

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2016.15.020

文章编号: 1005-8982(2016)15-0106-04

膀胱黏膜毒蕈碱型胆碱能受体密度与前列腺术后膀胱痉挛的相关性研究

廖彬, 黄世旺, 蔡旌槐, 陈伟义, 陈益民

(广东省潮州市人民医院 泌尿外科, 广东 潮州 521000)

摘要: **目的** 探讨膀胱黏膜毒蕈碱型胆碱能受体(M受体)M₂、M₃亚型的密度与前列腺电切术后膀胱痉挛的相关性。**方法** 选取2012年5月-2015年5月医院收治的良性前列腺增生(BPH)患者作为研究对象,将其分为合并膀胱过度活动症(OAB)观察组和不合并OAB对照组,再将观察组分为发生膀胱痉挛组及不发生膀胱痉挛组,比较各组M₂、M₃受体的密度及其相关性。**结果** 观察组术后膀胱痉挛的发生率高于对照组;观察组M₂、M₃受体密度均低于对照组;观察组中发生膀胱痉挛患者的M₃受体密度低于不发生膀胱痉挛患者的M₃受体密度。**结论** 膀胱黏膜M₃受体密度与前列腺术后发生膀胱痉挛存在相关性,提示M₃受体可能参与膀胱痉挛的发病机制。

关键词: 毒蕈碱型胆碱能受体;膀胱黏膜;膀胱痉挛;良性前列腺增生;膀胱过度活动症

中图分类号: R697.32

文献标识码: B

Correlation study between density of muscarinic receptors in bladder mucosa and bladder spasm after prostate surgery

Bin Liao, Shi-wang Huang, Jing-huai Cai, Wei-yi Chen, Yi-min Chen

(Department of Urology, the People's Hospital of Chaozhou City,
Chaozhou, Guangdong 521000, China)

Abstract: **Objective** To analyze the correlation of the bladder spasm after prostate surgery and the density of M₂ and M₃ muscarinic receptors in bladder mucosa. **Methods** Patients with benign prostatic hyperplasia (BPH) in our hospital from May 2012 to May 2015 were enrolled as research objects and divided into observation group [BPH with overactive bladder (OAB)] and control group (BPH without OAB). And then the observation group was further divided into bladder spasm subgroup and non-spasm subgroup. The density of M₂ and M₃ receptors were determined and their correlations with bladder spasm were analyzed. **Results** The rate of bladder spasm of the observation group was higher than that of the control group. The density of M₂ and M₃ muscarinic receptors of the observation group was lower than that of the control group. The density of M₃ muscarinic receptor in the bladder spasm subgroup was lower than that in the non-spasm subgroup. **Conclusions** There is a correlation between bladder spasm after prostate surgery and density of M₃ muscarinic receptor in bladder mucosa, suggesting M₃ receptor may be involved in the pathogenesis of bladder spasm and it can be used as a target to design drugs for prevention and control of bladder spasm.

Keywords: muscarinic receptor; bladder mucosa; bladder spasm; benign prostatic hyperplasia; overactive bladder

良性前列腺增生 (benign prostatic hyperplasia, BPH)是引起中老年男性排尿障碍最为常见的一种良

收稿日期:2015-12-28

性疾病。经尿道前列腺电切术(transurethral resection of the prostate, TURP)是治疗 BPH 的金标准^[1]。然而 TURP 术后患者容易发生膀胱痉挛,膀胱痉挛会加重术后出血及患者痛苦,如何预防及控制术后膀胱痉挛是困扰泌尿外科医生的难点。膀胱痉挛症状属于膀胱过度活动症(overactive bladder, OAB)范畴,有研究显示,约 50% 的 BPH 患者同时伴有 OAB 症状^[2-3],而 BPH 合并 OAB 患者行 TURP 术后膀胱痉挛发生率高达 20% ~ 25%^[4-5]。

目前毒蕈碱型胆碱能受体(以下简称 M 受体)阻滞剂是治疗 OAB 的一线用药,能够改善 BPH 患者的 OAB 症状,然而 M 受体阻滞剂如何缓解 OAB 症状的作用机制至今仍未明确^[6]。近年来有研究发现,BPH 合并 OAB 患者膀胱黏膜的 M 受体中 M₂、M₃ 亚型受体密度比无 OAB 症状的 BPH 患者明显降低,且与其发生 OAB 症状的严重程度存在相关性^[7]。那么,膀胱黏膜 M₂、M₃ 亚型受体的密度是否与 TURP 术后发生膀胱痉挛存在相关性,M 受体阻滞剂能否改善术后出现的膀胱痉挛症状,目前的相关报道较少。

1 资料与方法

1.1 临床资料

回顾性分析本院 2012 年 5 月 -2015 年 5 月收治的 BPH 患者共 80 例。将其分为 BPH 合并 OAB 组(观察组)40 例和 BPH 组(对照组)40 例,使用 OAB 评分表,将尿急症状项目大于或等于 2 分定义为 BPH 合并 OAB 组,尿急症状项目 0 分者定义为 BPH 组。将观察组中术后突然出现阵发性耻骨上区及尿道疼痛,膀胱冲洗管一过性受阻,伴或不伴有膀胱内液体返流至冲洗管或从尿道管周围流出(排除膀胱血块堵塞)的患者定义为膀胱痉挛组^[8],不发生上述症状的患者定义为不发生膀胱痉挛组。

1.2 纳入及排除标准

1.2.1 纳入标准 ①符合《2014 版中国泌尿外科疾病诊断治疗指南》中 BPH 的诊断标准;②前列腺特异性抗原 <4 μg/L;③膀胱残余尿量 >100 ml;④存在行前列腺电切手术指征患者;⑤年龄 60 ~ 80 岁;⑥签署知情同意书,同意加入本研究项目。

1.2.2 排除标准 ①术后病理诊断考虑前列腺癌患者;②糖尿病患者;③严重尿路感染。尿常规白细胞 ≥ 强阳性(+++)或脓球 ≥ 弱阳性(+)的患者;④存在神经源性膀胱功能障碍的患者;⑤近期曾使用 M 受体阻滞剂治疗的患者;⑥患有精神疾病或存在语

言障碍的患者。

1.3 方法

1.3.1 标本的获取 通过膀胱镜活检取得膀胱顶部的黏膜组织标本。

1.3.2 膀胱黏膜的大小及保存方法 每位患者均取 3 块组织,每块组织约 3 mm × 4 mm × 4 mm(5 ~ 20 mg)。将取得的标本放入组织冻存管,并迅速投入液氮中冷却。手术结束后将标本置入 -80℃ 的冰箱冷冻保存。

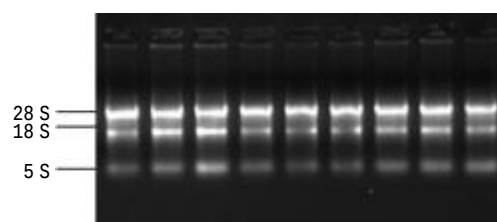
1.3.3 实验分析前的标本处理 将所有组织标本做成病理切片,行苏木精 - 伊红染色确认为膀胱黏膜组织。

1.3.4 使用的试剂及仪器 Trizol 试剂(美国 Invitrogen 公司),Thermo Script RT-PCR System(美国 Invitrogen 公司),Brilliant II SYBR green QPCR kit(美国 Stratagene 公司),实时荧光定量聚合酶反应(qRT-PCR)仪(美国 Stratagene 公司),微量核酸蛋白定量仪(美国 Nanodrop 公司),微量加样器(德国 Eppendorf 公司),低温高速离心机(德国 Eppendorf 公司),凝胶成像分析系统(法国 VL 公司),恒温循环水浴箱(美国 Thermo 公司)等。

1.3.5 qRT-PCR 提取标本总 RNA,保证 RNA 纯度及行 RNA 的完整性鉴定(见附图),参照 Thermo-script RT-PCR System 说明书,通过逆转录反应获得 cDNA 片段,设计好荧光定量 PCR 引物,在检测 M₂ 和 M₃ 受体的 RNA 的同时,利用引物对每个标本进行检测,从而校正不同标本之间因 RNA 总量或逆转录反应效率差异等因素所致的数据差异。使用荧光定量仪做数据分析,绘制荧光定量 PCR 标准曲线,根据标准曲线标化 M₂、M₃ 受体基因的拷贝数,最后将得到的标化的 M₂ 和 M₃ 基因拷贝数作为 M₂ 和 M₃ 受体密度进行统计分析。

1.4 指标观察

测定所有患者膀胱黏膜 M₂、M₃ 受体的密度及术后发生膀胱痉挛的发生率,分析膀胱黏膜 M₂、M₃



琼脂糖凝胶电泳显示 28 S、18 S 和 5 S 3 条带清晰可见,无明显降解

附图 RNA 鉴定

受体的密度与术后发生膀胱痉挛的相关性。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 18.0 统计软件进行数据分析, M2 及 M3 的 RNA 值用中位数和四分位间距表示[M(P₂₅ ~ P₇₅)], 定性资料用 χ^2 检验进行分析, 定量资料用两独立样本的秩和检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 术后膀胱痉挛发生率比较

本研究 80 例手术均顺利完成。观察组与对照组术后膀胱痉挛的发生率经 χ^2 检验, 差异有统计学意义。提示 BPH 合并 OAB 患者术后更容易发生膀胱痉挛。见表 1。

2.2 M2、M3 受体密度的比较

两组 M2、M3 受体标化的基因拷贝数应用两独立样本的秩和检验, 差异有统计学意义, 提示 BPH 合并 OAB 患者 M2、M3 受体密度比 BPH 患者降低。见表 2。

2.3 M2、M3 受体密度与术后发生膀胱痉挛的相关性

为分析观察组患者的 M2、M3 受体密度是否与术后发生膀胱痉挛存在相关性, 笔者将观察组再分为术后膀胱痉挛组及术后不发生膀胱痉挛组, 两组

表 1 两组术后膀胱痉挛的发生率比较 ($n=40$)

组别	发生膀胱痉挛数/例	膀胱痉挛发生率/%	χ^2 值	P 值
观察组	21	52.5	12.579	0.001
对照组	6	15		

表 2 两组 M2、M3 受体密度的比较 [$n=40$, M(P₂₅ ~ P₇₅)]

组别	M2 标化的相对拷贝数	M3 标化的相对拷贝数
观察组	3.36(1.53 ~ 5.09)	1.27(0.94 ~ 1.53)
对照组	13.68(7.28 ~ 18.1)	3.95(2.14 ~ 4.06)
Z 值	-7.294	-5.981
P 值	0.001	0.001

表 3 观察组中术后膀胱痉挛组与不发生膀胱痉挛组 M2、M3 受体密度比较 M(P₂₅ ~ P₇₅)

组别	M2 标化的相对拷贝数	M3 标化的相对拷贝数
膀胱痉挛组($n=21$)	3.2(1.39 ~ 4.76)	1.12(0.87 ~ 1.41)
不发生膀胱痉挛组($n=19$)	3.53(1.78 ~ 5.23)	1.43(1.08 ~ 1.89)
Z 值	-0.579	-2.086
P 值	0.573	0.036

的 M2、M3 受体密度比较见表 3, BPH 合并 OAB 患者无论术后是否发生膀胱痉挛, M2 受体密度并不存在差异性, 而 M3 受体密度却存在差异性, 提示 M3 受体可能参与术后发生膀胱痉挛的发病机制。

3 讨论

M 受体分为 M1 ~ M5 5 个亚型^[9]。已有研究证实人类的膀胱逼尿肌中存在所有的 M 受体亚型, 其中 M2、M3 受体的 RNA 占绝大多数^[10]。既往的研究认为, M 受体阻滞剂通过阻断膀胱逼尿肌 M 受体(主要是 M2 和 M3 亚型), 抑制逼尿肌过度收缩^[11], 从而改善 BPH 患者的 OAB 症状, 但是无法解释已抑制患者的逼尿肌收缩, 却很少有 BPH 患者因服用 M 受体阻滞剂而出现排尿困难加重甚至出现尿潴留。近年来的研究发现膀胱黏膜同样存在 M 受体的 5 个亚型, 其中主要的受体亚型仍然是 M2、M3 受体。那么 M 受体阻滞剂是否通过抑制膀胱黏膜的 M 受体, 从而缓解 OAB 症状的呢? 这是近年来研究的热点。

关于膀胱黏膜 M 受体的报道较多。有相关研究发现膀胱黏膜上的 M 受体密度与膀胱逼尿肌的 M 受体密度相似^[12], 刺激膀胱黏膜的 M 受体可导致尿路上皮源性的抑制因子释放, 从而调节逼尿肌的收缩^[13-14], 膀胱黏膜的 M 受体在 OAB 的发生机制中起着重要作用^[15-16]。M 受体阻滞剂不仅作用于膀胱逼尿肌的 M 受体, 而且对膀胱黏膜 M 受体的抑制也起着重要作用^[17]。大量的动物实验研究发现, M 受体阻滞剂的主要作用可能是通过抑制膀胱传入通路上传入神经的活性, 从而减弱膀胱黏膜对乙酰胆碱的敏感性^[18-20]。以上的研究结果均提示膀胱黏膜上的 M 受体与 OAB 的发生密切相关。

那么, 做为属于 OAB 范畴的膀胱痉挛症状是否与 M2、M3 受体密度存在相关性呢? 在本研究的观察组中笔者发现膀胱痉挛患者的 M3 受体密度明显降低, 结合既往的研究发现膀胱黏膜对激动 M 受体引起的逼尿肌收缩反应存在抑制作用^[14-15], 笔者认为, 膀胱黏膜可能存在一种保护作用, 在 BPH 合并 OAB 的病理状态下, 膀胱黏膜发挥其保护作用, 通过减少 M 受体的密度, 降低膀胱黏膜对乙酰胆碱的敏感性, 缓解 OAB 症状, 然而 BPH 合并 OAB 的患者因膀胱黏膜中 M 受体的过度减少, 特别是 M3 受体亚型的减少可能导致术后更容易发生膀胱痉挛, M3 受体在前列腺电切术后发生膀胱痉挛的发病机制中可

能起着重要的作用。

综上所述,M受体阻滞剂如何缓解OAB症状的作用机制是相当复杂的。本研究中BPH合并OAB行经尿道前列腺电切术后发生膀胱痉挛的患者膀胱黏膜的M3受体密度明显下降,至少说明M3受体密度对术后发生膀胱痉挛的影响。虽然目前仍然缺乏膀胱黏膜M受体在疾病状态下是如何发挥作用的研究,但作为与前列腺电切术后发生膀胱痉挛相关的M3受体却可以作为研发新药的靶点,高选择性的M3受体阻滞剂对预防和控制经尿道前列腺电切术后发生膀胱痉挛可能起着更加有效的作用。

参 考 文 献:

- [1] 那彦群,叶章群,孙颖浩,等.中国泌尿外科疾病诊断治疗指南[M].北京:人民卫生出版社,2014:259-261.
- [2] KNUTSON T, EDLUND C, FALL M, et al. BPH with coexisting overactive bladder dysfunction-an everyday urological dilemma[J]. *Neurourol Urodyn*, 2001, 20(3): 237-247.
- [3] 高中伟,辛士永,张建国,等.坦索罗辛联合索利那新在治疗轻度良性前列腺增生合并膀胱过度活动症中的疗效分析[J]. *中华男科学杂志*, 2014, 20(3): 239-243.
- [4] 龚海华,钱良军.琥珀酸索利那新、盐酸坦索罗辛单用或联用治疗经尿道离子束刀前列腺切除术膀胱过度活动症效果对比[J]. *实用药物与临床*, 2014, 17(6): 774-777.
- [5] HOMMA Y, KAKIZAKI H, YAMAUCHI O, et al. Assessment of overactive bladder symptoms: comparison of 3-day bladder diary and the overactive bladder symptoms score[J]. *Urology*, 2011, 77(1): 60-64.
- [6] PATRA P B, PATRA S. Research findings on overactive bladder[J]. *Curr Urol*, 2015, 8(1): 1-21.
- [7] 张进生,李玮,刘宁,等.良性前列腺增生合并膀胱过度活动症患者膀胱黏膜毒蕈碱型胆碱能受体、亚型的表达及临床意义[J]. *中国微创外科杂志*, 2014, 8(14): 747-750.
- [8] 梅骅,陈凌武,高新,等.泌尿外科手术学[M].第3版.北京:人民卫生出版社,2008:425-426.
- [9] EGLEN R M. Overview of muscarinic receptor subtypes[J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2012, 1(208): 3-28.
- [10] SIGALA S, MIRABELLA G, PERONI A, et al. Differential gene of cholinergic muscarinic receptor subtypes in male and female normal human urinary bladder[J]. *Urology*, 2002, 60(4): 719-725.
- [11] YAMADA S, KURAOKA S, OSANO A, et al. Characterization of bladder selectivity of antimuscarinic agents on the basis of in vivo drug-receptor binding[J]. *Int Neurourol J*, 2012, 16(3): 107-115.
- [12] YOSHIDA A, SEKI M, NASRIN S, et al. Characterization of muscarinic receptors in the human bladder mucosa: direct quantification of subtypes using 4-DAMP mustard[J]. *Urology*, 2011, 78(3): 1357-1366.
- [13] CHAIYAPRASITHI B, MANG C F, KILBINGER H, et al. Inhibition of human detrusor contraction by a urothelium derived factor[J]. *J Urol*, 2003, 170(5): 1897-1900.
- [14] HAWTHORN M H, CHAPPLE C R, COCK M, et al. Urothelium-derived inhibitory factor (s) influence on detrusor muscle contractility in vitro[J]. *Br J Pharmacol*, 2000, 129(3): 416-419.
- [15] MORO C, UCHIYAMA J, CHESSE-WILLIAMS R. Urothelial lamina propria spontaneous activity and the role of M3 muscarinic receptors in mediating rate responses to stretch and carbachol[J]. *Urology*, 2011, 78(6). DOI: 10.1016/j.urology.2011.08.039.
- [16] BIRDER L A, RUGGIERI M, TAKEDA M, et al. How does the urothelium affect bladder function in health and disease? I-CI-RS 2011[J]. *Neurourol Urodyn*, 2012, 31(3): 293-299.
- [17] ANDERSSON K E. Muscarinic acetylcholine receptors in the urinary tract[J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2011, 1(202): 319-344.
- [18] HEDLUND P, STRENG T, LEE T, et al. Effects of tolterodine on afferent neurotransmission in normal and resiniferatoxin treated conscious rats[J]. *J Urol*, 2007, 178(1): 326-331.
- [19] KOVYAZINA I V, TSENTSEVITSKY A N, NIKOLSKY E E. Identification of the muscarinic receptor subtypes involved in autoregulation of acetylcholine quantal release from frog motor nerve endings[J]. *Dokl Biol Sci*, 2015, 460(1): 5-7.
- [20] MATSUMOTO Y, MIYAZATO M, YOKOYAMA H, et al. Role of M2 and M3 muscarinic acetylcholine receptor subtypes in activation of bladder afferent pathways in spinal cord injured rats[J]. *Urology*, 2012, 79(5). DOI: 10.1016/j.urology.2012.01.022.

(申海菊 编辑)