DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.12.028
第24卷第12期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 12
2002年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec. 2002

文章编号:1000-5404(2002)12-1437-02

论著

大鼠不稳定膀胱与MR亚型密度改变关系的实验研究

卢根生,宋 波,熊恩庆,金锡御 (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 探讨毒蕈碱受体(MR)亚型密度变化与不稳定膀胱发生之间的关系。方法 建立不稳定膀胱大鼠模型,采用RT-PCR方法测定不稳定膀胱及对照组逼尿肌毒蕈碱受体(MR)亚型密度。结果 对照组和不稳定膀胱组逼尿肌组织均含有m_2RNA和m_3RNA,没有检测到m_1、m_2和m_3亚型的mRNA。正常对照组膀胱逼尿肌m_2RNA(1.67±0.42)含量明显多于m_3RNA(0.64±0.19),两者之比约2.59∶1;不稳定膀胱逼尿肌中m_2和m_3密度均增加,分别为(2.03±0.65)和(1.53±0.46),m_3增加更明显($P<0.01$),两者比值显著缩小,约1.4∶1。结论 不稳定膀胱产生与MR亚型密度上调及M_2R、M_3R亚型之间的比例失调有关。

关键词:不稳定膀胱;毒蕈碱受体;亚型;密度
中图法分类号:R322.62;R392.11;R694.02 文献标识码:A

Relationship between muscarinic receptor subtype density change and unstable bladder in rats

Lu Gen-sheng, Song Bo, Xiong En-qing, Jin Xi-yu (Center of Urology of PLA, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To study the relationship between muscarinic receptor(MR) subtype density changes and the producing of unstable bladder. **Methods** The rat model of unstable bladder was established and the MR subtype density of control and unstable bladders were defermined by RT-PCR. **Results** There were only m_2RNA and m_3RNA in the detrusor of control and unstable bladders, but no m_1, m_2 and m_3 mRNA, the amount of m_2RNA(1.67±0.42)was larger obviously than m_3RNA(0.64±0.19), the ratio was 2.59∶1 in control group, and the density of both m_2 and m_3 in unstable bladder increased to (2.03±0.65) and(1.53±0.46) respectively, and the increase of m_3 was more significant ($P<0.01$) with the ratio of 1.4∶1. **Conclusions** MR subtype up-regulation and the ratio unbalance of MR subtype are closely related to the producing of unstable bladder.

Key words: unstable bladder; muscarinic receptor; subtype; density

不稳定膀胱又称为逼尿肌不稳定,是最常见的膀胱功能障碍类型之一,表现为尿频、尿急和紧迫性尿失禁,临床发病率高,治疗效果不理想。究其原因是因为膀胱功能调节复杂、逼尿肌不稳定发病机制不清。我们应用RT-PCR方法对不稳定膀胱逼尿肌毒蕈碱受体(Muscarinic receptor, MR)亚型含量进行测定,探讨逼尿肌不稳定的发生机制,为临床治疗提供指导。

1 材料与方法

1.1 动物模型建立

Wistar大鼠,30只,雌性,体重200~220 g。随机分成两组,对照组及实验组各15只。实验组大鼠1%苯巴比妥,腹腔注射麻醉(40 mg/kg)。大鼠仰卧位固定,酒精消毒会阴部,以直径为1 mm的聚乙烯探子插入尿道,于尿道口与阴道口之间剪开皮肤,分离尿道,2-0丝线于前尿道部位结扎尿道,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,拔出探子,缝合皮肤。对照组大鼠仅切开皮肤,而不结扎尿道,术后每只单笼喂养,保持动物笼清洁干燥。所有实验动物术后适量使用抗生素:庆大霉素0.5 mg/kg,腹腔注射,每日1次,共3 d。

1.2 充盈性膀胱测压

梗阻后6周,乌拉坦皮下注射麻醉(1 g/kg)。大鼠仰卧位固定,酒精消毒会阴部,硬膜外导管经尿道插入膀胱,接7号针头,经三通管与尿动力仪及微量灌注泵相连。轻压腹部,排净尿液。以0.2 ml/min生理盐水的速度进行膀胱灌注并测压。根据大鼠有无逼尿肌不稳定将实验组大鼠分为逼尿肌不稳定组(DI)、逼尿肌稳定组(DS)。

1.3 逼尿肌5种胆碱能受体亚型含量测定

1.3.1 引物合成 参照文献[1]合成6对引物(上海细胞所合成),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 5种胆碱能受体亚型和β-actin的PCR引物序列

Tab 1 PCR primers for five MR subtypes and β-actin

Primers	Upstream/downstream	Expected length(bp)
m_1	AAA TAC AGT CAA GAG GCC GAC TAA G	349
	CTT GTC CCA GCG GCA AAG CAG C	
m_2	CTA AGC AAA CAT GCA TCA GAA TTG G	286
	AAG GTG CAC AAA AGG TGT TAA TGA G	
m_3	ACC CAG CTC CGA GCA GAT GGA C	341
	CGG CTG ACT CTA GCT GGA TGG G	
m_4	CAG CCA TTG AGA TTG TGC CTG CC	314
	GGT GGC GTT GCA CAG AGC ATA G	
m_5	TCA GAA ATG TGT GGC CTA TAA GTT C	304
	TGA CTG GGA CAC ACT TGT CAC AG	
β-actin	CTG GCA TCG TGA TGG ACT CCG G	380
	GTG GAT GCC ACA GGA CTC CAT G	

1.3.2 核酸分离 取对照组和DI组各5只大鼠逼尿肌,从肌肉样品提取总RNA(使用ISOGEN, Nippon Gene, Japan),经不含RNA酶的DNA酶I处理,除去DNA的污染。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39770471)
作者简介:卢根生(1965-),男,湖北省黄冈县人,博士,副主任医师,副教授,主要从事膀胱癌、膀胱功能障碍性疾病方面的研究。发表论文20余篇。电话:(023) 68754265
收稿日期:2002-01-15;修回日期:2002-07-16

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

1.3.3 逆转录(RT) 提取的 RNA 经逆转录生成相应的 cDNA。提取的 RNA(1μg)加入 38μl RT 反应混合液(20 mmol/L Tris-Cl, 50 mmol/L KCl, 2.5 mmol/L $MgCl_2$, 1 mmol/L dNTP, 100 pmol 随机 6 核苷酸引物)中,混匀;95℃ 3 min,迅速置于冰上;加入 2μl M-MLV 逆转录酶,混匀,42℃ 1 h;95℃ 10 min。

1.3.4 PCR 反应 RT 产物 10μl 加入 40μl PCR buffer 液(20 mmol/L Tris-Cl, 50 mmol/L KCl, 2.5 U Taqae)混匀。反应按 95℃ 1 min, 65℃ 2 min, 75℃ 2 min 的顺序进行,共 25 个循环,最后一个循环的延伸条件为 75℃ 10 min。取 5μl PCR 产物经 2.3% 琼脂糖电泳,5μg/ml 的 EB 染色,照相。

1.3.5 定量分析 由 RT-PCR 扩增获得的 M_2、M_3 片段(cDNA)亚克隆到 pGEM-T 载体上,稀释成 300 amol/ml 至 1.23 amol/ml,作为标准 DNA。使用 M_2 或 M_3 引物,肌肉 RT 产物和一系列稀释的载体进行 25 个循环的 PCR 反应,琼脂糖电泳,5μg/ml 的 EB 染色,照相。

照片经扫描后,经图像分析仪测量 DNA 区的整合光密度值,亚克隆质粒整合光密度值与质粒数量可绘成半直方图。通过计算机计算不同浓度胶标准曲线的公式。从公式可根据 cDNA 的整合光密度值计算它的数量。对比 cDNA 的量反映其 mRNA 的表达水平。

1.3.6 统计学处理 数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 t 检验。

2 结果

2.1 尿动力学检查

实验组 15 只大鼠,膀胱出口梗阻后 6 周行充盈性膀胱测压,10 只出现逼尿肌不稳定。逼尿肌不稳定发生率为 67%,而对照组大鼠无逼尿肌不稳定发生。

2.2 逼尿肌不稳定 MR 亚型 mRNA 含量变化

对照组和 DI 组膀胱逼尿肌组织均含有 m_2RNA 和 m_3RNA,没有检测到 m_1、m_2 和 m_3 亚型的 mRNA。正常对照组膀胱逼尿肌 m_2RNA 含量明显多于 m_3RNA,两者之比约 2.59∶1;不稳定膀胱逼尿肌中 m_2 和 m_3 密度均增加,m_3 增加更明显($P<0.01$)。两者比值明显缩小,约 1.4∶1。见表 2。

表 2 不稳定膀胱逼尿肌 m_2 和 m_3 mRNA 含量变化($\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Changes of m_2, m_3 mRNA content in DI($\bar{x}\pm s$)

	cDNA		m_2mRNA∶m_3mRNA
	m_2	m_3	(m_2cDNA∶m_3cDNA)
Control	1.67±0.42	0.64±0.19	2.59±0.68
DI	2.03±0.65※	1.53±0.46※※	1.41±0.43※※

※: $P<0.05$, ※※: $P<0.01$ Control

3 讨论

膀胱是一具有良好顺应性的空腔器官,在其充盈和排空时能自我调整以适应膀胱容量的改变,且能保持一定的压力和形态。膀胱精细复杂的功能调节是由胆碱能神经、肾上腺素能神经、非肾上腺非胆碱能神经、肌细胞和细胞间连接等多种因素共同参与完成的,其中胆碱能神经是最重要的调节因素[2~4]。

资料显示:胆碱能受体有 5 种亚型,不同的组织器官存在不同的受体亚型,逼尿肌仅含有 M_2R 和 M_3R 两种亚型,不含有 M_1R、M_4R 和 M_5R 三种亚型;不同种属逼尿肌两亚型含量有很大差异,但 M_2R 数量均占绝对优势[5]。大鼠、兔和豚鼠膀胱逼尿肌 M_2R 与 M_3R 之比分别为 9∶1、3∶1、3∶1。文献[6]报道:逼尿肌细胞共表达 m_2、m_3 受体,m_2mRNA∶m_3mRNA 的比值为 1.06∶1。Wang 应用免疫组化对逼尿肌胆碱能受体亚型分布进行了研究,显示大鼠逼尿肌上 M_2R 与 M_3R 之比为 9.8∶1。本研究证实了大鼠逼尿肌上 m_2、m_3 的存在,不含有 m_1、m_4、m_5 亚型,两者之比为 2.6∶1。

对于 M 受体密度改变是否参与了逼尿肌不稳定的发生,各家报道不一致。有学者对逼尿肌高反射进行研究,认为 M 受体密度与逼尿肌高反射的产生无关[7]。鼠去神经膀胱研究显示,逼尿肌 M 受体密度较对照组显著增加,认为去神经膀胱导致乙酰胆碱递质减少,通过增加 M 受体数量来维持膀胱功能的完整,因此认为膀胱去神经后 M 受体密度增加可能导致逼尿肌对胆碱能激动剂敏感性的增加,提示鼠膀胱去神经后逼尿肌的自发性活动增加与 M 受体密度增加有关[8]。也有学者应用放射自显影方法对人不稳定膀胱研究显示逼尿肌 M 受体密度增加。

以上对不稳定膀胱发生中受体密度变化的研究主要是通过配体结合等药理学实验方法进行的,这些实验中的 M 受体密度是指所有的胆碱能受体的总和,而未能将 M 受体亚型分开。本实验中,我们首次通过 RT-PCR 方法对 M 受体亚型密度变化与逼尿肌不稳定产生之间的关系进行研究。结果显示,正常膀胱逼尿肌中,m_2R∶m_3R 的比值为 2.59∶1,而逼尿肌不稳定组 m_2R 和 m_3R 两种亚型的含量显著增多,m_3R 增加更明显,m_2R∶m_3R 的比值下降到 1.41∶1。推测,M_3R 可能在膀胱功能调节中起更大作用;受体上调使逼尿肌对神经递质及其类似物更敏感,兴奋性增加,有助于逼尿肌不稳定的产生;同时逼尿肌不稳定的产生与两受体亚型比例失调有关。

参考文献:

[1] Yamaguchi O, Shishido K, Tamura K, *et al*. Evaluation of mRNA encoding muscarinic receptor subtype in human detrusor muscle[J]. J Urol, 1996, 156(9): 1208-1212.

[2] Ishiura Y, Yoshiyama M, Yokoyama O, *et al*. Central muscarinic mechanisms regulating voiding in rats[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2001, 297(3): 933-935.

[3] Krichevsky V P, Pagala M K, Vaydovsky I. Function of M_3 muscarinic receptors in the rat urinary bladder following partial outlet obstruction[J]. J Urol, 1999, 161(5): 1644-1651.

[4] 卢根生, 宋 波, 金锡御, 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): 219-222.

[5] Andersson K E. Advances in the pharmacological control of the bladder[J]. Exp Physiol, 1999, 84(1): 195-203.

[6] Igawa Y. Discussion: functional role of M(1), M(2), and M(3) muscarinic receptors in overactive bladder[J]. Urology, 2000, 55(5A Suppl): 47-49.

[7] Hegde S S, Eglen R M. Muscarinic receptor subtypes modulating smooth muscle contractility in the urinary bladder[J]. Life Sci, 1999, 64(6-7): 419-423.

[8] Wallis R M, Napier C M. Muscarinic antagonists in development for disorders of smooth muscle function[J]. Life Sci, 1999, 64(6-7): 395-400.

(编辑 冷怀明)

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