DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.08.021

论著

文章编号:1000-5404(2004)08-0710-04

P2x受体亚型在大鼠逼尿肌不稳定中的作用研究

杨 昕,宋 波,方 强,金锡御,李为兵 (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P2x受体亚型mRNA在大鼠正常和不稳定逼尿肌中的表达变化。方法 建立逼尿肌不稳定大鼠(detrusor instability, DI)模型,设正常对照,以β-actin为内参照,RT-PCR检测P2X受体各亚型在膀胱中的表达变化。结果 DI大鼠和正常大鼠逼尿肌中未检测到$P2x_6$受体mRNA;$P2x_1$、$P2x_5$和$P2x_7$受体亚型mRNA表达降低;$P2x_2$、$P2x_4$表达量显著增加($P<0.01$);$P2x_3$未发现明显变化。讨论 DI大鼠逼尿肌内P2x受体部分亚型mRNA表达发生变化,这些变化在逼尿肌不稳定的发病机制中可能有重要作用。

关键词:P2x受体;逼尿肌不稳定;逆转录聚合酶链式反应
中图法分类号:R392.2;R694.02 文献标识码:A

Roles of P2x receptor subtypes in detrusor instability

YANG Xin, SONG Bo, FANG Qiang, JIN Xi-yu, LI Wei-bing (Urinary Research Center, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstracts: Objective To study the changes of mRNA expression of P2x receptor subtypes in normal detrusor and detrusor instability (DI) rats. Methods Wistrar rats model of detrusor instability was established by ligating the proximal urethra. Normal control group was employed, and β-actin served as the internal control. Changes of the expression of P2x receptor subtypes in the bladder tissue were detected by reverse transcriptive polymerase chain reaction (RT-PCR). Different mRNA expressions of P2x receptor subtypes were identified. Results No expression of $P2x_6$ receptor mRNA was detected in the detrusors of DI and normal rats. Expression levels of $P2x_1$, $P2x_5$, and $P2x_7$ were significantly decreased, but $P2x_2$ and $P2x_4$ significantly increased in DI rats ($P<0.01$). No change of $P2x_3$ was detected. Conclusion Changes of mRNA in part of P2x receptor subtypes in DI rats may play an important role in the pathogenic mechanisms of detrusor instability.

Key words: P2x receptor; detrusor instability; RT-PCR

逼尿肌不稳定(detrusor instability, DI)是泌尿科常见疾病,其主要表现为尿频、尿急、尿失禁甚至上尿路损害。其发生机制尚不明确。P2x嘌呤受体是近年新发现的一种嘌呤能受体,广泛分布于全身各种组织,主要参与平滑肌的舒缩调节[1]。本研究拟通过RT-PCR检测正常及DI大鼠逼尿肌组织P2x受体各亚型的mRNA表达,以探讨P2x受体在逼尿肌舒缩功能调节中的作用及其与逼尿肌不稳定的关系,为临床治疗逼尿肌不稳定提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康雌性Wistar大鼠21只(由第三军医大学实验动物中心提供),体质量200~250 g。随机奇偶分组法分为正常组8只,梗阻组13只。

1.2 仪器设备

Gene Cycler PCR仪,凝胶成像扫描仪Doc 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Nidoc970A型),微量灌注泵(美国3M公司)。

1.3 引物

$P2x_2$和$P2x_4$引物由DNAstar软件自行设计,$P2x_1$、$P2x_3$、$P2x_5$、$P2x_6$、$P2x_7$引物参照文献[2,3],所有引物均由上海Sangon公司合成,以三蒸水配制成工作液(10 pmol/μl),序列见表1。

1.4 试剂

DEPC(焦碳酸二乙酯)、EB(溴化乙锭)、溴酚兰购自美国Sigma公司;Oligo dT(寡脱氧胸苷酸)、dNTP(脱氧核糖核苷三磷酸)、RNAsin(RNA酶抑制剂)、MMV(逆转录酶)、*Taq* DNA聚合酶购自美国Promega公司;Tripure购自美国BM公司,其它试剂均为国产分析纯试剂。

1.5 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

基金项目:重庆市科技计划项目(2003-31-18)
Supported by Research Project Foundation of Scientific Committee of Chongqing (2003-31-18)
作者简介:杨 昕(1977-),男,云南省大理市人,硕士,医师,主要从事尿动力学方面的研究。电话:(023)68754186
通信作者:宋 波,电话:(023)68754186
收稿日期:2003-10-29;修回日期:2004-03-12

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

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。

表 1　P2x 受体各亚型引物序列

Tab 1　Primer sequences of P2x receptor subtypes

	GenBank No.	Sequence	Length (bp)
$P2x_1$	NM-012997.1	5′-AAAGCAGAAAGGAAAGCCCA-3′	435
		5′-ATACAGTCCGTGGAACTGG-3′	
$P2x_2$	NM-053656.2	5′-CCCGAGGCTCGACCCCAAGTATGA-3′	407
		5′-CTGATGGAGGGCTGGGTGGCTGAT-3′	
$P2x_3$	NM-031075.1	5′-CAACTTCAGGTTTGCCAAA-3′	520
		5′-TGAACAGTGAGGGCCTAGAT-3′	
$P2x_4$	NM-031594.1	5′-CCAGATCAAGTGGGACTGCAACCT-3′	487
		5′-CTCTAGAGTGACAGACGCAG-3′	
$P2x_5$	X92069.1	5′-AGTCATCAACATTGGTTCTG-3′	542
		5′-CAGGAGACCTTCCGTGAAA-3′	
$P2x_6$	NM-012721.1	5′-AGATACCTGGGACAACAC-3′	794
		5′-TCTCTGGGTGAACCTAGGA-3′	
$P2x_7$	NM-019256.1	5′-AGGAGCCCCTTATCAGCTCT-3′	695
		5′-CATTGGTGTACTTGTCGTCC-3′	
β-actin	NM-031144	5′-TAAAGACCTCTATGCCAACACAGT-3′	240
		5′-CACGATGGAGGGGCCGGACTCATC-3′	

1.6　充盈性膀胱测压筛选 DI 大鼠

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。

1.7　组织总 mRNA 提取

逼尿肌组织匀浆, 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。

1.8　RT-PCR

1.8.1　RT-PCR cDNA 第一链合成　　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 (40 U/μl) 0.5 μl、10× dNTP 1 μl、5× Buffer 4 μl、MMV (10 U/μl) 1 μl。混匀后低速离心, 37 ℃孵育 60 min, 95 ℃× 10 min 灭活逆转录酶, 冰浴 10 min; 合成的 cDNA 于−20 ℃保存。

1.8.2　PCR 反应体系　　10 mol/L dNTP 0.5 μl, 10× buffer 2.5 μl, 上下游引物各 1.5 μl, cDNA 1.5 μl。*Taq* 酶 0.5 μl, 以消毒双蒸水补足总体积 25 μl。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。褪火温度如下: $P2x_1$、$P2x_4$ 为 60 ℃, $P2x_2$、$P2x_3$、$P2x_5$ 为 54 ℃, $P2x_6$ 和 $P2x_7$ 为 57 ℃。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吸光度值, 与相应的内参照 β-actin 比值表示为最终结果。

1.9　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　成功建立 DI 大鼠模型

梗阻组存活 13 只, 测压有不稳定收缩波的 10 只, 模型成功率 76.92% (10/13), 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, DI 组均可见锯齿状无抑制收缩波, 无明确排尿反射 (图 1、2)。

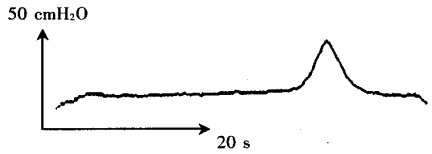


图 1　正常大鼠膀胱测压曲线曲线平滑, 膀胱容量及压力正常, 存在排尿反射

Fig 1　Cystometric curves of the controls show normal capacity, detrusor pressure and micturation reflex

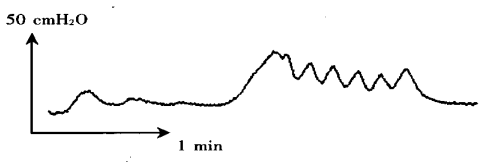


图 2　梗阻大鼠膀胱测压曲线呈不稳定收缩波, 膀胱容量及压力增加

Fig 2　Cystometric curves of DI rats show unstable contractions, increased capacity and detrusor pressure

2.2　RT-PCR 检测结果

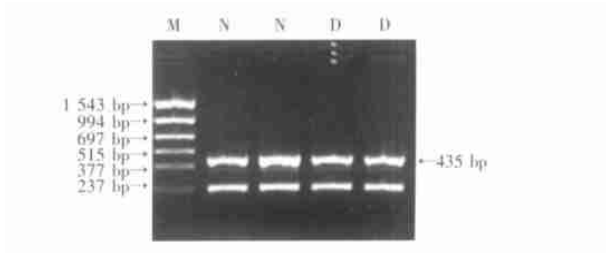
正常及 DI 大鼠逼尿肌中都表达有 6 种 P2x 亚型, 分别为 $P2x_1$、$P2x_2$、$P2x_3$、$P2x_4$、$P2x_5$ 和 $P2x_7$, 而 $P2x_6$ 未见表达; 正常逼尿肌中 $P2x_1$ 受体表达相对较高, 而在 DI 大鼠逼尿肌中 $P2x_1$、$P2x_5$ 和 $P2x_7$ 受体亚型 mRNA 表达降低, $P2x_2$、$P2x_4$ 表达量增加, $P2x_3$ 受体亚型 mRNA 表达未发现明显变化。两组差别具有显著性 (表 2, 图 3~8)。

表 2　P2x 受体各亚型 mRNA 在正常及 DI 大鼠逼尿肌中表达情况 ($\bar{x}\pm s$)

Tab 2　mRNA expressions of P2x receptor subtypes in control and DI rats ($\bar{x}\pm s$)

Group	$P2x_1$	$P2x_2$	$P2x_3$	$P2x_4$	$P2x_5$	$P2x_7$
Control	1.84±0.12 *	0.28±0.09 *	1.34±0.10	0.56±0.09 *	0.53±0.03 *	0.45±0.08 *
DI	1.25±0.15	0.44±0.08	1.37±0.06	1.25±0.09	0.44±0.01	0.20±0.04

*: $P<0.01$, *vs* DI

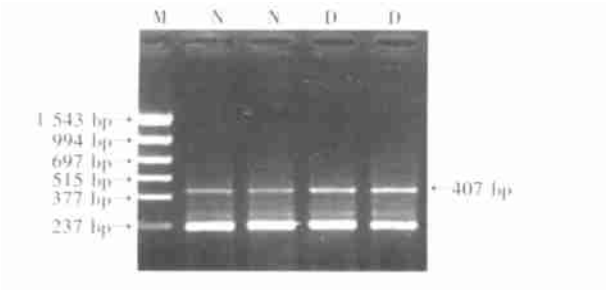


M: Marker, N: Control, D: DI

图 3　$P2x_1$ 受体亚型 mRNA 表达降低

Fig 3　Decreased mRNA expression of $P2x_1$

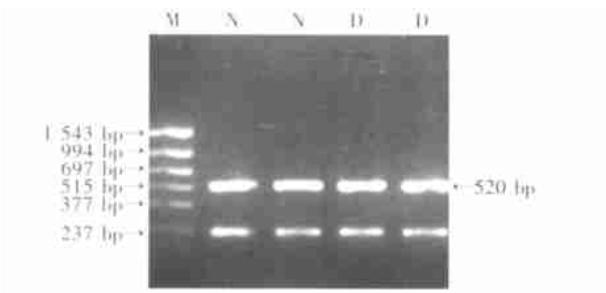
?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net



M：Marker；N：Control；D：DI

图 4 $P2x_2$ 受体亚型 mRNA 表达升高

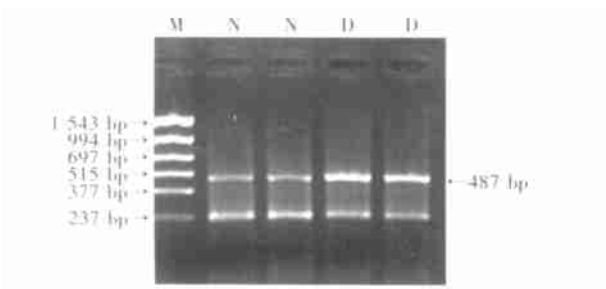
Fig 4 Increased mRNA expression of $P2x_2$



M：Marker；N：Control；D：DI

图 5 $P2x_3$ 受体亚型 mRNA 表达无变化

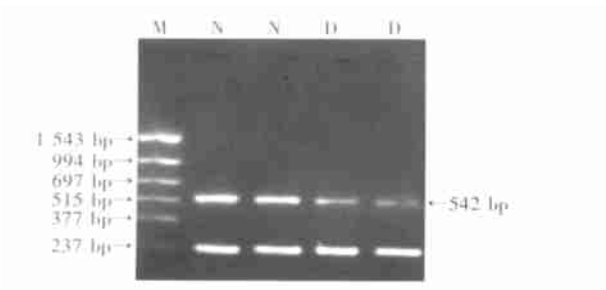
Fig 5 Unchanged mRNA expression of $P2x_3$



M：Marker；N：Control；D：DI

图 6 $P2x_4$ 受体亚型 mRNA 表达升高

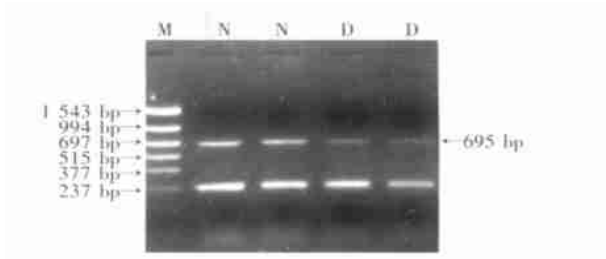
Fig 6 Increased mRNA expression of $P2x_4$



M：Marker；N：Control；D：DI

图 7 $P2x_5$ 受体亚型 mRNA 表达降低

Fig 7 Decreased mRNA expression of $P2x_5$



M：Marker；N：Control；D：DI

图 8 $P2x_7$ 受体亚型 mRNA 表达降低

Fig 8 Decreased mRNA expression of $P2x_7$

3 讨论

逼尿肌不稳定的发生原因很多，神经源性及肌源性因素是其主要的发生机制。继往研究认为梗阻后膀胱内压升高，神经损害，导致膀胱对有关神经递质出现超敏反应是逼尿肌不稳定的产生原因[4]。我们发现，M 受体拮抗剂并不能明显抑制正常和不稳定逼尿肌的自发收缩频率[5]，这一结果强烈提示，胆碱能神经在逼尿肌不稳定的发生中可能不起重要作用。近年国外研究表明非胆碱能非肾上腺素能神经(NANC)是除胆碱能和肾上腺素能神经之外的另一个参与膀胱功能调节重要因素，但相关的研究报道还比较缺乏。

P2x 受体是近年来才发现的一种 NANC 受体，它属于配体门控通道。1994 年 Velera 等和 Brake 等分别从大鼠精索平滑肌和 PC12 细胞克隆得到 $P2x_1$ 和 $P2x_2$ 亚型，此后相继发现了 $P2x_3$～$P2x_7$ 亚型[6]。和其它配体门控通道一样，P2x 受体的激活不需经过膜和胞内信号转导。受 ATP 刺激后，通过蛋白质变构作用非选择性通透如 Na^+、K^+、Ca^{2+} 等阳离子，数毫秒之内即可形成膜电流，从而诱导平滑肌细胞产生相应的收缩或舒张反应，其逆转电位在 0 mV 左右[7]。

P2x 受体的激动剂较多，在体内由于核苷酸酶迅速降解 ATP 和 2- MeSATP，而对 αβ-MeATP 无作用，因此，激动剂作用效力顺序为 αβ-MeATP ＞βγ-MeATP ＞ATP ＝2- MeSATP ＝ADP，但在体外抑制核苷酸酶活性后发现，2- MeSATP 对 P2x 激活作用最强，特异性也最高。目前缺乏 P2 受体亚型特异性的拮抗剂，sura mine 非选择性的抑制 P2x 与 P2y 及其亚型，而 PPADS 对 P2x 具有相对较高的选择性。

目前有关 P2X 亚型在膀胱中的分布及表达仅国外有少量报道。Lee 等[8] 及 Elneil 等[9] 发现，正常大鼠逼尿肌内有 P2x 受体表达，其中 $P2x_1$ 亚型主要分布于逼尿肌细胞膜；$P2x_2$ 主要分布于肌细胞；$P2x_3$ 主要分

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

布于支配逼尿肌的神经束；$P2x_4$ 主要分布于膀胱毛细血管固有膜；$P2x_5$ 主要分布于膀胱上皮细胞；$P2x_6$ 分布于膀胱上皮下的基底膜；而 $P2x_7$ 则分布于膀胱上皮。O' Reilly 等[10] 报道 αβ-MeATP 只在一定程度上增强体外正常逼尿肌条的收缩，而对 DI 逼尿肌条的增强作用非常明显。Wada 等[11] 的膀胱测压结果表明，正常及尿道出口梗阻（BOO）大鼠膀胱最大收缩压在阿托品作用下分别下降 30％和 60％，再予以拮抗剂 PPADS 可使 BOO 组收缩压进一步降低，而对正常膀胱则无作用。研究结果提示，P2x 受体在逼尿肌中表达并起功能调节的作用，并且其调节作用在 DI 中进一步增强，但对 P2X 受体亚型与 DI 的关系尚缺乏研究。

本研究通过 RT-PCR 检测表明，正常与 DI 大鼠逼尿肌中均表达有除 $P2x_6$ 以外的 6 种 P2x 受体。其中，正常逼尿肌的 $P2x_1$ 表达相对较高，鉴于与 $P2x_1$ 受体在介导 ATP 促平滑肌收缩效应中的作用，初步推断 $P2x_1$ 受体可能在介导嘌呤能神经对逼尿肌功能的调节中发挥重要作用。DI 大鼠逼尿肌中 $P2x_1$、$P2x_5$ 和 $P2x_7$ 亚型 mRNA 表达较正常降低，而 $P2x_2$、$P2x_4$ 表达增加，$P2x_3$ 未发现明显变化。这种亚型表达变化是否是 P2x 受体对 DI 逼尿肌作用进一步增强的重要因素，还需要进一步的深入研究，初步推测 $P2x_2$、$P2x_4$ 有取代 $P2x_1$ 成为主要的调节 DI 逼尿肌功能的嘌呤能受体的可能。

本研究提示，P2x 受体亚型在参与逼尿肌功能的调节中可能发挥着不同的作用，深入探讨其作用机制有助于明确嘌呤能神经在 DI 发生中的作用机制，为 DI 的治疗提供实验依据。

参考文献：

[1] 陈宇东，宋　波，金锡御，等. 血管活性肠肽对大鼠离体逼尿肌肌条自发性收缩作用的实验研究[J]. 河北医科大学学报，2001，22(5)：273－275.

[2] Brandle U，Guenther E，Irrle C，*et al*. Gene expression of the P2x receptors in the rat retina[J]. Mol Brain Res，1998，59(2)：269－272.

[3] Wheeler-Schilling T H，Marquordt K，Kohler K，*et al*. Expression of purinergic receptors in bipolar cells of the rat retina[J]. Mol Brain Res，2000，76(2)：415－418.

[4] de Groat W C. A neurologic basis for the overactive bladder[J]. Urology，1997，50(6)：36－52.

[5] 李　新，宋　波，金锡御，等. M 受体及其亚型与脊髓横断后逼尿肌反射亢进关系研究[J]. 中华泌尿外科杂志，2002，23(8)：501－504.

[6] Buell G，Collo G，Rassendren F. P2x receptors：an emerging channel family[J]. Eur J Neurosci，1996，8(10)：2221－2228.

[7] Ralevic V，Burnstock G. Receptors for purines and pyrimidines[J]. Pharmacol Rev，1998，50(3)：413－492.

[8] Lee H Y，Bardini M，Burnstock G. Distribution of P2x receptors in the urinary bladder and the ureter of the rat[J]. J Urol，2000，163(6)：2002－2007.

[9] Elneil S，Skepper J N，Kidd E J，*et al*. Distribution of P2x(1)andP2x(3) receptors in the rat and human urinary bladder[J]. Pharmacology，2001，63(2)：120－128.

[10] O' Reilly B A，Kosaka A H，Knight G F，*et al*. P2x receptors and their role in female idiopathic detrusor instability[J]. J Urol，2002，167(1)：157－164.

[11] Wada H，Otomo R，Shimoda N，*et al*. Acceleration of ATP-induced contraction in the obstructed bladder of the rat[J]. Nippon Hinyokika Gakkai Zasshi，2003，94(3)：439－447.

（编辑　刘洪娥）

（上接 709 页）

3　讨论

口腔粘膜完整性的维持有赖于机体的免疫系统和口腔上皮的更新速度，唾液的保护作用。尤其是细胞免疫的正常功能。当机体免疫力降低或者免疫失调，全身系统性疾病的影响下，加上口腔自洁作用减弱，口腔内环境改变，其口腔粘膜的完整性遭到破坏而形成口腔溃疡[1]。

口泰液为传统的漱口液，虽然含有洗必泰和灭滴灵，有杀灭致病菌作用，但长期反复使用会杀灭和抑制常居菌，甚至引起真菌感染（二重感染）。同时作为化学消毒剂，对口腔粘膜有一定的刺激和损伤，灭滴灵抗厌氧菌作用明显，但口腔粘膜的愈合主要是依靠口腔粘膜的修复机制，抗感染的意义不大，因而对口腔溃疡作用不明显，并且味道苦涩[2]。

益口含漱液是以含茶多酚和甘草甜素为主，DP300、甘油、维生素 E 等多种成份为辅的口腔含漱液。能有效杀灭细菌、真菌、病毒，抗氧化作用强，维持口腔粘膜完整的同时，能增强毛细血管的韧性、渗透性，增强血管的抵抗力。甘草甜素是中药甘草中的主要组份，研究证明具有抗癌、抗病毒及抗溃疡作用，并含有清甜香味[3,4]。

本研究表明通过含漱茶多酚漱口液，利用口腔肌肉运动形成的压力，随着冲击、振荡、使药液不断循环流动，使口腔溃疡与药物反复接触，可以促使溃疡愈合速度加快，而且毒副作用小，口感舒适，不易产生耐药性，值得临床推广应用。

关键词：重型复发性口腔溃疡；茶多酚含漱液
中图法分类号：R781.505　　文献标识码：B

参考文献：

[1] 李秉琦. 口腔粘膜病学[M]. 北京：人民卫生出版社，1998. 47－64.

[2] 赵佛宽，朱　丹，朱晓玲. 3 种清洁口腔方法效果的临床观察[J]. 山西护理杂志，1998，12(4)：155.

[3] 刘学铭，丁克祥，梁世中. 茶多酚的药理作用研究进展[J]. 广东药学院学报，1998，4(14)：305－310.

[4] 王朝霞，宋丽君，杨里贞. 甘草甜素的研究现状[J]. 中国中西医结合杂志，2002，22(10)：746－747.

（编辑　薛国文）

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