·论 著·

热休克蛋白 20 在大鼠急性尿潴留膀胱中的表达及意义

闫书贤,王永权,熊智勇,邓建平,卢根生 (第三军医大学西南医院全军泌尿外科研究所,重庆 400038)

[摘 要] **目的** 研究热休克蛋白 20(Hsp20)在大鼠急性尿潴留(AUR)模型膀胱中的表达及其与逼尿肌收缩功能的关系。**方法** 通过结扎尿道口的方法建立大鼠急性尿潴留动物模型,利用充盈性膀胱测压的方法检测膀胱收缩功能,采用免疫荧光染色的方法分别检测急性尿潴留膀胱排空后不同时相点(0 h、1 h、6 h、12 h、24 h、3 d、5 d、7 d)大鼠膀胱逼尿肌 Hsp20 的表达情况,采用 western blot 的方法比较尿潴留后不同时相点 Hsp20 含量的差异。**结果** AUR 后 1h、6h、12h、24h 组大鼠逼尿肌收缩力呈时间依赖性递减,均较 0h 组显著下降($P<0.05$);3d、5d、7d 组最大逼尿肌压较 1h、6h、12h 和 24h 组显著回升,但仍低于 0h 组和对照组($P<0.05$);AUR 各组 Hsp20 表达明显高于对照组,梗阻后 24 h 内 Hsp20 表达呈逐步上升趋势,而 24 h 至 7 d 则是逐渐降低的,其差异具有统计学意义($P<0.05$)。**结论** AUR 后膀胱逼尿肌中 Hsp20 表达的上调很可能对逼尿肌细胞有一定的保护作用,但 AUR 后 Hsp20 的高表达可能也是逼尿肌细胞收缩功能受到抑制的重要因素之一。

[关键词] 热休克蛋白 20;急性尿潴留;膀胱收缩乏力;大鼠

[中图分类号] R322-33;R681.7 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2012)03-0229-04

Expressions and significances of heat shock protein 20 in bladders of rats with acute urinary retention

YAN Shu-xian, WANG Yong-quan, XIONG Zhi-yong, DENG Jian-ping, LU Gen-sheng (Urological Research Institute of PLA, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the expressions of heat shock protein 20 (Hsp20) and their relationship with contractile function of uric muscle in rats with acute urinary retention (AUR). **Methods** Animal model of AUR was established by ligating the external orifice of urethra in rats. Filling cystometry was performed to evaluate the contractile function while immunofluorescence and western blot were employed to detect and compare the expressions of Hsp20 at 0 h, 1 h, 6 h, 12 h, 24 h, 3 d, 5 d, 7 d after AUR. **Results** The contractile function of uric muscle decreased in a time-dependent manner after AUR ($P<0.05$). The maximum detrusor pressure of 3d, 5d, 7d group significantlyrebound over 1h, 6h, 12h and 24h group, but it was still below the 0h group and the control group ($P<0.05$). Expressions of Hsp20 after AUR were in a gradual upward trend within 24 h, and they were gradually reduced from 24 h to 7 d after AUR. But they were all significantly higher than that of the control group. The difference was statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** The upregulation of the expressions of Hsp20 in the detrusor have a protective effect to detrusor cells after AUR, but it may be one of the factors for the inhibition of detrusor muscle cell contraction after AUR.

Keywords: heat shock protein 20; acute urinary retention; bladder atony; rats

急性尿潴留(acute urinary retention, AUR)是临床常见严重的排尿功能障碍,其病因多为下尿路梗阻、神经源性膀胱、硬膜外麻醉后或某些药物作用所致。AUR 常导致严重逼尿肌收缩乏力(detrusor underactivity, DU),以至于很多患者在解除下尿路梗阻或去除其他病因之后,排尿功能仍未得到有效缓解[1]。研究表明,热休克蛋白 20(heat shock protein 20, Hsp20)在稳定细胞骨架、调节肌细胞收缩方面发挥了重要作用[2],但在膀胱逼尿肌中的作用研究尚未见报道。本研究采用充盈性膀胱测压、Western blot、免疫荧光染色及激光共聚焦等技术,通过对比研究 AUR 大鼠不同时相点膀胱逼尿肌收缩力及 Hsp20 的表达情况,初步探讨 AUR 后膀胱收缩功能和 Hsp20 表达的关系及相关机制,旨在为临床治疗提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 急性尿潴留大鼠模型构建

按照 Saito 等人的方法建立 AUR 大鼠模型[3]。健康雌性 SD 大鼠(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)45 只,3 月龄,体质量 220~250 g,完全随机分为对照组($n=5$)和 AUR 组($n=40$)。对照组用戊巴比妥钠(35 mg/kg)腹腔注射达浅麻醉,以硬膜外导管经尿道插入膀胱。轻压下腹

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81000288)

[作者简介] 闫书贤(1981-),男,河南省洛阳市人,主治医师,硕士,主要从事下尿路排尿功能障碍方面的研究。E-mail:liang3043@sina.com

[通讯作者] 卢根生,E-mail:lugeng8@hotmail.com

[收稿日期] 2012-02-20 [修回日期] 2012-03-04

部排空膀胱,将导管经三通管与尿动力仪及微量灌注泵相连。标定零点,用生理盐水以 0.2 mL/min 的速度灌注膀胱,用多道生理信号采集系统记录膀胱充盈过程中压力、容积变化情况,记录开始灌注到出现排尿的时间和最大逼尿肌压。AUR 组行充盈性膀胱测压后完全排空膀胱,丝线结扎大鼠尿道,以37 ℃生理盐水 0.2 mL/min 持续灌注膀胱,灌注量达到测定膀胱容量的2 倍后停止灌注,保持膀胱内高压 2 h,然后排空膀胱,根据术后不同时相点(0 h、1 h、6 h、12 h、24 h、3 d、5 d、7 d)又分为 AUR0h、AUR1h、AUR6h、AUR12h、AUR24h、AUR3d、AUR5d 和 AUR7d 组。充盈性膀胱测压在不同时相点分别测定膀胱排尿期最大逼尿肌压。构成 AUR 模型后,在不同时相点将动物处死,取出膀胱标本备用。

1.2 Hsp20 免疫荧光染色

取出部分膀胱标本用 4% 多聚甲醛溶液固定 6 ~ 8 h,然后在 10% ~30% 蔗糖溶液梯度脱水过夜, -20 ℃下 OCT 冰冻包埋液包埋组织,冰冻切片机沿垂直于肌层方向行 10 μm 冰冻切片备用。标本在 4% 多聚甲醛溶液中固定 30 min,PBS 漂洗 3 次,每次 10 min,兔抗大鼠 Hsp20 一抗 4 ℃孵育过夜,PBS 漂洗 3 次后加羊抗兔 AF555 标记荧光二抗,室温孵育 1 h,DAPI 复染细胞核 10 min,PBS 漂洗 3 次,每次 10 min。在激光共聚焦显微镜下观察逼尿肌组织 Hsp20 的表达情况。

1.3 Western blot 检测 AUR 大鼠膀胱 Hsp20 表达

将部分膀胱标本称重并匀浆后提取总蛋白,配 置 5% SD S2PAGE 浓缩胶及 10% SD S2PAGE 分离胶。将 15 μg 样品溶液与相等体积 2 × SD S 上样缓冲液混合,用微量上样器上样。电泳仪电压设定为 80V,20 min;100 V,70 min。电泳完成后转膜,电压设定为 100 V,90 min。将 PVDF 膜放入 5% 脱脂奶粉 PBS 溶液中封闭 2 h。将 Hsp20 一抗按 1∶400 稀释,4 ℃孵育过夜;1∶500稀释 AF555 标记山羊抗兔 IgG(H + L)二抗孵育 1 h。PBS 充分漂洗后行增强化学发光。用 BIo-Rad 公司 QuantIty One 软件对 Western blot 结果灰度扫描 。

1.4 统计学处理

所有数据用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 13.0 统计软件进行 t 检验。$P < 0.05$ 为有显著差异。

2 结果

2.1 AUR 大鼠充盈性膀胱测压

对大鼠膀胱在 AUR 后不同时相点进行充盈性膀胱测压,AUR1h、AUR6h、AUR12h 和 AUR24h 组最大逼尿肌压均显著低于 AUR0h 组和对照组($P < 0.05$),AUR3d、AUR5d、AUR7d 组最大逼尿肌压较 AUR1h、AUR6h、AUR12h 和 AUR24h 组显著回升,但仍低于 AUR0h 组和对照组($P < 0.05$),见表 1。

2.2 Hsp20 表达检测

对照组和 AUR 组大鼠膀胱免疫荧光染色结果显示 Hsp20 主要表达在膀胱逼尿肌细胞质内,各组膀胱逼尿肌内均有表达。总体而言,对照组大鼠 Hsp20 染色较 AUR 组浅淡(图 1)。Western blot 结果可见 AUR 大鼠膀胱逼尿肌中 Hsp20 的表达在 24 h 内有随梗阻后时间逐渐升高的趋势,24 h 后 Hsp20 的表达随时间逐渐下降,这种变化趋势跟最大逼尿肌压的变化呈负相关。灰度扫描的结果提示 AUR 各组 Hsp20 表达明显高于对照组,梗阻后 24 h 内 Hsp20 表达呈上升趋势,而 24 h 至 7 d 则是逐渐降低的,其差异具有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

表 1 AUR 大鼠膀胱测压和 Hsp20 表达($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

组别	最大逼尿肌压(cmH_2O)	Hsp20 表达(Hsp20/β-actin)
对照组	52.57 ± 3.95	0.74 ± 0.23
AUR0h	60.65 ± 4.81 *	1.12 ± 0.14 *
AUR1h	52.94 ± 2.40 *	1.21 ± 0.24 *
AUR6h	41.13 ± 2.18 *	1.35 ± 0.14 *
AUR12h	39.14 ± 3.76 *	1.50 ± 0.33 *
AUR24h	32.16 ± 2.30 *	1.74 ± 0.29 *
AUR3d	42.32 ± 4.47 #	1.32 ± 0.24 #
AUR5d	45.28 ± 4.64 #	1.01 ± 0.36 #
AUR7d	49.71 ± 2.17 #	0.82 ± 0.32 #

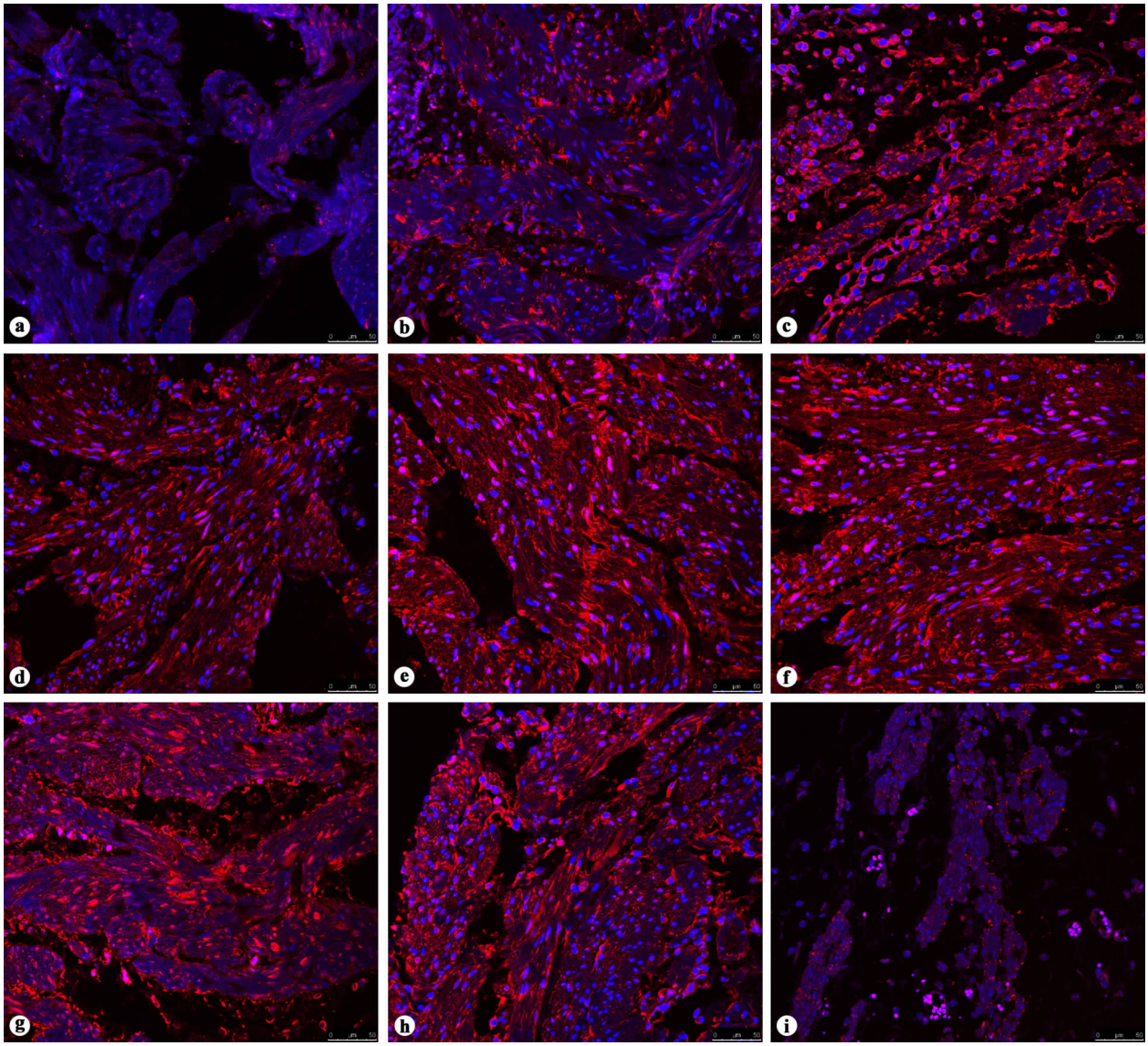
*:与对照组比较,$P < 0.05$;#:与对照组比较,$P < 0.05$

3 讨论

急性尿潴留是下尿路梗阻常见的一种并发症,常可导致膀胱功能的损害,严重者可造成膀胱收缩功能的丧失[4]。但是,目前临床上针对 AUR 除了留置尿管等待逼尿肌功能恢复之外,各种药物(氯贝胆碱、新斯的明等)治疗或非药物治疗(神经刺激等物理治疗)效果均令人失望[5]。长期留置尿管严重影响患者的生活质量,而且很多患者在拔除尿管后短时间内再次出现 AUR。究其原因,除考虑出现新的梗阻因素之外,大多数患者均伴有不同程度的逼尿肌收缩乏力[6]。

Hsp20 是小分子热休克蛋白家族中的一员,在全身各组织器官中都有表达,主要分布在骨骼肌、心肌、血管平滑肌、胃肠平滑肌和膀胱逼尿肌等组织中[7-9]。研究表明,Hsp20 具有抑制缺血性心肌凋亡、调节血小板功能和调节血管、胃肠、子宫平滑肌收缩等生物学功能[10]。血管平滑肌细胞中 Hsp20 可通过稳定细胞骨架的作用对于血管适应外源性或内源性的牵张刺激或血流剪切力刺激起到有效地保护作用[11]。对子宫平滑肌的研究发现,晚期妊娠状态下的子宫肌层 Hsp20 表达和磷酸化显著上调很有可能是维持子宫平滑肌松弛的重要因素之一[12]。

膀胱逼尿肌作为一种特殊的平滑肌,其收缩的调控机制似乎与骨骼肌更为相似,即对于收缩力和收缩精确性要求较高,因此,稳定和精密的肌丝结构是保证逼尿肌正常收缩的基础。目前建立 AUR 模型常采用容积恒定法[13],即给动物以超过正常膀胱容量(一般用生理盐水充盈膀胱,维持时间1 ~ 2h,然后排空膀



a:对照组;b:AUROh;c:AUR1h;d:AUR6h;e:AUR12h;f:AUR24h;g:AUR3d;h:AUR5d;i:AUR7d

图 1 Hsp20 在 AUR 后不同时相点组织免疫荧光染色,红色显示 Hsp20 阳性染色,蓝色显示细胞核(×250)

胱。本实验对 AUR 大鼠进行充盈性膀胱测压,测压过程始终保持大鼠处于浅麻醉状态,使测压过程更接近于生理状态。结果显示,AUR 继发的膀胱逼尿肌收缩功能障碍具有时相特异性。解除梗阻后早期膀胱收缩功能受损相对较轻,甚至会出现代偿性增强。而随着时间推移膀胱收缩功能障碍持续加重,AUR 发生后 24 h 膀胱收缩功能降至最低,之后 6 d 逐渐恢复,至 AUR 后 7 d 大致恢复正常。这个过程与临床 AUR 患者膀胱收缩功能改变相似。同时,通过对 AUR 大鼠膀胱不同时相点 Hsp20 免疫荧光染色及 Western blot 的检测,我们发现大鼠膀胱逼尿肌中 Hsp20 的表达在 24 h 内有随梗阻后时间逐渐升高的趋势,24 h 后 Hsp20 的表达随时间逐渐下降,这种变化趋势跟最大逼尿肌压的变化呈负相关。因此,本文推测,AUR 后膀胱逼尿肌中 Hsp20 表达的上调很可能对逼尿肌细胞有一定的保护作用,但 AUR 后 Hsp20 高表达也是逼尿肌细胞收缩功能受到抑制的重要因素之一。进一步对 Hsp20 在逼尿肌收缩功能作用机制的研究,将有助于全面阐明 AUR 后膀胱收缩乏力的机制,为其临床治疗提供新的切入点。

[参考文献]

[1] Khastgir J, Khan A, Speakman M. Acute urinary retention: medical management and the identification of risk factors for prevention[J]. Nat Clin Pract Urol, 2007, 4(8): 422 – 431.

[2] Salinthone S, Tyagi M, Gerthoffer WT. Small heat shock proteins in smooth muscle[J]. Pharmacol Ther, 2008, 119(1): 44 – 54.

[3] Saito M, Miyagawa I. Bladder dysfunction after acute urinary retention in rats[J]. J Urol, 2001, 165(5): 1745 – 1747.

[4] 李文刚,方 强,宋 波,等. 活性氧在急性尿潴留大鼠膀胱功能损

害中的作用研究[J]. 第三军医大学学报,2005,27(4):331 - 333.
[5] Suskind AM, Smith PP. A new look at detrusor underactivity: impaired contractility versus afferent dysfunction [J]. Curr Urol Rep, 2009, 10(5):347 - 351.
[6] Thorne MB, Geraci SA. Acute urinary retention in elderly men[J]. Am J Med, 2009, 122(9):815 - 819.
[7] Haslbeek M. SHsps and their role in the chaperone network[J]. Cell Mol Life Sci, 2002, 59(10):1649 - 1657.
[8] Kato K, Goto S, Inaguma Y, et al. Purification and characterization of a 20-kDa protein that is highly homologous to alpha B crystallin[J]. J Biol Chem, 1994, 269(21):15302 - 15309.
[9] van de Klundert FA, Smulders RH, Gijsen ML, et al. The mammalian small heat-shock protein Hsp20 forms dimers and is a poor chaperone [J]. Eur J Bioehem, 1998, 258(3):1014 - 1021.
[10] 郭晓倩. 沙鼠脑缺血再灌注后 Caspase-3 和 Hsp20 的表达变化及西比灵干预的影响[D]. 长沙:中南大学,2007.
[11] Chen HF, Xie LD, Xu CS. The signal transduction pathways of heat shock protein 27 phosphorylation in vascular smooth muscle cells[J]. Mol Cell Biochem, 2010, 333(1 - 2):49 - 56.
[12] Shi P, Wang MM, Jiang LY, et al. Paclitaxel-doxorubicin sequence is more effective in breast cancer cells with heat shock protein 27 overexpression[J]. Chin Med J (Engl), 2008, 121(20):1975 - 1979
[13] Chien CT, Yu HJ, Cheng YJ, et al. Reduction in renal haemodynamics by exaggerated vesicovascular reflex in rats with acute urinary retention [J]. J Physiol, 2000, 526 (Pt 2):397 - 408.

(编辑:左艳芳)

· 个案与短篇 ·

1 例颈胸腹联体婴儿分离术后重症监护技术

马晓玲 (第三军医大学新桥医院心血管中心监护室,重庆 400037)

[**关键词**] 联体婴儿;分离术;重症监护
[**中图分类号**] R473.72 [**文献标识码**] B [**文章编号**] 1672-5042(2012)03-0232-01

联体婴儿为世界罕见的先天畸形,发病率低,其中胸腹联体儿占 40%[1],而颈胸腹联体儿世界仅有零星报道,存活率极低。2010 年 7 月 27 日,我院收治 1 例了出生 21 d 颈胸腹相联的联体女婴,现将比例女婴分离术后重症监护技术及创新性护理措施报告如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料

联体儿(大双和小双)系第 2 胎第 2 产,足月,孕 38 周外院行剖宫产出生,双胎体重 4.8 kg,出生后 Apgar 评分、羊水、胎盘情况不详。患儿因双胎并联体 21 d,间断发热 17 d,呼吸困难 2 d急诊入院。TCBM:头为 4,胸为 5.2。精神差,面色苍白,对外界刺激反应差,小双头颈后仰,胸腰椎背曲,呈“C”字形,呼吸急促,可见鼻翼煽动,点头样呼吸及吸气性三凹征。患儿系颈胸腹相连。外院 CT 示:①联体婴双侧头颅新生儿轻度缺血缺氧性脑病可能;②联体婴双侧头颅蛛网膜下腔出血可疑;③双侧胸腔相通,脊柱位于两侧,且共用一个心脏可能。B 超示:①联体婴儿心脏相通? 心脏畸形? ②联体婴儿一个肝脏?

1.2 手术情况

患儿病情危重,经抗感染,利尿,肠外营养等治疗,患儿病情无明显好转,于 2010 年 7 月 29 日晚急诊行分离术。术中发现联体双胎共用一个心脏、肝脏,手术只能保留一个患儿,经与家属沟通后,据患儿大器官畸形情况,决定放弃小双。7 月 30 日 8:15 分离心脏后小双死亡,大双于 30 日急诊行颈胸腹联体儿分离术,术后 13:00 返回 ICU。当晚因心率血压下降行床旁开胸抢救后恢复,为减轻心脏负担考虑延迟关胸。患儿术后并发急性肾功能衰竭,低心排血综合症,感染,肝功能损害,低氧血症,高碳酸血症,代谢性酸中毒,高血糖,乳酸持续大于 15.0 mmol/L等。行对症治疗,给予开放式辐射床,皮肤护理,CRRT,抗感染,强心利尿,营养支持,伤口护理,保护性隔离,多管道护理等治疗。

1.3 护理方法

1.3.1 伤口护理 术前对联体儿行牵拉胸腹部皮肤以增加皮肤弹性,利于术后皮肤缝合。术后以温水棉签刺激患儿吸吮动作,促进胃肠排气,间断应用开塞露,下肛管减轻腹胀,减轻腹壁张力,促进伤口的愈合。以维生素 E 定时按摩胸腹部,四肢及臀部皮肤,对于改善皮肤血液供应,改善水肿,硬肿,减轻皮肤张力。引进开放式辐射床的操作应用:置患儿于开放式辐射床,温度 32 ~ 38 ℃,湿度 50% ~ 60%,定期检测温湿度,确保应用安全,防止新生儿硬肿。

1.3.2 联合式抗感染综合治疗及护理 单间监护病房实行保护性隔离,持续空气净化,严格限制探视。每日 2 次彻底消毒温箱及更换无菌湿化液,并对温箱表面及湿化液作细菌培养定时监测体温。尽早拔除侵袭性导管,并做好导管培养。做好气管插管的护理。合理安排集中采集标本:每日将血液,痰液,引流渗出液,尿液等体液标本送检,以检验结果指导、规范和调整使用抗生素。定期采集呼吸机及各种管道接头处,

[**收稿日期**] 2011-12-31 [**修回日期**] 2012-01-13

(下转第 235 页)