论著

文章编号:1000-5404(2014)13-1398-04

缝隙连接介导胞间通讯在兔输尿管痉挛中的作用

李 新[1],郭凤云[2],陈志朋[3],潘进洪[3],何 鹏[3],李为兵[3],周占松[3] (650032 昆明,成都军区昆明总医院:泌尿外科[1],心血管内科[2];400038 重庆,第三军医大学西南医院全军泌尿外科研究所[3])

[摘要] **目的** 探讨缝隙连接在输尿管痉挛中的作用及其机制。**方法** 新西兰大白兔按随机数字表法分为正常对照组(10只)和实验组(14只)。实验组制作输尿管梗阻模型。常规HE染色、电镜观察输尿管结构变化,采用Western blot及免疫组织化学技术分别检测输尿管中缝隙连接蛋白Cx43的表达变化,以体外肌条拉力实验检测输尿管收缩性变化,并观察缝隙连接阻滞剂18α-次甘草酸(AGA)对其收缩性的影响。**结果** 两组输尿管形态改变差别不明显。输尿管平滑肌细胞间存在大量缝隙连接结构。免疫组化技术及Western blot检测可见实验组输尿管Cx43表达较对照组增加($P<0.01$)。体外肌条拉力实验显示实验组在较小电刺激强度[(0.42±0.14)mV]下即可出现自发性收缩($P<0.05$);随电刺激强度增大,肌条收缩力逐渐增强,相同电刺激强度下实验组收缩力较对照组明显增高($P<0.05$),AGA可显著抑制电刺激所引起的输尿管收缩,而实验组较对照组收缩力下降更为明显($P<0.05$)。**结论** Cx43介导胞间通讯增强是导致输尿管急性梗阻后兴奋性增高、收缩力增加的重要因素之一。

[关键词] 输尿管痉挛;Cx43;缝隙连接;收缩性
[中图法分类号] R329.27; R363.21; R693.02 [文献标志码] A

Role of gap junctional intercellular communication in ureter spasm of rabbits

Li Xin[1], Guo Fengyun[2], Chen Zhipeng[3], Pan Jinhong[3], He Peng[3], Li Weibing[3], Zhou Zhansong[3] ([1]Department of Urology, [2]Department of Cardiovasology, Kunming General Hospital of Chengdu Military Command, Kunming, Yunnan Province, 650032; [3]Institute of Urology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the role of gap junctional intercellular communication in the spasm of ureter of rabbits. **Methods** New Zealand rabbits were randomly divided into control ($n=10$) and experimental ($n=14$) group. Ureter spasm animal models were made. Expression and location of Cx43 were detected by Western blotting and immunohistochemical assay. The contraction of ureter strip evoked by minimum electronic stimulus was recorded. Effect of gap junction inhibitor (AGA) on ureter strip contraction was also observed. **Results** There was no obvious different change in the morphology of the ureter between the 2 groups. Many gap junctions were observed among the ureter smooth muscle cells. Immunohistochemical assay and Western blotting indicated that the expression of Cx43 was enhanced in the experimental than the control groups ($P<0.05$). The spontaneous contraction of ureter strip *in vitro* was observed in the experimental group under the minimum electronic stimulus of 0.42±0.14 mV ($P<0.05$). The contraction strength was increased with the increase of electronic stimulus, while the strength of experimental group was stronger than that of control ($P<0.05$). AGA significantly inhibited the ureter strip contraction for both groups, with that in the experimental group more significant ($P<0.05$). **Conclusion** Cx43-mediated gap junctional intercellular communication is one of important factors for increased excitability and enhanced contraction of the ureter after acute obstruction.

[**Key words**] ureter spasm; Cx43; gap junction; contraction

Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2010BB5170), the Open Project of State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury (SKLKF201007), and the Project of Kunming General Hospital of Chengdu Military Command (2013YG201). Corresponding author: Li Xin, E-mail: ductman@tom.com

[基金项目] 重庆市自然科学基金(CSTC2010BB5170);创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室开放基金(SKLKF201007);成都军区昆明总院创新基金(2013YG201)
[通信作者] 李 新,E-mail:ductman@tom.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140319.1711.003.html(2014-03-19)

顽固性肾绞痛是泌尿外科医师常见而棘手的难题,对其发生机制进行深入探讨以寻找新型治疗方案实属必要[1]。输尿管痉挛是肾绞痛的基本病理生理反应,输尿管的收缩信号是通过缝隙连接介导胞间通讯(gap junctional intercellular communication, GJIC)来进行的[2],如果能够阻止这种平滑肌细胞间信息传递,将有可能达到解除输尿管痉挛的目的。本研究采用新西兰大白兔制作急性输尿管梗阻模型,观察梗阻前后输尿管平滑肌缝隙连接蛋白 Cx43 表达的变化以及缝隙连接阻滞剂对输尿管肌条收缩的抑制作用。以期从新的角度对输尿管痉挛发生机制进行研究,为临床药物治疗提供新的实验与理论依据。

1 材料与方法

1.1 动物模型及分组

健康新西兰大白兔 24 只,体质量 2.0 ~ 2.5 kg,雌雄不限,由第三军医大学实验动物中心提供。按随机数字表分组,10 只作为正常对照组,其余 14 只大鼠制作肾绞痛模型作为实验组。

1.2 方法

1.2.1 动物模型制作 按照 Giamberardino 等[3]介绍的"人工结石置入法"制作肾绞痛模型:经腹膜外入路,于右侧输尿管中下 1/3 处注射 0.5 mL 牙科水泥。观察动物术后行为变化,当动物出现腹部收缩、舔触术侧下腹、肢体过伸、背部仰卧、身体蜷缩、下腹蹭地 6 大症状时视为模型制作成功,随即处死动物取材。

1.2.2 输尿管平滑肌形态学观察 光镜观察:4% 多聚甲醛经右心室灌注固定,常规方法脱水、浸蜡包埋,组织蜡块均以 5 μm 厚切片,HE 染色,光镜下观察。透射射电镜观察:处死动物,迅速取材,将组织块修剪成 1 mm^3 左右大小,分别以 2.5% 戊二醛、1.0% 锇酸固定,乙醇 + 丙酮梯度脱水,包埋剂包埋固化,50 nm 超薄切片,3% 醋酸铀-枸橼酸铅双染色,透射电镜观察。

1.2.3 免疫组织化学检测输尿管平滑肌 Cx43 的表达 组织采用 4% 多聚甲醛灌注固定,常规方法脱水、浸蜡包埋,组织蜡块均以 5 μm 厚切片,采用 S-P 法进行免疫组织化学检测。严格按照试剂盒说明书进行,切片常规脱蜡去水,3% 过氧化氢灭活内源性过氧化物酶,枸橼酸盐抗原修复液高压热抗原修复,10% 正常山羊血清封闭 15 min,依次滴加适当比例稀释的一抗(羊抗兔 Cx43 多克隆抗体 1∶50,Santa Cruz 公司),4 ℃冰箱孵育过夜,依次滴加生物素标记的二抗(兔抗羊 IgG,中山生物技术公司),DAB (中山生物技术公司)显色,苏木精复染,镜下观察 Cx43 的分布及表达变化[4]。

1.2.4 Western blot 检测输尿管平滑肌 Cx43 的表达 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,电转法转移至 PVDF 膜,37 ℃下 5% 脱脂奶溶液封闭 3 h, 然后与一抗溶液反应(1∶1 000) 4 h,0.1% Tween-20 磷酸缓冲液漂洗后, 再与生物素标记的二抗 37 ℃孵育 2 h, 洗膜后 DAB 显色,光密度扫描半定量分析显影带。

1.2.5 体外肌条拉力实验 处死动物,全切输尿管,取中段输尿管长约 2.0 cm,于器官槽内与拉力传感器相连。槽内充满 37 ℃恒温 Krebs 液,通以 95% O_2、5% CO_2 混合气体。由微调螺旋调节肌条长度,拉力传感器与四通道多功能生理信号放大器相连,通过电刺激器给予电信号刺激,记录输尿管肌条收缩强度及幅度变化,检测信号输入计算机。

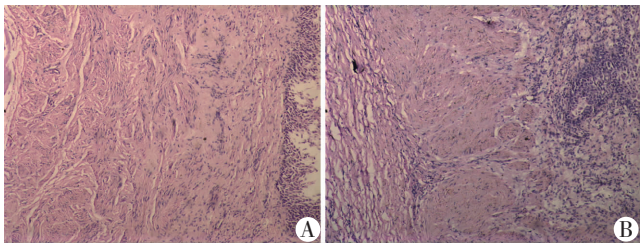
1.3 统计学分析

采用 SPSS 10.0 统计软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组计量资料比较(组内、组间)采用两独立样本 t 检验。

2 结果

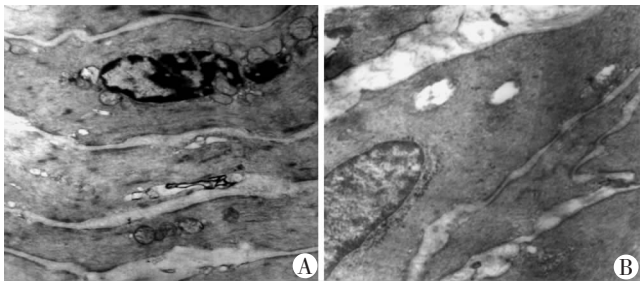
2.1 兔输尿管平滑肌形态学变化

HE 染色及扫描电镜观察显示,两组输尿管平滑肌细胞间可见大量缝隙连接,两组标本在形态学上无显著差别,考虑为结石所致输尿管痉挛时间较短,输尿管主要表现为以收缩为主的功能性改变(图 1、2)。



A:对照组;B:实验组

图 1 光镜观察两组兔输尿管平滑肌形态学变化 (HE ×100)

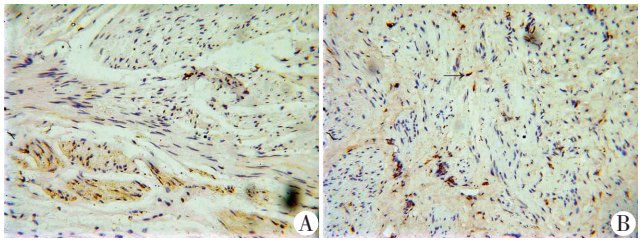


A:对照组; B:实验组

图 2 电镜观察两组兔输尿管平滑肌形态学变化 (TEM ×12 000)

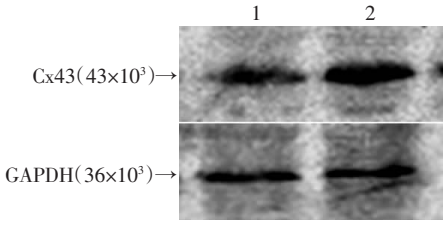
2.2 急性梗阻前后输尿管平滑肌中 Cx43 表达的变化

免疫组化技术检测输尿管平滑肌 Cx43 的表达,可见实验组中 Cx43 表达较对照组增加(图 3)。Western blot 检测(图 4)输尿管平滑肌 Cx43 的表达,同样可见实验组(1.024)中 Cx43 表达较对照组(0.649)显著增加($P < 0.01$)。



A:对照组;B:实验组 ↑:示 Cx43 阳性细胞

图 3 免疫组化观察两组兔输尿管平滑肌中 Cx43 表达(S-P ×400)



1:对照组;2:实验组

图4 Western blot检测两组输尿管平滑肌中Cx43的表达

2.3 输尿管肌条收缩强度及幅度变化

2.3.1 最小收缩电刺激强度 机械牵拉输尿管,使输尿管段张力维持在0.1 g,经电刺激器从0.1 mV开始,以0.05 mV为单位逐渐递增,记录引起各组输尿管段收缩的最小电刺激强度,结果显示,与对照组[(0.63±0.17)mV]比较,实验组输尿管兴奋性增高,输尿管段在较小电刺激强度[(0.42±0.14)mV]下即可出现自发性收缩($P<0.05$)。

2.3.2 不同电刺激强度下肌条收缩力变化 根据2.3.1中的数据,使输尿管段张力维持在0.1 g,从0.4 mV开始,以0.1 mV为单位逐渐递增电刺激强度,记录引起各组输尿管段收缩力的变化,结果显示,实验组对电刺激敏感性增强,当电刺激为0.5 mV时实验组输尿管段即发生收缩,而对照组肌条直到0.7 mV才出现收缩;随电刺激强度增大,肌条收缩力逐渐增强;相同电刺激强度下实验组收缩力较对照组明显增高。表明梗阻后输尿管收缩敏感性及收缩力均增强(表1)。

2.3.3 缝隙连接阻滞剂18α-次甘草酸(AGA)对电刺激所致体外输尿管段收缩力的影响 用含不同浓度18α-次甘草酸(10^{-8}、10^{-7}、10^{-6}mol/L)的Krebs液孵育肌条10 min,使输尿管段张力维持在0.1 g,从0.4 mV开始,以0.1 mV为单位逐渐递增电刺激强度,记录引起各组输尿管段收缩力的变化。结果显示,加入10^{-8}mol/L AGA后,当电刺激为0.7 mV时实验组输尿管段才发生收缩,而对照组则在电刺激为0.8 mV时出现收缩;随着AGA浓度增加,输尿管段收缩需要更高强度的电刺激(表1)。表明AGA可显著抑制电刺激所引起的输尿管收缩,而实验组较对照组收缩力下降更为明显。

3 讨论

3.1 肾绞痛的发生机制有待进一步补充

输尿管的收缩为一种自律性蠕动,肾盂、盏交界处的特殊平滑肌细胞(atypical smooth muscle cell,ASMC)产生自发性兴奋,通过缝隙连接介导细胞间通讯在普通平滑肌细胞(typical smooth muscle cell, TSMC)之间进行传递,引起输尿管整体协调收缩。输尿管急性阻塞所引起的突发性腰背部绞痛称为肾绞痛,是泌尿外科最常见急症。肾绞痛发作时疼痛剧烈难忍,以致有人将其称之为"人生最难以忍受的疼痛之一"。因此,对于肾绞痛患者,迅速而有效的解痉镇痛处理十分重要。输尿管痉挛是肾绞痛的基本病理生理反应,目前认为,输尿管痉挛可能通过以下途径引起疼痛:①结石等原因造成梗阻后,压力感受器启动内脏神经反射引起局部平滑肌剧烈收缩痉挛,由于管腔内壁张力增加,这些部位的疼痛感受器受到牵拉后引起剧烈疼痛;②输尿管痉挛后,输尿管或肾盏壁水肿和平滑肌缺血使内源性前列腺素等炎症递质增加,激活了更多的疼痛感受器,进一步加重了痛感[5]。因此,当前临床药物治疗主要通过解痉、镇痛等处理,但仍有13.9%的患者仍持续疼痛或反复发作,最终不得不进行包括手术在内的进一步治疗[5]。这说明肾绞痛还可能存在某种我们尚不了解的机制,有必要进行深入研究。

目前临床应用的解痉药物分别通过抑制输尿管ASMC收缩兴奋性的产生(M受体拮抗剂)及平滑肌细胞的收缩(钙通道阻滞剂)来进行,而针对衔接二者的输尿管兴奋-收缩信号传导的治疗尚少见研究报道[6]。如果能够阻断这种通过缝隙连接介导的平滑肌细胞间信息传递,将可能抑制输尿管整体收缩,从而解除输尿管痉挛。如果能够通过实验证实上述设想,将对输尿管痉挛发生机制提出新的补充,为临床治疗提供新的方向。

3.2 痉挛输尿管平滑肌中Cx43表达增多

缝隙连接是相邻细胞间离子及小分子物质交换的直接通道,是细胞间信息传递的重要途径。构成缝隙连接的是一组被称为连接素(connexin,Cx)的蛋白质,在平滑肌中主要由Cx43组成。缝隙连接蛋白的正常表达和分布是维持器官、组织协调有序活动的重要基础。有研究报道,心律失常、高血压、脑血管痉挛等疾病都与缝隙连接的表达与功能改变等密切相关[7]。Zhang等[8]

表1 AGA对不同电刺激致输尿管段收缩力的影响(g, $n=10$, $\bar{x}\pm s$)

电刺激强度(mV)	空白Krebs液		AGA(mol/L)+Krebs液					
			10^{-8}		10^{-7}		10^{-6}	
	实验组	对照组	实验组	对照组	实验组	对照组	实验组	对照组
0.4	–	–	–	–	–	–	–	–
0.5	0.24±0.07	–	–	–	–	–	–	–
0.6	0.54±0.11	–	–	–	–	–	–	–
0.7	0.75±0.32[a]	0.63±0.14	0.31±0.16	–	–	–	–	–
0.8	0.92±0.39[a]	0.81±0.47	0.41±0.24	0.39±0.26	0.28±0.13	0.27±0.16	–	–
0.9	1.09±0.68	1.07±0.52	0.68±0.37	0.65±0.21	0.37±0.21	0.36±0.22	0.18±0.08	0.16±0.11
1.0	1.07±0.41	1.02±0.36	0.71±0.40	0.68±0.31	0.52±0.17	0.49±0.28	0.27±0.19	0.26±0.13

a: $P<0.05$,与对照组比较

发现心肌梗死后心肌缝隙连接蛋白 Cx43 表达明显上调,认为这可能是由于梗死后组织缺血缺氧所引起的继发性反应,由于缝隙连接增加而引起的心电信号异常传导可能与该组患者易发生房颤有关。Burdyga 等[9]研究显示,妊娠大鼠子宫平滑肌细胞间缝隙连接通讯增强,细胞内钙离子浓度有明显升高,而收缩活动也随之增多,认为这可能与妊娠期间体内激素变化引起缝隙连接表达及功能改变有关。

本研究通过透射电镜和免疫组化、免疫蛋白印迹法检测到输尿管平滑肌之间有较多缝隙连接蛋白 Cx43 存在,实验组输尿管平滑肌中 Cx43 表达较对照组增加。但是缝隙连接增多在输尿管痉挛中作用究竟如何,仍需进一步研究。

3.3 Cx43 在输尿管痉挛的发生发展中起着重要作用

Garcia-Huidobro 等[10]研究显示,利用缝隙连接阻断剂可以抑制 KCl 诱导的血管环的收缩幅度(间缝隙连接介导 TSMCs 联合收缩),但是对其收缩频率(ASMCs)和基础张力(单个 TSMC)无明显影响。这充分提示,平滑肌细胞之间是通过缝隙连接来完成整体的协调收缩的。研究表明,正常情况下基底动脉平滑肌层存在缝隙连接蛋白 Cx43 mRNA 表达,但无蛋白表达或表达低下,蛛网膜下腔出血可诱使基底动脉发生痉挛,其平滑肌层中 Cx43 mRNA 和蛋白表达均显著增加并成时间依赖性,这表明缝隙连接参与蛛网膜下腔出血后脑血管痉挛,其中缝隙连接蛋白 Cx43 的异常表达可能在脑血管痉挛发生过程中具有非常重要的病理意义[11]。

本研究通过体外肌条收缩实验对缝隙连接在输尿管收缩中的作用进行了观察。结果显示,实验组输尿管肌条在较小电刺激强度下即可诱发出有效收缩,在相同电刺激强度下,这种收缩的强度和幅度均较对照组明显。这与临床中肾绞痛时输尿管痉挛的表现一致,说明梗阻后输尿管平滑肌收缩兴奋性和收缩强度增加。而在加入缝隙连接阻滞剂后,上述输尿管收缩被抑制,其中实验组下降更为明显。这充分说明实验组输尿管肌条收缩性增加是由于缝隙连接的数量及功能的增多所引起的。

我们认为,对于在以缝隙连接为平滑肌细胞间主要的兴奋传导方式的输尿管来说,肾绞痛的发生机制是多层面的:①上尿路急性梗阻时,压力感受器启动内脏神经反射,输尿管兴奋性增高,收缩力增强,平滑肌细胞间缝隙连接兴奋传递加强、加快,促使输尿管收缩;②梗阻后由于缺血、缺氧导致大量管腔内外的前列腺素 E_2、血栓素 A_2 等致痉物质生成,产生致痉信号并向周围平滑肌传递,刺激平滑肌细胞启动收缩机制,促进输尿管收缩;③同时,输尿管梗阻后神经反射递质以及炎性介质增加可能对缝隙连接蛋白表达产生上调作用,增多的缝隙连接则进一步延长了致痉信号在时间和空间上对平滑肌细胞的刺激,导致输尿管持续收缩,最终引起输尿管痉挛,而输尿管平滑肌细胞间缝隙连接在其中起着重要作用[12-13]。如果能打断这种由缝隙连接介导的致痉信号的传递,将可有效解除输尿管痉挛而达到治疗肾绞痛的目的,针对输尿管缝隙连接进行深入研究可望为肾绞痛的治疗提供新的选择。

参考文献:

[1] Cervellin G, Comelli I, Comelli D, *et al*. Mean temperature and humidity variations, along with patient age, predict the number of visits for renal colic in a large urban Emergency Department: results of a 9-year survey[J]. J Epidemiol Glob Health, 2012, 2(1): 31-38.

[2] Floyd R V, Borisova L, Bakran A, *et al*. Morphology, Calcium signaling and mechanical activity in human ureter[J]. J Urol, 2008, 180(1): 398-405.

[3] Giamberardino M A, Affaitati G, Valente R, *et al*. Changes in visceral pain reactivity as a function of estrous cycle in female rats with artificial ureteral calculosis[J]. Brain Res, 1997, 774(1/2): 234-238.

[4] Alkafafy M, Rashed R, Helal A. Immunohistochemical studies on the bovine lactating mammary gland (Bos taurus)[J]. Acta Histochem, 2012, 114(2): 87-93.

[5] Hollingsworth J M, Norton E C, Kaufman S R, *et al*. Medical expulsive therapy versus early endoscopic stone removal for acute renal colic: an instrumental variable analysis[J]. J Urol, 2013, 190(3): 882-887.

[6] Cevik E, Cinar O, Salman N, *et al*. Comparing the efficacy of intravenous tenoxicam, lornoxicam, and dexketoprofen trometamol for the treatment of renal colic[J]. Am J Emerg Med, 2012, 30(8): 1486-1490.

[7] Herv J C, Derangeon M, Sarrouilhe D, *et al*. Gap junctional channels are parts of multiprotein complexes[J]. Biochim Biophys Acta, 2012, 1818(8): 1844-1865.

[8] Zhang Y, Kanter E M, Yamada K A. Remodeling of cardiac fibroblasts following myocardial infarction results in increased gap junction intercellular communication[J]. Cardiovasc Pathol, 2010, 19(6): e233-e240.

[9] Burdyga T, Borisova L, Burdyga A T, *et al*. Temporal and spatial variations in spontaneous Ca events and mechanical activity in pregnant rat myometrium[J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2009, 144(Suppl 1): S25-S32.

[10] Garcia-Huidobro D N, Garcia-Huidobro M T, Huidobro-Toro J P. Vasomotion in human umbilical and placental veins: role of gap junctions and intracellular Calcium reservoirs in their synchronous propagation[J]. Placenta, 2007, 28(4): 328-338.

[11] Burnier L, Fontana P, Angelillo-Scherrer A, *et al*. Intercellular communication in atherosclerosis[J]. Physiology (Bethesda), 2009, 24(1): 36-44.

[12] Snir N, Moskovitz B, Nativ O, *et al*. Papaverine hydrochloride for the treatment of renal colic: an old drug revisited. A prospective, randomized study[J]. J Urol, 2008, 179(4): 1411-1414.

[13] Phillips E, Hinck B, Pedro R, *et al*. Celecoxib in the management of acute renal colic: a randomized controlled clinical trial[J]. Urology, 2009, 74(5): 994-999.

(**收稿**:2013-10-30;**修回**:2014-01-14)

(编辑 龙 亮)