论著

文章编号:1000-5404(2014)13-1394-04

人和大鼠膀胱平滑肌细胞存在低水平的自噬

赵 江[1],董兴有[2],杨星亮[2],王 亮[2],李龙坤[2],周占松[1],宋 波[1] (400038 重庆,第三军医大学西南医院全军泌尿外科研究所[1];400037 重庆,第三军医大学新桥医院泌尿外科[2])

[摘要] **目的** 探讨人和大鼠膀胱平滑肌细胞是否存在自噬,以阐明自噬在膀胱疾病中的作用。**方法** 雌性SD大鼠8只,2~3月龄,体质量200~230 g。人膀胱标本($n=4$)来自于西南医院泌尿外科膀胱癌全切患者。HE染色观察膀胱肌层定位。透射电镜(TEM)用于人和大鼠膀胱平滑肌细胞自噬小体鉴定。免疫荧光双标用于人和大鼠微管相关蛋白1轻链3(LC3)和平滑肌肌动蛋白(α-SMA)共定位。Western blot和RT-PCR检测人和大鼠膀胱肌层组织LC3蛋白和mRNA表达。**结果** TEM证实人和大鼠膀胱平滑肌细胞存在自噬小体。免疫荧光双标和Western blot证实人和大鼠膀胱平滑肌细胞存在自噬标记蛋白LC3的表达。RT-PCR证实人和大鼠膀胱平滑肌细胞存在自噬标记蛋白LC3 mRNA的表达。**结论** 人和大鼠膀胱平滑肌细胞存在自噬,这种低水平自噬可能在维持膀胱平滑肌细胞自身稳态中起到重要作用。

[关键词] 自噬;膀胱平滑肌;膀胱
[中图法分类号] R322.62; R329.28 [文献标志码] A

Autophagy at low level in human and rat bladder smooth muscle cells

Zhao Jiang[1], Dong Xingyou[2], Yang Xingliang[2], Wang Liang[2], Li Longkun[2], Zhou Zhansong[1], Song Bo[1] ([1]Institute of Urinary Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038; [2]Department of Urinary Surgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate whether there exists autophagy in the human and rat bladder smooth muscle cells in order to elucidate the role of autophagy in bladder diseases. **Methods** A total of 8 male SD rats at an age of 2 to 3 months, weighing 200 to 230 g were sacrificed for bladder tissue. Four samples of human bladder tissues were harvested from 4 patients of bladder cancer after radical cystectomy. HE staining was used to locate the bladder muscle layer. Transmission electron microscopy (TEM) was used for identification of autophagosome in the human and rat bladder smooth muscle cells. Co-location of human and rat microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) and α-smooth muscle actin (α-SMA) was detected with double-labeled immunofluorescent assay. The expression of LC3 at protein and mRNA levels was detected in human and rat bladder muscle layer by Western blotting and RT-PCR. **Results** TEM showed there existed autophagosomes in the human and rat bladder smooth muscle cells. Double-labeled immunofluorescent assay, Western blotting and RT-PCR confirmed the autophagy marker protein LC3 was expressed in the human and rat bladder smooth muscle cells. **Conclusion** The presence of autophagy in human and rat bladder smooth muscle cells at low level may play an important role in the maintenance of homeostasis in bladder smooth muscle cells.

[**Key words**] autophagy; bladder smooth muscle; bladder

Corresponding author: Song Bo, E-mail: songb-mr@vip.sina.com

在真核生物细胞中,自噬是一个高度保守的蛋白降解途径,通过隔离损伤以及衰老的细胞器和蛋白并交给溶酶体溶解,从而精细地调控细胞的生理功能,扮演细胞管家角色[1]。基础水平的自噬是维持细胞稳态的一种重要机制[2]。当细胞面对不同应激(如饥饿、感染、内质网应激、线粒体损伤等)时,自噬将提供细胞多样化功能以应对外界环境的应激[1]。此时,自噬演变为一种重要的细胞保护机制,这种保护机制提供了细胞面对严峻环境改变时的适应能力。目前大量

[通信作者] 宋 波,E-mail: songb-mr@vip.sina.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140225.1540.013.html(2014-02-25)

研究提示,自噬相关蛋白和通路的改变参与了机体多种器官和组织的炎症、衰老、代谢以及感染等疾病的病理生理过程[3-4],在这些疾病中,自噬扮演的保护功能受到了阻止或者降低。这提示自噬的紊乱与疾病的发生存在较为密切的关系。膀胱平滑肌作为膀胱的重要组成成分,其生理性的舒张和收缩在维持膀胱尿液存储和排空中占有重要的地位。其结构和功能改变不但影响了膀胱的正常功能,而且还是多种膀胱疾病(如膀胱出口梗阻、糖尿病膀胱、老年膀胱等)发病机制的重要原因[5-7]。自噬作为维持细胞稳态和细胞保护的重要机制,其在膀胱平滑肌中是否存在以及其作用尚少见报道。事实上,平滑肌自噬在气道、血管以及阴茎上已被证实,并且自噬在其中发挥着重要的保护作用[8-10],可见自噬在平滑肌功能的维持中占有重要的地位。本研究主要探讨膀胱平滑肌是否存在自噬,旨在为下一步研究其在膀胱疾病中的作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验对象 雌性 SD 大鼠 8 只,2~3 月龄,体质量 200~230 g,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,过量戊巴比妥麻醉处死,迅速取出膀胱并沿纵轴切开,膀胱在解剖显微镜下迅速去除黏膜,肌层组织用于后续实验。人膀胱标本(n=4)来自于西南医院泌尿外科膀胱癌全切患者,在解剖显微镜下迅速去除人膀胱癌旁 2 cm 组织黏膜,肌层组织用于后续实验。本研究经第三军大学伦理委员会批准,患者均签署知情同意书。

1.1.2 主要试剂 小鼠单克隆 β-actin 抗体购自 Santa Cruz 公司,兔多克隆微管相关蛋白 1 轻链 3B(LC3B)抗体购自 Sigma 公司,辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔和山羊抗鼠二抗购自北京中杉公司,FITC 标记的山羊抗鼠二抗购自武汉博士德公司,罗丹明标记驴抗兔购自 Invitrogen 公司,DAPI 和 TRIzol 总 RNA 提取液购自碧云天生物技术研究所,逆转录试剂盒购自 TaKaRa 公司,PCR 试剂盒购自康为世纪生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 HE 染色 人和大鼠膀胱组织经 10% 福尔马林固定,梯度酒精脱水,石蜡包埋并切片(5 μm)用于 HE 染色。

1.2.2 Western blot 检测人和大鼠膀胱肌层 LC3 蛋白表达 人和大鼠膀胱肌层组织各 50 mg 用于 LC3 蛋白表达检测。Western blot 具体方法和步骤同文献[11]。抗体浓度为 β-actin(1∶1 000),LC3B(1∶600),山羊抗兔二抗(1∶4 000),山羊抗鼠二抗(1∶1 000)。

1.2.3 透射电镜(TEM)观察自噬小体结构 人和大鼠膀胱肌条(n=4) 4 mm×8 mm,迅速放入电镜固定液(1% 多聚甲醛,2.5% 戊二醛)中固定,梯度酒精脱水,环氧化树脂包埋。随后,各肌条被切为 50 nm 超薄切片并用醋酸铅铀酰柠檬酸染色。制作好的标本在 PhilipsCM10(Philips CM10; Eindhoven, Netherlands)透射电镜下观察自噬小体的结构。

1.2.4 LC3 和平滑肌肌动蛋白(α-SMA)免疫荧光双标 人和大鼠新鲜膀胱肌条(n=4) 5 mm×10 mm 制作冰冻切片(5 μm),经多聚甲醛常温下固定 15 min,PBS 清洗 3 次。切片经 0.3% Triton X-100 打孔 5 min,PBS 清洗 3 次,1% BSA 常温下封闭 2 h。接着 α-SMA(1∶100)和 LC3B(1∶300) 4 ℃过夜孵育。随后,切片 PBS 清洗 3 次,FITC 标记山羊抗鼠(1∶100)和罗丹明标记驴抗兔(1∶300)常温下孵育 2 h。切片 PBS 清洗 3 次,DAPI 常温下孵育 5 min。PBS 清洗 3 次,甘油封片。制作好的标本在莱卡激光显微镜下观察。人和大鼠新鲜标本切片用于阴性对照研究,阴性对照为不含一抗的处理标本,其他步骤同前。

1.2.5 RT-PCR 检测人和大鼠膀胱肌层 LC3 mRNA 表达 人和大鼠膀胱肌层(n=4)组织各 60 mg 和 150 mg,用 TRIzol 总 RNA 提取液提取总 RNA,通过逆转录试剂盒将 RNA 逆转为 cDNA 后,用 PCR 试剂盒配置如下 20 μL 体系:10 μL 的 PCR Mix,2 μL 的 cDNA,上、下游引物各 1 μL,6 μL 的无 RNase 水。扩增条件:2 min,94 ℃预变性,94 ℃变性 30 s,大鼠 LC3、大鼠 GADPH、人 LC3 和人 GADPH 退火分别为 58、59、56 ℃和 58 ℃,30 s,72 ℃延伸 30 s,终延伸 72 ℃ 5 min。反应结束后,取 LC3 及 GAPDH 扩增产物各 5 μL 分别与 6×Loading Buffer 1 μL 混合,2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。扩增引物见表 1。

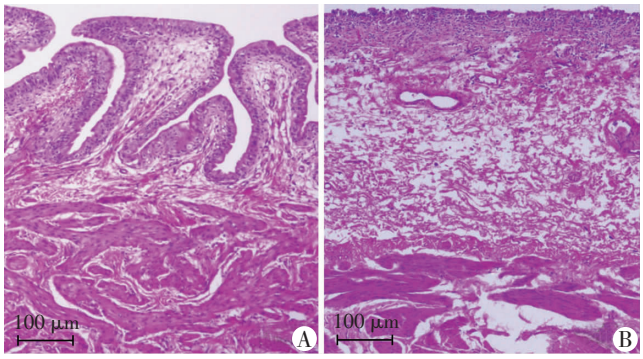
表 1 人和大鼠 LC3、GADPH 扩增引物序列及长度

基因	引物序列	长度(bp)
LC3(大鼠)	上游:5′-CCATTCACCAGGAGGAAGAAG-3′	319
	下游:5′-GGAGACACACAAGGGAAGTG-3′	
LC3(人)	上游:5′-GTAAACGGGCTGTGTGAGAAA-3′	374
	下游:5′-AAGGCAGAAGGGAGTGTGTCT-3′	
GAPDH(大鼠)	上游:5′-TCCGCCCCTTCCGCTGATGC-3′	434
	下游:5′-GCCGCCTGCTTCACCACCTTCT-3′	
GAPDH(人)	上游:5′-AGGAGCGAGATCCCTCCAAA-3′	239
	下游:5′-TAAGCAGTTGGTGGTGCAGG-3′	

2 结果

2.1 HE 染色观察

HE 染色可见大鼠和人膀胱黏膜完整,肌层较为厚实,固有膜和肌层分界相对不明显。与大鼠相比,人黏膜层较为厚实,提示在标本处理时应完整去除黏膜层(图 1)。

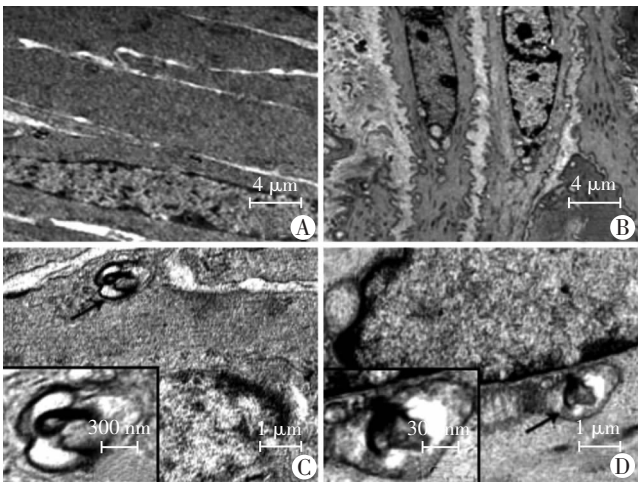


A:大鼠膀胱;B:人膀胱

图 1 HE 染色显示大鼠和人膀胱形态结构

2.2 TEM观察人和大鼠膀胱平滑肌细胞

TEM观察结果证实人和大鼠膀胱平滑肌细胞存在自噬小体,电镜下人和大鼠膀胱平滑肌细胞自噬小体为双层膜结构,中间包裹一些胞质货物(如衰老的细胞器等),形态较典型(图2)。

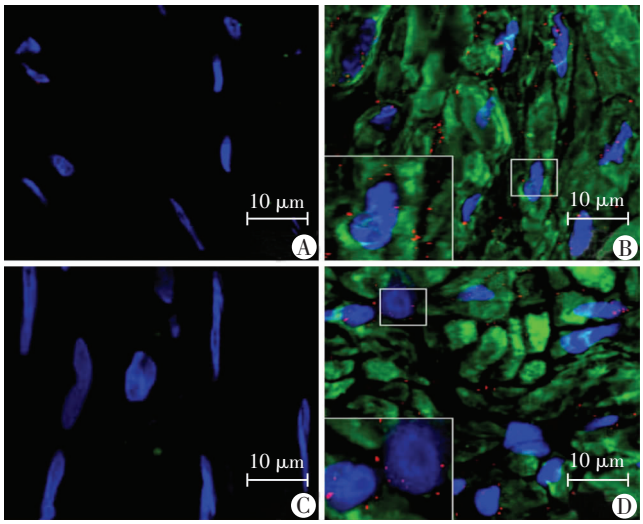


A:大鼠膀胱肌层定位; B:人膀胱肌层定位; C:大鼠平滑肌细胞自噬小体; D:人平滑肌细胞自噬小体

图2 TEM显示大鼠和人膀胱平滑肌细胞自噬小体

2.3 人和大鼠膀胱平滑肌LC3和α-SMA免疫荧光双标变化

LC3和α-SMA免疫荧光双标证实(图3)人和大鼠膀胱平滑肌细胞存在自噬标记蛋白LC3表达,自噬标记蛋白呈现为斑点状和颗粒状,在正常的大鼠和人膀胱平滑肌细胞中LC3表达量相对较少。

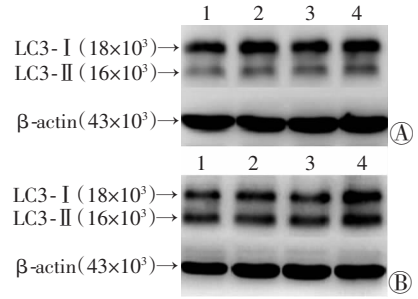


A:大鼠阴性对照; B:大鼠平滑肌细胞LC3荧光; C:人阴性对照; D:人平滑肌细胞LC3荧光 绿色:α-SMA;红色:LC3;蓝色:DAPI

图3 免疫荧光双标检测人和大鼠膀胱平滑肌细胞LC3和α-SMA表达

2.4 人和大鼠膀胱肌层LC3蛋白表达

Western blot检测显示人和大鼠膀胱肌层存在自噬标记蛋白LC3的表达(图4)。正常情况下人和大鼠存在少量自噬标记蛋白LC3的表达,其中作为存在自噬小体上的标记蛋白LC3-Ⅱ含量相对较少,提示正常情况下膀胱平滑肌细胞存在低水平的自噬活动。

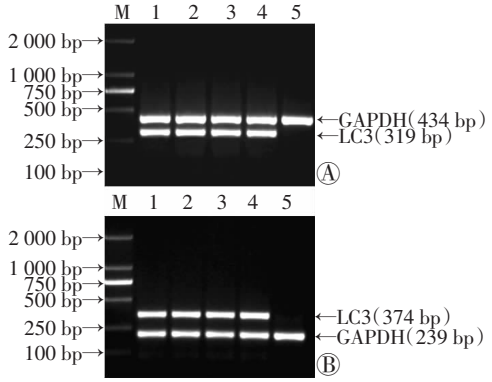


1~4:代表4个标本

图4 Western blot检测大鼠(A)和人(B)膀胱肌层LC3蛋白的表达

2.5 人和大鼠膀胱肌层LC3 mRNA表达

RT-PCR结果(图5)证实人和大鼠膀胱肌层存在LC3 mRNA的表达,从基因水平上证实人和大鼠膀胱平滑肌存在自噬。



M:标准;1~4:代表4个标本;5:阴性对照

图5 RT-PCR检测大鼠(A)和人(B)膀胱肌层LC3 mRNA的表达

3 讨论

电镜、LC3免疫荧光以及Western blot是可靠并被广泛运用的自噬检测和评价的方法[12-13]。本研究通过电镜观察到人和大鼠膀胱平滑肌细胞中存在自噬小体这种典型的细胞亚结构。此外,通过免疫荧光和Western blot证实了人和大鼠膀胱平滑肌细胞上存在自噬标记蛋白LC3表达,人和大鼠膀胱肌层LC3-Ⅱ的表达量较少,结合免疫荧光LC3荧光斑点数目较少的结果,我们认为正常生理情况下,人和大鼠膀胱平滑肌细胞存在低水平的自噬。同样,运用RT-PCR我们证实了人和大鼠膀胱肌层存在LC3 mRNA的表达。综合电镜、免疫荧光、Western blot和RT-PCR结果,证实人和大鼠膀胱平滑肌细胞存在低水平自噬,这种低水平自噬可能在维持膀胱平滑肌细胞稳态和结构功能完整中起着重要的作用。

无论是在国内,还是在国外,女性和男性下尿路症状(lower urinary tract symptoms, LUTS)与老年呈高度相关性[14-16]。临床资料和基础实验提示老年相关的盆底血管紊乱在LUTS中扮演着较为重要的角色[16]。在经直肠彩色超声检查中,与正常年轻人相比,老年

LUTS 患者膀胱血供显著减少[17]。在盆底动脉功能障碍和膀胱出口梗阻动物模型研究中,同样发现动物膀胱存在供血不足的情况[16]。这提示膀胱慢性缺血缺氧可能是 LUTS 的一个重要发病机制。在活体和细胞水平上,研究发现,慢性缺血缺氧将导致逼尿肌细胞线粒体以及内质网肿胀、变形,细胞膜结构损伤等改变,这些变化最终导致平滑肌细胞氧化应激的发生[16]。氧化应激发生将引起一系列下游的瀑布效应,其中包括蛋白氧化、细胞膜破坏、细胞凋亡信号诱导等,这些因素最终引起膀胱平滑肌细胞收缩功能损伤和细胞数量减低以及纤维化的发生[16]。逼尿肌作为膀胱收缩和舒张的主要功能细胞,其结构和功能的破坏,将影响膀胱正常的尿液存储和排空,进而导致尿急、尿频、尿不尽等一系列 LUTS 症状产生。

自噬作为调控氧化应激的一种重要方式得到了广泛的研究。研究提示当细胞线粒体遭到损伤时,损伤的线粒体将产生较多的活性氧族(ROS)和活性氮族(RNS)以及损伤其他细胞器,作为自噬激活因素 ROS、RNS 以及损伤的细胞器将激活自噬,激活的自噬将通过清除损伤的线粒体和细胞器以及损伤蛋白等发挥抗氧化应激保护细胞的作用[18-19]。然而,事实上自噬与老年疾病的发生存在较为密切的关系,老年时氧化应激增加但自噬的水平却有不同程度的降低,导致氧化应激的损伤持续从而加速老年化的进程[20]。在老年相关的 LUTS 中,膀胱平滑肌细胞因缺血缺氧发生氧化应激,导致逼尿肌细胞结构和功能的破坏,进而导致尿急、尿频、尿不尽等 LUTS 症状的产生。自噬作为维持细胞稳态和调控氧化应激的重要方式,其在老年相关的 LUTS 中如何变化? 干预自噬是否能改善膀胱功能?

在未来的 10 ~ 15 年里,中国作为老年化人口大国,老年相关疾病将成为我国医疗负担的重要组成部分。老年相关的 LUTS 也将成为泌尿科医师面临的棘手问题,因此阐述自噬在老年相关的 LUTS 中的作用和地位可能对我们处理和对待 LUTS 提供新思路。

参考文献:

[1] Levine B, Mizushima N, Virgin H W. Autophagy in immunity and inflammation[J]. Nature, 2011, 469(7330):323 - 335.

[2] Mizushima N, Levine B, Cuervo A M, *et al*. Autophagy fights disease through cellular self-digestion[J]. Nature, 2008, 451(7182): 1069 - 1075.

[3] Saitoh T, Fujita N, Jang M H, *et al*. Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1beta production[J]. Nature, 2008, 456(7219):264 - 268.

[4] Salminen A, Kaarniranta K, Kauppinen A. Beclin 1 interactome controls the crosstalk between apoptosis, autophagy and inflammasome activation: impact on the aging process[J]. Ageing Res Rev, 2013, 12(2):520 - 534.

[5] Li L, Jiang C, Hao P, *et al*. Changes of gap junctional cell-cell communication in overactive detrusor in rats[J]. Am J Physiol Cell Physiol,2007, 293(5):C1627 - C1635.

[6] 卢根生, 宋波. 逼尿肌过度活动的研究进展[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(10): 1128 - 1130.

[7] 双卫兵, 王东文, 高宏飞, 等. 自由基在2 型糖尿病大鼠膀胱逼尿肌损伤的作用与意义[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(19): 1824 - 1827.

[8] He C, Zhu H, Zhang W, *et al*. 7-Ketocholesterol induces autophagy in vascular smooth muscle cells through Nox4 and Atg4B[J]. Am J Pathol, 2013, 183(2):626 - 637.

[9] Ghavami S, Mutawe M M, Schaafsma D, *et al*. Geranylgeranyl transferase 1 modulates autophagy and apoptosis in human airway smooth muscle[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2012, 302(4): L420 - L428.

[10] Zhang M G, Wang X J, Shen Z J, *et al*. Long-term oral administration of 5alpha-reductase inhibitor attenuates erectile function by inhibiting autophagy and promoting apoptosis of smooth muscle cells in corpus cavernosum of aged rats[J]. Urology, 2013, 82(3): 743.e9 - 743.e15.

[11] Chen W, Jiang C, Jin X, *et al*. Roles of stem cell factor on loss of interstitial cells of Cajal in bladder of diabetic rats[J]. Urology, 2011, 78(6):1443.e1 - 1443.e6.

[12] Klionsky D J, Abeliovich H, Agostinis P, *et al*. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes[J]. Autophagy, 2008, 4(2):151 - 175.

[13] Mizushima N, Yoshimori T, Levine B. Methods in mammalian autophagy research[J]. Cell, 2010, 140(3):313 - 326.

[14] Parsons J K, Bergstrom J, Silberstein J, *et al*. Prevalence and characteristics of lower urinary tract symptoms in men aged > or = 80 years[J]. Urology, 2008, 72(2):318 - 321.

[15] 张祥华,李昕,张争, 等. 社区中老年男性膀胱过度活动症患病率的调查研究[J]. 中华外科杂志, 2010, 48(23):1763 - 1766.

[16] Azadzoi K M, Yalla S V, Siroky M B. Human bladder smooth muscle cell damage in disturbed oxygen tension[J]. Urology, 2011, 78(4): 967.e9 - 967.e15.

[17] Pinggera G M, Mitterberger M, Steiner E, *et al*. Association of lower urinary tract symptoms and chronic ischaemia of the lower urinary tract in elderly women and men: assessment using colour Doppler ultrasonography[J]. BJU Int, 2008, 102(4): 470 - 474.

[18] Lee J, Giordano S, Zhang J. Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signalling[J]. Biochem J, 2012, 441(2):523 - 540.

[19] Nakahira K, Haspel J A, Rathinam V A, *et al*. Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome[J]. Nat Immunol, 2011, 12(3):222 - 230.

[20] Shacka J, Roth K A, Zhang J. The autophagy-lysosomal degradation pathway: role in neurodegenerative disease and therapy[J]. Front Biosci, 2008, 13:718 - 736.

(**收稿**:2013-11-04;**修回**:2014-01-16)

(编辑 龙 亮)