剂对肌条自发性收缩频率及收缩幅度的作用　　首先测定在张力为 1.0 g 时肌条自发性收缩频率及幅度，而后依次用浓度为 10^{-6} mol/L 的 L 型钙离子拮抗剂 Nifedipine、10^{-4} mol/L T 型钙离子拮抗剂 $NiCl_2$（经预实验获得的肌条敏感浓度）作用于肌条，观察肌条自发性收缩频率及收缩幅度变化情况。

1.5.3　观测指标　　收缩频率（次/min）：连续位相性收缩中舒张张力在收缩张力最高值 1/3 以上时，记为 1 次单收缩，频率记为单位时间内自发性收缩数目平均值；逼尿肌收缩力：是指逼尿肌在特定条件下产生收缩的力量大小。在本实验中用体外实验测定肌条拉力代表。计算方法为：逼尿肌基础张力之上的收缩幅度值；指标变化率：以用药前测定的参数为基准，如（用药后频率-用药前频率）/用药前频率所得比值代表频率变化率。

1.6　统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS10.10 软件行 t 检验和方差分析。

2　结果

2.1　BOO 后 DI 的发生率

33 只 BOO 模型大鼠中，4 只因尿漏、尿道感染导致死亡，模型成功 29 只，充盈性膀胱测压，有 22 只出现 DI，发生率为 75.9%。

2.2　BOO 对逼尿肌兴奋性、自律性以及收缩性的影响

梗阻不稳定组、稳定组、对照组逼尿肌条予以缓慢牵拉至其出现收缩时的最小张力分别为：（0.52 ± 0.16）、（0.70 ± 0.11）、（0.74 ± 0.16）g，不稳定组较稳定组、对照组明显降低（$P < 0.05$），稳定组与对照组之间比较差别无显著性意义（$P > 0.05$）；继续牵拉肌条至张力为 1.0 g 时固定肌条长度，测定肌条自发性收缩频率及幅度，不稳定组较稳定组及对照组明显增大（$P < 0.05$），即在相同前负荷下不稳定逼尿肌自发性收缩节律和收缩幅度明显增强。稳定组与对照组之间比较差别无显著性差异（$P > 0.05$）（表 1,2）。

2.3　L 型、T 型钙离子拮抗剂对肌条自发性收缩频率的影响

一定浓度的 L 型钙离子拮抗剂 Nifedipine 以及 T 型钙离子拮抗剂 $NiCl_2$ 均可使对照组、逼尿肌稳定组、逼尿肌不稳定组自发性收缩频率降低（$P < 0.05$）；和逼尿肌不稳定组相比，稳定组和对照组更明显（$P < 0.05$），后二者之间无显著差异（$P > 0.05$）（表 1）。

表 1　L 型、T 型钙通道阻滞剂作用下大鼠逼尿肌肌条自发性收缩频率变化（$\bar{x} \pm s$）

Tab 1　Changes of contraction frequency of isolated detrusor strip of rats by 10^{-6} mol/L Nifedipine and 10^{-4} mol/L $NiCl_2$（$\bar{x} \pm s$）

Groups	n	Before administration	10^{-6} mol/L Nifedipine	Ratio of change(%)	10^{-4} mol/L $NiCl_2$	Ratio of change(%)
Control	10	3.32 ± 1.06 **	1.24 ± 0.46 *	62.7 ± 1.04	1.03 ± 0.35 *	66.6 ± 12.8 **
DS	7	3.43 ± 0.79 **	1.46 ± 0.62 *	53.9 ± 20.8	1.32 ± 0.43 *	60.8 ± 14.0 **
DI	22	4.79 ± 1.18	3.36 ± 1.06 *	29.7 ± 15.2 **	3.05 ± 0.72 *	34.1 ± 16.8 **

*：$P < 0.05$，*vs* before administration；**：$F = 10.322$，$P < 0.01$，*vs* DI

2.4　L 型、T 型钙离子拮抗剂对肌条自发性收缩幅度的影响

一定浓度的 L 型钙离子拮抗剂 Nifedipine 以及 T 型钙离子拮抗剂 $NiCl_2$ 均可使对照组、逼尿肌稳定组、逼尿肌不稳定组自发性收缩幅度降低（$P < 0.05$）；和逼尿肌不稳定组相比，稳定组和对照组更明显（$P < 0.05$），后二者之间无显著差异（$P > 0.05$）（表 2）。

表 2　L 型、T 型钙通道阻滞剂作用下大鼠逼尿肌肌条收缩力变化（g，$\bar{x} \pm s$）

Tab 2　Changes of spontaneous contraction tension of isolated detrusor strip of rats by 10^{-6} mol/L Nifedipine and 10^{-4} mol/L $NiCl_2$（g，$\bar{x} \pm s$）

Groups	n	Before administration	10^{-6} mol/L Nifedipine	Ratio of change(%)	10^{-4} mol/L $NiCl_2$	Ratio of change(%)
Control	10	0.24 ± 0.08 **	0.07 ± 0.03 *	65.4 ± 20.8	0.12 ± 0.03 *	45.7 ± 23.4 **
DS	7	0.27 ± 0.08 **	0.10 ± 0.04 *	50.8 ± 18.9	0.16 ± 0.04 *	37.1 ± 16.3 **
DI	22	0.46 ± 0.10	0.29 ± 0.07 *	34.2 ± 19.2 **	0.36 ± 0.10 *	21.6 ± 11.0

*：$P < 0.05$，*vs* before administration；**：$F = 20.773$，$P < 0.01$，*vs* DI

3　讨论

膀胱出口梗阻是指膀胱出口至尿道外口之间任一

部位出现梗阻,关于 BOO 动物模型的方法,文献有较多报道,采用的实验动物种类于方式不尽相同,各有优缺点。在模型制作中,最为重要的是制作方法中应尽量避免非梗阻因素对逼尿肌功能的影响。本实验采用的方法对尿道及膀胱颈局部损伤小,费用低,手术时间短,适合于较大数量的动物实验研究,值得借鉴和推广[3]。

为探讨 BOO 导致 DI 的发病机制,本实验采用不受神经因素影响的离体逼尿肌条进行机械牵拉实验发现,与稳定组以及正常对照相比,不稳定组逼尿肌在较低的张力下出现自发性收缩,而且自发性收缩频率明显加快,说明逼尿肌自身的兴奋性和自律性明显增强,这些生理特性的改变与 DI 的发生有密切关系[4,5]。逼尿肌无慢波存在,其自发性收缩是由引起细胞膜去极化的刺激所引起,逼尿肌的兴奋性是由逼尿肌细胞自身的静息电位、阈电位及膜通道性状决定的,因此逼尿肌自身的生理特性变化可能是 DI 发生的重要原因。

逼尿肌细胞是一种可兴奋细胞,其兴奋的产生受多种因素调控,但 Ca^{2+} 在其中起着最关键的作用。逼尿肌细胞兴奋的前提是 Ca^{2+} 内流入胞,导致膜电位发生改变,使电压依赖式离子通道激活,细胞去极化,同时,Ca^{2+} 发挥第二信使作用,激活其他 Ca^{2+} 依赖式离子通道与受体,共同参与细胞动作电位的引发。而钙通道是 Ca^{2+} 入胞的主要途径,细胞外钙离子主要通过电压依赖性钙通道进入细胞。Fry 等研究证实 Ca^{2+} 对逼尿肌细胞兴奋产生与调节起着关键作用,逼尿肌细胞膜上存在着 L、T 型钙通道[6,7]。因此如果使用特异性钙通道阻滞剂阻断钙通道,抑制 Ca^{2+} 内流入胞,将会有效的降低逼尿肌细胞的兴奋性和收缩性,这对于临床治疗 DI 将会有积极的意义。

在本实验中我们发现:在特定的前负荷下,L 型、T 型钙通道阻滞剂对不稳定组逼尿肌,稳定组以及正常对照组的自发性收缩频率和收缩幅度都有抑制作用,其中对不稳定组的作用不及稳定组和正常对照组明显。在相同实验条件下,T 型钙通道阻滞剂对逼尿肌的收缩频率的影响更明显,而 L 型钙通道阻滞剂对收缩幅度的影响更明显,但两者都没有完全消除逼尿肌条的自发性收缩。这一结果与 Buckner[8] 和 Fry[9] 的结论一致。

在我室既往的研究中,李新等[10]应用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)技术对膀胱平滑肌细胞的钙通道进行测定。结果显示各组膀胱逼尿肌组织均含有 L 和 T 型钙通道 mRNA。在逼尿肌不稳定模型组,L 和 T 型mRNA 含量均有不同程度增加,T 型钙通道mRNA 增加更明显。推测由于钙通道的表达异常(增多),对钙离子的敏感性增加,更容易导致细胞外钙离子内流入胞,引起平滑肌细胞自发性除极易化,兴奋性增高,从而表现为不稳定膀胱。这也更好的解释了相同浓度钙通道阻滞剂(L 或 T 型)对不稳定逼尿肌条的作用不及正常逼尿肌条明显,所以临床上应用 Ca^{2+} 通道阻滞剂治疗 DI 未能尽如人意。

另外,目前临床所用的 Ca^{2+} 通道阻滞剂均为 L 型(尚无 T 型),此类药物缓解症状可能与其抑制逼尿肌收缩力有关,因其仅能阻断 L 型通道,可能因此而不能消除 DI。因此有必要对逼尿肌细胞膜上钙离子通道的表达与特性进行更深入的研究[11]。如果能研制一种针对膀胱的 T 型钙通道的特异性拮抗剂,对于我们认识和解决临床上关于不同原因导致的逼尿肌不稳定的相关治疗将具有重要意义。

参考文献:

[1] 宋 波,金锡御. 尿动力学[A]. 见:李炎唐 主编. 泌尿外科高科技[M]. 北京:军事医学科学出版社, 1998. 158-160.

[2] Sibley G N. Developments in our understanding of detrusor instability [J]. Br J Urol, 1997, 80(Suppl 1): 54-61.

[3] 龚 宇,宋 波,熊恩庆,等. 大鼠 BOO 对膀胱逼尿肌生物力学特性的影响[J]. 第三军医大学学报, 2003, 25(22): 2002-2004.

[4] Brading A F. A myogenic basis for the overactive bladder [J]. Urology, 1997, 50(6A Suppl): 57-67.

[5] Hashitani H, Fukuta A, Takano H, *et al*. Origin and propagation of spontaneous excitation in smooth muscle of the guinea-pig urinary bladder[J]. J Physiol, 2001, 530(Pt 2): 273-286.

[6] Sui G P, Wu C, Fry C H. A description of Ca^{2+} channels in human detrusor smooth muscle[J]. BJU Int, 2003, 92(4): 476-482.

[7] 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 Urodyn, 2003, 22(1): 77-82.

[8] Buckner S A, Milicic I, Daza A V, *et al*. Spontaneous phasic activity of the pig urinary bladder smooth muscle: characteristics and sensitivity to potassium channel modulators[J]. Br J Pharmacol, 2002, 135(3): 639-648.

[9] Fry C H, Sui G P, Severs N J, *et al*. Spontaneous activity and electrical coupling in human detrusor smooth muscle: implications for detrusor overactivity[J]? Urology, 2004, 63(3 Suppl 1): 3-10.

[10] 李 新,宋 波,李益人,等. 钙通道在大鼠逼尿肌不稳定膀胱中的表达及变化[J]. 第三军医大学学报, 2003, 25(13): 1165-1167.

[11] Andersson K E. The overactive bladder: pharmacologic basis of drug treatment [J]. Urology, 1997, 50(6A Suppl): 74-84.

(编辑 汪勤俭)