

糖尿病性膀胱病逼尿肌中 SCF mRNA 和 SCF 蛋白的表达

张少峰 谢 胜 甘 伟 罗茂华 李云飞[△]

(湖北医药学院附属人民医院泌尿外科 湖北 十堰 442000)

摘要 目的:检测 DCP 逼尿肌中 SCF 表达水平,探讨 SCF 基因表达与 DCP 关系及其发病机制。**方法:**按 1:2 病例对照研究,采用链脲佐菌素(STZ)及尿动力学检测成功建立 DCP 豚鼠 20 只为实验组,并以同质豚鼠 40 只为对照组,应用 RT-PCR 和 Western-blotting 方法分别检测各组膀胱逼尿肌中 SCF mRNA、SCF 蛋白的表达。**结果:**DCP 豚鼠组织中 SCF mRNA 表达与正常对照组比较无明显显著差异($P>0.05$),DCP 豚鼠组织中 SCF 蛋白表达明显低于正常对照组($P<0.01$)。**结论:**DCP 组织中 SCF 蛋白表达减少与 SCF 基因翻译水平异常有关,因此高血糖环境下 SCF 基因表达异常可能是 DCP 的发病机制之一。

关键词: Cajal 样细胞,糖尿病性膀胱病,SCF,SCF/c-kit 信号通路

中图分类号: R587.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2011)12-2317-04

Expression and Significance of SCF Messenger Ribonucleic Acid and SCF Protein in the Diabetic Cystopathy

ZHANG Shao-feng, XIE Sheng, GAN Wei, LUO Mao-hua, LI Yun-fei[△]

(Department of Urology, Affiliated People's Hospital of Hubei Medical College 325027, Shiyan China)

ABSTRACT Objective: The aim of this study was to determine the expression of SCF mRNA and SCF protein in the bladders in guinea pigs of diabetic cystopathy (DCP). To explore the correlation and mechanisms between SCF gene expression and DCP.

Methods: Sixty guinea pigs were divided randomly into the normal group ($n=40$) and the experimental group ($n=20$), the guinea pigs of the experimental group were injected with streptozotocin (STZ) to induce DCP model. Expression of SCF mRNA was detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and expression of SCF protein was tested and analyzed by Western-blotting.

Results: It is no significant difference ($P>0.05$) that DCP group of SCF mRNA expression compared with control group, SCF protein expression significantly declined in the DCP group. **Conclusion:** The declined expression of SCF gene at translation phases destroys the SCF/c-kit signal pathway, which lead to the dysfunction of Cajal-like cells in DCP of guinea pig, so the abnormal expression of SCF gene is one of pathogenesis of DCP

Key words: Cajal-like cells, Diabetic cystopathy, SCF/c-kit signal pathway

Chinese Library Classification(CLC): R578.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)12-2317-04

前言

糖尿病性膀胱病(diabetic cystopathy, DCP)是糖尿病引起的泌尿系统并发症之一。在糖尿病患者中,DCP 发病率为 25%~85%。严重影响患者生活质量,但其发病机制目前尚不清楚。最近研究表现 Cajal 样细胞异常在 DCP 中扮演重要角色^[1-3],大量研究显示 SCF 作为分子配体与其受体 c-kit 结合后起动的 SCF/c-kit 信号转导通路,对 Cajal 样细胞功能的发挥至关重要,微环境中缺乏 SCF 刺激培养的 Cajal 样细胞其数量明显减少及起搏功能丧失^[4,5]。然而目前有关 DCP 逼尿肌中 SCF 基因表达变化方面的研究未见相关文献报道,本研究通过检测 SCF mRNA、SCF 的表达水平,探讨 SCF 基因表达与 DCP 的关系及其发病机制。

1 材料与方法

作者简介 张少峰(1962-)男,硕士生导师,副教授,主要研究方向:腔内泌尿外科及尿控学研究

△通讯作者 李云飞, Tel: 15271413478, E-mail: lyf694110@yahoo.com.cn.

(收稿日期:2010-12-11 接受日期:2011-01-12)

1.1 实验动物、主要仪器及试剂

实验动物:普通级英国种雄性豚鼠体重(体重 220-250g)。**实验用药和主要试剂:**链脲佐菌素(STZ)购于 sigma,TRIZOL 购自 invitrogen,RT-PCR 扩增试剂盒购于 Fermentas,凝胶扫描成像系统、SCF 一抗(小鼠抗大鼠抗体,Millipore,美国)、二抗(异硫氰酸荧光素标记的山羊抗大鼠抗体,中国)、紫外分光光度仪、梯度 PCR 仪(EPENDORF,德国)。PCR 引物委托大连宝生物合成 SCF 5'-GTCATTGTTGGATAAGCGAGAT-3'(forward) 5'-ATGGCTGCCAGTGTAGG-3'(reverse),GAPDH 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'(forward) 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'(reverse)。

1.2 实验方法和步骤

1.2.1 DCP 模型的建立 其具体方法见参考文献^[6]

1.2.2 SCF mRNA 表达的检测 根据 GenBank 中 SCF 序列,用 Primer5.0 软件分别设计 SCF mRNA、内参照 GAPDH mRNA 的引物;取液氮保存膀胱组织约(100mg)抽取总 RNA,紫外分光光度定量:取 1μL 样品用 99μL DEPC 水稀释,充分混匀,在紫外分光光度计上测 OD²⁶⁰、OD²⁸⁰ 及 OD²⁶⁰/OD²⁸⁰, OD²⁶⁰/OD²⁸⁰ 的比值在 1.6~2.0 之间时表示提取的 RNA 纯度较好。用无 RNA

酶的水调零,根据 OD²⁶⁰=40μg/mL 单链核苷酸来计算 RNA 浓度,电泳检测 RNA 的完整性:采用 1.5%琼脂糖凝胶最后于紫外灯下观察结果,若见清晰 28s、18s 条带,提示所提 RNA 完整,无明显降解(图 1)可进行下一步实验。逆转录合成 cDNA:取 1μg 总 RNA 用常规逆转录聚合酶链反应合成 cDNA,PCR 扩增:反应条件以 94℃预变性 5min、94℃变性 30s、54℃退火 30s、72℃延伸 60s、循环 30 次、最后延伸 10min。PCR 产物鉴定、凝胶图像扫描及半量分析:以 1.5%琼脂糖凝胶电泳后用凝胶扫描分析系统扫描电泳图片存盘,用 Quantity one 4.4 (Bio-Rad, USA)软件对目标条带进行光密度分析,测定各条带光密度值,结果以积分吸光度值(integral absorbance, IA)表示。将各个检测基因的 IA 值与 GAPDH 条带的 IOD 值相比较得到相对 IA 值。

1.2.3 SCF 蛋白表达的测定 总蛋白抽提:取液氮保存膀胱组织约(200mg)抽取蛋白样品,蛋白定量:取 5μl 样品用匀浆缓冲液稀释 10 倍,充分混匀,在紫外分光光度计 595nm 波长下比色测得每样品的蛋白含量,然后加载样缓冲液将每管样品稀释为终浓度为 4μg/L;电泳及半干电转印;免疫印迹杂交:SCF 一抗:小鼠抗大鼠抗体(1:50),二抗为山羊抗小鼠抗体(1:50),5、

取免疫印迹化学发光试剂盒进行化学发光法检测;结果分析:用扫描仪扫描化学发光定影的 X 光片存盘,用上述软件对目标条带进行光密度分析,测定各条带光密度值,结果以 IA 值表示。

1.3 统计学分析 尿动力学指标、SCF mRNA 数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,SCF 表达数据由于呈偏态分布及方差不齐,测定数据都计算了中位数(M)和四分位间距(OR)及 M±QR 表示,并运用 SPSS16.0 统计软件包对尿动力学参数、SCF mRNA 表达数据采用两独立样本 t 检验,对 SCF 蛋白表达数据进行非参数检验。

2 结果

2.1 豚鼠膀胱在体充盈性尿动力学指标测定

豚鼠经尿动力学检测将糖尿病豚鼠筛选出 DCP 豚鼠 20 只,DCP 豚鼠尿动力学指标:最大膀胱容量(P<0.05)、漏尿点压(P<0.01)、静息膀胱内压(P<0.01)明显高于对照组,排尿期最大逼尿肌压(P<0.01)、顺应性(P<0.05)明显低于对照组,结果表明 DCP 组豚鼠逼尿肌功能障碍,各组豚鼠尿动力学检测指标参数见表 1。

Tab 1 The level of urodynamic index of three groups ($\bar{x} \pm s$, n₁=40; n₂=20)

Index	Group	
	Control(n ₁)	DCP(n ₂)
Maximum bladder pressure	41.56± 2.42 **	13.40± 2.12
Maximum bladder capacity	3.51± 0.46 *	2.82± 0.11
Threshold	1.24± 0.64 **	3.42± 1.26
Compliance	0.41± 0.44 *	0.15± 0.73
Resting pressure	1.52± 0.07 **	5.16± 0.75

*P<0.05, **P<0.01 vs DCP group

2.2 豚鼠膀胱组织 SCF mRNA 表达

各组 RT-PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳均在 400-500bp 之间获得特异性目的条带即 SCF457bp, GAPDH 扩增片段为

300bp,见(图 2)。计算 SCF 与 GAPDH 的相对积分光密度值提示:DCP 组 SCFmRNA 表达与正常对照组比较无显著统计学差异(p>0.05),二组 SCF mRNA 表达水平见表 2。

Tab. 2 Expression of SCF mRNA and SCF protein in bladder of guinea pig

SCF mRNA			SCF protein		
Group	n	$\bar{x} \pm s$	Two-sample T test	M± QR	Man-whitney
Control	40	5.66± 0.54	0.74	293.52± 56.15	12.3
DCP	20	4.65 ± 0.47 [▲]		144.69± 23.13**	

*P<0.05, **P<0.01 vs control group. [▲]P>0.05 vs control group

2.3 豚鼠膀胱组织 SCF 蛋白表达

经聚丙烯酰胺凝胶电泳和硝酸纤维素膜蛋白质印迹显示出一条 45KD 的条带,符合 SCF 蛋白的分子量大小。与对照组相比,DCP 组 SCF 蛋白表达明显降低(P<0.01),各组豚鼠膀胱组织 SCF 蛋白的表达水平如下表 2。

3 讨论

膀胱 Cajal 样细胞在膀胱中具有两大功能:充当膀胱逼尿

肌兴奋收缩的起搏点及推进电活动的传播功能^[2,7-10];信息传递和作为神经输出和膀胱逼尿肌联系的中介功能,然而其功能的发挥依赖于 SCF/c-kit 信号通路。SCF 在膀胱组织中主要来源于成纤维细胞及平滑肌细胞, Rich 报道微环境中 SCF 浓度对 ICC 的培养至关重要,不加 SCF 的培养基 Cajal 细胞本不能存活。Cajal 细胞的培养必须依赖与其共培养的成纤维细胞等分泌提供 SCF 才能成活。SCF 作为配体与 cajal 样细胞膜表面 c-kit 受体结合后启动 SCF/c-kit 信号通路,将信号传入胞内直

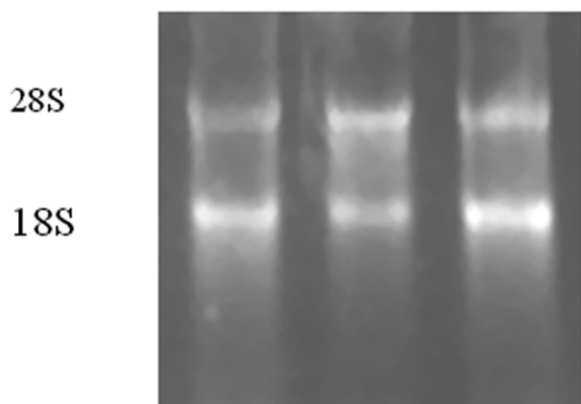


图1 总 RNA 电泳

Fig. 1 Electrophoresis of RNA

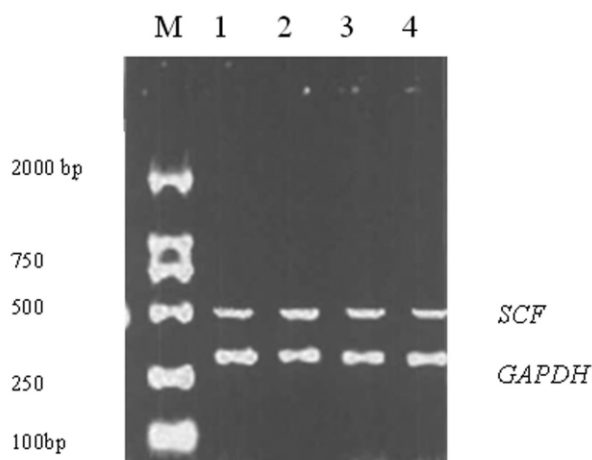


图2 SCF mRNA 表达分析(RT-PCR) 300bp 为内参照 GAPDH 457bp 为 SCF。M :DL2000DNAMarker 1 2 :正常对照组 3 4 :DCP 组。

Fig. 2 The expression of SCF mRNA by RT-PCR analysis, two bands with sized 300bp(GAPDH) and 457bp(SCF) presented in the electrophoresis.

M :DL2000DNAMarker 1 2 :control group 3 4 :DCP group

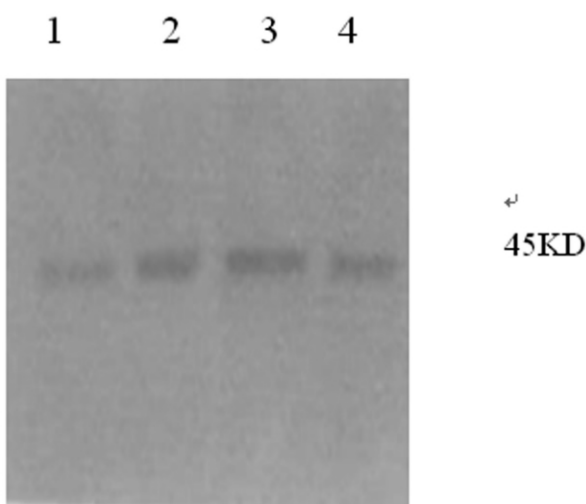


图3 SCF 蛋白表达(Western-blotting)。1 2 :正常对照组 3 4 :DCP 组。

Fig. 3 The expression of SCF protein by Western-blotting.

1 2 :control group 3 4 :DCP group

殖、分化和及表型维持^[11-15]。SCF 作为 SCF/c-kit 信号通路的组分成份配体,因此 SCF 基因的正常表达及膀胱组织正常数量的 SCF 是维持该信号转导通路正常和 Cajal 样细胞发挥功能的必要条件。

我们前期研究发现 cajal 样细胞功能异常是 DCP 逼尿肌功能的重要原因之一^[1],而 Cajal 样细胞这种功能异常是否与 SCF 基因表达异常有关?因此本实验从基因水平上对 DCP 膀胱组织进一步研究,从基因表达来看,SCF DNA 转录 SCF mRNA 的量决定翻译 SCF 的表达量,但基因的表达在生物体存在复杂的调控机制,如对 SCF mRNA 的剪接、修饰、翻译起始复合物的调节等,可能存在两者水平不平行表达,为了考虑这些因素,本实验利用 RT-PCR 和 Western-blotting 定量技术从转录和翻译两个水平进行检测,结果显示 DCP 豚鼠组织中 SCF mRNA 表达与正常对照组比较无明显显著差异 ($P>0.05$),而 DCP 豚鼠组织中 SCF 表达明显低于正常对照组 ($P<0.01$),这提示 DCP 膀胱组织 SCF 表达降低可能是体内高血糖环境作用下 SCF 基因翻译能力降低所致,而非 SCF 基因转录水平异常所致。正常膀胱逼尿肌兴奋收缩与 Cajal 样细胞功能密切相关,而 Cajal 样细胞发挥其电生理功能必须依赖 SCF/c-kit 信号转导通路调节胞浆中游离钙离子浓度^[16-20]。而 DCP 逼尿肌中 SCF 表达降低, Cajal 样细胞胞浆中达不到有效游离钙离子浓度,则丧失其在膀胱逼尿肌中发挥的起搏及信息传递功能,最终使逼尿肌功能障碍发生 DCP。体内高血糖环境下为什么会发生 SCF 翻译效率降低,可能与高血糖抑制 SCF mRNA 翻译起始复合物形成有关,其具体机制有待进一步研究证实。

综上所述,DCP 豚鼠膀胱逼尿肌由于 SCF mRNA 翻译成 SCF 含量降低,从而使膀胱 Cajal 样细胞失去 SCF/c-kit 信号通路的刺激而发生该细胞在膀胱中的起搏及兴奋信息传导功能减弱,最终导致膀胱逼尿肌功能障碍而发生 DCP,因此基因表达异常是 DCP 的发病机制之一。

参考文献(References)

- [1] 李云飞,王勤章. 糖尿病膀胱病变与 Cajal 样间质细胞的研究进展 [J]. 临床外科杂志, 2009, 17(6): 41-43
Li Yun-fei, Wang Qin-zhang. The study progression of relations for diabetic cystopathy and Cajal-like cells [J]. Clin Surg, 2009, 17(6): 41-43
- [2] Satoshi lino, Kazuhide Horiguchi. Interstitial cells of Cajal are involved in neurotransmission in the gastrointestinal tract [J]. Acta histochem. cytochem, 2006, 39(6): 145-153
- [3] Davidson RA, McCloskey KD. Morphology and localization of interstitial cells in the guinea pig bladder: structural relationships with smooth muscle and neurons [J]. J Urol, 2005, 173(4): 1385-1390
- [4] Ward SM, Sanders KM. Physiology and Pathophysiology of the interstitial cell of Cajal from bench to bedside: Functional development and Plasticity of interstitial cells of Cajal networks [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2001, 281(3): 602-611
- [5] Leeuyer E, Herblot S, Saint-Denis M, et al. The SCL complex regulates c-kit expression in hematopoietic cells through functional interaction with Sp1 [J]. Blood, 2002, 100(7): 2430-2440

至胞核,从而调节基因表达,控制 Cajal 样细胞功能、生长、增

- [6] 李云飞,王勤章,丁国富. 早期糖尿病膀胱尿动力学及 Cajal 样细胞的变化和意义 [J]. 临床泌尿外科杂志,2009,24(9):694-697
Li Yun-fei,Wang Qin-zhang,Ding Guo-fu. Changes and significances of urodynamics and cajal-like cells in diabetic cystopathy of the early stage[J].Clinical Urology, 2009,24(9):694-697
- [7] Shafik A, El-Sibai O, Shafik AA, et al. Identification of interstitial cells of Cajal in human urinary bladder: concept of vesical pacemaker [J]. Urology, 2004,64(4):809-813
- [8] McCloskey KD. Characterization of outward currents in interstitial cells from the guinea pig bladder[J]. J Urol, 2005,173(1):296-301
- [9] Megan FK, Betty E, Lang RJ. Identification of the cells underlying pacemaker activity in the guinea-pig upper urinary tract [J]. The Journal of Physiology. 1999,519(3):867-884
- [10] Gillespie JJ, Harvey IJ, Drake MJ. Agonist- and nerve-induced phasic activity in the isolated whole bladder of the guinea pig: evidence for two types of bladder activity[J]. Exp Physiol, 2003,88(3):343-357
- [11] Davidson RA, McCloskey KD. Morphology and localization of interstitial cells in the guinea pig bladder: structural relationships with smooth muscle and neurons[J]. J Urol, 2005,173(4):1385-1390
- [12] Rasmussen H, Rumessen JJ, Hansen A, et al. Ultrastructure of Cajal-like interstitial cells in the human detrusor [J]. Cell Tissue Res, 2009,335(3):517-527
- [13] Biers SM, Reynard JM, Doore T, et al. The functional effects of a c-kit tyrosine inhibitor on guinea-pig and human detrusor [J]. BJU Int, 2006,97(3):612-616
- [14] Kubota Y, Biers SM, Kohri K, et al. Effects of imatinib mesylate (Glivec) as a c-kit tyrosine kinase inhibitor in the guinea-pig urinary bladder[J]. Neurourol Urodyn, 2006,25(3):205-210
- [15] McCloskey KD. Calcium currents in interstitial cells from the guinea-pig bladder[J]. BJU Int, 2006 Jun,97(6):1338-1343
- [16] 王勤章,李云飞,丁国富.豚鼠膀胱 ICCS 的类型及钙离子振荡特征 [J].中华泌尿外科杂志,2010,31(9):614-617
Li Yun-fei,Wang Qin-zhang,Ding Guo-fu. The types and spontaneous Ca^{2+} waves of ICCS in the bladder of guinea pig [J].journal of Urology,2010,31(9):614-617
- [17] Nakayama S, Kajioka S, Goto K, et al. Calcium-associated mechanisms in gut pacemaker activity [J]. J Cell Mol Med. 2007,11(5):958-968
- [18] Johnston L, Carson C, Lyons AD, et al. Cholinergic-induced Ca^{2+} signaling in interstitial cells of Cajal from the guinea pig bladder[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2008,294(3):645-655
- [19] Liu HN, Ohya S, Furuzono S, Wang J, et al. Co-contribution of IP3R and Ca^{2+} influx pathways to pacemaker Ca^{2+} activity in stomach ICCs[J]. J Biol Rhythms,2005,20(1):15-26

(上接第 2265 页)

- [7] 侯天勇,伍亚民,张玉波,等.维甲酸对神经干细胞的增殖和分化效应 [J]. 中华神经医学杂志,2005,4(9):888-891
Hou Tian-yong, Wu Ya-min, Zhang Yu-bo, et al. Effect of retinoic acid on proliferation and differentiation of neural stem cells [J]. Chin J Neuromed, 2005,4(9):888-891
- [8] 高博,邢雪松. Hes1 信号分子在内源性神经干细胞增殖分化中的作用 [J]. 沈阳医学院学报,2010,12(2):122-124
Gao Bo, Xin Xue-song. The effect of Hes1 on the proliferation and differentiation of endogenous neural stem cell [J]. Journal of shenyang medical college, 2010,12(2):122-124
- [9] Pevny LH, Nicolis SK. Sox2 roles in neural stem cells [J]. Biochem Cell Biol, 2010,42(3):421-424
- [10] Mancini SJ, Mantei N, Dumortier A, et al. Jagged 1-dependent Notch signaling is dispensable for hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation [J]. Blood, 2005,105(6):2340-2342
- [11] Toledo EM, Colombres M, Inestrosa NC. Wnt signaling in neuroprotection and stem cell differentiation [J]. Prog Neurobiol, 2008,86(3):281-296
- [12] Sun JQ, Sha B, Zhou WH, et al. Basic fibroblast growth factor stimulates the proliferation and differentiation of neural stem cells in neonatal rats after ischemic brain injury [J]. Brain Dev,2009,31(5):331-340
- [13] Li Q, Ford MC, Lavik EB, et al. Modeling the neurovascular niche: VEGF- and BDNF-mediated cross-talk between neural stem cells and endothelial cells: an in vitro study [J]. J Neurosci Res, 2006,84(8):1656-1668
- [14] 李政,王江,龙在云,等.VEGF、bFGF 联合应用对胎鼠大脑皮质神经干细胞分化的影响 [J].解放军医学杂志,2010,35(4):377-380
Li Zheng, Wang Jiang, Long Zaiyun, et al. Joint action of VEGF and bFGF on differentiation of neural stem cells from embryonic rat cortex [J]. Med J Chin PLA, 2010,35(4):377-380
- [15] Dragunow M, Greenwood JM, Cameron RE, et al. Valproic acid induces caspase 3-mediated apoptosis in microglial cells [J]. Neuroscience, 2006,140(4):1149-1156
- [16] Chen G, Zeng WZ, Yuan PX, et al. The mood-stabilizing agents lithium and valproate robustly increase the levels of the neuroprotective protein bcl-2 in the CNS. Neurochem, 1999,72(2):879-882
- [17] Peng GS, Li G, Tzeng NS, et al. Valproate pretreatment protects dopaminergic neurons from LPS-induced neurotoxicity in rat primary midbrain cultures: role of microglia [J]. Brain Res Mol Brain Res, 2005,134(1):162-169
- [18] Laeng P, Pitts RL, Lemire AL, et al. The mood stabilizer valproic acid stimulates GABA neurogenesis from rat forebrain stem cell [J]. J Neurochem, 2004,91(1):238-251
- [19] Hisahara S, Chiba S, Matsumoto H, et al. Histone deacetylase SIRT1 modulates neuronal differentiation by its nuclear translocation [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008,105(40):15599-15604