

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2020.18.004

NOS 在压力性尿失禁大鼠盆底组织中的表达及意义^{*}

苟鑫¹, 吴静², 罗伟¹, 柯健¹, 杨智明¹, 袁志伟¹, 孙浩³, 杨昭庆³, 方克伟^{1△}

(1. 昆明医科大学第二附属医院泌尿外科 650101; 2. 昆明医科大学基础医学院生物化学和分子生物学系 650500; 3. 中国医学科学院医学生物学研究所遗传室, 昆明 650031)

[摘要] **目的** 分析压力性尿失禁(SUI)大鼠阴道、尿道及肛提肌组织中一氧化氮合酶(NOS)的表达情况,探讨 NOS 在女性 SUI 发生发展过程中的表达意义。**方法** 以 60 只健康雌性未育 SD 大鼠和 15 只健康雄性 SD 大鼠为实验对象,在笼中进行自然妊娠,实验分 3 组,取正常妊娠分娩后的雌性大鼠作为对照组(A 组),另有雌性大鼠分娩后扩张阴道组(B 组)、阴道扩张+卵巢切除组(C 组),每组 6 只。喷嚏实验及尿动力学检查验证模型,q-PCR、Western blot 检测 NOS mRNA 及蛋白的表达水平,免疫组织化学检测 NOS 在阴道、尿道及肛提肌组织中的表达。**结果** 实验所得数据经 Shapiro-Wilk 统计分析,验证均符合正态分布, B 组、C 组漏尿点压(ALPP)低于 A 组,其中 C 组较 A 组明显下降($P<0.05$)。B 组、C 组与 A 组比较,衍生型 NOS(iNOS)、内皮型 NOS(eNOS)、神经元型 NOS(nNOS)mRNA 及 β 蛋白表达水平均显著上调,差异有统计学意义($P<0.01$)。免疫组织化学结果显示, A 组、B 组、C 组 iNOS 的染色强度积分在各组织中分别为:尿道上皮(2.66 ± 0.51)、(5.33 ± 0.51)、(9.66 ± 0.51)分,阴道上皮(0.66 ± 0.51)、(5.00 ± 0.63)、(9.33 ± 0.81)分,肛提肌(0.66 ± 0.51)、(5.66 ± 0.51)、(9.33 ± 0.81)分,各组织中组间差异均有统计意义($P<0.05$)。eNOS 在 3 组阴道上皮、尿道上皮组织中无表达,在肛提肌组织染色强度积分表达依次为(0.83 ± 0.75)、(5.33 ± 0.51)、(10.00 ± 0.63)分,组间差异有统计意义(均 $P<0.05$)。nNOS 在 3 组尿道上皮组织无表达,在阴道上皮组织中染色强度积分依次为(0.66 ± 0.51)、(5.83 ± 0.98)、(9.66 ± 1.03)分,在肛提肌组织的染色强度积分依次为(0.50 ± 0.54)、(5.50 ± 0.54)、(9.66 ± 1.03)分,组间两两比较差异有统计学意义(均 $P<0.05$)。**结论** 雌性大鼠在卵巢切除后出现 SUI 症状,而卵巢切除后雌激素下降可致 NOS(iNOS、nNOS、eNOS)表达的升高,NOS 与 SUI 的发病可能有关。

[关键词] 尿失禁;压力性;一氧化氮合酶;SD 大鼠;模型;盆底组织

[中图分类号] R711.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2020)18-2984-07

Expression and significance of NOS in pelvic floor tissue of stress urinary incontinence rats^{*}

GOU Xin¹, WU Jing², LUO Wei¹, KE Jian¹, YANG Zhiming¹, YUAN Zhiwei¹,
SUN Hao³, YANG Zhaoqing³, FANG Kewei^{1△}

(1. Department of Urology, the Second Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming, Yunnan 650101, China; 2. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Basic Medical College, Kunming Medical University, Kunming, Yunnan 650500, China; 3. Department of Genetics, Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences, Kunming, Yunnan 650031, China)

[Abstract] **Objective** To analyze the expression of nitric oxide synthase (NOS) in the vagina, urethra and levator ani tissue of female stress urinary incontinence (FSUI) rats, and to explore the expression significance of NOS in the occurrence and development of FSUI. **Methods** In this study, 60 healthy female SD rats and 15 male SD rats were selected as experimental subjects for natural pregnancy in cages, female rats were divided into 3 groups, normal pregnant delivery rats (group A), rats took vaginal dilatation after delivery (group B), rats took vaginal dilatation+ovariectomized (group C), 6 rats in each group. The sneeze test and urodynamics test were used to verify the success of SUI modelling. The expression of NOS mRNA and protein in SUI

^{*} **基金项目:**国家自然科学基金项目(80860127);云南省科技计划项目(2015 FA007);云南省高校女性盆底疾病诊疗工程研究中心;云南省科学和技术带头人后备人才项目(2017HB038);云南省卫生和计划生育委员会医学学科带头人项目(D-201615)。 **作者简介:**苟鑫(1994—),住院医师,硕士,主要从事泌尿外科研究。 [△] **通信作者,** E-mail: 2482099228@qq.com。

rats' vagina, urethra and levator ani tissue were detected by q-PCR and Western blot, and the expression level of NOS was detected by immunohistochemistry method. **Results** The experimental data were verified to be normal distribution by Shapiro-Wilk statistical test, ALPP in group B and group C was lower than that in group A, and group C was significantly lower than that in group B ($P < 0.05$). The expressions levels of iNOS, eNOS, and nNOS in group B and group C were significantly increased when compared with group A, and the difference were statistically significant ($P < 0.01$). Immunohistochemical results showed that the staining intensity scores of iNOS in groups A, B, and C were: urethral ($2.66 \pm 0.51, 5.33 \pm 0.51, 9.66 \pm 0.51$), vaginal ($0.66 \pm 0.51, 5.00 \pm 0.63, 9.33 \pm 0.81$), levator ani tissues ($0.66 \pm 0.51, 5.66 \pm 0.51, 9.33 \pm 0.81$), the differences among the three groups were statistically significant ($P < 0.05$). eNOS showed no statistical differences in the vagina and urethra among three groups ($P = 0.342, P = 0.492$), and in the levator ani tissues were ($0.83 \pm 0.75, 5.33 \pm 0.51, 10.00 \pm 0.63$), there were statistical differences in three groups ($P < 0.05$). There were no expression of nNOS in urethral of the three groups ($P = 0.629$), but it had statistical differences in the vaginal ($0.66 \pm 0.51, 5.83 \pm 0.98, 9.66 \pm 1.03$), and levator ani tissues ($0.50 \pm 0.54, 5.50 \pm 0.54, 9.66 \pm 1.03$), $P < 0.05$. **Conclusion** The female rats showed symptoms of SUI after ovariectomy, and the decrease of estrogen after ovariectomy can increase the expression of NOS (iNOS, nNOS, eNOS), which is related to the incidence of SUI.

[Key words] urinary incontinence; stress; nitric oxide synthase; SD rat; model; pelvic floor tissue

压力性尿失禁(stress urinary incontinence, SUI)好发于女性中老年人群,严重影响患者生活质量,正受到越来越多医患人群的重视^[1]。SUI的发病机制复杂,尤其对其分子机制知之甚少。有限研究关注在胶原蛋白、基质金属蛋白酶雌激素受体、转化生长因子 β 等^[2-3]。近年的研究发现,一氧化氮(NO)在人和动物的下泌尿道黏膜上皮、平滑肌和血管广泛分布,并参与骨盆底支撑结构的松弛^[4]。一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)催化 L-氨基酸从而产生 NO。目前发现 NOS 有 3 种亚型:神经元型(nNOS)、衍生型(iNOS)、内皮型(eNOS)。nNOS 和 eNOS 称为结构 NOS (cNOS),由细胞内的 Ca^{2+} 浓度进行生理控制^[5];在正常情况下,iNOS 通常以微量的形式表达,而在病理条件下,iNOS 不依赖 Ca^{2+} 就可以合成大量的 NO。本研究将检测 SUI 大鼠尿道、阴道和肛提肌组织中 NOS 各亚型的表达,探讨雌激素缺乏和产道损伤对 NOS 表达的影响。

1 资料与方法

1.1 实验材料

60 只鼠龄约 2 个月,体质量 220~250 g[平均(235 ± 15)g]的雌性未孕 SD 大鼠和 15 只体质量 230~280 g[平均(255 ± 25)g]的雄性 SD 大鼠购自昆明医科大学动物实验中心,本研究经伦理委员会审查通过。雄鼠和雌鼠以 1:4 的比例喂养在笼子里,自然受孕。分娩后取 18 只雌性大鼠进行后续实验研究。一抗 iNOS 抗体、nNOS 抗体、eNOS 抗体购自美国 Abcam 公司; β -Tubulin 抗体购自美国 Cellsignaling/CST 公司。

1.2 动物模型构建及分组

实验共设立 3 组,正常妊娠分娩后的大鼠作为对

照组(A 组),雌性大鼠分娩后扩张阴道组(B 组)、阴道扩张+卵巢切除组(C 组),B、C 组以方克伟等^[6]方法构建 SUI 模型,每组设 6 只。尿动力学检查及喷嚏实验(具体参见方克伟等^[6]方法)验证 SUI 建模是否成功,记录最大膀胱容量(MBC)、尿漏点压(ALPP)。其中尿动力学检查方法:SD 大鼠用 40 mg/kg 2%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,取仰卧位固定,尿道口用碘伏消毒,将尿道垂直牵拉提起,将涂有液体石蜡的硬膜外导管插入膀胱约 3 cm。将硬膜外导管通过三通管一端与尿流动力学检测仪相连,另一端与微量输液泵相连,用无菌生理盐水充满管道,保证管道内无空气。

1.3 组织标本获取与保存

用氯水合物(0.4 g/kg)深度麻醉大鼠。尿道、阴道及肛提肌组织在无菌操作条件下完全取出。用 4%多聚甲醛固定及 RNAlater 保存液保存,将所有标本保存在-80℃冰箱中。

1.5 NOS mRNA 表达水平检测

100 mg 组织研磨粉碎,提取细胞,TRIzol 提取总 RNA,通过 Prime Script RT 试剂盒(TaKaRa,日本)逆转录得到 cDNA。利用 SYBR 荧光定量 PCR 试剂盒(TaKaRa,日本)进行检测。iNOS 上游引物 5'-TCT TGC AAG TCC AAA TTA TGC ATG-3',下游引物 5'-GAC TTA CTC TTT GAA GGA GCC ATA-3';nNOS 上游引物 5'-CTC TTC AAA CGC AAA GTG GGA G-3',下游引物 5'-GTT GAC TGC GAG AAT GAT GTC T-3';eNOS 上游引物 5'-AGC ACA AGA GTT ACA AAA TCC GAT-3',下游引物 5'-CTG TCT GTG TTA CTG GAT TCC TTC-3'。

1.6 NOS 表达水平的检测

在液氮中研磨组织,用 RIPA 裂解液和超声波细胞粉碎机在 12 000 r/min 和 10 cm 离心半径下裂解组织和细胞 10 min,取上清液,用 BCA 法测定总蛋白浓度。Western blot 检测各组组织的 iNOS、nNOS 和 eNOS 蛋白表达情况。

1.7 NOS 免疫组织化学分析

组织做石蜡切片,行免疫组织化学染色,分析各组 SD 大鼠阴道、尿道和肛提肌组织中 iNOS、nNOS 及 eNOS 的表达及分布情况。

1.8 统计学处理

采用 SPSS19.0 软件分析数据。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析和 LSD 检验,计数资料以频率和百分率[n(%)]表示,组间的比较采用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 建模情况

C 组建模成功率 90%(18/20)明显高于 B 组的 60%(12/20);A 组喷嚏实验阳性率与 B 组、C 组比较差异有统计学意义($P = 0.001$),B 组与 C 组比较差异有统计学意义($P = 0.018$)。3 组 MBC 分别为(2.82 ± 0.40)、(2.77 ± 0.49)、(2.78 ± 0.39)mL,3 组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。ALPP 方面,B 组[(45.20 ± 2.78)cm H₂O]、C 组[(44.75 ± 2.33)cm H₂O]较 A 组[(64.85 ± 2.44)cm H₂O]明显下降,C 组较 B 组明显下降($P < 0.05$)。

2.2 NOS mRNA 及蛋白表达情况

2.2.1 iNOS mRNA 及蛋白的表达

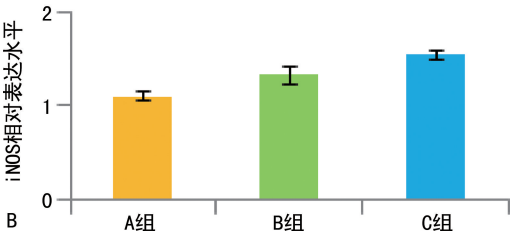
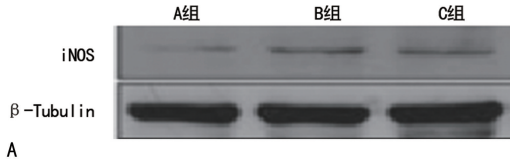
q-PCR 结果显示,iNOS mRNA 表达水平 B 组($1.319\ 3 \pm 0.090\ 7$)、C 组($1.541\ 8 \pm 0.053\ 2$)较 A 组($1.093\ 9 \pm 0.045\ 9$)明显升高,差异有统计学意义($P < 0.01$);C 组较 B 组明显升高($P < 0.05$)。Western blot 检测结果显示,B 组、C 组与 A 组比较,iNOS 表达明显升高,差异均有统计学意义($P < 0.01$),见图 1。

2.2.2 nNOS mRNA 及蛋白的表达

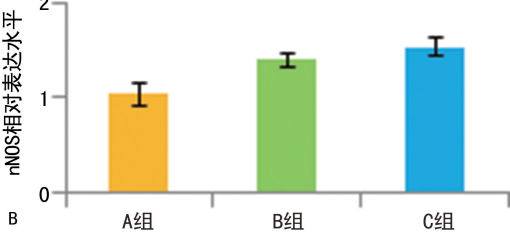
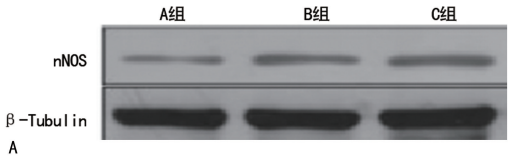
RT-PCR 检测显示,nNOS mRNA 表达水平 B 组($1.182\ 6 \pm 0.079\ 8$)、C 组($1.325\ 4 \pm 0.060\ 0$)较 A 组($0.983\ 3 \pm 0.157\ 3$)明显升高,C 组较 B 组明显升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。Western blot 检测结果显示,B 组、C 组和 A 组相比较,iNOS 表达水平明显上升,差异均有统计学意义($P < 0.01$),见图 2。

2.2.3 eNOS mRNA 及蛋白的表达

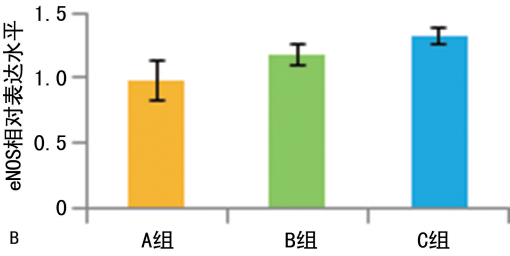
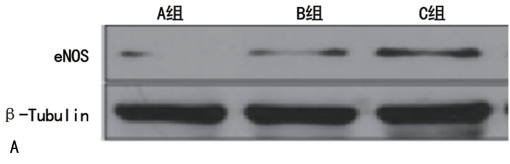
RT-PCR 结果显示,eNOS mRNA 表达水平 B 组($1.392\ 6 \pm 0.083\ 5$)、C 组($1.532\ 8 \pm 0.102\ 1$)较 A 组($1.033\ 4 \pm 0.114\ 0$)明显升高,C 组较 B 组明显升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。Western blot 检测结果显示,B 组、C 组与 A 组比较,eNOS 表达水平明显上升,差异有统计学意义($P < 0.01$),见图 3。



A: Western blot 图;B: Western blot 分析图。
图 1 Western blot 检测 iNOS 在 SD 大鼠体内的表达



A: Western blot 图;B: Western blot 分析图。
图 2 Western blot 检测 nNOS 在 SD 大鼠体内的表达



A: Western blot 图;B: Western blot 分析图。
图 3 Western blot 检测大鼠 eNOS 在 SD 大鼠体内的表达

2.3 NOS 免疫组织化学结果

2.3.1 iNOS 免疫组织化学结果

在尿道上皮组织中,iNOS 主要表达在上皮细胞核,染色强度积分分别为 A 组(2.66 ± 0.51)分、B 组(5.33 ± 0.51)分、C 组(9.66 ± 0.51)分,组间两两比较差异有统计学意义($P < 0.01$),见图 4。阴道上皮组织中,iNOS 主要表达在阴道上皮细胞核,染色强度积分分别为 A 组(5.00 ± 0.63)分、B 组(0.66 ± 0.51)分、C 组(9.33 ± 0.81)分,组间两两比较差异均有统

计学意义($P < 0.01$),见图 5。在肛提肌组织中,iN-OS 主要在平滑肌细胞质中表达,染色强度积分分别为 A 组(0.66 ± 0.51)分、B 组(5.00 ± 0.63)分、C 组(9.33 ± 0.81)分,两两比较差异均有统计学意义($P < 0.01$),见图 6。

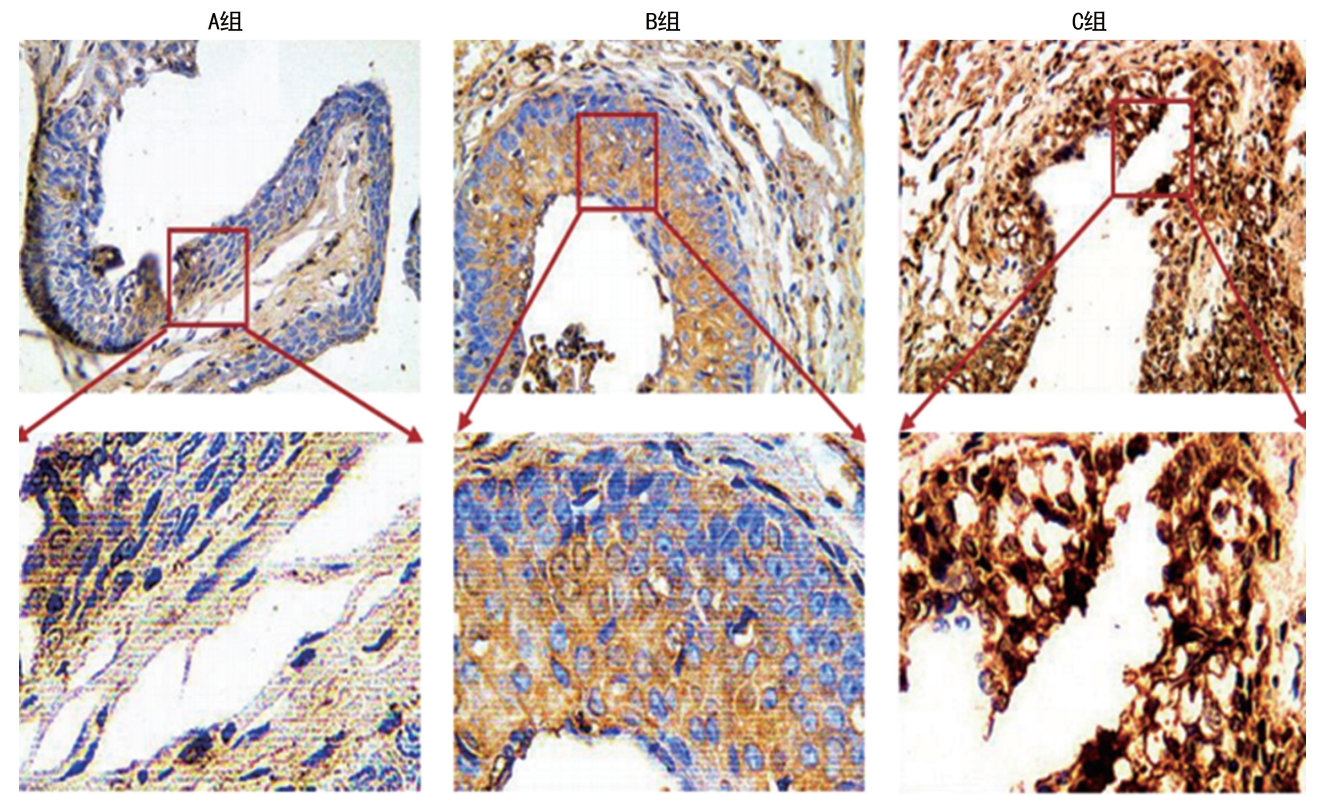


图 4 iNOS 在 SD 大鼠尿道上皮组织中的表达(免疫组织化学,×400)

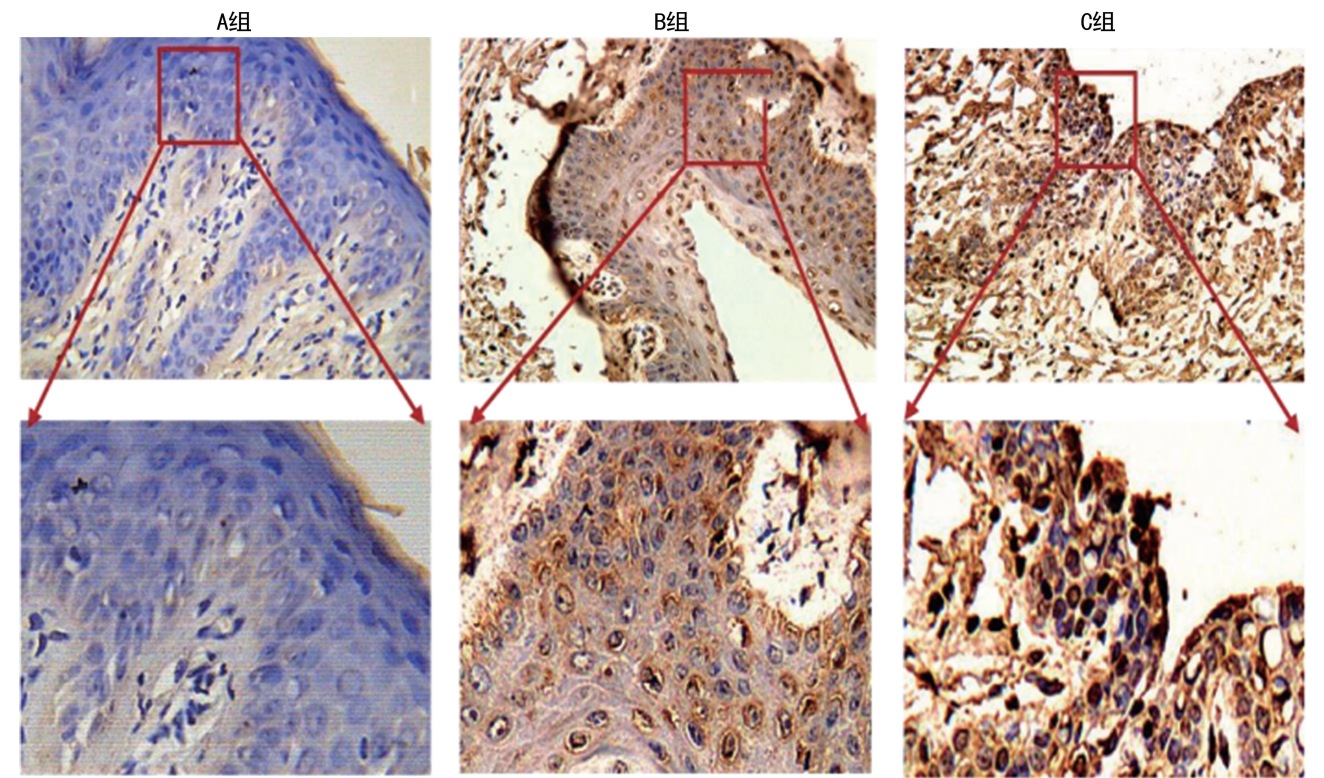


图 5 iNOS 在 SD 大鼠阴道上皮组织中的表达(免疫组织化学,×400)

2.3.2 eNOS 免疫组织化学结果

在尿道上皮组织、阴道上皮组织中,eNOS 未见表

达。在肛提肌组织中，eNOS 主要表达在平滑肌细胞质，染色强度积分依次为 A 组(0.83 ± 0.75)分、B 组(5.33 ± 0.51)分、C 组(10.00 ± 0.63)分，组间两两比较差异均有统计学意义($P < 0.01$)，见图 7。

2.3.3 nNOS 免疫组织化学结果

在尿道上皮组织中，nNOS 未见表达；在阴道上皮组织中，nNOS 主要表达在上皮细胞质，染色强度

积分依次为 A 组(0.66 ± 0.51)分、B 组(5.83 ± 0.98)分、C 组(9.66 ± 1.03)分，见图 8，组间两两比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。在肛提肌组织中，nNOS 主要在平滑肌细胞核中表达，染色强度积分依次为 A 组(0.50 ± 0.54)分、B 组(5.50 ± 0.54)分、C 组(9.66 ± 1.03)分，两两比较差异均有统计学意义($P < 0.01$)，见图 9。

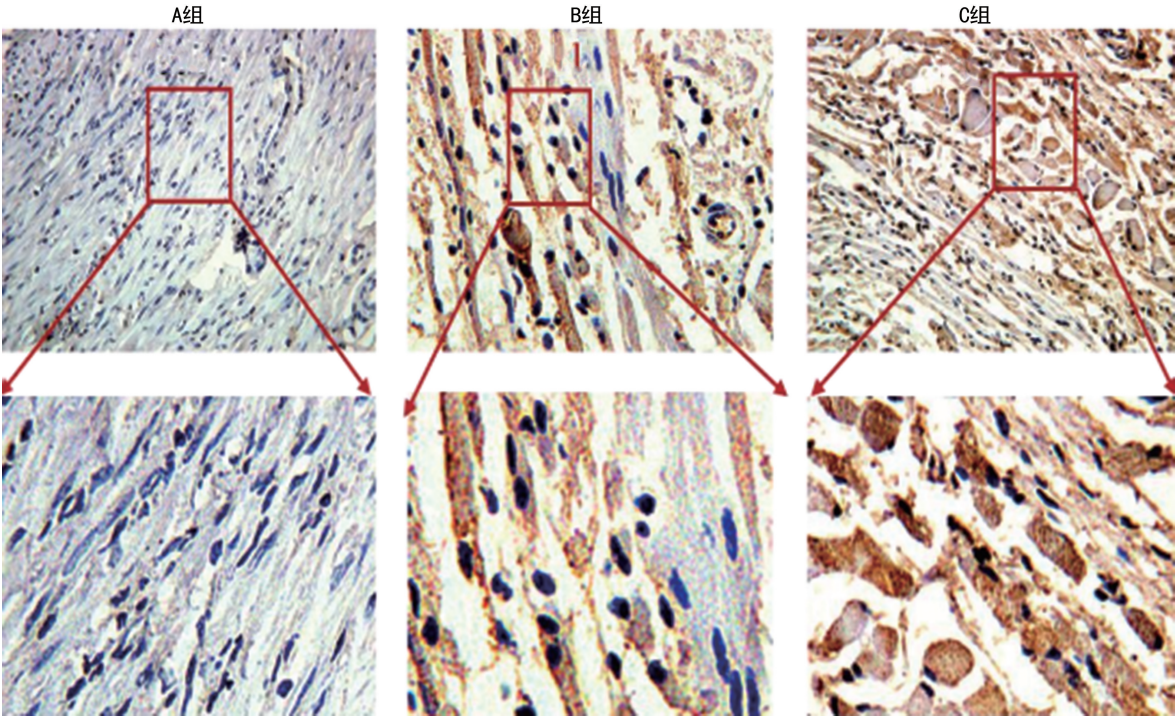


图 6 iNOS 在 SD 大鼠肛提肌组织中的表达 (免疫组织化学, $\times 400$)

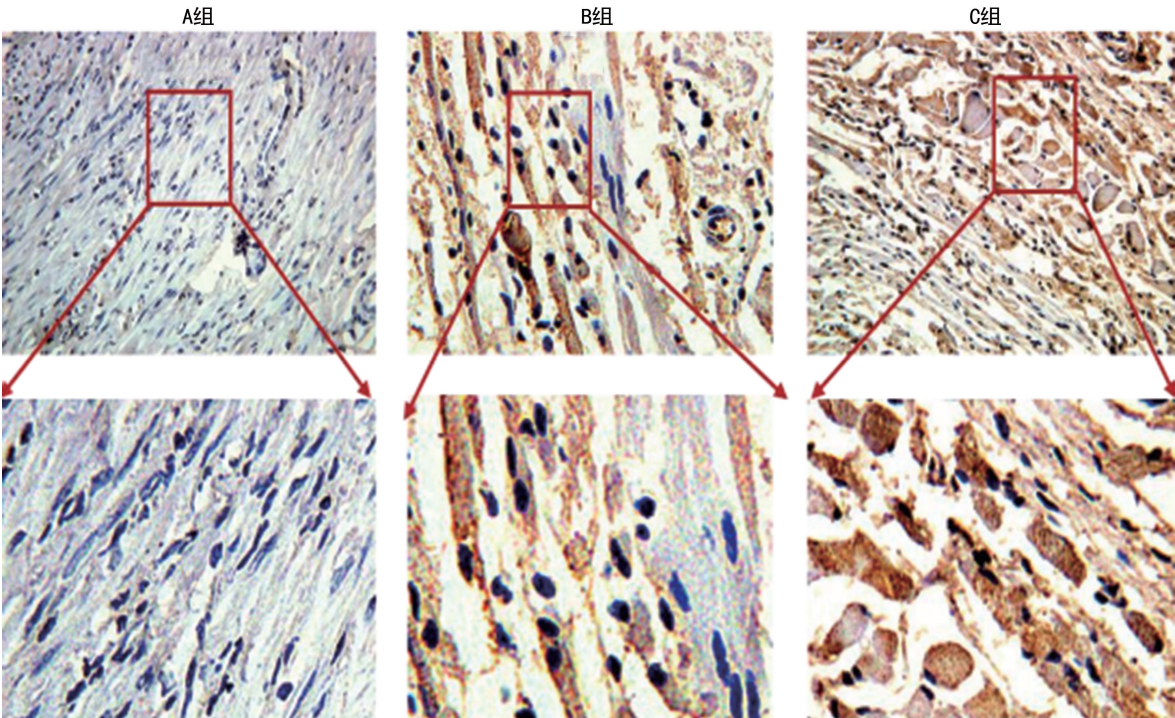


图 7 eNOS 在 SD 大鼠肛提肌组织中的表达 (免疫组织化学, $\times 400$)

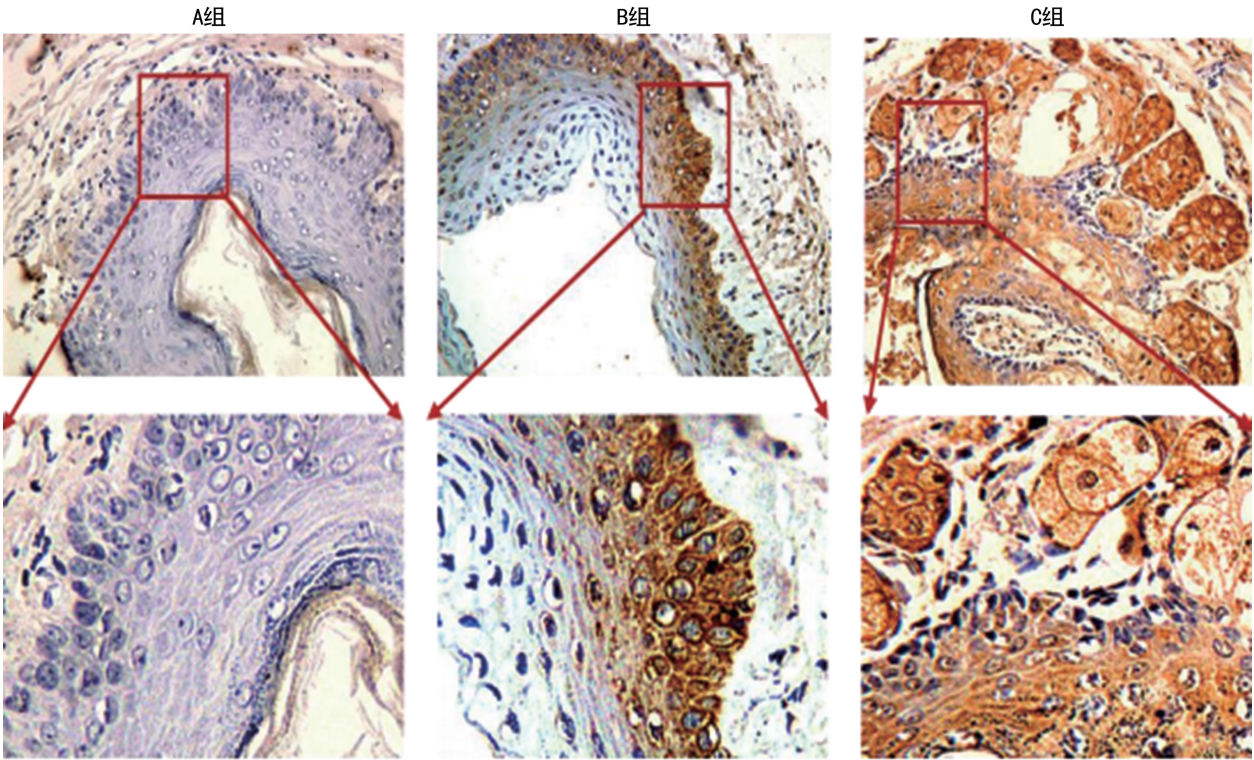


图 8 nNOS 在 SD 大鼠阴道上皮组织中的表达 (免疫组织化学, ×400)

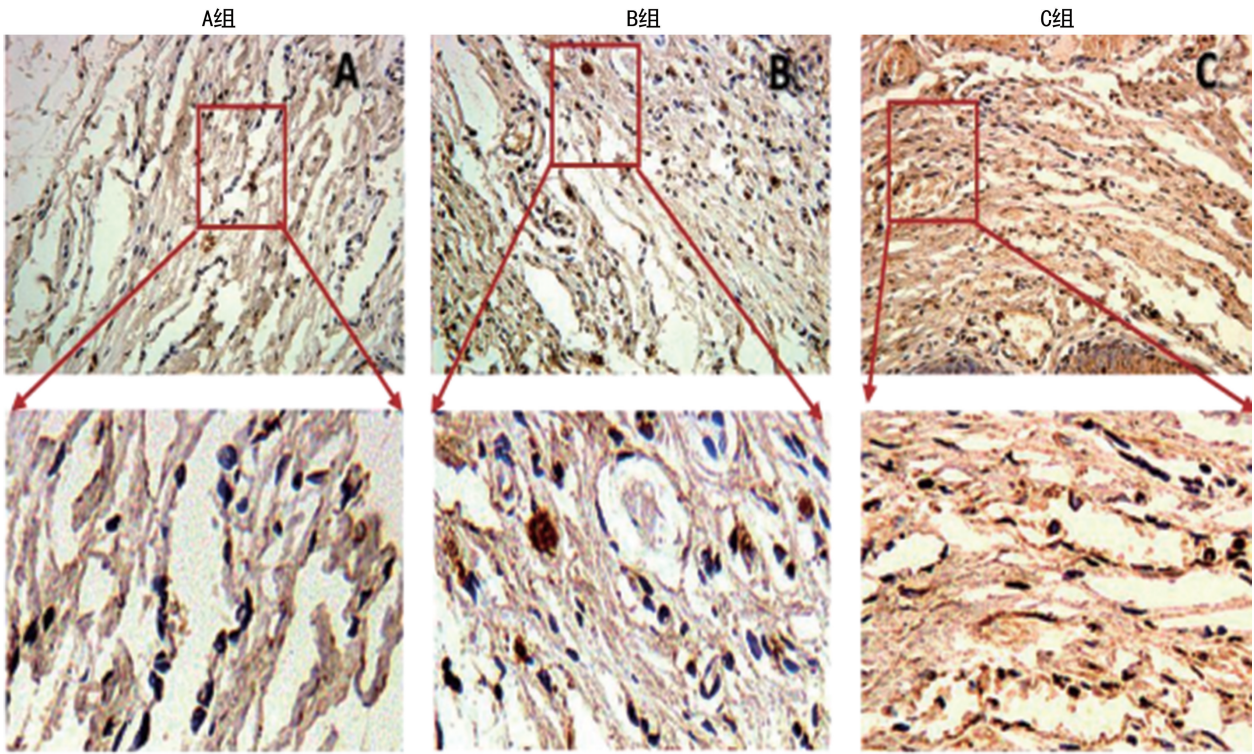


图 9 nNOS 在 SD 大鼠阴道上皮组织中的表达 (免疫组织化学, ×400)

3 讨 论

分娩维持超过 30 min,阴道侧壁压力达到 240 cm H₂O,可能导致微循环缺血和盆底肌肉、尿道韧带和神经组织的过度拉伸,从而导致 SUI^[7]。分娩产道损伤和更年期雌激素下降在 SUI 的发展中起着重要作用^[8]。利用单纯扩张阴道和切除卵巢建立 SUI 的动物模型可以为研究人类 SUI 提供有效途径。

在本研究中,建模成功的雌性 SD 大鼠 ALPP 显著降低。阴道扩张可诱发缺血及牵引伤害,影响下尿路组织的组成及功能,因此可诱导雌性大鼠 SUI^[9]。NO 被认为是参与了尿道松弛的神经递质之一^[10],在尿道中,NO 通过环鸟苷单磷酸(cGMP)调节近端尿道。cGMP 可激活与尿道平滑肌^[11] 松弛、MUCP 减少及 SUI 诱导相关的 cGMP 依赖蛋白激酶

G(PKG)。切除卵巢模拟绝经后老年妇女的低雌激素水平。雌激素缺乏可刺激阴道、膀胱颈部、尿道和肛提肌组织中 NOS 表达的增加,诱发大量 NO 的产生^[12]。GAME 等^[13]在切除卵巢后的雌鼠中,给予长期大量雌激素治疗,NOS 在尿道中的表达明显减少,MUCP 增加。在本研究中,正常分娩的大鼠较 SUI 模型中肛提肌平滑肌层 nNOS、iNOS、eNOS 的表达水平均显著增加。这表明平滑肌中 NOS 的表达变化与 SUI 发病机制相关。此外,有研究表明 NO 及 NOS 与膀胱过度活动症^[14]、间质性膀胱炎^[15]等疾病密切相关,是女性下尿路生理和病理过程中的重要介质^[16]。

在本研究中,iNOS、nNOS、eNOS 在尿道、阴道及肛提肌组织的转录及翻译水平上,正常分娩的大鼠明显低于其他 SUI 模型组,表明 NOS 参与了 SUI 的发生及进展,雌激素水平下降加重了 NOS 的作用,在 3 种 NOS 中,以 iNOS 变化尤其明显。免疫组织化学染色则提示 eNOS 仅在肛提肌组织中表达,在尿道组织及阴道组织中无明显表达,提示 eNOS 对肛提肌意义大。其中的作用及机制还需要深入研究。

总之,本研究显示 SUI 大鼠模型的肛提肌平滑肌细胞中 iNOS、nNOS、eNOS 表达升高,尿道上皮组织中 nNOS、eNOS 无明显变化,阴道上皮组织 eNOS 无明显变化。切除卵巢后引起 SUI 大鼠下尿道 NOS 表达进一步升高,其中的作用及机制需要深入研究。

参考文献

- [1] OSTLE Z. Assessment, diagnosis and treatment of urinary incontinence in women [J]. *Br J Nurs*, 2016, 25(2): 84-91.
- [2] LIU X C, WANF S H, WU S H, et al. Exosomes secreted by adipose-derived mesenchymal stem cells regulate type I collagen metabolism in fibroblasts from women with stress urinary incontinence [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2018, 9(1): 159-168.
- [3] MUMTAZ F H, KHAN M A, THOMPSON C S, et al. Nitric oxide in the lower urinary tract: physiological and pathological implications [J]. *BJU Int*, 2000, 85(5): 567-578.
- [4] HEDLUND P. Nitric oxide/cGMP-mediated effects in the outflow region of the lower urinary tract—is there a basis for pharmacological targeting of cGMP? [J]. *World J Urol*, 2005, 23(6): 362-367.
- [5] GROMOTOWICZ-POPLAWSKA A, KLOZA M, ALEKSIEJCZUK M, et al. Nitric oxide as a modulator in platelet-and endothelium-dependent antithrombotic effect of eplerenone in diabetic rats [J]. *J Physiol Pharmacol*, 2019, 70(2): 324-336.
- [6] 方克伟, 杨海北, 李泽惠, 等. 压力性尿失禁动物模型的建立 [J]. *国际泌尿系统杂志*, 2010, 30(6): 739-743.
- [7] LONG C Y, WU C H, LIU C M, et al. The impact of simulated birth trauma and ovariectomy on the gene expression of detrusor muscarinic receptors in female rats [J]. *Int Urogynecol J*, 2010, 21(9): 1163-1168.
- [8] CAPOLICCHIO G, AITKEN K J, GU J X, et al. Extracellular matrix gene responses in a novel ex vivo model of bladder stretch injury [J]. *J Urol*, 2001, 165(6 Pt 2): 2235-2240.
- [9] CHEN H Y, CHEN W C, LIN Y N, et al. Synergistic effect of vaginal trauma and ovariectomy in a murine model of stress urinary incontinence: upregulation of urethral nitric oxide synthases and estrogen receptors [J]. *Mediators Inflamm*, 2014, 2014: 314846.
- [10] BURNETT A L. Nitric oxide control of lower genitourinary tract functions: a review [J]. *Urology*, 1995, 45(6): 1071-1083.
- [11] TIDBALL J G, WEHLING-HENRICKS M. Nitric oxide synthase deficiency and the pathophysiology of muscular dystrophy [J]. *J Physiol*, 2014, 592(21): 4627-4638.
- [12] SEO Y, PARK S W, KIM J Y, et al. Expression of $\alpha 1$ Receptor and nitric oxide synthase in oophorectomized and estrogen-supplemented rat bladder and urethra [J]. *Korean J Urol*, 2014, 55(10): 677-686.
- [13] GAME X, ALLARD J, ESCOURROU G, et al. Estradiol increases urethral tone through the local inhibition of neuronal nitric oxide synthase expression [J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2008, 294(3): R851-857.
- [14] KAMIYAMA Y, MUTO S, MASUDA H, et al. Inhibitory effects of nicorandil, a K ATP channel opener and a nitric oxide donor, on overactive bladder in animal models [J]. *BJU Int*, 2008, 101(3): 360-365.
- [15] EHRÉN I, HALLÉN GRUFMAN K, VRBA M, et al. Nitric oxide as a marker for evaluation of treatment effect of cyclosporine A in patients with bladder pain syndrome/interstitial cystitis type 3C [J]. *Scand J Urol*, 2013, 47(6): 503-508.
- [16] HO M H, BHATIA N N, KHORRAM O. Physiologic role of nitric oxide and nitric oxide synthase in female lower urinary tract [J]. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 2004, 16(5): 423-429.