论著

文章编号:1000-5404(2006)09-0970-03

钙调神经磷酸酶在逼尿肌肥大发生中的作用研究

陈 可[1],卢根生[1],张庆华[2],宋 波[1] ([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 观察钙调神经磷酸酶(CaN)催化亚单位α、β、γ(CnAα、CnAβ、CnAγ)3种亚型在肥大逼尿肌的表达变化,探讨其在逼尿肌肥大发生中的作用。**方法** 选用10周龄雌性Wistar大鼠实行膀胱出口部分梗阻手术。手术分别于2、4、6周取下大鼠膀胱。以RT-PCR检测3种亚型mRNA表达,Western blot测定亚型蛋白表达量的变化。肥大标志物肌球蛋白重链(MHC)表达变化通过考马斯亮蓝胶染色光密度测定。**结果** ①RT-PCR可检测到CnAα、CnAβ,未检测到CnAγ。②Western blot检测,CnAα手术后2周比对照组表达显著增加($P<0.01$),4周、6周表达下降。CnAβ表达无显著变化。③肌球蛋白重链表达变化与CnAα表达变化具有相关性。**结论** CnAα在逼尿肌肥大发生中起重要的作用,CnAβ作用不明显。

关键词: 钙调神经磷酸酶;亚型;逼尿肌;肥大

中图法分类号: R322.62; R345; R694.202 **文献标识码**: A

Effect of calcineurin in hypertrophy of detrusor muscle

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

Abstract: **Objective** To explore the regulatory role of calcineurin (CaN) in the hypertrophy of detrusor cells and investigate the difference of the expression of CnAα, CnAβ, CnAγ in the hypertrophic detrusor cells. **Methods** Partial bladder outlet obstruction (BOO) was surgically induced in thirty 10-week-old female Wistar rats. The bladder was excised 2, 4 and 6 weeks respectively after BOO. Another 10 rats as control underwent sham operation and 2 weeks later the bladder was subjected to experiment. The mRNA and protein expression of calcineurin subunit α, β, γ (CnAα, CnAβ, CnAγ) was examined respectively by RT-PCR and Western blotting. Myosin heavy chain expression was evaluated on gels stained with Coomassie blue. **Results** CnAα, CnAβ could be detected by RT-PCR but no CnAγ. CnAα expression increased 2 weeks after BOO as compared to that of controls ($P<0.01$), decreased during 4 and 6 weeks. However, CnAβ expression showed no change throughout the development of hypertrophy. The changes in myosin heavy chain expression correlated with CnAα expression. **Conclusion** This experiment suggests that CnAα not CnAβ play an important role in the formation of bladder smooth muscle hypertrophy.

Key words: calcineurin; subunit; detrusor; hypertrophy

钙调神经磷酸酶(calcineurin,CaN)是迄今发现的唯一受Ca^{2+}/钙调素(calmodulin,CaM)调节的丝/苏氨酸蛋白磷酸酶,参与了多种功能调节[1]。近年发现,CaN-T细胞活化核因子(nuclear factor of activated T cell,NF-AT3)途径广泛存在于心肌、骨骼肌、血管平滑肌细胞等,参与心肌和骨骼肌肥大的发生。膀胱出口梗阻导致逼尿肌细胞发生肥大发生的分子机制至今不明。本实验通过对逼尿肌肥大后钙调神经磷酸酶催化亚单位3种亚型表达变化的研究,探讨钙调神经磷酸酶在逼尿肌肥大发生中的作用。

1 材料与方法

1.1 膀胱出口部分梗阻模型制作

雌性Wistar大鼠40只(购自第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心),体质量180~200 g,将大鼠分为膀胱部分梗阻2周组、膀胱部分梗阻4周组、膀胱部分梗阻6周组、假手术2周组(作为对照),每组10只。1%戊巴比妥钠(40 mg/kg)腹腔内注射麻醉,仰卧位固定,常规消毒、铺巾后,直径约1 mm硬膜外导管圆头端插入尿道,探头入膀胱后可有部分尿液从探子尾端流出,下腹部正中切口,暴露膀胱颈后,钝性分离双侧膀胱下动脉与尿道间隙,用4-0丝线结扎尿道,以能牵拉滑动尿道中探子并带动周围组织为度。拔除探子,关腹。

作者简介:陈 可(1977-),男,重庆市人,硕士研究生,助教,主要从事膀胱功能障碍性疾病方面的研究。电话:(023)68765841, E-mail: ckck961@sina.com

通讯作者:卢根生,电话:(023)68765841

收稿日期:2006-02-17;修回日期:2006-03-07

假手术组方法同上,但不结扎尿道。所有大鼠术后清洁喂养。

1.2　组织学实验

手术后第2、4、6周处死大鼠,取下膀胱称重,切下部分肌条放入10%甲醛溶液固定后做切片,苏木精-伊红染色。计数机图形处理软件测量肌层厚度。余下下膀胱组织放入液氮中冻存。

1.3　RT-PCR

1.3.1　引物合成　　通过GenBank查出大鼠钙调神经磷酸酶3种亚型CnAα(NM017041)、CnAβ(D90036)、CnAγ(NM134367)的mRNA序列,应用引物设计软件Primer 5.0设计合成6条引物,序列为CnAα正义链5′-AGAGGGTGCTTCGATTCTCCG-3′;反义链5′-AAGGCATCCATACAGGCGTCA-3′;产物348 bp;CnAβ正义链5′-TAGTGGAGTGTTGGCTGGAGGAC-3′;反义链5′-CAGTGGTATGTGCGGTGTTCAGG-3′;产物215 bp;CnAγ正义链5′-CCTCCAACCCGACGGCTAACT-3′;反义链5′-CATGCACGCTTCGTACACCAG-3′;产物465 bp。

1.3.2　核酸分离　　使用Tripure试剂盒提取大鼠逼尿肌总RNA。DEPC处理水溶解RNA后测D值,电泳检测。18 S条带粗细为28 S条带2倍,D值在1.8~2.0之间的样本可用于逆转录。

1.3.3　逆转录　　按照TaKaRa RNA PCR试剂盒取1 μgRNA经逆转录反应生成cDNA。

1.3.4　PCR反应　　RT产物10 μl加入50 μl反应体系。CnAα 95 ℃变形5 min,再以94 ℃变形30 s,58 ℃退火45 s,72 ℃延伸45 s的顺序进行35个循环,最后72 ℃延伸10 min。CnAβ95 ℃变形5 min,再以94 ℃变形30 s,60 ℃退火45 s,72 ℃延伸45 s的顺序进行35个循环,最后72 ℃延伸10 min。取9 μl反应产物于1.5%琼脂糖凝胶上电泳。使用Quantity One软件进行图像处理。

1.4　Western blot

1.4.1　提取总蛋白　　按100 mg膀胱组织加1 ml RIPA和10 μl PMSF提取总蛋白,匀浆后20 000×g,4 ℃高速离心30 min,取上清液至无菌EP管。

1.4.2　制作蛋白标准曲线　　改良Lowry法制作蛋白标准曲线,各试剂反应时间为15 min。测量波长为590 nm的样品吸光度。

1.4.3　聚丙烯酰胺电泳　　根据绘制的蛋白标准曲线,测定各标本浓度,取20 μg蛋白进行电泳。5%浓缩胶80 V电压跑40~50 min。12%分离胶150 V跑约2 h至溴酚蓝到胶底部。

1.4.4　转膜　　根据marker切取相应位置胶,做三明治。200 V转55 min。加入羊抗鼠CnAα、CnAβ多克隆抗体,兔抗羊辣根过氧化物酶标抗体,化学发光法显色,Quantity One光密度扫描分析数据。

1.5　肌球蛋白重链表达测定

取各组标本蛋白提取液,定量后做聚丙烯酰胺电泳(5%浓缩胶,6%分离胶),80 V,约1.5 h溴酚蓝至胶底部,用考马斯亮蓝染色1 h,脱色1 h,使用Quantity One扫描光密度分析数据。

1.6　统计学分析

计量资料以$\bar{x}\pm s$表示,用SPSS统计软件行t检验。

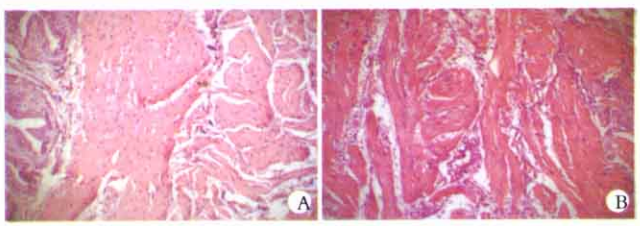
2　结果

2.1　膀胱湿重

称量梗阻2、4、6周组的膀胱湿重分别为(123.72±10.61)、(144.82±10.28)、(187.77±20.8)mg,与对照组(92.64±8.84)mg比较差异显著($P<0.01$)。BOO手术导致了膀胱重量在各个时间点的显著增高,重量的增加呈时间依赖性,且在梗阻后6周增加最显著。

2.2　肌层厚度测量

光镜下观测膀胱肌层切片,与对照组相比可见梗阻组肌细胞体积增大,细胞核深染,见图1。使用Simple PCI图像分析系统显微镜下测量各组膀胱肌层厚度,对照组平均肌层厚度为(770.0±93.5)μm,梗阻2周组肌层厚度(1250±67.8)μm($P<0.01$),梗阻4周组肌层厚度(1507±136)μm($P<0.05$),梗阻6周组肌层厚度(558.6±50.1)μm($P<0.01$)。可见梗阻2、4、6周组肌层厚度比对照组显著增厚。梗阻4周组肌层增厚最显著,梗阻6周组肌层厚度下降,可见纤维组织增生。提示BOO手术后第2周至第4周间肥大发生,第6周后发生失代偿。

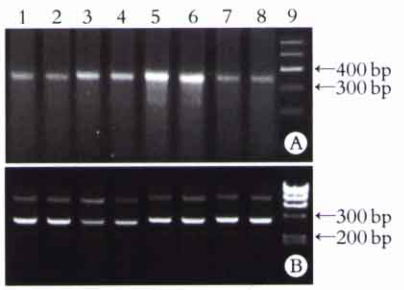


A:对照组;B:梗阻2周组

图1　逼尿肌细胞病理切片　(HE×200)

2.3　RT-PCR结果

RT-PCR检测到在各组逼尿肌中,均有CnAα、CnAβmRNA的表达,而CnAγmRNA未见表达。提示CnAγ在膀胱逼尿肌肥大发生时作用不明显,见图2。



A:CnAα mRNA;B:CnAβ mRNA;1、2:BOO术后2周;3、4:BOO术后4周;5、6:BOO术后6周;7、8:对照组;9:标准

图2　BOO术后mRNA表达

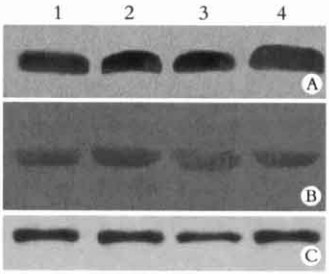
2.4　CnAα、CnAβ在肥大逼尿肌中蛋白表达量的变化

由图3 Western Blot检测可得知,CnAα在梗阻2周蛋白表达量为(260.52±29.17),与对照组(96.46±24.36)相比表达显著增加($P<0.01$),梗阻4周(164.73±26.42)后开始下降,梗阻6周(132.95±18.38)后继续下降。而CnAβ在梗阻2周(116.85±20.39)、梗阻4周(108.98±18.42)、梗阻6周(101.81±15.48)的表达无明显变化。

2.5　肥大标志物肌球蛋白重链表达变化

考马斯亮蓝胶染色光密度测定肌球蛋白重链的表达变化,

梗阻2周组(194.81±25.26)较对照组(100.96±23.77)相比表达显著增高($P<0.05$)。4周组(119.20±23.88)和6周组(101.81±15.48)逐渐下降。肌球蛋白重链与CnAα的表达变化具有相关性。



A: CnAα; B: CnAβ; C: β-actin; 1: 对照组; 2: BOO术后2周组; 3: BOO术后4周组; 4: BOO术后6周组

图3 BOO术后蛋白表达量的变化

3 讨论

CaN是一种在体内广泛分布,参与多种细胞功能调节的多功能信号酶,在细胞因子介导的T细胞活化中起调节枢纽作用,在神经递质和激素的释放、神经突触的生长发育和突触可塑性方面亦具有重要的调节作用,与学习记忆和老年性痴呆有关[1]。CaN从酵母到人其分子结构高度保守。CaN是由结合钙调素的催化亚基(CnA)和结合Ca^{2+}的调节亚基(CnB)按1:1组成的异源二聚体。CnA是全酶催化和调节的核心,其活性可被CnB和CaM激活[2]。人的CnA有3种主要的亚型:CnAα、CnAβ和CnAγ。CnAγ仅在睾丸中特异表达[2]。CnAα、CnAβ在组织细胞的分布不同,提示其可能起不同的作用[3]。CnAα缺乏的突变鼠在T细胞介导的抗原特异反应中出现缺陷,中枢神经系统的突触可塑性也发生改变[4]。CnAα可能是参与多种信息传递的主要形式[5]。本实验在肥大的逼尿肌细胞中,各个时间点用RT-PCR均可检测到CnAα mRNA和CnAβ mRNA表达,而未能检测到CnAγmRNA表达,说明CnAγ可能与逼尿肌细胞肥大无关,与国外文献报道的一致[6]。CnAα、CnAβ可能参与调节逼尿肌细胞肥大。

前列腺增生常引起膀胱出口梗阻,导致膀胱壁增厚,逼尿肌肥大。肥大的分子机制至今不明。大量的研究提示CaN信号通路在心肌和骨骼肌肥大中起着重要的调节作用[7]。在心肌肥大的研究中发现,当肥大刺激因素使细胞质内钙离子浓度升高,CaN被激活,活化的CaN去磷酸化NFAT家族成员,使他们转位进入细胞核,与细胞内的转录因子如锌指转录因子(GATA4)结合,活化肥大的相关基因如肌球蛋白重链(Myosin heavy chain, MHC)[6-9]。肌球蛋白重链(Myosin heavy chain, MHC)是平滑肌肥大的一个标志物[10,11],其表达受GATA4调控。在本实验中,通过建立膀胱出口部分梗阻模型,导致大鼠膀胱肥大。通过称量膀胱湿重,可得知BOO术后2周膀胱重量增加,与对照组相比有显著差异($P<0.01$)。重量的增加呈时间依赖性,6周时最重。取各时间点膀胱标本测量肌层厚度,2周组大鼠逼尿肌肌层增厚,4周组肌层厚度增加显著,6周组肌层厚度降低。膀胱病理切片可见平滑肌细胞在BOO术后2周出现细胞核深染,肌细胞体积增大,6周组可见纤维组织增生。MHC在BOO术后2周与对照组相比表达增强($P<0.05$),术后4周、6周表达逐渐下降。推测CaN信号通路同样在膀胱逼尿肌肥大中起着重要的作用。

本实验显示CnAα的表达在术后2周与对照组相比出现显著增高,4周,6周出现下降,这种表达的变化与平滑肌肥大标志物肌球蛋白重链的表达变化具有相关性,而CnAβ在术后各个时间点表达并无显著变化。提示CnAα在逼尿肌细胞肥大过程中起一定的作用,而CnAβ的作用不显著。这也为我们进一步探索逼尿肌细胞肥大的发生机制提供有益的帮助,也为我们的治疗提供了新的策略。

参考文献:

[1] KLEE C B, REN H, WANG X. Regulation of the calmodulin-stimulated protein phosphatase, calcineurin [J]. J Biol Chem, 1998, 273(22): 13367-13370.

[2] CHANG C D, MUKAI H, KUNO T, *et al*. cDNA cloning of an alternatively spliced isoform of the regulatory subunit of Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein phosphatase (calcineurin B alpha 2) [J]. Biochim Biophys Acta, 1994, 1217(2): 174-180.

[3] JIANG H, XIONG F, KONG S, *et al*. Distinct tissue and cellular distribution of two major isoforms of calcineurin[J]. Mol Immunol, 1997, 34(8-9): 663-669.

[4] KAYYALI U S, ZHANG W, YEE A G, *et al*. Cytoskeletal changes in the brains of mice lacking calcineurin A alpha[J]. J Neurochem, 1997, 68(4): 1668-1678.

[5] KISSINGER C R, PARGE H E, KNIGHTON D R, *et al*. Crystal structures of human calcineurin and the human FKBP12-FK506-calcineurin complex[J]. Nature, 1995, 378 (6557): 641-644.

[6] BUENO O F, VAN-ROOIJ E, MOLKENTIN J D, *et al*. Calcineurin and hypertrophic heart disease: novel insights and remaining questions [J]. Cardiovasc Res, 2002, 53(4) 806-821.

[7] DUNN S E, BURNS J L, MICHEL R N. Calcineurin is required for skeletal muscle hypertrophy[J]. J Biol Chem, 1999, 274(31): 21908-21912.

[8] BUENO O F, VAN-ROOIJ E, MOLKENTIN J D, *et al*. Calcineurin and hypertrophic heart disease: novel insights and remaining questions [J]. Cardiovasc Res, 2002, 53(4): 806-821.

[9] 祝善俊,杨永健,于林君,等. 钙调神经磷酸酶信号通路与心肌细胞肥大[J]. 中华内科杂志, 2004, 43(1): 19-21.

[10] MOLKENTIN J D. Calcineurin-NFAT signaling regulates the cardiac hypertrophic response in coordination with the MAPKs[J]. Cardiovasc Res, 2004, 63 (3): 467-475.

[11] DiSANTO M E, WANG Z, MENON C, *et al*. Expression of myosin isoforms in smooth muscle in the corpus cavernosum penis[J]. Am J Physiol, 1998, 275 (4 Pt 1): C976-C987.

(编辑 栾 嘉)