文章编号:1000-5404(2006)10-1057-03

论著

钙信号在周期性牵张诱导逼尿肌细胞高表达Cx43中作用的实验研究

闵勇正,卢根生,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 探讨钙信号在周期性牵张诱导膀胱逼尿肌细胞高表达连接蛋白43(Connexin43,Cx43)中的作用。**方法** 运用牵张膀胱逼尿肌细胞体外模型,给逼尿肌细胞周期性20%牵张持续6 h,采用RT-PCR测定受EGTA孵浴的逼尿肌细胞Cx43 mRNA表达改变;采用激光共聚焦法,测定不同钙通道拮抗剂作用条件下,细胞内游离钙离子浓度($[Ca^{2+}]_i$)的改变。**结果** 牵张前30 min培养基中加入5 mmol/L EGTA,可以显著抑制牵张诱导的Cx43 mRNA高表达;机械牵张可以显著增加$[Ca^{2+}]_i$;5 mmol/L EGTA可以完全抑制牵张诱导的$[Ca^{2+}]_i$增加;$GdCl_3$、硝苯地平、兰尼碱与毒胡萝卜素可分别抑制61.95%、29.98%、87.98%由牵张诱导的$[Ca^{2+}]_i$增加。**结论** 牵张诱导Ca^{2+}内流及通过Ca^{2+}内流诱导的钙触发钙释放(calcium-induced Ca^{2+} release, CICR),在牵张诱导的逼尿肌细胞Cx43高表达反应中可能起着重要的作用。

关键词: 周期性牵张;逼尿肌;细胞;Cx43;$[Ca^{2+}]_i$

中图法分类号: R-332;R329.27;R694.202 **文献标识码:** A

Role of Ca^{2+} signaling in overexpression of detrusor smooth muscle cell connexin 43 by cyclic stretch *in vitro*

MIN Yong-zheng, LU Gen-sheng, SONG Bo (Urinary Surgery Research Center, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the role of Ca^{2+} signaling in the overexpression of detrusor smooth muscle cell connexin 43 by cyclic stretch *in vitro*. **Methods** The detrusor smooth muscle cells (DSMC) grown on collagen-coated silicone membranes were subjected to cyclic stretch-relaxation. The Cx43 mRNA in DSMC were detected with RT-PCR, and the concentration of intracellular free Ca^{2+} in DSMC was measured by confocal microscopy in conjunction with the calcium indicator, Fura-3 (Molecular Probes). **Results** The overexpression of Cx43 mRNA induced by cyclic stretch was significantly inhibited by EGTA. The increase of intracellular free Ca^{2+} induced by stretch was also inhibited completely by EGTA, 61.95% by $GdCl_3$, 29.98% by Nifedipine, 87.98% by Ryanodine and Thapsigargin. **Conclusion** The stretch-induced Ca^{2+} entry, *via* the Ca^{2+}-induced Ca^{2+} release mechanism, may play an important role in DSMC connexin 43 overexpression induced by cyclic stretch.

Key words: cyclic stretch; detrusor smooth muscle cell; connexin 43; $[Ca^{2+}]i$

缝隙连接是相邻细胞间电耦联的媒介及离子交换的低阻力膜通道,Cx43是膀胱逼尿肌中最重要的细胞缝隙连接蛋白之一。近年来的研究结果表明[1-3]:逼尿肌细胞兴奋性增加是不稳定膀胱发生的重要原因,逼尿肌细胞间缝隙连接增加与逼尿肌不稳定发生有较密切的关系。在前列腺增生(benign prostatic hyperplasia, BPH)患者膀胱及不稳定膀胱大鼠模型中也已观察到缝隙连接表达增高[4,5],且以连接蛋白Cx43增高为主。可以认为:如果没有细胞间兴奋传递,那么,即使细胞兴奋性增加也不会出现不稳定膀胱。所以,Cx43表达增高在梗阻后膀胱功能异常中应该起着极其重要的作用。

应用周期性牵张膀胱逼尿肌细胞体外模型可以模拟在体膀胱流出道梗阻后膀胱所受到的超负荷状态。该模型是研究膀胱流出道梗阻后其结构和功能改变的有效的手段。本研究运用周期性牵张膀胱逼尿肌细胞体外模型,初步探讨钙信号在牵张诱导Cx43表达增加反应中的作用。

1 材料与方法

1.1 仪器与材料

BioFlex®培养皿(Flexcell公司,美国)、CO_2培养箱(荷尔公

作者简介:闵勇正(1977-),男,江西省上饶市人,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:2006-02-21;修回日期:2006-03-24

司，德国）、Olympus 1-M 型倒置荧光显微镜（Olympus 公司，日本）、BIM-Ⅲ小型生物撞击机（第三军医大学大坪医院野战外科研究所）、2～3 月龄 SD 雄性大鼠，体质量 150～180 g（第三军医大学实验动物中心）、SP-2 激光共聚焦成像系统（Leica，德国）。

1.2 主要试剂

DMEM 液干粉（Hyclone 公司）、胎牛血清（Hyclone 公司）、D-Hank's 液（Hyclone 公司）、Ⅰ型胶原酶（Sigma 公司），胰蛋白酶（Amresco 公司国），Tripure（Omega 公司，美国）、RT-PCR 试剂盒（Promega 公司）、Cx43 引物及 β-actin 内参引物（上海博亚公司），EGTA（Amresco 公司），$GdCl_3$（Sigma 公司）、硝苯地平（Sigma 公司）、兰尼碱（Sigma 公司）、毒胡萝卜素（Sigma 公司）、Fura-3（Molecular Probes）。

1.3 方法

1.3.1 周期性牵张模型的建立　取 2～4 代培养之逼尿肌细胞接种于 6 孔 BioFlex® 培养皿，细胞接种密度约为 1.5×10^5/孔。细胞融合达 80% 左右后，受到由计算机控制的周期性牵张。牵张参数设置：频率为 6 周期/min（每个周期包括 5 s 牵张及 5 s 松弛），牵张拉伸度为 20%，用于行 RT-PCR 组别之细胞持续时间为 6 h，用于测定细胞内游离 Ca^{2+} 浓度组别之细胞持续时间为 30 min。牵张前细胞在含 1% 胎牛血清的 DMEM 液中孵育 12 h，之后换新鲜含 10% 胎牛血清的 DMEM 液。

1.3.2 实验分组　正常对照组：正常培养的逼尿肌细胞不给予牵张刺激。单纯牵张刺激组（记为 S_0）：计算机控制予以 20% 牵张拉伸。EGTA 处理组（记为 S_E）、$GdCl_3$ 处理组（记为 S_G）、硝苯地平处理组（记为 S_N）、兰尼碱与毒胡萝卜素处理组（记为 $S_{R\text{-}T}$）：细胞受 20% 牵张拉伸前分别在含 5 mmol/L EGTA、0.5mmol/L $GdCl_3$、5 μmol/L 硝苯地平、10 μmol/L 兰尼碱和 10 μmol/L 毒胡萝卜素的完全培养基中孵浴 30 min。

1.3.3 RT-PCR 测定膀胱逼尿肌细胞 Cx43 mRNA　RNA 提取方法按 Tripure 产品说明书进行，提取的 RNA 纯度行紫外分光光度测定，吸光度 $D(260)/D(280)$ 值均在 1.8～2.0 之间，表明 RNA 无明显降解。设计引物：Cx43 上游 5′-GCGGCTTGCTGAGAACCTACA-3′，下游 5′-CGTTGGTCCACGATGGCTAAT-3′，PCR 产物片段为 640 bp；内参 β-actin 上游 5′-CCACTGCCGCATCCTCTT-3′，下游 5′-TCCTGCTTGCTGATCCACATC-3′，PCR 产物片段为 400 bp。取 1 μg RNA 按 RT-PCR 试剂盒操作说明进行。PCR 条件为：94 ℃预变性 2 min；94 ℃变性 1 min、53 ℃退火 30 s、72 ℃延伸 30 s，循环 30 次；72 ℃延伸 10 min；4 ℃保温约 30 min。RT-PCR 结束后取 5 μl PCR 产物行 1% 琼脂糖凝胶电泳。

1.3.4 细胞内游离 Ca^{2+} 浓度的测定　采用激光共聚焦法。具体步骤如下：取待测细胞用 0.01 mol/L PBS 液（pH 值 7.4）洗 2 次，加入用 PBS 液稀释的 4.0 nmol/L Fura-3 100 μl，于 37 ℃、5% CO_2 条件下孵育 40 min；细胞再用 PBS 液洗 2 次，立即置于共聚焦显微镜下观察，可得到细胞的荧光图像。每组扫描 20 个细胞，以每个细胞荧光强度值表示细胞内 Ca^{2+} 浓度。

1.4 统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 统计分析软件，两组间比较行 t 检验。

2 结果

2.1 周期性牵张对膀胱逼尿肌细胞 Cx43 mRNA 相对表达的影响

RT-PCR 后经凝胶成像分析系统扫描分析测定，见图 1。正常膀胱逼尿肌细胞 Cx43 mRNA 相对表达量为（0.42 ± 0.019）（Int × mm^2/Int × mm^2）；周期性牵张可诱导 Cx43 mRNA 表达明显增加，达（0.94 ± 0.021）（Int × mm^2/Int × mm^2）（$P<0.01$）；而牵张前给予 5 mmol/L EGTA Cx43 mRNA 相对表达量下降为（0.43 ± 0.018）（Int × mm^2/Int × mm^2），与牵张组比较差异非常显著（$P<0.01$），与正常对照组比较无显著性差异（$P>0.05$）。

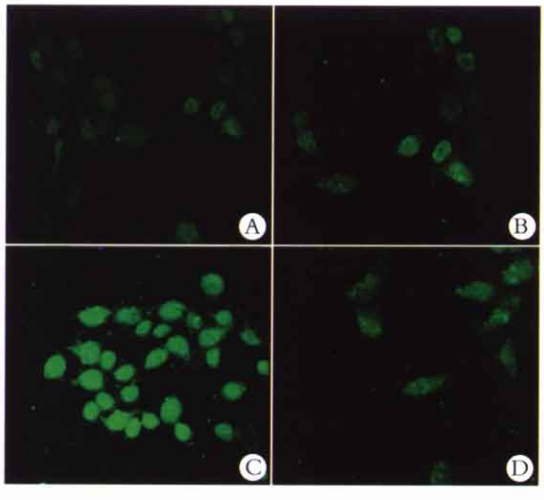


M：标准；1,3,5：β-actin；2：对照组；4：S_0；6：S_E

图 1 RT-PCR 分析结果

2.2 细胞内游离 Ca^{2+} 浓度变化

各组细胞内荧光强度见表 1。可见，静息期膀胱逼尿肌细胞内游离 Ca^{2+} 浓度均值为（65.01 ± 6.91）荧光单位；牵张刺激可诱导膀胱逼尿肌细胞内游离 Ca^{2+} 含量迅速升高，达到（227.40 ± 13.35）荧光单位（$P<0.01$）；若预先分别加入 5 mmol/L EGTA，或 0.5 mmol/L $GdCl_3$，或 2 μmol/L 硝苯地平，或 10 μmol/L 兰尼碱和 10 μmol/L 毒胡萝卜素，对单纯牵张诱导细胞内钙离子浓度增加的抑制程度［其计算公式为：所求组抑制程度 = 1 −（该组荧光强度 − 正常对照组荧光强度）/（单纯牵张组荧光强度 − 正常对照组荧光强度）］分别为 100%、61.95%、29.98%、87.98%，见图 2。



A：对照组；B：S_E 组；C：S_0 组；D：$S_{R\text{-}T}$ 组

图 2 $[Ca^{2+}]_i$ 的 Fura-3 负载激光共聚焦检测（×100）

表 1　细胞内游离 Ca^{2+} 浓度变化（$n=20$）

组别	细胞内游离 Ca^{2+} 浓度（$\bar{x}\pm s$）	抑制 $[Ca^{2+}]_i$ 升高的程度（%）
对照组	65.01 ± 6.91	—
S_0	227.40 ± 13.35[a]	—
S_E	63.89 ± 6.23[b]	100.00
S_G	126.80 ± 12.43[a]	61.95
S_N	178.72 ± 15.45[a]	29.98
S_{R-T}	84.52 ± 8.45[a]	87.98

a：$P<0.01$，与对照组比较；b：$P<0.01$，与 S_0 组比较

3　讨论

本实验显示，5 mmol/L EGTA 可以完全抑制由周期性牵张刺激所导致的 Cx43 mRNA 表达增加；同时，EGTA 可以完全抑制由周期性牵张刺激所导致的 $[Ca^{2+}]_i$ 升高。EGTA 是 Ca^{2+} 螯合剂，说明牵张刺激所导致的 Cx43 表达升高反应是钙依赖性的。细胞外 Ca^{2+} 的内流可能是这一反应的初始刺激因素。我们接下来观察了几种不同的钙离子通道在这一反应中所起的作用。

牵张激活离子通道（stretch-activated ion channels，SACs）存在于多种类型的细胞中，是机械敏感性离子通道的一种，受偶联通道蛋白的细胞支架或脂质膜张力变化的调控。$GdCl_3$ 是牵张激活离子通道拮抗剂，我们发现，0.5 mmol/L $GdCl_3$ 可以抑制 61.95% 由周期性牵张刺激所导致的 $[Ca^{2+}]_i$ 升高。显示牵张激活离子通道在周期性牵张诱导膀胱逼尿肌细胞 Cx43 表达增加反应中可能起着较为重要的作用。而 Kushida 等[6]报道：细胞受到牵张前，培养基中加入氯化钆，可以完全抑制牵张诱导的 c-Jun 氨基端激酶活化；可见周期性牵张膀胱逼尿肌细胞诱导的 c-Jun 氨基端激酶活化完全依赖于牵张激活离子通道。这与我们的发现稍有差异，其原因可能是牵张模型不一致或牵张诱导 Cx43 表达增加与牵张诱导 c-Jun 氨基端激酶活化两个反应所涉及的机制不同。

L 型钙离子通道所起作用可能相对较小，因为 2 μmol/L 硝苯地平仅可抑制 29.98% 由周期性牵张刺激所导致的 $[Ca^{2+}]_i$ 升高。关于硝苯地平在抑制由周期性牵张刺激所导致的 $[Ca^{2+}]_i$ 升高反应中的作用的实验研究结果存在着一定的差异。Tatsukawa 等[7]认为，硝苯地平可以完全抑制由周期性牵张刺激所导致的 $[Ca^{2+}]_i$ 升高；而 Ruwhof 等[8]则观察到硝苯地平仅可以抑制 50% 由周期性牵张刺激所导致的 $[Ca^{2+}]_i$ 升高。这些实验结果的不一致性可能是由于组织特异性差异或牵张模型不一致所造成的。硝苯地平起作用可能是由于牵张导致牵张激活离子通道开放，细胞外 Ca^{2+} 内流，膜去极化，进而激活 L 型钙离子通道。最近有研究显示[9]，机械牵张可以直接激活 L 型钙离子通道。

为了观察是否存在钙内流诱导钙释放，我们用 10 μmol/L 兰尼碱和 10 μmol/L 毒胡萝卜素同时抑制肌质网兰尼碱受体和 Ca^{2+}-ATP 酶，以抑制肌质网 Ca^{2+} 释放和摄入。结果显示由周期性牵张刺激所导致的 $[Ca^{2+}]_i$ 升高绝大部分被抑制，抑制程度达 87.98%。这不仅说明在牵张诱导 $[Ca^{2+}]_i$ 升高过程中存在钙内流诱导钙释放反应，而且也说明牵张诱导的 $[Ca^{2+}]_i$ 升高主要来自细胞内储存钙的释放。

通过以上分析，我们可以得出这样的结论：周期性牵张可以诱导膀胱逼尿肌细胞高表达 Cx43；钙信号可能在其中扮演着极其重要的角色；细胞外 Ca^{2+} 的内流可能是这一反应的初始刺激因素。其所涉及的可能机制可以概括如下：周期性牵张刺激激活了 $GdCl_3$ 敏感性牵张激活离子通道，细胞外 Ca^{2+} 内流，内流的 Ca^{2+} 触发了钙内流诱导钙释放反应，使肌质网内储存的 Ca^{2+} 大量释放，$[Ca^{2+}]_i$ 增加，进而启动核反应，导致 Cx43 在基因和蛋白水平表达均增加；L 型钙离子通道可能直接因牵张刺激而被激活，或因为 Ca^{2+} 内流、膜去极化进而被激活，从而发挥着一定的作用。

参考文献：

[1] YIN J L, CHAN L W, TSE V, *et al*. Gap junctional protein expression in the unstable human detrusor[J]. J Urol, 2003, 169(Suppl 4): 317 - 318.

[2] HAEFLIGER J A, TISSIERES P, TAWADROS T, *et al*. Connexin 43 and 26 are differentially increased after rat bladder outlet obstruction [J]. Exp Cell Res, 2002, 274(2): 216 - 225.

[3] 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.

[4] 卢根生, 宋　波, 金锡御, 等. BPH 病人的逼尿肌超微结构观察[J]. 中华男科学, 2002, 8(4): 283 - 285.

[5] 周逢海, 宋　波, 金锡御. 逼尿肌不稳定缝隙连接蛋白基因及其蛋白的表达意义[J]. 中华实验外科杂志, 2003, 20(10): 928 - 929.

[6] KUSHIDA N, KABUYAMA Y, YAMAGUCHI O, *et al*. Essential role for extracellular Ca^{2+} in JNK activation by mechanical stretch in bladder smooth muscle cells[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2001, 281(4): C1165 - C1172.

[7] TATSUKAWA Y, KIYOSUE T, ARITA M. Mechanical stretch increases intracellular calcium concentration in cultured ventricular cells from neonatal rats[J]. Heart Vessels, 1997, 12(3): 128 - 135.

[8] RUWHOF C, VAN-WAMEL J T, NOORDZIJ L A, *et al*. Mechanical stress stimulates phospholipase C activity and intracellular calcium ion levels in neonatal rat cardiomyocytes[J]. Cell Calcium, 2001, 29(2): 73 - 83.

[9] LYFORD G L, STREGE P R, SHEPARD A, *et al*. Alpha(1C) (Ca(V) 1.2) L-type calcium channel mediates mechanosensitive calcium regulation[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2002, 283(3): C1001 - C1008.

（编辑　栾　嘉）