

Connexin-43 Expressed on Cell Membranes in Rat Detrusor Muscle with Partial Bladder Outlet Obstruction Rats

Qiang Chi^{1*}, Man Yu¹, Zhiyong Wang¹, Ying Liu¹, Guang Ma¹, Hui Xu¹, Junpeng Li¹, Zemin Wang¹, Dianbing Song¹, Lei Wang¹, Fenghai Zhou², Yangmin Wang²

¹Department of Urology, The Affiliated Hospital to Chengde Medical College, Chengde Hebei

²Department of Urology, Lanzhou General Hospital of PLA, Lanzhou Gansu

Email: *chi_qiang.2007@163.com

Received: Jul. 9th, 2018; accepted: Jul. 26th, 2018; published: Aug. 2nd, 2018

Abstract

Objectives: To investigate alterations of gap junctional protein, connexin-43 (Cx-43), in the rat detrusor muscle with partial bladder outlet obstruction (P-BOO). **Methods:** A total of 33 female Wistar rats (10 weeks old) were divided into a P-BOO group and a sham-operated control group and were killed at 2, 4, and 8 weeks after surgery. Cystometric investigation, the alteration of gap junction, and Cx-43 protein expression, which compose the gap junction, were examined. **Results:** The number of gap junctions was decreased in the P-BOO rat bladder. Furthermore, decreased cellular membrane expression of Cx-43 proteins was detected in rat detrusor muscle cells more than 4 weeks after surgery. The gap junctions of the detrusor muscle cell membranes were significantly fewer in number of the P-BOO rats with no detrusor contractions. **Conclusions:** These data suggest that the normal signals that contribute to voiding function could be transported directly through the gap junctions. Voiding dysfunction may be caused by the disruption of gap junctional intercellular communication.

Keywords

Connexin-43, Bladder, Obstruction, Model, Animal, Detrusor Muscle Cell, Cell Membrane

缝隙连接蛋白-43在膀胱出口部分梗阻的大鼠逼尿肌细胞膜中的表达

迟强^{1*}, 于满¹, 王志勇¹, 刘英¹, 马光¹, 徐辉¹,
李俊鹏¹, 王泽民¹, 宋殿宾¹, 王磊¹, 周逢海², 王养民²

*通讯作者。

文章引用: 迟强, 于满, 王志勇, 刘英, 马光, 徐辉, 李俊鹏, 王泽民, 宋殿宾, 王磊, 周逢海, 王养民. 缝隙连接蛋白-43在膀胱出口部分梗阻的大鼠逼尿肌细胞膜中的表达[J]. 生理学研究, 2018, 6(1): 1-7.

DOI: 10.12677/jps.2018.61001

¹承德医学院附属医院泌尿外科, 河北 承德

²兰州军区兰州总医院全军泌尿外科中心, 甘肃 兰州

Email: *chi_qiang.2007@163.com

收稿日期: 2018年7月9日; 录用日期: 2018年7月26日; 发布日期: 2018年8月2日

摘要

目的: 探讨缝隙连接蛋白-43在膀胱出口部分梗阻大鼠逼尿肌细胞膜中表达的变化。**方法:** 将33只雌性Wistar大鼠(10周龄)分为模型组和假手术组, 两组大鼠分别于术后2、4和8周处死, 同时进行膀胱内测压、缝隙连接数量、形态变化及缝隙连接蛋白-43的检测。**结果:** 在模型组中缝隙连接的数量显著降低, 并且术后4周缝隙连接蛋白-43在模型组大鼠逼尿肌细胞膜上的表达显著降低。模型组大鼠逼尿肌细胞膜上的缝隙连接数量也明显减少。**结论:** 正常的排尿过程是通过逼尿肌细胞间的缝隙连接直接作用的结果。缝隙连接介导的细胞间通讯功能障碍可能是导致排尿功能障碍的原因。

关键词

缝隙连接蛋白-43, 膀胱, 梗阻, 动物, 模型, 逼尿肌细胞, 细胞膜

Copyright © 2018 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

人类膀胱出口部分梗阻(Partial bladder outlet obstruction, P-BOO)常继发于慢性前列腺增生, 一般认为膀胱逼尿肌细胞的增生、肥大是该病的病理学基础。这些组织学的改变伴随相应的功能改变, 包括残余尿量增多, 尿频及排尿压的改变。缝隙连接是通过位于相邻细胞膜之间的连接子构成, 其化学成分为六聚体的连接蛋白。目前发现在人体中至少有 13 种缝隙连接蛋白基因。缝隙连接蛋白介导的细胞间通讯可能在调控胚胎的发育, 细胞的生长、分化等方面发挥重要作用。缝隙连接是人体及动物细胞膜上的特殊结构, 构成了相邻细胞间的特殊通道, 信息离子(包括钙离子)及小分子可通过此通道进入细胞间的转运, 调节许多重要的生理功能。在心血管疾病的基础研究中发现缝隙连接介导的细胞间通讯参与了细胞间的兴奋传导[1]。缝隙连接介导的细胞间通讯直接参与相邻细胞间神经信号的传收缩方面发挥重要作用[2] [3] [4]。

Haefliger, J.A.等通过实验发现缝隙连接蛋白-43(Connexin-43, Cx-43)是大鼠逼尿肌细胞中重要的连蛋白。在人类的逼尿肌细胞中同样发现了 Cx-43 与 Cx-45 [5] [6]。在一项关于排尿功能障碍的研究中发现 Cx-43 在逼尿肌中的表达发生改变。Fry 等指出逼尿肌的兴奋依赖于缝隙连接的存在[7] [8]。

本实验通过探讨 P-BOO 的大鼠逼尿肌细胞膜上缝隙连接和 Cx-43 表达的变化, 为逼尿肌中缝隙连接的改变可导致尿流动力学改变提出了形态学和免疫组织化学的证据。

2. 材料与方法

2.1. P-BOO 动物模型的建立

10 周龄雌性 Wistar 大鼠, 体重 170~260 g, 均由北京维通利华实验动物有限公司提供(动物合格证

SCXK (京) 2007-0009、SPF 级)。33 只大鼠被随机分为 6 组：模型组中造模后 2 周处死 6 只；造模后 4 周处死 6 只；造模后 8 周处死 6 只。假手术组中 2 周处死 5 只；4 周处死 5 只；8 周处死 5 只。上述各组大鼠处死后取膀胱逼尿肌组织进行后期实验。P-BOO 动物模型的建立参照 Mattiasson 和 Uvelius [9]和 Malmgren 等[10]的造模方法。大鼠通过腹腔注射 25%乌拉坦(1 g/kg)麻醉后，用硬膜外导管(直径 1 mm)经尿道插入膀胱，小心游离尿道，游离至近膀胱颈口处，4-0 PGLA 医用可吸收丝线结扎近膀胱颈口处尿道，结扎松紧度以线结刚靠近尿道为宜，拔出导管，缝合皮肤。假手术组操作同上，但不结扎尿道。

2.2. 排尿压测定

将实验大鼠，25%乌拉坦(1 g/kg)腹腔注射麻醉[11]，仰卧固定，用硬膜外导管(直径 1 mm)经尿道插入膀胱，硬膜外导管接经三通管与尿动力仪及微量泵(UDS-600，加拿大)相连。标定零点，生理盐水经微量灌注泵向膀胱灌注，速度为 0.2 mL/min [12]，同步记录随容积增加膀胱压力波形、大小变化，至尿道口周围溢水定义为膀胱最大容量(灌注速度×灌注时间=膀胱最大容量)并记录膀胱残余尿量。

2.3. 免疫组织化学检测

所有膀胱逼尿肌样本均用 4%的多聚甲醛浸泡固定，常规石蜡包埋，连续切片。随后加入一抗兔抗大鼠的 Cx-43 多克隆抗体(1:100 武汉博士德生物工程有限公司)，过氧化物酶标记的二抗(1:100 武汉博士德生物工程有限公司)。对照组中用 0.01 mmol/L PBS (武汉博士德生物工程有限公司)代替一抗作阴性对照。

2.4. 冰冻蚀刻分析

样本加戊二醛固定，随后加入 30%的甘油缓冲液，置入液氮中冷冻。样本在-112℃的冷冻断裂机(JFD-7000 日本)中被反复破碎断裂。样本在次氯酸钠溶液中被消化，随后加入浓度为 1:1 的甲基氯仿对丙酮基苯酚和 100%二甲基甲酰胺。将复合物置于网格中在透射电子显微镜(JEM-1210 日本)下观察。

2.5. 免疫蛋白印记(Western-blotting)检测

膀胱逼尿肌组织被剔除粘膜层后加入 1 mmol/L 碳酸氢钠溶液和 2 mmol/L 苯基甲磺酰氟化物蛋白酶抑制剂的混合片剂(Roche 美国)，同时经高频声波处理。Western-blotting 和 SDS-PAGE 电泳(每个泳道上样 40 μg)。为了检测 Cx-43 的含量，先后加入兔抗大鼠的 Cx-43 多克隆抗体和用过氧化物酶标记的荧光二抗。检测结果采用增强化学发光法显色，X 光片曝光显影，凝胶图象处理系统(EPA-3000 日本)分析目标带的分子量和净光密度值。

2.6. 统计学分析

所有数据均以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示，Mann-Whitney U test 进行模型组和假手术组的比较。结果差异显著，有统计学意义($P < 0.05$)。

3. 结果

3.1. 膀胱重量及容量

对 18 只模型组大鼠及 15 只假手术组大鼠进行测定，发现模型组大鼠的膀胱重量较假手术组大鼠显著增加($P < 0.01$ ；表 1)。在术后 4 周和 8 周模型组大鼠的膀胱容积较术后 2 周显著增加($P < 0.05$)。

3.2. 膀胱测压结果

在假手术组中大鼠的排尿模式正常。在术后 2 周模型组大鼠的排尿压较假手术组显著增加。然而，

模型组中术后4周大鼠的排尿压较术后2周显著降低。在模型组中术后8周大鼠的逼尿肌没有发生收缩，同时出现尿失禁现象(图1)。

3.3. 大鼠逼尿肌细胞膜中Cx-43的免疫组织化学染色结果

对模型组和假手术组大鼠逼尿肌细胞进行Cx-43的免疫组织化学染色观察。Cx-43在术后2周模型组大鼠的逼尿肌细胞胞膜、胞质、胞核中均有表达。另外，术后4周在模型组大鼠逼尿肌细胞的胞质、胞核和胞膜上均有部分表达。然而，在术后8周模型组大鼠逼尿肌细胞中Cx-43主要被检测到在胞质或胞核中，胞膜未见其表达(图2)。在假手术组大鼠的逼尿肌细胞中Cx-43的表达未见异常。模型组中随着术后时间的延长，Cx-43的表达也随之降低：2周100%；4周 $76.4\% \pm 2.3\%$ ；8周 $4.3\% \pm 1.6\%$ 。

3.4. 缝隙连接的形态学分析

观察缝隙连接的数量。每个缝隙连接像凝聚的圆形颗粒(图3)。在假手术组大鼠逼尿肌中存在许多缝隙连接，并且每个网格中缝隙连接的数量分别为：术后2周 3.2 ± 0.12 ；术后4周 2.1 ± 0.77 ；术后8周 3.0 ± 0.57 。然而，在模型组大鼠逼尿肌中缝隙连接的数量在对应时间内较假手术组显著降低，分别为：术后2周 1.7 ± 0.42 ；术后4周 1.1 ± 0.55 ；术后8周没有检测到缝隙连接的存在。缝隙连接的形态在两组

Table 1. Bladder weight and capacity

表 1. 膀胱重量及容积

	术后 2 周	术后 4 周	术后 8 周
膀胱重量(g)			
假手术组	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.2 ± 0.0
模型组	$0.9 \pm 0.2^*$	$1.2 \pm 0.4^*$	$1.6 \pm 0.5^*$
膀胱容积(mL)			
假手术组	0.5 ± 0.3	0.5 ± 0.3	0.6 ± 0.3
模型组	$4.9 \pm 2.2^*$	$10.5 \pm 3.8^*$	$13.1 \pm 3.1^*$

注：* $P < 0.01$ 。

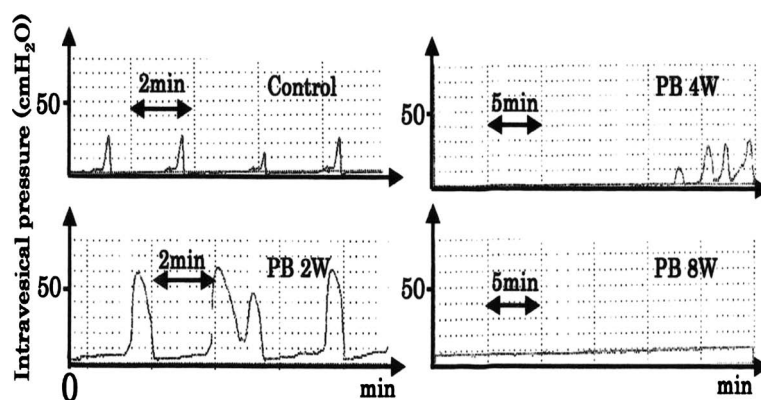


Figure 1. Bladder pressure. Examples of voiding patterns of control and P-BOO rats at 2, 4, and 8 weeks from cystometric investigation. PB2W, PB4W, and PB8W indicate P-BOO rats 2, 4, and 8 weeks after surgery, respectively. Intravesical pressure of P-BOO rats at 2 weeks was significantly greater than in control rats and gradually decreased after 2 weeks. No detrusor contraction was observed in P-BOO rats at 8 weeks after surgery, and voiding had characteristics of overflow

图 1. 膀胱测压。假手术组大鼠排尿期膀胱内压力正常，模型组中大鼠在术后第2周(PB2W)、第4周(PB4W)、第8周(PB8W)排尿期膀胱内压力均发生变化。其中，术后2周膀胱内压力较假手术组明显增高，且随着时间的推移有逐渐减弱的趋势，在术后第8周出现无逼尿肌收缩并出现尿失禁

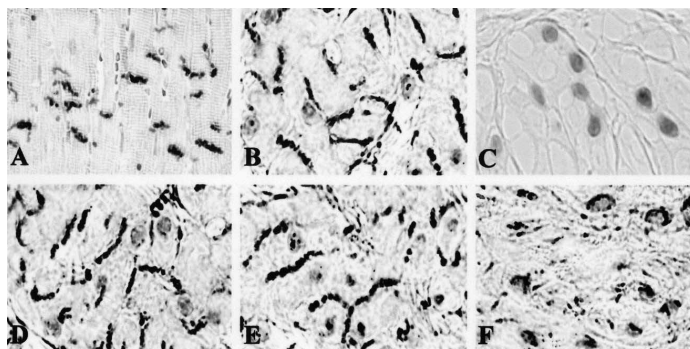


Figure 2. Immunohistochemical staining of Cx-43. (A) Positive control. Cx-43 expressed on cell membranes of mouse heart; (B) Control rats at 8 weeks. Cx-43 expressed on cell membranes of detrusor muscle; (C) Negative control of P-BOO rats; (D) Cx-43 expressed on cell membranes in P-BOO rats at 2 weeks; (E) Cx-43 plaques partly expressed in both cytoplasm and nuclei and on cell membrane in P-BOO rats at 4 weeks; (F) Cx-43 in P-BOO rats at 8 weeks expressed in cytoplasm and nuclei

图 2. 缝隙连接蛋白-43 免疫组织化学染色($\times 400$)。 (A) 阳性对照组选取 Cx-43 在大鼠心肌细胞膜上的表达; (B) 假手术组术后 8 周 Cx-43 在大鼠逼尿肌细胞膜上的表达; (C) 阴性对照组; (D) 模型组术后 2 周 Cx-43 在大鼠逼尿肌细胞膜、胞质和胞核上均有表达; (E) 模型组术后 4 周 Cx-43 在大鼠逼尿肌细胞膜、胞质和胞核上均有部分表达; (F) 模型组术后 8 周大鼠逼尿肌细胞中 Cx-43 在胞质或胞核中有表达, 胞膜未见其表达

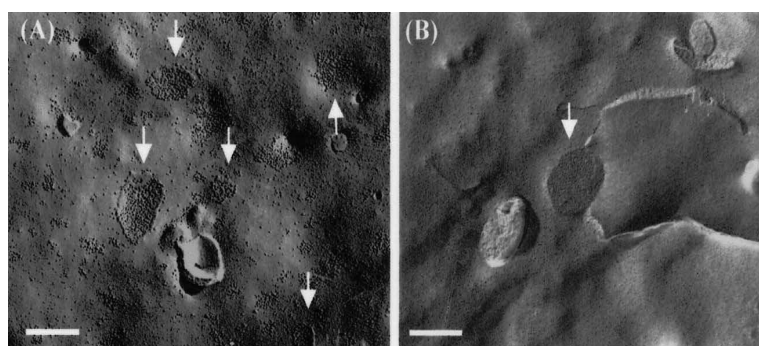


Figure 3. Freeze-fracture study demonstrating gap junction of detrusor muscle in (A) control rats and (B) P-BOO rats at 4 weeks. White arrows indicate gap junction

图 3. 冰冻蚀刻分析逼尿肌中缝隙连接的形态($\times 25,000$) (白色箭头所示缝隙连接; A 假手术组、B 模型组)

中没有差异。

3.5. Western-blotting 检测与 SDS-PAG 电泳结果

在假手术组中 Cx-43 的表达没有显著不同。在模型组中 Cx-43 的表达较假手术组显著增高。而且, 在模型组中 Cx-43 的表达随时间的延长而逐渐增强(图 4)。

4. 讨论

通过缝隙连接介导的细胞与细胞间的信息通讯对排尿功能调节有密切关系。术后 2 周 Cx-43 在两组大鼠逼尿肌细胞膜上均有表达, 说明逼尿肌的收缩是通过缝隙连接介导的。术后 4 周模型组大鼠逼尿肌细胞中 Cx-43 在胞质、胞核及胞膜上均有表达。在术后 8 周模型组大鼠逼尿肌细胞中 Cx-43 主要集中表达于胞质或胞核上而不是在胞膜上。上述结果提示细胞膜上 Cx-43 表达降低导致了缝隙连接介导的细胞间通讯障碍。通过电子显微镜观察发现模型组大鼠逼尿肌中随着梗阻时间的延长缝隙连接数量逐渐减少。因此, Cx-43 在细胞膜上表达的降低与逼尿肌的收缩和梗阻时间呈平行关系。

Christ 等[13]报道在膀胱过度活动症的大鼠逼尿肌中 Cx-43mRNA 和蛋白表达是显著增加的。在本研

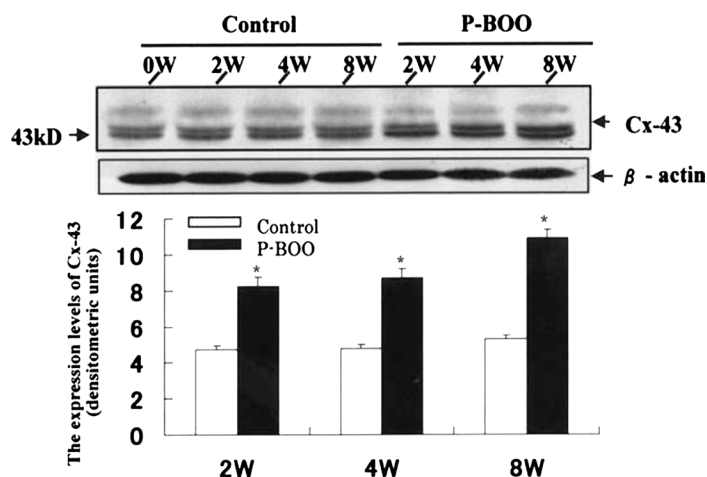


Figure 4. Expression of Cx-43 in P-BOO rats was greater than that in control rats. Expression of Cx-43 protein in P-BOO rats gradually increased from 2 to 8 weeks

图 4. 缝隙连接蛋白-43 的免疫蛋白印记分析。模型组中 Cx-43 在大鼠逼尿肌细胞中的表达显著高于假手术组，且随着时间的推移在模型组中 Cx-43 的表达也明显增高

究中发现 Cx-43 在模型组中的表达较假手术组显著增强，并且通过制造 P-BOO 导致 Cx-43 在逼尿肌中的表达上调。Cx-43 的表达上调与 Cx-43 在胞膜中的表达下降可能是由于 P-BOO 所致逼尿肌细胞过分拉伸。

国外报道 Cx-43 参与膀胱壁收缩来增加排尿压。然而，逼尿肌的收缩和 Cx-43 的定位没有明确[14]。Cx-43 的表达位置在研究缝隙连接耦连功能上发挥重要作用[15] [16] [17]。本实验结果提示在 P-BOO 的大鼠逼尿肌细胞膜上 Cx-43 的表达是降低的。因此，相信当 Cx-43 不能表达在逼尿肌细胞膜上时膀胱逼尿肌细胞是不能发生同步收缩的。

在膀胱逼尿肌中缝隙连接介导的细胞间通讯的功能障碍，究其原因是因为 Cx-43 在逼尿肌细胞膜上的表达降低所致。因此，正常的电信号不能在逼尿肌细胞中传递，致使排尿功能障碍。所以，缝隙连接的改变可能是导致排尿功能障碍性疾病发生的原因之一。

参考文献

- [1] Jongasma, H. and Wilders, R. (2000) Gap Junctions in Cardiovascular Disease. *Circulation Research*, **86**, 1193-1197. <https://doi.org/10.1161/01.RES.86.12.1193>
- [2] 周逢海, 宋波, 王养民, 等. 逼尿肌不稳定缝隙连接介导细胞间通讯的研究[J]. 中华泌尿外科杂志, 2004, 25(4): 260-262.
- [3] Song, S.H., Joo, H.T., Cho, H.W., et al. (2011) Sex- and Age-Related Changes in Connexin 43 Expression in Normal Rat Bladder. *International Neurourology Journal*, **15**, 25-28. <https://doi.org/10.5213/inj.2011.15.1.25>
- [4] 封建立, 宋波. 不稳定逼尿肌 Cx-43 基因表达及其与逼尿肌细胞间缝隙连接通讯功能的关系研究[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(9): 825-827.
- [5] Haefliger, J.A., Tissieres, P., Tawadros, T., et al. (2002) Connexin 43 and 26 Are Differentially Increased after Rat Bladder Obstruction. *Experimental Cell Research*, **274**, 216-225. <https://doi.org/10.1006/excr.2001.5465>
- [6] Neuhaus, J., Weimann, A., Stolzenburg, J.U., et al. (2002) Smooth Muscle Cells from Human Urinary Bladder Express Connexin 43 *In Vivo* and *In Vitro*. *World Journal of Urology*, **20**, 250-254.
- [7] Fry, C.H., Sui, G.P., Severs, N.J., et al. (2004) Spontaneous Activity and Electrical Coupling in Human Detrusor Smooth Muscle: Implications for Detrusor Overactivity? *Urology*, **63**, 3-10.
- [8] Fry, C.H., Bayliss, M., Young, J.S., et al. (2011) Influence of Age and Bladder Dysfunction on the Contractile Properties of Isolated Human Detrusor Smooth Muscle. *BJU International*, **108**, 91-96. <https://doi.org/10.1111/j.1464-410X.2010.09845.x>
- [9] Mattiasson, A. and Uvelius, B. (1982) Changes in Contractile Properties in Hypertrophic Rat Urinary Bladder. *Journal*

- of Urology*, **128**, 1340-1342. [https://doi.org/10.1016/S0022-5347\(17\)53503-X](https://doi.org/10.1016/S0022-5347(17)53503-X)
- [10] Malmgren, A., Sjogren, C., Uvelius, B., *et al.* (1987) Cystometric Evaluation of Bladder Instability in Rats with Infra-vesical Outflow Obstruction. *Journal of Urology*, **137**, 1291-1294. [https://doi.org/10.1016/S0022-5347\(17\)44485-5](https://doi.org/10.1016/S0022-5347(17)44485-5)
- [11] Tracy, W., Cannon, M.D., Margot, S., *et al.* (2001) Effects of Anesthesia on Cystometry and Leak Point Pressure of the Female Rat. *Life Sciences*, **69**, 1193-1202. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(01\)01182-1](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(01)01182-1)
- [12] Lluel, P., Barras, M. and Palea, S. (2002) Cholinergic and Purinergic Contribution to the Micturition Reflex in Conscious Rats with Long-Term Bladder Outlet Obstruction. *Neurourology and Urodynamics*, **21**, 142-153. <https://doi.org/10.1002/nau.10007>
- [13] Christ, G.J., Day, N.S., Day, M., *et al.* (2003) Increased Connexin 43-Mediated Intercellular Communication in a Rat Model of Bladder Overactivity *in Vivo*. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, **284**, 1241-1248. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00030.2002>
- [14] Miyazato, M., Sugaya, K., Nishijima, S., *et al.* (2009) Changes of Bladder Activity and Connexin 43-Derived Gap Junctions after Partial Bladder-Outlet Obstruction in Rats. *International Urology and Nephrology*, **41**, 815-821. <https://doi.org/10.1007/s11255-008-9516-7>
- [15] Mograbi, B., Corcelle, E., Defamie, N., *et al.* (2003) Aberrant Connexin 43 Endocytosis by the Carcinogen Lindane Involves Activation of the ERK/Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway. *Carcinogenesis*, **24**, 1415-1423. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgg093>
- [16] Sasano, C., Takeuchi, S., Uzzaman, M., *et al.* (2001) Internalization of Cx43 Gap Junctions in Hypertrophied Rat Ventricular Myocytes. *Environmental Medicine*, **45**, 97-99.
- [17] Neuhaus, J., Heinrich, M., Schwalenberg, T., *et al.* (2009) TGF-Beta1 Inhibits Cx43 Expression and Formation of Functional Syncytia in Cultured Smooth Muscle Cells from Human Detrusor. *European Urology*, **55**, 491-497. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2008.03.090>

知网检索的两种方式:

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>
下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2330-1589, 即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>
左侧“国际文献总库”进入, 输入文章标题, 即可查询

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: jps@hanspub.org