·论 著·

HCN 通道在人体输尿管自发性收缩中的作用

冯观贵[1],刘 骞[1],孙碧韶[2],朱景振[2],龙 洲[1],李龙坤[1] (1. 第三军医大学新桥医院泌尿外科,重庆 400037;2. 第三军医大学西南医院泌尿外科,重庆 400038)

[摘 要] **目的** 应用 ZD7288 特异性阻断超极化激活环核苷酸门控阳离子非选择性通道(HCN 通道)后观察人输尿管离体平滑肌肌条自发性收缩活动的变化,从功能学上初步探讨 HCN 通道在输尿管平滑肌自发性收缩中的作用。**方法** 收集临床上因肾肿瘤或囊肿等行肾切除手术患者的离体输尿管标本 12 例,经确认患者手术前均未接受放疗、化疗或免疫治疗等特殊处理,进行输尿管离体平滑肌肌条实验,观察在 ZD7288 作用下输尿管离体平滑肌肌条的收缩幅度和频率的变化。以人肠道组织为阳性对照,剩余标本用于检测 HCN 通道在人输尿管上的表达情况。**结果** 经 RT-PCR、WB 法(Western blot)技术及免疫组化法检测,发现正常人输尿管存在 HCN 通道的表达,且 HCN 通道主要表达于人输尿管的黏膜层与平滑肌层;离体肌条实验中加入 ZD7288 后,肌条的收缩频率明显变慢,收缩幅度变化不明显,自身前后对比有统计学差异($P<0.01$)。**结论** HCN 通道可能在人输尿管自发性收缩中发挥着重要作用。

[关键词] HCN 通道;输尿管;自发性收缩

[中图分类号] R693 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2015)02-0119-04

Role of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation nonselective channel in spontaneous contraction of smooth muscles in human isolated ureters

FENG Guan-gui[1], LIU Qian[1], SUN Bi-shao[2], ZHU Jing-zhen[2], LONG Zhou[1], LI Long-kun[1] (1. Department of Urology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037; 2. Department of Urology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate effects of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation nonselective channel in the human ureter on the spontaneous contraction of smooth muscles. **Methods** Four HCN subtypes were detected in human ureteral tissue using reverse transcription polymerase chain reaction, Western blotting and immunohistochemical. ZD7288, the HCN blocker, was used to observe the changes of ureteral muscle contraction amplitude and frequency by applying the ureteral smooth muscle strip test in vitro. **Results** HCN1-4 isoforms were all identified in human ureter using reverse transcription-polymerase chain reaction and Western blotting. Through the immunohistochemical, HCN channel was found mostly in the urothelium layer and muscular layer of human ureteral wall. ZD7288 significantly decreased the bladder excitation. **Conclusion** All 4 HCN channel hypotypes exist in the human ureter, and affect the ureteral excitation.

Keywords: HCN channel; ureters; spontaneous contraction

超极化激活环核苷酸门控阳离子非选择性通道,即 HCN 通道(hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels),是慢波起搏通道,主要表达于哺乳动物的心脏和神经系统,在心脏起搏及神经活动中发挥着重要的作用[1-4]。近年来在豚鼠的肾内髓质集合系统[5]、人或大鼠的膀胱逼尿肌等多个部位相继发现了 HCN 通道[6-7],但 HCN 通道在同样具有自发蠕动能力的输尿管中的作用还鲜有报道。本研究采用 ZD7288 特异性阻断 HCN 通道后观察人新鲜离体输尿管平滑肌肌条自发性收缩活动的变化,希望能从功能学上对HCN通道在输尿管平滑肌自发性收缩活动中的作用做出初步判断,为后续进一步研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

HCN1-4 亚型抗人单克隆抗体(Abcam),逆转录试剂盒、RT-PCR 试剂盒(Takara,中国大连),Trizol、RIPA 裂解液、PMSF、SDS PAGE 制胶试剂盒(碧云天,中国上海)。

1.2 输尿管及膀胱组织标本的收集

收集我院泌尿外科临床上因肾肿瘤或囊肿等行肾切除手术患者的离体输尿管标本 12 例,其中男 7 例,女 5 例,年龄 42~76岁,平均(60.6±8.5)岁。经确认患者手术前均未接受放疗、化疗或免疫治疗等特殊处理。肾或输尿管积水、肾结核等患者输尿管标本均已排除。膀胱组织来自我院泌尿外科膀胱癌患者的全切手术标本,经确认为距肿瘤 5 cm 左右的正常组织。

doi:10.11659/jjssx.01E015035

[基金项目] 国家自然科学基金重点项目(81230017)

[收稿日期] 2014-11-18 [修回日期] 2014-12-15

1.3 输尿管离体平滑肌肌条的制备

术中切除新鲜输尿管标本置于新配 4 ℃ Kreb's 液中备用,立即前往实验室制作成约 20 mm × 5 mm × 2 mm,即体积约 200 mm^3 的肌条组织。每例输尿管剩余标本分别取组织进行固定和冻存。术中尽量避免对输尿管进行不必要的钳夹与牵拉。

1.4 肌条实验

将输尿管平滑肌肌条一端垂直且无张力悬浮固定于盛有 10 mL 37 ℃ Kreb's 液的单腔器官浴槽中,另一端用丝线固定于装有一维位移微调器(成都仪器厂)的量程为 30 g 的 JZJ01 型肌肉张力换能器(成都仪器厂)上,并通以 95% 的 O_2 和 5% 的 CO_2。肌肉张力换能器连接 RM-6240C 型多道生理信号采集处理系统(成都仪器厂),选择通道模式为张力,灵敏度 0.75 g,扫描速度 5 s/div。肌条在单腔器官浴槽内平衡 30 min 后,调节一维位移微调器,使肌条张力升至 3.0 g,待肌条出现自发性收缩且平稳,观察并记录肌条张力变化曲线 15 min,加入 ZD7288 10 μl,使单腔器官浴槽的 ZD7288 终浓度为 1×10^{-5} mol/L,观察 15 min,记录时间 - 张力曲线。

1.5 采用 RT-PCR 检测 HCN1-4 各亚型的表达

运用 Trizol 提取输尿管组织总 RNA,检测浓度及纯度合格后按逆转录试剂盒说明书方法逆转录为 cDNA,膀胱组织按同样方法处理。温控条件分别是 42 ℃、2 min,37 ℃、15 min,85 ℃、5 s,按照 RT-PCR 试剂盒(DRR037A)进行 PCR 的扩增,程序如下:95 ℃预变性 5 min,95 ℃变性 30 s,Tm 退火 30 s,72℃延伸 30 s,扩增 35 个循环后,72 ℃延伸 10 min,4 ℃保存。扩增产物 2% 琼脂糖凝胶 110 V 恒压电泳后曝光。以 GAPDH 作为内参,扩增 35 个循环周期,每个标本 3 个复孔。HCN 通道引物序列见表 1。

表 1 HCN 通道相关基因的引物序列与产物长度

基因	引物序列(5'-3')	产物长度(bp)
HCN1-F	CCG CTC GAA CTT TCC ACT ATG CC	208
HCN1-R	TCC CGG GTC AGG TTG GTG TTG	
HCN2-F	GCC AGA AGA TCC ACG ACT ACT ATG	238
HCN2-R	GTG CCT TCG CGG ATG ATG ATG	
HCN3-F	CCG GGC CTT TGA GAC TGT G	231
HCN3-R	GGC GCA TGT ACC AGT GGC	
HCN4-F	GCG GAC CCC AAC TTC GTG ACG	204
HCN4-R	CCG GGT CAG GCA GAT CTC TC	

1.6 采用 WB 法检测 HCN1-4 各亚型的表达

将输尿管组织用 PBS 快速清洗,加入预冷的 RIPA 蛋白裂解液中,尽量剪碎,转入匀浆器中冰上研磨。裂解 30 min 后,4 ℃、12 000 r/min 离心 15 min,吸取的上清液即为输尿管组织的总蛋白。置于 100 ℃ 5 min 变性。RC-DC 法检测蛋白浓度,经 5% 的浓缩胶和 8% 的分离胶 SDS-PAGE 电泳,每孔的上样量为 80 μg 总蛋白。浓缩胶 70 V 电泳 30 min,分离胶 110 V 电泳 90 min,5% 的 BSA 封闭 1 h,免疫抗体反应(稀释比例,一抗 HCN 1∶1 000,GAPDH 1∶1 000,二抗:1∶5 000)。ECL 化学发光,凝胶成像系统中检测蛋白的表达情况。

1.7 免疫组化法(IHC)明确 HCN1-4 各亚型

将福尔马林浸泡的输尿管组织进行包埋,常规石蜡切片,脱蜡后清水清洗,组织片置入 EDTA pH 8.0 的枸橼酸缓冲液中行高压修复,切片浸入 3% H_2O_2 10 min。PBS 液充分洗涤后滴加一抗于切片上,37 ℃烤箱孵育 90 min,PBS 液洗 3 次,每次 5 min,二抗室温孵育 30 min;PBS 充分洗涤后擦干,上显色剂,显微镜下观察,达到信号强度后终止显色,苏木精衬染、脱水、透明、封片。

1.8 数据测量

取输尿管平滑肌肌条自发性收缩最稳定的 2 min 进行检测,波幅使用 RM-6240C 型多道生理信号采集处理系统软件进行测量。

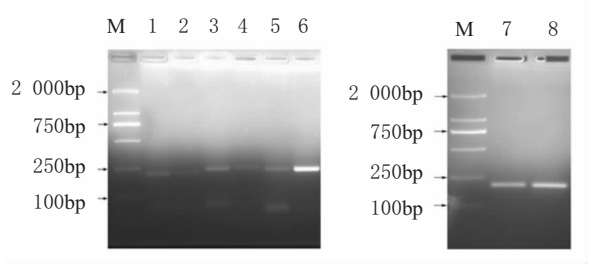
1.9 统计学方法

实验数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,输尿管收缩前后变化行 t 检验,采用 SPSS 13.0 统计软件分析,$P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RT-PCR 检测 HCN 通道相关基因的表达

在人输尿管组织中可以检测到 HCN 通道的 4 个亚型,以 HCN4 表达相对较明显(图 1)。

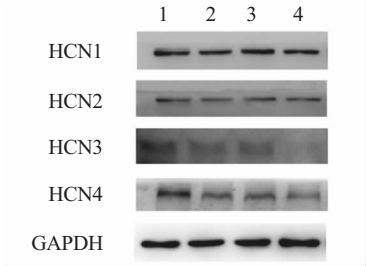


M:标准;1:输尿管 HCN1;2:膀胱 HCN1;3:输尿管 HCN2;4:膀胱 HCN2;5:输尿管 HCN3;6:膀胱 HCN3;7:输尿管 HCN4;8:膀胱 HCN4

图 1 RT-PCR 检测 HCN 通道相关基因的表达

2.2 WB 法和免疫组化对 HCN 通道蛋白水平的检测

WB 法和免疫组化技术均检测到输尿管组织中 HCN 通道及其各亚型的表达,且 HCN 通道在人体输尿管的黏膜上皮和平滑肌层表达最为明显(图 2、图 3)。



1:人输尿管标本 1;2:人输尿管标本 2;3:人输尿管标本 3;4:人膀胱标本(阳性对照)

图 2 WB 法检测人输尿管 HCN 通道的表达

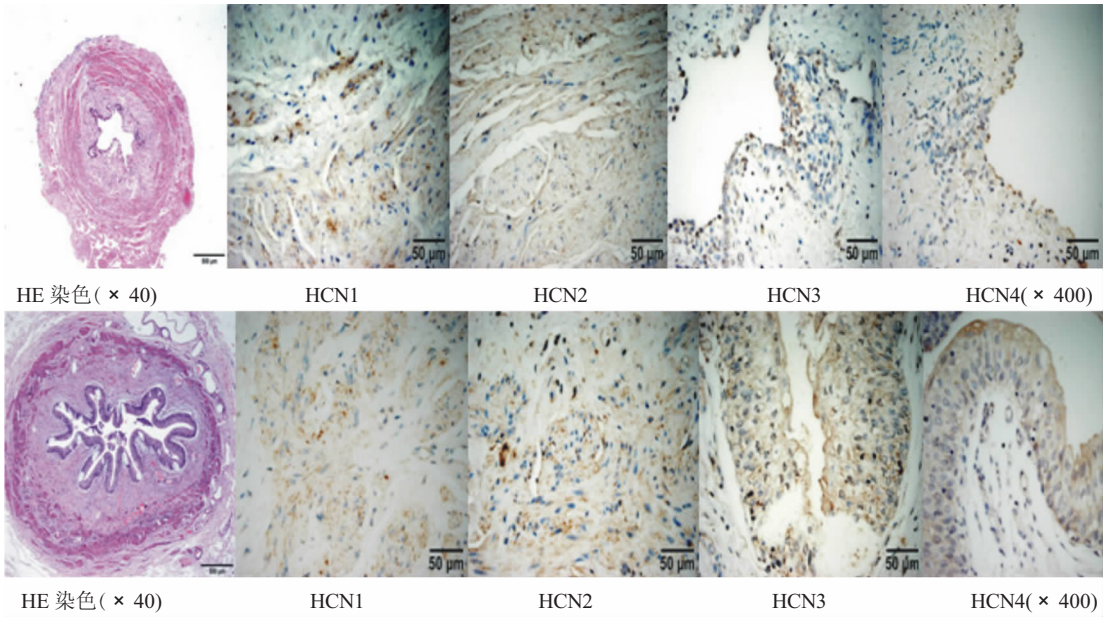


图 3 免疫组化法检测 HCN 通道蛋白的表达

2.3 ZD7288 对人体输尿管平滑肌自发性收缩的作用

对术中收集到的人新鲜输尿管平滑肌进行离体肌条实验检测,取肌条收缩平稳后收缩幅度和频率的平均值进行统计学处理并比较。结果显示,在 Kreb's 液中孵育 30 min 后,给予 3.0 g的前负荷下,肌条可出现稳定的自发性收缩,其收缩幅度为(1.531 ± 0.306) g,频率为(1.609 ± 0.204)次/分,加入 ZD7288 后收缩幅度为(1.402 ± 0.256) g,频率为(0.469 ± 0.034)次/分,经统计学检验 $P<0.01$ 差异显著(图 4)。

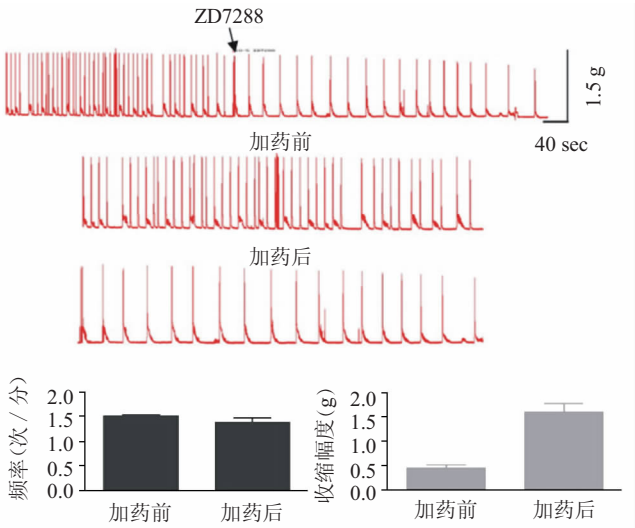


图 4 ZD7288 对人输尿管平滑肌自发性收缩的作用

3 讨论

HCN 通道是一种能被电压和环磷酸腺苷调控的、非选择性阳离子通道,能够产生特异性的 Ih 电流,而 Ih 电流被认为是起搏细胞的重要标志之一。与大部分细胞不同的是,引发 Ih 电流的是细胞的超极化电流而非通常的去极化电流,Ih 电流进一步引发动作电位,导致平滑肌收缩,进而影响器官的功能活动。因此有关 HCN 通道的研究已经成为许多平滑肌器官动力学功能领域的热点。目前 HCN 通道的起搏通道作用在心组织及中枢神经系统中均已得到明确。

在泌尿系统中,膀胱与输尿管都存在着不依赖于神经支配的自发性兴奋性。在文献报道和我们团队的前期研究中,已经证实膀胱源性自发兴奋调控在逼尿肌兴奋异常中占有重要地位[8]。膀胱中存在有胃肠道起搏样细胞(interstitial cells of Cajal,ICC),并通过酶消化法,体外得到了原代培养的膀胱 ICC 样细胞[9-10]。本团队前期研究发现 ICC 细胞的兴奋性对膀胱逼尿肌的收缩功能有显著影响[11-12],且膀胱 ICC 具有起搏细胞的 Ih 内向特征电流[13],进一步的研究确认在大鼠的膀胱内有 HCN 通道 4 个亚型的表达,HCN1 表达量相对较多,通过免疫双染等技术证实 HCN 通道可能通过 ICC 细胞在膀胱的自发性收缩中发挥着重要作用[6]。Xue 等[7]在人的膀胱内也发现有 HCN 通道 4 个亚型的表达,且 HCN4 表达量相对较多。ICC 细胞及其起搏功能的发现,确立了 ICC 细胞作为膀胱源性兴奋通路的枢纽地位,而其核心是以 HCN 通路为主导的起搏和整合通路。作为同样具有自发性兴奋性的输尿管,HCN 通道在其中是否也发挥着重要作用呢? 目前还未发现有相关报道。本实验中使用 HCN 阻断剂 ZD7288 阻断 HCN 通道后观察人新鲜离体输尿管肌条收缩活动的变化,正是希望能从功能学上对 HCN 通道在输尿管平滑肌自发性收缩活动中的作用进行初步探讨。

ZD7288 作为 HCN 通道的非选择性阻断剂,在 HCN 通道功能的研究报道中,研究者们多采用 ZD7288 这一药物阻断 HCN 通道后观察机体的反应。但 Wu 等[14]研究表明 ZD7288 不仅能阻断 HCN 通道及大剂量阻断 T 通道外,还能够阻断背根神经节细胞中广泛分布的钠通道,且阻断效果更为明显,说明 ZD7288 并非 HCN 通道的特异性阻滞剂。在我们的研究中,采用 ZD7288 阻断人离体输尿管中的 HCN 通道,本身已不受到中枢及外周神经的影响,达到相对特异性的效果。

在本研究中,我们收集临床上因肾脏肿瘤或囊肿等行肾脏切除手术患者的离体输尿管标本,率先开展以人正常输尿管组织为模型,采用 RT-PCR、WB 法及免疫组化技术分别从基因、蛋白水平上证实了正常人输尿管中 HCN 通道各亚型的存在,且主要表达于输尿管的黏膜层与肌肉层。人新鲜输尿管离体肌条实验从功能学上初步判断 HCN 通道在输尿管自发性收缩中发挥着重要的作用。由于 ZD7288 短时间内无法洗脱,因此针对人输尿管平滑肌肌条,在自发性收缩平稳的基础上,直接加入 ZD7288,观察到肌条收缩频率明显变慢,幅度变化不明显,通过加药前后的自身对照,统计学分析有显著差异,说明 ZD7288 明显抑制了人输尿管的节律性收缩。

前期已有大量研究[15-19]发现在输尿管上有 ICCs 细胞的表达,主要存在于输尿管的上皮层及部分基层组织,且在输尿管平滑肌的自发性收缩中起着重要作用,很可能是输尿管的起搏细胞。我们团队前期研究发现 ICCs 细胞在豚鼠肾盂输尿管各部位的分布有显著差异,其与上尿路平滑肌局部肌条收缩有密切关系[19]。本研究表明 HCN 通道在人输尿管自发性收缩中发挥着重要的作用,而 HCN 通道是否是通过 ICCs 在输尿管的自发性收缩中发挥作用,还有待进一步研究。

在临床上,输尿管的功能正常与否与一系列泌尿系动力相关性疾病、先天性输尿管疾病密切相关,如先天性巨输尿管、先天性肾盂输尿管连接处梗阻、膀胱输尿管反流及输尿管功能性梗阻等。本研究是对正常人输尿管自发性收缩功能的一个初步探索,旨在为今后进一步的相关深入研究打下良好的基础,系统而深入地阐明 HCN 通路在输尿管自发兴奋收缩中的作用和机制,对多种输尿管疾病的基础研究和临床治疗具有重要意义。

[参考文献]

[1] He C, Chen F, Li B, et al. Neurophysiology of HCN channels: from cellular functions to multiple regulations[J]. Prog Neurobiol, 2014, 112: 1 – 23.

[2] Benarroch EE. HCN channels: function and clinical implications[J]. Neurology, 2013, 80(3): 304 – 310.

[3] Brown HF, Giles W, Noble SJ. Membrane currents underlying activity in frog sinus venosus[J]. J Physiol, 1977, 271(3): 783 – 816.

[4] Maccaferri G, Mangoni M, Lazzari A, et al. Properties of the hyperpolarization-activated current in rat hippocampal CA1 pyramidal cells[J]. J Neurophysiol, 1993, 69(6): 2129 – 2136.

[5] Bolivar JJ, Tapia D, Arenas G, et al. A hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated, (Ih-like) cationic current and HCN gene expression in renal inner medullary collecting duct cells[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2008, 294(4): C893 – 906.

[6] 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. e1417 – 1413.

[7] 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. e213 – 228.

[8] Meng E, Young JS, Brading AF. Spontaneous activity of mouse detrusor smooth muscle and the effects of the urothelium[J]. Neurourol Urodyn, 2008, 27(1): 79 – 87.

[9] McCloskey KD. Interstitial cells in the urinary bladder--localization and function[J]. Neurourol Urodyn, 2010, 29(1): 82 – 87.

[10] McCloskey KD. Bladder interstitial cells: an updated review of current knowledge[J]. Acta Physiol, 2013, 207(1): 7 – 15.

[11] Min Y, He P, Wang Q, et al. The effects of the c-kit blocker glivec on the contractile response of urinary bladder[J]. J Surg Res, 2011, 171(2): e193 – 199.

[12] 丁砺鑫,方 强. 膀胱 Cajal 间质细胞对膀胱逼尿肌细胞兴奋调控的结构和功能特征的初步研究[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(12): 1118 – 1121.

[13] 丁砺鑫,王永权,方 强. 大鼠不稳定膀胱中 ICCs 细胞中 HCN 蛋白表达的变化[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(7): 578 – 581.

[14] Wu X, Liao L, Liu X, et al. Is ZD7288 a selective blocker of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel currents? [J]. Channels, 2012, 6(6): 438 – 442.

[15] Metzger R, Schuster T, Till H, et al. Cajal-like cells in the human upper urinary tract[J]. J Urol, 2004, 172(2): 769 – 772.

[16] Di Benedetto A, Arena S, Nicotina PA, et al. Pacemakers in the upper urinary tract[J]. Neurourol Urodyn, 2013, 32(4): 349 – 353.

[17] Gevaert T, De Vos R, Van Der Aa F, et al. Identification of telocytes in the upper lamina propria of the human urinary tract[J]. J Cell Mol med, 2012, 16(9): 2085 – 2093.

[18] 樊汝会,王永权,李雪梅,等. ATP 对原代培养大鼠膀胱 Cajal 间质细胞及逼尿肌细胞兴奋性的影响[J]. 局解手术学杂志, 2011, 20(2): 117 – 119.

[19] 钟 晓,李为兵. ICC 样细胞在正常豚鼠上尿路的分布及对平滑肌收缩的影响[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(6): 495 – 497.

(编辑:周小林)