

· 临床研究 ·

肾上腺素能 β 受体在人膀胱逼尿肌中作用的年龄相关性研究

李振华 马智勇 李刚 王平 孔垂泽

【摘要】 目的 研究肾上腺素能 β 受体膀胱逼尿肌反应性的年龄相关性改变及其可能机制。方法 采用细胞功能试验来检测 10 位老年患者逼尿肌细胞对异丙肾上腺素(肾上腺素能 β 受体激动剂)、BRL37344(选择性 β_2 受体激动剂)、forskolin(腺苷酸环化酶激活剂)和 DBcAMP(二丁基环腺苷酸)的反应性。同样用非选择性肾上腺素能 β 受体配基 [^3H] - 双氢心得舒来进行放射性配基结合测定。并以青年人的膀胱逼尿肌标本作为对照。结果 对照组和老年组之间 KCl 诱导的逼尿肌收缩程度无显著性差异;与对照组相比,老年组对异丙肾上腺素、BRL37344 和 forskolin 的反应性分别下降了 15.0%、17.6% 和 12.6% ($P < 0.001$),异丙肾上腺素和 BRL37344 的 pD_2 ($-\lg\text{EC}_{50}$) 值也显著降低;两组间对 DBcAMP 的反应性并无差别;随年龄增加逼尿肌细胞的肾上腺素能 β 受体的最大结合部位显著下降,但平衡解离常数却无明显差别。结论 老年人膀胱平滑肌存在对肾上腺素能 β 受体的反应性下降,这可能是造成老年人膀胱顺应性减退的原因。受体密度的降低和腺苷酸环化酶活性的下降导致的 cAMP 合成减少可能是造成肾上腺素能 β 受体反应性下降的分子基础。

【关键词】 膀胱平滑肌;肾上腺素能 β 受体;逼尿肌

Age-dependent changes of beta-adrenoceptor function in human detrusor urinae and possible mechanisms

LI Zhenhua, MA Zhiyong, LI Gang, et al

Department of Urology, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, China

【Abstract】 Objective To study age-dependent changes of beta-adrenoceptor responsiveness and their possible mechanisms. Methods Responsiveness of detrusor urinae from 10 old patients to the beta-adrenergic agonists isoprenaline, BRL37344, forskolin, and dibutyl cyclic AMP (DBcAMP) was examined by using a cellular function test. A radioligand binding assay was performed using the non-selective beta-adrenergic receptor ligand [^3H]-dihydroalprenolol ([^3H]-DHA). Specimens from 10 young men were used as controls. Results There were no age-dependent changes in contractile response to KCl. The relaxation responses to isoprenaline, BRL37344, and forskolin decreased by 15.0%, 17.6%, and 12.6%, respectively ($P < 0.001$) in the aged group. The pD_2 values for isoprenaline and BRL37344 also declined significantly. There was no difference in the responsiveness to DBcAMP between the two groups. The maximum binding site decreased significantly with increasing age, but the equilibrium-dissociation constant did not change. Conclusions There is an age-related decline in beta-adrenergic responsiveness which might be one of the causative factors of reduced bladder compliance in the elderly. A decrease in cAMP level caused by reduced receptor density and adenylyl cyclase activity might be the underlying molecular mechanism of the changes in beta-adrenoceptor responsiveness.

【Key words】 bladder; detrusor urinae; β -adrenoceptor

老年人中存在年龄相关性膀胱功能变化,提示老年人下尿路症状的病理生理基础中存在与年龄相关的膀胱平滑肌、尿路上皮、血管及神经病变^[1]。作者采用细胞功能试验和放射性配基结合试验的方法

对老年人逼尿肌细胞中肾上腺素能 β 受体的表达、受体功能年龄相关性变化及发生的分子机制进行了研究。

1 材料与方法

1.1 标本来源 膀胱平滑肌来源于手术切除标本,并于术前进行尿动力学及神经学检查以证实患者的膀胱功能正常。老年组 10 例,年龄 63~68 岁,男性 7 例,女性 3 例;对照组 7 例,年龄 24~32 岁,均为男

收稿日期:2004-08-16

基金项目:本课题受国家自然科学基金资助(编号 30170352)

作者单位:110001 沈阳市,中国医科大学附属第一医院泌尿外科

作者简介:李振华,男,1972 年 5 月生,河北省秦皇岛市人,医学博士,

主治医师。E-mail: akita20@hotmail.com

性。切除黏膜及周围脂肪组织,置于4℃氧合的Kreb氏液。

1.2 β 受体 mRNA 的检测 按照使用说明方法用TRIzol (GibcoBRL公司)提取总RNA,无RNase的DNase消化以去除污染的基因组DNA,分光光度计(DU-640, Beckman公司)以检测总RNA的量,肾上腺素能 β_1 、 β_2 、 β_3 受体的引物序列见参考文献[2], β -actin引物作为内标。用Titan单管RT-PCR系统(Roche分子生物化学公司)进行RT-PCR反应^[2]。

1.3 细胞功能实验 具体步骤详见参考文献[3]。用连有影像分析系统的倒置显微镜来测量随机选择细胞的长度;以40mmol的KCl溶液收缩细胞,检测不同浓度(10^{-9} ~ 10^{-5} mol)的异丙肾上腺素、BRL37344、forskolin和DBcAMP(Sigma公司)对逼尿肌细胞的松弛效应。以细胞的长度变化计算各种药物的效能,从浓度反应曲线计算激动剂的 pD_2 值(-lgEC₅₀),每种药物的内在活性(intrinsic activity, IA)为相对于对照组异丙肾上腺素最大松弛作用的比值。

1.4 放射性配基结合实验 ①逼尿肌质膜成分的分离:加入40~50倍体积的冰冷缓冲液(250 mmol蔗糖, 5 mmol MgCl₂, 1 mmol EDTA, 10 mmol Tris-HCl)后对逼尿肌标本进行匀浆,匀浆物过滤后在60 000 r/min、4℃下离心15 min,沉渣用含150 mmol NaCl和10 mmol Tris-HCl的缓冲液悬浮,储存在-70℃待测。Lowry法进行蛋白定量;②饱和实验:在有或无 10^{-6} mol心得安存在下,将不同浓度的肾上腺素能 β 受体配基^{[3]H}-双氢心得舒(dihydroalprenolol, DHA)(国家原子能研究所)加入含0.5 g蛋白/L的检测缓冲液(10 mmol MgCl₂, 50 mmol Tris-HCl)中,37℃下孵育30 min,进行饱和实验,液闪计数器检测放射性Scatchard法计算最大结合部位(B_{max})和平衡解离常数(K_d)。

1.5 统计学处理 数据以平均值±标准差表示,组间差异比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 认为差异具有显

著性意义。

2 结果

2.1 细胞功能试验 在40 mmol KCl作用下,对照组和老年组的逼尿肌细胞分别缩短(18.6 ± 1.4)%和(17.4 ± 1.5)%,两组间差异无显著性意义($P > 0.05$)。各种药物抑制KCl诱导的逼尿肌细胞收缩的内在活性与 pD_2 值结果见表1。

各种药物对40 mmol/L KCl诱导的逼尿肌细胞收缩都产生浓度依赖性抑制。与对照组相比,老年组膀胱平滑肌细胞对非选择性肾上腺素能 β 受体激动剂异丙肾上腺素、选择性肾上腺素能 β_3 受体激动剂BRL37344和腺苷酸环化酶激活剂forskolin的反应性明显下降($P < 0.01$),但对细胞内第二信使cAMP的类似物DBcAMP的反应性与对照组比较差异无显著性意义($P > 0.05$)。老年组中异丙肾上腺素、BRL37344的 pD_2 值明显下降($P < 0.05$, $P < 0.01$),但DBcAMP的 pD_2 值与对照组相比差异无显著性意义($P > 0.05$)。

2.2 人逼尿肌细胞中肾上腺素能三受体 mRNA 的表达 用3种 β 受体序列相应的特异性引物进行了RT-PCR反应,4例标本中均检测到 β_1 、 β_2 和 β_3 受体的PCR产物,大小约为265、329和314 bp;同时内标 β -actin的PCR产物也被检出,大小为452 bp。

2.3 逼尿肌细胞放射性配基结合实验 非选择性受体配基DHA与两组逼尿肌细胞膜标本的结合均有饱和性,Scatchard图分析显示对照组和老年组的最大结合部位分别为(32.36 ± 2.30) pmol/g蛋白和(26.90 ± 1.80) pmol/g蛋白,平衡解离常数分别为(0.18 ± 0.02) nmol及(0.17 ± 0.02) nmol。与对照组相比,老年组肾上腺素能 β 受体的最大结合部位明显减少($P < 0.01$),但平衡解离常数差异无显著性意义($P > 0.05$)。

表1 老龄化对药物抑制KCl诱导的逼尿肌细胞收缩作用的影响($\bar{x} \pm s$)

药 物	IA		pD_2	
	对照组	老年组	对照组	老年组
异丙肾上腺素	1	$0.85 \pm 0.06^{**}$	6.52 ± 0.03	$6.27 \pm 0.18^*$
BRL37344	0.69 ± 0.05	$0.56 \pm 0.03^{**}$	6.24 ± 0.17	5.93 ± 0.14
forskolin	1.27 ± 0.06	$1.11 \pm 0.04^{**}$	-	-
DBcAMP	1.29 ± 0.04	1.32 ± 0.06	3.59 ± 0.06	3.62 ± 0.08

注:与对照组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

3 讨论

老化进程与膀胱功能改变密切相关。老龄人口中排尿功能障碍是最常见的疾病,其发病率要高于心血管系统疾病;15%~30% 的 60 岁以上的老人受尿失禁、膀胱排空困难或排尿刺激症状困扰,并随着年龄的增长而逐渐加重^[4]。虽然老年人存在下尿路病理生理变化的性别上的差异,但是女性和男性有类似的排尿症状。男性下尿路功能的尿动力学变化并不依赖于膀胱出口梗阻程度,女性的尿动力学变化也与尿失禁程度无关。因此,老年人中膀胱功能障碍与年龄有关,而与性别无关^[1]。

膀胱平滑肌存在三种肾上腺素能 β 受体亚型的 mRNA。近年用逆转录聚合酶链反应等方法研究证实人类膀胱平滑肌存在三种肾上腺素能 β 受体亚型, β_1 、 β_2 和 β_3 , 其中只有 β_3 亚型可以介导膀胱平滑肌松弛,在膀胱充盈过程中抑制其收缩、维持正常的顺应性^[3]。肾上腺素能 β 受体是一种 G 蛋白偶联的跨膜受体, G 蛋白是一种由 α 、 β 、 γ 三个亚单位构成的异三聚体。 β 受体与激动剂结合后可以导致刺激性 G 蛋白 G_s 解离为 $G_{s\alpha}$ 、 $G_{s\beta}$ 和 $G_{s\gamma}$, $G_{s\alpha}$ 能活化细胞内腺苷酸环化酶,腺苷酸环化酶能够催化 ATP 降解成腺苷 3',5'-环磷酸(cAMP),cAMP 可以激活蛋白激酶 A,使其催化亚单位与调节亚单位分离,催化亚单位能磷酸化细胞内关键的靶蛋白,通过改变细胞收缩装置的磷酸化状态、抑制肌球蛋白轻链激酶激活,增加细胞内钙离子的再摄取及排出和细胞膜超极化等途径最终导致平滑肌松弛;磷酸二酯酶可以水解 cAMP 参与调节肾上腺素能 β 受体的细胞内水平^[5]。肾上腺素能 β 受体与激动剂结合还可以激活抑制性 G 蛋白 G_i ,后者能通过其 α 亚单位抑制腺苷酸环化酶的功能^[6]。Nishimoto 等^[7]报道与年轻鼠相比,老龄鼠中异丙肾上腺素对 KCl 和电场刺激引起的逼尿肌条收缩的最大松弛作用减弱。这说明鼠逼尿肌细胞上存在肾上腺素能 β 受体反应性的年龄相关性变化。人逼尿肌细胞上是否也有同样的变化还不明确。本研究显示,对照组和老年组之间 KCl 诱导的逼尿肌收缩程度差异无显著性,提示老化对膀胱收缩功能无影响。老年人膀胱平滑肌对非选择性肾上腺素能 β 受体激动剂异丙肾上腺素产生的松弛减少 15.0%,其 pD_2 值也明显下降,这说明老年人逼尿肌细胞对 β 受体激动剂的敏感度下降。这些结果提示,老年人膀胱平滑肌的肾上腺素能 β 受体反应性减

退。突触后胆碱能 M_2 受体能够抑制肾上腺素能 β 受体对腺苷酸环化酶的刺激,并与胆碱能 M_3 受体协同引起逼尿肌收缩, M 受体和 β 受体之间的平衡状态对于维持正常的膀胱功能极为重要^[8]。尿动力学检查显示,男性及女性老年人都有最大尿流率、排尿量及膀胱容量的下降以及排尿后残余尿量、逼尿肌不稳定的增加。最大尿流率的下降与伴随年龄增加逐渐减少的排尿量密切相关。另外,老年人的最大逼尿肌压与最大尿流率时逼尿肌压不存在年龄相关性变化,证实老年人膀胱顺应性下降而收缩功能无明显变化^[1]。本组研究结果与尿动力学检查相符,提示肾上腺素能 β 受体反应性下降可能是老年人膀胱顺应性下降的细胞学基础,并进而导致了胆碱能 M 受体功能相对亢进和膀胱过度活动。用非选择性放射性配基 [3H]-DHA 进行受体饱和实验发现,老年组中逼尿肌细胞的肾上腺素能 β 受体的最大结合部位显著下降,但平衡解离常数与对照组相似,说明老年人逼尿肌细胞中肾上腺素能 β 受体的密度降低,但受体亲和性无明显变化,提示 β 受体的密度降低也可能是老年人膀胱顺应性减退的重要原因之一。

此外,还研究了逼尿肌细胞对于 forskolin 及 DBcAMP(水溶性膜透过性 cAMP 类似物)的反应。BRL37344 的松弛效果下降了 17.6%,其 pD_2 也下降了。这提示老年人不缺乏肾上腺素能 β_3 受体,但是其反应性下降了。由于肾上腺素能 β_3 受体是主要的逼尿肌松弛药物,这说明其反应性下降可能是老年人逼尿肌细胞肾上腺素能 β 受体反应性降低的主要原因之一。老年人逼尿肌细胞中 forskolin 对 KCl 引起的逼尿肌收缩抑制效能与对照组相比下降了 12.6%,这可能与腺苷酸环化酶的含量或者生物活性下降有关。Wheeler 等^[9]报道 Fischer 鼠膀胱中存在年龄依赖的腺苷酸环化酶活性下降,与本组结果一致。

老年组与对照组对 DBcAMP 的反应性没有差别,提示老年人逼尿肌细胞 β 受体反应性下降与腺苷酸环化酶活性降低引起的 cAMP 合成减少有关,而与 cAMP 合成后的生化机制无关。

参考文献

- 1 Madersbacher S, Pycha A, Schatzl G, et al. The aging lower urinary tract: a comparative urodynamic study of men and women. *Urology*, 1998, 51: 206-212.
- 2 Fujimura T, Tamura K, Tsutsumi T, et al. Expression and possible functional role of β_3 -adrenoceptor in human and rat detrusor.

- 3 Igawa Y, Yamazaki Y, Takeda H, et al. Functional and molecular or biological evidence for a possible β_3 -adrenoceptor in the human detrusor muscle. *Br J Pharmacol*, 1999, 126: 819-825.
- 4 Diokno AC, Brown MB, Goldstein N, et al. Epidemiology of bladder emptying symptoms in elderly men. *J Urol*, 1992, 148: 1817-1821.
- 5 Hall IP. Second messengers, ion channels and pharmacology of airway smooth muscle. *Eur Respir J*, 2000, 15: 1120-1127.
- 6 Lefkowitz RJ. G protein-coupled receptors III. New roles for receptor kinases and β -arrestins in receptor signaling and desensitization. *J Biol Chem*, 1998, 273: 18677-18680.
- 7 Nishimoto T, Latifpour J, Wheeler MA, et al. Age-dependent alternations in β -adrenergic responsiveness of rat detrusor smooth muscle. *J Urol*, 1995, 153: 1701-1706.
- 8 Igawa Y. Discussion: functional role of M_1 , M_2 , and M_3 muscarinic receptors in overactive bladder. *Urology*, 2000, 55: 47-49.
- 9 Wheeler MA, Pontari M, Nishimoto T, et al. Changes in lipid composition and isoproterenol- and ethanol-stimulated adenylate cyclase activity in aging Fischer rat bladders. *J Pharmacol Exp Ther*, 1990, 254: 277-284.

• 病例报告 •

辛伐他汀致横纹肌溶解症 1 例报告

孔凡龙 樊启光 吴平 李智元 龚蕾 陈洋

患者,女性,76岁,工人,住院号:61349。主因“间断胸闷8年,持续心前区疼痛1d”于2003年9月25日于我院急诊就诊,心电图示 V_{1-6} ST段弓背向上抬高,最高可达10 mv (V_3 、 V_4), V_{3R} - V_{5R} QS型。肌酸激酶(CK):1073 U/L(正常值25~170 U/L),肌钙蛋白T(TnT):0.63 ng/ml(正常值: <0.05 ng/ml)。患者既往高血压病史30余年,血压最高可达200/110 mmHg。糖尿病史10余年。慢支、肺气肿病史近10年。脑梗死病史9年,遗留右侧肢体活动不利。以“急性广泛前壁心肌梗死、冠心病、心功能Ⅲ级、高血压3级(极高危组)、2型糖尿病、慢性喘息性支气管炎急性发作、慢性阻塞性肺气肿、脑梗死后遗症”收入院。入院后心电图示:I、aVL、 V_{1-3} ST段弓背向上抬高,最高达7 mv (V_3),遂予尿激酶1500000 U溶栓治疗,溶栓后2 h心电图示 V_{1-5} ST段回落, V_3 ST段下降近50%,胸痛基本缓解,CKMB于14 h达峰值,考虑溶栓部分再通。10月8日患者CK、CKMB恢复正常,肝肾功能正常,乙肝5项正常。遂行冠状动脉造影术。结果示:冠脉供血右优势,LAD近端 D_1 发出处可见90%节段性狭窄,LCX_前可见70%节段性狭窄,LCX_后可见60%节段性狭窄,RCA_前可见80%局限性狭窄,前向血流均TIMI 3级。术中患者心电图突然示Ⅲ导ST段弓背向上抬高,并出现急性左心功能不全,遂行主动球囊反搏术(IABP)治疗并转入同仁医院重症监护室,当日开始予以硝酸甘油、多巴酚酞胺、利普定、呋塞米、辛伐他汀(舒降之)40 mg 每晚1次治疗,仍多次出现左心衰,持续IABP治疗,病情平稳后,行UCG示:EF 25%,室壁瘤形成(下壁、心尖)。因心功能极差,无法行冠状动脉搭桥术,于10月

21日转回我院继续内科保守治疗。转回后示心电图示 V_{1-2} QS型 V_3 rS型 V_{1-3} ST段成弓背型,但无抬高,I、aVL、 V_{2-5} T波倒置, V_6 T波低平,遂予爱倍、多巴酚酞胺静点、阿司匹林肠溶片、硝酸异山梨酯、蒙诺、倍他乐克、双氢克尿塞、安体舒通口服,并继续辛伐他汀(舒降之,杭州默沙东制药有限公司,批号:p1020)40 mg 每晚1次口服,低分子肝素钙腹壁皮下注射及保守治疗,多次行心电图较前无改变,IABP应用20余天后顺利拔除,后病情平稳,CK正常,11月3日(服用辛伐他汀26 d)患者诉乏力,双下肢疼痛,予对症处理,11月3日CK正常,11月10日(服用辛伐他汀33 d)CK突然升高至1780 U/L, TnT <0.05 ng/ml,心电图无变化,未诉胸痛,不支持再次心梗诊断,考虑不除外口服辛伐他汀致横纹肌溶解,致CK升高,故停用辛伐他汀,2 d后患者CK:6918 U/L,但心电图及TnT无动态变化,11月13日CK达最高12089 U/L,并出现茶色尿,行尿常规RBC:3~5个/HP,尿蛋白(+),肝转氨酶示ALT:170 U/L(正常值5~40 U/L)、AST:285 U/L(正常值3~40 U/L),肾功能示BUN:9.75 mmol/L(正常值2.86~8.20 mmol/L)、Cr:110.00 μ mol/L(正常值44.00~133.00 μ mol/L)考虑若为横纹肌溶解症,则有可能引起肝肾损害,遂予谷光甘肽1200 mg 每天静点保护肝肾,复查心电图示CK逐渐下降,尿色逐渐恢复正常,11月21日心电图示CK:291 U/L,于当日行左股直肌活检并送病理,病理回报:“镜下未见明显异常。”此病理结果考虑与取活检时已处于疾病恢复期且病变可逆有关。此后患者生命体征平稳,心电图示、TnT正常,尿常规、肝肾功能正常,并于12月16日痊愈出院。

该病例提示当服用辛伐他汀出现肌痛、CK明显升高、肝肾功能损伤、尿色改变(非血尿)时,要注意发生横纹肌溶解症的可能,应及时停药并及取活检明确诊断。

收稿日期:2004-04-08

作者单位:100013 北京市,北京市和平里医院重症监护病房

作者简介:孔凡龙,男,1948年2月生,辽宁省大连市人,主任医师,科主任

通讯作者:孔凡龙, Tel:010-64215431-519