

# 抑制 c-Kit 和 Cx43 对膀胱收缩功能的影响及其作用机制的研究

谭明辉, 欧阳松, 钱 彪, 郝 雨, 轩留明, 孙 鹏, 张永强, 王勤章

**摘要** 目的 通过抑制膀胱 Cajal 间质细胞( ICCs) 上的缝隙连接蛋白 43( Cx43) 与酪氨酸激酶受体蛋白( c-Kit) 探究对膀胱收缩功能的影响。方法 80 只雄性豚鼠随机分为空白对照组、Glivec( c-Kit 抑制剂) 组、Gap27 ( Cx43 抑制剂) 组和 Glivec + Gap27 组。4 组于每日上午灌注生理盐水、Glivec、Gap 27、Glivec + Gap 27 持续灌注 2 个月。于灌注 2 个月后行尿流动力学检测造模是否成功, 收取新鲜膀胱组织, 行体外肌条实验检测各组的肌肉收缩功能; 免疫荧光检测 c-Kit 与 Cx43 在 ICCs 细胞上的表达; qRT-PCR 和 Western blot 法检测膀胱组织中 c-Kit 与 Cx43 的表达; 电镜观察膀胱平滑肌超微结构变化。结果 尿动力学显示实验组较空白对照组膀胱顺应性增加(  $P < 0.05$ ); Glivec + Gap27 组膀胱顺应性比 Glivec 组和 Gap27 组增加(  $P < 0.01$ )。体外肌条实验显示实验组的膀胱肌条收缩频率和张力较空白对照组降低(  $P < 0.05$ ) 实验组给予乙酰胆碱( ACh) 后与对照组相比肌条收缩减弱(  $P < 0.05$ )。免疫荧光显示 c-Kit 与 Cx43 在 ICCs 细胞上共表达。qRT-PCR 和 Western blot 提示抑制 c-Kit 后, 膀胱组织中的 Cx43 蛋白表达水平、基因表达水平低于空白对照组(  $P < 0.05$ ); 抑制 Cx43 后, 膀胱组织中的 c-Kit 蛋白表达水平、基因表达水平低于空白对照组(  $P < 0.05$ )。电镜显示同时抑制 c-Kit 与 Cx43 后膀胱平滑肌线粒体结构破坏。结论 Cx43 在膀胱 ICCs 上表达, 二者可能共同参与调控膀胱收缩功能。Cx43 和 c-Kit 的降低可能破坏了膀胱平滑肌的线粒体, 影响其功能, 进而影响膀胱收缩功能。

**关键词** 逼尿肌活动低下; Cajal 间质细胞; 缝隙连接蛋白 43; 超微结构; 豚鼠

中图分类号 R 694.5

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2022)12-1941-07

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.12.016

逼尿肌活动低下( detrusor underactivity, DU) 是引起排尿功能障碍的常见原因之一, 临床上引起 DU 的病因常见于糖尿病、高龄等, 但具体的机制尚

不明确<sup>[1]</sup>。有研究<sup>[2]</sup>表明膀胱组织中存在 ICCs, ICCs 作为膀胱逼尿肌的起搏细胞, 参与了膀胱逼尿肌的收缩活动。膀胱 ICCs 的细胞膜表面存在一种特异性标志物, 为跨膜酪氨酸激酶受体蛋白( c-Kit 蛋白)。研究<sup>[3]</sup>表明 c-Kit 参与控制 ICCs 细胞的存活、增殖和分化。缝隙连接是相邻细胞间的跨膜通道, 具有细胞间通讯功能( gap junction intercellular communication, GJIC), 能促进细胞与细胞间信息和能量物质的交换<sup>[4]</sup>, 而缝隙连接蛋白 43( connexin 43, Cx43) 是研究最多、表达最普遍的连接蛋白亚型之一<sup>[5]</sup>。在提供电通信的途径中, 缝隙连接是神经元、心肌细胞和平滑肌细胞等可兴奋细胞功能的基础<sup>[6]</sup>。逼尿肌中 ICCs 之间以及 ICCs 和平滑肌细胞之间通过缝隙连接促进慢波信号传播, 进而促进肌肉收缩<sup>[7]</sup>。

糖尿病膀胱病变( diabetic cystopathy, DCP) 是糖尿病常见并发症之一, 有研究<sup>[8]</sup>表明 DCP 中 c-Kit 表达下降, Cx43 表达也降低, 且单独上调 c-Kit 对膀胱功能改变不明显。而在电镜下显示 DCP 的平滑肌细胞出现线粒体结构破坏<sup>[9]</sup>。这一改变可能是由 ICCs 与 Cx43 导致的, 该研究通过经豚鼠尿道膀胱灌注 Cx43 特异性抑制剂 Gap27 和 c-Kit 的特异性抑制剂 Glivec, 初步探讨抑制 Cx43 与 c-Kit 对膀胱收缩的影响及其机制, 旨在为后续 DCP 膀胱治疗提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物与分组** 该研究使用 3 月龄荷兰种的普通级雄性豚鼠 80 只, 体质量 350 ~ 450 g, 购自新疆医科大学动物实验中心。豚鼠由石河子大学动物实验中心的生活馆中管理, 自由进食和饮水。豚鼠被随机分配到 4 组: 空白对照组、Glivec 组、Gap27 组、Glivec + Gap27 组, 每组各 20 只。该研究经石河子大学医学院第一附属医院动物伦理委员会审核通过( A2019-167-01)。

**1.1.2 主要试剂** 甲磺酸伊马替尼( 美国 ApexBio

2022-08-09 接收

基金项目: 国家自然科学基金( 编号: 81960147)

作者单位: 石河子大学第一附属医院泌尿外科, 石河子 832000

作者简介: 谭明辉 男, 硕士研究生;

王勤章 男, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: wqz1969@sina.com

公司 ,A1805) ,Gap27( 美国 ApexBio 公司 ,A1045) , c-Kit 一抗( 美国 NOVU 公司 ,SNBP1-43359) ,Cx43 一抗( 美国 Abcam 公司 ,ab235585) ,FITC 标记抗小鼠和 TRITC 标记抗兔免疫荧光染色二抗( 北京中杉金桥生物技术有限公司 ,PV-9000) ,浓缩型 DAB 试剂盒( 北京索莱宝科技有限公司 ,DA1010) ,HRP 标记的抗小鼠二抗( 北京中杉金桥生物技术有限公司 ZF0312) ,HRP 标记的抗兔二抗( 北京中杉金桥生物技术有限公司 ZB2305) 。

## 1.2 方法

**1.2.1 经尿道膀胱灌注** 药物将 4 组豚鼠禁食水 12 h ,改良硬脊膜外导管 ,用于豚鼠导尿。七氟醚吸入麻醉后 ,豚鼠四肢固定 ,暴露阴茎。用碘伏消毒后 ,插入导尿管 8 ~ 10 cm 后 ,用注射器反复抽吸 0.4 ml 生理盐水进行膀胱冲洗。4 组豚鼠分别于每日上午灌注 Glivec(  $4 \times 10^{-6}$  mol/L) 、Gap 27(  $26 \times 10^{-6}$  mol/L) 、Glivec + Gap 27 以及对照组灌注生理盐水 ,持续灌注 2 个月 ,每次灌注 800  $\mu$ l ,灌注完拔出导尿管后 ,待豚鼠苏醒后回笼继续饲养。

**1.2.2 尿动力学检测膀胱功能** 吸入麻醉成功后仰卧位固定 ,下腹部剃毛后碘伏消毒 ,行正中切口 ,分离暴露膀胱。2 个 4 号留置针自膀胱顶部穿刺进入膀胱 ,一个留置针连接微量灌注泵 ,另一个留置针与压力换能感受器相连。记录每个模型 5 个排尿周期的膀胱残余尿量、最大膀胱压力、最大膀胱容量及膀胱顺应性 ,观察灌药后豚鼠膀胱收缩功能变化。

**1.2.3 逼尿肌肌条实验** 取豚鼠下腹部正中切口 ,快速取出膀胱后置于克 - 亨氏液中漂洗干净 ,并持续供给 97% O<sub>2</sub>、3% CO<sub>2</sub> 混合气体 ,取膀胱 6 mm  $\times$  3 mm 肌条。膀胱肌条的两端以 1 号丝线固定 ,丝线与张力换能器相连 ,调节微螺旋 ,给张力换能器 1 g 的负荷。观察 15 min 后 ,记录各组正常条件下自发的收缩频率和张力变化 ,再滴加乙酰胆碱( ACH) 后观察 15 min ,记录各组膀胱肌条的收缩频率及张力变化 ,比较各组膀胱收缩功能的变化。

**1.2.4 免疫荧光实验** 膀胱组织行冰冻切片后 ,丙酮固定 10 min ,37  $^{\circ}$ C 下用含 3% Triton X-100 的 PBS 透化 15 min。牛血清白蛋白封闭 1 h ,滴加抗 c-Kit 一抗( 1 : 50) 与抗 Cx43 一抗( 1 : 100) 于 4  $^{\circ}$ C 下过夜。将样品洗涤后滴加各自荧光染色二抗( 1 : 500) 。在室温下孵育 2 h ,DAPI 行细胞核染色 ,抗荧光淬灭封片液封片 ,倒置显微镜下观察。

**1.2.5 qRT-PCR 实验** 使用 TRIzol 提取膀胱组织的总 RNA ,测量 RNA 浓度后 ,根据 RT primer Mix

( MCE 美国新泽西州) 的协议 ,将总 RNA 逆转录为 cDNA。qRT-PCR 扩增程序是在 ABI7500 实时 PCR 系统中进行。按说明书依次加入 SYBR Green qPCR Master Mix、上游引物、下游引物、cDNA 和无酶水( 引物设计见表 1) 。每个样品定量检测生物学重复 3 次。

表 1 用于定量实时聚合酶链反应的引物序列

基因名称	引物序列( 5' - 3' )
Cx43	F: TACTTCAAGGCTGCTCCTC R: GGTTCGTGCTCCGCACTGTAG
c-Kit	F: CCAATTATCCCCTCA R: GGGTTCATCTTTAGCCAC
GAPDH	F: ACCACAGTCCATGCTAC R: TCCACCACCCTGTTGCTGTA

**1.2.6 Western blot 实验** 将豚鼠膀胱组织 ,裂解为缓冲液 ,测相应蛋白浓度后 ,电泳后通过电转将蛋白质转移到 PVDF 膜上。脱脂牛奶封闭 2 h ,4  $^{\circ}$ C 条件下滴加抗 c-Kit( 1 : 1 000) 与抗 Cx43( 1 : 1 000) 一抗。将膜与 c-Kit 二抗( 1 : 5 000) 和 Cx43 二抗( 1 : 5 000) 室温孵育 2 h , $\beta$ -actin 被用作蛋白质表达的内部对照。显色曝光后晾干并扫描胶片。并且通过 Image J 4.2.0 软件分析蛋白相对表达水平。

**1.2.7 电子显微镜观察** 膀胱组织置于 3% 戊二醛的玻片上 ,裁剪大小为 2 ~ 3 mm 的组织块 ;置于 3% 戊二醛固定液中持续固定 48 h。将固定后的组织块于 0.1% 锇酸中固定 2 h 后移至 1% 的醋酸铀内 ;组织块脱水后浸泡在丙酮、中性树脂( 1 : 4) 的混合液中 ;将组织标本修块、定位后在超薄切片机上切割制作 100 nm 的超薄组织切片 ,行双重电子染色 ,后于透射电镜下进行观察 ,不同放大倍率观察并进行拍片。

**1.3 统计学处理** 该研究所得结果均来自 3 次以上独立实验 ,进行正态检验和方差齐性检验后 ,符合正态分布的计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示 ,采 SPSS 26.0 和 GraphPad Prism 9.0 软件进行统计学分析 ,组间采用单因素方差分析及其两两比较的 LSD 法 , $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 尿动力学检测结果** Glivec + Gap27 组、Glivec 组和 Gap27 组与空白对照组相比 ,结果显示 ,豚鼠最大膀胱容量、膀胱顺应性及残余尿量明显增加(  $P < 0.05$ ) ;最大膀胱压力降低(  $P < 0.05$ ) 。Glivec + Gap27 组的豚鼠最大膀胱容量、膀胱顺应性及残余

尿量比 Glivec 组和 Gap27 组增加 ( $P < 0.01$ )；最大膀胱压力比 Glivec 组和 Gap27 组降低 ( $P < 0.01$ )。Glivec 组和 Gap27 组之间上述指标比较差异均无统计学意义。见表 2。

**2.2 体外肌条实验观察膀胱的收缩变化** Glivec 组、Gap27 组及 Glivec + Gap27 组的正常收缩频率和收缩张力较空白对照组降低, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )；Glivec + Gap27 组的正常收缩频率较 Glivec 组、Gap27 组降低, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。各组给予 ACH 后, Glivec 组、Gap27 组及 Glivec + Gap27 组的收缩频率和收缩张力较空白对照组弱, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )；Glivec + Gap27 组的收缩频率和张力较 Glivec 组、Gap27 组弱, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。给予 ACH 后 Glivec 组呈现强直收缩, 收缩节律较差；Gap27 组收缩缓慢, Glivec + Gap27 组收缩不明显。见图 1。

**2.3 c-Kit 和 Cx43 免疫荧光染色** 免疫荧光结果提示 ICCs 细胞上 c-Kit 与 Cx43 共同表达, 由于组织切片角度原因, 细胞核显示大小不等。Glivec 组、Gap27 组及 Glivec + Gap27 组的 Cx43 与 c-Kit 的荧光强度较空白对照组减弱(图 2)。

**2.4 c-Kit mRNA 和 Cx43 mRNA 的表达** Gap27 组抑制 Cx43 后膀胱组织中 c-Kit mRNA 的表达水平低于空白对照组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )；Glivec + Gap27 组膀胱组织中 c-Kit mRNA 的表达水平低于空白对照组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.001$ )。Glivec 组抑制 c-Kit 后膀胱组织中的 Cx43 mRNA 的表达水平低于空白对照组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )；Glivec + Gap27 组膀胱组织中 Cx43 mRNA 的表达水平低于与空白对照组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.001$ )。见图 3。

**2.5 Western blot 法检测各组 c-Kit 及 Cx43 的蛋白表达** Gap27 组抑制 Cx43 后膀胱组织中 c-Kit 蛋白的表达水平低于空白对照组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。Glivec + Gap27 组膀胱组织中 c-Kit 蛋白的表达水平低于空白对照组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.001$ )。Glivec 组抑制 c-Kit 后膀胱组织中 Cx43 蛋白的表达水平低于空白对照组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )；Glivec + Gap27 组膀胱组织中 Cx43 蛋白的表达水平低于空白对照组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。见图 4。

**2.6 膀胱平滑肌细胞的超微结构改变** Glivec +

表 2 4 组尿动力学参数的比较 ( $n = 20 \bar{x} \pm s$ )

组别	最大膀胱容量 (ml)	最大膀胱力 (kPa)	膀胱顺应性 (ml/kPa)	残余尿 (ml)
空白对照	1.70 ± 0.06	1.50 ± 1.18	0.12 ± 0.04	0.07 ± 0.06
Glivec	1.89 ± 0.10 <sup>**△△</sup>	0.99 ± 0.62 <sup>**△△</sup>	0.18 ± 0.05 <sup>**△△</sup>	0.14 ± 0.07 <sup>**△△</sup>
Gap27	1.85 ± 0.13 <sup>**△△</sup>	0.96 ± 0.69 <sup>**△△</sup>	0.17 ± 0.07 <sup>**△△</sup>	0.12 ± 0.07 <sup>△△</sup>
Glivec + Gap27	2.49 ± 0.06 <sup>**</sup>	0.70 ± 0.41 <sup>**</sup>	0.49 ± 0.08 <sup>**</sup>	0.65 ± 0.14 <sup>**</sup>
F 值	260.85	354.42	124.22	173.57

与空白对照组比较: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ; 与 Glivec + Gap27 组比较: △△  $P < 0.01$

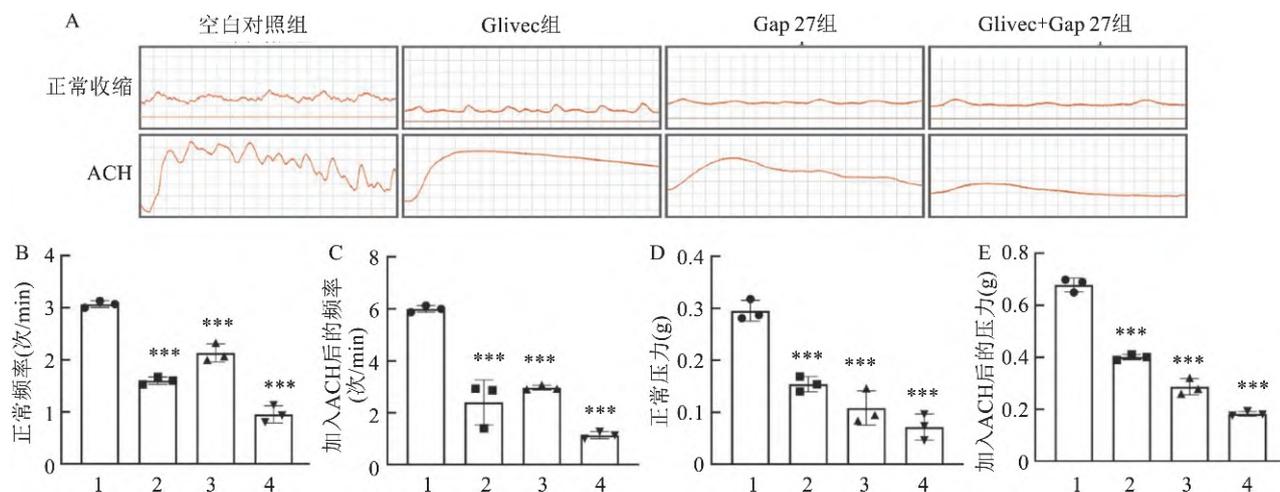


图 1 各组肌条实验结果

A: 正常收缩和加入 ACH 后各组膀胱收缩的变化; B、C: 各组在正常情况和加入 ACH 后的收缩频率的定量; D、E: 各组在正常情况和加入 ACH 后的收缩张力的定量; 1: 空白对照组; 2: Glivec 组; 3: Gap27 组; 4: Glivec + Gap27 组; 与空白对照组比较: \*\*\*  $P < 0.001$

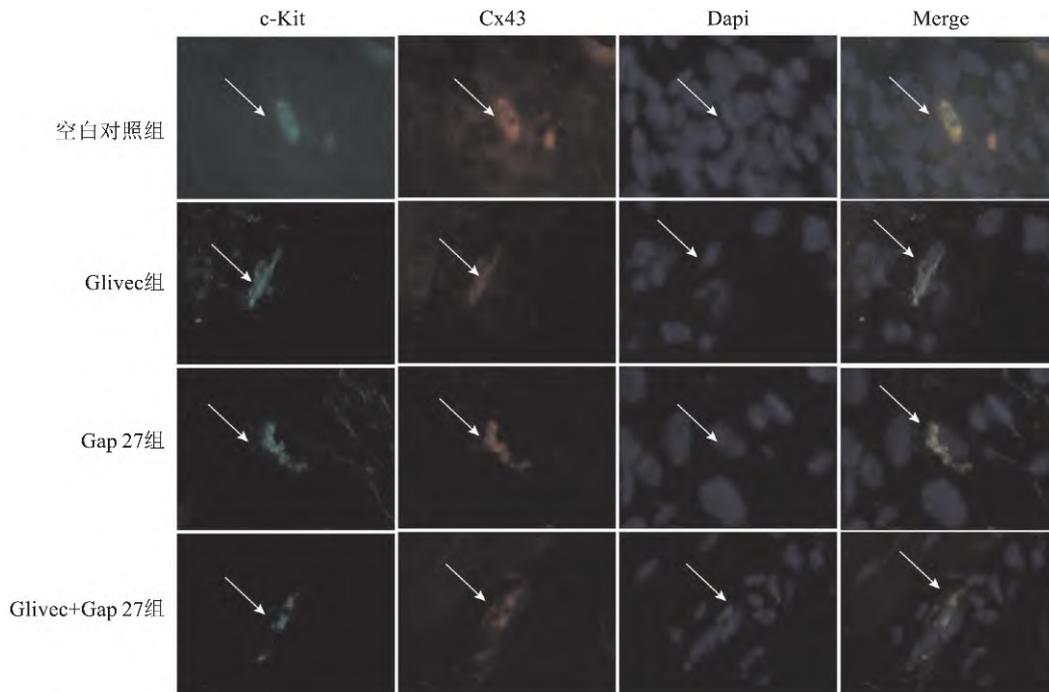


图2 免疫荧光显示膀胱组织中 Cx43 和 c-Kit 的表达 ×400  
 绿色: c-Kit 阳性的 ICCs 细胞; 红色: Cx43 阳性; 蓝色: Dapi 细胞核阳性

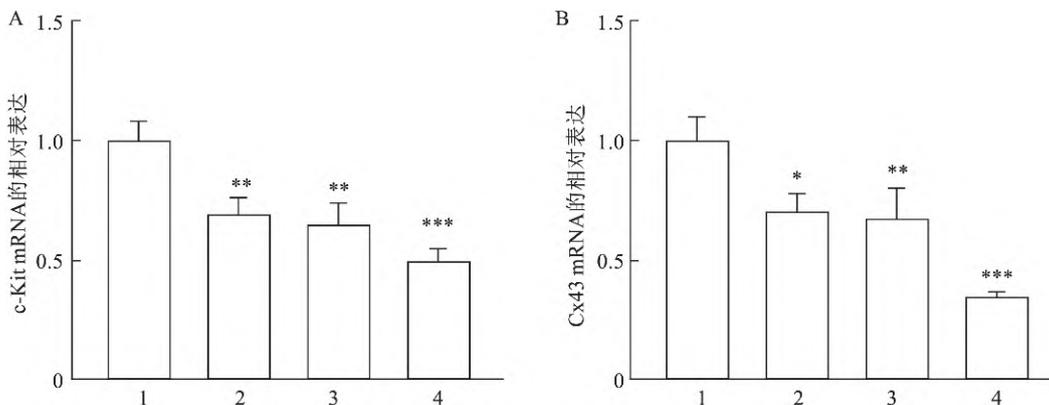


图3 豚鼠膀胱组织中 c-Kit 和 Cx43 的 mRNA 表达水平

A: 各组 c-Kit mRNA 的相对表达; B: 膀胱灌注药物后各组 Cx43 mRNA 的相对表达; 1: 空白对照组; 2: Glivec 组; 3: Gap27 组; 4: Glivec + Gap27 组; 与空白对照组比较: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$

Gap27 组同时抑制 c-Kit 与 Cx43 后膀胱肌层的平滑肌细胞中线粒体结构破坏,线粒体嵴消失,内外膜破坏,线粒体形态改变,呈空泡样。单独的 Glivec 组和 Gap27 组平滑肌细胞的线粒体较正常组变化不明显。见图 5。

### 3 讨论

膀胱 ICCs 细胞是类似胃肠道 Cajal 间质细胞的起搏器细胞,参与了膀胱逼尿肌的收缩<sup>[10]</sup>。电镜下

观察到了 ICCs 与平滑肌和神经通过缝隙链接有着密切的联系<sup>[11]</sup>。研究<sup>[12]</sup>表明膀胱可能存在一个以 ICCs 为功能单位的细胞网络控制着膀胱收缩。ICCs 和平滑肌细胞的信号传递过程中,表达多种缝隙链接蛋白<sup>[13]</sup>,Cx43 在其中可能扮演重要角色,但对于 ICCs 与 Cx43 在膀胱收缩中的研究较少。Cx43 的抑制剂 Gap27 能阻断缝隙链接功能,被设计用来阻断缝隙链接的功能。Glivec 是干细胞因子受体 c-Kit 的抑制剂。

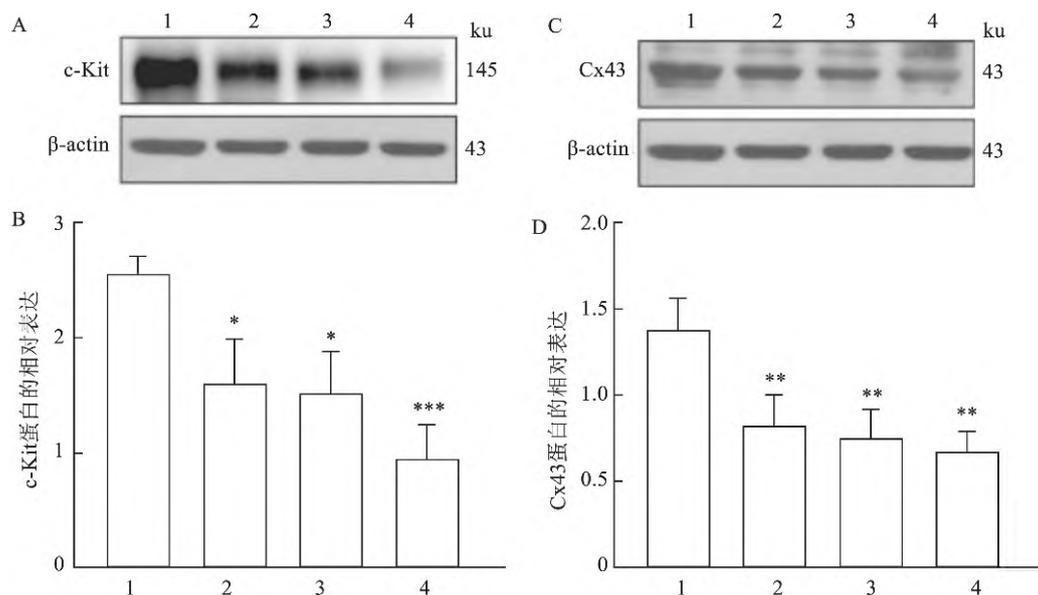
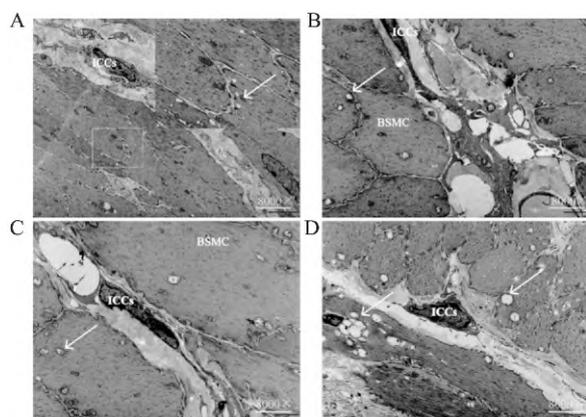


图4 豚鼠膀胱组织中 c-Kit 和 Cx43 的蛋白表达

A、B: 膀胱灌注药物后各组 c-Kit 蛋白的相对表达; C、D: 膀胱灌注药物后各组 Cx43 蛋白的相对表达; 1: 空白对照组; 2: Glivec 组; 3: Gap27 组; 4: Glivec + Gap27 组; 与空白对照组比较: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$

图5 各组膀胱肌层超微结构变化  $\times 8000$ 

A ~ D: 空白对照组、Glivec 组、Gap27 组、Glivec + Gap27 组膀胱肌层超微结构; BSMC: 膀胱平滑肌细胞; ICCs: 膀胱 Cajal 间质细胞; 箭头: 线粒体改变

该研究经尿道膀胱灌注 Glivec 和 Gap27 2 个月, 通过尿动力学研究表明实验组与空白对照组相比, 豚鼠的最大膀胱容量、膀胱顺应性及残余尿量明显增加, 最大膀胱压力降低。模型成功后, 体外通过肌条实验显示, 通过药物抑制 c-Kit 与 Cx43 后, 导致膀胱肌条的收缩频率及张力降低。在肌条实验中加入 ACh 后, 3 组实验组与空白对照相比, 实验组的频率和张力都回升不明显, Glivec 组、Gap27 组收缩频率和张力降低, Glivec + Gap27 组和正常组之间的差异更为明显。这一结果的原因可能是 ICCs 的起

搏功能与 Cx43 的信息物质交换功能减弱后, 促进膀胱平滑肌收缩的慢波传导受阻, 平滑肌收缩受限, 使得膀胱收缩减弱。在新生儿自发性胃穿孔<sup>[14]</sup>、先天性巨结肠<sup>[15]</sup>的研究中表明 Cx43 后 c-Kit 表达同时降低。但 Cx43 和 c-Kit 降低如何导致膀胱收缩下降并未见相关报道, 免疫荧光观察显示 Cx43 和 c-Kit 在 ICCs 细胞上表达, 二者可能存在相互影响的可能性。qRT-PCR 和 Western blot 显示抑制 c-Kit 后, 膀胱组织中的 Cx43 蛋白表达水平、基因表达水平低于空白对照组; 抑制 Cx43 后, 膀胱组织中的 c-Kit 蛋白表达水平、基因表达水平低于空白对照组。抑制 c-Kit 后 ICCs 功能受损, 在 ICCs 上表达的 Cx43 可能也受到影响, 导致物质交换和慢波传导受阻, 进而影响膀胱收缩功能。抑制膀胱 Cx43 后, 信息和能量物质交换受阻, 可能影响了 c-Kit 信号的持续表达, 使 ICCs 起搏功能受损, 进而影响了膀胱收缩功能。前期电镜显示 DCP 的 Cx43 和 c-Kit 降低的同时膀胱平滑肌细胞出现线粒体破坏<sup>[9]</sup>。该实验电镜结果显示同时抑制 Cx43 和 c-Kit 后膀胱肌层的平滑肌细胞中出现线粒体结构破坏。有理由进一步推测 DCP 收缩功能减弱, 可能与 Cx43 和 ICCs 的改变导致平滑肌功能受损有关。该实验的创新性在于经尿道灌注 Glivec 和 Gap27, 初步探讨了 c-Kit 和 Cx43 在被抑制后, 可能导致了膀胱平滑肌超微结构的改变, 进而导致膀胱收缩减弱。该实验也有一定局限

性 实验分组只给予了抑制剂组 因为二者在膀胱收缩中的前期研究缺乏,此次实验的目的也是为后续同时上调 c-Kit 和 Cx43 是否能改善 DCP 功能提供理论指导。

综上所述,c-Kit 与 Cx43 在 ICCs 上共表达,抑制 c-Kit 后 ICCs 功能受损,可能影响了 Cx43 的表达,导致物质交换受阻,进而影响膀胱收缩功能。抑制膀胱 Cx43 后信息和能量物质交换受阻,可能影响了 c-Kit 信号的持续表达,使 ICCs 起搏功能受损,进而影响了膀胱收缩功能。c-Kit 与 Cx43 的同时抑制加剧了 ICCs 起搏功能受损和 Cx43 的信息物质交换受阻,可能导致膀胱平滑肌的线粒体结构功能破坏,影响膀胱平滑肌功能致膀胱的收缩功能下降。

### 参考文献

- [1] Smith P P, Birder L A, Abrams P, et al. Detrusor underactivity and the underactive bladder: symptoms, function, cause-what do we mean? ICI-RS think tank 2014 [J]. *Neurourol Urodyn*, 2016, 35(2): 312-7.
- [2] Cunningham R M, Larkin P, McCloskey K D. Ultrastructural properties of interstitial cells of Cajal in the Guinea pig bladder [J]. *J Urol*, 2011, 185(3): 1123-31.
- [3] Pasternak A, Szura M, Gil K, et al. Interstitial cells of Cajal - systematic review [J]. *Folia Morphol (Warsz)*, 2016, 75(3): 281-6.
- [4] Su V, Lau A F. Connexins: mechanisms regulating protein levels and intercellular communication [J]. *FEBS Lett*, 2014, 588(8): 1212-20.
- [5] Rodriguez-Sinovas A, Sanchez J A, Valls-Lacalle L, et al. Connexins in the heart: regulation, function and involvement in cardiac disease [J]. *Int J Mol Sci* 2021 23; 22(9): 4413.
- [6] Stephan J, Eitelmann S, Zhou M. Approaches to study gap junctional coupling [J]. *Front Cell Neurosci* 2021, 15: 640406.
- [7] Kuhn A, Stadlmayr W, Monga A, et al. A pilot study of Connexin 43 (Cx43) in human bladder tissue in patients with idiopathic detrusor overactivity [J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2008, 141(1): 83-6.
- [8] Li C, Qian B, Ni Z, et al. Construction of recombinant lentiviral vector containing human stem cell leukemia gene and its expression in interstitial cells of cajal [J]. *Open Life Sciences*, 2020, 15(1): 83-91.
- [9] Yang K, Wang Q. 50 week ultrasound imaging and ultrastructural abnormalities of bladder after sugar diuresis and diabetes mellitus in rats [J]. *Int Urol Nephrol*, 2021, 53(10): 1995-2005.
- [10] Mah S A, Avei R, Cheng L K, et al. Current applications of mathematical models of the interstitial cells of Cajal in the gastrointestinal tract [J]. *WIREs Mech Dis* 2021, 13(2): e1507.
- [11] Shen M, Qian B, Xu H, et al. Effect of recombinant lentivirus of SCL gene on expression of c-kit protein in interstitial cells of Cajal under high glucose condition [J]. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2019, 44(2): 117-21.
- [12] Davidson R A, McCloskey K D. Morphology and localization of interstitial cells in the guinea pig bladder: structural relationships with smooth muscle and neurons [J]. *J Urol*, 2005, 173(4): 1385-90.
- [13] Seki K, Komuro T. Immunocytochemical demonstration of the gap junction proteins connexin 43 and connexin 45 in the musculature of the rat small intestine [J]. *Cell Tissue Res*, 2001, 306(3): 417-22.
- [14] 夏丽娜, 王志强, 王宗敏, 等. C-kit 和 Cx43 在新生儿自发性胃穿孔中的表达 [J]. *中国当代儿科杂志* 2011, 13(10): 787-9.
- [15] 禹振华. NSE、C-kit、Cx43 在慢传输型便秘合并成人巨结肠中的表达及临床意义 [D]. 长沙: 湖南师范大学 2016.

## Study of the effect of inhibition of c-Kit and Cx43 on bladder contractile function and its mechanism of action

Tan Minghui, Ouyang Song, Qian Biao, Hao Yu, Xuan Liuming, Sun Peng, Zhang Yongqiang, Wang Qinzhang  
(Dept of Urology, The First Affiliated Hospital of Shihezi University, Shihezi 832000)

**Abstract Objective** To investigation of the interaction between interstitial cells of Cajal (ICCs) and connexin 43 (Cx43) in bladder contraction and its significance. **Methods** Eighty male guinea pigs were randomly divided into blank control group, Glivec group, Gap27 group and Glivec + Gap27 group. Four groups of guinea pigs were perfused with saline, Glivec, Gap 27, and Glivec + Gap 27 every morning for 2 months. Success of urodynamic testing model after 2 months. Bladder tissue was collected for an *in vitro* muscle strip test to detect muscle contraction in each group. Correlation between c-Kit and Cx43 was detected by immunofluorescence. The interaction between c-Kit and Cx43 in the bladder was further validated by qRT-PCR and Western blot. Ultrastructural changes in the muscle layer of the bladder were observed by electron microscopy. **Results** Urodynamics revealed increased bladder compliance in the experimental group compared to the blank control group ( $P < 0.05$ ); bladder compliance

网络出版时间: 2022-11-29 09:44 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20221128.1716.017.html>

## 妊娠期慢性应激致子代小鼠杏仁核神经元损伤和抑郁样行为

刘锐<sup>1</sup>, 屠心茹<sup>1</sup>, 陶龙<sup>1</sup>, 徐家雯<sup>1</sup>, 江瑞<sup>1</sup>, 姚余有<sup>1,2</sup>

**摘要** 目的 探究妊娠期慢性应激对仔鼠青春期抑郁样行为影响的性别差异,以及杏仁核是否参与介导仔鼠抑郁样行为及其可能机制。方法 采用 C57BL/6J 小鼠,雌雄合笼,将孕鼠随机分为正常对照(CON)组和妊娠期慢性应激(CPS)组,孕鼠分娩当天为产后第0天(PND0),将CON组和CPS组的仔鼠进一步分成雌性(Female)组、雄性(Male)组。在PND35,开始测试仔鼠抑郁样行为, Golgi-Cox 染色观察基底外侧杏仁核(BLA)锥体神经元形态, TUNEL 检测 BLA 神经元凋亡情况, ELISA 检测仔鼠血清促肾上腺皮质激素释放激素(CRH)含量, Western blot 技术检测杏仁核哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)和磷酸化 mTOR [p-mTOR(Ser2448)] 表达水平。结果 妊娠期慢性应激导致仔鼠出现抑郁样行为,其与性别间存在交互作用。在强迫游泳实验中, CPS 组子代雌鼠、雄鼠的不动时间均增加( $P < 0.05$ ,  $P < 0.001$ ),且雄鼠较雌鼠表现出更为严重的绝望行为( $P < 0.05$ ),糖水偏好测试中,相较于CON组, CPS 组的子代雌鼠糖水偏好率降低

( $P < 0.05$ ),子代雄鼠也有下降的趋势,但差异无统计学意义。相较于CON组, CPS 组的雌性和雄性仔鼠 BLA 区域的神经元树突分支密度降低( $P < 0.01$ )、神经元凋亡程度增加( $P < 0.001$ ), CPS 组的雌雄仔鼠的杏仁核 p-mTOR 表达水平均显著降低( $P < 0.001$ )。妊娠期慢性应激导致仔鼠血清 CRH 含量升高( $P < 0.001$ ),且 CPS 组雌性仔鼠的血清 CRH 水平高于雄性仔鼠( $P < 0.05$ )。结论 妊娠期慢性应激导致子代青春期小鼠出现抑郁样行为并存在性别差异,且妊娠期慢性应激导致仔鼠 BLA 神经元的树突萎缩和凋亡,其作用机制可能是仔鼠杏仁核 m-TOR 的激活受到抑制, CRH 可能参与介导妊娠期慢性应激致仔鼠抑郁样行为的性别差异和 BLA 神经元损伤。

**关键词** 妊娠期慢性应激; 青春期抑郁; 杏仁核; 性别差异; p-mTOR; CRH

中图分类号 R 749.4

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2022)12-1947-07  
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.12.017

2022-08-21 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81773452)

作者单位: <sup>1</sup>安徽医科大学公共卫生学院卫生检验与检疫学系, 合肥 230032

<sup>2</sup>人口健康与优生安徽省重点实验室, 合肥 230032

作者简介: 刘锐, 男, 硕士研究生;

姚余有, 男, 副教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: yaoan-q71@aliyun.com

青少年抑郁具有高复发率和高自杀率, 现已成为严重的全球公共卫生问题<sup>[1]</sup>。产前应激会影响胎儿的神经发育, 儿童在出生后患有抑郁等精神障碍的风险增加<sup>[2]</sup>。研究<sup>[3]</sup>表明, 抑郁的发生与杏仁核、海马等的神经元结构和功能异常有关, 课题组前期研究<sup>[4]</sup>表明, 妊娠期慢性应激诱导子代雄鼠抑郁

increased in the Glivec + Gap27 group compared to the Glivec and Gap27 groups ( $P < 0.01$ ). *In vitro* muscle strip experiments revealed that the frequency and tone of bladder muscle strip contractions were lower in the experimental group compared to the blank control group ( $P < 0.05$ ), and that muscle strip contractions were weaker in the experimental group after administration of acetylcholine (ACH) compared to the control group ( $P < 0.05$ ). Immunofluorescence showed that c-Kit was co-expressed with Cx43 on ICCs cells. qRT-PCR and Western blot suggested that the protein expression level and gene expression level of Cx43 in bladder tissues were lower after inhibition of c-Kit than in the blank control ( $P < 0.05$ ); after inhibition of Cx43, the protein expression level and gene expression level of c-Kit in bladder tissues the levels of c-Kit protein expression and gene expression in bladder tissues were lower than those in the blank control group ( $P < 0.05$ ). Electron microscopy revealed that the mitochondrial structure of bladder smooth muscle was disrupted after simultaneous inhibition of c-Kit and Cx43. **Conclusion** Cx43 is expressed on bladder ICCs and the two may be jointly involved in regulating bladder contractile function; the joint reduction of Cx43 and c-Kit may have disrupted the mitochondria of bladder smooth muscle, affecting its function and consequently bladder contractile function.

**Key words** detrusor underactivity; interstitial cells of Cajal; connexin 43; ultrastructure; guinea pigs