论著

文章编号:1000-5404(2009)19-1824-04

自由基在2型糖尿病大鼠膀胱逼尿肌损伤的作用与意义

双卫兵,王东文,高宏飞,原小斌 (山西医科大学第一医院泌尿外科,太原 030001)

摘 要:目的 探讨自由基在糖尿病膀胱功能障碍病理生理学机制中的作用和意义。**方法** 分组观测不同时间段T2DM大鼠与正常对照组大鼠膀胱逼尿肌肌条收缩实验,并将剩余膀胱组织制备匀浆,测定其中超氧化物歧化酶(SOD)的活力与丙二醛(MDA)的含量。**结果** 不同时间段T2DM组引起逼尿肌收缩的最小牵张力高于对照组。T2DM组在0~16周的收缩频率较对照组增高,在20周后减低。T2DM组最大收缩力呈现降低趋势。正常对照组膀胱匀浆中SOD第8周达最高峰后,呈现出下降趋势,至24周时有所增高。T2DM组4周时SOD出现增高,在8周和24周组大鼠膀胱中SOD较对照组显著下降。MDA在两组动物中都表现为进行性下降趋势。在第4周,T2DM组大鼠膀胱中MDA含量较对照组显著性降低。第8周出现MDA增高。T2DM组SOD/MDA的值低于正常对照组。在第4周时,T2DM组比正常对照组显著增高,第8周时,出现显著性降低。逼尿肌肌条收缩频率与逼尿肌最大收缩力之间呈负相关,($r=-0.226$, $P<0.05$);MDA与逼尿肌最大收缩力之间呈正相关($r=0.234$, $P<0.01$)。**结论** 糖尿病可导致膀胱逼尿肌功能受损。在发病初期机体清除氧自由基的能力提高,膀胱功能处于代偿状态;随着病情进展,机体氧自由基损伤严重,膀胱逼尿肌功能失代偿。自由基损伤也是糖尿病膀胱逼尿肌损伤的重要机制之一。

关键词: 糖尿病;膀胱病变;自由基;尿动力学;大鼠
中图法分类号: R345.4; R587.1; R694.602 **文献标识码:** A

Role of free radicle in bladder detrusor impairment to T2DM rats

SHUANG Wei-bing, WANG Dong-wen, GAO Hong-fei, YUAN Xiao-bin (Department of Urology, First Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China)

Abstract: Objective To explore the role and significance of free radicle in the pathophsiological mechanisms of diabetic cystopathy (DCP). **Methods** The detrusor strip contraction experiments were performed and observed in the group of type 2 diabetes mellitus (T2DM) rats at different time stages and the control group. The bladder tissue samples was made into homogenate, and the activities of superoxide dismutase (SOD) and the contents of malondialdehyde (MDA) were determined. **Results** The minimum stretch forces to induce the detrusor contractions in T2DM group were larger than the control group. Compared with the control group, the detrusor contractive frequency was higher in the period of 0 to 16 weeks, but was lower after the 20th week. The maximum detrusor contractive forces in the T2DM group showed a descended tendency with the elapse of the experiment time. In the bladder homogenate of the control group, the activities of SOD was declined after reaching the peak at the stage of 8th week, and then escalated at the stage of 24th week. As for the T2DM group, the activities of SOD became higher in the 4th week, than descended at the stage of 8th and 24th weeks. The contents of MDA in both groups showed descended tendency. In T2DM group, MDA became even lower than the control group in the 4th week and became higher than the control group in the 8th week. The ratio of SOD/MDA in T2DM group was lower than the control group. In details, the ratio of SOD/MDA in T2DM group rose significantly in the 4th week, while declined in the 8th week. There was a negative correlation between the maximum detrusor contractive force and detrusor contractive frequency, and a positive correlation between the maximum detrusor contractive force and the contents of MDA. **Conclusion** The destrusor functions are

基金项目: 国家自然科学基金(30571865);山西医科大学青年基金(山医大校科字[2005]47号)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30571865) and Younth Foundation of Shanxi Medical University ([2005]47)

作者简介: 双卫兵,男,山西省交城县人,博士研究生,副主任医师,主要从事神经泌尿与尿动力学的基础与临床方面的研究,发表论文30余篇。电话:(0351)4639879, E-mail: shuangweibing@yahoo.com.cn

收稿日期: 2009-01-09; **修回日期:** 2009-04-29

impaired by Diabetes Mellitus. In the initial stage of DCP, the bladder functions are normal, because the detrusor had a high ability to remove the free radicle. In the progression stage of DCP, the bladder functions become decompensation, because the organism is seriously injured by the free radicle. So the impairment by free radicle is one of important mechanisms of destrusor impairment of diabetic cystopathy.

Key words: diabetes mellitus; bladder disease; free radicle; urodynamics; rats

糖尿病所导致的膀胱功能障碍,也称为糖尿病膀胱(diabetic cystopathy, DCP),是糖尿病外周神经病变的常见并发症之一,其发病率占糖尿病患者的25% ~ 85%[1]。临床上最常见的症状是膀胱感觉减退,膀胱容量增大,排尿期逼尿肌收缩力降低,残余尿也呈现增多趋势,尤其是在晚期更为明显[2]。膀胱逼尿肌功能变化存在着神经性、血管源性和肌源性等多方面的因素[2],其中肌源性损伤是直接导致逼尿肌功能变化的因素。目前认为自由基也参与了糖尿病膀胱肌源性损伤,但自由基在逼尿肌损伤过程中发挥了什么样的作用? 目前尚不清除。因此,本实验在进行离体逼尿肌功能实验的基础上,进一步对膀胱匀浆中的超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和丙二醛(malondialdehyde,MDA)进行测定,旨在探讨自由基损伤对糖尿病大鼠逼尿肌功能损伤的作用及其意义。

1　材料与方法

1.1　T2DM 大鼠模型的建立[3]及实验分组

清洁级封闭群 2 d 龄 Wistar 大鼠 156 只(实验过程中死亡 18 只),雌、雄不限,体质量 8 ~ 12 g(山西医科大学动物中心提供),随机数字表法将其分为 2 型糖尿病(type 2 Diabetes Mellitus,T2DM)组和对照组。链脲佐菌素(streptozotocin,STZ)结合高糖高脂饮食诱导制备 T2DM 模型。T2DM 大鼠断乳后第 4 周模型成功,挑选空腹血糖大于正常对照大鼠空腹血糖均值 + 3 个标准差,胰岛素敏感性降低者确定为 T2DM 大鼠纳入实验。在断乳时和高糖高脂饮食喂养第 4、8、12、16、20、24 周(分别称为 0、4、8、12、16、20、24 周组)随机数字法选取 T2DM 大鼠和相匹配的正常对照组大鼠测定膀胱匀浆中 SOD、MDA 的含量。根据实验设计每组动物数一般≥7 例。

1.2　离体逼尿肌肌条机械性牵张刺激实验[4]

断头处死大鼠后,自制双刃刀制备膀胱肌条,在充满 Krebs 液的 37 ℃恒温器官槽中温浴 30 min。采用恒压灌流方式保持灌流槽内的液体成分不变,流率控制为 30 ml/min,并通以含 95% 氧气,5% 二氧化碳的混合气体。用 Powlab/4sp 生物信号采集系统检测并记录肌条收缩的信号。

1.3　膀胱匀浆的制备和蛋白含量测定

切取肌条后迅速将剩余膀胱组织放于液氮冷冻, -76 ℃超低温冰箱保存。制备匀浆时,从冰箱取出膀胱,准确称重后,将膀胱剪成碎屑,电动匀浆器以 1 100 r/min 速度,上下 10 个冲程进行匀浆,匀浆管置于 0 ~ 4 ℃冰盒中以防影响组织中酶因匀浆时产热而活性降低。按照重量体积比为 1∶9加入生理盐水,制成 10% 的匀浆。平衡离心,4 ℃下以 2 000 r/min 离心 10 min。取上清用于蛋白及酶学等指标测定。蛋白含量测定用 Lorry 法。

1.4　膀胱匀浆中的 SOD 的活力测定

采用黄嘌呤氧化酶法(羟胺法)测定 SOD 活力,分光光度仪设定波长为 550 nm。组织匀浆中 SOD 活性单位的定义为每毫克组织蛋白在1 ml 反应液中 SOD 抑制率达 50% 时所对应的 SOD 量为 1 个 SOD 活力单位(U)。组织匀浆中 SOD 活力 = [对照管 D(550)值 - 测定管 D(550)值] × 反应液总体积 ÷ [对照管 D(550)值 ×50% × 取样量] ÷ 匀浆中的蛋白含量。单位:U/mg。

1.5　膀胱匀浆中 MDA 含量的测定

MDA 检测采用硫代巴比妥比色法,分光光度仪设定波长为 532 nm。组织中 MDA 含量 = [测定管 D(532)值 - 测定空白管 D(532)值] ÷ [标准管 D(532)值 - 标准空白管 D(532)值] × 标准品浓度 ÷ 匀浆中的蛋白含量。单位:nmol/mg。

1.6　统计学方法

采用 SPSS 11.0 统计软件进行双因素方差分析和相关分析,结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2　结果

2.1　逼尿肌肌条舒缩试验最小牵张力的测定结果

引起逼尿肌条收缩的最小牵张力的测定结果显示 T2DM 组(0.656 ± 0.177)g 显著高于对照组(0.359 ± 0.152)g(P < 0.05),不同时间段 T2DM 组引起逼尿肌收缩的最小牵张力高于对照组,除 0 周组外,其余各组间均有显著性差异(P < 0.05,表 1)。

2.2　逼尿肌肌条舒缩试验收缩频率的测定结果

逼尿肌出现收缩后产生的频率 2 组[T2DM 组(3.27 ± 1.15),对照组(3.05 ± 1.36)]比较无显著性差异(P > 0.05),T2DM 组在 0 ~ 16 周的变化较对照组增高,在 20、24 周较对照组减低。不同时间段比较第 16 周和第 20 周时有显著性差异(表 1)。

2.3　逼尿肌肌条舒缩试验最大收缩力的测定结果

最大收缩力 T2DM 组(0.084 ± 0.042)g 与对照组(0.115 ± 0.053)g 比较呈现降低趋势,总体比较有显著性差异(P < 0.05);不同时间段比较在 16 周和 20 周时有显著性差异(P < 0.05,表 1)。

表1 不同时段2组大鼠逼尿肌肌条最小牵张力、收缩频率、最大收缩力的比较

时间	最小牵张力(g)		收缩频率(次/min)		最大收缩力(g)	
	对照组	T2DM组	对照组	T2DM组	对照组	T2DM组
0周	0.431±0.085(n=9)	0.465±0.324 (n=9)	2.61±0.7(n=9)	3.06±1.13(n=9)	0.142±0.048(n=9)	0.112±0.042(n=9)
4周	0.411±0.066(n=11)	0.517±0.413^a(n=11)	2.68±0.64(n=11)	3.23±1.08(n=11)	0.141±0.043(n=11)	0.109±0.039(n=11)
8周	0.358±0.159(n=10)	0.637±0.286^b(n=9)	3.25±1.01(n=10)	4.10±0.99(n=10)	0.103±0.040(n=10)	0.048±0.015^b(n=10)
12周	0.327±0.159(n=10)	0.643±0.259^b(n=12)	2.70±0.79 (n=10)	3.19±0.82(n=12)	0.139±0.056(n=10)	0.115±0.037(n=12)
16周	0.317±0.210(n=14)	0.692±0.318^b(n=14)	2.39±0.63 (n=14)	4.00±0.71^b(n=14)	0.100±0.053(n=14)	0.083±0.037^b(n=14)
20周	0.335±0.177(n=8)	0.928±0.095^b(n=9)	4.38±2.12 (n=8)	2.83±1.00^b(n=9)	0.088±0.049(n=8)	0.057±0.029^a(n=9)
24周	0.336±6.406(n=6)	0.944±0.114^b(n=6)	4.42±2.38(n=6)	3.42±1.36(n=6)	0.075±0.055(n=6)	0.646±0.054(n=6)

a:$P<0.05$, b:$P<0.01$,与对照组比较

表2 不同时段2组大鼠膀胱匀浆中SOD、MDA、SOD/SDA比较

时间	过氧化物歧化酶(SOD)(U/mg)		丙二醛(MDA)(nmol/mg)		SOD/MDA	
	对照组	T2DM组	对照组	T2DM组	对照组	T2DM组
0周	35.950±9.155(n=9)	29.090±13.595(n=9)	2.273±1.673(n=9)	2.085±0.901(n=9)	31.576±27.932(n=9)	22.494±19.291(n=9)
4周	34.011±14.516(n=11)	39.647±14.757^a(n=11)	2.395±1.409(n=11)	1.476±1.101^a(n=11)	27.950±30.155(n=11)	48.318 3±29.772^a(n=11)
8周	50.997±20.842(n=10)	33.805±8.494^b(n=9)	1.116±0.841(n=10)	1.504±1.109(n=10)	67.572±37.500(n=10)	33.170±18.568^b(n=10)
12周	40.137±13.715(n=10)	34.011±10.162(n=12)	0.776±0.248 (n=10)	0.763±0.299(n=12)	55.067±19.761(n=10)	46.155±14.664(n=12)
16周	30.023±6.378(n=14)	34.607±12.614(n=14)	0.694±0.148 (n=14)	0.728±0.253(n=14)	43.538±6.351(n=14)	53.138±17.285(n=14)
20周	27.934±6.406(n=8)	33.240±16.166(n=9)	0.786±0.114 (n=8)	0.717±0.155(n=9)	36.457±10.204(n=8)	43.596±17.034(n=9)
24周	42.334±15.051(n=6)	21.801±5.816^b(n=6)	0.833±0.224(n=6)	0.646±0.054(n=6)	52.351±18.288(n=6)	35.027±8.416(n=6)

a: $P<0.05$, b: $P<0.01$,与对照组比较

2.4 膀胱匀浆中SOD活力测定结果

就SOD而言,总体上正常对照组[(36.902±14.447) U/mg]比T2DM组[(34.708±11.808) U/mg]高($P<0.05$)。在高糖高脂第4周时,SOD在T2DM组显著增高,在第8周和第24周T2DM组大鼠膀胱中SOD的含量较对照组显著下降(表2)。正常对照组膀胱中的SOD活力从断乳第8周达最高峰后,呈现下降趋势,24周时有所增高。

2.5 膀胱匀浆中MDA含量测定结果

MDA在2组动物中都表现为进行性下降趋势。在第4周,T2DM组大鼠膀胱中MDA含量较对照组显著降低($P<0.01$)。第8周出现MDA增高,但2组间比较无统计学差异($P>0.05$,表2)。

2.6 膀胱匀浆中SOD活力与MDA含量比值

SOD/MDA可反映机体清除氧自由基的能力,T2DM组SOD/MDA值低于正常对照组大鼠。在第4周时,T2DM组比正常对照组显著增高($P<0.05$),第8周时,出现显著性降低($P<0.01$,表2)。

2.7 逼尿肌收缩功能改变与SOD、MDA以及两者比值间的相关性分析

逼尿肌肌条收缩频率与逼尿肌最大收缩力之间呈负相关($r=-0.226$, $P<0.05$);MDA与逼尿肌最大收缩力之间呈正相关($r=0.234$,$P<0.01$)。

3 讨论

逼尿肌具有接受牵张刺激后可以引起肌肉收缩的特点。糖尿病可以导致大鼠兴奋性、自主节律性和肌肉收缩能力的改变。本研究显示在糖尿病发病过程中膀胱逼尿肌兴奋性降低,自主节律性呈现先增高后降低趋势,最大收缩力降低。熊恩庆等[5]也研究发现糖尿病早期就有逼尿肌收缩受损,表现为逼尿肌最大收缩力和持续收缩力下降。此外,逼尿肌收缩频率加快,将影响逼尿肌的收缩力,本研究也证实随着收缩频率的增加,逼尿肌最大收缩力降低,两者呈负相关。

正常情况下,机体处于氧化/抗氧化的相对平衡状态,机体不断进行着产生/清除自由基的活动。氧自由基能攻击生物膜中的多不饱和脂肪酸(polyunsaturated fatty acid,PUFA),引发脂质过氧化作用,并因此形成脂质过氧化物[6]。MDA是过氧化物脂质的二级分解产物,因而测试MDA的量常常可反映机体内脂质过氧化的程度,间接地反映出细胞损伤的程度。体内存在着完整的抗氧化防御系统,进行清除自由基和抑制自由基反应,该系统包括酶与非酶系统。其中SOD就是清除有害自由基的主要酶之一。SOD对机体的氧化与抗氧化平衡起着至关重要的作用,此酶能清除超氧化物阴离子,保护细胞免受损伤。当SOD生成降低或被耗尽,细胞自身氧化/抗氧化平衡破坏,未被清除的氧自由基将损伤细胞,从而导致器官的功能障碍。

SOD活力的高低间接反映了机体清除自由基的能力,而MDA的高低又间接反映了机体细胞受氧自由基攻击的严重程度。尽管MDA与SOD的含量均可反映体内自由基的变化情况,但是单纯观测其中一个,均不能很好地表明机体对于病变作出的反应。因此我们选择SOD为分子、MDA为分母计算出比值后进行研究,该比值能够反映机体的自由基清除能力。本研

究发现在糖尿病大鼠高糖高脂饮食第 4 周时(即 T2DM 大鼠刚刚发病时),SOD/MDA 在 T2DM 组比正常对照组显著增高,表明此时机体清除氧自由基的能力提高,机体处于代偿状态。而在第 8 周时,MDA 显著增高,SOD 和 SOD/MDA 出现显著性降低,表明机体氧自由基损伤严重,此时糖尿病大鼠膀胱逼尿肌的最大收缩力降低也最为显著。已经有研究证实,自由基损伤在衰老过程中起着重要的作用[7]。在研究中发现 T2DM 组动物的 SOD/MDA 的值低于正常对照组大鼠,但统计学分析差异无显著性。可能是病变导致自由基清除能力降低被大鼠增龄自由基清除功能降低掩盖所致。MDA 与逼尿肌最大收缩力之间呈正相关,可能为逼尿肌收缩过程产生消耗能量的同时伴有自由基形成。

Nakamura 等[8]研究发现在造成膀胱功能损伤的过程中氧自由基扮演着重要的角色。我们的研究也证实自由基损伤也是糖尿病膀胱逼尿肌损伤的重要机制之一。在发病初期机体清除氧自由基的能力提高,膀胱功能处于代偿状态;随着病情进展,机体氧自由基损伤严重,膀胱逼尿肌功能失代偿。可见在 DCP 的预防和治疗中,抗氧化治疗必不可少。

参考文献:

[1] Menendez V, Cofan F, Talbot-Wright R, *et al*. Urodynamic evaluation in simultaneous insulin-dependent diabetes mellitus and end stage renal disease[J]. J Urol, 1996, 155(6): 2001 - 2004.
[2] 双卫兵,王东文. 糖尿病神经源性膀胱[M]//陈　忠, 崔　喆, 双卫兵. 神经源性膀胱. 北京:人民卫生出版社, 2009:293 - 300.
[3] 双卫兵,王志慧,王东文, 等. 2 型糖尿病大鼠模型的制备及其验证[J]. 山西医科大学学报, 2005, 36(3):275 - 279.
[4] 双卫兵,王东文,张　旭, 等. 非胰岛素依赖型糖尿病大鼠逼尿肌兴奋性及自律性改变[J]. 现代泌尿外科杂志, 2005, 10(1):5 - 7.
[5] 熊恩庆,龚　宇,宋　波, 等. 糖尿病大鼠膀胱舒张及收缩功能实验研究[J]. 第三军医大学学报, 2000, 22(8):744 - 746.
[6] Rehman H, Connor H D, Ramshesh V K, *et al*. Ischemic preconditioning prevents free radical production and mitochondrial depolarization in small-for-size rat liver grafts[J]. Transplantation, 2008, 85(9): 1322 - 1331.
[7] 李素云, 王立芹, 郑稼琳, 等. 自由基与衰老的研究进展[J]. 中国老年学杂志, 2007, 27(20):2046 - 2048.
[8] Nakamura J, Hamada Y, Chaya S, *et al*. Transition metals and polyol pathway in the development of diabetic neuropathy in rats[J]. Diabetes Metab Res Rev, 2002, 18(5): 395 - 402.

(编辑　王　红)

文章编号:1000-5404(2009)19-1827-02

个案与短篇

腹膜后巨大脂肪瘤 2 例

张渝科,杨日高,吴国庆　　(解放军 324 医院普外科,重庆 400020)

原发性腹膜后肿瘤(primary retroperitoneal tumor, PRPT)是指发生在腹膜后间隙的肿瘤,是一种较少见的肿瘤。PRPT 占所有肿瘤的 0.07% ~0.2%[1],其中 77% ~90% 为恶性。多起源于中胚层组织,以脂肪肉瘤、平滑肌肉瘤、恶性纤维组织细胞瘤、纤维肉瘤以及恶性畸胎瘤等较常见[2]。PRPT 无特异性临床表现,不易早期发现,存在合并其他不同来源和性质肿瘤可能,手术切除难度大、风险高[3]。我科 2009 年至今收治 2 例腹膜后巨大脂肪瘤患者,均已手术,疗效满意,现报告如下。

1　临床资料

本组 2 例,男性 76 岁,女性 35 岁。均以腹胀、腹痛症状并发现腹部包块入院。2 例患者均无恶心、呕吐及泌尿系统症状。2 例术前均行腹部彩超和 CT 检查,诊断符合率分别为 96% 和 98%(图 1),此外行双下肢血管超声检查(VIP)1 例。怀疑肿瘤浸润输尿管行静脉肾盂造影(VIP)检查 1 例。

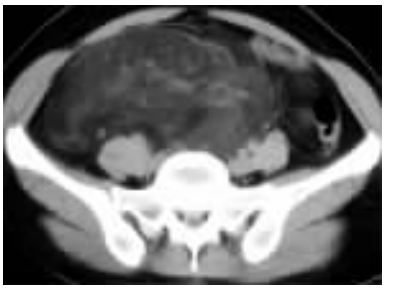


图 1　腹膜后巨大脂肪瘤 CT 表现

2 例均行手术治疗,女性患者术中探查发现腹膜后巨大脂肪瘤合并结肠肝曲肌纤维母细胞肉瘤,行肿瘤切除 + 右半结肠切除 + 右侧输尿管部分切除术,术后完整切除瘤体大小为 18 cm × 10 cm × 8 cm(图 2A);男性患者因腹膜后巨大脂肪瘤侵犯腔静脉而行肿瘤大部分切除术,切除瘤体大小为 15 cm × 9 cm × 7 cm(图 2B、图 3)。均痊愈出院。

(下转 1831 页)

作者简介:张渝科,男,重庆市人,医师,主要从事胃肠外科方面的研究。E-mail:zyk761127@yahoo.com.cn
通信作者:杨日高,电话:(023)68762058
收稿日期:2009-05-26;**修回日期**:2009-06-25