文章编号:1000-5404(2006)17-1795-03

论著

BKcaα1 基因在 DI 大鼠膀胱中的表达

张远宁[1,2],宋 波[1],金锡御[1],张艮甫[2],文前军[1] (第三军医大学:[1]西南医院全军泌尿外科中心,重庆 400038;[2]新桥医院泌尿外科,全军肾脏病中心,重庆 400037)

提 要:目的 研究逼尿肌不稳定(Detrusor instability,DI)大鼠膀胱中大电导钙激活钾 α1 通道(Big conductance calcium activated potassium channelα1,BKcaα1)基因的表达,探讨 BKcaα1 通道在逼尿肌不稳定发生中的作用。**方法** 建立 Wistar 大鼠 DI 模型,采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)及免疫组织化学染色技术,检测 BKcaα1 基因在 DI 大鼠膀胱中的表达。**结果** BKcaα1 基因在 DI 大鼠膀胱中的表达降低。**结论** BKcaα1 通道反馈调节逼尿肌的收缩,可能与 DI 的发生有关。

关键词:逼尿肌不稳定;钙激活钾通道;收缩
中图法分类号:R322.62;R394.2;R694.502 **文献标识码**:A

Expression of BKcaα1 gene in rat bladder of detrusor instability

ZHANG Yuan-ning[1,2], SONG Bo[1], JIN Xi-yu[1], ZHANG Gen-fu[2], WEN Qian-jun[1] ([1]Urinary Surgery Research Center, Southwest Hospital, Chongqing 400038, [2]Renal Diseases Research Center, Department of Urinary Surgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To study the expression of BKcaα1 gene in rat bladder of detrusor instability and its role in DI. **Methods** The detrusor instability (DI) was established in 20 female Wistar rats and another 20 rats were used as controls. At 5 or 6 weeks after DI establishment, the expression of BKcaα1 gene in bladder of DI rats and normal rats was detected with reverse transcriptase chain reaction and immunohistochemistry. **Results** The expression of BKcaα1 gene was decreased in DI bladder. **Conclusion** The BKcaα1 channel feedback regulates the contraction of detrusor, which is related to the detrusor instability.

Key words: detrusor instability; calcium activated potassium channel; contraction

逼尿肌不稳定(detrusor instability,DI)是指储尿期发生人为意识不能控制的逼尿肌收缩[1]。逼尿肌发生自发性兴奋和收缩的能力受到细胞膜电位和相关离子及通道等多因素的影响,其中钙是细胞内参与兴奋和收缩调节的主要离子。钙离子内流引起细胞去极化,大电导钙激活钾通道(big conductance calcium activated potassium channel,BKca)同时被激活,引起钾的外流,促使细胞复极化。BKca 通道中的 α1 亚型,既可被内向的钙电流激活,又可在机械牵张下激活[2]。

本实验检测 DI 大鼠膀胱中 BKcaα1 基因的表达,探讨 BKcaα1 通道在 DI 发生中的作用。

1 材料与方法

1.1 动物及 DI 动物模型的建立

40 只健康雌性 Wistar 大鼠,体质量约 180~200 g/只,由我校实验动物中心提供。其中 20 只大鼠采用 BOO 法建立 DI 模型[3],另外 20 只为对照组。

作者简介:张远宁(1974-),男,山东省泰安市人,博士,主治医师,主要从事逼尿肌不稳定方面的研究。电话:(023)68398816

收稿日期:2005-08-25;修回日期:2005-11-24

1.2 膀胱充盈性压力测定

DI 模型第 5、6 周大鼠及对照组大鼠行膀胱造瘘,造瘘 1 周后行膀胱充盈性压力测定。造瘘管通过三通管与微量灌注泵、尿动力仪相连,记录膀胱最大容量(Max Volume ml)、最大逼尿肌压(Max Pdet cmH_2O)、膀胱顺应性(Compliance,C = △Volume/△Pdet)。

1.3 引物和试剂

BKcaα1 引物为:5′-CGAACCATCTCAGCCTAGACG-3′,5′-CAAGAAAGCCCACCACATGC-3′,其特异性片段长度为 167 bp;β-actin 引物:5′-GTGGGGCGCCCCGGCACCA-3′,5′-CTCCTTAATGTCACGCACGATTT-3′,特异性片段长度为 500 bp。以上引物由上海博亚生物技术有限公司合成。逆转录试剂盒为美国 Promega 公司产品,PCR 试剂盒购自大连宝(TAKARA)生物有限公司,DNA Marker:DL 2000 购自大连宝(TAKARA)生物有限公司。

1.4 RT-PCR 反应

选取 DI 模型第 5、6 周大鼠及对照无 DI 发生的大鼠新鲜膀胱逼尿肌组织,解剖镜下仔细剔除黏膜及膀胱外膜,匀浆组织,采用 Tripure 提取总 RNA。1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性。逆转录反应体系:total RNA(1 μg/μl) 1 μl、Riandon 9 mers(50 pmol/μl) 1 μl、DEPC 处理水 8 μl,置 75 ℃反应 5 min,立即冰浴;再加入 Promega 5 × buffer 5 μl、TaKaRa dNT-

Pmixture(10 mmol/L)1.25 μl、TaKaRa Rnase Inhibitor(40 U/μl) 0.625 μl、Ptomega M-MlV RT(200 U/μl) 1 μl、DEPC 处理水 7.125 μl,混匀,置 42 ℃反应 1 h。聚合酶链式反应体系:cDNA 10 μl、10 × buffer 5 μl、$MgCl_2$(25 mmol/L) 8 μl、dNTP(2.5 mmol/L) 4 μl、*Taq* 酶(5 U/μl) 0.25 μl、ddH_2O 20.75 μl、Primer1 (20 mmol/L) 0.5 μl、Primer2(20 mmol/L) 0.5 μl、β-action Primer1 0.5 μl、β-action Primer2 0.5 μl, 94 ℃ 5 min 预变性,94 ℃ 45 s 变性、56 ℃ 50 s 退火、72 ℃ 1 min 延伸(32 个循环),最后延伸 72 ℃,10 min。PCR 扩增产物行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,110 V,90 min。紫外灯下观察、摄影。

1.5 免疫组织化学染色方法监测 BKcaα1 的表达

抗体及试剂盒购自武汉博士德公司。选取 DI 模型第 5、6 周大鼠及对照无 DI 发生的大鼠,处死后切取膀胱组织,在 PBS 内将膀胱组织切碎,采用Ⅳ型胶原酶消化,接种到 24 孔培养板,培养板内放置载玻片,置于 37 ℃ CO_2 孵箱内培养。细胞爬片满意后,4% 多聚甲醛固定,按照试剂盒说明,行免疫组织化学染色。以 0.01 mol/L PBS 代替一抗,作为阴性对照。

1.6 图像分析

采用 Leica Qwin/Plus 软件对 RT-PCR 及免疫组织化学染色图片进行图像灰度分析。

1.7 统计学方法

所有实验数据的计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,结果采用 SPSS 11.0 统计软件行单因素方差分析。

2 结果

2.1 膀胱充盈性测压

DI 组及对照组的膀胱测压数据结果见表 1。

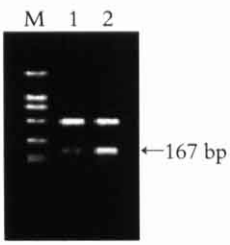
表 1 对照及 DI 大鼠膀胱充盈性测压结果比较($\bar{x} \pm s$)

组别	最大容量(ml)	最大逼尿肌压(cmH_2O)	顺应性(ml/cmH_2O)
对照组	0.38 ± 0.03	52.50 ± 7.80	0.006 3 ± 0.001 4
DI 组	1.18 ± 0.41[a]	90.53 ± 11.90[a]	0.012 6 ± 0.003 9[a]

a: $P<0.01$,与对照组比较

2.2 BKcaα1 基因的表达

应用 BKcaα1 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 167 bp 的目的基因片段;BKcaα1 基因在 DI 大鼠逼尿肌组织的表达产物量少于对照组,两者相差显著($P<0.05$),见图 1。



M: DNA 标准; 1: DI 组; 2: 对照组

图 1 RT-PCR 检测 BKcaα1 基因的表达

2.3 免疫组织化学染色

免疫组织化学染色结果显示,BKcaα1 在 DI 及对照组细胞中均有表达,BKcaα1 的在 DI 细胞中的表达明显弱于对照组细胞。选取高倍镜下细胞数目相同的视野,采用 Leica Qwin/Plus 软件对图像进行灰度分析。结果显示 DI 组灰度值 138.86 ± 12.45 与对照组灰度值 249.26 ± 19.86 差异有显著性($P<0.01$)。

3 讨论

逼尿肌是一种特殊的平滑肌,可产生自发性的收缩,即逼尿肌细胞具有可兴奋性。由于膀胱功能调节非常复杂,目前关于逼尿肌兴奋的产生和调节机制尚未完全清楚。逼尿肌不稳定是指储尿期发生人为意识不能抑制的逼尿肌收缩,膀胱压≥15 cmH_2O,常引起尿频、尿急、急迫性尿失禁等临床症状,严重者可导致肾积水和肾功能损害。在我科以往的研究中证实,肌源性因素是 DI 的重要机制之一[4]。

逼尿肌自发性兴奋和收缩受到静息电位、阈电位及相关离子通道性状等因素的共同影响,其中钙内流增加和钾外流减少是重要的原因。钙激活的钾通道包括大电导的 BKca 和小电导的 Skca 两种。BKca 受胞内一过性局部钙增加即钙火花(Ca^{2+} sparks)激活而产生外向电流,参与动作电位的复极化与快速超极化,动作电位期钙的进一步内流则同时激活 BKca 和 Skca,后者参与细胞电位后超极化。在大电导的 BKca 中,其 α1 亚型既可被内流的钙火花激活,同时可牵张激活,属于牵张激活阳离子通道(stretch-activated cation channels,SACs)之一[5]。

逼尿肌具有自发兴奋性,其细胞膜静息电位(resting membrane potential,RMP)为 -42 mV 左右。膀胱在充盈状态下,逼尿肌承受一定前负荷,由于牵张反射,兴奋并开放与牵张刺激有关的特定性离子通道,造成细胞内外的离子流,再通过一系列的作用,产生肌肉收缩[6]。在牵张兴奋的同时,BKcaα1 通道被激活,对逼尿肌细胞自发动作电位的时程和峰值产生负反馈地影响,进而抑制钙通道的开放,从而降低逼尿肌的兴奋性。这是一种生理状态下的负反馈调节,从而维持逼尿肌兴奋的平衡[7]。

在本实验中,采用 BOO 法建立排尿梗阻模型。在我们以往的研究中发现,术后早期 DI 的发生率较低,但在第 8 周后,膀胱的排尿压、顺应性与自发收缩活动却开始出现下降趋势。在第 5、6 周 DI 发生率为 96%,且在第 5、6 周处于一相对稳定水平状态[4]。因此,在本实验中选取的 DI 动物模型为术后 5、6 周。

在本实验中,测压结果显示 DI 组的膀胱容量、逼尿肌压及膀胱顺应性较正常对照组增高,差异显著。采用逆转录-聚合酶链反应及免疫组织化学染色技术检测 BKcaα1 的表达显示 BKcaα1 在 DI 大鼠逼尿肌组织的表达产物量少于对照组。BKcaα1 在两类大鼠膀

胱逼尿肌中均存在，但其表达量产生了变化，有可能导致通道的功能变化，因而对逼尿肌的兴奋调节作用也可能出现变化，正常与 DI 逼尿肌的这种差异性表达有可能成为 DI 发生的组织学基础。

综上所述，引起 DI 膀胱逼尿肌兴奋性改变的因素是多方面的，BKcaα1 基因表达的改变可能与 DI 的发生有关，值得我们进一步的研究。

参考文献：

[1] 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.

[2] PARK S Y，LEE M Y，KEUM E M，*et al*. Ionic currents in single smooth muscle cells of the human vas deferens[J]. J Urol，2004，172(2)：628－633.

[3] 邱功阔，宋　波，金锡御，等. 逼尿肌不稳定发病机制的研究[J]. 中华实验外科杂志，2003，20(1)：91.

[4] 邱功阔，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.

[5] TANG Q Y，QI Z，NARUSE K，*et al*. Characterization of a functionally expressed stretch-activated BKca channel cloned from chick ventricular myocytes[J]. J Membr Biol，2003，196(3)：185－200.

[6] WELLNER M C，ISENBERG G. Properties of stretch-activated channels in myocytes from the guinea-pig urinary bladder[J]. J Physiol，1993，466：213－227.

[7] CHIANG H T，WU S N. Inhibition of large-conductance calcium-activated potassium channel by 2-methoxyestradiol in cultured vascular endothelial (HUV-EC-C) cells[J]. J Membr Biol，2001，182(3)：203－212.

[8] 杨　航，宋　波，金锡御，等. 逼尿肌不稳定中钙激活钾/氯通道 mRNA 表达差异的实验研究[J]. 第三军医大学学报，2004，26(9)：781－783.

[9] 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.

（编辑　陈聪连）

（上接 1787 页）

值，3 个视野总 IOD 值作为该侧脑组织阳性染色 IOD 值，计算左侧与右侧 IOD 值之比，以 L∶R_{NF} 表示。每例标本选择 3 张相邻切片，取平均值作为此例标本 L∶R_{NF} 结果。同时用图像分析软件分别测定双侧脑半球横截面积，计算左侧与右侧脑半球横截面积之比，以 L∶R_{AREA} 表示，每例标本选择 3 张相邻切片，取平均值为此例 L∶R_{AREA} 结果。

1.3　统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，以 SPSS 11.0 统计软件进行方差分析。

2　结果

HI 后 1 周缺氧缺血组左侧脑组织 NF-H 表达明显减少，以外囊、纹状体最为明显。缺氧缺血组 L∶R_{NF} 值明显小于假手术组（$P<0.01$），干预组 L∶R_{NF} 值高于缺氧缺血组（$P<0.05$）。缺氧缺血组 L∶R_{AREA} 值较假手术组明显下降（$P<0.01$）。干预组 L∶R_{AREA} 值较缺氧缺血组明显升高（$P<0.01$）（表 1）。

表 1　HI 后 1 周双侧脑半球横截面积及磷酸化 NF-H 积分光密度比值（$\bar{x} \pm s$）

组别	n	L∶R_{NF}	L∶R_{AREA}
假手术组	8	0.990 ± 0.010[b]	0.985 ± 0.023[b]
缺氧缺血组	8	0.475 ± 0.106	0.680 ± 0.043
干预组	8	0.671 ± 0.145[a]	0.804 ± 0.031[b]

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与缺氧缺血组比较

3　讨论

神经丝是轴突细胞骨架的主要成分。除支持作用外，在物质运输、能量转化、以及跨膜信号传递等病理生理过程中发挥重要作用[3]。哺乳动物的神经丝主要由 NF-L、NF-M、NF-H 3 种亚基组成。磷酸化 NF-H 主要分布于轴突[4]，是轴突成熟的标志之一。通过与其他神经丝蛋白亚基产生的静电斥力保持轴索圆管形结构，决定轴突直径；并与临近的细胞骨架成分相连接，影响轴突转运。本实验应用 NF 单克隆抗体标记磷酸化 NF-H，观察轴突蛋白表达。

本实验显示新生鼠 HIBD 后患侧磷酸化 NF-H 表达明显减少，与 Stys 等[5] 的结果一致。磷酸化 NF-H 的破坏可能使得轴突管径缩小，轴浆流动改变[6]，从而影响轴突运输功能，造成细胞器、递质传送障碍，最终导致轴突结构与功能的破坏。本实验还显示 HI 后立即予 GYKI-52466 治疗使得脑半球面积减少程度显著下降，NF-H 表达明显增加。提示 AMPA 受体拮抗剂 GYKI-52466 能有效缓解 HI 对发育中脑组织的病理损害，减轻轴突损伤。

关键词：受体，AMPA；脑缺血；脑缺氧；神经丝

中图法分类号：R743.31；R741.05　　**文献标识码**：B

参考文献：

[1] GRESSENS P，SPEDDING M，GIGLER G，*et al*. The effects of AMPA receptor antagonists in models of stroke and neurodegeneration[J]. Eur J Pharmacol，2005，519(1－2)：58－67.

[2] PAXINOS G，WATSON C. The rat brain in stereotaxic coordinates[M]. Sydney：Academic Press，1982.

[3] ACKERLEY S，THORNHILL P，GRIERSON A J，*et al*. Neurofilament heavy chain side arm phosphorylation regulates axonal transport of neurofilaments[J]. J Cell Biol，2003，161(3)：489－495.

[4] SHAW G，YANG C，ELLIS R，*et al*. Hyperphosphorylated neurofilament NF-H is a serum biomarker of axonal injury[J]. Biochem Biophys Res Commun，2005，336(4)：1268－1277.

[5] STYS P K，JIANG Q. Calpain-dependent neurofilament breakdown in anoxic and ischemic rat central axons[J]. Neurosci Lett，2002，328(2)：150－154.

[6] ARONOWSKI J，CHO K H，STRONG R，*et al*. Neurofilament proteolysis after focal ischemia：when do cells die after experimental stroke?[J]. J Cereb Blood Flow Metab，1999，19(6)：652－660.

（编辑　王　红）