

逼尿肌相关蛋白在慢性前列腺炎大鼠模型中的表达及意义

王晶 梁朝朝 樊松 郝宗耀 张翼飞 刘明 周骏

摘要 目的 采用 17β -雌二醇联合去势建立大鼠慢性非细菌性前列腺炎模型,检测膀胱逼尿肌蛋白在慢性前列腺炎大鼠膀胱的表达。方法 取2月龄SD雄性大鼠60只随机分为6组,每组10只,即:空白对照组、生理盐水组、假手术组、单纯 17β -雌二醇组、单纯去势组、 17β -雌二醇联合去势组。HE染色判定大鼠慢性前列腺炎模型建造成功后,采用SP免疫组化法、Western blot检测6组大鼠膀胱组织肌动蛋白(α -actin)、肌球蛋白(MLC 2)及高分子量钙调素结合蛋白(h-cad)表达的差异。结果 免疫组化结果显示 17β -雌二醇联合去势组中 α -actin、MLC 2、h-cad蛋白表达增多,Western blot显示 α -actin在各组的表达,与空白对照组相比,生理盐水组、假手术组、单纯 17β -雌二醇组、单纯去势组联合去势组差异有统计学意义。MLC 2、h-cad在各组的表达与空白对照组相比,生理盐水组、假手术组差异无统计学意义,单纯 17β -雌二醇组、单纯去势组、联合去势组差异有统计学意义。结论 α -actin、MLC 2、h-cad表达变化可能参与慢性前列腺炎排尿相关症状的发病。

关键词 肌动蛋白; 肌球蛋白; 钙调素结合蛋白; 慢性前列腺炎; 膀胱功能异常

中图分类号 R 697+.33

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)08-1072-05

慢性前列腺炎是泌尿外科门诊最常见的一种疾病,多发于青壮年男性,发病率约为2%~15%^[1],约占门诊量8%~25%,其中90%左右为慢性非细菌性前列腺炎(CAP)^[2],大约50%男性在一生的不同时期曾有过慢性前列腺炎症状,复发率高达25%~50%^[3~4]。该病常表现为排尿异常、局部疼痛、性功能障碍^[5]以及精神症状^[3]等,其中尤以排尿异常症状如尿频、尿急、尿痛、尿分叉等为常见^[6],但慢性前列腺炎排尿相关症状的发病机制至今尚不清楚。该研究通过建立大鼠慢性非细菌性前列腺炎模

2015-03-24 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81170698 81470986);安徽省科技攻关项目(编号:12010402128);卫生部国家临床重点专科建设项目;安徽省自然科学基金项目(编号:1508085MH177)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院泌尿外科,合肥 230032

作者简介:王晶,男,硕士研究生;

梁朝朝,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者,E-mail: liang_chaozhao@163.com

型,运用SP免疫组化法、Western blot法测定大鼠膀胱组织肌动蛋白(α -actin)、肌球蛋白(myosin light chain 2, MLC 2)及高分子量钙调素结合蛋白(h-cadesmon h-cad)表达的差异,初步探讨慢性前列腺炎尿频、尿急等相关症状发病机制。

1 材料与方法

1.1 材料 17β -雌二醇购自美国Sigma公司;抗 α -actin抗体、抗MLC 2抗体购自英国Abcam公司,抗cad抗体购自美国Santa Cruz生物技术公司;SP免疫组化检测试剂及DAB试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司;PVDF膜购自美国Millipore公司;ECL Plus发光试剂盒购自美国Thermo公司;甲叉双丙烯酰胺、丙烯酰胺、甘氨酸、Tris碱、过硫酸铵、TEMED SDS均购自合肥奥达生物科技有限公司。

1.2 动物模型制备 2月龄雄性SD大鼠60只,由安徽医科大学实验动物中心提供,采用随机单位设计分组法分为6组,每组10只,即空白对照组(不给予任何处理),生理盐水组(仅皮下注射生理盐水),假手术组(无菌条件下切开阴囊皮肤,不行去势手术),单纯去势组(仅行单纯睾丸切除术),单纯 17β -雌二醇组[仅皮下注射 17β -雌二醇(0.25 mg/2 ml/kg)],联合去势组(17β -雌二醇皮下注射联合去势)。

假手术组、单纯去势组、联合去势组SD大鼠使用10%水合氯醛3 ml/kg麻醉,假手术组仅在无菌条件下切开阴囊皮肤,不行去势手术,单纯去势组、联合去势组在无菌条件下行大鼠双侧睾丸切除术,手术当日及术后2 d给予肌肉注射青霉素5万U/(kg/d)。在手术日后第1天,单纯 17β -雌二醇组、联合去势组SD大鼠开始连续皮下注射 17β -雌二醇(0.25 mg/2 ml/kg)至第30天,生理盐水组SD大鼠开始连续皮下注射生理盐水(2 ml/kg)至第30天。6组大鼠在最后一次给药24 h内,在无菌条件下取出大鼠前列腺及膀胱组织,快速放入D-Hanks液中。仔细剥除前列腺包膜及周围脂肪、结缔组织等其他组织,获得无菌的前列腺和膀胱组织,前列腺组织放置入10%甲醛后石蜡包埋切片,HE染色,然后使用

光镜观察以评估组织炎症情况,留取膀胱组织用于免疫组化及 Western blot 实验。

1.3 慢性前列腺炎模型的判定 HE 染色镜下可见联合去势组炎症细胞聚集于腺泡腔内和周围,部分腺体上皮组织破坏或淋巴样小结/滤泡形成; 空白对照组大鼠前列腺组织结构完整,无炎症细胞浸润,腺泡上皮组织整齐,无淋巴样小结/滤泡形成。

1.4 实验方法

1.4.1 免疫组化染色 标本均经 4% 多聚甲醛固定后常规石蜡包埋连续切片用免疫组化 SP 法进行。 α -actin、MLC 2、cad 一抗工作浓度为 1 : 100。阴性对照以 pH = 7.4、0.01 mmol/L PBS 缓冲液代替一抗。肌细胞中细胞质以棕黄色染色为阳性表达。Nikon Eclipse 80i 型显微镜下观察并放大 400 倍后拍照,随机选取 6 个视野,采用图像分析系统计算积分光密度值,最后取各组染色 3 次非连续切片的平均值。

1.4.2 Western blot 法 取 100 mg 标本碾碎后加 400 μ l 单去污剂裂解液(含 PMSF),在匀浆器中匀浆至无明显的组织块为止。将裂解液用移液器移至 1.5 ml 离心管中,4 °C 裂解 30 min,裂解时候轻轻摇晃几次。在 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min,取上清液按 Western blot 常规方法进行。ECL 发光试剂盒显影,以 GAPDH 为内参,相应蛋白与内参光密度比值代表该蛋白相对表达水平。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用 One-Way ANOVA 分析,组间两两比较采用 Bonferroni 检验。

2 结果

2.1 SD 大鼠前列腺组织学 HE 切片光镜观察 空白对照组、生理盐水组、假手术组大鼠腺体表面较光滑、排列整齐,间质未见明显炎症细胞浸润。单纯去势组、单纯雌二醇组间质有少量炎细胞浸润,间质充血水肿、增宽。联合去势组有较多的炎细胞浸润、炎症范围广并伴有腺体的破坏。见图 1。

2.2 免疫组化结果 采用免疫组化观察空白对照组、生理盐水组、假手术组、单纯去势组、单纯雌二醇组、联合去势组大鼠膀胱组织 α -actin、MLC 2、h-cad 的表达,发现单纯去势组、单纯雌二醇组 α -actin、MLC 2、h-cad 蛋白表达水平高于空白对照组、生理盐水组、假手术组($P < 0.05$),联合去势组 α -actin、MLC 2、h-cad 蛋白表达水平显著高于其余各组($P < 0.01$)。见图 2~5。

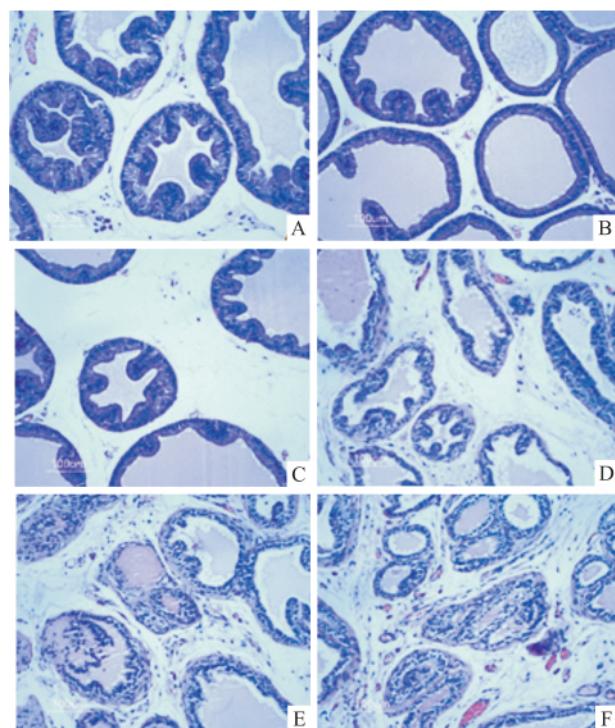


图 1 各组前列腺组织 HE 染色结果 $\times 20$

A: 空白对照组; B: 生理盐水组; C: 假手术组; D: 单纯去势组; E: 单纯雌二醇组; F: 联合去势组

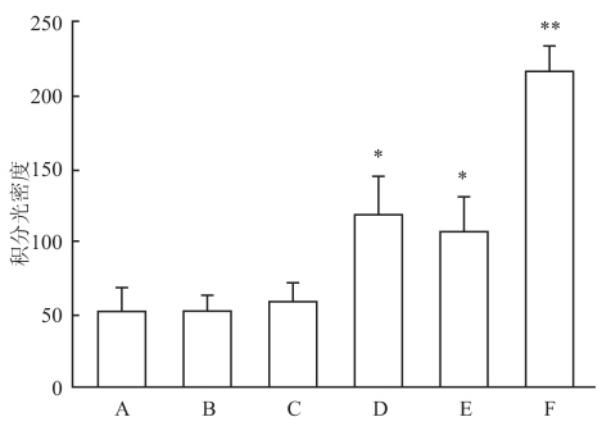
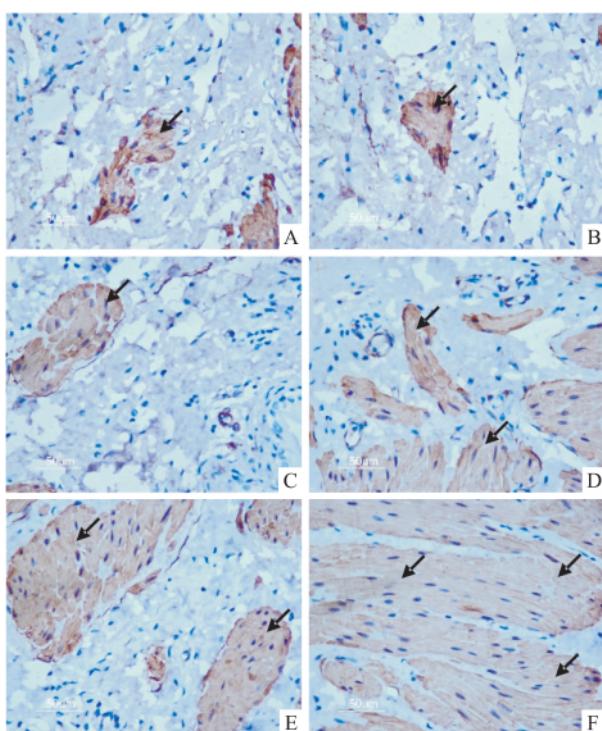
2.3 Western blot 结果 采用 Western blot 法,使用空白对照组、生理盐水组、假手术组、单纯去势组、单纯雌激素组、联合去势组大鼠膀胱组织蛋白提取液,分别测定 α -actin、MLC 2、h-cad 及相应样本 GAPDH 的表达,发现联合去势组 α -actin、MLC 2、h-cad 蛋白表达水平高于空白对照组、生理盐水组、假手术组、单纯去势组、单纯雌二醇组($P < 0.05$)。见图 5。

3 讨论

Li et al^[6] 对 25 例 CAP 患者及 15 例健康男性进行尿流动力学检查,发现 CAP 患者普遍出现排尿中断、逼尿肌-括约肌协同失调,最大尿流率降低,最大逼尿肌压力及最大尿道闭合压均较对照组有所升高。这提示慢性前列腺炎患者存在膀胱功能的异常,但具体发病机制不清。

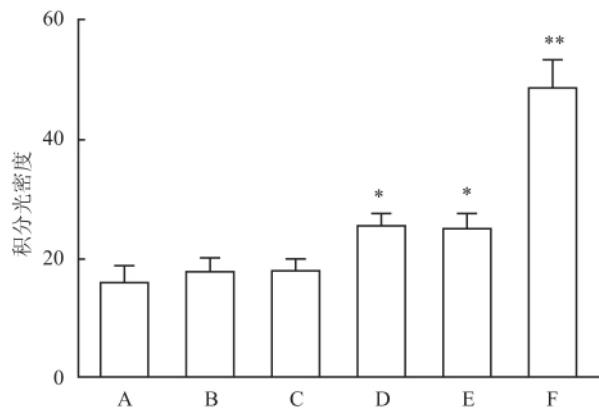
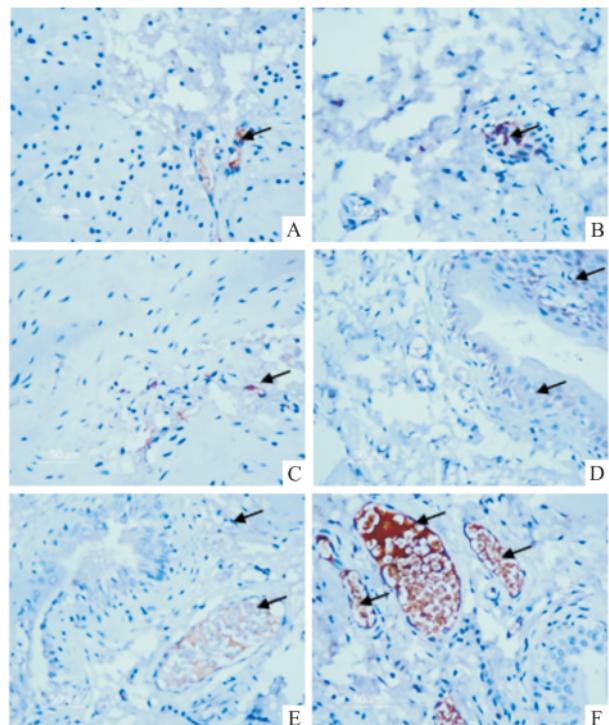
本研究采用国际公认的去势后皮下注射 17 β -雌二醇的造模方法成功建立了 CAP 模型^[7],通过模型进一步研究 CAP 大鼠的膀胱相关蛋白表达情况。对于了解慢性前列腺炎排尿相关症状的发病机制有一定的意义。

目前国内外学者对于膀胱排尿生理的研究^[8~9]

图 2 α -actin 在各组的表达 $\times 40$

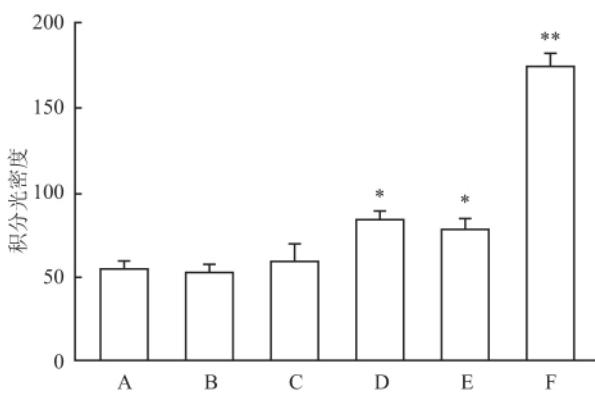
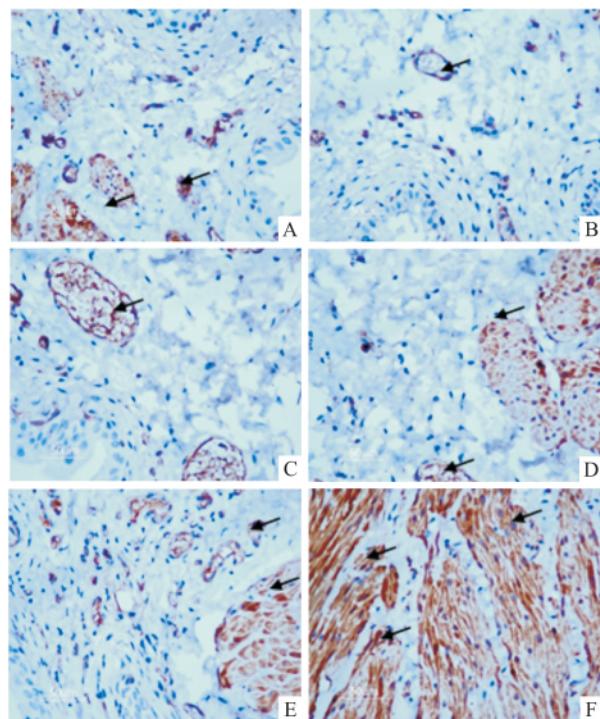
A: 空白对照组; B: 生理盐水组; C: 假手术组; D: 单纯去势组; E: 单纯雌二醇组; F: 联合去势组; 与空白对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

较为深入, 众所周知, 膀胱肌肉由逼尿肌和三角区肌两部分平滑肌组成, 排尿时三角区浅层肌肉收缩使膀胱颈张开, 尿道外括约肌及尿道旁括约肌松弛, 同时逼尿肌收缩完成排尿动作。如果膀胱逼尿肌、尿道平滑肌及尿道外括约肌功能失调, 则可发生排尿功能障碍。探讨排尿异常时膀胱逼尿肌的细胞和分子基础, 对于慢性前列腺炎引起的膀胱功能异常的治疗有一定的意义。国内外大量学者^[8-10]对膀胱出口部分梗阻对于膀胱功能改变的影响及相关蛋白水平改变的意义进行了大量研究, 但对于慢性前列腺炎影响膀胱功能的相关报道并不多见。

图 3 各组 MLC 2 表达情况 $\times 40$

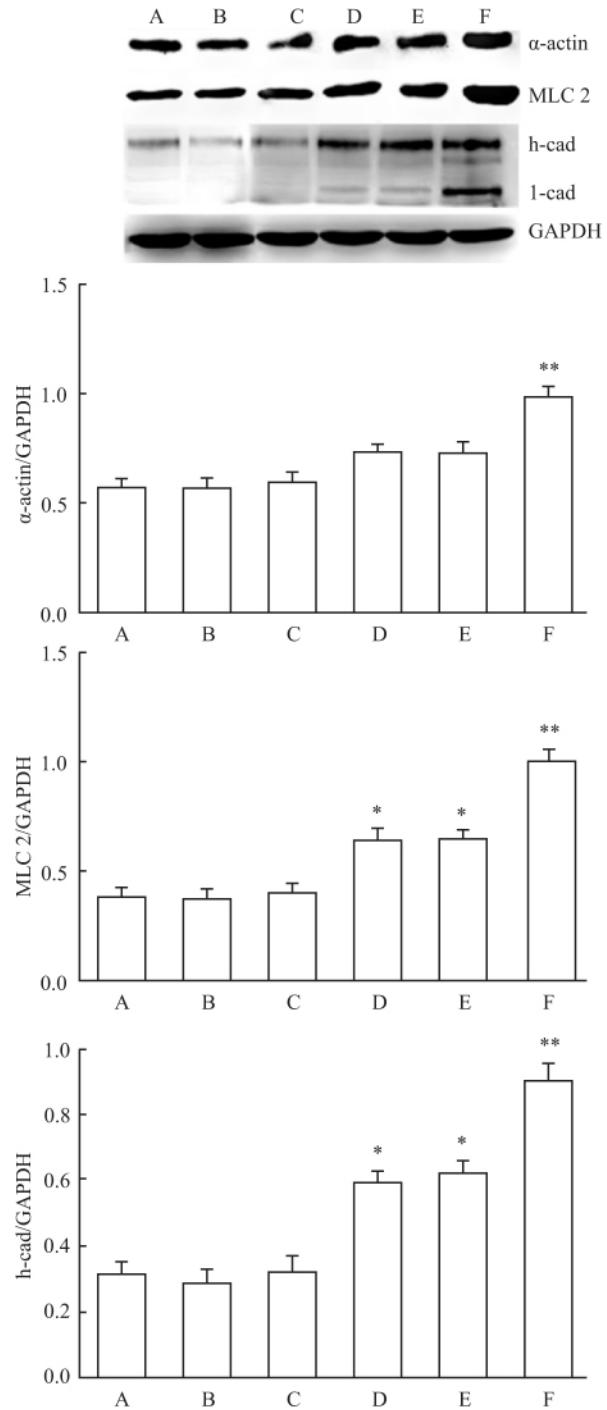
A: 空白对照组; B: 生理盐水组; C: 假手术组; D: 单纯去势组; E: 单纯雌二醇组; F: 联合去势组; 与空白对照组相比: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

与膀胱逼尿肌相关的蛋白包括肌动蛋白、原肌球蛋白、肌球蛋白、钙调蛋白、钙调素结合蛋白等。膀胱逼尿肌属平滑肌, 细肌丝由肌动蛋白及原肌球蛋白构成, 其中肌动蛋白构成了细肌丝的主干, 粗肌丝主要有肌球蛋白构成, 肌球蛋白轻链的磷酸化使横桥三磷酸腺苷酶活性升高从而引发肌丝滑行和肌肉收缩。Gao et al^[11]发现限制肌球蛋白轻链激酶活性可导致平滑肌收缩功能失调, Boopathi et al^[12]认为蛋白激酶 C 抑制蛋白 CPI-17 可通过抑制肌球蛋白轻链激酶活性降低肌球蛋白轻链磷酸化水平, 从而导致平滑肌收缩减弱。钙调素结合蛋白在平滑肌及非平滑肌细胞中均有表达, 但分为两种不同亚型,

图 4 各组 h-cad 表达情况 $\times 40$

A: 空白对照组; B: 生理盐水组; C: 假手术组; D: 单纯去势组; E: 单纯雌二醇组; F: 联合去势组; 与空白对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

平滑肌细胞内表达 h-cad, 分子量为 90~150 ku, 非平滑肌细胞内表达低分子量钙调素结合蛋白 (l-caldesmon, l-cad), 分子量为 60~80 ku。两种亚型的 cad 都可连接肌动蛋白、原肌球蛋白及肌球蛋白, 从而调节平滑肌肌肉收缩或稳定非平滑肌细胞内的微丝网络。Yang et al^[13]研究膀胱出口部分梗阻兔模型逼尿肌的 h-cad/l-cad 表达的变化, 发现代偿期的膀胱逼尿肌收缩增强, h-cad 表达增加, 随着时间推移, l-cad 也逐渐增加, 导致逼尿肌失代偿, 收缩功能减弱。本研究结果显示在单纯去势组及单纯雌二醇组中, 膀胱组织 α -actin、MLC 2 及 h-cad 表达相对空白对照组、生理盐水组、假手术组轻度升高, 这提

图 5 α -actin、MLC 2、h-cad 在各组的表达

A: 空白对照组; B: 生理盐水组; C: 假手术组; D: 单纯去势组; E: 单纯雌二醇组; F: 联合去势组; 与空白对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

示单因素的雄激素阻断效应可以导致轻度慢性前列腺炎而引起膀胱功能的变化, 而在双因素全雄激素阻断的模型组中, 3 种蛋白的表达相对其他组别均有显著升高, 提示慢性前列腺炎大鼠膀胱功能可能存在异常。

临幊上 部分前列腺患者存在膀胱颈和前列腺尿道的平滑肌痉挛、逼尿肌—括约肌协同失调、逼尿肌纤维化 引起前列腺尿道内压增高，产生前列腺及射精管内尿液返流，从而加重前列腺炎，引起膀胱收缩力增强，可能导致相关的逼尿肌蛋白代偿性增高，其表达水平的改变可能是慢性前列腺炎引起膀胱功能异常的分子基础。

参考文献

- [1] Krieger J N , Riley D E , Cheah P Y , et al. Epidemiology of prostatitis: new evidence for a world-wide problem [J]. *World J Urol* , 2003 , 21(2) : 70–4.
- [2] Liang C Z , Li H J , Wang Z P , et al. Treatment of chronic prostatitis in Chinese men [J]. *Asian J Androl* , 2009 , 11(2) : 153–6.
- [3] Mehik A , Hellström P , Sarpola A , et al. Fears , sexual disturbances and personality features in men with prostatitis: a population-based cross-sectional study in Finland [J]. *BJU Int* , 2001 , 88(1) : 35–8.
- [4] Nickel J C. Prostatitis: lessons from the 20th century [J]. *BJU Int* , 2000 , 85(2) : 179–85.
- [5] Tran C N , Shoskes D A. Sexual dysfunction in chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome [J]. *World J Urol* , 2013 , 31(4) : 741–6.
- [6] Li Y , Qi L , Wen J G , et al. Chronic prostatitis during puberty [J]. *BJU Int* , 2006 , 98(4) : 818–21.
- [7] Wilson M J , Woodson M , Wiehr C , et al. Matrix metalloproteinases in the pathogenesis of estradiol-induced nonbacterial prostatitis in the lateral prostate lobe of the Wistar rat [J]. *Exp Mol Pathol* , 2004 , 77(1) : 7–17.
- [8] Mannikarottu A S , DiSanto M E , Zderic S A , et al. Altered expression of thin filament-associated proteins in hypertrophied urinary bladder smooth muscle [J]. *Neurourol Urodyn* , 2006 , 25(1) : 78–88.
- [9] Shukla A R , Nguyen T , Zheng Y , et al. Over expression of smooth muscle specific caldesmon by transfection and intermittent agonist induced contraction alters cellular morphology and restores differentiated smooth muscle phenotype [J]. *J Urol* , 2004 , 171(5) : 1949–54.
- [10] Matsumoto S , Hanai T , Ohnishi N , et al. Bladder smooth muscle cell phenotypic changes and implication of expression of contractile proteins (especially caldesmon) in rats after partial outlet obstruction [J]. *Int J Urol* , 2003 , 10(6) : 339–45.
- [11] Gao N , Huang J , He W , et al. Signaling through myosin light chain kinase in smooth muscles [J]. *J Biol Chem* , 2013 , 288(11) : 7596–605.
- [12] Boopathi E , Hypolite J A , Zderic S A , et al. GATA-6 and NF-κB Activate CPI-17 Gene Transcription and Regulate Ca²⁺ Sensitization of Smooth Muscle Contraction [J]. *Mol Cell Biol* , 2013 , 33(5) : 1085–102.
- [13] Yang L , He D L , Wang S , et al. Effect of long-term partial bladder outlet obstruction on caldesmon isoforms and their correlation with contractile function [J]. *Acta Pharmacol Sin* , 2008 , 29(5) : 600–5.

Expression of detrusor-related proteins in chronic prostatitis rats model

Wang Jing , Liang Chaozhao , Fan Song , et al

(Dept of Urology , The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University , Hefei 230032)

Abstract **Objective** To establish rats chronic non-bacterial prostatitis model by castration combined injection of 17 beta-estradiol , and to discuss the relationship between chronic prostatitis and bladder dysfunction by the research of detrusor-related proteins. **Methods** 60 2-month-old SD rats were randomly taken and divided into 6 groups ,10 rats for each , as follows: Blank control group , Saline group , Sham operation group , 17 beta Estradiol (0.25 mg/ml/kg) group , Simple Castration group , Combined Castration group. To evaluate the results of rat CP model by hematoxylin-eosin staining , then expression of α-actin , MLC 2 and h-cad in bladder tissues of 6 groups of rats were analyzed via western-blot and S-P immunohistochemical staining. **Results** Immunohistochemistry showed that expressions of α-actin , MLC 2 and h-cad in Combined Castration group were higher than other groups. Western blot qualitative study showed that expression of α-actin in combined castration group was higher than other groups. Compared with the blank control group , expression of MLC 2 and h-cad was moderately elevated in 17 beta estradiol group , simple castration group , and significantly elevated in combined castration group. **Conclusion** Altered expression of α-actin , MLC 2 and h-cad is likely involved in the pathogenesis of bladder dysfunction following chronic prostatitis.

Key words actin; myosin; caldesmon; chronic prostatitis; bladder dysfunction