论著

文章编号:1000-5404(2008)07-0578-04

大鼠不稳定膀胱中ICCs细胞中HCN蛋白表达的变化

丁砺蠡,王永权,方 强,封建立,李龙坤,宋 波 (第三军医大学西南医院全军泌尿外科研究所 重庆 400038)

摘 要:**目的** 研究HCN离子通道(hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channel, HCN)蛋白在膀胱Cajal间质细胞(interstitial cells of Cajal, ICCs)中的表达及在不稳定膀胱ICCs细胞中表达的变化,探讨ICCs细胞兴奋性变化与逼尿肌不稳定(detrusor instability, DI)的关系。**方法** ①将30只大鼠随机分为正常对照(10例),逼尿肌稳定组(DS, $n=12$),逼尿肌不稳定组(DI, $n=8$)大鼠尿道近端结扎,建立膀胱出口梗阻(bladder outlet obstruction, BOO)模型。②对各组进行HCN和c-kit免疫荧光双标,确定HCN蛋白是否在ICCs细胞上存在及HCN表达的变化。③以Western blot法检测HCN蛋白表达量的变化。**结果** ①免疫荧光双标显示,在c-kit阳性的ICCs细胞膜上,有HCN抗原的表达,c-kit阴性细胞未见HCN表达;与正常组相比,DI组、DS组HCN蛋白表达增加。②Western blot检测显示,与正常组相比,DI组、DS组的HCN表达增高,DI组增高显著($P<0.01$)。**结论** 大鼠膀胱ICCs细胞可表达HCN通道蛋白,且DI膀胱ICCs细胞HCN通道明显增多,由此导致的ICCs细胞兴奋性增高可能在DI发生中起重要作用。

关键词:ICCs细胞;HCN通道;逼尿肌不稳定

中图法分类号:R329.25;R394.2;R694.502 **文献标识码**:A

Variation of HCN protein expression in interstitial cells of Cajal from rat with detrusor instability

DING Li-li, WANG Yong-quan, FANG Qiang, FENG Jian-li, LI Long-kun, SONG Bo (Urinary Surgery Research Institute, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To investigate whether there is expression of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channel (HCN) in normal bladder interstitial cells of Cajal (ICCs) and in ICCs of unstable bladder, so as to assess the relationship between the changes of ICCs excitability and the detrusor instability. **Methods** ① Thirty SD rats were randomized into 3 groups: normal ($n=10$), detrusor stability ($n=12$) and detrusor instability ($n=8$, 8 weeks after bladder outlet obstruction). ② The HCN protein expression in ICCs was detected with double-labeled immunofluorescence. The relationship of HCN protein and ICCs was accessed by double-labeled immunofluorescence with HCN and c-kit. ③ HCN expression of the 3 groups was also detected with Western blotting assay. **Results** ① HCN expression was well accorded to c-kit expression by using double-labeled immunofluorescence. ② With double-labeled immunofluorescence and Western blotting, HCN expression of DI and stable group was increased compared to the normal group, with statistical significance between the DI and normal groups ($P<0.01$). **Conclusion** HCN protein is identified in ICCs of rat bladder. The expression of HCN protein is enhanced obviously in DI group, which may be responsible for the increased excitability of DI bladder.

Key words: interstitial cells of Cajal; hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channel; detrusor instability

正常膀胱具有在一定张力下产生不被神经系统控制的自发兴奋收缩的特征。这种肌源性收缩现在认为是由起搏细胞Cajal间质细胞(interstitial cells of Cajal, ICCs)所启动[1]。与正常膀胱相比,逼尿肌不稳定(detrusor instability, DI)膀胱的自发性活动能力明显增强。这提示我们DI膀胱中的ICCs细胞功能可能发生了变化。

ICCs细胞在膀胱组织中呈多群、网络状分布,共同调控膀胱平滑肌细胞的兴奋和收缩[2],ICCs细胞本身兴奋性的变化可能会导致膀胱运动功能的改变。HCN离子通道(hyperpolarization-activated cyclic nucle-

基金项目:国家自然科学基金(30700270,30500505)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30700270, 30500505)

作者简介:丁砺蠡,男,安徽省怀宁县人,博士研究生,主治医师,主要从事膀胱功能障碍方面的研究。电话:(023) 65398476, E-mail:ding@mail.tmmu.com.cn

通信作者:宋 波,电话:(023)68754186, E-mail:songb-mr@sina.com

收稿日期:2007-12-05;修回日期:20087-02-04

otide-gate cation channel）是一种特殊的离子通道，是产生过度激活正离子流（hyperpolarization-activated cation current，Ih）电流的结构基础，被认为是起搏细胞的重要特征。HCN 的表达水平与细胞的兴奋性有关[3]。

本实验拟探讨 ICCs 细胞中是否存在 HCN 离子通道，然后用 HCN 离子通道的表达量作为 ICCs 细胞兴奋性的指标，探索 DI 膀胱中 HCN 通道蛋白的表达量有何变化，从而从起搏细胞的兴奋性变化的角度解释 DI 的病理生理过程。

1　材料与方法

1.1　实验对象

SD 大鼠 30 只，2～3 月龄，体质量 180～210 g（第三军医大学实验动物中心）。建立膀胱出口梗阻（bladder outlet obstruction，BOO）动物模型，结扎膀胱颈部导致不完全梗阻后 8 周，行充盈性膀胱测压，根据测压结果分为逼尿肌稳定组（DS）和逼尿肌不稳定组（DI），以同龄正常大鼠为正常对照。

1.2　组织铺片的制作

大鼠 20% 乌拉坦麻醉后，取膀胱新鲜组织，将 100% 丙酮自膀胱颈处注入膀胱内，维持充盈状态，置入 100% 丙酮中固定 6～8 h 后，沿腹侧面纵行剪开，在解剖显微镜下，小心剔除黏膜层。取其黏膜下层，由于膀胱逼尿肌层较厚且呈网状走形，分层不明显，将肌层组织制成含 1～2 层肌细胞的铺片。所有标本剪切成 4～5 mm 长、1～2 mm 宽，置于 4 ℃ 的 0.01 mol/L PBS 中过夜后行以下实验。

1.3　主要试剂

山羊抗大鼠 c-kit 单抗（1∶100，Santa Cruz 公司），兔抗大鼠 HCN2 多抗（1∶100，Chemicon 公司），罗丹明标记小鼠抗山羊抗体（1∶200，北京中杉公司分装），FITC 标记山羊抗兔抗体（1∶200，上海博奥森公司分装），DAPI（0.1 μg/ml，DAKO）。

1.4　c-kit 免疫荧光染色

染色方法为间接酶标抗体法（IELA）。铺片经 0.01 mol/L PBS 充分漂洗后，0.03% H_2O_2/甲醇封闭内源性过氧化物酶 20 min（25 ℃），1% BSA 孵育 30 min 后加入 c-kit 单抗 4 ℃ 过夜，罗丹明标记小鼠抗山羊抗体 25 ℃ 60 min。漂洗 3 次，每次 5 min，甘油封片，共聚焦显微镜观察。

1.5　c-kit、HCN 免疫荧光双标

先行 c-kit 免疫荧光染色，经充分漂洗后再进行 HCN 免疫荧光染色，最后 DAPI 染核。双重染色后的标本封片剂封片，共聚焦显微镜下观察，照相记录。

1.6　Western blot 检测

先提取总蛋白质，取 50～100 mg 组织于匀浆器中加入裂解液，充分匀浆后裂解 30 min，转移至 EP 管，4 ℃，12 000 × g 离心 10 min。分光光度计测量蛋白浓度，取等量标准化后的蛋白溶液加入等体积的 2 × SDS 上样缓冲液并沸水煮约 10 min，使蛋白变性。再取等量变性的蛋白溶液，进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳，每孔上样量为 30 μl，并以电转膜仪将蛋白转移至硝酸纤维素膜（110 V，2 h），经丽春红染色鉴定并标记标准蛋白位置，再以 5% 脱脂奶粉封闭，HCN 一抗及二抗孵育，ECL 试剂盒发光，胶片曝光，Quantity One 软件扫描计算灰度值，以 β-actin 为内参照。

1.7　统计学方法

结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 12.0 进行配对 t 检验。

2　结果

2.1　DI 大鼠模型的建立

30 只大鼠中 10 只作为正常对照组，另 20 只用于 DI 模型的建立，8 周后根据充盈性膀胱测压结果分为逼尿肌稳定（DS）组（n = 12）和逼尿肌不稳定（DI）组（n = 8）。

2.2　正常大鼠膀胱 ICCs 细胞上 HCN 蛋白表达

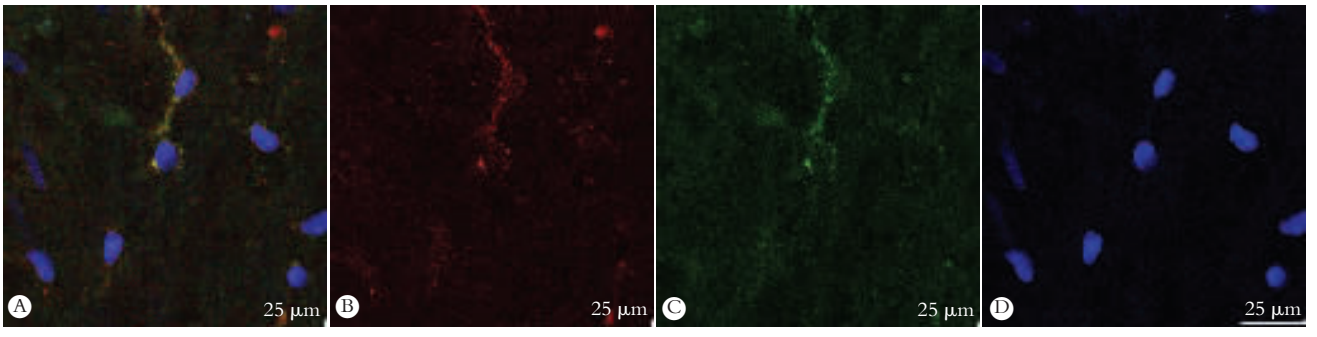
免疫荧光染色（IF）显示免疫双标的结果显示，正常大鼠膀胱内存在 c-kit 及 HCN 双标阳性细胞。

2.3　正常、DS 和 DI 膀胱 HCN 蛋白表达

免疫荧光染色（IF）显示，正常对照组（图 2A）膀胱中仅有少量 HCN 和 c-kit 双标细胞，DS 组（图 2B）膀胱的双标细胞较对照组有所增加，而 DI 组的双标细胞明显增加（图 2C）。

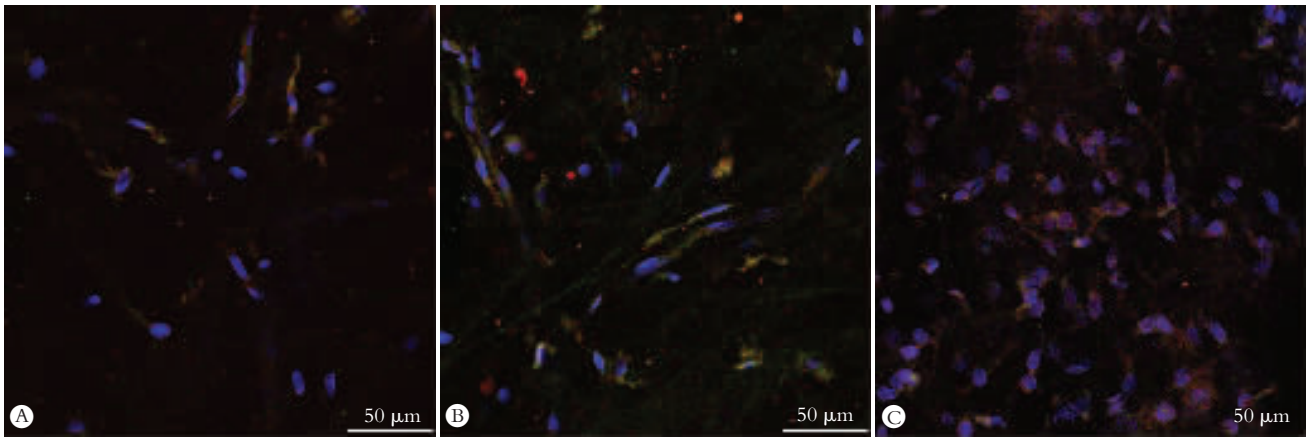
2.4　Western blot 检测各组 HCN 蛋白表达

Western blot 检测表明，与正常对照组相比，DS 组膀胱 HCN 蛋白表达量（2 道）略有增加，而 DI 组（3 道）HCN 表达量明显高于对照组（P < 0.01）。见图 3。



A：呈橘红色荧光的 c-kit、HCN 双标阳性细胞；B：红色荧光的 c-kit 阳性细胞；C：绿色荧光的 HCN 阳性细胞；D：蓝色荧光的细胞核

图 1　HCN 蛋白在 ICCs 细胞上的表达　（IF）



A:正常对照组;B:DS 组;C:DI 组

图2 HCN 蛋白在正常、DS、DI 膀胱 ICCs 细胞上的分布差异 (IF)



1:正常对照组;2:DS 组;3:DI 组

图3 Western blot 检测不同时期 HCN 蛋白表达的变化

3 讨论

ICCs 细胞是一种特殊类型细胞,广泛存在于各系统平滑肌组织中。ICCs 细胞在消化道中起着起搏胃肠道慢波、传递电信号、介导肠神经与平滑肌之间调节信号的作用,并与病理状态下的多种胃肠动力紊乱疾病(便秘、假性肠道梗阻等)密切相关,是胃肠道平滑肌节律性收缩功能调节的重要因素[4]。

ICCs 细胞也是膀胱运动的起搏细胞。膀胱逼尿肌具有在一定外加张力作用下自发兴奋收缩的能力,且不能被神经阻滞剂所抑制[5],说明这种收缩是肌源性的。我们前期也在膀胱内发现了与胃肠道 ICCs 细胞相似的细胞,膜片钳显示该细胞具有自发性电位,与逼尿肌的自发性收缩关系密切,这一实验表明 ICCs 细胞具有起搏细胞的电生理学特性。体外细胞实验也证实,在用 Glivec 抑制 ICCs 细胞生长后逼尿肌细胞的收缩受到明显抑制。说明 ICCs 细胞在膀胱内可能起到起搏细胞的作用[6]。以上提示我们,作为起搏细胞,膀胱 ICCs 细胞的病理性改变(兴奋性的提高,结构变化)也可能会导致到膀胱运动功能的异常。

平滑肌的运动异常可能与 ICCs 细胞的改变有关。近年研究表明 ICCs 与一些胃肠运动功能障碍性疾病,如贲门失迟缓症、糖尿病性胃轻瘫以及慢性便秘等有关。尽管这些疾病的发生机制尚不清楚,但均可见 ICCs 细胞数量存在不同程度的减少,细胞网络完整性发生破坏等病理改变[7]。

逼尿肌不稳定又称不稳定膀胱(unstable bladder,USB),是最常见的一种膀胱运动功能异常。临床症状主要为尿频、尿急、紧迫性尿失禁等储尿期功能异常,严重者将引起肾、输尿管积水和肾功能损害,尿动力学检查表现为膀胱充盈期出现逼尿肌不自主的期相性收缩。DI 是多种病变(主要包括膀胱出口梗阻、神经性疾病及感染)的最终病理生理环节之一。前期研究显示:离体肌条实验研究显示:DI 逼尿肌与正常逼尿肌相比较,在较小的牵张负荷下,即产生肌肉的收缩;在同等收缩负荷下,DI 逼尿肌的收缩频率明显高于正常逼尿肌;在体试验中,DI 表现为在未达到最大膀胱容量即出现收缩,而正常膀胱需要在最大容量才发生收缩[8]。这都说明不稳定膀胱运动异常亢进。

HCN 通道表达水平与 ICCs 细胞的兴奋性存在对应关系。HCN 通道是一种特殊的阳离子通道,存在于神经元细胞、窦房结细胞等具有自律性的细胞膜上,是产生起搏电流 Ih 的结构基础[9]。HCN 的表达增加或者减少都会直接引起起搏细胞兴奋性的改变[10]。

本实验首先通过免疫荧光双标显示,在 ICCs 细胞膜上存在有可产生 Ih 电流的结构基础——HCN 通道蛋白,从这个角度给 ICCs 细胞的起搏特性找到了新证据。其次,对通过免疫荧光双标和 HCN 的蛋白检测显示,与正常膀胱相比,DI 膀胱中 HCN 的表达显著增加。DI 膀胱 ICCs 细胞中具有更多的 HCN 通道,因此细胞具有更高兴奋性。起搏细胞的兴奋性在提高,这也许就是 DI 膀胱运动异常亢进的原因,从而为我们加深对 DI 的了解和探索治疗新方法提供一个新思路。

参考文献:

[1] Plum F, Colfelt R H. The genesis of vesical rhythmicity[J]. AMA Arch Neurol, 1960, 2:487-496.

[2] Biers S M, Reynard J M, Doore T, *et al*. The functional effects of a c-kit tyrosine inhibitor on guinea-pig and human detrusor[J]. BJU Int, 2006, 97(3):612-616.

[3] Drake M J, Gardner B P, Brading A F. Innervation of the detrusor

muscle bundle in neurogenic detrusor overactivity[J]. BJU Int, 2003, 91(7): 702 - 710.
[4] Won K J, Suzuki T, Hori M, *et al*. Motility disorder in experimentally obstructed intestine: relationship between muscularis inflammation and disruption of the ICCs network[J]. Neurogastroenterol Motil, 2006, 18(1): 53 - 61.
[5] Rolle U, Nemeth L, Puri P. Nitrergic innervation of the normal gut and in motility disorders of childhood[J]. J Pediatr Surg, 2002, 37(4): 551 - 567.
[6] Davidson R A, McCloskey K D. Morphology and localization of interstitial cells in the guinea pig bladder: structural relationships with smooth muscle and neurons[J]. J Urol, 2005, 173(4): 1385 - 1390.
[7] Gillespie J I, Harvey I J, Drake M J. Agonist - and nerve-induced phasic activity in the isolated whole bladder of the guinea pig: evidence for two types of bladder activity[J]. Exp Physiol, 2003, 88(3): 343 - 357.
[8] Hashitani H, Fukuta H, Takano H, *et al*. Origin and propagation of spontaneous excitation in smooth muscle of the guinea-pig urinary bladder[J]. J Physiol, 2001, 530(Pt 2): 273 - 286.
[9] Huizinga J D, Robinson T L, Thomsen L. The search for the origin of rhythmicity in intestinal contraction; from tissue to single cells[J]. Neurogastroenterol Motil, 2000, 12(1): 3 - 9.
[10] Lang R J, Klemm M F. Interstitial cell of Cajal-like cells in the upper urinary tract [J]. J Cell Mol Med, 2005, 9(3): 543 - 556.

（编辑　王　红）

文章编号：1000-5404(2008)07-0581-01

个案与短篇

异位妊娠合并脾破裂 1 例

辛云淑　（重庆市第五人民医院妇产科，重庆 400062）

患者，女，32 岁，因“停经 69 d，下腹剧烈疼痛 2 h 伴昏迷 30 min”急诊入院。到急诊部时面色苍白，心跳、呼吸停止，经内科医师急救（胸外按压，人工呼吸，头低足高位，输氧，药物抢救等），呼吸心跳复苏后，立即送手术室，给予导尿。查尿 HCG 阳性，腹部稍膨隆，移浊（+），腹肌稍紧张，下腹压痛明显。妇科检查：阴道无血性分泌物，宫颈举痛，宫体前位，饱满，左侧附件增厚，压痛明显。后穹隆穿刺抽出不凝血液 5 ml。考虑为异位妊娠破裂，失血性休克，在纠正休克的同时，输血、输液，局麻下行剖腹探查。术中见：腹腔内有大量新鲜血液及血凝块，子宫前位饱满质软，左侧输卵管间质部有一约 3 cm 大小破口，有活动性出血，并有绒毛组织附着。右侧附件正常，盆腔无明显粘连。行左侧输卵管间质部修补术。共吸出血液及凝血块共约 3 500 ml，并在血液中找到一孕囊，囊内有一胚胎，已初具人形。手术顺利。绒毛组织及孕囊送病检。术中回输自体血液 2 600 ml，术后输血浆及红细胞悬液共 800 ml。术后心电监护，生命体征平稳。13 h 后发现腹部切口处有鲜红色血液溢出，腹部稍膨隆，同时伴有血压下降。考虑为左侧输卵管间质部破口修补处再次出血。立即再次行开腹探查，术中见腹腔内有较多鲜红色血液，吸净血液，反复冲洗盆腹腔，检查修补处及左侧输卵管均无活动性出血。再继续探查见血液来源于上腹部，继续检查发现脾脏下缘近肾压迹处有一较大血肿，并有一约 3 cm 大裂口，有活动性出血。考虑为异位妊娠合并脾破裂。经家属签字同意后行脾脏切除术。术中吸出血液约 1 500 ml，自体回输血液 1 200 ml。切除脾脏送病理检查，报告示：①左侧输卵管间质部妊娠；②脾脏破裂。术后 8 d 痊愈出院。

讨论

异位妊娠是妇产科急腹症之一，如诊断处理不及时，可能危及生命。异位妊娠的发病率逐年上升[1]。异位妊娠具有起病急、症状多样化和前期症状不典型等特点，极易误诊，是目前孕产妇死亡的主要原因之一[2,3]。其主要的死亡原因有：①多年不孕的高龄妇女，有停经、阴道流血、腹痛时，自查尿 HCG 阳性，自认为流产未到医院检查，而在家保胎。②未婚先孕、隐瞒病史，不承认有性生活史。③患者经医院诊断为异位妊娠，对危险性认识不够，不愿意治疗。以上原因可导致异位妊娠破裂大出血，抢救不及时而死亡。

异位妊娠破裂合并失血性休克、DIC 多见，但合并脾破裂少见。该患者追述病史，因腹痛剧烈，昏倒时跌倒在床沿边，约几分钟清醒，上床平躺，腹痛难忍，并感肛门坠胀；如厕时又昏倒，后经丈夫回家发现才急送入院，在送院的途中，呼之不应，到急诊部时，呼吸、心跳已停止。经内科抢救呼吸心跳复苏后，诊断为异位妊娠破裂失血性休克。在抢救休克的同时，局麻下行剖腹探查，术中证实为左侧输卵管间质部妊娠破裂，并见绒毛及孕囊胚胎后，未再继续探查。术后 13 h 发现腹部切口有新鲜血液溢出。再次探查，才发现为脾脏破裂。此病例因为来院时昏迷，虽经内科及时抢救后呼吸心跳复苏，但神志仍恍惚，无法及时问清病史而致漏诊。异位妊娠破裂的死亡率较高，该患者为左侧输卵管间质部妊娠破裂大出血，又合并脾脏破裂，两种疾病并存，均为急腹症，十分危急，极易漏诊脾破裂。如宫外孕术后患者仍有内出血表现，应再次剖腹探查以排除其他部位的出血。

关键词：异位妊娠；脾破裂；失血性休克
中图法分类号：R714.22　　文献标识码：B

参考文献：

[1] 丰有吉. 妇产科学[M]. 北京：人民卫生出版社，2005：67.
[2] 许建营. 异位妊娠[M]. 北京：中国医药科技出版社，2002：7.
[3] 郑祥钦，崔小妹，江　洪. 359 例异位妊娠保守治疗成败因素的 logistic 回归分析[J]. 实用临床医药杂志，2007，11(3)：120 - 121.

（编辑　汪勤俭）

作者简介：辛云淑，女，重庆市人，副主任医师，主要从事妇产科临床方面的研究，发表论文 12 篇。电话：(023)60931899
收稿日期：2008-01-28；修回日期：2008-03-04