DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.22.015
第25卷第22期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 22
2003年11月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Nov. 2003

文章编号:1000-5404(2003)22-1999-03

论著

糖尿病大鼠膀胱储尿期功能改变的实验研究

熊恩庆,龚 宇,宋 波,金锡御 (第三军医大学附属西南医院全军泌尿专科中心,重庆 400038)

提 要:目的 研究糖尿病膀胱病变(Diabetic cystopathy, DCP)储尿期尿动力学特征及膀胱感觉功能障碍,为阐明DCP的发病机制提供实验依据。方法 分别以链脲佐菌素(STZ)、蔗糖诱导制作大鼠DCP模型及利尿模型,正常大鼠作对照。采用免疫组化结合图像分析技术观察膀胱感觉神经递质CGRP及其纤维改变;制备离体全膀胱,作膀胱灌注测压观察膀胱顺应性改变;放免法测定逼尿肌舒张信号转导分子cAMP。结果 DCP8周时,膀胱壁尤其是粘膜下层的CGRP及其神经纤维明显减少;离体膀胱测压显示糖尿病膀胱顺应性升高;膀胱舒张作用明显弱于对照组和利尿组,逼尿肌cAMP含量显著低于后者。结论 ①DCP对膀胱功能的损害是多方面的:CGRP为主要递质的粘膜下层膀胱容量感觉纤维明显减少,膀胱顺应性改变是DCP的致病机制之一。②DCP早期即已发生储尿期功能障碍,并且可能是膀胱收缩功能损伤的因素。③非糖尿病性利尿状态(多尿)对膀胱功能构成一定的损害作用,但不是DCP形成的主要原因。提示临床上对糖尿病患者作必要的尿动力学检查能较早发现DCP,有助于保护膀胱功能。

关键词:糖尿病膀胱病变;膀胱顺应性;舒张
中图法分类号:R587.1;R694.06 文献标识码:A

Urinary storage dysfunction of diabetic bladder

XIONG En-qing, GONG Yu, SONG Bo, JIN Xi-yu (Center for Urology of PLA, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To provide experimental basis for further study of the mechanism of urinary storage dysfunction of diabetic cystopathy (DCP). **Methods** Steptozotocin (STZ)-induced and sucrose-induced diabetic rats were employed as DCP and diuresis models. Normal rats served as the control. The changes of calcitonin gene-related peptide (CGRP) were analyzed by immunocytochemical method and computer-assisted image analysis software. Compliance of the whole bladder prepared *in vitro* was evaluated by bladder irrigation. The messenger molecule cAMP of detrusor relaxation was determined by radioimmunological assay. **Results** Compared with those in other groups, the CGRP immunoreactive positive nerve fibers and content of this neurotransmitter significantly decreased in the bladder wall, especially in the submucosa. Significantly higher bladder compliance was observed ($P<0.01$). The cAMP of diabetic bladder was significantly lower than that in sucrose-diuresis and control groups, which was (0.37±0.04) Pmol, (0.69±0.09) Pmol and (0.74±0.07) Pmol. **Conclusion** Multiple factors may be involved in DCP. The bladder compliance is important in urinary storage dysfunction of diabetic bladder which appears in the early stage of DCP and may also be harmful for bladder contraction. Non-diabetic diuresis does not play a major role in the development of DCP. Therefore, urodynamic test as early as possible can help to diagnose DCP in diabetic patients.

Key words: diabetic cystopathy; bladder compliance; relaxation

糖尿病膀胱病变(Diabetic cystopathy, DCP)是糖尿病外周神经病变的常见并发症,目前研究认为DCP主要是糖尿病糖代谢紊乱、植物神经病变所致,但由于膀胱功能损害的具体机制尚不清楚[1],因此即使在DCP早期,仍然缺乏有效的临床治疗。而储尿期膀胱感觉、收缩功能障碍及其尿动力学改变在DCP的病程进展中具有重要意义,但这方面的文献报道很少。

基金项目:重庆市科委应用基础基金课题(1998)
Supported by Research Project Foundation for Basic and Application of Scientific Committee of Chongqing (1998)
作者简介:熊恩庆(1952-),男,安徽省合肥市人,教授,主要从事泌尿系统疾病的基础和临床方面的研究,发表论文30余篇。电话:(023)68754186
通信作者:宋 波,电话:(023)68754168
收稿日期:2002-09-06;修回日期:2003-03-05

1 材料和方法

1.1 动物模型与分组

Wistar大鼠73只,雌雄不拘,分为正常对照组(20只)、蔗糖利尿组(25只)、糖尿病组(28只)。糖尿病组:大鼠禁食12 h,

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

1%链脲佐菌素(Steptozotocin, STZ)溶液腹腔注射(50 mg/kg),以连续4周尾静脉血葡萄糖浓度>16.7 mmol/L(ONETOUCH 血糖仪测定),尿糖持续(+++)以上为模型成功;蔗糖利尿组:以5%蔗糖液替代自由进水,余同对照组;3组均自由进食,代谢笼监测饮水及尿量。

1.2 CGRP 神经免疫组化标记

CGRP抗体购自第四军医大学神经科学研究所,组化试剂盒购自Dako公司。采用ABC法,DAB-硫酸镍铵显色。免疫组化染色切片每组选5例,2张作空白对照,在Tiger920图像分析仪上进行分析。计算膀胱壁内CGRP神经的面积、吸光度 A 值、吸光度积分。

1.3 体外全膀胱制备

大鼠麻醉后下腹正中切口,分离结扎双侧输尿管,尽量远离膀胱颈部离断尿道,完整取出膀胱,经尿道插入一硬质导管,结扎固定,经三通管分别连接于灌注泵(3M公司)及尿动力仪(Dentac公司),作膀胱灌注测压。测压过程中,膀胱正位固定于37 ℃、充氧(95%O_2,5%CO_2)、Tyrodes溶液的器官槽内,每次测压前膀胱静置平衡30 min,灌注速度为0.2 ml/min。

1.4 体外全膀胱舒缩试验

全膀胱制备方法同离体膀胱灌注测压,以0.2 ml/min灌注达1/2最大膀胱容量时停止灌注,观察下述因素作用下的膀胱压力改变:①1 mol/L Bet。②1 mol/L Bet作用5 min后,更换肌槽内的Tyrodes液,加入1 mol/L Iso。

1.5 膀胱cAMP含量测定

取出膀胱置于器官槽内(Tyrode's液37 ℃)平衡20 min,加入0.5 mmol/L Bet,10 min后加入0.5 mmol/L Iso,Tyrode's液清洗并排空膀胱、液氮保存,检测时组织匀浆、离心(3 000 r/min,15 min),去上清后真空干燥,0.8 mol/L醋酸缓冲液溶解,按cAMP放免试剂盒说明进行操作。

1.6 统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,行 t 检验。

2 结果

2.1 各组大鼠一般状况

模型建立8周时,糖尿病组体质量明显减少,血糖、尿糖、膀胱湿质量、饮水量及尿量均显著高于其它两组,见表1。而蔗糖利尿组的膀胱湿质量、饮水量及尿量也显著大于对照组。与全膀胱显著肥大、质量增加不同,糖尿病及蔗糖利尿组的膀胱底部并无明显改变,见表2。

表1 各组大鼠一般状况($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 General data of rats in each group($\bar{x}\pm s$)

Group	Body weight(g)	Blood glucose level (BGL)(mmol/L)	Urine glucose level
Control	250.7±14.5	2.66±0.28	−
Sucrose	245.3±16.1	2.71±0.24	−
Diabetic	148.2±12.6 *	21.58±2.79 *	+++

*: $P<0.01$ *vs* control

2.2 CGRP及其神经纤维免疫组化结合图像分析

光镜下可见正常大鼠膀胱粘膜下神经丛、肌间神经丛均有丰富的CGRP免疫阳性(CGRP-IR)神经纤维分布,并有部分延伸至平滑肌层,肌层内血管周围亦有较多的CGRP-IR纤维曾环状分布。糖尿病大鼠膀胱壁内粘膜下及肌层CGRP-IR纤维显著减少,尤以粘膜下减少明显;而蔗糖利尿组大鼠膀胱壁内CGRP-IR并无明显减少,但其逼尿肌层纤维较对照组减少。

表2 各组大鼠膀胱情况($\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Changes of bladder and micturition($\bar{x}\pm s$)

Group	Whole bladder Weight of(mg)	Weight of fundus of bladder(mg)	Bladder volume(ml)	Urine volume (ml/24 h)
Control	89.6±5.2	10.3±2.9	1.65±0.2	25±7
Sucrose	182.4±12.7	9.6±3.2	3.67±0.3	126±10
Diabetic	239.2±18.5 *△	11.4±4.1	5.42±0.7 *△	193±34 *△

*: $P<0.01$ *vs* control; △: $P<0.01$ *vs* Sucrose group

图像分析结果显示,与对照组及蔗糖利尿组比较,糖尿病组CGRP神经分布和含量均呈显著下降,而前两组之间差别则无显著性意义,见表3。

表3 各组大鼠膀胱CGRP神经图像分析结果比较($\bar{x}\pm s$)

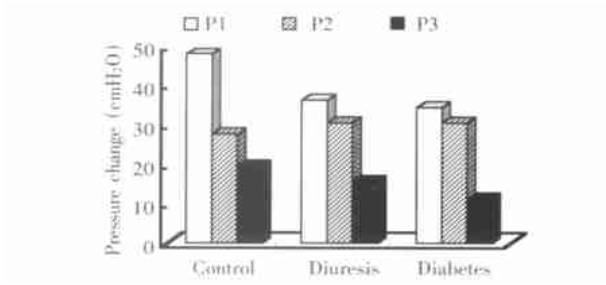
Tab 3 CGRP immunochemical analysis($\bar{x}\pm s$)

	Absorbency A value (AAV)	Absorbency Integral (AI)
Control	3.3±0.5	28.4±3.0
Sucrose	3.4±0.6	26.5±4.1
Diabetes	2.2±0.4 *	15.5±4.8 *

*: $P<0.01$ *vs* control

2.4 体外全膀胱收缩及舒张实验

3组膀胱加入Bet后膀胱压(P1)组内比较均显著升高,而组间比较糖尿病组则显著低于其它组;Bet作用5 min后各组膀胱压(P2)均明显下降,加入Iso后3组膀胱压均有降低,但组间比较糖尿病组较其它组下降幅度(P3)减少,见图1。



Significantly less changes of pressure to bet and Iso in diabetic group than those the other two groups ($P<0.05$)

图1 离体膀胱的收缩/舒张反应

Fig 1 Contraction/relaxation responses of bladder *in vitro*

2.5 膀胱cAMP含量测定

糖尿病组显著低于利尿组及对照组,分别为(0.37±0.04),(0.69±0.09),(0.74±0.07) pmol/L($P<0.05$)。

3 讨论

植物神经病变是糖尿病多种慢性并发症的共同病

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

因,累及多个器官且具有长期潜在的危险性,其中40%~80%的糖尿病人患有糖尿病膀胱病变[2]。已明确DCP实质上主要是糖尿病时糖代谢紊乱、植物神经病变所致,特点是尿量增多、排尿反射减弱、膀胱容量增大、出现残余尿,由此而引起尿频、排尿不尽、充溢性尿失禁、肾功能不全等相应症状。但其膀胱功能损害的具体机制尚不清楚,因此临床治疗缺乏针对性,疗效不佳[3]。

由于糖尿病大鼠较对照组大鼠膀胱逼尿肌明显代偿性肥大,为排除膀胱体积增大及逼尿肌肥大对观测结果和分析的影响,本实验增设了5%蔗糖喂养组大鼠,后者由高浓度蔗糖导致利尿状态进而逼尿肌代偿性肥大,能出现大部分糖尿病鼠的膀胱功能改变,即膀胱的非神经原性病变,而同时无代谢紊乱,因此设立饮蔗糖组有利于正确判断结果,同时可以探讨单纯利尿状态在DNB致病机制中的作用。

膀胱壁内的神经支配较为复杂,除了肾上腺素能及胆碱能神经以外,肽能神经的存在日益受到重视[4]。CGRP是同源降钙素(CT)在基因转录加工过程中不同的翻译产物之一,为37个氨基酸组成的多肽,不同种属来源的CGRP在氨基酸组成上略有差异。已经证实CGRP是广泛分布于中枢及外周神经中重要的感觉神经递质,而CGRP肽能神经则是膀胱壁内感觉神经的主要成分[5]。

Paro等[6]报道糖尿病大鼠膀胱感觉神经纤维出现由代谢异常导致的典型形态学改变。近年来发现糖尿病胃肠功能紊乱尤其是胃轻瘫时,胃壁内CGRP明显下降,说明CGRP介导的粘膜对刺激的感觉功能下降,导致胃肠蠕动减退或胃轻瘫,因而CGRP在DNB中很可能存在类似作用[7]。免疫组化结合图像分析结果显示:糖尿病大鼠6周时,膀胱壁内尤其是粘膜下神经丛CGRP含量显著减少,CGRP神经纤维分布亦先出下降,提示糖尿病时膀胱壁内肽能神经递质出现显著异常,这种异常导致的膀胱感觉功能损害很可能是糖尿病神经原性膀胱进一步发展的触发因素。

膀胱功能正常的一个重要标志是在排尿阈容积下的低压性舒张容纳作用[8],与膀胱顺应性及逼尿肌舒张功能密切相关。膀胱充盈使膀胱粘膜皱褶变平以前,膀胱壁几乎不受明显的牵拉,只需能克服膀胱壁惯性使其移位的力即可使膀胱逐渐充盈,此时膀胱内压并无明显升高。此后,随膀胱充盈,膀胱壁受到的牵拉将逐渐增加,此时膀胱的顺应性是决定膀胱储尿功能的重要因素。但是关于糖尿病膀胱这方面的报道极少,因此我们采用离体膀胱灌注及体外全膀胱对β受体激动剂Iso的舒张效应的观察,发现STZ大鼠12周时,逼尿肌舒张功能显著下降,同时膀胱顺应性明显升高。受体饱和实验显示糖尿病鼠膀胱β受体密度明显增加,推测与糖尿病交感神经受损有关[9];Gur等[8]也报道磷酸二酯酶抑制剂氨茶碱作用后糖尿病鼠膀胱的舒张反应增强,提示β受体后cAMP介导的生化途径出现异常,因此我们认为糖尿病时逼尿肌舒张功能受损,膀胱顺应性改变也是DCP的重要致病机制。

由于DCP病因机制中除植物神经病变以外,还有肌源性异常等其它因素[10],因此实验增设5%蔗糖诱导的利尿(多尿)大鼠,作为糖尿病时超常尿量负荷对膀胱功能损害的对照。结果显示利尿鼠逼尿肌舒缩功能,膀胱顺应性均有一定程度改变,但均不如糖尿病膀胱显著,说明利尿(多尿)状态并不是DCP的主要致病因素。

参考文献:

[1] 熊恩庆, 龚　宇, 宋　波, 等. 糖尿病大鼠膀胱舒张及收缩功能实验研究[J]. 第三军医大学学报, 2000, 22(8): 744-746.

[2] Bilous R W. Diabetic autonomic neuropathy[J]. BMJ, 1990, 301(6752): 565-567.

[3] Liatifpour J, Gousse A, Yoshida M, *et al*. Effect of insulin and dietary myoinositol on muscarinic receptor alterations in diabetic rat bladder[J]. J Urol, 1992, 147(3): 760-763.

[4] Gupta S, Yang S, Cohen R A, *et al*. Altered contractility of urinary bladder in diabetic rabbits: Velationship to reduced Na^+ pump activity[J]. Am J Physiol, 1996, 271(6 pt 1): C2045-2052.

[5] Keast J R, de Groat W C. Segmental distribution and peptide content of primary afferent neurons innervating the urogenital organs and colon of male rats[J]. J Comp Weurol, 1992, 319(4): 615-623.

[6] Paro M, Italiano G, Travagli R A, *et al*. Cystometric changes in alloxan diabetic rats: evidence for functional and structural correlates of diabetic autonomic neuropathy[J]. J Auton Neru Syst, 1990, 30(1): 1-11.

[7] Grider J R. CGRP as a transmitter in the sensory pathway mediating peristaltic reflex[J]. Am J Physiol, 1994, 266(6 pt 1): G1139-1145.

[8] Gur S, Karahan S T. Effects of adenosine 5' triphosphate, adenosine and acetylcholine in urinary bladder and colon Musches from streptozotocin diabetic rats[J]. Arzneimittelforschung, 1997, 47(11): 1226-1229.

[9] Tammela T L, Briscoe J A, Levin R M. Factors underlying the increased sensitivity to field stimulation of urinary bladder strips from streptozotocin-induced diabetic rats[J]. Br J Pharmacol, 1994, 113(1): 195-203.

[10] Lalifpour J, Nishimoto T, Marian M J, *et al*. Differential regulation of bladder beta-adrenergic and muscarinic receptors in experimental diabetes [J]. Diabetes, 1991, 40(9): 1150-1156.

(编辑　郭建秀)

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