DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.06.018
第25卷第5期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 5
2003年3月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Mar. 2003

文章编号:1000-5404(2003)06-0505-03

论著

大鼠低顺应性膀胱中Ⅰ型和Ⅲ型胶原蛋白的基因表达

刘 南,宋 波,金锡御,熊恩庆 (第三军医大学附属西南医院全军泌尿中心,重庆 400038)

提 要:目的 检测低顺应性膀胱组织中Ⅰ型、Ⅲ型胶原蛋白基因表达。方法 用原位杂交的方法检测大鼠梗阻性低顺应性膀胱组织中Ⅰ型、Ⅲ型胶原蛋白mRNA表达的改变。结果 与正常对照组相比,低顺应性膀胱组肌层内Ⅰ型、Ⅲ型胶原蛋白基因表达被上调,且Ⅲ型胶原蛋白基因表达被上调的程度更为显著。结论 在大鼠的梗阻性低顺应性膀胱中,发现膀胱组织肌层内Ⅰ型、Ⅲ型胶原蛋白基因表达被上调,而这两种基因表达的上调与梗阻后低顺应性膀胱的形成存在一定的关系。

关键词:低顺应性膀胱;梗阻;胶原蛋白;mRNA
中图法分类号:R394.3;R341.26;R694.5 文献标识码:A

The gene expressions of collagen types Ⅰ and Ⅲ in obstructive low compliant bladder in rats

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

Abstract: Objective To detect the gene expressions of collagen types Ⅰ and Ⅲ in obstructive low compliant bladder in rats. Methods The expressions of collagen types Ⅰ and Ⅲ mRNA in rat bladder tissues were detected by *in situ* hybridization. Results Compared with those in the normal control, the gene expressions of collagen types Ⅰ and Ⅲ in smooth muscle of low compliant bladder were up-regulated. Type Ⅲ gene expression was more obvious than type Ⅰ. Conclusion The expressions of collagen types Ⅲ and Ⅰ in obstructive low compliant bladder in rats are up-regulated, which is related with low compliant bladder after obstruction.

Key words: low compliant bladder; bladder outlet obstruction; collagen; mRNA

在一些疾病的病理进程中常可观察到细胞外基质成分(Extracellular matrix, ECM)的异常,损伤可引起组织中胶原蛋白和其他基质成分的异常沉积从而导致器官纤维化。先前对肺纤维化、肝纤维化、心肌纤维化和皮肤纤维性病变的研究显示,这些组织、器官中均有胶原蛋白的合成、积聚增加。这些研究表明不同器官、不同纤维病变的共同特点是有类似的胶原蛋白合成途径和沉积。

在正常情况下,在膀胱充盈期。随膀胱容量增加,膀胱内应保持低压状态,即压力一般在1.47 kPa以下,这种充盈期的△V/△P即为膀胱的顺应性C(Compliance)。在膀胱流出道梗阻后,膀胱壁由于结缔组织积聚而发生结构重塑(Remodeling),其中主要是胶原蛋白和弹性蛋白等细胞外基质成分发生了变化,从而引起膀胱纤维化,使正常膀胱变为一种小容量、高压力的低顺应性膀胱,这种膀胱贮尿时膀胱内压较正常高,升高的膀胱内压可引起上尿路的功能损害。我室自2001年起应用原位杂交技术对大鼠的低顺应性膀胱模型中Ⅰ型、Ⅲ型胶原蛋白基因表达做了研究,现报告如下。

1 材料和方法

1.1 大鼠低顺应性膀胱型的建立

1.1.1 动物选择 体重为150~200 g的雌性Wistar大鼠,2~3月龄。

1.1.2 膀胱流出道梗阻的建立 70只雌性Wistar大鼠按随机排列表随机分为2组,40只为梗阻组,30只为对照组。

梗阻组:40只Wistar大鼠用异戊巴比妥行腹腔内注射麻醉(50 mg/kg),然后行下腹正中切口,找到膀胱,仔细游离膀胱-尿道交界处,于此处穿过3-0丝线,自尿道外口插入外径为1 mm的聚乙烯探子入膀胱,以此为支撑,轻轻结扎膀胱-尿道交界处的丝线,结扎标准以尿道内支架管移动略紧为宜,逐层关闭切口,每2周观测体重变化。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39970739)
作者简介:刘 南(1967-),男,重庆市人,博士研究生,主治医师,主要从事尿动力学方面的研究,发表论文5篇。电话:(023)68754000-73089
收稿日期:2002-04-22;修回日期:2002-09-03

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

对照组：选用30只雌性Wistar大鼠。采用同样的麻醉、同样的外科手术方法、游离膀胱-尿道交界处，但不结扎，然后关闭腹腔。

1.1.3 尿流动力学检测 根据既往我们对大鼠流出道梗阻的研究，2个月以后对大鼠行尿流动力学检测（尿动力仪为Nidoc-970尿动力学检测仪：成都电子科技大学维信有限公司，AVI270微量灌注泵：美国3M公司）。每月1次，用外径为1 mm的导管插入膀胱，用灌注泵以37 ℃温盐水行膀胱灌注，若导管不能插入膀胱可直接行下腹切口，暴露膀胱后，导管插入膀胱直接检测膀胱压力容积变化，梗阻组灌注率为50 ml/h，对照组为12 ml/h[1]。

1.2 原位杂交

1.2.1 cDNA探针 大鼠Ⅰ型、Ⅲ型胶原蛋白基因cDNA探针为购自武汉博士德生物工程公司。

1.2.2 组织原位杂交 冰冻切片厚约6~8 μm，4%多聚甲醛固定，用3%柠檬酸新鲜稀释的胃蛋白酶暴露mRNA核酸片段后，依次行预杂交、杂交、杂交后洗涤、滴加封闭液，滴加生物素化鼠抗地高辛。滴加SABC，滴加生物素化过氧化物酶，DAB显色（显色液中加0.25%硫酸镍胺以增强其敏感性），苏木精复染镜检。

1.3 统计学处理

相关数据均应用SPSS统计学软件处理，结果以$\bar{x} \pm s$表示，组间以t检验进行处理。

2 结果

2.1 低顺应性膀胱动物模型

40只雌性Wistar大鼠，膀胱流出道梗阻后4~5个月行尿动力检测，16只出现低顺应性膀胱，低顺应性膀胱发生率为40%，19只死亡，还有5只未出现低顺应性膀胱。16只出现低顺应性膀胱的大鼠被处死，取出膀胱置液氮罐中保存。

假手术对照组Wistar大鼠共30只，梗阻后5个月仍有21只存活，处死大鼠，取下膀胱组织置液氮中保存。

梗阻性低顺应性膀胱组与正常对照组的顺应性，见表1。

表1 梗阻性低顺应性膀胱组与正常对照组的膀胱顺应性的比较（$\bar{x} \pm s$）

Tab 1 Comparison of the bladder compliance between the obstructive low compliant bladder group and normal control group（$\bar{x} \pm s$）

	n	Compliance (ml/cm H_2O)
Low compliant bladder	16	0.059±0.012
Normal control	21	0.103±0.018 *

*：$P<0.01$ *vs* low compliant bladder

2.2 原位杂交结果

大鼠Ⅰ型、Ⅲ型胶原蛋白cDNA探针与各实验组膀胱组织原位杂交，可观察到胶原mRNA的分布特点。

Ⅰ型胶原蛋白：与正常对照组相比，低顺应性膀胱组膀胱组织肌层中表达Ⅰ型胶原蛋白基因的数量增多，强度增加，见图1、2。

Ⅲ型胶原蛋白：与正常对照组相比，低顺应性膀胱组膀胱组织肌层中表达Ⅲ型胶原蛋白基因的细胞数量明显增多，强度明显增加，细胞成群分布，且其程度超过了Ⅰ型胶原蛋白基因表达上调的程度，见图3、4。



图1 正常对照组膀胱组织Ⅰ型胶原蛋白原位杂交 （ISH×100）

Fig 1 Result by *in situ* hybridization of collagen type Ⅰ in normal bladder tissue in rats （ISH× 100）

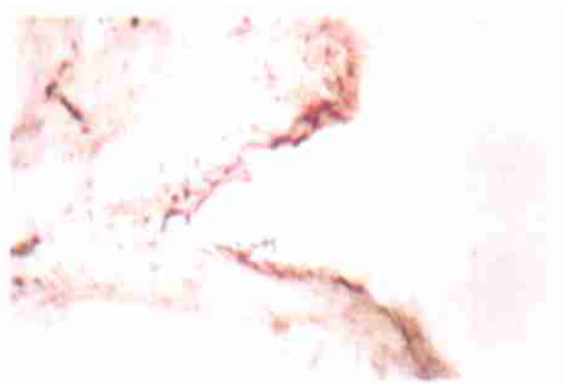


图2 低顺应性膀胱组膀胱组织肌层中Ⅰ型胶原蛋白基因表达被上调 （ISH× 100）

Fig 2 The up-regulated gene expression of collagen type Ⅰ in bladder muscular layer of low compliant bladder in rats （ISH× 100）



图3 正常对照组膀胱组织Ⅲ型胶原蛋白原位杂交 （ISH×200）

Fig 3 Result by *in situ* hybridization of collagen type Ⅲ in normal bladder tissue in rats （ISH× 200）

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

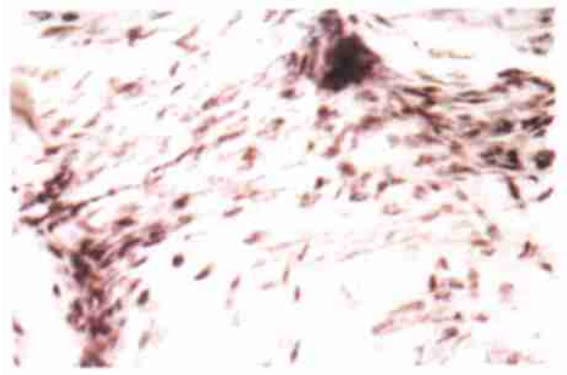


图 4　低顺应性膀胱组膀胱组织肌层中Ⅲ型胶原蛋白基因表达被明显上调　(ISH× 200)

Fig 4　The up-regulated gene expression of collagen type Ⅲ in bladder muscular layer of low compliant bladder in rats (ISH× 200)

3　讨论

正常的膀胱有独特的能力: 即在充盈期膀胱内贮存的尿液逐渐增加, 膀胱的体积逐渐增大但却没有相应的压力增高, 但膀胱这种独特的能力却可被疾病所改变。许多研究表明当膀胱流出道梗阻后最终可造成膀胱纤维化, 顺应性下降, 当顺应性降低从而影响了膀胱低压储存尿液的能力后, 上尿路功能受损的可能性明显增加了。有研究表明当人漏尿点压(A leak point pressure)达到或超过 40 cmH_2O 时, 上尿路功能受损的几率明显增加[2]。

先前对低顺应性膀胱所做的组织学和生物化学研究表明: 其组织学特点是膀胱壁细胞外基质蛋白异常沉积[3,4]。免疫组化的研究亦显示: 在低顺应性膀胱中, 主要是Ⅱ型胶原蛋白在固有层下的平滑肌束间浸润。而 Ewalt 等[5]还定量检测了低顺应性膀胱组织中的胶原蛋白含量, 与正常相比Ⅱ型胶原蛋白含量增加了 33%。本实验成功构建了大鼠的梗阻性低顺应性膀胱的模型, 并应用原位杂交的方法对大鼠膀胱组织中Ⅰ型、Ⅱ型胶原蛋白的基因表达进行了研究, 显示梗阻性低顺应性膀胱中, 主要是肌层内的Ⅱ型胶原蛋白基因表达被明显上调, 同时亦表明Ⅰ型胶原蛋白基因表达亦有所上调。

有作者对低顺应性膀胱的结构特点行进一步的研究发现[4,6]: 在低顺应性膀胱中, 固有层中基质成分的分布和排列与正常膀胱相比没有什么不同, 但在肌层中却有明显的差异, 在肌束间区域主要是Ⅱ型、Ⅰ型胶原蛋白积聚于此。正常情况下, 固有层可以维持膀胱的顺应性。当在病理情况下, 固有层中的基质成分向平滑肌束间浸润后, 增大了肌束间空隙并可改变膀胱的顺应性。

在膀胱流出道梗阻后又是什么原因引起胶原蛋白基因表达的上调呢? 有作者通过研究提出可能是膀胱的内压的变化启动了这个过程[7], 膀胱流出道梗阻后, 由于在膀胱壁的不同层面的平滑肌束可遭受不同的张力变化, 因而其可相应地合成和沉积不同的细胞外基质蛋白。此外, 更表浅的平滑肌束还受到局部分泌的生长因子的作用而影响其细胞外基质成分的沉积, 其作用并不十分清楚。而细胞周围间隙基质的沉积到底是因为合成增加还是降解减少[8], 目前尚不明确。目前, 虽然细胞周围间隙沉积的胶原蛋白的来源尚不知晓, 但它们与肌束间的关系提示平滑肌细胞在独特的调控机制不可能为其来源[9]。

通过本研究, 我们发现在梗阻后低顺应性膀胱的大鼠模型中, 膀胱肌层内Ⅲ型胶原蛋白的基因表达被明显上调, Ⅰ型胶原蛋白的基因表达被上调。我们的研究仅表明梗阻后膀胱顺应性的减少与胶原蛋白的基因表达间存在一定的关系, 但没有确切的证据表明胶原蛋白基因表达的增加就是膀胱顺应性减少的原因。要阐明其确切的发病机制尚需进一步深入的研究。

参考文献:

[1] O' Connar L T Jr, Vaughan E D Jr, Felsen D. *In vivo* cystometric evaluation of progressive bladder outlet obstruction in rats[J]. J Urol, 1997, 158(2): 631－635.

[2] McGuire E J, Woodside J R, Borden T A, *et al*. Prognostic value of urodynamic testing in myelodysplastic patients[J]. J Urol, 1981, 126(2): 205－209.

[3] Landau E H, Jayanthi V R, Churchill B M, *et al*. Loss of elasticity in dysfunctional bladders urodynamic and histochemical correlation[J]. J Urol, 1994, 152(2 Pt 2): 702－705.

[4] Ewalt D H, Howard P S, Blyth B, *et al*. Is lamina propria matrix responsible for normal bladder compliance[J]? J Urol, 1992, 148(2 Pt 2): 544－549.

[5] Ewalt D H, Constantinescn S C, Bellon G, *et al*. Increased collagen type Ⅲ in the neurogenic non-compliant bladder[J]. J Urol, 1992, 147(2): 438－452.

[6] Tekgul S, Yashino K, Bagli D, *et al*. Collagen types Ⅰ and Ⅲ localization by *in situ* hybridization and immunohistochemistry in the partially obstruction young rabbit bladder[J]. J Urol, 1996, 156(2 Pt 2): 582－586.

[7] Baskin L, Howard P S, Macark E. Effect of physical forces on bladder muscle and urethelium[J]. J Urol, 1993, 150(2 Pt 2): 601－607.

[8] Chen M W, Krasnapolsky L, Levin R M, *et al*. An early molecular response induced by acute overdistension of the rabbit urinary bladder[J]. Mol Cell Biochem, 1994, 132(1): 39－44.

[9] Gosling J. Modification of bladder structure in response to outflow obstruction and aging[J]. Eur Urol, 1997, 32(Suppl 1): 9－14.

(编辑　张大春)

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