维普资讯 http://www.cqvip.com

局解手术学杂志 2004年第13卷第4期
J Regional Anat & Operative Surg, 2004, Vol.13, No.4

不同发育阶段大鼠膀胱组织结构及Cx26表达变化的观察

罗顺文，叶 钢，张荣贵，江永浩
（第三军医大学附属新桥医院泌尿外科，重庆 400037）

［摘 要］ **目的** 观察不同发育阶段大鼠膀胱组织结构的变化，及连接蛋白connexin 26（Cx26）随组织发育的不同阶段而表达的变化。**方法** 分别取幼年、成年和老年三组大鼠膀胱，测量排空状态下膀胱壁厚度，用HE和PAS法染色观察膀胱壁组织结构变化，同时用免疫组织化学评价Cx26表达情况。**结果** 随着膀胱的发育成熟，膀胱壁组织显著增厚，逼尿肌肌纤维增粗，固有层结缔组织增加。早期Cx26在移行细胞层表达较弱，在成年期后稳定高表达。**结论** 在膀胱的发育过程中，组织结构发生显著变化，成年后移行细胞表达Cx26显著增强，与膀胱的发育和功能密切相关。

［关键词］ 膀胱；connexin 26；组织结构
［中图分类号］ R322.62；Q954.48 ［文献标识码］ A ［文章编号］ 1672－5042(2004)04－0220－03

Changes of tissue structure and Cx26 expression in rat bladder in different developmental stages

LUO Shun-wen, YE Gang, ZHANG Rong-gui, JIANG Yong-hao
(Department of Urology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To observe the changes of the tissue structure and connexin 26 (Cx26) expression in rat urinary bladder in different developmental stages. **Methods** Rats were divided into three groups (infant, adult, and the old). Rat urinal bladders were collected from the 3 groups for measurement of the thickness of bladder wall in empty status. The changes of tissue structure were observed by HE and PAS stainings. Cx26 expression was determined by immunohistochemistry. **Results** With the development of the bladder, the wall of urinary bladder became thicker, and the fibrin of the detrusor and the connective tissue in basal layer increased. Weak Cx26 expression was found in transitional epithelial cells in the infant urinary bladder, but stably high expression of Cx26 in the adult urinary bladder. **Conclusion** Significant changes of the tissue structure of the urinary bladder take place during its growth. The increased expression of Cx26 in transitional cells in the adult urinary bladder may be closely associated with the development and functions of the urinary bladder.

Keywords: urinal bladder; connexin 26; tissue structure

随着膀胱的发育成熟，排储尿功能逐渐完善，组织结构发生变化。细胞表面的连接蛋白介导细胞间的通讯和信息交流，在调节细胞生长、促进发育、维持组织细胞间的稳态起重要作用。连接蛋白Connexin26（Cx26）是连接蛋白家族中的一员，许多实验已证实Cx26在膀胱组织中特异性表达，与膀胱组织的发育和功能维持密切相关。本实验通过普通组织切片和免疫组织化学方法，观察不同发育阶段大鼠膀胱的组织结构变化和Cx26的表达情况。

［作者简介］ 罗顺文（1974－），男，福建省连城县人，主治医师，硕士，主要从事泌尿系肿瘤方面的研究。电话：（023）65221053，Email：luosu2000.student@sina.com
［通信作者］ 叶 钢，教授，主任医师。电话：（023）68774624，Email：gye@mail.xinqiaohospital.com.cn

［收稿日期］ 2004－03－10 ［修回日期］ 2004－05－16

1 材料与方法

1.1 标本

雄性Wistar大鼠（本校动物实验室提供），按实验要求分三组：幼年组（出生1 d的乳鼠），成年组（6月龄），老年组（30月龄）。每组各12只。各组大鼠断颈处死后，立即切开腹壁，眼科镊提起膀胱顶部，沿膀胱颈切下膀胱，充分排空尿液，放入10%福尔马林固定24 h。

1.2 主要试剂

苏木素、伊红、1%过碘酸、Schiff试剂等为本院中心实验室提供，兔多克隆抗体（Cx26）及SABC试剂盒为博士德公司产品，DAB显色剂为北京中山公司产品。

1.3 膀胱壁厚度测量

剪开膀胱并平展固定好，垂直切开膀胱壁，用标尺测量膀胱壁厚度（为膀胱完全空虚收缩状态的厚度），每个膀胱分别测量3个部位，求平均值。

1.4 组织学观察

各组标本经脱水，石蜡包埋切片，片厚4 μm，HE染色和

维普资讯 http://www.cqvip.com

PAS法染色，分别观察膀胱壁各层细胞和细胞外基质情况。

1.5 免疫组织化学法观察 Cx26 表达

切片脱蜡、水化后，PBS 冲洗 3 次，每次 5 min，加 1 滴过氧化物酶阻断液孵育 10 min。蒸馏水冲洗后，在 0.01 mol/L 柠檬酸缓冲液中修复抗原，正常山羊血清(1%)孵育 20 min，倾去血清滴加一抗(Cx26 以 1∶100 稀释)，37 ℃孵育 3 h，依次加二抗、PBS 冲洗 3 次，每次 5 min，滴加链霉菌抗生物素蛋白－过氧化物酶溶液，37 ℃孵育 20 min，DAB 显色 5 min，冲洗后苏木素复染，脱水，透明，中性树胶封固。PBS 代替一抗作为阴性对照。分别观察移行上皮、固有层和肌层中的表达情况，结果行半定量分析并评分。在高倍显微镜下(×400)观察，计 100 个细胞，根据着色程度及着色细胞百分数进行判定：阴性(0)，整张切片无着色；弱阳性(1)，浅黄色，阳性细胞数 < 30%；阳性(2)，棕色，阳性细胞 30% ~ 70%；强阳性(3)，棕黄色或深棕色，阳性细胞数 > 70%。

1.6 统计学处理

结果以均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示，采用 SPSS 统计软件，t 检验确定差异显著性。

2 结果

2.1 膀胱壁厚度测量

在膀胱排空期，幼年组膀胱壁厚度(0.993 ± 0.026) mm，成年组(1.173 ± 0.037) mm，老年组(1.185 ± 0.045) mm。幼年组比成年组和老年组薄($P < 0.01$)，而成年组和老年组之间无明显差异($P > 0.05$)。

2.2 膀胱组织结构观察

HE 和 PAS 染色观察各组标本结构完整，移行上皮层和固有层皱缩成乳头状皱襞，肌层由内纵、中环、外纵三层平滑肌组成，各层肌纤维相互交错，分界不清，外膜主要为疏松结缔组织。各组比较可见(图 1,2,3)：①幼年组膀胱平滑肌肌束菲薄，排列疏松，PAS 胞浆染色较淡，成年组和老年组平滑肌肌纤维发达，PAS 染色深红，排列致密；②幼年组膀胱固有层组织少，移行上皮紧挨着内层平滑肌，成年组和老年组固有层结缔组织发达，PAS 染色深，约 3 ~ 5 层粗丝状纤维与上皮层平行排列；③成年组和老年组移行上皮排列紧密，游离面平整，出现较多胞浆呈空泡状圆形或卵型"盖细胞"，幼年组移行细胞排列较紊乱；④老年组和成年组无明显区别。

2.3 Cx26 在各组中的表达

免疫组织化学染色结果可见 Cx26 广泛分布于各层组织(图 4,5,6)，主要表达在平滑肌细胞和移行上皮细胞，固有层组织中表达微弱，然而在三组中的分布存在显著差异。幼年组 Cx26 表达较弱，染色淡黄，成年组和老年组移行上皮细胞中呈强阳性表达，染色呈棕黄色或黄褐色。幼年组移行上皮层与其余两组有非常显著差异($P < 0.01$)，三组间肌层和固有层表达无差异($P > 0.05$)，积分见表 1。

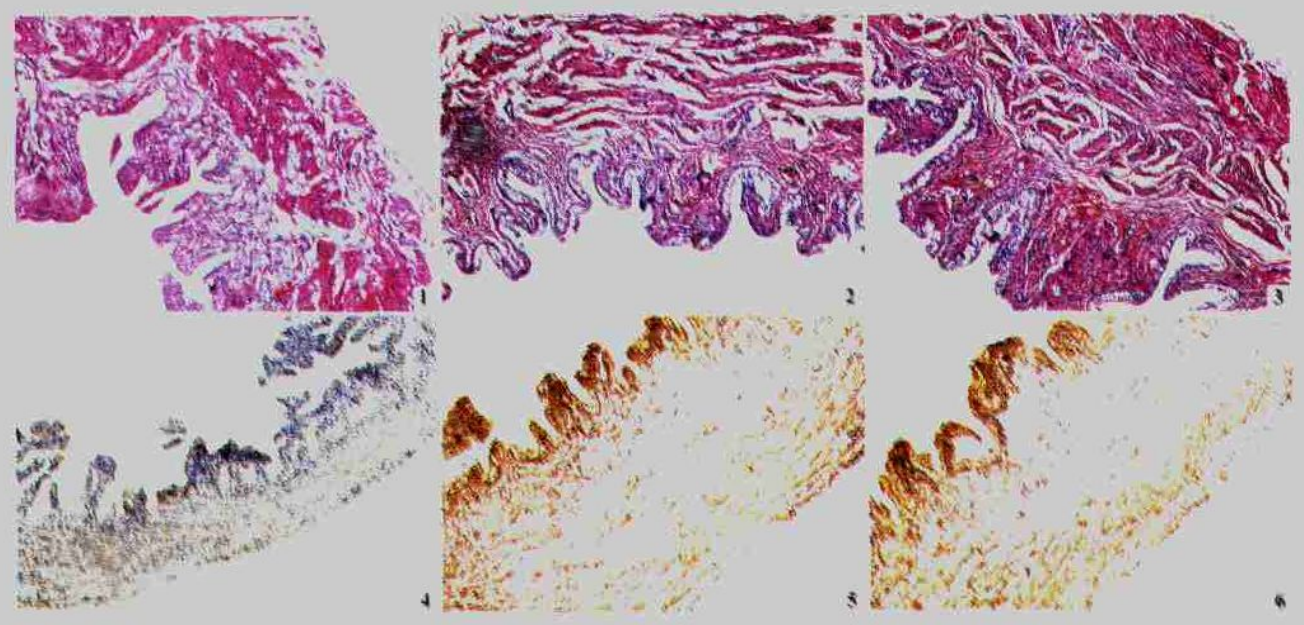


图 1 乳鼠膀胱逼尿肌菲薄，固有层纤维组织少，移行上皮紧贴肌层 (HE × 100)
图 2 成年鼠膀胱逼尿肌发达，肌束增粗增多，固有层纤维组织增多 (HE × 100)
图 3 老年鼠膀胱逼尿肌发达，肌束增粗增多，固有层纤维组织增多 (HE × 100)
图 4 乳鼠膀胱组织中 Cx26 表达较弱，逼尿肌层和移行上皮细胞表达稍强，固有层表达微弱 (免疫组化 × 100)
图 5 成年鼠膀胱组织中 Cx26 表达强，逼尿肌层和移行上皮细胞呈强阳性表达，固有层表达微弱 (免疫组化 × 100)
图 6 老年鼠膀胱组织中 Cx26 表达强，逼尿肌层和移行上皮细胞呈强阳性表达，固有层表达微弱 (免疫组化 × 100)

维普资讯 http://www.cqvip.com

表1 各组组织 Cx26 表达积分($\bar{x} \pm s$)

	幼年组	成年组	老年组
移行上皮层	1.54±0.58	2.92±0.28*	2.92±0.30*
固有层	0.83±0.68	0.87±0.48	1.01±0.47
平滑肌层	2.05±0.62	2.16±0.38	2.08±0.28

注:与幼年组比较, * $P<0.01$;在同组中与固有层和肌层比较, * $P<0.05$

3 讨论

膀胱随着个体发育,组织结构不断发育成熟,组织细胞间协同作用完成储尿和排尿功能。其基本组织结构由移行上皮细胞层、固有层结缔组织、逼尿肌层组织和外膜组成,外膜除了在顶部有浆膜外,其余部位为疏松结缔组织。连接蛋白介导缝隙连接细胞间通讯(gap junction intercellular communication, GJIC), GJIC 在调节细胞生长、促进分化、维持器官功能和组织细胞间的稳态起重要作用[1-2]。

在膀胱发育过程中,组织结构发生了变化,本文通过测量膀胱壁厚度发现成年组和老年组膀胱壁无明显差别,比幼年组膀胱壁显著增厚。通过 HE 和 PAS 染色,观察到膀胱壁增厚主要与逼尿肌肌纤维发达,肌束增宽,固有层结缔组织增多,纤维呈多层条状排列有关。而成年组和老年组膀胱移行上皮层排列比幼年组更加致密,出现较多胞浆呈空泡状圆形或巨型"盖细胞",与膀胱适应不同阶段的功能有关。

目前已经发现,Cx26 是连接蛋白家族中的一员,许多体内外实验证实在膀胱组织中特异性高表达,与膀胱组织细胞的分化成熟及膀胱功能密切相关,在许多疾病中连接蛋白表达异常,如炎症、不稳定膀胱和长期膀胱出口梗阻等疾病,发现连接蛋白表达异常[3]。尤其与肿瘤的关系越来越受关注。在肿瘤组织和肿瘤细胞系中 Cx26 表达下降,多种致癌因素诱导 Cx26 表达下降,有实验通过诱导肿瘤细胞 Cx26 的高表达,逆转恶性表型,促进细胞凋亡,Cx26 是有巨大潜力的抑癌基因[4-6]。Cx26 在发育的各个时期表达是否一致?本文认为 Cx26 在各层组织表达不同,且各个时期表达不尽一致,主要表达在移行上皮细胞中,在幼年期表达较弱,成年期后稳定高表达在移行细胞层。Cx26 的表达与膀胱的发育和功能有密切关系。然而 Cx26 表达的调节机理和在各个发育阶段具体起何作用,尚需进一步研究。

[参考文献]

[1] Yamasaki H, Krutovskikh V, Mesnil M, et al. Role of connexin (gap junction) genes in cell growth control and carcinogenesis[J]. C R Acad Sci Ⅲ, 1999, 322(2-3): 151-159.

[2] 邱国松,陈君柱. 连接蛋白及细胞间连接通讯的调控[J]. 国外医学·分子生物学分册, 1999, 21(3): 144-148.

[3] John H, Wang X, Wehrli E, et al. Evidence of gap junctions in stable nonobstructed human bladder[J]. J Urol, 2003, 169(2): 745-749.

[4] Gee J, Tanaka M, Grossman HB. Connexin 26 is abnormally expressed in bladder cancer[J]. J Urol, 2003, 169(3): 1135-1137.

[5] Tanaka M, Grossman HB. Connexin 26 gene therapy of human bladder cancer: induction of growth suppression, apoptosis, and synergy with Cisplatin[J]. Hum Gene Ther, 2001, 12(18): 2225-2236.

[6] Tanaka M, Fraizer GC, De La Cerda J, et al. Connexin 26 enhances the bystander effect in HSVtk/GCV gene therapy for human bladder cancer by adenovirus/PLL/DNA gene delivery[J]. Gene Ther, 2001, 8(2): 139-148.

(编辑:余汇洋)

(上接219页)

胱白,主诉畏寒,易疲劳,食欲差,腰部不适,舌淡苔薄白水滑,脉缓细而无力。查体:咽部无充血,扁桃体不大,心肺及腹部检查未见异常。

2 方法与结果

余给患者用补肾温阳,健脾益气。如附子汤加减:制附子12 g,肉桂2 g,炙黄芪15 g,红参10 g,桂枝10 g,茯苓15 g,白术10 g,白芍8 g,炙甘草5 g。五剂,水煎服,每次150 ml,每日3次口服。二诊,畏寒及疲劳感有所减轻,舌淡苔薄白而润。脉缓细无力。尿常规示:蛋白+~++,红细胞5~8/HP。上方加山药30 g,菟丝子15 g,五剂。三诊,患者已无腰部不适感,仍有轻微畏寒、疲劳感。尿常规未见异常。上方附子改为5 g,继用五付,同时口服自制的温阳补痛、健脾益气的红日再造丸9 g,每日2次,及活血化瘀的通脉活络丸9 g,每日2次。四诊时,患者仍自觉怕冷、易疲劳,复查尿常规阴性。给予红日再造丸,每次1粒,每日3次口服;通脉活络丸1丸,每日1次。半年后患者无畏寒、疲劳感,尿常规阴性,即停服红日再造丸与通脉活络丸。随访至今,未再复发。

3 讨论

紫癜性肾炎的临床辨证中,以热毒血瘀证、血热证、瘀血阻络证、阴虚夹瘀证及气虚证为最多,湿热证、寒凝血滞证和脾肾两虚证较少。患者平素既有畏寒喜暖的习惯,在感受风寒后感冒发烧,继而出现皮疹,在当地医院查尿常规发现有蛋白尿,随后到本院治疗。根据患者体重和脉症,作者辩证为脾虚不能统摄、肾亏失于封藏导致蛋白及红细胞不循常而渗出于尿液,表现为紫癜性肾炎的一系列表现。故用益气温经、祛寒化水的附子汤加减,标本兼治:再用丸药以改变体质,以冀恢复脾肾功能,经半年治疗获得了满意的效果。

(编辑:黄春霞)