

· 基础研究 ·

P2X3 受体在神经源性膀胱大鼠背根神经节及逼尿肌中的表达

章慧平 陈忠 叶章群 熊承良 朱长虹 杜广辉 陈园 胡卫锋 胡丽娟 曾晓勇

【摘要】目的 探讨 P2X3 受体在不同平面脊髓损伤后神经源性膀胱大鼠 L₆~S₁ 背根神经节 (DRG) 和膀胱逼尿肌中的表达变化及临床意义。**方法** 共选取健康雌性 SD 大鼠 80 只, 将其随机分为骶上脊髓 (胸腰段) 损伤组、骶髓损伤组及对照组。采用脊髓横断法制备大鼠不同平面脊髓损伤后神经源性膀胱模型, 于模型制作 20 d 后采用 Western blotting 技术检测各组大鼠背根神经节和膀胱逼尿肌中 P2X3 受体表达情况, 并进行组间比较。**结果** 骶上脊髓损伤组大鼠背根神经节、膀胱逼尿肌中 P2X3 受体表达水平较对照组、骶髓损伤组明显增高 ($P < 0.01$); 骶髓损伤组背根神经节、膀胱逼尿肌中 P2X3 受体表达水平较对照组明显降低 ($P < 0.05$)。**结论** 结合本课题前期研究的尿流动力学检查结果, 推测 P2X3 受体表达水平与膀胱尿道功能障碍程度密切相关, 有望通过影响 P2X3 受体表达水平为临床治疗脊髓损伤后神经源性膀胱提供新途径。

【关键词】 脊髓损伤; 动物模型; P2X3 受体; 背根神经节; 膀胱逼尿肌

P2X3 receptor expression in DRG and bladder detrusor of an animal model of neurogenic bladder and urethra ZHANG Hui-ping*, CHEN Zhong, YE Zhang-qun, XIONG Cheng-liang, ZHU Chang-hong, DU Guang-hui, CHEN Yuan, HU Wei-feng, HU Li-juan, ZENG Xiao-yong. * Family Planning Research Institute, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

Corresponding author: CHEN Zhong, Email: chenzhongtj@126.com

【Abstract】Objective To investigate the P2X3 receptor expression in L₆-S₁ dorsal root ganglion (DRG) and bladder detrusor in a rat model of neurogenic bladder and urethra. **Methods** Eighty Sprague-Dawley rats were recruited and randomly divided into a sacral injury group, a suprasacral injury group and a control group. Spinal transection was performed to establish the animal model of neurogenic bladder and urethra in rats of the sacral injury group and suprasacral injury group. Check the P2X3 receptor expression in DRG and bladder detrusor among the three groups by Western blot test at 20 days after model establishment. **Results** P2X3 receptor expression in L₆-S₁ DRG of sacral injury group was significantly less than that of the suprasacral injury group, which was in turn significantly higher than that of the control group. P2X3 receptor expression in bladder detrusor of sacral injury group was significantly lower than that of the suprasacral injury group, which was in turn significantly higher than that of the control group. **Conclusion** There was close relationship between P2X3 receptor expression and dysfunction of bladder and urethra.

【Key words】 Spinal cord injury; P2X3 receptor; Dorsal root ganglion; Bladder detrusor

三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 作为细胞内能量库, 在组织损伤或被分泌释放到细胞外时, 可作用于细胞表面 P2 嘌呤受体 (包括 P2X、P2Y 受体家族), 从而发挥递质作用。迄今为止, 人们采用分子克隆技术已确定了 7 种哺乳动物的 P2X 受体亚型 (P2X1~P2X7), 不同亚型间有 40%~50% 氨基酸序列相同^[1,2]。P2X3 受体是 Chen 等^[3] 于 1995 年从大鼠背根神经节 (dorsal root ganglion, DRG) 中发现并成功将

其克隆, 通过原位杂交技术显示 P2X3 受体定位于 DRG 小细胞内。Zhong 等^[4] 研究发现, 膀胱感觉传入神经元分布在 L₆~S₁ DRG 中。本研究拟采用 Western blot 技术检测大鼠神经源性膀胱模型 L₆~S₁ DRG 和膀胱逼尿肌中 P2X3 受体表达水平, 并结合前期对神经源性膀胱大鼠模型的尿流动力学检查结果, 分析 P2X3 受体与膀胱尿道功能障碍间的相关性。现报道如下。

材料与方法

一、脊髓损伤大鼠神经源性膀胱模型建立及分组

共选取健康雌性 SD 大鼠 80 只, 体重 220~250 g, 由华中科技大学同济医学院动物实验中心提供, 所有

基金项目: 湖北省自然科学基金项目 (2005S2178, 2006ABA151)

作者单位: 430030 武汉, 华中科技大学同济医学院计划生育研究所 (章慧平、熊承良、朱长虹); 华中科技大学同济医学院附属同济医院泌尿外科 (陈忠、叶章群、杜广辉、陈园、胡卫锋、胡丽娟、曾晓勇)

通讯作者: 陈忠, Email: chenzhongtj@126.com

大鼠均在通风良好条件下分笼饲养,期间自由摄食、饮水。将上述 80 只大鼠随机分为骶上脊髓(胸腰段)损伤组(30 只)、骶髓损伤组(30 只)及对照组(20 只)。

选用脊髓横断法^[5]制备大鼠不同平面脊髓损伤后神经源性膀胱模型,采用 10% 乌拉坦溶液(1.0 g/kg 体重)腹腔注射麻醉大鼠,将与浮肋相连的第 13 胸椎作为骨性标志进行定位,骶上脊髓损伤部位位于脊髓 T₁₀ ~ L₂ 节段(对应于 T₈₋₁₂ 椎体),骶髓损伤位于 S₂₋₄ 部位(对应于 L₂₋₄ 椎体),于确定损伤部位后备皮、消毒,行背部正中切口,依次切开皮肤、皮下筋膜,向两侧钝性分离竖脊肌,破坏椎体直至暴露脊髓,采用眼科手术刀将脊髓快速切断,可见大鼠后肢痉挛性抽搐数次后软瘫,用显微剪剪除一段长约 1 mm 的脊髓组织,并以弯头显微镊轻轻抬起被剪脊髓两断端以证实脊髓完全横断。术后大鼠单笼饲养,皮下注射青霉素 20 万单位,1 次/d;同时腹腔注射 3 ml 生理盐水,2 次/d,共持续 1 周时间;实验期间每天挤压大鼠体表膀胱投影区上方以协助其排尿、排便,每日 4 次。由于脊髓休克、泌尿系感染等原因导致的实验动物死亡率较高,本研究于模型制作 20 d 后经尿流动力学检查有完整数据的实验大鼠数量分别为:骶上脊髓损伤组 16 只;骶髓损伤组 19 只;对照组 18 只。对照组大鼠在进行尿流动力学检查前均正常饲养,期间不给予任何特殊处理。

二、主要实验试剂和仪器

十二烷基硫酸钠(SDS)、二巯基苏糖醇(DTT)、丙烯酰胺、亚甲双丙烯酰胺、Leupeptin、Aprotinin 均为美国 Sigma 公司产品;兔抗 P2X₃(美国 Santa Cruz 公司产品)购于北京中山试剂公司,生物素标记的羊抗兔 IgG 为北京中山公司产品。Avanti™ 型低温高速离心机为美国 Beckman 公司产品,硝酸纤维素膜(nitrocellulose film, NC 膜)为美国 Amersham 公司产品。

三、P2X₃ 受体的免疫印迹(Western blotting)分析

各组实验大鼠均采用免疫印迹法进行 P2X₃ 受体表达水平分析,具体操作步骤如下。

1. 大鼠 DRG 组织细胞膜蛋白样品制备:于术后 20 d 时行尿流动力学检测,然后将骶上脊髓损伤组、骶髓损伤组及对照组大鼠快速断头处死,取 L₆ ~ S₁ DRG 和膀胱逼尿肌标本。制备细胞膜蛋白样品步骤如下:加入 10 倍体积的预冷匀浆缓冲液 A(包含 10 mmol/L Tris-acetate, 5 mmol/L EDTA, pH 值为 7.4),其中含蛋白酶抑制剂 Aprotinin(5 μg/ml)、Leupeptin(10 μg/ml)和 PMSF(0.1 mol/L),标本经匀浆后离心 10 min(1000 g),将上清液转移至另一离心管内再次离心 60 min(12 000 g),弃去上清液。膜沉淀用含上述相同蛋白酶抑制剂的缓冲液 B(含

20 mmol/L Tris-HCl, 140 mmol/L NaCl, pH 值为 7.4)重新混悬。上述操作均在 4 ℃ 环境下进行。采用考马斯亮蓝法测定蛋白浓度后,于 -20℃ 环境中保存待测。

2. P2X₃ 受体 Western blotting 分析:将各实验组大鼠蛋白标本置入上样缓冲液中,在浓度为 6% 的十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)中电泳分离,每条泳道蛋白上样量为 50 μg,每次电泳包括各实验组大鼠 DRG 和膀胱逼尿肌蛋白样本各 3 个。待电泳结束后,用湿法电转蛋白质至硝酸纤维素(NC)膜上。将转移后的 NC 膜用 5% 脱脂奶粉封闭 1 h,加入一抗兔抗 P2X₃(1:400),4℃ 环境下过夜;经 TTBS 洗膜后,加入经辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG(1:1000),室温环境下孵育 1 h;经 TTBS 充分洗膜后,再将膜置入 DAB 溶液中显色。采用图像分析系统对 NC 膜上的目标蛋白质条带灰度值进行测定,以每张 NC 膜中对照组的第 1 个条带灰度值为标准,将同一膜上其它条带的灰度值与其进行比较,并计算相应比值进行定量分析。

四、统计学分析

本研究所得数据以($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 11.5 版统计学软件包进行数据分析,统计学方法选用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

结 果

骶上脊髓损伤组 DRG 和膀胱逼尿肌中 P2X₃ 受体表达水平较对照组、骶髓损伤组显著增高,组间差异具有统计学意义($P < 0.01$);骶髓损伤组 DRG 和膀胱逼尿肌中 P2X₃ 受体表达水平较对照组显著降低,差异亦有统计学意义($P < 0.05$),具体数据详见表 1、图 1。

表 1 各组大鼠 DRG、膀胱逼尿肌中 P2X₃ 受体表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

组 别	只数	P2X ₃ 受体表达水平	
		DRG	膀胱逼尿肌
骶上脊髓损伤组	19	20.7736 ± 0.5697 ^a	18.3067 ± 0.4109 ^a
骶髓损伤组	16	5.8923 ± 0.1261 ^b	4.7892 ± 0.2215 ^b
对照组	18	9.2550 ± 0.1668	8.3067 ± 0.2597

注:与骶髓损伤组、对照组比较,^a $P < 0.01$;与对照组比较,^b $P < 0.05$

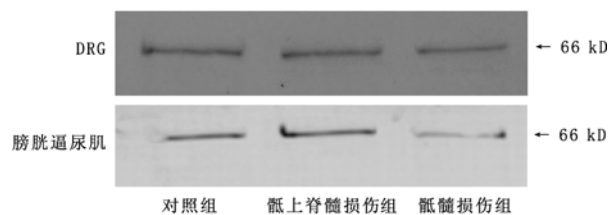


图 1 3 组大鼠 DRG 和膀胱逼尿肌中 P2X₃ 受体表达水平比较

讨 论

临床上多数神经系统疾病患者经常会出现神经性下尿路功能障碍,如处理不当会严重威胁患者生命。目前临床对大多数神经源性膀胱患者的主要治疗手段仍是保守治疗,其具体治疗方法取决于所患疾病类型。针对膀胱功能障碍患者而言,其病情转归有自然恢复因素存在,但更重要的是与患者一般状况、所采取的治疗措施密切相关^[6]。

本研究结果表明,骶髓损伤组大鼠 DRG、膀胱逼尿肌中 P2X₃ 受体表达水平较对照组、骶上脊髓损伤组显著降低,骶上脊髓损伤组大鼠 DRG、膀胱逼尿肌中 P2X₃ 受体表达水平较对照组显著增高,提示 P2X₃ 受体在 L₆~S₁ DRG 和逼尿肌中的表达水平与脊髓损伤平面密切相关。本研究前期实验发现,实验大鼠在渡过脊髓休克期后,骶上脊髓损伤组膀胱最大容量、膀胱顺应性较对照组、骶髓损伤组显著下降($P < 0.01$),骶髓损伤组膀胱最大容量、膀胱顺应性较对照组显著增加($P < 0.01$);骶上脊髓损伤组逼尿肌漏尿点压力较对照组、骶髓损伤组明显升高($P < 0.01$),骶髓损伤组逼尿肌漏尿点压力较对照组显著降低($P < 0.01$)^[7]。有研究发现,女性特发性逼尿肌不稳定患者、脊髓神经源性逼尿肌过度活动症患者以及间质性膀胱炎患者其 P2X₃ 受体表达水平均较正常人明显增高^[8-10]。Debra 等^[11]对 P2X₃ 受体基因敲除大鼠的膀胱排尿反射功能研究后发现,P2X₃ 受体基因敲除大鼠 DRG、脊髓和外周神经中均未检测到 P2X₃ 免疫阳性反应;当实验大鼠 P2X₃ 受体基因被敲除后,其表现出明显的膀胱反射功能减弱、排尿次数减少、膀胱容量增加。以上研究结果均提示,P2X₃ 受体表达水平与膀胱尿道功能障碍程度密切相关。

Nilson 等^[12]对 T₉~T₁₀ 水平脊髓横断大鼠研究后发现,脊髓嘌呤受体(如 P2X₃ 受体)主要具有以下作用:①传递外周伤害性信号;②在由急性膀胱炎诱发的膀胱过度活动中发挥功能调节作用;③促进慢性炎症诱发的中枢神经系统致敏反应;④加剧急性脊髓损伤后以神经元变性为基础的兴奋性中毒反应;同时他还发现脊髓损伤大鼠脊髓 ATP 释放增多可能是由于能释放 ATP 的传入神经末梢数量增多和/或单个传入神经末梢神经释放 ATP 量增加所致。Nilson 等^[12]认为,当脊髓上通路被破坏后,机体还存在多个 ATP 释放源,如脊髓传入神经末梢、中间神经元甚至神经胶质细胞等;然而不论是哪种起源释放的 ATP,相关研究都清

楚表明慢性脊髓损伤时中枢嘌呤反应增强。

目前针对脊髓损伤后膀胱尿道功能障碍的治疗视患者病情不同,其方法及疗效各异。对原发神经病变不能恢复的膀胱尿道功能障碍患者,其治疗以达到“平衡膀胱”为主要目的,即患者膀胱能低压储尿并有较大容量,能不用导尿管排空膀胱,无尿失禁,上尿路功能不受继发损伤等。本研究结果提示,针对脊髓损伤后神经源性膀胱患者,如采取一定措施增加或减少 DRG 或膀胱壁中 P2X₃ 受体水平,或采用某种制剂改变 P2X₃ 受体功能状态,可有效缓解尿失禁、尿频尿急综合征、排尿困难以及非梗阻性尿潴留等疾病,从而达到“平衡膀胱”的治疗目的。

参 考 文 献

- [1] Dunn PM, Zhong Y, Brunstock G. P2X receptors in peripheral neurons. *Prog Neurobiol*, 2001, 65: 107-134.
- [2] North RA. Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev*, 2002, 82: 1013-1067.
- [3] Chen CC, AKopian AN, Sivilotti L, et al. A P2X purinoceptor expressed by a subset of sensory neurons. *Nature*, 1995, 377: 428-431.
- [4] Zhong Y, Banning AS, Cockayne DA, et al. Bladder and cutaneous sensory neurons of the rat express different functional p2x receptors. *Neuroscience*, 2003, 120: 667-675.
- [5] Yoshiyama M, Nezu FM, Yokoyama O, et al. Changes in micturition after spinal cord injury in conscious rats. *Urology*, 1999, 54: 929-933.
- [6] Jean JW. Conservative treatment of patients with neurogenic bladder. *Eur Urol*, 2008, 7: S557-S565.
- [7] 曾晓勇, 章慧平, 陈忠, 等. 大鼠脊髓不同平面损伤后神经源性膀胱模型的尿流动力学检查. *中华物理医学与康复杂志*, 2007, 29: 677-679.
- [8] O'Reilly BA, Kosaka AH, Knight GF, et al. P2X receptors and their role in female idiopathic detrusor instability. *J Urol*, 2002, 167: 157-164.
- [9] Brady CM, Apostolidis A, Yiangou Y, et al. P2X₃-immunoreactive nerve fibres in neurogenic detrusor overactivity and the effect of intravesical resiniferatoxin. *Eur Urol*, 2004, 46: 247-253.
- [10] Tempest HV, Dixon AK, Turner WH, et al. P2X and P2X₃ receptor expression in human bladder urothelium and changes in interstitial cystitis. *BJU Int*, 2004, 93: 1344-1348.
- [11] Debra A, Cockayne SG, Hamilton Q, et al. Urinary bladder hyporeflexia and reduced pain-related behaviour in P2X₃-deficient mice. *Nature*, 2000, 407: 1011-1015.
- [12] Nilson A, Salas GT, David A, et al. Receptor activated bladder and spinal ATP release in neurally intact and chronic spinal cord injured rats. *Neurochem Int*, 2007, 50: 345-350.

(修回日期: 2008-05-25)

(本文编辑: 易 浩)