DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.09.013
第26卷第9期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 9
2004年5月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE May. 2004

文章编号:1000-5404(2004)09-0781-03

论著

逼尿肌不稳定中钙激活钾/氯通道mRNA表达差异的实验研究

杨 航,宋 波,金锡御,杨 昕 (第三军医大学西南医院全军泌尿外科中心,重庆 400038)

提 要:目的 探讨钙激活钾/氯通道在正常和不稳定逼尿肌组织中的mRNA表达变化。方法 雌性Wistar大鼠采用会阴部尿道结扎法制作成膀胱出口梗阻(bladder outlet obstruction, BOO)模型,经清醒状态膀胱测压确定逼尿肌不稳定(detrusor instability, DI)后,提取正常与DI逼尿肌组织mRNA,以RT-PCR方法研究组织中大电导钙激活钾通道(big conductance calcium activated potassium channel, Bkca)、小电导钙激活钾通道(small conductance calcium activated potassium channel, Skca)、钙激活氯通道(calcium activated chloride channel, Clca)的mRNA表达,凝胶成像分析比较其差异性变化。结果 大鼠尿道梗阻后DI发生率76.17%,膀胱容量及最大逼尿肌压显著增加($P<0.01$)。钙激活钾/氯通道在两组大鼠逼尿肌中均有表达,其中Bkca、Skca2、Skca3明显降低,而Clca明显升高。结论 钙激活钾/氯通道的表达改变可影响逼尿肌兴奋性的反馈调节,在逼尿肌不稳定的发病机制中有重要作用。

关键词:逼尿肌不稳定;钙激活钾通道;钙激活氯通道;逆转录聚合酶链式反应;mRNA表达
中图法分类号:R322.62;R394.2;R694.5 文献标识码:A

Different mRNA expressions of calcium activated channels in normal and instable detrusors

YANG Hang, SONG Bo, JIN Xi-yu, YANG Xin (Urology Research Center, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To study the different mRNA expressions of big and small conductance calcium activated potassium channels (Bkca and Skca), and calcium activated chloride channels (Clca) in normal and instable detrusors. **Methods** Model of bladder outlet obstruction (BOO) of female Wistar rats was prepared by ligating the proximal urethra in the perineum. Detrusor instability (DI) was confirmed by conscious cystometry. The mRNA was extracted from the detrusors of normal and DI rats for the detection of the expressions of Bkca, Skca2, Skca3, and Clca by RT-PCR. The different channel expression between normal and instable detrusors was identified by gel imaging. **Results** The incidence of DI in BOO rats was 76.17%. Bladder capacity and the maximal detrusor pressure increased significantly ($P<0.01$). Both Kca and Clca expressed in normal and instable detrusors. The expressions of Bkca, Skca2, and Skca3 significantly decreased, whereas Clca significantly increased in DI. **Conclusion** Kca and Clca may play an important role in the modulation of detrusor activity and the development of DI.

Key words: detrusor instability; calcium activated potassium channels; calcium activated chloride channels; RT-PCR; mRNA expression

逼尿肌不稳定(detrusor instability, DI)表现为逼尿肌自发性的无抑制收缩,近年研究表明肌源性因素是其重要机制之一,其中钙是调节肌细胞兴奋和收缩的主要离子,钙内流增加是DI发生的重要原因[1],但临床应用钙阻断剂并未取得预期疗效[2]。因此钙相关的调节机制在维持逼尿肌正常功能及其在DI中的变化和作用值得深入研究。

本实验观察了正常与DI逼尿肌中与钙相关并起重要调节作用的钙激活钾/氯离子通道的mRNA表达变化,为深入探讨钙相关的调节机制在DI发生中的作用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 健康雌性Wistar大鼠30只(第三军医大学实验动物中心提供),体质量120~150 g,分为正常组8只,梗阻组22只。

1.1.2 仪器设备 Gene Cycler PCR仪,凝胶成像扫描仪Doc

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30277920)
Supported by the National Nature Science Foundation of China (30277920)
作者简介:杨 航(1968-),男,四川省成都市人,博士,主治医师,主要从事膀胱的生理及病理方面的研究。电话:(023)68754186
通信作者:宋 波,电话:(023)68754186
收稿日期:2003-07-08;修回日期:2003-12-10

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Gel 2000 均为美国 Bio-Rad 公司产品。紫外分光光度仪 Du-640 (Beckman, USA), 尿动力仪(成都维信有限公司 Nidoc970 型), 微量灌注泵(美国 3M 公司)。

1.1.3 试剂 *Taq* DNA 聚合酶(5 U/μl), AMV 逆转录酶(10 U/μl), Oligo(dT), dNTP(10 mmol/L), RNAsin(RNA 酶抑制剂)(40 U/μl), PCR Marker 均购自 Promega 公司。Tripure 购自 BM 公司。DEPC(焦磷酸二乙酯)购自 Sigma 公司。溴化乙啶, 琼脂糖购自华美生物工程公司, 其它均为国产分析纯试剂。

1.1.4 引物 Bkca、SKca2、SKca3 引物以 DNAstar 软件设计, 并经 BLAST 验证, Clca 引物参照文献[3], 由上海 Sangon 公司合成, 以三蒸水配制成工作液(浓度为 10 pmol/μl), 序列见表 1。

表 1 钙激活钾/氯通道及内参照 RT PCR 引物序列

Tab 1 Primers for calcium activated channels and controls

	GenBank No.	Length (bp)	Sequence (sense/reverse)	Annealing temp.
Bkca	AF135265	412	GCGGGGGCAAGACGAAGGA	58 ℃
			ACGGGAGGGACTGTGAAGAAATC	
Skca2	U69882	414	CTTCTCCTATGCCCCTTCCACAAC	57 ℃
			ATTCCGGTAAGCAAGCAGACTCCT	
Skca3	AF284345	483	GAAGCATCCGGGCCCTCAACAA	58 ℃
			TGGCGTGGTCAATCTTCTTTAGCA	
ClCa	AF077303	110	ACTTCCGGTCTGATACCTAA	50 ℃
			TTGGCCAGAATTGCAATGTA	
β-actin	NM-031144	240	TAAAGACCTCTATGCCAACACAGT	
			CACGATGGAGGGCCCGGACTCATC	

1.2 方法

1.2.1 Wistar 大鼠 DI 模型制备 大鼠麻醉后仰卧固定, 直径 1 mm 探子插入尿道。于会阴部尿道与阴道之间分离尿道, 在尽量靠近膀胱颈处 1 号丝线缝扎, 6 周后经下腹部于膀胱顶部导入测压导管, 对照组同期置管。

1.2.2 充盈性膀胱测压 大鼠置于测压笼中, 导管于背部引出, 经三通管分别与尿动力仪及微量灌注泵相连, 充盈性膀胱测压并确定 DI。

1.2.3 逼尿肌总 RNA 的提取 大鼠击昏后迅速取出膀胱, 于冰 DEPC 水中去除粘膜和浆膜并剪碎, 按 Tripure 说明书一步法提取总 RNA, 测定 A_{260}/A_{280} 比值并定量, 以比值大于 1.8 者为可用。

1.2.4 逆转录反应 各样品 RNA 取 2 μg, 加入 Oligo dT 1 μl, DEPC 水补足至 13.5 μl, 混匀后低速离心, 70 ℃孵育 5 min, 冰浴 2 min, 转录体系中依次加入: RNAsin 0.5 μl, dNTP 1 μl, 5× Buffer 4 μl, AMV 1 μl, 42 ℃孵育 60 min, 95 ℃× 10 min, 冰浴 10 min, 合成的 cDNA 于 −20 ℃保存。

1.2.5 PCR 扩增反应 采取多重 PCR 反应体系, 分别加入: 10× PCR Buffer 2.5 μl, $MgCl_2$ (25 mmol/L) 1.5 μl, dNTP 0.5 μl, cDNA 产物 1.5 μl, 离子通道及 β-actin 引物各 1.5 μl, *Taq* 酶 0.5 μl, 补水至总体积 25 μl。PCR 循环设定: 95 ℃× 5 min 预变性后, 94 ℃ 变性 30 s, 褪火 30 s, 72 ℃延伸 30 s, 共 35 个循环, 随后 72 ℃延伸 5 min。PCR 产物 5 μl 于 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 紫外光凝胶成像并测定光密度值, 与相应的内参照 β-actin 比值表示为最终结果。

1.3 统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用 SPSS 程序 t 检验。

2 结果

2.1 大鼠膀胱测压

梗阻组存活 17 只, 测压有不稳定收缩波的 13 只, 模型成功率 76.17% (13/17), 单位时间无抑制性收缩发生率为(1.38 ± 0.80)次/min。正常组膀胱测压曲线平滑, 排尿反射波形正常, 梗阻组可见锯齿状无抑制收缩波, 无明确排尿反射。

2.2 RT-PCR

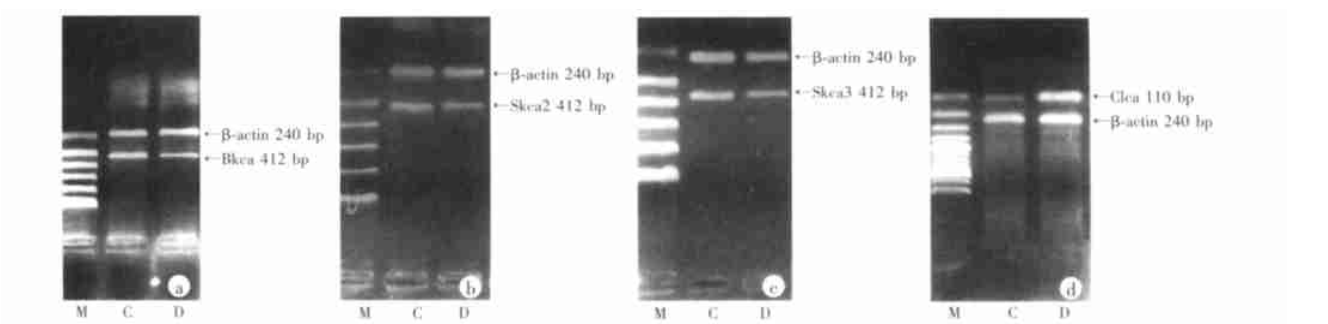
两组逼尿肌中均有钙激活钾/氯通道的 mRNA 表达, 其中梗阻组 Bkca、SKca2、SKca3 较对照组降低, 而 ClCa 则明显升高, 两组差别具有显著性。结果见表 2, 图 1。

表 2 正常及 DI 逼尿肌中钙激活钾/氯通道 mRNA 表达差异比较 ($\bar{x}\pm s$)

Tab 2 mRNA expression of calcium activated channels in normal and DI detrusors ($\bar{x}\pm s$)

	Bkca	SKca2	SKca3	ClCa
Control	0.65±0.09	0.45±0.06	0.65±0.09	0.39±0.05
DI	0.39±0.07 **	0.36±0.07 *	0.34±0.08 **	0.79±0.12 **

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$, *vs* control



a: Bkca; b: Skca2; c: Skca3; d: Clca; M: Marker; C: Control; D: DI; Internal control: β-actin

图 1 正常及 DI 大鼠逼尿肌中钙激活钾通道及氯通道表达差异比较

Fig 1 Different mRNA expressions of calcium activated K^+ channels and Cl^- channels in control and DI rat detrusors

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

3　讨论

DI 发生的原因以 BOO 最为常见。国外大鼠 DI 模型制作多经下腹部切口, 分离并结扎近端尿道[4,5]。作者于会阴部分离尿道, 不须解剖大鼠盆腔结构, 创伤小且无神经损害, 术后局部瘢痕少, 避免了膀胱变形和尿道缩窄程度的差异, 使同组大鼠的梗阻程度更为接近。假手术可能造成局部瘢痕压迫尿道, 因此并无必要。

多数麻醉药物可抑制排尿反射, 麻醉时正常与 BOO 大鼠膀胱测压曲线均缓慢上升, 并随麻醉深度的变化而出现波动, 与对照大鼠之间并无明显差别。而清醒测压时 BOO 大鼠则有无抑制性收缩波形, 膀胱容量、顺应性及自发性收缩强度与正常鼠有显著差异[4,5]。不抑制排尿反射的药物如乌拉坦和氯胺酮则可能使正常大鼠出现无抑制性收缩[6], 因此, 清醒测压是准确判断 DI 发生的可靠方法。

本实验结果显示对照组测压曲线平滑, BOO 组有明显的无抑制性收缩波, 表明会阴部尿道结扎及清醒测压是制作 DI 模型的一种简单和成功率较高的方法。

肌源性因素是 DI 发生的重要机制之一, 其中钙内流增加和钾外流减少是重要的原因[7], 钙在调节细胞兴奋和收缩中起主要作用, 但钙相关通道在 DI 逼尿肌中的表达和作用尚缺乏深入研究。

Kca 和 Clca 是平滑肌中与钙相关的两种主要通道。胞内肌浆网钙释放和胞外钙内流可激活 Bkca 和 Skca, 分别参与动作电位的复极与快速超极化和细胞电位的后超极化[8~10], 因此 Kca 开放将降低膜电位, 抑制细胞兴奋性。而 Clca 激活后产生的内向电流使细胞膜电位趋于去极化, 增强细胞兴奋性, 这两类通道共同对细胞膜电位进行稳态调节, 并进一步调控肌细胞的收缩[10]。

实验结果显示, DI 逼尿肌 Kca 整体表达水平下降, 而 Clca 表达增加, 提示促进复极化和超极化的外向钾电流减弱, 而引起去极化的内向氯电流增强, 使逼尿肌细胞趋于去极化, 兴奋性增加。因此, 钙相关调节机制改变将影响细胞膜电位的稳定性, 从而导致 DI 的发生。由于 DI 逼尿肌细胞间具有广泛的电偶联, 局部的电活动极易传递到整个膀胱, 形成无抑制性收缩[11]。

本实验提示, 钙激活钾/氯通道的表达的改变影响了逼尿肌兴奋性的反馈调节机制, 深入研究其在 DI 中的作用有助于阐明 DI 的发生机制。

参考文献:

[1] 李　新, 宋　波, 李益人, 等. M 受体及其亚型与逼尿肌功能的关系研究[J]. 第三军医大学学报, 2002, 24(2): 164－166.

[2] Andersson K E. Treatment of overactive bladder: other drug mechanisms [J]. Urology, 2000, 55(5A Suppl): 51－57.

[3] Nakazawa H, Hori M, Murata T, *et al*. Contribution of chloride channel activation to the elevated muscular tone of the pulmonary artery in monocrotaline-induced pulmonary hypertensive rats[J]. Jpn J Pharmacol, 2001, 86(3): 310－315.

[4] Matsuura S, Downie J W. Effect of anesthetics on reflex micturition in the chronic cannula-implanted rat[J]. Neurourol Urodyn, 2000, 19(1): 87－99.

[5] Malmgren A, Sjogren C, Uvelius B, *et al*. Cystometrical evaluation of bladder instability in rats with infravesical outflow obstruction[J]. J Urol, 1987, 137(6): 1291－1294.

[6] Cannon T W, Damaser M S. Effects of anesthesia on cystometry and leak point pressure of the female rat[J]. Life Sci, 2001, 69(10): 1193－1202.

[7] Brading A F. A myogenic basis for the overactive bladder[J]. Urology, 1997, 50(6A Suppl): 57－67.

[8] Herrera G M, Nelson M T. Differential regulation of SK and BK channels by Ca^{2+} signals from Ca^{2+} channels and ryanodine receptors in guinea-pig urinary bladder myocytes[J]. J Physiol, 2002, 541(Pt 2): 483－492.

[9] Herrera G M, Nelson M T. Sarcoplasmic reticulum and membrane currents [J]. Novartis Found Symp, 2002, 246: 189－203.

[10] ZhuGe R, Sims S M, Tuft R A, *et al*. Ca^{2+} sparks activate K^+ and Cl^- channels, resulting in spontaneous transient currents in guinea-pig tracheal myocytes[J]. J Physiol, 1998, 513(3): 711－718.

[11] 卢根生, 金锡御, 宋　波, 等. 逼尿肌不稳定超微结构改变的实验研究[J]. 解放军医学杂志, 2002, 27(3): 219－220.

（编辑　汪勤俭）

作者书写数字须知

根据《关于出版物上数字用法的规定》, 本刊实行三位分节法(即从小数点算起, 向左向右每 3 位分一节, 节间留出一定空隙), 废除千分撇分节法(如 2,431 改为 2 431)。但年份、页数、部队编号、仪表型号、标准号不用三位分节法。中文出现的数字, 凡属计数数值, 一律用阿拉伯数字表示。

本刊编辑部

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net