技术方法

文章编号:1000-5404(2006)06-0608-02

大鼠膀胱平滑肌过度充盈后钙离子分布的变化

陶忠芬[1],李文刚[2],路 菊[1],可金星[1],宋 波[2],肖桃元[1] (第三军医大学:[1]高原军事医学系中心实验室,[2]西南医院全军泌尿外科中心,重庆 400038)

提 要:目的 观察大鼠膀胱平滑肌细胞钙离子在亚细胞水平的分布变化,同时探讨钙离子超微结构示踪方法。**方法** 健康雌性Wistar大鼠10只,分实验组(膀胱过度充盈2 h+排空后2 h)和正常对照组各5只,用草酸钾-戊二醛灌注固定取膀胱组织制样透射电镜观察。**结果** 示踪钙离子呈20 nm直径高电子密度细颗粒状,正常对照组大鼠膀胱平滑肌示踪钙离子数量少,散在分布于滑面内质网内,实验组示踪钙离子在损伤肌细胞内数量明显增多,弥漫密集分布,尤其聚集在线粒体周围。**结论** 急性尿潴留时膀胱平滑肌功能和结构损害与细胞内钙超载密切相关。钙示踪法是观察细胞内钙超载的可靠方法。

近年来国外学者研究证实急性尿潴留/排空后膀胱血流动力学变化存在典型的缺血再灌注特点,推测缺血再灌注在膀胱急性尿潴留时发挥十分重要作用,其中钙离子可能参与这一损害过程[1]。因此,从亚细胞水平观察膀胱逼尿肌细胞钙分布及超微结构的变化,对研究缺血再灌注时有十分重要的意义。本研究以超微结构钙示踪法观察急性尿潴留后膀胱平滑肌钙离子变化,以探讨钙离子在膀胱平滑肌结构和功能损伤中的作用及钙离子超微结构示踪方法。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康雌性Wistar大鼠10只(购自第三军医大学实验动物中心),4~5月龄,体质量200~245 g。完全随机分为2组,即正常对照组(C)、充盈2 h+排空后2 h组(E2),每组5只。

1.2 急性尿潴留模型的建立

实验组动物参照Chien等[2]所建膀胱过度充盈模型进行,1%戊巴比妥腹腔注射麻醉大鼠(40 mg/kg),以生理盐水灌注膀胱(0.1 ml/min)行膀胱测压,尔后排空膀胱,以同样灌注速度充盈膀胱,灌注量达到测定膀胱容量的2倍,保持2 h后排空膀胱,于排空后2 h取材。对照组单纯行膀胱测压,再以正常容量生理盐水充盈膀胱保持2 h,于排空后2 h取材。

1.3 取材

大鼠膀胱过度充盈2 h,排空后2 h,开腹,行腹主动脉插管,灌注90 mmol/L草酸钾(8.29 g草酸钾+500 ml生理盐水,pH为7.4)至下腔静脉流出清亮液体,再灌注2.5%戊二醛+90 mmol/L草酸钾30 ml,然后切取膀胱组织。将标本修成1 mm×1 mm×1 mm大小后放入2.5%戊二醛+90 mmol/L草酸钾混合液(pH为7.7)中固定。对照组也于排空后以同样方法取材。

1.4 制样方法

参照文献[3]的方法并作改进制样,样品用上述固定液中4 ℃冰箱避光固定24 h,7.5%蔗糖-90 mmol/L草酸钾溶液漂洗3次,30 min/次。用1%锇酸-2%焦锑酸钾溶液在4 ℃冰箱内固定2 h后,双蒸水清洗15 min。丙酮梯度脱水,环氧丙烷置换,环氧树脂618包埋,半薄切片定位,超薄切片,经铀—铅双染色后PHILIPS-TECNAI 10透射电镜80 kV观察并照相。

2 结果

示踪钙离子呈20 nm直径的高电子密度颗粒。正常组膀胱平滑肌细胞示踪钙离子数量少,主要分布于肌浆网内,也可见于线粒体,粗面内质网腔,肌细胞超微结构无异常,肌丝规则整齐排列,密体密斑可见,线粒体、内质网、细胞核等细胞器形态正常(图1)。在实验组,膀胱过度充盈排空后,示踪颗粒在损伤肌细胞明显增多,示踪颗粒在细胞基质内弥漫分布,尤其聚集在线粒体周围,细胞核内也见钙颗粒聚集,肌丝、密斑溶解消失,线粒体及内质网扩张,偶见细胞核浓缩(图2)。这种损伤的肌细胞散在几个或单个分布,以血管周围的平滑肌细胞多见。其他细胞损伤相对较轻,示踪颗粒数量较少,散在分布。

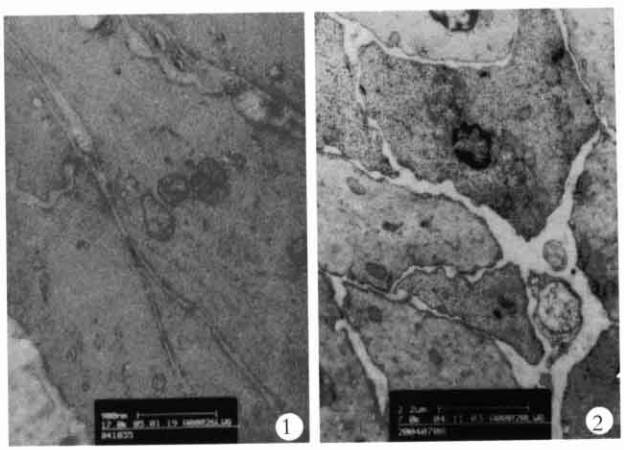


图1 正常逼尿肌细胞钙的超微结构分布 (TEM×17 000)

图2 膀胱过度充盈后逼尿肌细胞钙的超微结构分布 (TEM×7 000)

作者简介:陶忠芬(1977-),女,重庆市人,实验师,主要从事电镜技术方面的研究。电话:(023)68752348

通讯作者:肖桃元,E-mail:xty@mail.tmmu.com.cn

收稿日期:2005-03-29;**修回日期:**2005-07-04

3 讨论

钙是参与细胞代谢活动的重要元素，作为细胞内信使之一，几乎参与一切外来信息的信号转导过程，因此，细胞内钙离子稳态的维持对于细胞生命活动至关重要。研究表明，多种原因的损伤（缺血、缺氧、创伤等）都有钙稳态的破坏和细胞内钙超载的参与。膀胱是一平滑肌器官，膀胱的兴奋收缩耦联与钙离子变化密切相关。急性尿潴留不仅使逼尿肌收缩力下降，还可导致平滑肌凋亡，推测这种变化与钙超载有关[1,4]。我们通过大鼠膀胱过度充盈模型观察发现急性尿潴留/排空后平滑肌细胞肌丝、密体密斑结构破坏，细胞器肿胀，部分细胞核浓缩，细胞内钙沉积显著增多，这些结果提示急性尿潴留时膀胱平滑肌功能和结构损害与细胞内钙超载密切相关。导致逼尿肌钙超载的机制十分复杂，可能与以下因素有关[5]：急性尿潴留导致膀胱组织缺血缺氧（膀胱壁血管受压），ATP生成不足，依赖ATP的钙泵、钠钾泵功能障碍，使得钙内流增加（血管平滑肌细胞钙示踪增加尤其显著）；缺血再灌注产生自由基引起细胞膜脂质双分子层氧化，膜通透性增高，使细胞外钙内流，细胞内储存钙释放；平滑肌细胞内质网对钙的回摄能力减退。

细胞化学钙染色的电镜观察法是一直观可靠的钙染色法，不仅可以观察钙在亚细胞水平的分布情况，而且可同时观察细胞超微结构。我们通过反复摸索，细胞化学钙染色成功的关键是：最好采用活体原位组织灌注，这样使组织及时快速固定，超微结构保存良好，同时钙化学反应充分。与心脑组织不同，逼尿肌对缺血缺氧耐受性较高，组织损害常表现为局灶性改变，所以取材时要多取组织块，从中筛选，提高阳性率，以保证观察到病变及钙沉积。后固定液中焦锑酸钾的终浓度为2%。由于焦锑酸钾难溶于水，可采用将双蒸水加热至沸腾，然后加入焦锑酸钾，置于磁力搅拌器上溶解。将pH值调至7.8～8.0，可保持溶液澄清透亮而不易沉淀。

关键词：膀胱平滑肌；钙离子；急性尿潴留；透射电镜
中图法分类号：R334.3 **文献标识码**：B

参考文献：

[1] SAITO M, MIYAGAWA I. Bladder dysfunction after acute urinary retention in rats[J]. J Urol, 2001, 165(5): 1745－1747.
[2] CHIEN C T, YU H J, CHENG Y J, *et al*. Reduction in renal haemodynamics by exaggerated vesicovascular reflex in rats with acute urinary retention[J]. J Physiol, 2000, 526(Pt 2): 397－408.
[3] 姜少军，周晓军，张 淼. 表皮钙离子超微结构定位的研究（英文）[J]. 解剖学报，2004，35(4)：426－429.
[4] YU H J, CHIEN C T, LAI Y J, *et al*. Hypoxia preconditioning attenuates bladder overdistension-induced oxidative injury by up-regulation of Bcl-2 in the rat[J]. J Physiol, 2004, 554(Pt 3): 815－828.
[5] 王迪浔，金惠铭. 人体病理生理学[M]. 第2版. 北京：人民卫生出版社，2002：59－63.

（编辑 陈聪连）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2006)06-0609-01

经皮内镜胃造瘘术的临床应用

刘爱民，雷德安，吴 涛，张 盛，余义芬，任在跃 （重庆市涪陵中心医院消化科，涪陵 408000）

1 资料与方法

1.1 临床资料

男性18例，女性5例，年龄29～61岁，中位年龄48岁。其中脑外伤17例，脑溢血2例，食管气管瘘3例，瘘口直径>0.5 cm，上段食道癌1例。脑部疾病者均存在不同程度意识障碍，行PEG前均已行鼻饲或深静脉营养1～2 m。

1.2 方法

1.2.1 术前准备 患者准备：①同常规胃镜检查，对凝血机制障碍者须先纠正凝血功能；②B超探测左上腹排除胃前壁有无其他脏器。器械准备：①胃造瘘管全套由荷兰纽迪希亚，美国COOK公司生产；②胃镜：Olympus XQ-240和Pentax EG-2930K

1.2.2 手术方法 常规胃镜检查排除幽门梗阻等病变后，退镜至胃体部，改为半卧位，充气使胃扩张至胃黏膜无皱折，借助腹壁上的透腹内镜光线确定腹部穿刺点并标记（通常位于胃的左上1/4）。穿刺点常规消毒铺巾，2%利多卡因5 ml逐层麻醉后，穿刺点用手术刀处作0.4～0.5 cm皮肤切口，钝分至肌层，胃镜直视下，套管穿刺针垂直刺入胃腔，拔除针芯，套管留在原处，经套管插入引导丝线，经胃镜活检孔插入圈套器套紧引导丝线，连同胃镜一起退出口外，先将造瘘管顶端在水中浸泡片刻以激活其顶端的润滑材料，以便造瘘管能顺利地经腹壁拉出体外。再将引导丝线与造瘘管鼠尾状环行末端套紧，经留在腹壁外的引导丝线缓缓拉出，将造瘘管拉入胃腔，再次插入胃镜观察蘑菇头与胃壁贴紧，通过造瘘管向胃腔内注射20 ml生理盐水，内镜下见造瘘管通畅，并确认胃前壁与腹壁紧密接触，松紧适度后将皮肤垫盘锁牢固定，盘片必须紧贴腹壁，留出所需长度后，加上管道固定夹，快速释放夹，剪掉造瘘管末端，接上喂养管连接器，术毕。

作者简介：刘爱民（1969－），男，重庆涪陵市人，副主任医师，主要从事消化系疾病的内镜及放射介入治疗方面的研究，发表论文10余篇。电话：(023)72008546

收稿日期：2005-06-18；修回日期：2006-02-17

（下转614页）