热休克蛋白 27 在大鼠急性尿潴留膀胱中的表达及意义

王永权,沈文浩,邓建平,鄢俊安,熊恩庆 (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 27(HSP27)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**通过尿道口钳夹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、2、4、6 h)大鼠膀胱逼尿肌 HSP27 的表达情况,采用 Western-blot 的方法比较尿潴留后不同时相点 HSP27 含量的差异。**结果** AUR 后 2、4、6 h 大鼠逼尿肌收缩力呈时间依赖性递减,均较 0 h 组显著下降($P<0.05$);其膀胱组织中 HSP27 的含量亦显著低于 0 h 组,各组的 HSP27 表达均高于对照组($P<0.05$)。**结论** HSP27 可能在急性尿潴留致逼尿肌收缩功能障碍发病过程中起到重要作用。

[关键词] 热休克蛋白 27;急性尿潴留;膀胱收缩乏力;大鼠
[中图分类号] R694.55;R334.3 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2011)02-0124-03

Expressions and significances of heat shock protein 27 in bladders of rats with acute urinary retention

WANG Yong-quan, SHEN Wen-hao, DENG Jian-ping, YAN Jun-an, XIONG En-qing (Urological Research Institute of PLA, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the expressions of heat shock protein 27 (HSP27) and their relationship with contractile function of uric muscle in rats with acute urinary retention (AUR). **Methods** Animal model of AUR was established by clamping the external orifice of urethra with small clips 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 HSP27 at 0, 2, 4 and 6 hours after AUR. **Results** The contractile function of uric muscle was decreased in a time-dependent manner at 0, 2, 4 and 6 hours after AUR ($P<0.05$). Expressions of HSP27 were significantly lowered at 2, 4 and 6 hours after AUR than those at 0 hour after AUR but they were significantly higher in bladders with AUR than those without ($P<0.05$). **Conclusion** HSP27 may play an important role in the pathogenesis of detrusor underactivity induced by AUR.

Keywords: heat shock protein 27; acute urinary retention; detrusor underactivity; rat

急性尿潴留(acute urinary retention, AUR)是下尿路梗阻、神经源性膀胱、硬膜外麻醉后或某些药物作用后常见的严重下尿路并发症。AUR 常引起严重逼尿肌收缩乏力(detrusor underactivity, DU),导致很多患者在解除梗阻后,排尿功能未得到有效缓解[1]。急性尿潴留发生后膀胱在超微结构上常表现为逼尿肌以退化为特征的结构改变,膀胱平滑肌细胞骨架损害,细胞内肌丝数量的明显减少、萎缩和排列紊乱是逼尿肌细胞变性的特征性变化。研究表明 HSP27 在稳定细胞骨架结构、调节平滑肌收缩中发挥了重要作用[2],但在膀胱逼尿肌中尚未见报道。本研究拟通过检测 HSP27 在 AUR 大鼠膀胱中不同时相点的表达情况,探讨 HSP27 和 AUR 后膀胱收缩功能的关系。

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81000288)
[作者简介] 王永权(1980-),男,贵州省贵阳市人,主治医师,讲师,博士,主要从事尿动力学方面的研究。电话:(023)68765846
[通讯作者] 熊恩庆,电话:(023)68754832,E-mail:wyq_315@yahoo.com.cn
[收稿日期] 2010-12-13 [修回日期] 2011-01-12

1 材料与方法

1.1 大鼠膀胱急性尿潴留模型构建

按照 Saito 等人的方法建立 AUR 大鼠模型[3]。将 25 只雌性 Wistar 大鼠完全随机分为对照组($n=5$)和 AUR 组($n=20$),行充盈性膀胱测压后完全排空膀胱,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,无损伤动脉夹钳夹尿道外口,保持膀胱内高压 30 min,然后尿道插管排空膀胱,根据术后不同时相点(0、2、4、6 h)又分为 AUR0h、AUR2h、AUR4h 和 AUR6h 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。

1.2 HSP27 免疫荧光染色

动物断颈处死,取膀胱标本,4% 多聚甲醛固定 6 ~ 8 h,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粘膜层方向行 10 μm 冰冻切片备用。标本 4% 多聚甲醛固定 30 min,PBS 漂洗 3 次,每次 10 min,兔抗大鼠 HSP27 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。激光共聚焦显微镜观察。

1.3 AUR 大鼠膀胱 HSP27 表达检测

动物膀胱标本匀浆后提取总蛋白,配置 10% SDS2PAGE

分离胶及 5% SDS2PAGE 浓缩胶。将 15 μg 样品溶液与等体积 2×SDS loading buffer 混合,用微量上样器上样。电泳仪电压设定 80 V,20 min,100 V,70 min。电泳完毕后转膜,电压设定 100 V,90 min。将 PVDF 膜放入 5% 脱脂奶粉 PBS 溶液封闭 2 h。1∶500稀释 HSP27 一抗,4 ℃孵育过夜;1∶5 000 稀释辣根酶标记兔抗山羊二抗孵育 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 11.0 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结果见表 1。AUR2h、AUR4h 和 AUR6h 组最大逼尿肌压均显著低于 AUR0h 组和对照组($P<0.05$),而 AUR0h 组和对照组相比无显著差异。

2.2 HSP27 表达检测

免疫荧光染色结果显示 HSP27 主要表达在膀胱平滑肌细胞质内,对照组和 AUR 各组膀胱逼尿肌内均有表达。总体而言,对照组大鼠 HSP27 染色较 AUR 组浅淡(图 1)。Western-blot 结果可见 AUR 大鼠膀胱内 HSP27 的表达有随梗阻后时间逐渐下降的趋势,灰度扫描的结果提示 AUR 各组 HSP27 表达显著高于对照组,而 AUR2h、AUR4h 和 AUR6h 组表达均显著低于 AUR0h 组(表 1)。

表 1 AUR 大鼠充盈性膀胱测压和 HSP27 表达($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

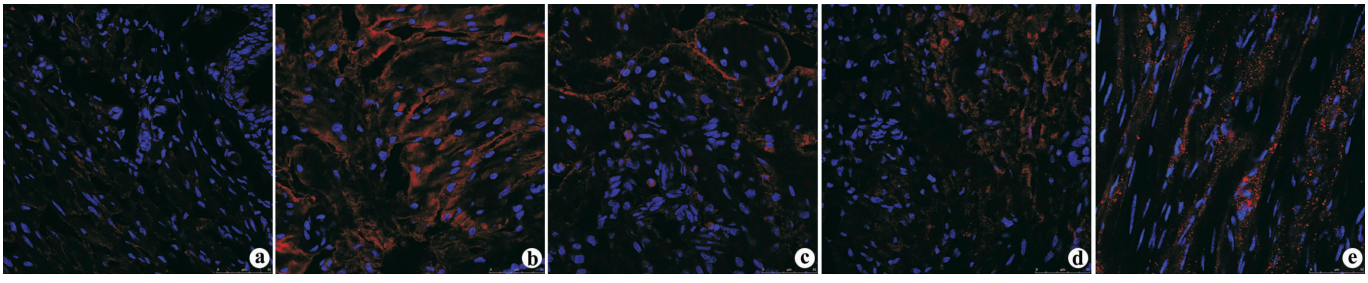
组别	最大逼尿肌压(cmH_2O)	HSP27 表达(HSP27/β-actin)
对照组	23.3±4.3	0.75±0.07
AUR0h	24.2±4.8	3.30±0.28*
AUR2h	17.2±3.6*#	2.45±0.21*#
AUR4h	13.1±5.4*#	2.10±0.14*#
AUR6h	8.9±4.8*#	1.55±0.07*#

*:与对照组比较,$P<0.05$;#:与 AUR0h 组比较,$P<0.05$

3 讨论

急性尿潴留是泌尿系统最常见的急症之一。然而,目前临床上除了留置尿管等待逼尿肌功能恢复外,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)方法均令人失望[4]。长期留置尿管,很多患者在拔除尿管短时间内再次出现 AUR,除考虑出现新的梗阻因素而外,大多数患者均伴有不同程度的逼尿肌收缩乏力[5]。

根据经典的肌丝滑行理论,平滑肌的收缩有赖于粗细肌丝的相互滑动产生相对位移导致的肌细胞长度变化。这一过程牵涉到神经递质神经受体、各种收缩相关蛋白以及多种酶的激活等事件[6]。而细胞骨架的完整性是维持平滑肌可收缩性的结构基础,同时也是多种损伤机制导致的平滑肌收缩功能障碍的共同通路。HSP27 是一类重要的应激反应分子,是最早发现、也是最具代表性的小分子热休克蛋白之一。研究表明,血管平滑肌细胞中 HSP27 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的保护作用[7]。对子宫平滑肌的研究发现,晚期妊娠和分娩状态下的子宫肌层 HSP27 表达和磷酸化显著上调很有可能是分娩过程中子宫收缩力增强的重要因素之一[8]。在气道平滑肌中,周期性的机械牵张刺激可导致细胞内 HSP27 磷酸化水平增加,维持细胞内微丝蛋白稳定性,并增强肌细胞的收缩功能[9]。本研究结果表明 AUR 继发的逼尿肌组织结构损害具有时相特异性,即急性尿潴留发生过程伴随着膀胱在短期内承受超负荷的牵拉刺激,然而 AUR 导致的膀胱收缩功能障碍并没有随着牵拉负荷的解除而消失。在时相上表现为尿潴留早期收缩功能受损相对较轻(甚至会出现代偿性增强),而留置尿管解除梗阻后膀胱功能损害随时间继续加重的特点。同时,膀胱逼尿肌中 HSP27 的表达也呈现出类似的时相性特征。因此,本文推测,逼尿肌牵张应激反应后 HSP27 的上调很可能对细胞有一定的保护作用,而解除梗阻后由于应激刺激的解除导致 HSP27 保护机制的减弱,则很有可能使逼尿肌组织结构的损害进行性加重,从而导致逼尿肌收缩功能损害加剧或延迟恢复。



a:对照组;b:AUR0h;c:AUR2h;d:AUR4h;e:AUR6h

图 1 HSP27 在 AUR 后不同时相点组织免疫荧光染色(×250)

[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] Suskind AM, Smith PP. A new look at detrusor underactivity: impaired contractility versus afferent dysfunction[J]. Curr Urol Rep, 2009, 10(5): 347 – 351.

[5] Thorne MB, Geraci SA. Acute urinary retention in elderly men[J]. Am J Med, 2009, 122(9): 815 – 819.

[6] Batts TW, Klausner AP, Jin Z, et al. Increased expression of heat shock protein 20 and decreased contractile stress in obstructed rat bladder[J]. J Urol, 2006, 176(4 Pt 1): 1679 – 1684.

[7] 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.

[8] 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.

[9] Chaudhuri S, Smith PG. Cyclic strain-induced HSP27 phosphorylation modulates actin filaments in airway smooth muscle cells[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2008, 39(3): 270 – 278.

(编辑:余汇洋)

· 个案与短篇 ·

肝内胆管囊腺瘤误诊 2 例报告

田 驹,于聪慧,余昌中 (北京军区总医院肝胆外科,北京 100700)

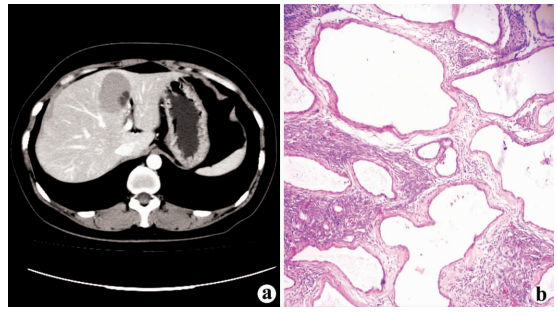
[关键词] 肝内胆管囊腺瘤;误诊;诊断
[中图分类号] R735.8 [文献标识码] B [文章编号] 1672-5042(2011)02-0126-01

肝胆管囊腺瘤起病缓慢,病程长,早期缺乏特异性临床症状,诊断起来困难,容易误诊[1]。我科 2007 年至 2009 年共收治 2 例,其中肝内胆管囊腺瘤 1 例,囊腺瘤癌变 1 例。本文就此 2 例患者的临床资料回顾分析如下。

1 临床资料

病例 1,女,49 岁。因肝囊肿开窗术后 3 个月伴发热、上腹疼痛入院。查体:右上腹可触及直径约 10.0 cm 质硬包块。查甲胎蛋白(AFP)、癌胚抗原(CEA)、CA-199 均正常。腹部 B 超示:肝内巨大囊性无回声区,内多个分隔,透声差。腹部 CT:肝左叶巨大囊性肿块,密度不均,边界清,囊内多个分隔及不规则点状高密度影,CT 值约 89.39 Hu;增强扫描肿块低密度区无强化,内部分隔明显强化。MRCP:腹腔内 18.5 cm × 16.0 cm × 11.0 cm 的多发、分叶状,信号不均匀囊性肿物。入院后在全麻下行肝胆管囊腺瘤切除术。术中见肿物位于左肝内叶胆管,完整摘除肿物,并将长出肿物的胆管壁切除。术后病理报告:肿物大小 17.0 cm × 15.0 cm × 7.5 cm,切面呈多囊性,局部实性,灰白色,囊内见清亮液体。病理诊断:肝内多房性胆管囊腺瘤,部分为多房性浆液性囊腺瘤改变,部分为粘液性囊腺癌。术后恢复好,随访 2 年无复发。

病例 2,女,39 岁。因发现肝脏肿物 2 个月入院。查体无明显阳性体征。化验甲胎蛋白(AFP)等生化检验均正常。B 超检查诊断为肝血管瘤。腹部 CT 诊断:肝囊肿伴囊内出血(图 1a)。入院后在全麻下行肝胆管囊腺瘤切除术,术中见肝左内叶暗红色肿物,质软,边界清楚。距肿物包膜 1 cm 完整切除肿物。术后病理证实为(肝脏)胆管囊腺瘤(图 1b)。术后恢复好,随访 1 年无复发。



a:腹部 CT 显示肝左内叶类圆形肿物,内见低密度区,边界清,大小约 5.8 cm × 3.9 cm × 5.5 cm,CT 值约 77 Hu。增强扫描肿物未见强化;b:胆管囊腺瘤病理组织切片显示局部上皮增生活跃(HE 染色 ×100)

图 1 胆管囊腺瘤 CT 和病理组织切片

(下转第 129 页)

[收稿日期] 2010-11-28 [修回日期] 2010-12-23