

钙蛋白酶及其抑制蛋白在女性压力性尿失禁患者尿道周围组织中的表达

杨春波 赵彦侠 金杭美

[摘要] 目的 分析钙蛋白酶及钙蛋白酶抑制蛋白在压力性尿失禁(SUI)患者尿道周围组织中的表达及定位,探讨两者在压力性尿失禁发病中起的作用。方法 选取20例行阴道无张力尿道中段悬吊术的SUI患者(SUI组)和20例行阴道壁囊肿剥除术的非SUI患者(对照组),采用免疫组化EnVision染色法对两组患者尿道周围组织石蜡切片中钙蛋白酶-1、钙蛋白酶-2和钙蛋白酶抑制蛋白的表达区域及水平进行检测。结果 SUI组和对照组尿道周围组织中的上皮细胞、平滑肌细胞中均有钙蛋白酶-1、钙蛋白酶-2和钙蛋白酶抑制蛋白的表达,但间质细胞中未见这三种蛋白的表达。钙蛋白酶-1的表达水平在SUI组和对照组上皮细胞和平滑肌细胞中的表达分别为 2.71 ± 0.45 vs 2.41 ± 0.41 , 2.01 ± 0.40 vs 2.09 ± 0.43 ,两组间比较,差异均无统计学意义(t 分别=1.80、-0.46, P 均 >0.05)。钙蛋白酶-2的表达水平在SUI组和对照组上皮细胞和平滑肌细胞中的表达分别为 3.07 ± 0.36 vs 2.67 ± 0.47 , 2.50 ± 0.42 vs 2.08 ± 0.51 ,两组间比较,差异均有统计学意义(t 分别=2.35、2.28, P 均 <0.05)。钙蛋白酶抑制蛋白的表达水平在SUI组和对照组上皮细胞和平滑肌细胞中的表达分别为 2.91 ± 0.42 vs 3.23 ± 0.39 , 2.69 ± 0.43 vs 3.09 ± 0.45 ,两组间比较,差异均有统计学意义(t 分别=-2.19、-2.35, P 均 <0.05)。结论 钙蛋白酶/钙蛋白酶抑制蛋白表达失衡可能参与压力性尿失禁的发生,钙蛋白酶-2对SUI的发病有促进作用,钙蛋白酶抑制蛋白对SUI的发病有保护作用。

[关键词] 压力性尿失禁; 钙蛋白酶-1; 钙蛋白酶-2; 钙蛋白酶抑制蛋白

Expression of calpains and calpastatin in the urethral peripheral tissues of women with stress urinary incontinence

YANG Chunbo, ZHAO Yanxia, JIN Hangmei. Department of Gynecology, Women's Hospital, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310006, China

[Abstract] **Objective** To investigate the expression and distribution of calpain and calpastatin in urethral surrounding tissue of SUI patients and explore the role of calpain and calpastatin in the pathogenesis of SUI. **Methods** The expressions of calpain-1, calpain-2 and calpastatin were detected with an EnVision immunohistochemistry assay in 40 paraffin-embedded samples of urethral surrounding tissue in SUI patients and control group. **Results** Calpain-1, calpain-2 and calpastatin were expressed in epithelial and smooth muscle tissue of SUI group and control group, but not found in interstitial cells. The expression levels of calpain-1 in epithelial tissue of SUI and control group were 2.71 ± 0.45 and 2.41 ± 0.38 , and in smooth muscle tissue were 2.01 ± 0.40 and 2.09 ± 0.43 . The differences were not statistical significance ($t=1.80$, -0.46 , $P>0.05$). The expression levels of calpain-2 in epithelial tissue of SUI and control group were 3.07 ± 0.36 and 2.67 ± 0.47 , and in smooth muscle tissue were 2.50 ± 0.42 and 2.08 ± 0.51 . The differences were statistical significance ($t=2.35$, 2.28 , $P<0.05$). The expression levels of calpastatin in epithelial tissue of SUI and control group were 2.91 ± 0.42 and 3.23 ± 0.39 respectively, and in smooth muscle tissue were 2.69 ± 0.43 and 3.09 ± 0.45 respectively. The differences were statistical significance ($t=-2.19$, -2.35 , $P<0.05$). **Conclusion** The imbalance expression of calpain/calpastatin may be involved in the occurrence of stress urinary incontinence. Calpain-2 promotes the incidence of SUI, and calpastatin

prevents the incidence of SUI.

[Key words] stress urinary incontinence; calpain-1; calpain-2; calpastatin

DOI: 10.13558/j.cnki.issn1672-3686.2016.02.003

课题项目:浙江省教育厅课题(Y201224994)

作者单位:310006 浙江杭州,浙江大学医学院附属妇产科医院妇四科(杨春波、金杭美);山东省聊城市东昌府区妇幼保健院妇科(赵彦侠)

压力性尿失禁 (stress urinary incontinence, SUI) 是泌尿妇科常见疾病,其定义为:在腹压增加时,出现不自主的尿液自尿道外口溢出。目前病因尚不十分明确,近年来针对压力性尿失禁的发病机制的研究越来越广泛和深入,从宏观解剖逐步深入到微观的分子生物学领域。

钙蛋白酶是一族钙离子依赖性的水解蛋白酶,广泛存在于全身各脏器组织中,参与不同细胞过程。病理状态下,钙离子浓度的异常增高可激活钙蛋白酶,对多种细胞骨架和蛋白质水解酶产生降解作用,造成组织伤害^[1-3]。目前已发现钙蛋白酶系统与人体多种疾病的发生有着密切关系,包括:肌营养不良、缺血性脑损伤、伤口不愈合、肿瘤等^[4-7]。目前发现的钙蛋白酶家族成员至少由15种同工酶组成,可分为普遍存在的微钙蛋白酶(钙蛋白酶-1)和组织特异性的毫钙蛋白酶(钙蛋白酶-2)。钙蛋白酶-1只需微摩尔浓度的Ca²⁺就可激活,而钙蛋白酶-2需毫摩尔级的Ca²⁺浓度才能被激活。钙蛋白酶抑制蛋白是可以抑制钙蛋白酶-1和钙蛋白酶-2活性的一种蛋白质,当钙蛋白酶被Ca²⁺激活后,可迅速与之结合,从而保证钙蛋白酶对底物只进行局部特定位点的水解。

已有研究发现:SUI患者尿道周围组织中钙蛋白酶-2 mRNA和蛋白表达水平平均增高,钙蛋白酶抑制蛋白mRNA表达水平增高^[8]。由此可见,钙蛋白酶及钙蛋白酶抑制蛋白与SUI的发生密切相关。本次研究拟通过分析钙蛋白酶及其抑制蛋白在SUI患者尿道周围组织中的表达及定位,研究其在体内分布情况及在细胞内的分布情况,探讨其在SUI发病中起的作用,并为临床寻找可能抑制SUI发生的药物提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选择2012年1月至12月于浙江大学医学院附属妇产科医院行手术治疗的SUI患者20例,纳入标准:①SUI诊断依据国际控尿协会标准^[9];②在患者腹压增加时(咳嗽、屏气等)见尿液不自主自尿道外口溢出,尿动力学检查未提示膀胱逼尿肌不自主收缩,尿常规检查无异常。排除近3个月内服用过激素类药物的研究对象。选择同期20例因阴道壁囊肿行手术治疗患者作为对照组,纳入标准:①无尿失禁症状;②妇科检查无阴道壁膨出或子宫脱垂,术后病理检查证实无子宫肌瘤或子宫内膜异位症等与雌激素相关疾病患者。排除近3个月内服用过激素类药物患者。本次研究均获得患者的知情同意。两

组患者的年龄、分娩次数、体重指数等见表1,两组间各因素比较,差异均无统计学意义(P 均 >0.05)。

表1 两组患者一般临床资料

组别	n	年龄/岁	分娩次数/次	体重指数/kg/m ²
SUI组	20	47.91 ± 4.40	1.40 ± 0.48	24.63 ± 1.55
对照组	20	45.52 ± 4.19	1.25 ± 0.43	23.64 ± 1.38

1.2 方法

SUI组患者行阴道无张力尿道中段悬吊术,对照组患者行阴道壁囊肿剥除术。术中均由资深医师切取患者尿道口下方1~4 cm处,长约2 cm、宽约1 cm的包括阴道前壁在内的尿道周围组织(主要包括黏膜层、黏膜下层和平滑肌层),取下的组织用甲醛固定,石蜡包埋,切片四份,一份行苏木素-伊红染色,三份用于免疫组化实验。免疫组化方法为Envision法:切片常规脱蜡水化,高压热修复,再用3%过氧化氢阻断内源性过氧化物酶,依次加一抗、二抗,二氨基联苯胺显色,并用苏木素-伊红复染后透明封片。同时用磷酸缓冲盐液代替一抗、二抗作阴性对照。

1.3 免疫组化结果判定

免疫组化结果判定采取组织学积分H-score法^[10],对钙蛋白酶-1、钙蛋白酶-2和钙蛋白酶抑制蛋白在上皮细胞、间质细胞、平滑肌细胞中的表达进行定位和半定量分析。尿道周围组织细胞阳性着色呈棕黄色或黄褐色,并呈颗粒状,主要位于胞浆内,部分定位于胞膜、胞核,背景呈紫蓝色^[11]。胞浆、胞膜和胞核黄染即为钙蛋白酶-1、钙蛋白酶-2和钙蛋白酶抑制蛋白阳性表达。

免疫组化结果由两位资深病理科医师独立判定。在染色区域随机选择5个视野,每个视野计数100个细胞,按以下标准将染色细胞数量分为4级:0级阴性,细胞浆内、胞膜和胞核无黄褐色颗粒出现; (+)级弱阳性,细胞浆内、胞膜和胞核出现较浅的黄褐色颗粒; (++)级中度阳性,介于弱阳性和强阳性之间; (+++)级强阳性,细胞浆内、胞膜和胞核有明显的黄褐色颗粒。4级分别记0、1、2、3分。以Pi代表同一染色强度范围内阳性细胞占切片标本中所有观察细胞的百分比,以i为0、1、2、3,分别代表(-)、(+)、(++)、(+++)4个染色强度,每张切片中阳性部分的组织学积分为H-score = $\sum Pi(i+1)$ 。

1.4 统计学方法

采用SPSS 20.0软件进行分析。呈正态分布数据采用独立样本t检验,呈非正态分布数据则采用非参数检验。设 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SUI组和对照组尿道周围组织中钙蛋白酶-1的表达及定位

2.1.1 两组间尿道周围组织中钙蛋白酶-1的表达经免疫组化Envision法染色,在上皮细胞、纤维细胞、平滑肌细胞中表达的结果分别如封二图1~6。

由封二图1、4可见,钙蛋白酶-1在SUI组及对照组阴道上皮细胞中均呈阳性表达,呈黄褐色染色,以胞浆、胞膜为明显;由封二图2、5可见,钙蛋白酶-1在SUI组及对照组阴道间质细胞中均无明显表达;由封二图3、6可见,钙蛋白酶-1在SUI组及对照组阴道平滑肌细胞中均呈阳性表达,呈黄褐色染色,以胞浆为明显。

2.1.2 SUI组和对照组尿道周围组织中钙蛋白酶-1的表达水平见表2

表2 SUI组和对照组尿道周围组织中钙蛋白酶-1的表达水平

组别	n	上皮H-score值	平滑肌H-score值
SUI组	20	2.71 ± 0.45	2.01 ± 0.40
对照组	20	2.41 ± 0.38	2.09 ± 0.43

由表2可见,钙蛋白酶-1在SUI组及对照组的上皮细胞、平滑肌细胞中的表达,差异均无统计学意义(t 分别=1.80、-0.46, P 均>0.05)。

2.2 SUI组和对照组尿道周围组织中钙蛋白酶-2的表达及定位

2.2.1 两组间尿道周围组织中钙蛋白酶-2的表达经免疫组化Envision法染色,在上皮细胞、纤维细胞、平滑肌细胞中表达的结果分别如封二图7~9,封三10~12。

由封二图7和封三图10可见,钙蛋白酶-2在SUI组阴道上皮细胞中呈强阳性表达,在对照组阴道上皮细胞中呈阳性表达,均呈黄褐色染色,以胞浆、胞膜为明显;由封二图8和封三图11可见,钙蛋白酶-2在SUI组及对照组阴道间质细胞中均无明显表达;由封二图9和封三图12可见,钙蛋白酶-2在SUI组平滑肌细胞中呈强阳性表达,在对照组阴道平滑肌细胞中呈阳性表达,均呈黄褐色染色,以胞浆为明显。

2.2.2 SUI组和对照组尿道周围组织中钙蛋白酶-2的表达水平见表3

由表3可见,钙蛋白酶-2在SUI组及对照组的上皮细胞、平滑肌细胞中的表达差异均有统计学意义(t 分别=2.35、2.28, P 均<0.05)。

表3 SUI组和对照组尿道周围组织中钙蛋白酶-2的表达水平

组别	n	上皮H-score值	平滑肌H-score值
SUI组	20	3.07 ± 0.36*	2.50 ± 0.42*
对照组	20	2.67 ± 0.47	2.08 ± 0.51

注:*:与对照组比较, P <0.05。

2.3 SUI组和对照组尿道周围组织中钙蛋白酶抑制蛋白的表达及定位

2.3.1 两组间尿道周围组织中钙蛋白酶抑制蛋白的表达经免疫组化Envision法染色,在上皮细胞、纤维细胞、平滑肌细胞中表达的结果分别如封三图13~18。

由封三图13、16可见,钙蛋白酶抑制蛋白在SUI组阴道上皮细胞中表达减弱,在对照组阴道上皮细胞中呈阳性表达,均呈黄褐色染色,以胞浆、胞膜为明显;由封三图14、17可见,钙蛋白酶抑制蛋白在SUI组及对照组阴道间质细胞中均无明显表达;由封三图15、18可见,钙蛋白酶抑制蛋白在SUI组平滑肌细胞中表达减弱,在对照组阴道平滑肌细胞中呈阳性表达,均呈黄褐色染色,以胞浆为明显。

2.3.2 SUI组和对照组尿道周围组织中钙蛋白酶抑制蛋白的表达水平见表4

表4 SUI组和对照组尿道周围组织中钙蛋白酶抑制蛋白的表达水平

组别	n	上皮H-score值	平滑肌H-score值
SUI组	20	2.91 ± 0.42*	2.69 ± 0.43*
对照组	20	3.23 ± 0.39	3.09 ± 0.45

注:*:与对照组比较, P <0.05。

由表4可见,钙蛋白酶抑制蛋白在SUI组及对照组的上皮细胞、平滑肌细胞中的表达,差异均有统计学意义(t 分别=-2.19、-2.35, P 均<0.05)。

3 讨论

目前已发现,钙蛋白酶广泛存在于全身各脏器组织中,但以肌肉组织和神经组织中为明显。这其中又以钙蛋白酶与肌肉组织病变之间关系的研究最为深入。肌肉营养不良是最早发现的与钙蛋白酶相关联的疾病,其发病机制与钙离子平衡失衡直接相关。通过对患有肌营养不良症的病人体内肌肉组织检测,常常发现在肌营养不良的肌肉细胞中钙蛋白酶的活性增加,钙蛋白酶抑制蛋白被降解,或者钙蛋白酶蛋白的总量增加^[12]。这些检测表明,在肌营养不良和其他钙蛋白酶相关病理中钙蛋白酶的活

性增加了,而钙蛋白酶抑制蛋白的丢失对钙蛋白酶活性的增加有潜在的促进作用。

本次研究发现钙蛋白酶-1在SUI组与对照组两组间上皮细胞和平滑肌细胞间的表达无明显差异(P 均 >0.05),而钙蛋白酶-2在两组上皮细胞和平滑肌细胞间的表达则均存在差异(P 均 <0.05)。可能是因为在细胞内钙离子的波动在微摩尔浓度水平以下,所以钙蛋白酶-1很可能在正常生理条件下发挥功能,介导细胞正常生理活动,而钙蛋白酶-2则可能在病理情况(细胞内钙超载条件)下才能激活,介导组织损伤并最终导致疾病的发生^[13,14]。钙蛋白酶抑制蛋白是一种内源性、需 Ca^{2+} 的钙蛋白酶抑制蛋白,在细胞内普遍存在,参与肌细胞生长与代谢过程。该蛋白是迄今为止唯一的特异性钙蛋白酶家族抑制剂。钙蛋白酶抑制蛋白与钙蛋白酶同时存在于细胞质和细胞膜中。一分子的钙蛋白酶抑制蛋白可同时抑制四分子钙蛋白酶的活性^[15]。钙蛋白酶抑制蛋白含有4个抑制区,当钙蛋白酶被 Ca^{2+} 激活后,如果附近有钙蛋白酶抑制蛋白存在,将迅速与之结合而抑制钙蛋白酶活性,从而保证钙蛋白酶对底物只进行局部的特定位点的水解。在本次研究中,发现在SUI组和对照组患者两组尿道周围组织的上皮和平滑肌细胞中钙蛋白酶抑制蛋白的表达均存在差异(P 均 <0.05)。在SUI患者中,钙蛋白酶抑制蛋白的表达明显减弱,由此可以推测,在妊娠、分娩等情况下,盆底组织极度牵拉、受压,细胞受损,由于 Ca^{2+} 内流,导致钙蛋白酶过度激活,钙蛋白酶抑制蛋白受到抑制,使钙蛋白酶/钙蛋白酶抑制蛋白表达失衡,从而导致肌原纤维和肌细胞、上皮细胞基质、细胞骨架蛋白等的降解,组织张力降低,致使SUI的发生。王立靖等^[16]对长期负荷跑台的大鼠腓肠肌进行检测,发现负荷运动后腓肠肌纤维出现损伤和炎症反应,肌纤维中的毫钙蛋白酶的表达式升高,微钙蛋白酶未表现出明显差异,钙蛋白酶抑制蛋白的活性增高,表明毫钙蛋白酶在肌肉损伤的过程中起重要作用,在损伤发生的急性期,钙蛋白酶抑制蛋白活性的增高对肌肉的损伤有保护作用。

本次研究还发现,钙蛋白酶/钙蛋白酶抑制蛋白系统在SUI患者尿道周围组织中的表达位于平滑肌细胞及上皮细胞,而在间质细胞中则无明显表达。这与钙蛋白酶系统在体内分布特点有关。钙蛋白酶主要存在于肌细胞内,在机体年龄增长、妊娠、分娩、或由于长期咳嗽、便秘导致腹内压增加,盆底组

织受压后处于缺血、缺氧、去神经化等损伤时,细胞外 Ca^{2+} 内流,引起细胞内 Ca^{2+} 超载,从而使钙蛋白酶被激活,开始降解肌原纤维、骨架蛋白及细胞外基质等。肌原纤维被降解后,将导致肌细胞收缩力减弱,组织松弛,这可能进一步导致压力性尿失禁的发生。Kampfl等^[17]发现在实验性脑外伤、脑缺血、脊髓损伤等神经元的退变过程中,细胞内钙离子内稳态被破坏,导致钙超载,从而激活钙蛋白酶,产生不可逆地降解底物,细胞骨架蛋白降解和丢失,严重的将导致细胞的凋亡、坏死。钙蛋白酶-1和钙蛋白酶-2在上皮细胞中表达,而在纤维细胞中未表达,分析原因与细胞的代谢活跃程度有关。阴道上皮细胞处于不断的增生、成熟、脱落过程中,细胞内代谢活跃。而间质细胞代谢相对低下,故钙蛋白酶-1和钙蛋白酶-2表达较低,未达到明显染色程度。

近年来有关钙蛋白酶抑制剂的研究较为热门,已有较多研究证实钙蛋白酶抑制剂能减少钙蛋白酶对组织的损伤。钙蛋白酶抑制剂是人工合成的高效的、具有细胞渗透性的抑制剂。Peng等^[18]通过大鼠脑神经缺血再灌注损伤实验发现,钙蛋白酶抑制剂对脑神经缺血损伤有明显保护作用,能显著减少脑神经细胞缺氧后钙蛋白酶激活导致的损伤。与此同时,更多钙蛋白酶抑制剂如MDL28170、SJA6017等也被发现对局灶性脑缺血神经细胞损伤及弥漫性脑损伤的脑功能有保护作用^[19,20]。由此可见,随着研究的开展,更多的钙蛋白酶抑制剂将被发现,特异的钙蛋白酶抑制剂将能够治疗神经肌肉及神经的退行性疾病。

参考文献

- 1 Ono Y, Sorimachi H. Calpains—An elaborate proteolytic system[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1824(1): 224-236.
- 2 Hamid RM. Role of calpain in apoptosis[J]. *Cell J*, 2011, 13(2): 65-72.
- 3 Redpath GMI, Woolger N, Piper AK, et al. Calpain cleavage within dysferlin exon 40a releases a synaptotagmin-like module for membrane repair[J]. *Mol Biol Cell*, 2014, 25(19): 3037-3048.
- 4 Vanessa MM, Marial IM, Bruno PC, et al. Involvement of calpains in adult neurogenesis: implications for stroke[J]. *Front Cell Neurosci*, 2015, 9(22): 1-9.
- 5 Picos-Cárdenas VJ, Sáinz-González E, Miliar-García A, et al. Calpain-10 gene polymorphisms and risk of type 2 dia-