

补肾活血方对 BPH 模型大鼠膀胱逼尿肌 缝隙连接蛋白表达的影响

孙洁¹ 李秋芬² 田代志³ 江少波¹ 鄢贤德¹ 裘顺安¹ 任小刚¹ 李玉兵¹

(1. 浙江中医药大学附属第一医院泌尿外科 浙江 杭州 310006; 2. 杭州市中医院肾内科 浙江 杭州 310000;
3. 湖北中医药大学中心实验室 湖北 武汉 430061)

摘要:目的: 观察补肾活血方对前列腺增生大鼠膀胱逼尿肌缝隙连接蛋白 43(Cx43) mRNA 及蛋白表达的影响。材料与方法: 清洁级雄性 Wistar 大鼠 48 只, 随机分为正常组、模型组、模型加补肾活血方组、模型加坦索罗辛组四组。除正常组外, 其它实验大鼠以去势加睾酮注射法复制大鼠 BPH 模型。于去势第一天起, 各组大鼠分别给予相应药物灌胃。模型 + 补肾活血方按 1 mL/100 g/日体重予补肾活血方(由淫羊藿、枸杞子、穿山甲、丹参、菟丝子等组成, 含生药量 2.34 g/mL) 灌胃。模型加坦索罗辛组按 1.8 μg/100 g/日体重予坦索罗辛灌胃。其余各组予等体积生理盐水灌胃。均每日 1 次, 连续 38 天后检测各组大鼠膀胱逼尿肌组织 Cx43 mRNA 及蛋白表达。结果: 与空白组相比, 模型组 Cx43 mRNA 表达明显上升(2.08 vs 30.69 $P < 0.01$)。坦索罗辛及补肾活血方组 Cx43 mRNA 表达与空白组相比也有升高, 但无统计学差异(16.05, 12.74, 2.08 $P > 0.05$)。与模型组相比, 补肾活血方(12.74 vs 30.69 $P < 0.01$) Cx43 mRNA 表达明显下降。与空白组相比, 模型组及补肾活血方、坦索罗辛等各组 Cx43 蛋白表达明显上升(分别为 1.44, 3.89, 1.86, 2.73), 而补肾活血方、坦索罗辛各组与模型组相比, Cx43 蛋白表达均明显下降($P < 0.01$)。结论: 补肾活血方组可以明显降低 BPH 模型大鼠膀胱组织 Cx43 mRNA 及蛋白表达, 这可能是补肾活血方有效改善 BPH 继发膀胱改变的机制之一。

关键词: 前列腺增生; 膀胱; 缝隙连接蛋白; 中医药

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 1673-7717(2012)08-2501-03

Influence of Bushen Huoxue Formula on Mrna/Protein Expression of Connexin 43(Cx43) in the Detrusor of Benign Prostatic Hyperplasia(BPH) Rats

SUN Jie¹, LIU Qiu-fen², TIAN Dai-zhi³, JIANG Shao-bo¹, WU Xian-de¹, QIU Shun-an¹, REN Xiao-gang¹, LI Yu-bing¹

(1. First Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310006, Zhejiang, China;

2. Hangzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310000, Zhejiang, China;

3. Hubei University of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430061, Hubei, China)

Abstract: Objective: To observe the effect of Bushen Huoxue Formula on mRNA/protein expression of connexin 43 (Cx43) in the detrusor of benign prostatic hyperplasia (BPH) rats. Methods: Clean grade 48 male Wistar rats were randomly divided into four groups (A-D group). Except A group, the other groups received castration plus testosterone injection to make model of BPH. On the first day of castration, the rats were given the appropriate medication orally. C group gavage with Bushen Huoxue Formula (1 mL/(100 g · day), including herbs with 2.34 g/mL). D group received Tamsulosin with 1.8 μg/(100 g · day), and A and B groups received the same volume saline. The mRNA/protein expression of Cx43 in the detrusor tissue of all groups was detected after 38 days. Results: Compared with the control group, the Cx43 mRNA expression of B group was significantly increased (2.08 vs 30.69 $P < 0.01$). The Cx43 mRNA expression also increased in C and D groups compared with the blank group, but without statistical difference (16.05, 12.74, 2.08 $P > 0.05$). Compared with the B group, Cx43 mRNA expression was significantly decreased in C group (12.74 vs 30.69 $P < 0.01$). The protein expression of Cx43 was significantly increased in B, C, D groups compared with that in the A group (3.89, 1.86, 2.73 respectively vs 1.44). But protein expression of Cx43 was significantly decreased ($P < 0.01$) compared with that in

收稿日期: 2012-06-21

基金项目: 浙江省中医药管理局普通项目(2008CB006)

作者简介: 孙洁(1975-), 男, 湖北孝感人, 博士, 研究方向: 中医男科证治。

the B group. *Conclusion:* Bushen Huoxue Formula can significantly downregulate the mRNA/protein expression of connexin 43 (Cx43) in the detrusor of benign prostatic hyperplasia rats, which may be one of the mechanisms of Bushen Huoxue Formula protecting bladder function of BPH rats.

Key words: benign prostatic hyperplasia; bladder; collagen; Bushen Huoxue Formula

良性前列腺增生(BPH)是老年男性最常见泌尿系统疾病之一。在美国,70%的60~69岁男性患有BPH,而70岁以上男性BPH发病率高达80%^[1]。2002~2004年期间上海浦东地区50岁以上男性BPH总发病率高达62.9%^[2]。症状性BPH使患者睡眠变差、性能力下降,拒绝社交,甚至引起焦虑、忧郁,严重影响了老年男性的生活质量^[3]。

近年来的研究发现,BPH患者的下尿路症状(LUTs)并不完全与增大的前列腺体积导致的膀胱出口梗阻(BOO)直接相关。由BOO引起的膀胱改变也是引起LUTs,尤其是储尿期症状的重要原因。为了明确中药保护BPH膀胱功能的可能机制,我们观察了验方补肾活血方对BPH大鼠模型膀胱缝隙蛋白Cx43表达的影响,报道如下。

1 材料及方法

1.1 动物 3月龄清洁级雄性Wistar大鼠48只。

1.2 主要实验试剂 乌拉坦(分析纯)Sigma公司(美国); Trizol RNA提取试剂盒(Invitrogen公司,美国); CyberGreen mix 荧光染料(TOYOBO公司); 焦磷酸二乙酯(DEPC)(深圳晶美生物工程有限公司,深圳); Oligo(dT) 15 Primer(Promega公司,美国); dNTP(Promega公司,美国); RNase(Promega公司,美国); TaqDNA聚合酶(4u/ul)(Promega公司,美国); M-MLV逆转录酶(Promega公司,美国); 考马斯亮蓝R-250(Coomassie Blue)(深圳晶美生物工程有限公司,深圳); 考马斯亮蓝G-250(深圳晶美生物工程有限公司,深圳); PVDF膜(NEN公司,美国); X光感光胶片(厦门柯达公司); 辣根酶标记兔抗羊IgG(H+L)(北京中山生物技术有限公司)。

1.3 分组 随机分为正常组、模型组、模型加补肾活血方组、模型加坦索罗辛组4组。

1.4 造模 除正常组外,其它实验大鼠在戊巴比妥钠麻醉后,常规消毒皮肤,经阴囊摘除双侧睾丸,残端处结扎,以确保止血、缝合皮肤。去势后,将去势大鼠随机分为模型组、模型加补肾活血方组、模型加坦索罗辛组。并于去势后第8天起,每只大鼠皮下注射丙酸睾酮1mg/(300g·d),连续30天,造模结束。

1.5 给药 自由饮食。于去势第一天起,各组大鼠分别给予相应药物灌胃。模型+补肾活血方按1mL/(100g·d)体重予补肾活血方(由淫羊藿、枸杞子、穿山甲、丹参、菟丝子等组成,含生药量2.34g/mL)灌胃。模型加坦索罗辛组按1.8μg/100g/日体重予坦索罗辛灌胃。其余各组予等体积生理盐水灌胃。均每日1次,连续30天。

2 检测方法

2.1 以实时荧光定量PCR方法检测膀胱逼尿肌组织Cx43表达 引物序列见表1,由上海生工生物工程技术服务有

限公司合成。

表1 引物序列

扩增对象	上游引物	下游引物	片段长度
Cx43	GCGCAATTACAACAAGCAA	ACCAACTCCACGGGAACGAA	354bp
β-actin	CGTTGACATCCGTAAAGACCTC	TAGGAGCCAGGCGACTAATCT	110bp

以TRIzol法提取总mRNA后,进行逆转录,反应条件为42℃ 25min,95℃ 5min,4℃ 5min。将获取的cDNA进行实时荧光定量PCR扩增,反应体系为SYBR Green mix 12.5μL,引物(5pmol/μL) 2μL,cDNA(10倍稀释) 2.5μL,ddH₂O 8μL。反应条件为50℃ 2min后,95℃退火2min,扩增条件为95℃ 15s,61℃ 20s,72℃ 40s,扩增40个循环。采用2^{-ΔΔCt}方法计算Cx43的表达水平。首先利用PCR仪自带软件求得各基因的Ct值,以β-actin的Ct值标准化Cx43基因Ct值,得到基因初始模板相对量,再计算Cx43基因初始模板相对量与前β-actin基因初始模板相对量的比值,分析Cx43表达相对量的变化。

2.2 Western blot法检测膀胱组织中Cx43水平 提取膀胱组织总蛋白后,按如下方法操作:(1)电泳:灌制聚丙烯酰胺凝胶后,膀胱组织总蛋白上样电泳,电泳电压浓缩胶为95V,分离胶为160V;(2)转膜:电泳结束后,取出凝胶,将之与大小相同的PVDF膜(事先用95%乙醇固定)置于6层(上下3层)滤纸中间,置入转移槽中,加满转移液,95mA电泳转膜约12h后,取出PVDF膜,自然晾干,置于95%乙醇中固定;(3)洗膜:0.01M PBST洗15min×3次;(4)封闭:0.01M配制的PBST-5%脱脂奶粉中封闭非特异性蛋白,37℃的空气摇床中振荡约4h,0.01M PBST洗15min×3次;加I抗体(1:1000用0.01M PBST配制),37℃的空气摇床中振荡3~4h;0.01M PBST洗15min×3次;加兔抗羊IgG二抗(1:2000用0.01M PBST配制),37℃的空气摇床中振荡1~2h;0.01M PBST洗15min×3次;(5)显影:将PVDF膜置于NEN化学发光试剂中反应1~3min;在暗室中使X光片曝光,常规方法显影、定影;(6)凝胶扫描成像系统进行分析,蛋白表达量用密度(Odu*mm²)表示。

3 结果

RT-PCR结果显示模型组与空白组相比,Cx43 mRNA表达明显上升($P<0.01$),坦索罗辛及补肾活血方组Cx43 mRNA表达与空白组相比也有升高,但无统计学差异($P>0.05$)。补肾活血方与模型组相比Cx43 mRNA表达明显下降($P<0.01$)。Western blot结果与RT-PCR类似,模型组($P<0.01$)及补肾活血方($P<0.05$)、坦索罗辛($P<0.01$)等各组与空白组相比,Cx43蛋白表达明显上升,而补肾活血方、坦索罗辛各组与模型组相比,Cx43蛋白表达均明显下降($P<0.01$)。详见表2。

表2 各组大鼠膀胱逼尿肌 Cx43 表达比较

组别	Cx43 mRNA(OD Ratio)	Cx43 蛋白(Odu*mm ²)
空白组	2.08 ± 1.02	1.44 ± 0.25
模型组	30.69 ± 18.71**	3.89 ± 0.25**
坦索罗辛组	16.65 ± 7.35*	2.73 ± 0.33***
补肾活血方组	12.74 ± 7.22**	1.86 ± 0.49***

注: *与空白组比较有显著性差异 $P < 0.05$, **与空白组比较有非常显著性差异 $P < 0.01$; *与模型组比较有显著性差异 $P < 0.05$, **与模型组比较有非常显著性差异 $P < 0.01$ 。

4 讨 论

BPH 患者前列腺体积增大引起的下尿路症状(LUTs)是 BPH 困扰中老年男性的最重要原因。然而在通过手术等方法解除膀胱出口梗阻(BOO)后仍有 30% 患者存在逼尿肌过度活动而需要进一步治疗^[4]。BPH 患者的 LUTs 还可能与继发于 BOO 的各种膀胱功能改变有关^[5-6]。因此我们有必要寻找有效而且安全的方法保护 BPH 患者膀胱功能,这也要求我们对 BPH 继发的膀胱改变及其机制有更加清晰、深入的了解。

膀胱逼尿肌是维持膀胱低压储尿,低压排尿的重要结构。它在储尿期时能在一定容量下维持较高张力而不收缩,当需要排尿时,膀胱颈口开放,膀胱所有逼尿肌协同收缩,产生高于尿道压的膀胱内压,使尿液排空。这一过程需要逼尿肌平滑肌细胞之间的协同,因此细胞间通讯对维持正常膀胱功能非常重要。

逼尿肌平滑肌细胞之间通过两种方式传递信息。一种是由中间连接介导的机械耦联,其特点是传递速度较慢,传递肌细胞产生的收缩力;一种是基于缝隙连接的电耦联,其特点是传递速度较快,传递肌细胞收缩的电信号。缝隙连接可以连接相邻的两个细胞,提供低电阻通路,从而使选择性地使小于 1kDa 的低分子物质如各种离子和 cAMP、cGMP 等通过自由扩散由一个细胞传递到另一个细胞。在传递离子的同时,实际也传递了电信号。这种通过缝隙连接的细胞间通讯对在细胞间维持和传递刺激非常重要^[7]。

在 Cx 家族中共有 12 个不同的亚单位,其中 Cx43 是最主要的一种^[8]。近年来,人们认为细胞间通讯可能是引起逼尿肌过度活动的重要原因之一^[9]。有研究者观察到在复制 PBOO 模型 6 周后,逼尿肌过度活动的逼尿肌 Cx43 mRNA 表达比对照组高 75 倍以上^[10]。而在使用 Cx43 阻断剂后,能有效改善 BOO 继发的 DI^[11],说明 Cx43 在 BPH 继发的 DI 发病过程中起着重要作用。

我们的研究数据显示,BPH 模型大鼠膀胱逼尿肌组织 Cx43 mRNA 和蛋白表达均明显上升,均为空白组的 4 倍。而补肾活血方治疗组逼尿肌组织 Cx43 mRNA 和蛋白表达明显下降,接近空白组水平,与之相比无统计学差异。提示补肾活血方可能通过降低逼尿肌 Cx43 水平,改善了逼尿肌细胞之间的信息传递,从而有效控制 BPH 继发的 DI,这也可能是中医补肾活血方治疗 BPH 的另一有效机制。

参考文献

[1] Wei JT, Calhoun E, Jacobsen SJ. Urologic diseases in America

project: benign prostatic hyperplasia [J]. J Urol, 2005, 173: 1256 - 1261.

- [2] 石泉, 姜宁, 王国增, 等. 浦东新区 50 岁以上男性前列腺增生症流行病学调查[J]. 中国男科学杂志, 2006, 20: 36 - 38.
- [3] Sountoulides P, van Dijk MM, Wijkstra H, et al. Role of voiding and storage symptoms for the quality of life before and after treatment in men with voiding dysfunction [J]. World J Urol, 2010, 28: 3 - 8.
- [4] Mitterberger M, Pallwein L, Gradjl J, et al. Persistent detrusor overactivity after transurethral resection of the prostate is associated with reduced perfusion of the urinary bladder [J]. BJU Int, 2007, 99: 831 - 835.
- [5] 吴娟, 廖利民, 付光, 等. 前列腺增生患者逼尿肌过度活动伴收缩功能受损对排尿的影响[J]. 中国康复理论与实践, 2007, 13: 1083 - 1084.
- [6] 傅承忠, 宋永胜, 陈智彬, 等. 经尿道前列腺电切术后储尿期症状状况分析[J]. 中华男科学杂志, 2010, 16: 994 - 998.
- [7] Li L, Jiang C, Hao P, et al. Changes of gap junctional cell-cell communication in overactive detrusor in rats [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2007, 293: C1627 - 1635.
- [8] Rackauskas M, Neverauskas V, Skeberdis VA. Diversity and properties of connexin gap junction channels [J]. Medicina (Kaunas), 2010, 46: 1 - 12.
- [9] Christ GJ, Day NS, Day M, et al. Increased connexin43-mediated intercellular communication in a rat model of bladder overactivity in vivo [J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2003, 284: R1241 - 1248.
- [10] Christ GJ, Venkateswarlu K, Day NS, Valcic M, Santizo C, Zhao W, Wang HZ, Persson K, Andersson KE. Intercellular communication and bladder function [J]. Adv Exp Med Biol, 2003, 539: 239 - 254.
- [11] Wang Q, Yu WC, Jiang HZ, et al. Effects of gap junction blocking on the oxygen partial pressure in acupoints of the bladder meridian [J]. Zhongguo Zhen Jiu, 2010, 30: 1011 - 1014.

英国丙肝疫苗临床试验取得初步成效

英国研究人员日前报告说,他们对一种丙肝疫苗进行的临床试验取得初步成效。这种疫苗的效果能至少持续 1 年,并且没有太大不良反应。

英国牛津大学等机构的研究人员在学术刊物《科学转化医学》上报告了这项成果。目前,医学上一直缺少有效的丙肝疫苗。本次研究中所使用的疫苗是以一种腺病毒为基础开发的,它没有模仿丙肝病毒易变的外壳,而是模仿了其内部相对长期稳定不变的结构。

共 41 名健康志愿者注射了这种疫苗,结果显示在用该疫苗“培训”过一种名为 T 细胞的免疫细胞后,T 细胞能够长期对丙肝病毒进行攻击,这种效果在为期 1 年的跟踪研究期间内都有效。

试验还显示这种疫苗没有太大的不良反应,受试者最多出现轻微头痛或局部疼痛等症状。