文章编号:1000-5404(2006)09-0967-03

论著

周期性牵张诱导逼尿肌细胞高表达 Cx43 的实验研究

闵勇正[1],卢根生[1],宋 波[1],张庆华[2] ([1]第三军医大学西南医院全军泌尿外科中心,重庆 400038;[2]解放军150医院泌尿外科,洛阳 471000)

提 要:目的 探讨周期性牵张对膀胱逼尿肌细胞表达连接蛋白43(Connexin43,Cx43)的诱导作用。**方法** 运用牵张膀胱逼尿肌细胞体外模型,给予逼尿肌细胞周期性20%拉伸度的牵张,持续6 h;采用Western blotting、RT-PCR在蛋白和mRNA水平测定逼尿肌细胞Cx43表达。**结果** 正常对照组Cx43表达量为(1 1.377 5±0.425 1),Cx43mRNA相对表达量为(0.423 3±0.187 5);而给予20%牵张刺激6 h逼尿肌细胞Cx43表达量增加至(14.015 0±0.526 2),Cx43mRNA相对表达量增加到(0.935 0±0.020 67),二者均较对照组有显著增加($P<0.01$)。**结论** 周期性牵张可显著诱导增加逼尿肌细胞Cx43在蛋白和基因水平的表达。

关键词:周期性牵张;逼尿肌;Cx43
中图法分类号:R-332;R322.62;R694 **文献标识码**:A

In vitro connexin43 overexpression in detrusor smooth muscle cells by cyclic stretch

MIN Yong-zheng[1], LU Gen-sheng[1], SONG Bo[1], ZHANG Qing-hua[2] (Urinary Surgery Research Center, Southwest Hospital, Third Millitary Medical University, Chongqing 400038, [2]Department of Urinary Surgery, 150 Hospital of Luoyang, Luoyang 471000, China)

Abstract: Objective To investigate the connexin43 overexpression of detrusor smooth muscle cells (DSMCs) by cyclic stretch. Methods The DSMCs growing on collagen-coated silicone membrane were subjected to cyclic stretch-relaxation. The Cx43 and Cx43 mRNA expression in DSMCs were detected with Western blotting and RT-PCR. Results The Cx43 and Cx43 mRNA expression of control DSMCs were respectively (11.377 5±0.425 1) and (0.423±3 0.187 5), and that of DSMCs subjected to cyclic stretch-relaxation were (14.015 0±0.526 2) and (0.935 0±0.020 67), with significant difference between the two groups ($P<0.01$). Conclusion The connexin43 overexpression in DSMCs could be induced by cyclic stretch.

Key words: cyclic stretch; detrusor muscle; connexin43

膀胱流出道梗阻后,不考虑梗阻的初始原因,可以说是梗阻膀胱的代偿性反应导致了膀胱结构和功能的改变。膀胱过度膨胀可能是其潜在的刺激因素。因为不论是临床良性前列腺增生患者还是下尿路梗阻模型中的动物,都观察到高压排尿。从而可以认为,膀胱壁张力的增高或者说膀胱过度膨胀是梗阻后膀胱结构和功能改变的触发器。但目前对于膀胱过度膨胀导致膀胱结构和功能改变的机制还不清楚。通过周期性机械牵张和松弛离体膀胱逼尿肌细胞可以模拟梗阻后膀胱过度膨胀状态。本实验通过这种体外牵张模型,观察了周期性牵张对逼尿肌细胞缝隙连接蛋白Cx43表达的影响。

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个月龄SD雄性大鼠(第三军医大学实验动物中心)。

1.2 主要试剂

DMEM液干粉(Hyclone公司,美国)、胎牛血清(Hyclone公司,美国)、D-Hanks液(Hyclone公司,美国)、Ⅰ型胶原酶(Sigma公司,美国),胰蛋白酶(Amresco公司,美国)、SM-α-actin单克隆抗体(博士德)、FITC标记山羊抗小鼠IgG(Santa Cruz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:2005-12-17;修回日期:2006-02-20

司,美国),Tripure(Omega 公司,美国)、RT-PCR 试剂盒(Promega 公司,美国)、Cx43 引物及 β-actin 内参引物(上海博亚公司),兔抗鼠 Cx43 多克隆抗体(Labvision 公司,美国),辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG(Santa Cruz 公司,美国),DAB 试剂盒(博士德)。

1.3 方法

1.3.1 SD 大鼠膀胱逼尿肌细胞培养及鉴定 SD 大鼠膀胱分离、培养参照文献[1]。膀胱分离后经Ⅰ型胶原酶消化,获得细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基置通 5% CO_2 37 ℃孵箱培养。取一代细胞进行免疫荧光鉴定;一抗为 SM-α-actin 单克隆抗体,二抗为 FITC 标记山羊抗小鼠 IgG。

1.3.2 周期性牵张模型的建立 取 2~4 代培养的逼尿肌细胞接种于 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%,持续时间为 6 h。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。

1.3.3 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。

1.3.4 膀胱逼尿肌细胞 Cx43 Western blotting RIPA 提取逼尿肌细胞总蛋白,采用 Brad ford 法检测提取液蛋白浓度。将 40 μg 蛋白经 12% SDS-PAGE 电泳分离后,电转 4 h 20 min 转移至 PVDF 膜,37 ℃下 5% 脱脂奶溶液封闭 2 h,然后与 1∶100 Ⅰ抗溶液反应(兔抗鼠 Cx43 多克隆抗体,由 Labvision 公司生产)过夜,0.1% Tween20 磷酸缓冲液漂洗后,再与 1∶1 000 辣根过氧化物酶标记的Ⅱ抗(羊抗兔 IgG,由 Santa Cruz 公司生产)37 ℃孵育 2 h,洗膜后按 DAB 试剂说明书进行显色反应。显色完毕,膜经光密度扫描半定量分析显影条带。

1.3.5 膀胱逼尿肌细胞 Cx43 mRNA RT-PCR 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 $D(260)/D(280)$ 比值均在 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 μlPCR 产物行 1% 琼脂糖凝胶电泳。

1.4 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 统计软件行 t 检验。

2 结果

2.1 培养 SD 大鼠膀胱逼尿肌细胞的鉴定结果

鉴定结果见图 1。SM-α-actin 为平滑肌特定标记蛋白;由图 1 可知,所培养细胞为平滑肌细胞。

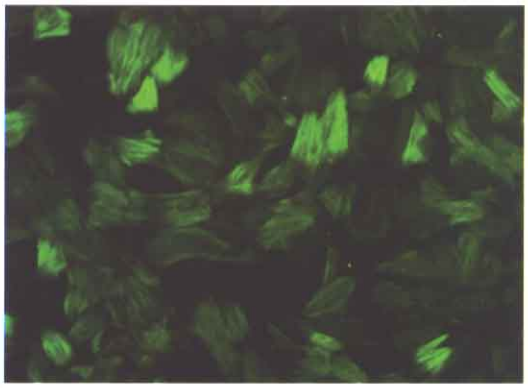
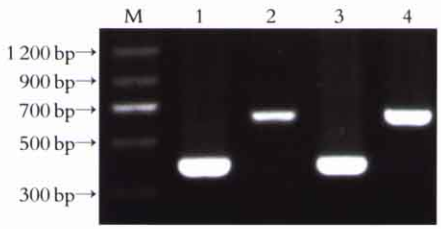


图 1 SD 大鼠膀胱逼尿肌细胞的免疫荧光鉴定结果 (免疫荧光×100)

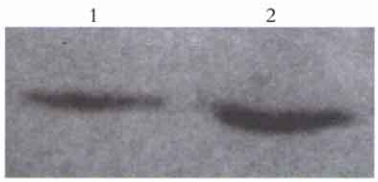
2.2 膀胱逼尿肌细胞 Cx43 mRNA 及 Cx43 蛋白表达测定结果

RT-PCR 后经凝胶成像分析系统扫描测定,见图 2。正常对照组 Cx43mRNA 相对表达量为(0.423 3 ± 0.187 5) Int × mm^2/Int × mm^2,周期性牵张可诱导逼尿肌细胞 Cx43 mRNA 表达明显增加,达到(0.935 0 ± 0.020 67) Int × mm^2/Int × mm^2,两组比较,差异非常显著($P<0.01$)。20% 牵张刺激也可显著增加逼尿肌细胞 Cx43 蛋白的表达量,由正常对照组的(11.377 5 ± 0.425 1),ODu × mm^2 增加到(14.015 0 ± 0.526 2) ODu × mm^2($P<0.01$),见图 3。



M:标准;1,3:β-actin;2:对照组;4:S_0 组

图 2 RT-PCR 分析结果



1:对照组;2:S_0 组

图 3 Western blotting 分析结果

3 讨论

本实验应用周期性牵张膀胱逼尿肌细胞体外模型,模拟在体膀胱流出道梗阻后膀胱所受到的超负荷状态。应用这种体外牵张模型,已经观察到周期性机械牵张能诱导肝素结合性表皮生长因子样生长因

子[2]、胰岛素样生长因子-1[3]、环氧化酶-2[4]、神经生长因子产生[5]等多种蛋白和生长因子表达增加；而 Galvin 等[3]在研究中也观察到，逼尿肌遭受反复牵张 6h 后，转化生长因子-β 表达较正常对照组（未施加牵张组）降低 23%。我们首次观察到周期性牵张可以诱导逼尿肌细胞在基因和蛋白水平提高 Cx43 的表达。

以上研究均证实，周期性牵张膀胱逼尿肌细胞体外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。膀胱流出道梗阻是指膀胱颈和近端尿道处由于各种原因导致的尿液流出道阻力升高，使膀胱逼尿肌结构改变，继而产生膀胱功能改变和一系列严重的并发症。目前常用的膀胱出口梗阻动物模型大多是通过手术结扎缩窄动物尿道，造成膀胱出口梗阻。这种动物模型最大缺陷在于无法对梗阻程度进行精确的控制。而本实验所建立的体外牵张模型由于可以对其实验参数进行量化，可以对细胞受牵张程度进行精确控制；而且使不同批次实验具有近乎完全相同的实验条件，从而降低了人为因素对实验条件的影响。因此，应用该模型进行实验研究具有较好的可重复性和可控制性，是模拟研究在体膀胱流出道梗阻后膀胱所受到的超负荷状态下其结构和功能改变有效手段。

正常逼尿肌细胞之间存在大量的中间连接和少许的桥粒连接及缝隙连接。中间连接对逼尿肌细胞间的收缩起机械偶联作用，这种机械偶联作用是保证整个逼尿肌协同一致收缩的前提，而缝隙连接和桥粒连接则提供相邻细胞膜之间的离子交换的低电阻通道，传递细胞兴奋的电信号，在逼尿肌细胞之间起电偶联作用。Cx43 是膀胱逼尿肌中最重要的细胞缝隙连接蛋白之一。在 BPH 患者膀胱及不稳定膀胱大鼠模型中均已观察到缝隙连接表达增高[6,7]，且以连接蛋白 Cx43 增高为主。我们既往研究表明[8,9]，逼尿肌细胞兴奋性增加是不稳定膀胱发生的重要原因。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。

目前，尚未见到对梗阻后膀胱逼尿肌细胞 Cx43 表达增加机制的研究报道。而在心肌细胞类似研究中发现[10]：在牵张前分别予以 10 nmol/L 和 100 nmol/L 血管紧张素 Ⅱ 受体阻滞剂氯沙坦，可分别减弱 73% 和 100% 由牵张诱导的 Cx43 表达升高。这提示我们，由牵张诱导的 Cx43 表达增加是一个继发性核事件。那么，周期性牵张逼尿肌细胞在基因和蛋白水平诱导 Cx43 的高表达反应中涉及到什么样的可能机制呢？我们可以通过本实验所建立的体外牵张模型，对这一机制进行探讨，这是我们下一步所关注的重点。

参考文献：

[1] 司徒镇强，吴军正. 细胞培养[M]. 西安：世界图书出版西安公司，2004：69－81.

[2] PARK J M, BORER J G, FREEMAN M R, *et al*. Stretch activates heparin-binding EGF-like growth factor expression in bladder smooth muscle cells[J]. Am J Physiol, 1998, 275(5 Pt 1): C1247－C1254.

[3] GALVIN D, WATSON R W G, O'NEILL A J, *et al*. Mechanical stretch alters human bladder smooth muscle phenotype[J]. Eur Urol Suppl, 2002, 1(1): 131.

[4] PARK J M, YANG T, AREND L J, *et al*. Obstruction stimulates COX-2 expression in bladder smooth muscle cells *via* increased mechanical stretch[J]. Am J Physiol, 1999, 276(1 Pt 2): F129－F136.

[5] PERSSON K, SANDO J J, TUTTLE J B, *et al*. Protein kinase C in cyclic stretch-induced nerve growth factor production by urinary tract smooth muscle cells[J]. Am J Physiol, 1995, 269(4 Pt 1): C1018－C1024.

[6] 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.

[7] 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.

[8] 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.

[9] 封建立，宋　波. 不稳定逼尿肌 Cx43 基因表达及其与逼尿肌细胞间缝隙连接通讯功能的关系研究[J]. 第三军医大学学报，2005，27(9)：825－827.

[10] SHYU K G, CHEN C C, WANG B W, *et al*. Angiotensin II Receptor Antagonist Blocks the Expression of Connexin43 Induced by Cyclical Mechanical Stretch in Cultured Neonatal Rat Cardiac Myocytes[J]. J Mol Cell Cardiol, 2001, 33(4): 691－698.

（编辑　张大春）

关于修回稿件附软盘的说明

为缩短学报出版周期，减少编排错误，请作者根据学报编辑部提出的意见对文稿修改后，将修改稿以 Word 格式存入软盘，并请标明软盘中的文件名、作者姓名及稿件编号，连同修改稿一并送交本刊编辑部或 E-mail：aammt@mail.tmmu.com.cn（校外稿件请邮寄）。

本刊编辑部