doi:10.11659/jjssx.05E019114

·基础研究·

逼尿肌过度活动中 RyR2 开放程度变化及其发生机制的研究

郑 俊,蒋 涛,杨能瑞,阳孟君,陈志文,周占松,郑 雳 (陆军军医大学附属第一医院医院全军泌尿外科中心,重庆 400038)

[摘 要] **目的** 探讨逼尿肌过度活动(DO)中 Ryanodine 受体亚型 2(RyR2)开放程度的变化及其发生的机制。**方法** 构建膀胱逼尿肌过度活动的动物模型,通过激光扫描共聚焦显微镜检测正常对照组和 DO 组钙火花,通过 Western blot 检测正常对照组和 DO 组大鼠磷酸化 RyR2(p-RyR2)和 FKBP12.6 的表达情况。**结果** 相比于正常对照组,DO 组大鼠膀胱逼尿肌细胞钙活动明显降低,FKBP12.6 蛋白表达明显增加,而 p-RyR2 表达明显下降,差异具有统计学意义($P<0.05$)。**结论** DO 组 FKBP12.6 明显增加,p-RyR2 表达明显下降,可能是 DO 逼尿肌 RYR2 开放降低发生的关键原因。

[关键词] 逼尿肌过度活动;RyR2;磷酸化 RyR2;FKBP12.6;钙火花

[中图分类号] R694 [文献标识码] A [收稿日期] 2019-05-16

Study on the variation of RyR2 opening and its mechanism in detrusor overactivity

ZHENG Jun, JIANG Tao, YANG Neng-rui, YANG Meng-jun, CHEN Zhi-wen, ZHOU Zhan-song, ZHENG Ji (Urological Institute, First Affiliated Hospital of Army Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the variation of ryanodine receptor subtype 2 (ryr2) opening and its mechanism in detrusor overactivity (DO). **Methods** An animal model of overactive detrusor muscle of the bladder was constructed. The spontaneous calcium activity in the normal control group and DO group was detected by laser scanning confocal microscope, and the expression of phosphorylated RyR2 (p-RyR2) and FKBP12.6 in the two groups were detected by Western blot. **Results** Compared with the normal control group, the DO group showed significantly decreased spontaneous calcium activity, increased expression of FKBP12.6 protein, and decreased expression of p-RyR2. **Conclusion** In the DO group, the expression of FKBP12.6 protein was significantly increased, and the expression of p-RyR2 was significantly decreased, which may be the key reason for the reduction of the RyR2 opening in the detrusor overactivity.

Keywords: detrusor overactivity; ryanodine receptor subtype 2; phosphorylated RyR2; FKBP12.6; calcium spark

逼尿肌过度活动(detrusor overactivity,DO)是临床最常见的兴奋异常,是指在膀胱充盈时自发或者诱发的逼尿肌不自主收缩,最终导致膀胱过度活动征(overactive bladder,OAB)相关的一系列症状,如尿频、尿急、夜尿增多等,严重影响患者生活质量[1]。储尿期逼尿肌自发性(肌源性)兴奋异常增强是 DO 发生的重要环节。既往国内外研究发现:①正常膀胱平滑肌在离体的条件下可出现节律性的自发收缩;②使用手术切除或阻断剂阻断神经因素影响后,膀胱的收缩活动依然存在,提示其具有肌源性兴奋机制[2];③在膀胱流出道梗阻和神经源性异常引起时的 DO,这种肌源性的自发兴奋和收缩明显增强[3]。多项研究提示肌浆网上的

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(NSFC 81770762)

[通信作者] 郑 雳,E-mail:Jizheng023@aliyun.com

[19] Marsh L, Dawson TM. Treatment of early Parkinson's disease[J]. BMJ, 2000, 321 (7252): 1 - 2. doi: 10.1097/WCO.0000000000000113.

[20] Rodgers A, Walker N, Schug S, et al. Reduction of postoperative mortality and morbidity with epidural or spinal anaesthesia: results from overview of randomised trials[J]. BMJ, 2000, 321(7275): 1493. doi: 10.1136/bmj.321.7275.1493.

[21] Loop T, Scheiermann P, Doviakue D, et al. Sevoflurane inhibits phorbol-myristate-acetate-induced activator protein-1 kinase pathway[J]. Anesthesiology, 2004, 101(3): 710 - 721. doi: 10.1136/bmj.321.7275.1493.

[22] Ben-Eliyahu S, Page GG, Yirmiya R, et al. Evidence that stress and surgical interventions promote tumor development by suppressing natural killer cell activity[J]. Int J Cancer, 1999, 80(6): 880 - 888.

(编辑:左艳芳)

Ryanodine 受体亚型 2(ryanodine receptor type 2,RyR2)是调控逼尿肌兴奋性的关键通道,但目前 DO 逼尿肌 RyR2 开放减弱的机制尚不清楚,深入研究 RyR2 开放减弱的机制将有可能为 DO 的治疗提供新的策略和靶点[4-5]。本研究基于本课题组前期在 FK-BP12.6 基因敲除鼠 DO 模型上的新发现,结合新近研究进展,提出科学假说:DO 逼尿肌结合在 RyR2 上的 FKBP12.6 增加,引起 RyR2 通道磷酸化水平下降,最终导致 RyR2 开放减弱[6]。故本研究拟通过构建膀胱逼尿肌过度活动的动物模型,激光扫描共聚焦显微镜检测正常对照组和 DO 组钙火花,Western blot 检测正常对照组和 DO 组大鼠磷酸化 RyR2(p-RyR2)和 FK-BP12.6 表达情况,探讨 DO 中 RyR2 开放的变化及其发生的机制,为深化认识 DO 肌源性兴奋调控机制和相关疾病的临床诊治提供新思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物和试剂

健康雌性 SD 大鼠 20 只(购自陆军军医大学实验动物中心),3 月龄,体质量 250 ~ 320 g。通过尿道结扎法构建膀胱出口梗阻模型,6 周后再进行膀胱测压,根据结果选取 10 只为逼尿肌过度活动组,另外 10 只大鼠为正常对照组。

Fluo-4 AM (Molecular probes 公司,美国),倒置显微镜(IX81,Olympus),增强化学发光检测液(ECL,Millipore),抗 RYR2 小鼠单克隆抗体(clone C3-33,1∶200;ABR,Golden,CO,USA),抗 fkbp12.6 兔多克隆抗体(1∶1 000,Santa Cruz,CA,USA),抗 GAPDH 山羊多克隆抗体(1∶200 000,Santa Cruz,CA,USA),过氧化物酶标记绵羊抗小鼠 IgG (1∶2 500,Santa Cruz,CA,USA),IR 染料 700-驴抗兔 IgG 和 IR 染料 800-山羊抗小鼠 IgG(1∶2 500,Santa Cruz,CA,USA)。

1.2 方法

1.2.1 正常对照组和逼尿肌过度活动组钙火花检测

将大鼠处死,取出膀胱置于含双抗(青霉素 100 U/mL和链霉素 100 U/mL)的 0.01 mol/L PBS 溶液中浸泡 10 min,解剖显微镜下剔除外膜和黏膜层,用酶消化法将膀胱壁肌层细胞分离。离心收集膀胱肌肉细胞。在室温下使用全细胞电压钳的方法记录膜电流。为了更准确比较 2 组细胞的 RyR2 通道开放差异,将细胞膜电位钳夹定位在 -40 mV。细胞内溶液由130 mmol/L KCl、1.8 mmol/L $MgCl_2$、1.0 mmol/L Na_2ATP、0.05 mmol/L $CaCl_2$ 和 0.1 mmol/L EGTA (pH 7.3)组成。细胞外溶液由 137 mmol/L NaCl、5.4 mmol/L KCl、1.8 mmol/L $CaCl_2$、1.0 mmol/L $MgCl_2$、10 mmol/L 葡萄糖和10 mmol/L HEPES (pH 7.4)组成。在室温下,将 10 μmol/L 钙荧光指示剂 Fluo-4 和细胞一起孵育10 min,然后将其转移到倒置显微镜(1 ×81,Olympus)的载物台上,细胞黏附在记录室的底部 15 min,然后灌注细胞外溶液40 min后用488 nm氩激光的激光共聚焦头对准倒置的显微镜上的细胞,收集线扫描图像。利用 MATLAB 7.1软件(MathWorks)处理并分析图像。为了记录钙火花,将共聚焦系统触发膜片钳系统工作,使得逼尿肌细胞膜电压控制在 -40 mV。将平滑肌基础钙荧光强度设定为 F0,将钙火花的幅度设定为 F。分别观察正常对照组和逼尿肌过度活动组大鼠膀胱肌肉细胞钙火花的数量、强度、FWHM、上升时间以及半衰期长短。

1.2.2 Western blot 检测 2 组大鼠 p-RyR2 和 FKBP12.6表达情况

将正常对照组和逼尿肌过度活动组大鼠逼尿肌细胞裂解,分别收集裂解液,并制备 Western 印迹样本,用 4% ~20% 丙烯酰胺梯度凝胶将其进行分离,然后电泳转移到硝基纤维素膜上。在室温下,用含 5% BSA 的三聚氰胺缓冲液(TBST)将膜封闭 2 h,依次孵育一抗,4 ℃孵育一抗过夜。然后加入二抗孵育 1 h,用增强化学发光检测液(ECL Millipore)检测p-RyR2、FKBP12.6、GAPDH 的表达。使用以下抗体:抗 p-RyR2 小鼠单克隆抗体(clone C3-33,1∶200;ABR,Golden,CO,USA),抗 fkbp12.6 兔多克隆抗体(1∶1 000,Santa Cruz,CA,USA),抗 GAPDH 山羊多克隆抗体(1∶200 000,Santa Cruz,CA,USA),过氧化物酶标记绵羊抗小鼠 IgG (1∶2 500,Santa Cruz,CA,USA),IR 染料 700-驴抗兔 IgG 和 IR 染料 800-山羊抗小鼠 IgG(1∶2 500,Santa Cruz,CA,USA)。

1.3 统计学处理

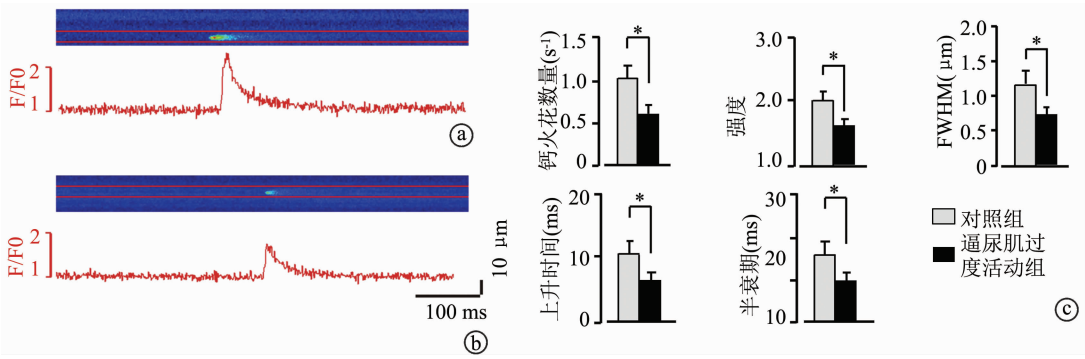
采用 SPSS 18.0 软件进行统计学分析,检验资料结果以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 t 检验,$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 正常对照组和逼尿肌过度活动组大鼠膀胱肌肉细胞钙火花检测

与对照组的大鼠肌肉细胞($n = 71$)相比,逼尿肌过度活动组的大鼠肌肉细胞($n = 85$)的钙火花的频率明显降低(图 1a)。同样,逼尿肌过度活动组大鼠肌肉细胞的 F/F0、FWHM、上升时间和半衰期明显减

少(图 1b~c),提示在逼尿肌过度活动组大鼠肌肉细胞钙火花的活性明显改变,这些改变可能是导致膀胱过度活动患者膀胱肌肉不稳定收缩的原因。

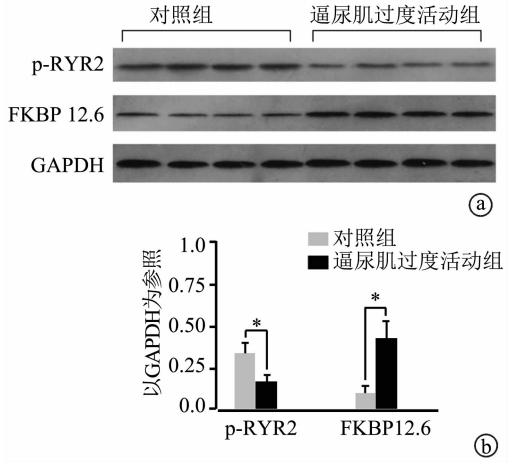


a:对照组钙火花检测;b:逼尿肌过度活动组钙火花检测;c:对照组及逼尿肌过度活动组钙火花的数量、强度、FWHM、上升时间以及半衰期长短 *:与对照组比较,$P<0.05$

图 1 正常对照组和逼尿肌过度活动组大鼠膀胱肌肉细胞钙火花检测

2.2 Western blot 检测 2 组大鼠 p-RyR2 和 FKBP12.6 表达情况

RyR2 是分布于膀胱平滑肌的 RyR 主要亚型。在心肌细胞中,FKBP12.6 是 RyR2 通道开放的关键调控蛋白,结合在 RyR2 上的 FKBP12.6 数量与 RyR2 通道的开放程度成反比[7]。同样,我们可以假设,在膀胱逼尿肌细胞中,FKBP12.6 表达量增加可能导致 RyR2 通道开放降低,进一步引起膀胱过度活动。本研究显示,与正常对照组相比,膀胱过度活动组($n=12$)大鼠逼尿肌细胞 FKBP12.6 蛋白表达明显增加,而p-RyR2 表达明显下降(图 2)。



a:Western blot 检测图; b:Western blot 定量分析图 *:与对照组比较,$P<0.05$

图 2 Western blot 检测 2 组大鼠 p-RyR2 和 FKBP12.6 表达

3 讨论

DO 是指在某种致病因素下,处于储尿期的膀胱出现非排尿性的收缩,主要表现为尿频、尿急,甚至可以诱发尿失禁[8]。目前,有关膀胱逼尿肌不稳定的发生机制目前尚未完全阐明,占主流的两大学说为神经源性学说和肌源性学说,其中神经源性学说长期占据主导地位[9]。在临床治疗过程中,兴奋性异常主要采用神经受体活性药物,如 M 受体的阻断剂及 β3 受体激动剂等,但疗效尚不理想[10]。近来年,逼尿肌自发性(肌源性)兴奋异常在 DO 发生中的作用日益受到重视,阐明 DO 的肌源性兴奋调控机制将对临床诊治该病变有着极为重要的意义。

本课题组前期研究还发现,利用 Ryanodine 特异性阻断 RyR2 开放后,对 DO 逼尿肌组织兴奋性无显著影响,提示 DO 逼尿肌细胞 RyR2 开放程度显著下降,而 RyR2 通道兴奋剂 Caffeine 可显著降低 DO 逼尿肌组织兴奋性,提示 DO 逼尿肌 RyR2 开放减弱,其对逼尿肌兴奋性抑制的降低是 DO 逼尿肌兴奋性异常增强的关键环节[11]。但 DO 中,RyR2 开放是否存在降低,目前尚无直接研究证据。本研究通过激光共聚焦显微镜首次发现,DO 逼尿肌钙火花减少,提示 DO 逼尿肌 RyR2 开放降低。

FKBP12.6 是调控 RyR2 开放的关键蛋白,本课题组前期利用 FKBP12.6 基因敲除鼠的研究发现,FKBP12.6 基因敲除导致 RyR2 开放较野生鼠显著增强;而利用 JVT519 增强 FKBP12.6 与 RyR2 结合后可一定程度上减轻 RyR2 的异常开放[6]。在心肌细胞的多个研究中发现,FKBP12.6 是 RyR2 通道开放的关键调控蛋白,结合在 RyR2 上的 FKBP12.6 数量与 RyR2 通道的开放程度成反比[12-13]。本研究首次发现,DO 中 FKBP12.6 表达明显上调,提示增加的 FKBP12.6 可能通过稳定 RyR2,降低 RyR2 开放,这与心肌细胞中的研

究类似[12-13]。

RyR2 通道磷酸化状态是决定通道开放程度的关键因素,是多个病理、生理状态下细胞兴奋性改变的关键环节[14-16]。在心脏疾病的多项研究发现,FKBP12.6 可能通过 PKA 导致 p-RyR2 开放下降[7,17-18]。本研究发现,DO 逼尿肌细胞 RyR2 通道磷酸化水平显著降低,p-RyR2 表达明显下降,提示在逼尿肌细胞中也同样存在这一机制,值得进一步探讨。

[参考文献]

[1] He Q,Yu YL,Li GH,et al. The dome wall of bladder acts as a pacemaker site in detrusor instability in rats[J]. Med Sci Monit,2017,23:2400 - 2407. doi:10.12659/MSM.904406.

[2] Rosenberg J,Byrtus M,Stengl M. Original research: combined model of bladder detrusor smooth muscle and interstitial cells[J]. Exp Biol Med (Maywood), 2016, 241 (16): 1853 - 1864. doi: 10.1177/1535370216655402.

[3] Li N,Ding H,He X,et al. Expression and function of the small-conductance Ca(2+)-activated K(+) channel is decreased in urinary bladder smooth muscle cells from female guinea pig with partial bladder outlet obstruction[J]. Int Urol Nephrol,2017,49(7):1147 - 1155. doi:10.1007/s11255 - 017 - 1592 - 0.

[4] Parajuli SP,Zheng YM,Levin R,et al. Big-conductance Ca(2+)-activated K(+) channels in physiological and pathophysiological urinary bladder smooth muscle cells[J]. Channels (Austin),2016,10(5):355 - 364. doi:10.1080/19336950.2016.1180488.

[5] 张思聪,卫中庆. 糖尿病膀胱病因与咖啡因对其治疗的研究进展[J]. 医学研究生学报,2017,30(4):427 - 431. doi:10.16571/j.cnki.1008 - 8199.2017.04.019.

[6] Zheng J,Wenzhi B,Miao L,et al. Ca(2+) release induced by cADP-ribose is mediated by FKBP12.6 proteins in mouse bladder smooth muscle[J]. Cell Calcium,2010,47(5):449 - 457. doi:10.1016/j.ceca.2010.03.006.

[7] Zhao YT,Guo YB,Gu L,et al. Sensitized signalling between L-type Ca^{2+} channels and ryanodine receptors in the absence or inhibition of FKBP12.6 in cardiomyocytes[J]. Cardiovasc Res,2017,113(3):332 - 342. doi:10.1093/cvr/cvw247.

[8] Virseda-Chamorro M,Salinas-Casado J,Tapia-Herrero AM,et al. Effect of pelvic organ prolapse repair on detrusor overactivity in women following incontinence surgery: a multivariate analysis[J]. Neurourol Urodyn,2017,36(8):2083 - 2088. doi:10.1002/nau.23242.

[9] Kessler TM,Bachmann LM,Minder C,et al. Adverse event assessment of antimuscarinics for treating overactive bladder: a network meta-analytic approach[J]. PLoS One,2011,6(2):e16718. doi:10.1371/journal.pone.0016718.

[10] Wrobel A,Rechberger T. The effect of combined treatment with a beta3 AR agonist and a ROCK inhibitor on detrusor overactivity[J]. Neurourol Urodyn, 2017, 36(3): 580 - 588. doi: 10.1002/nau.22978.

[11] Jiang HH,Song B,Lu GS,et al. Loss of ryanodine receptor calcium-release channel expression associated with overactive urinary bladder smooth muscle contractions in a detrusor instability model[J]. BJU Int,2005,96(3):428 - 433. doi:10.1111/j.1464 - 410X.2005.05644.x.

[12] Dhindwal S,Lobo J,Cabra V,et al. A cryo-EM-based model of phosphorylation-and FKBP12.6-mediated allosterism of the cardiac ryanodine receptor[J]. Sci Signal,2017,10(480). doi:10.1126/scisignal.aai8842.

[13] Zhong J,Chen J,Cao T,et al. Adenovirus-mediated FKBP12.6 overexpression induces hypertrophy and apoptosis in cultured neonatal cardiomyocytes[J]. Clin Exp Pharmacol Physiol,2009,36(2):135 - 140. doi:10.1111/j.1440 - 1681.2008.05030.x.

[14] Lascano E,Negroni J,Vila PM,et al. Impact of RyR2 potentiation on myocardial function[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol,2017,312(6):H1105 - H1109. doi:10.1152/ajpheart.00855.2016.

[15] Bovo E,Huke S,Blatter LA,et al. The effect of PKA-mediated phosphorylation of ryanodine receptor on SR Ca(2+) leak in ventricular myocytes[J]. J Mol Cell Cardiol,2017,104:9 - 16. doi:10.1016/j.yjmcc.2017.01.015.

[16] Uchinoumi H,Yang Y,Oda T,et al. CaMKI-dependent phosphorylation of RyR2 promotes targetable pathological RyR2 conformational shift[J]. J Mol Cell Cardiol,2016,98:62 - 72. doi:10.1016/i.yimcc.2016.06.007.

[17] Saad NS,Elnakish MT,Ahmed A,et al. Protein kinase a as a promising target for heart failure drug development[J]. Arch Med Res,2018,49(8):530 - 537. doi:10.1016/j.arcmed.2018.12.008.

[18] Marx SO,Reiken S,Hisamatsu Y,et al. PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts[J]. Cell,2000,101(4):365 - 376.

(编辑:左艳芳)