DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.13.019
第25卷第13期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 13
2003年7月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jul. 2003

文章编号:1000-5404(2003)13-1165-03

论著

钙通道在大鼠逼尿肌不稳定膀胱中的表达及变化

李 新[1],宋 波[1],李益人[2],熊恩庆[1],金锡御[1] ([1]第三军医大学附属西南医院全军泌尿中心,重庆 400038;[2]成都军区第60医院外一科,大理 671003)

提 要:目的 探讨电压依赖钙通道与逼尿肌功能变化之间的关系。方法 根据膀胱压力容积测定结果将动物分为稳定组(29只)和不稳定组(9只),其中稳定组分为BOO(11只)、SCI模型(9只)和对照组(9只),通过RT-PCR技术测定逼尿肌中L型和T型钙通道mRNA表达及变化。结果 正常大鼠中逼尿肌不稳定发生率为24.3%。L型和T型钙通道在逼尿肌中均有表达。正常对照组膀胱逼尿肌L型钙通道mRNA含量明显多于T型钙通道mRNA,两者之比约2.1∶1;BOO组、SCI组和不稳定组中L和T型mRNA含量均有不同程度增加,T型钙通道mRNA增加更明显($P<0.01$),两者比值明显缩小,分别为1.53、1.41和1.83。结论 钙通道的表达增加可能是导致平滑肌细胞自发性除极易化、兴奋性增高、引起逼尿肌不稳定的重要原因,其中T型钙通道起着重要的作用。

关键词:钙通道;逼尿肌不稳定
中图法分类号:R329.2+7;R334+.3;R694 文献标识码:A

Expressions and changes of Ca^{2+} channels in detrusor instability in rats

LI Xin, SONG Bo, LI Yi-ren, XIONG En-qing, JIN Xi-yu (Department of Urology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To investigate the relationship between Ca^{2+} channels and the function of detrusor in rats. **Methods** A total of 38 rats were divided into stable (29 cases) and instable (9 cases) groups according to the changes of cystometric studies. The bladder outlet obstruction models (11 cases) and L1-2 level spinal cord injury models (9 cases) were established with rats in the stable group. The mRNA expressions of L and T type Ca^{2+} channels in the detrusor of different groups were measured by RT-PCR. **Results** The occurrence rate of detrusor instability was 24.3% in normal rats. Both L- and T-type Ca^{2+} channels were found in rat detrusor, and the expressions in instable, BOO and SCI groups were much higher than that of control. The increase in the expression of T type Ca^{2+} channel was more obvious. **Conclusion** The up-regulation of calcium channels, especially T-type Ca^{2+} channel, may be the key factor to lead to detrusor instability.

Key words: Ca^{2+}; channel; detrusor

逼尿肌不稳定(Detrusor instability, DI)是多种病变(如神经疾病、膀胱出口梗阻等)的共同病理生理环节,是引起尿频、尿急、紧迫性尿失禁等临床症状的最重要的原因。有关DI发生机制不清,目前多以对症治疗为主,治疗效果不佳[1]。近年研究表明逼尿肌不稳定可能与其兴奋与收缩特性的改变有关[2]。Ca^{2+}作为细胞内最普遍和最重要的信号转导成分,广泛存在于各种兴奋细胞及许多非兴奋细胞中,细胞内钙离子浓度的升高对维持平滑肌细胞的兴奋性和收缩力起重要作用,而细胞外钙离子主要通过电压依赖性钙通道进入细胞[3]。我们通过制作逼尿肌不稳定模型,采用RT-PCR技术对不稳定膀胱逼尿肌电压依赖钙离子通道的表达和含量进行测定,探讨其在逼尿肌不稳定发生中的意义,为临床治疗提供指导。

1 材料与方法

1.1 实验对象

雌性Wistar大鼠,38只,体质量200~220 g。

1.2 主要试剂及仪器

Taq DNA聚合酶为TaKaRa产品;DEPC为Sigma产品;Tripure为博大公司产品;dNTPs、琼脂糖、RNasin、AMV逆转录酶、寡聚六核苷酸随机引物(oligdT)购自Promega公司。100 bp DNA Marker购自华美生物工程公司。PCR引物均由上海SANGON公司合成。GeneAmp2400型PCR仪,美国Bio-Rad公司。

1.3 尿动力学检查

所有动物均行膀胱压力容积测定(膀胱灌注速率为0.2 ml/min),记录膀胱压力波形、大小变化,根据尿动力学检查结果

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30277992)
作者简介:李 新(1973-),男,云南省大理市人,博士研究生,医师,主要从事排尿功能障碍性疾病方面的研究,发表论文10篇。电话:(023)68754186
收稿日期:2002-07-18;修回日期:2003-03-18

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

将分为不稳定组(9只, 24.3%)和稳定组(29只)。其中稳定组又分为脊髓横断组(9只)、膀胱流出道梗阻组(11只)和对照组(9只),并行尿动力学鉴定。

1.4 模型制作

1.4.1 麻醉方式 腹腔注射1%苯巴比妥溶液40 mg/kg。

1.4.2 膀胱流出道梗阻模型(Bladder outlet obstruction, BOO) 以直径为1 mm的探子插入尿道,分离尿道,2-0丝线结扎前尿道,松紧以牵拉探子周围组织可随之移动,而探子又可轻易拔出为度,5~6周后模型可用。

1.4.3 脊髓横断模型(Spinal cord transection, SCI) 先行膀胱造瘘。1周后实验组于L_{1-2}横断脊髓,3周后模型可用。

1.5 逼尿肌中电压依赖钙离子通道亚型含量测定

参照文献[4,5]合成引物,引物序列及扩增片段见表1。阳性对照β-actin的上下游引物来自不同外显子序列,确保不发生基因组DNA污染。

表1 L、T型钙通道和β-actin的PCR引物序列

Tab 1 PCR primers for L and T type calcium channels and β-actin

Primer	Upstream/downstream	Expected length(bp)
L	atc ggt acc cgg acc agc atg aag ctg ctg	218
	gag aag ctt cgt cgg atc tca ggc ccg atg	
T	cat tgg cca tgg aac att acc	284
	ctt cag aac tcg agc aat gc	
β-actin	tgg aat cct gtg gca tcc atg aaa c	250
	taa aaa cgc agc tca gta aca gtc cg	

1.5.1 组织总RNA的提取 大鼠断头后迅速取出膀胱平滑肌,置于液氮中保存,用TRIzol按一步法提取总RNA。所提的总RNA在A_{260}/A_{280}大于1.8,且EB染色后28S和18S两条带清晰可见呈2∶1。

1.5.2 逆转录反应 取4.2 μg总RNA,加入DEPC-H_2O至10.5 μl,混匀后70 ℃变性5 min,迅速冰浴。然后分别加入下列成分:dNTPs混合物(每种dNTP各2.5 mmol/L)2.0 μl;随机引物2.0 μl;Rnasin 0.5 μl,AMV酶1 μl;5×缓冲液4 μl使总反应体系为20 μl。上述混合物在37 ℃反应1 h,接着70 ℃变性10 min后冰浴,待进行扩增反应或在-70 ℃保存待用。

1.5.3 扩增反应 取以上逆转录产物1.5 μl,分别加入以下成分:dNTP(每种dNTP各2.5 mmol/L)0.5 μl;特异引物(10 pmol/L)1.5 μl;$MgCl_2$溶液(25 mmol/L)1.5 μl;10×缓冲液2.5 μl;Taq酶(5 U/μl)0.5 μl;DEPC-H_2O至17.0 μl。整个反应体系为25 μl。

反应条件:① T型钙通道:变性温度94 ℃ 4 min,退火温度54 ℃ 1 min,延伸温度72 ℃ 2 min,共35个循环,再延伸72 ℃ 10 min;② L型钙通道:变性温度95 ℃ 1 min,退火温度56 ℃ 1 min,延伸温度72 ℃ 1 min,共35个循环,再延伸72 ℃ 10 min;

1.5.4 电泳及成像 将L型钙通道或T型钙通道和β-actin(内参照)等量的PCR扩增产物(10 μl)一起上样,经2%琼脂糖凝胶电泳(1× TBE,5 V/cm)辨认、拍照。照片经扫描后,图像分析仪测量DNA区带整合吸光值。根据cDNA的整合吸光值计算其相对含量,L型钙通道和T型钙通道与β-actin的比值表示其相对表达水平。

1.6 统计学方法

计量资料采用$\bar{x}\pm s$表达,两个样本均数比较采用student's t检验,多个样本均数比较采用方差分析。

2 结果

2.1 尿流动力学检查结果

BOO组中有9只(81.8%)、SCI组全部(100%)表现为逼尿肌不稳定,同不稳定组(24.3%)一样,在膀胱充盈过程中出现多个无抑制收缩波。BOO组膀胱顺应性和40 cm H_2O时膀胱容积较对照组明显增加($P<0.05$),SCI组膀胱顺应性和40 cm H_2O时膀胱容积较对照组明显减少,而不稳定组与对照组之间膀胱顺应性和容量与稳定组差异不明显($P>0.05$),见表2。

表2 大鼠膀胱的最大容积及顺应性($\bar{x}\pm s$)

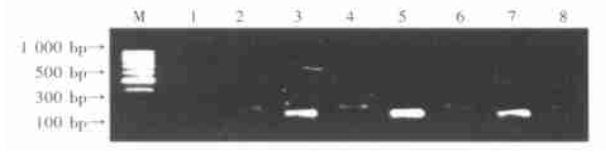
Tab 2 Maximum capacity and compliance of rat bladder($\bar{x}\pm s$)

	n	Maximum capacity (ml)	Compliance (ml/cmH_2O)
BOO	9	1.9482±0.0521 **	0.1724±0.093 *
SCI	9	0.6044±0.0214 *	0.0151±0.0035 *
Instable	9	1.1041±0.0271	0.0262±0.0032
Control	9	1.1562±0.0263	0.0289±0.0020

*: $P<0.05$ *vs* control

2.2 逼尿肌不稳定电压依赖性钙离子通道亚型mRNA含量变化

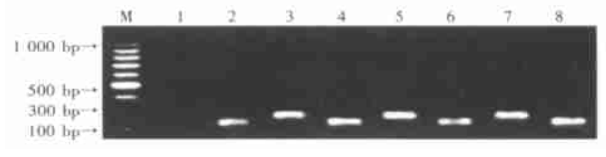
各组膀胱逼尿肌组织均含有L和T型钙通道mRNA。正常对照组膀胱逼尿肌L型钙通道mRNA含量明显多于T型钙通道mRNA,两者之比约2.13∶1;BOO组、SCI组和不稳定组中L型mRNA含量均高于对照组($P<0.05$),T型钙通道mRNA增加更明显($P<0.01$),两者比值明显缩小,分别为1.53、1.41和1.83,见图1、2。



M: PCR marker; 1: control; 2: β-actin; 3: instable; 4: β-actin; 5: BOO; 6: β-actin; 7: SCI; 8: β-actin

图1 L型钙离子通道在逼尿肌不稳定时表达变化

Fig 1 Result of RT-PCR for L-type Ca^{2+} channel in different groups



M: PCR marker; 1: control; 2: β-actin; 3: instable; 4: β-actin; 5: BOO; 6: β-actin; 7: SCI; 8: β-actin

图2 T型钙离子通道在逼尿肌不稳定时表达变化

Fig 2 Result of RT-PCR for T-type Ca^{2+} channel in different groups

3 讨论

逼尿肌是一种特殊的平滑肌,但有关其兴奋的产生和调节尚无系统的描述。我们的研究显示:逼尿肌

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

在一定前负荷下都可产生收缩, 不稳定膀胱逼尿肌在更小的前负荷下即发生收缩, 在同等的前负荷下不稳定膀胱逼尿肌的收缩频率明显增加, 表明不稳定膀胱与逼尿肌自发兴奋能力增强有关; 同时我们用多种神经因素干预并不能阻断 DI 逼尿肌的自发兴奋性, 提示发生不稳定膀胱的最终环节是肌细胞的兴奋性增高, 是一种肌源性兴奋性改变, 并不依赖于神经因素[6]。Ca^{2+} 作为细胞内最普遍和最重要的信号转导成分, 介导各种细胞功能包括兴奋收缩耦联、信号转导、神经递质的释放等, 对增加和维持平滑肌细胞兴奋性和收缩力起重要作用。从理论上推论, 如果能有效抑制逼尿肌钙通道, 将可打断兴奋收缩耦联等生理过程, 从而达到治疗逼尿肌不稳定的目的。但目前临床上应用 Ca^{2+} 通道阻断剂来治疗不稳定膀胱, 并未取得预期的效果, 因此有必要对膀胱平滑肌上钙离子通道的表达和变化进行深入的研究[7]。

钙离子通道广泛存在于各种兴奋细胞中, 细胞膜上钙离子通道开放引起的钙离子内流是导致细胞内钙离子浓度升高的重要途径。Van Breemen[8] 把细胞膜 Ca^{2+} 通道分为电压依赖性 Ca^{2+} 通道(VDC)和受体操纵性 Ca^{2} 通道(ROC)两种, ROC 的开放与膜去极化无关, 仅与膜受体激活有关, 目前对它的特性还未完全明了。目前已较明确的按激活电压高低将 Ca^{2+} 通道主要分为 L、T、N、P、Q、R 等多种类型电压依赖性钙通道(Voltage dependent calcium channel, VDCC), 其中仅有 L 和 T 型存在于心肌和平滑肌组织, 但上述两种钙通道在逼尿肌中的表达机器与逼尿肌功能之间的关系上未见报道。为进一步证实逼尿肌不稳定中钙离子通道的表达及变化以及这种变化与逼尿肌不稳定之间的关系, 我们利用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)技术对膀胱平滑肌细胞的钙离子通道进行了研究。结果显示各组膀胱逼尿肌组织均含有 L 和 T 型钙通道 mRNA。正常对照组膀胱逼尿肌 L 型钙通道 mRNA 含量明显多于 T 型钙通道 mRNA, 两者之比约 2.13 ∶1。Tao 等[9] 利用膜片钳技术对 L 和 T 型钙通道电流分别进行测定并计算其通道密度, 发现气道平滑肌组织中 L 型钙通道密度与 T 型钙通道密度之比为 2.2 ∶1。提示在正常生理条件下, 平滑肌中钙通道的表达以 L 型钙通道为主。当然, 由于两种通道开放电压并不一致, L 型钙通道为 −40 mV, T 型钙通道为 −90 mV, 在不同生理状况下两种通道所起作用与其表达密度可能并无关联。但是这给我们在临床中使用钙离子通道拮抗剂治疗不稳定膀胱疗效不佳提供了一个良好的答案: 常规使用的钙通道拮抗剂(如异搏定、维拉帕米等)均为 L 型钙通道拮抗剂, 对逼尿肌中存在 T 型钙通道作用不明显, 未能完全阻断钙离子的内流, 因此疗效不佳。

我们制作了多种逼尿肌不稳定模型并对其 L 和 T 型 mRNA 含量进行了测定。研究表明 BOO 组、SCI 组和不稳定组中 L 和 T 型 mRNA 含量均有不同程度增加。因此我们可以推论, 不稳定膀胱平滑肌细胞钙通道开放增加引起细胞内钙离子浓度上升, 此时虽然平滑肌没有开始收缩, 但平滑肌细胞的活性却明显增加, 从而产生易激性, 此时即使轻微的刺激就可以诱发膀胱逼尿肌收缩。因此膀胱逼尿肌钙通道数量及特性的改变可能是产生逼尿肌不稳定主要原因之一。同时我们对 L 和 T 型 mRNA 含量进行了比较, 发现在逼尿肌不稳定组中, T 型钙通道 mRNA 增加更明显($P<0.01$), 两者比值明显缩小, 分别为 1.53、1.41、1.83 和 2.13。这较充分的提示在逼尿肌不稳定的发生机制中, 钙通道的变化起着重要作用, 其中 T 型钙通道的作用更加明显。Triggle[10] 在研究中发现在心肌病的起搏细胞中, L 型钙通道的表达和开放电流并无明显变化, 但是 T 型钙通道却有较明显增加, 二者比值 1.3 ∶1, 而 T 型钙通道/电流是心脏起搏细胞自发性除极产生起搏活动的重要因素, 这可能是产生室上性心动过速的重要原因。

结合我室即往研究结论, 我们推测由于钙通道的表达异常(增多), 引起平滑肌细胞自发性除极易化, 兴奋性增高, 从而表现为不稳定膀胱, 其中 T 型钙通道起着重要的作用。如果能对 T 型钙通道的功能及特性进行深入研究, 研制一种针对膀胱的型钙通道的特异性拮抗剂, 对于我们认识和解决逼尿肌不稳定具有重要意义。

参考文献:

[1] Robinson D, Toozs-Hobson P. Detrusor instability[J]. Curr Obstet Gynaecol, 2001, 11(6): 344−352.

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

[3] 王忠慧, 马忠森, 周及红, 等. 哮喘豚鼠模型支气管平滑肌钙通道特性的变化[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2001, 24(9): 539−541.

[4] Huang B, Qin D, Deng L, *et al*. Re-expression of T-type Ca^{2+} channel gene and current in post-infarction remodeled rat left ventricle[J]. Cardiovasc Res, 2000, 46(3): 442−449.

[5] Takimoto K, Li D, Nerbonne J M, *et al*. Distribution, splicing and glucocorticoid-induced expression of cardiac α1c and α1D voltage-gated Ca^{2+} channel mRNAs[J]. J Mol Cell Cardiol, 1997, 29(11): 3035−3042.

[6] 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.

[7] Anderson K E. The overactive bladder: pharmacologic basis of drug treatment[J]. Urology, 1997, 50(6A Suppl): 74−84.

[8] Van Breemen C, Saida K. Cellular mechanisms regulating Ca^{2+} in smooth muscle[J]. Annu Rev Physiol, 1989, 51: 315−329.

[9] Tao F C, Tolloczko B, Eidelman D H, *et al*. Enhanced Ca^{2+} mobilization in airway smooth muscle contributes to airway hyperresponsiveness in an inbred strain of rat[J]. Am J Respir Crit Care Med, 1999, 160(2): 446−453.

[10] Triggle D J. The physiological and pharmacological significance of cardiovascular T-Type, voltage-gated calcium channels[J]. Am J Hypertens, 1998, 11(4 Pt 3): 80S−87S.

(编辑　陈聪连)

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