

糖尿病大鼠膀胱和骶髓背根神经节中 NGF 的表达与尿流动力学改变的研究*

吴建红 邵 怡 刘海涛 陈辉容 洪 艳 夏术阶[△]

(上海交通大学附属第一人民医院泌尿外科 上海 200080)

摘要 目的 探讨糖尿病大鼠膀胱与骶髓背根神经节(DRG)中神经生长因子(NGF)的表达与尿流动力学改变。方法:建立糖尿病大鼠模型 10 只,对照组 10 只,应用酶联免疫吸附试验(ELISA)法,分别检测大鼠膀胱组织及骶髓 DRG 中 NGF 的变化情况,结合代谢笼及尿流动力学改变,探讨糖尿病膀胱病变的可能发病机制。结果 造模 12 周后,糖尿病大鼠膀胱容量较正常对照组明显增大(1.47 ± 0.28 vs 0.71 ± 0.12 , $p < 0.05$) 残余尿量明显增多(0.52 ± 0.18 vs 0.07 ± 0.08 , $p < 0.01$) 排尿效率明显下降,膀胱及骶髓 DRG 中 NGF 表达水平明显降低。结论 NGF 在糖尿病大鼠膀胱和骶髓背根神经节中低表达,在糖尿病膀胱病变中发挥着重要作用。

关键词 糖尿病膀胱 神经生长因子 尿流动力学

中图分类号:Q95-3 R587.1 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2011)05-824-03

Expression of NGF in lumbar dorsal root ganglia and bladder of diabetic rats and urodynamic changes*

WU Jian-hong, SHAO Yi, LIU Hai-tao, CHEN Hui-rong, HONG Yan, XIA Shu-jie[△]

(First People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University, Shanghai, 200080, China)

ABSTRACT Objective: To evaluate the expression of nerve growth factor (NGF) in the bladder and sacral cord dorsal root ganglia (DRG) and the bladder function 8 weeks after diabetes induction and investigate the pathogenesis of diabetic cystopathy. **Methods:** Twenty Sprague-Dawley rats were divided into two groups: control ($n = 10$), streptozotocin-induced diabetic group ($n = 10$). Eight weeks later, the bladders and sacral cord DRG were dissected. We measured the expression of NGF in the bladders and sacral cord DRG using ELISA, evaluated the bladder function by metabolic cage study and cystometry. **Results:** We found that the streptozotocin-induced diabetic rats showed impaired bladder function characterized by increased bladder capacity, decreased bladder contractility (voiding efficiency), and an increase in residual urine. We also found a significantly reduced expression of NGF in the bladders sacral cord DRG from the diabetic group compared with the control. **Conclusions:** Our findings indicated that the decrease in NGF may be a contributory factor in diabetic cystopathy.

Key words: Diabetic cystopathy; nerve growth factor(NGF); Urodynamics

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3 R587.1 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2011)05-824-03

前言

糖尿病膀胱病变(diabetic cystopathy, DCP),亦称为糖尿病神经源性膀胱(diabetic neurogenic bladder, DNB)、糖尿病神经源性膀胱尿道功能障碍(neuropathic vesicourethral dysfunction of diabetes, NVUDD),是糖尿病引起的泌尿系统并发症之一。DCP 是糖尿病患者的常见并发症,其发病率约为 25%-85%^[1,2]。由于 DCP 可出现反复的尿道感染和肾功能衰竭影响患者生活质量甚至致命,因此早期治疗显得尤为重要。本研究旨在通过检测大鼠膀胱及骶髓 DRG 中 NGF 的表达水平改变,以及尿流动力学改变,以了解 NGF 水平改变在糖尿病膀胱病变发生发展中的作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物

健康清洁级成年 SD 大鼠 20 只,雌性,8 周龄,购于上海斯莱克实验动物有限公司[使用许可证号:SCXK(沪)2003-0003],所有动物饲养于上海市第一人民医院实验动物中心清洁级实验室。

1.2 动物分组及模型制备

SD 大鼠随机分为对照组(NC)、糖尿病组(DM)两组,每组 10 只,适应性喂养一周后,糖尿病组禁食 12h 后,采用单次腹腔注射 1%链脲霉素 STZ60mg/Kg 诱导糖尿病大鼠模型,48 小时后采用减尾取血法测血糖,取血糖大于 16.7mmol/L 表示造模成功,纳入实验组,对照组禁食 12h 后单次腹腔注射相应溶剂的柠檬酸缓冲液。

1.3 代谢笼测定

* 基金项目:上海市科学技术委员会科研计划项目资助(074119518)

作者简介:吴建红(1986-),男,硕士研究生,主要研究方向:糖尿病神经源性膀胱 E-mail:wujianhong86@gmail.com

[△]通讯作者:夏术阶 E-mail:xsjurologist@163.com.

(收稿日期:2010-12-01 接受日期:2010-12-26)

在造模成功后 8 周 将两组大鼠分别放至代谢笼内 每笼一只 , 行 24H 尿量测定。

1.4 尿流动力学检测

1%的戊巴比妥钠水溶液(40mg/Kg)腹腔注射麻醉 耻骨联合上缘切开皮肤 暴露出膀胱 置于切口处(可以避免腹腔压力对逼尿肌压的影响)。采用自制 2F 硬膜外导管插入膀胱 连接三通管并固定 , 一端连接微量灌注泵 , 作膀胱灌注用(速度控制在 0.2ml/min) , 另一端通过压力换能器连接 Medlab 生物信号采集处理系统进行膀胱压测定。测定指标包括膀胱阈容量、单次排尿量、残余尿量 , 计算排尿效率(排尿效率 = 单次排尿量 / 膀胱阈容量× 100%)等。

1.5 ELISA 试验

尿动力学测定后 取下腹部正中切口 , 切取完整膀胱测量湿重。将大鼠俯卧于冰板上 , 于脊柱两侧取两侧腰 6 骶 1 DRG , 标本立即放入液氮中冻存。检测前取出冻存标本 研磨成匀浆 , 加 0.1ml 磷酸盐缓冲液(pH=7.4)至 5ml , 离心 3000r/min, 取上清液进行检测 : 采用双抗体夹心 ABC-ELISA 法检测上清液中 NGF 的含量。具体步骤如下 ①建立标准孔 : 设标准 8 孔 , 每孔中各加入样品稀释液 100 μl , 第 1 孔加标准品 100μl 混匀后用加样器吸出 100μl , 移至第 2 孔。如此反复作倍比稀释至第 7 孔 , 最后 从第 7 孔中吸出 100μl 弃去 , 使之体积均为 100μl。第 8 孔为空白对照。②吸取 100μl 阴阳性对照及待测样本 , 按顺序加入反应板小孔中。将微孔反应板置于 37℃ 条件下 , 孵育 120 min。③在孵育结束后 , 用洗涤液将反应板充分洗涤 4-6 次 ,

向滤纸上印干。④除空白对照孔外 , 每孔中加入第一抗体工作液 50μl。⑤将反应微孔板置 37℃ 60 min。⑥用洗涤液将反应板充分洗涤 4~6 次 , 向滤纸上印干。⑦除空白孔外 , 每孔加酶标抗体工作液 100μl。⑧将反应板置 37℃ 60 min。⑨用洗涤液将微孔反应板充分洗涤 4~6 次 , 向滤纸上印干。⑩每孔加入底物液 A 和 B 各 50μl , 置 37℃ 暗处反应 10min。⑪每孔加入 50μl 终止液混匀。⑫在 450nm 处测吸光(OD)值。

1.6 统计学处理

实验数据用均数 + 标准差(SD)表示 , 采用 SAS8.0 统计软件进行处理。

2 结果

2.1 各组大鼠的一般情况

见表 1。STZ 造模 8 周后 糖尿病组与对照组相比 大鼠体重明显减轻(190.7± 18.95vs401.4± 20.86,P<0.01) , 血糖显著升高(23.85± 1.62vs6.76± 0.26,P<0.01)。

2.2 流动力学测定

见表 2。糖尿病组(n=10)与对照组相比 膀胱阈容量、残余尿量显著增加 , 排尿效率(V%)排尿量 / 膀胱容量明显减少 , 残余尿量明显增多。

2.3 NGF 在膀胱和骶髓 DRG 的表达

见表 3。糖尿病组与对照组相比 膀胱和骶髓 DRG NGF 表达明显降低。

表 1 各组大鼠一般情况比较
(Table 1. General characteristics of control and diabetic rats. n=10. Mean± SEM.)

组别 /Group	体重 / Body weight (g)		血糖 /Blood glucose level(mmol/L)	
	初始 /initial	12 周 /12weeks	72 小时 /72h	8 周 /8weeks
对照组 /control	214.5± 9.85	401.4± 20.86	6.76± 0.26	6.75± 0.31
糖尿病组 /DM	218.0± 7.52	190.7± 18.951*	23.85± 1.621*	24.26± 2.111*

* 与 NC 组比较 P<0.01 (*P<0.01 vs. control group.)

表 2 各组大鼠尿动力学参数比较(Table 2. Cystometric data of control and diabetic rats)

组别 /Group	数量 /No.	膀胱阈容量 / Bladder capacity (mL)	排尿量 / Bladder capacity (mL)	残余尿量 / Post-void volume(mL)	排尿效率 /Voiding efficiency (%)
对照组 /control	10	0.71± 0.12	0.6± 0.10	0.07± 0.08	91.07± 10.54
糖尿病组 /DM	10	1.47± 0.281*	0.9± 0.251*	0.52± 0.181*	64.15± 10.281*

* 与对照组比较 P<0.01;(*P<0.01 vs. control group.)

表 3 各组大鼠 NGF 表达水平比较(Table 3.NGF level of each group. n=10. Mean± SEM)

组别 /Group	数量 /No.	NGF 水平 /NGF level(ng/ml)	
		骶髓 DRG/ sacral cord DRG	膀胱 /bladder
对照组 /control	10	14364.44± 420.80	7351.74± 99.85
糖尿病组 /DM	10	9923.32± 856.961*	4108.72± 153.141*

* 与对照组比较 P<0.01 (*P<0.01 vs. control group.)

3 讨论

外周神经病变是糖尿病多种慢性并发症的共同病因 , 可以累及运动、感觉、自主神经 , 而通常以感觉神经最先受累 , 各种因素(包括代谢、血管、神经营养)均可破坏神经细胞的结构 , 造

成神经传导速度下降。在这些病人中超过 50%的患者患有糖尿病膀胱病变 , 其致病机制主要包括肌源性损害和神经源性损害两大方面。糖尿病膀胱功能的损害主要表现在储尿和排尿功能障碍两个方面 : 储尿功能障碍体现在患者充盈感觉功能减弱 ,

膀胱容量增大,而排尿功能障碍则表现为排尿困难、剩余尿增机体微循环障碍、周围神经滋养血管管壁基膜增厚和发生透明变性、管腔狭窄、缺血致 NGF 缺乏以及长期持续高血糖致细胞内山梨醇通路和非酶化促组织蛋白糖基化、醛糖还原酶激活和二酰基甘油(DAG)-蛋白激酶 C(PKC)通路激活等代谢异常引起的氧化应激导致交感、副交感神经受损^[3],并由于膀胱胆碱能神经对电场刺激反应的提高,故早期 DCP 患者膀胱亢进多见;又由于早期逼尿肌肥大及 M 受体密度升高,而表现为膀胱逼尿肌收缩力增强^[4]。另外由于高血糖造成的早期神经突触作用破坏,诱发不规则的肌电反应,故 DCP 患者存在逼尿肌/括约肌协同失调。晚期 DCP,由于 $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATP}$ 酶代谢异常,使轴突病变加剧,神经代谢障碍加剧^[5,6],膀胱感觉下降明显,膀胱容量明显增大,同时肌细胞代谢障碍使膀胱收缩力下降,顺应性增加。目前临床的治疗缺乏针对性,效果不是很明显。另外,近年研究发现内皮型一氧化氮合成酶也可能参与糖尿病膀胱的发生发展^[7,8]。

NGF 和睫状神经营养因子 (ciliary neurotrophic factor, CNTF)、胶质细胞源性神经营养因子 (glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF) 共称为神经营养因子 (neurotrophic factors, NTFS)。

NGF 是 NTFs 家族中发现最早、研究最深的一类生长因子,广泛存在于包括人类在内的多种动物中,主要存在于交感神经元及部分感觉神经元所分布的靶区域内的细胞组织内,其生物学活性主要是维持交感神经和感觉神经的生长发育及功能。NGF 在神经发育期间对神经元的生长和死亡具有重要作用,可促进成年神经的功能维持、结构完整以及损伤后再生,还能诱导神经递质的合成、蛋白磷酸化、甲基化以及类似 ras 蛋白的基因表达所需酶的合成,能有选择的营养交感神经节神经元和周围神经系统的小纤维感觉神经元。NGF 是一种含有 α 、 β 、 γ 三种亚基的多聚体,按 $\alpha 2\beta\gamma 2$ 的比例构成,每个单位内有二组二硫键。 β 亚单位是 NGF 的活性区,是由两个 118 个氨基酸碱基组成的单链经非共价键结合而成的二聚体。由靶细胞合成释放的 NGF 通过旁分泌的方式与效应细胞上的高亲和力受体 (TrKA) 和低亲和力受体 (p75) 结合,发挥诱导神经细胞合成蛋白质、抑制神经元凋亡、诱导轴突生长、促进神经鞘磷脂水解和促进神经再生等多种功能^[9,10]。关于 NGF 与糖尿病神经病变之间的关系,有学者研究发现,无论是糖尿病患者还是糖尿病动物模型,多种组织均出现 NGF 表达水平下降,原因可能与胰岛素缺乏和高血糖状态使 NGF 合成减少、受体 (TrKA) 亲和力降低及 NGF 逆向轴浆运输受损有关^[11]。

Pradat 研究发现,使用腺病毒介导的 NT-3 基因治疗糖尿病大鼠可预防其感觉及运动神经传导速率的下降,对神经传导具有保护作用^[12,13]。Katsumi Sasaki^[14]等利用单纯疱疹病毒介导 NGF 基因治疗 DCP 大鼠模型,发现糖尿病大鼠最大膀胱容量、单次排尿量、残余尿量较对照组均明显减少。

NGF 在膀胱全层含量丰富,对维持神经生长发育和神经功能起重要作用,同时还能抑制神经细胞凋亡^[15]。在本研究中,我们成功诱导出糖尿病大鼠模型,应用酶联免疫吸附试验发现糖尿病大鼠膀胱和骶髓 DRG 中 NGF 蛋白表达水平明显低于对照组,行尿流动力学检测发现糖尿病大鼠膀胱容量、残余尿量显著增加,排尿效率明显下降,膀胱过度活动明显,说明 NGF 表达降低在糖尿病膀胱病变中起重要作用,Sasaki^[16]等研究也发现糖尿病大鼠膀胱中 NGF 呈时间依赖性显著减少,进

一步证实了糖尿病膀胱中存在 NGF 的严重损坏。我们将进一步有针对性的寻求治疗糖尿病神经源性膀胱的新途径、新方法。

参考文献 (References)

- [1] Olapade-Olaopa EO, Morley RN, Carter CJ, et al. Diabetic cystopathy presenting as primary acute urinary retention in a previously undiagnosed young male diabetic patient [J]. J Diabetes Complications, 1997, 11(6):350-351
- [2] Siracusano S, Aloia G, Lentini MG, et al. Diabetic cystopathy [J]. Diabetes Nutr Metab, 2002, 15(1):41-44
- [3] Net Das Evcimen, George L, King. The role of protein kinase C activation and the vascular complications of diabetes [J]. Pharmacol Res, 2007, 55:498-510
- [4] Aito M, Wada Y, Ikeda K, et al. Expression of endothelin receptor subtypes and their messenger RNAs in diabetic rat prostate: effect of insulin treatment [J]. Mol Cell Biochem, 2000, 210:1-12
- [5] Bezuijen MW, Levendusky MC, Longhurst PA, et al. Functional response of bladder strips from streptozotocin diabetic rats depends on bladder mass [J]. J Urol, 2003, 169:2397-2401
- [6] De Groat WC. Anatomy of the central neural pathways controlling the lower urinary tract [J]. Eur Urol, 1998, 34 Suppl(1):25
- [7] da Silva CG, Specht A, Wegiel B, et al. Mechanism of purinergic activation of endothelial nitric oxide synthase in endothelial cells. Circulation, 2009, 119:871-879
- [8] Liu F, Xia M, Xu A. Expression of VEGF, iNOS, and eNOS is increased in cochlea of diabetic rat. Acta Otolaryngol, 2008, 128:1178-1186
- [9] Santee SM, Owen-Schaub LB. Human tumor necrosis factor receptor p75/80 (cd120b) gene structure and promoter characterization [J]. J Biol Chem, 1996, 271(35):21151-21159
- [10] Hannila SS, Kawaja MD. Nerve growth factor-mediated collateral sprouting of central sensory axons into deafferented regions of the dorsal horn is enhanced in the absence of the p75 neurotrophin receptor [J]. J Comp Neurol, 2005, 486(4):331-343
- [11] Kanbayashi H, Itoh H, Kashiwaya T, et al. Spatial distribution of nociceptive neuropeptide and nerve growth factor depletion in experimental diabetic peripheral nervous system [J]. J Int Med Res, 2002, 30(5):512-519
- [12] Akkina SK, Patterson CL, Wright DE. GDNF rescues nonpeptidergic unmyelinated primary afferents in streptozotocin-treated diabetic mice [J]. Exp Neurol, 2001, 167(1):173-182
- [13] Pradat PF, Kennel P, Naimi-Sadaoui S, et al. Continuous delivery of neurotrophin 3 by gene therapy has a neuroprotective effect in experimental models of diabetic and acrylamide neuropathies [J]. Hum Gene Ther, 2001, 12(18):2237-2249
- [14] Katsumi Sasaki, Michael B. Chancellor, et al. Gene Therapy Using Replication-Defective Herpes Simplex Virus Vectors Expressing Nerve Growth Factor in a Rat Model of Diabetic Cystopathy [J]. DIABETES, 2004, 53(10):2723-2730
- [15] 刘中庆, van Koeveering GA, 田成功等. 糖尿病膀胱的尿动力学及病理学改变 (附动物实验与临床观察) [J]. 临床泌尿外科杂志, 2005, 20(11):665-668
WEI Zhongqing, van Koeveering GA, TIAN Chengong, et al. Urodynamic findings and pathological alterations in diabetic cystopathy [J]. 2005, 20(11):665-668 (in Chinese)
- [16] Sasaki K, Chancellor MB, Phelan MW, et al. Diabetic cystopathy correlates with a long-term decrease lumbosacral dorsal root ganglia [J]. J Urol, 2002, 168:1259-1264