DOI: 10.16016/j.1000-5404.201501226

论著

HCN1通道基因敲除下调小鼠膀胱Cajal间质细胞中BK通道的表达及功能

孙碧韶[1],刘 骞[2],朱景振[1],龙 洲[2],冯观贵[2],李龙坤[2],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** 观察小鼠HCN1通道基因敲除对其膀胱Cajal间质细胞(interstitial cells of Cajal, ICCs)中BK通道的表达和功能的影响,探讨这种影响对膀胱兴奋性调控的意义。**方法** 健康清洁成年的野生型C57BL/6J小鼠和HCN1通道基因敲除的C57BL/6J小鼠各48只(雌雄各半)分别记为正常组和敲基因组,反转录PCR(RT-PCR)、荧光定量PCR(Q-PCR)、Western blot和免疫荧光双标检测其膀胱ICCs中BK通道各亚基的表达变化,离体逼尿肌肌条实验检测加入BK通道阻滞剂IBTX前后肌条收缩的变化,激光共聚焦显微镜下检测分别加入BK通道激动剂NS1619、阻滞剂IBTX前后小鼠膀胱ICCs内钙荧光的变化。**结果** Q-PCR显示敲基因组小鼠膀胱中BK通道α、β1、β2、β3、β4各亚基表达均降低($P<0.01$);Western blot显示敲基因组小鼠膀胱中BK通道α、β1、β2、β3、β4亚基表达均降低(其中α、β3、β4:$P<0.01$;β1、β2:$P<0.05$);免疫荧光双标显示敲基因组小鼠膀胱ICCs中BK通道α亚基表达降低($P<0.01$);离体逼尿肌肌条实验显示加入IBTX后敲基因组和正常组肌条收缩幅度均变大($P<0.01$,$P<0.05$),且敲基因组肌条收缩幅度的变化值小于正常组($P<0.05$);激光共聚焦显微镜下可见加入NS1619后两组ICCs内钙荧光均降低($P<0.05$)、加入IBTX后两组ICCs内钙荧光均增强($P<0.01$),且不论加入激动剂或阻滞剂,敲基因组加药前后ICCs内钙荧光的变化值均小于正常组($P<0.01$)。**结论** 小鼠HCN1通道基因敲除下调了其膀胱ICCs中BK通道的表达及功能,这种下调可能是对HCN1通道基因敲除后膀胱收缩减弱的一种代偿。

[关键词] ICCs;超极化激活环核苷酸门控阳离子通道;大电导钙激活钾通道;小鼠,基因敲除;膀胱
[中图法分类号] R-334;R334.3;R394.2 [文献标志码] A

Knockout of HCN1 channels down-regulates expression and function of BK channels in interstitial cells of Cajal in mouse urinary bladder

Sun Bishao[1], Liu Qian[2], Zhu Jingzhen[1], Long Zhou[2], Feng Guangui[2], Li Longkun[2], Song Bo[1] ([1]Institute of Urology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038; [2]Department of Urology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effects of the knockout of hyper-polarization-activated, cyclic nucleotide-gated cation channels (HCN1 channels) on the expression and function of large-conductance calcium-activated potassium channels (BK channels) in interstitial cells of Cajal (ICCs) in the mouse bladder, and investigate the significance of these effects to the excitatory regulation of bladder. **Methods** Forty-eight healthy clean adult wild-type C57BL/6J mice (HCN1 WT) and 48 HCN1 channels knockout C57BL/6J mice (HCN1 KO) were employed in this study. The expression of BK channels and subunits in ICCs at mRNA and protein levels was detected by RT-PCR, Q-PCR, Western blotting and immunofluorescence staining. The inhibitor of BK channel, IBTX, was added in the isolated detrusor muscle strips to observe the effect on muscle contraction. While, intracellular calcium concentration in ICCs were measured with laser confocal microscopy after the treatment of IBTX and the agonist of BK channels, NS1619,

[基金项目] 国家自然科学基金重点项目(81230017)
[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.20150529.1628.001.html(2015-05-29)

respectively. **Results** Q-PCR and Western blot results indicated that the expression of 5 BK channels' subunits, α, β1, β2, β3 and β4 were significantly lower at mRNA level ($P<0.01$) and at protein level (α, β3, β4: $P<0.01$; β1, β2: $P<0.05$) in the bladder of HCN1 KO mice than HCN1 WT mice. Double-labeling immunofluorescence staining revealed that the expression of α subunit was also lower in ICCs of HCN1 KO mice than HCN1 WT mice ($P<0.05$). IBTX increased the amplitudes of detrusor contraction in the detrusor strip of HCN1 KO and WT mice ($P<0.01$, $P<0.05$), but the KO mice detrusor had a lower sensitivity to IBTX ($P<0.05$). NS1619 decreased while IBTX increased the intracellular calcium concentration of ICCs in both WT and KO mice ($P<0.05$, $P<0.01$), but the actions of NS1619 and IBTX on KO mice were lower than WT mice ($P<0.01$). **Conclusion** Knockout of HCN1 channels decreases the expression and function of BK channels in ICCs, and it might be a compensational mechanism of the decreased contractility induced by the knockout of HCN1 channels.

[**Key words**] interstitial cells of Cajal; hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated cation channels; large-conductance calcium-activated potassium channels; mice, knockout; urinary bladder

Supported by the Key Program of National Natural Science Foundation of China (81230017). Corresponding author: Song Bo, E-mail: Songb-mr@vip.sina.com

膀胱逼尿肌兴奋性异常是临床上常见的膀胱功能障碍,是多种膀胱病变如膀胱过度活动症(overactive bladder, OAB)、糖尿病性膀胱、神经源性膀胱等的共同发病机制之一[1-2]。对于膀胱兴奋性调控的研究理论主要有神经源性和肌源性两大学说,膀胱中具有起搏功能的 Cajal 间质细胞(interstitial cells of Cajal, ICCs)的发现使得肌源性学说日益受到重视[3-4]。肌源性学说中各种离子通道对膀胱功能的调控尤为引人注目[5]。超极化激活环核苷酸门控阳离子通道(hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels)即 HCN 通道,有 1~4 四个亚型,在心脏和神经元中引发起搏电流,调节心脏和神经元的节律[6]。研究表明,大鼠和人类膀胱 ICCs 中 HCN1~4 亚型都有表达,且鼠类以 HCN1 为主,HCN 通道在膀胱中很可能担任着兴奋起搏的角色[7-8]。ICCs 的兴奋起搏信号传导至膀胱平滑肌进而引起平滑肌的兴奋,Ca^{2+} 相关通道的参与是这其中的重要一环。大电导钙激活钾通道(large-conductance Calcium-activated potassium channels)即 BK 通道,由 α、β(1~4)亚基构成,广泛表达于神经组织、腺体及平滑肌中,能被 NS1619、IBTX 特异性地激活和拮抗[9]。在平滑肌,质膜去极化及细胞内 Ca^{2+} 浓度升高都可以将其激活,引发钾离子外流,导致膜电位的复极化和超级化,这是对细胞外 Ca^{2+} 内流的一种反馈[10]。研究表明,膀胱平滑肌和 ICCs 中都有 BK 通道的表达,BK 通道参与了膀胱收缩功能的调控,其下调或上调可导致 OAB 或膀胱功能障碍等疾病[11]。HCN 通道和 BK 通道在膀胱 ICCs 兴奋性的调控中都发挥了重要作用,二者存在着可能的顺承关系,且都与 Ca^{2+} 这一重要的第二信使密切相关,但关于二者相互影响的研究尚少见报道。本研究旨在研究小鼠 HCN1 通道基因敲除对其膀胱 ICCs 中 BK 通道表达和功能的影响,初步探讨这种影响对膀胱兴奋性调控的意义。

1 材料与方法

1.1 动物来源

2 月龄健康清洁的野生型 C57BL/6J 小鼠(体质量 16~20 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,取未经任何特殊处理的 48 只(雌雄各半)作为对照组,记为正常组。健康清洁的 HCN1 通道基因敲除的 C57BL/6J 小鼠(经删选鉴定为纯合子)购自美国杰克逊实验室,雌雄交配传代,幼鼠长至 2 月龄(体质量 16~20 g)时投入使用,取 48 只(雌雄各半)作为实验组,记为敲基因组。取用动物时雌雄随机分配。

1.2 主要试剂和仪器

TRIzol(总 RNA 抽提试剂)、Tubulin 抗体等购自碧云天生物技术研究所。RT-PCR 反转录试剂盒购自日本 TaKaRa 公司。Q-PCR 荧光染料 SYBR GREEN 购自日本 TOYOBO 公司。Anti-KCNMA1、Anti-KCNMB 1~4 等一抗购自英国 Abcam 公司。Anti-c-kit 一抗(ICCs 特异性标记抗体)购自美国 Santa Cruz 公司。单腔器官浴槽系统、一维位移微调器、5 g 量程 JZJ01 型肌肉张力换能器、RM-6240C 型多通道生理信号采集处理系统购自成都仪器厂。木瓜蛋白酶、胰酶抑制剂、二硫苏糖醇(DTT)、Ⅱ型胶原蛋白酶购自美国 Sigma 公司。胎牛血清(FBS)、DMEM/F-12 培养基购自美国 Gibco 公司。钙离子荧光探针 Fluo4-AM 购自日本同仁化学研究所。

1.3 反转录PCR(RT-PCR)和荧光定量PCR(Q-PCR)

断颈处死小鼠,常规消毒后取膀胱,PBS快速清洗后用液氮冷冻研磨。所得组织粉末置于TRIzol中,按TRIzol说明书方法提取膀胱组织总RNA。Thermo紫外分光光度计测浓度及纯度后,取浓度适宜、纯度合格的RNA按TaKaRa试剂盒方法将其反转录成cDNAs。取cDNAs为模板,按TaKaRa试剂盒SYBR GREEN荧光定量PCR方法配置反应体系,用Step One Plus实时荧光定量PCR仪采用相对定量法做荧光定量PCR检测敲基因组小鼠膀胱中BK通道各亚基表达有何变化,内参为β-actin。各亚基基因表达以相对表达量(自身表达量/内参表达量)来表示。PCR引物购自上海生工公司,序列及产物长度见表1。

表1 BK通道各亚基基因及内参基因的引物序列与产物长度

基因	引物序列	产物长度(bp)
KCNMA1	上游:5′-GCCCTGTTAGATGGTCCCTTTG-3′	110
	下游:5′-AGCCGGTAAATTCCAAAACAAAGC-3′	
KCNMB1	上游:5′-CCCCTGGGCTTCTGATCTAATG-3′	257
	下游:5′-GGGGCAGAGCAGGAAAATAGAC-3′	
KCNMB2	上游:5′-AGCCAGCAACTTTTCTTTCATCAC-3′	177
	下游:5′-CATGCCTACCAACACCCAGTC-3′	
KCNMB3	上游:5′-CGACGACGAGGCCATCAGG-3′	156
	下游:5′-AAGGGGCCATCGGGACTGTAG-3′	
KCNMB4	上游:5′-GGCGTTTGTGGTGGGTGTTCTC-3′	202
	下游:5′-CGGCCCCTTCCATCTCCTG-3′	
β-actin	上游:5′-GTCCCTCACCCTCCCAAAAG-3′	266
	下游:5′-GCTGCCTCAACACCTCAACCC-3′	

1.4 Western blot实验

按前述方法处死小鼠取膀胱,液氮研磨后将组织粉末置于预冷的RIPA + PMSF混合液中,冰浴裂解30 min,4 ℃下12 000 × *g* 离心15 min后小心吸取上清液即膀胱总蛋白。立即用BCA法测定浓度,按体积比4∶1加入SDS-PAGE蛋白上样缓冲液后于97 ℃恒温金属浴仪上加热7 min后取出,-80 ℃分装保存待用。使用SDS-PAGE凝胶电泳分离蛋白(恒压:浓缩胶80 V,40 min,分离胶120 V,50~70 min),每泳道上样量为50 μg总蛋白,电泳结束后250 mA恒流转膜70 min。5% BSA摇床室温封闭2 h,按蛋白Marker指示位置切取目的条带,TBST漂洗后,anti-KCNMA1(1∶1 000),anti-KCNMB1(1∶500),anti-KCNMB2(1∶1 000),anti-KCNMB3(1∶1 000),anti-KCNMB4(1∶1 000),Tubulin(1∶1 000)等一抗抗体4 ℃摇床孵育过夜。TBST漂洗3次,每次10 min,辣根酶标记山羊抗兔、山羊抗小鼠IgG抗体室温孵育2 h,重复TBST漂洗3次,ECL化学发光液显影,凝胶成像系统曝光,保存图像。结果用Quantity One软件处理,各亚基蛋白表达以相对灰度值(目的条带灰度值/内参条带灰度值)表示。

1.5 膀胱ICCs原代细胞分离

以D-Hanks液为溶剂,配置分离酶Ⅰ:木瓜蛋白酶(0.5 mg/mL)、Ⅱ型胶原蛋白酶(0.5 mg/mL)、DTT(1 mg/mL)、BSA(1 mg/mL)、胰酶抑制剂(1 mg/mL)和分离酶Ⅱ:Ⅱ型胶原蛋白酶(1 mg/mL)、DTT(1 mg/mL)、BSA(1 mg/mL)。按前述方法处死小鼠取膀胱,立即置于预冷的D-Hanks液中,切开膀胱,小心剔除浆膜和粘膜层,在分离酶Ⅰ中将组织剪成肉糜样,37 ℃消化5 min,1 000 × *g* 离心1.5 min,去除上清液,加入分离酶Ⅱ在37 ℃下继续消化,同时取液滴显微镜下观察。待镜下观察到游离细胞后即以1 000 × *g* 离心3 min终止消化。弃上清后加入适量含10% FBS的DMEM/F-12培养基,吹打30次后用200目细胞筛过滤后即得到急性分离细胞悬液。ICCs镜下呈长梭形,有较多细小侧枝突起。

1.6 免疫荧光双标实验

将1.5中所得细胞悬液转移至NEST玻底培养皿,加入适量含10% FBS的DMEM/F-12培养基,在37 ℃、95% O_2 +5% CO_2 的孵箱中培养使细胞贴壁。然后将贴壁细胞用PBS液漂洗3次,每次5 min(下同),用4%多聚甲醛液固定20 min。PBS液漂洗3次,1% BSA在室温下封闭30 min,重复PBS液漂洗3次。加入Anti-c-kit和Anti-KCNMA1一抗,放入湿盒,4 ℃过夜。PBS液漂洗3次后避光孵育荧光素标记的二抗,室温下孵育2 h。随后孵育DAPI(染核)10 min,PBS液漂洗3次后滴加抗荧光淬灭封片剂。然后在TCS SP5激光共聚焦显微镜下镜检,所有ICCs均使用同等放大倍数和激发光条件。用血清代替一抗孵育作为阴性对照。

1.7 离体逼尿肌肌条实验

封闭单腔器官浴槽系统流出口,加入15 mL新鲜配置的Krebs液,通入恒流95% O_2 +5% CO_2 混合气,连接恒温水浴箱,设定温度37 ℃预热5 min。按前述方法处死小鼠取膀胱,置于4 ℃ Krebs液中,小心剔除黏膜层,沿纵轴将组织切成2 mm × 2 mm × 6 mm的肌条,将肌条一端固定于浴槽系统底部,一端用丝线连接于装有一维位移微调器的肌肉张力换能器,使肌条处于完全松弛状态并垂直浸没在Krebs液中。连接多通道生理信号采集处理系统,选择张力模式,调节灵敏度为0.75 g,扫描速度10 s/d。静置平衡10 min后,调节一维位移微调器缓慢牵拉肌条,使其张力升至0.3 g,待肌条出现自发性收缩且平稳,观察记录时间-张力变化曲线,10 min后加入BK通道阻滞剂IBTX(终浓度100 nmol/L),观察变化并记录10 min,Krebs液洗脱两

遍,继续观察记录10 min。取记录最平稳的2 min进行检测,数据用多通道生理信号采集处理系统软件处理。

1.8 激光共聚焦显微镜下检测钙荧光

将1.5中所得细胞悬液转移至NEST玻底培养皿,加入适量含10% FBS的DMEM/F-12培养基,在37 ℃、95% O_2 +5% CO_2 的孵箱中培养使细胞贴壁。然后用Hanks液漂洗2次,加入1 μmol/L的fluo-4AM溶解液200 μL覆盖皿底避光孵育30 min。用Hanks液漂洗后继续滴加Hanks液200 μL覆盖皿底,在激光共聚焦显微镜下观察ICCs内钙荧光,激发光波长为456 nm。运用Leica TIRF动态影像收集系统以12帧/min对ICCs内钙荧光进行实时影像采集。分别加入BK通道激动剂NS1619(终浓度30 μmol/L)和阻滞剂IBTX(终浓度200 nmol/L)后观察记录小鼠膀胱ICCs内钙荧光的变化,比较敲基因组和正常组小鼠膀胱ICCs内钙荧光的变化对NS1619和IBTX的敏感程度,以此评价2组小鼠ICCs中BK通道的功能变化。数据采用相对荧光强度进行记录,相对荧光强度(RFI) = F1/F0,F1 = 每记录时点的荧光强度,F0 = 基础荧光强度即加药前的平均荧光强度。然后绘制F1/F0对时间的变化曲线。

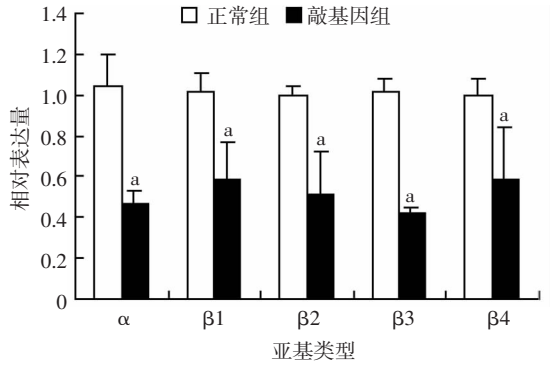
1.9 统计学分析

所得数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 19.0软件统计,组间计量资料比较进行 t 检验。

2 结果

2.1 Q-PCR检测BK通道各亚基的表达变化

经RT-PCR、Q-PCR检测发现,敲基因组小鼠膀胱内BK通道各亚基的相对表达量均低于正常组(图1)。由此可见,在mRNA水平,敲基因组小鼠膀胱中BK通道各亚基的表达降低,提示HCN1通道基因敲除下调了膀胱中BK通道的基因表达。

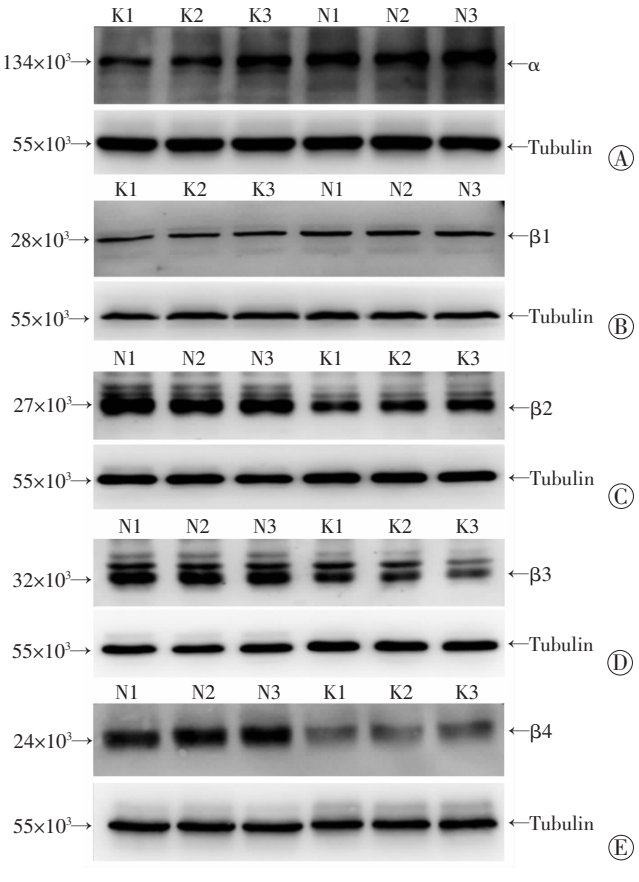


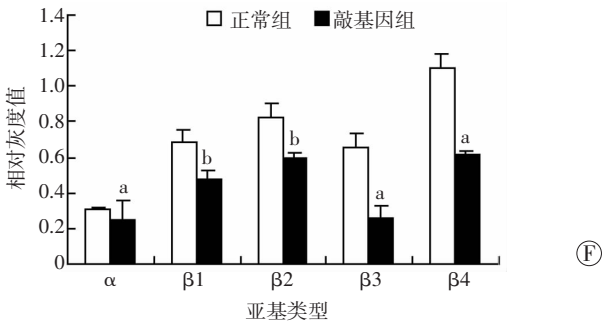
a:$P<0.01$,与正常组比较

图1 Q-PCR检测敲基因组和正常组膀胱中BK通道各亚基的表达变化

2.2 Western blot检测BK通道各亚基的表达变化

Western blot重复检测多次,统计蛋白表达相对灰度值,发现敲基因组(K)小鼠膀胱总蛋白中BK通道各亚基的相对灰度值均低于正常组(N)(图2)。由此可见,在蛋白水平,敲基因组小鼠膀胱中BK通道各亚基的表达降低,提示HCN1通道基因敲除下调了膀胱中BK通道的基因表达。





A:敲基因组和正常组α亚基表达对比;B:敲基因组和正常组β1亚基表达对比;C:敲基因组和正常组β2亚基表达对比;D:敲基因组和正常组β3亚基表达对比;E:敲基因组和正常组β4亚基表达对比;F:各亚基相对灰度值统计;a:$P<0.01$,b:$P<0.05$,与正常组比较

图2 Western blot检测敲基因组和正常组膀胱中BK通道各亚基的表达变化

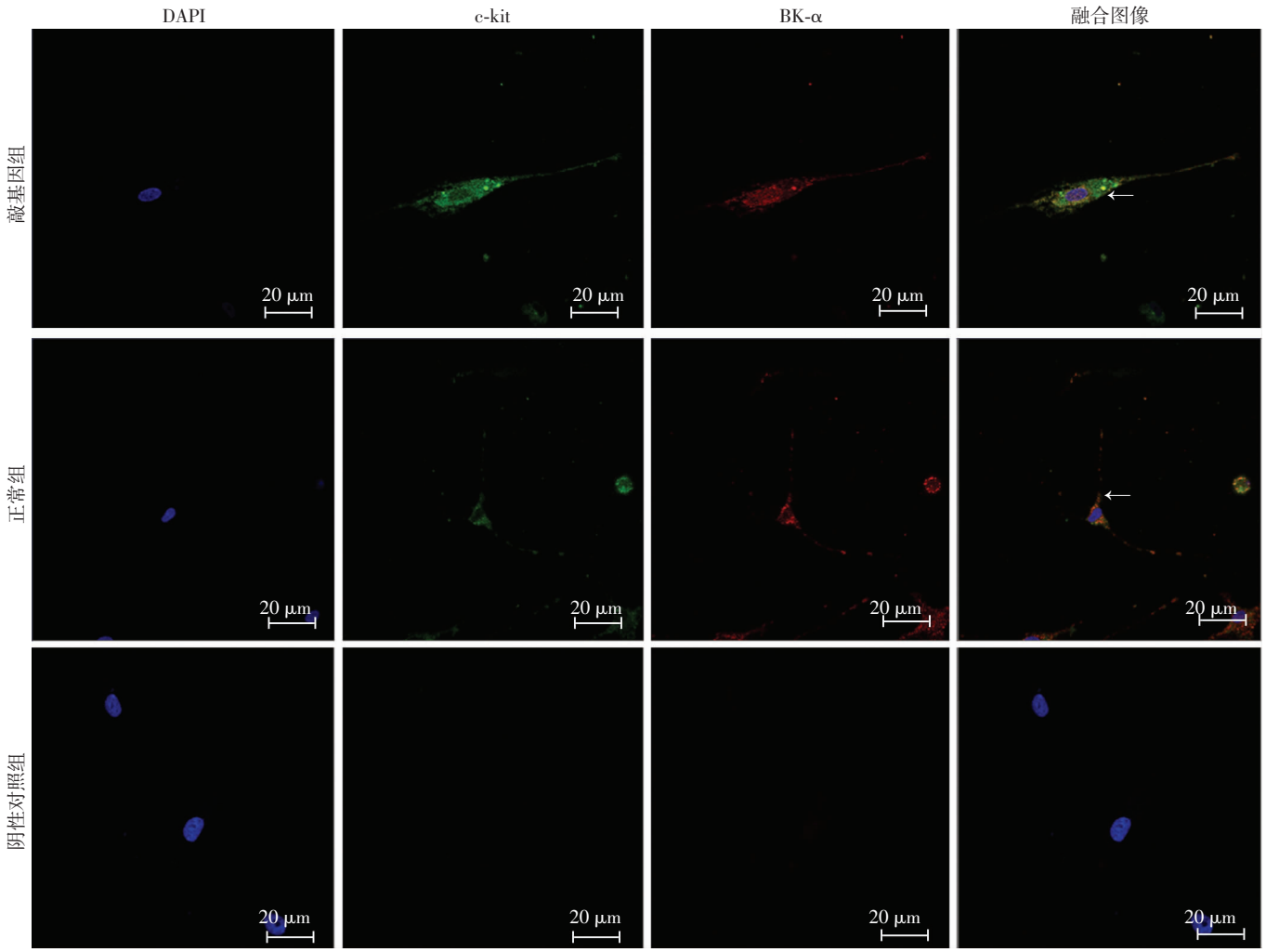


图 3　免疫荧光双标实验检测敲基因组和正常组小鼠膀胱 ICCs 中 BK-α 亚基表达变化

2.3　免疫荧光双标实验检测 ICCs 中 BK 通道 α 亚基表达变化

镜下可见 c-kit 阳性的 ICCs，核大，染色质分散，多毛刺样突起。比较小鼠膀胱 ICCs 中 α 亚基荧光密度敲基因组（570.40 ± 41.02）较正常组（1 018.00 ± 64.44）显著降低（$P < 0.01$，图 3）。说明敲基因组 ICCs 内 BK 通道 α 亚基表达降低，提示 HCN1 通道基因敲除下调了膀胱 ICCs 中 BK 通道的基因表达。

2.4　离体逼尿肌肌条实验检测 BK 通道功能变化

离体逼尿肌肌条实验检测加入 BK 通道阻滞剂 IBTX 前后肌条收缩的变化（图 4）。加入 IBTX 后，敲基因组肌条收缩幅度由（0.083 ± 0.034）增加到（0.091 ± 0.037）（$P < 0.01$）；正常组肌条收缩幅度由（0.130 ± 0.020）增加到（0.151 ± 0.031）（$P < 0.05$）。进一步比较加药前后肌条收缩幅度的变化值，发现敲基因组（0.008 ± 0.005）显著低于正常组（0.021 ± 0.014）（$P < 0.05$）。由此可见敲基因组小鼠肌条对 IBTX 的反应低于正常组，提示敲基因小鼠膀胱中 BK 通道的功能降低。

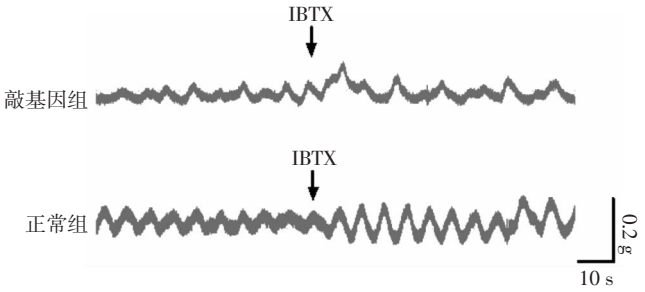
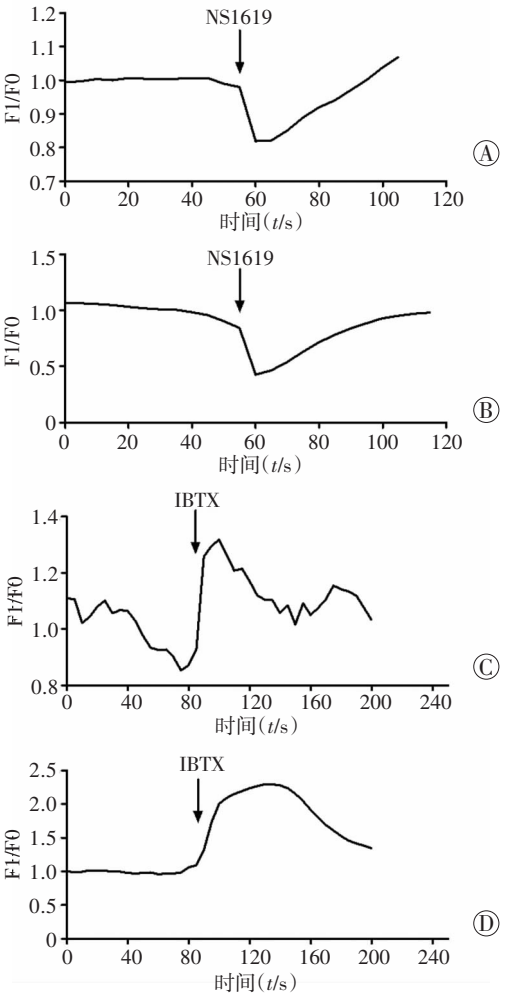


图 4　离体逼尿肌肌条实验加入 IBTX 前后肌条收缩波形变化

2.5　激光共聚焦显微镜下检测加入 BK 通道激动剂或阻滞剂前后 ICCs 内钙荧光变化

激光共聚焦镜检结果显示：加入 NS1619 后，敲基因组［（123.38 ± 1.00）*vs*（114.98 ± 10.86），$P < 0.05$］和正常组［（133.37 ± 8.97）*vs*（101.55 ± 10.86，$P < 0.01$］ICCs 内钙荧光均降低，比较钙荧光的变化值（加

药前－加药后),敲基因组(13.88±7.35)显著低于正常组(49.31±21.12)($P<0.01$)。加入IBTX后,敲基因组[(97.28±8.32)*vs*(110.85±8.22),$P<0.01$]和正常组[(75.20±2.48)*vs*(142.20±26.56),$P<0.01$] ICCs内钙荧光均增高,比较钙荧光的变化值(加药后－加药前),敲基因组(24.10±5.07)显著低于正常组(72.35±24.94)($P<0.01$)。将结果绘制成F1/F0对时间的变化曲线如图5。不论加入激动剂或阻滞剂,敲基因组加药前后ICCs内钙荧光的变化程度均小于正常组,说明敲基因组膀胱ICCs内钙荧光的变化对BK通道激动剂、阻滞剂的敏感程度均低于正常组。提示敲基因小鼠膀胱ICCs中BK通道的功能降低。



A:敲基因组加入NS1619前后ICCs内钙荧光的F1/F0变化曲线;B:正常组加入NS1619前后ICCs内钙荧光的F1/F0变化曲线;C:敲基因组加入IBTX前后ICCs内钙荧光的F1/F0变化曲线;D:正常组加入IBTX前后ICCs内钙荧光的F1/F0变化曲线

图5 激光共聚焦镜检加入NS1619或IBTX前后ICCs内钙荧光的变化

3 讨论

膀胱ICCs是类似于胃肠道ICCs的间质细胞,藉以其特异性标记物c-kit、波形蛋白等区分膀胱ICCs和膀胱平滑肌细胞。其作用可能有:膀胱收缩活动的起搏,神经、牵张刺激等信号的整合及传递等。ICCs与膀胱平滑肌细胞紧密相联,两者之间存在大量的缝隙连接,这可能是其传导兴奋的结构基础[12]。

以往对膀胱中离子通道的研究大都集中于平滑肌细胞,自ICCs发现以来,研究者相继在ICCs上发现了多种离子通道的存在及它们对ICCs兴奋性的调控。特别是ICCs中HCN通道的发现使得其作为兴奋起搏细胞的理论有了强大的说服力[7-8]。HCN通道是Pacemaker细胞的电生理结构基础:它在超极化激活,使Na^+、K^+内流引发膜电位的自动去极化,导致Ca^{2+}内流,引发动作电位。膜电位复极化后,它调节细胞膜电位向阈电位靠近,对下一次动作电位的触发起着正向作用[6]。HCN通道的这种自动除极功能决定了它极有可能是ICCs作为起搏细胞的核心。在小鼠体内敲除其膀胱主要表达的亚型-HCN1后,将对膀胱收缩产生一系列影响。肌条实验证实,小鼠HCN1通道基因敲除后,其肌条收缩能力减弱。这可能是兴奋起搏的减少所导致的。而在逼尿肌过度活动的模型中,HCN通道的表达升高[13]。这些都说明HCN通道对膀胱兴奋起搏起着重要作用。

BK通道在哺乳动物组织中广泛表达,其α亚基是其离子孔道的形成亚基,而β1~4亚基则主要负责对其功能的调控。BK通道具有电压敏感和Ca^{2+}敏感双重特性,质膜去极化及细胞内Ca^{2+}浓度升高都可以将其激活,引发钾离子外流,导致膜电位的复极化和超级化,是对细胞外Ca^{2+}内流的一种反馈[9-10]。在膀胱,BK通道可以通过反馈性抑制平滑肌细胞的兴奋来调节膀胱收缩功能[11]。

本研究发现小鼠HCN1通道基因敲除下调了其膀胱ICCs中BK通道的表达和功能。HCN1通道基因敲除后可能导致了膀胱兴奋起搏的不足,导致膀胱收缩性的减弱。而下调BK通道的表达及其功能,将减少BK通道对ICCs兴奋性的负反馈,维持其兴奋性向正向发展。这对于维持敲基因小鼠膀胱的正常生理功能是有利的。这种下调可以看做是对HCN1通道基因敲除后膀胱收缩减弱的一种代偿。

研究表明,膀胱中只有ICCs上表达HCN通道[7],而BK通道则在平滑肌细胞和ICCs上都有表达。

ICCs上的HCN1通道基因敲除除了下调其自身BK通道的表达及功能外,还可能将这种影响传递到了膀胱中的平滑肌细胞。ICCs作为起搏细胞,其兴奋性传导有赖于其细胞突起与平滑肌细胞间的缝隙连接。在结构上,ICCs与平滑肌细胞组成了一个关联紧密的网。这可能是这种影响传递的生理结构基础。而关于小鼠HCN1通道基因敲除下调其膀胱ICCs中BK通道的表达和功能的具体机制还有待于进一步研究,可能的机制包括通道蛋白结构的交联、共同的通道调控通路如PKC蛋白激酶信号通路等的相互影响[14-15]。HCN1通道基因敲除对膀胱ICCs中BK通道的表达及功能的下调显示了HCN通道作为ICCs起搏功能机制的核心地位,为膀胱兴奋性调控的研究提供了新内容。

参考文献:

[1] Bragg R, Hebel D, Vouri S M, *et al*. Mirabegron: a Beta-3 agonist for overactive bladder [J]. Consult Pharm, 2014, 29(12): 823-837.

[2] Arrellano-Valdez F, Urrutia-Osorio M, Arroyo C, *et al*. A comprehensive review of urologic complications in patients with diabetes [J]. Springerplus, 2014, 3: 549.

[3] Sakakibara R, Tateno F, Kishi M, *et al*. Neurology and the bladder: how to assess and manage neurogenic bladder dysfunction, with particular references to the neural control of micturition [J]. Brain Nerve, 2014, 66(5): 527-537.

[4] Juszczak K, Maciukiewicz P, Drewa T, *et al*. Cajal-like interstitial cells as a novel target in detrusor overactivity treatment: true or myth? [J]. Cent European J Urol, 2014, 66(4): 413-417.

[5] Brading A F, Brain K L. Ion channel modulators and urinary tract function [J]. Handb Exp Pharmacol, 2011(202): 375-393.

[6] Herrmann S, Schnorr S, Ludwig A. HCN channels--modulators of cardiac and neuronal excitability[J]. Int J Mol Sci, 2015, 16(1): 1429-1447.

[7] He P, Deng J, Zhong X, *et al*. Identification of a hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel and its subtypes in the urinary bladder of the rat [J]. Urology, 2012, 79(6): 1411. e7-1411. e13.

[8] Xue L, Li Y, Han X, *et al*. Investigation of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels in interstitial cells of Cajal of human bladder[J]. Urology, 2012, 80(1): 224. e13-224. e18.

[9] Torres Y P, Granados S T, Latorre R. Pharmacological consequences of the coexpression of BK channel alpha and auxiliary beta subunits [J]. Front Physiol, 2014, 5: 383.

[10] Rothberg B S. The BK channel: a vital link between cellular calcium and electrical signaling[J]. Protein Cell, 2012, 3(12): 883-892.

[11] Petkov G V. Central role of the BK channel in urinary bladder smooth muscle physiology and pathophysiology [J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2014, 307(6): R571-R584.

[12] Rusu M C, Folescu R, Manoiu V S, *et al*. Suburothelial interstitial cells [J]. Cells Tissues Organs, 2014, 199(1): 59-72.

[13] Deng T, Zhang Q, Wang Q, *et al*. Changes in hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel expression and activity in bladder interstitial cells of Cajal from rats with detrusor overactivity [J]. Int Urogynecol J, 2015, [Epub ahead of print].

[14] Reetz O, Strauss U. Protein kinase C activation inhibits rat and human hyperpolarization activated cyclic nucleotide gated channel (HCN)1——mediated current in mammalian cells [J]. Cell Physiol Biochem, 2013, 31(4/5): 532-541.

[15] Hristov K L, Smith A C, Parajuli S P, *et al*. Large-conductance voltage- and Ca^{2+}-activated K^+ channel regulation by protein kinase C in guinea pig urinary bladder smooth muscle [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2014, 306(5): C460-C470.

(**收稿**:2015-01-25;**修回**:2015-03-25)

(编辑 栾 嘉)