

# 血浆和尿中内皮素、一氧化氮在神经源性膀胱中的检测及意义

李守林<sup>1</sup> 刘晓东<sup>1</sup> 姜俊海<sup>1</sup> 王 浩<sup>1</sup> 徐其涛<sup>1</sup> 陈维秀<sup>2</sup> 陈雨历<sup>2</sup>

**【摘要】 目的** 探讨内皮素和一氧化氮在神经源性膀胱病人血浆和尿中含量的变化及其临床意义。**方法** 将 2003 年 10 月至 2004 年 8 月明确诊断的 22 例患儿作为实验组,均为反射亢进型膀胱源性膀胱。留取空腹血和晨尿,采用酶联免疫方法检测血浆和尿中内皮素(ET-1),一氧化氮(NO)含量,选取同期入院年龄匹配的儿童的血尿标本(腹股沟斜和鞘膜积液 30 例)设为对照组。**结果** 实验组 22 例,血浆 ET-1 含量( $0.487 \pm 0.039$ ) fmol/mL, NO 含量( $69.57 \pm 36.68$ )  $\mu$ mol/L,尿中 ET-1 含量为( $0.453 \pm 0.029$ ) fmol/mL, NO 含量( $392.36 \pm 121.1$ )  $\mu$ mol/L。对照组血浆 ET-1 含量( $0.494 \pm 0.117$ ) fmol/mL, NO 含量( $74.56 \pm 11.39$ )  $\mu$ mol/L,尿中 ET-1 含量( $0.548 \pm 0.073$ ) fmol/mL, NO 含量( $268.92 \pm 88.38$ )  $\mu$ mol/L。实验组中血浆 ET-1 含量高于尿中 ET-1 含量( $P < 0.01$ ),尿中 ET-1 含量低于对照组( $P < 0.05$ ),尿中 NO 含量高于对照组( $P < 0.05$ );血浆中 ET-1、NO 含量较对照组无明显差异( $P > 0.05$ )。**结论** 反射亢进型神经源性膀胱病人血浆中 ET 和 NO 的含量处于正常水平;而尿中 ET-1 和 NO 比例失衡。

**【关键词】** 膀胱,神经源性;内皮缩血管肽类;一氧化氮

**The clinical significance of endothelin and nitrogen monoxidum of plasma and urinary in neurogenic bladder diseases.** LI Shou-lin, LIU Xiao-dong, JIANG Jun-hai, et al. Department of Urinary Surgery of Shenzhen Children's Hospital, Shenzhen 518026, China

**【Abstract】 Objective** To explore the quantity of endothelin and nitrogen monoxidum in blood plasm and urinary and its significance in neurogenic bladder diseases. **Methods** The 22 patients of neurogenic bladder were from the period during October 2003 to August 2004, 10 months ~ 14 years old, the average was  $6.28 \pm 3.12$  years old. All patients underwent urodynamic study, nervous electromyogram, voiding cysto urethro graphy and intravenous pyelography(IVP). Using zymo-immunity, we detected the contents of endothelin and nitrogen monoxidum blood of empty stomach and urina sanguinis. And using chrome disoxidation biochemistry, we detected nitrogen monoxidum(NO) from blood and urinary, and control group age match 30 cases (oblique inguinal hernia and funicular hydrocele). **Results** All patients suffered to hyperreflexia. The endothelin-1 in plasma was  $0.487 \pm 0.039$  fmol/mL, and in the urinary was ( $0.453 \pm 0.029$ ) fmol/mL, NO in plasma was ( $69.57 \pm 36.68$ )  $\mu$ mol/L, and in the urinary was ( $392.36 \pm 121.1$ )  $\mu$ mol/L. In control group the endothelin-1 in plasma was ( $0.494 \pm 0.117$ ) fmol/mL, and in the urinary was ( $0.548 \pm 0.073$ ) fmol/mL. NO in plasma was ( $74.56 \pm 11.39$ )  $\mu$ mol/L, and in the urinary was ( $268.92 \pm 88.38$ )  $\mu$ mol/L. Endothelin-1 in plasma was higher than in urinary( $P < 0.01$ ), and NO in the urinary was higher than that of normal children( $P < 0.05$ ). Endothelin-1 and NO of plasma in neurogenic bladders were not significant with normal children( $P > 0.05$ ). **Conclusion** Endothelin and NO in plasma are at the normal level in hyperreflexia patients, but in the urinary lied disproportion of endothelin and NO, and endothelin is higher, and NO is lower than normal.

**【Key words】** Urinary Bladder, Neurogenic; Endothelins; Nitric Oxide

doi:10.3969/j.issn.1671-6353.2014.06.005

基金项目:山东省自然科学基金博士基金(项目编号:2005-BS03018),深圳市科技和信息局(项目编号:200703017)。

作者单位:1,深圳市儿童医院泌尿外科(深圳市,518026), E-mail: lishoulin@126.com,2,山东大学第二医院小儿外科(山东省济南市,250033)。

在含平滑肌细胞的组织器官中,含有调节平滑肌张力引起平滑肌细胞收缩和舒张因子,即内皮源性血管收缩因子(EDCF)和内皮源性血管舒张因子(EDRF)。目前内皮素(ET)和一氧化氮(NO)的研究成为这两种因子的代表。有关 ET 和 NO 在神经

源性膀胱中的协同研究尚未见报道。我们收集 2003 年 10 月至 2004 年 8 月诊断明确的患儿 22 例,通过检测血浆和尿中 ET-1 和 NO 的含量,探讨其含量变化在神经源性膀胱病人中的临床意义。

材料与方法

一、临床资料

实验组 22 例,平均年龄(6.28 ± 3.12)岁,男女为 2 : 1。病种:脊髓脊膜膨出伴脊髓栓系术后 16 例,脊柱裂伴脊髓栓系术后 5 例,肛门闭锁伴脊柱裂 1 例,均表现为不同程度大小便失禁,马鞍区感觉减退或丧失,球海绵体反射减弱或丧失,骶反射消失;9 例合并下肢明显异常:肌肉萎缩、肌力减退、高弓足、跛行。

对照组 30 例,选取同期入院年龄匹配的儿童血、尿标本(腹股沟斜疝和鞘膜积液 30 例)作对照。

二、监测方法

1. 仪器与试剂:BEP2000 酶标仪(美国), Endo-thelin-1 ELISA 酶联免疫试剂盒(美国 SAN JOSE, CA),一氧化氮试剂盒(酶法)(北京晶美)。

2. 血浆、尿中内皮素(ET-1)检测:①收集所有患儿清晨空腹血 3 mL,离心沉淀后留取上清液,低温保存。清晨尿 5 mL,离心沉淀后,留取上清液,低温保存。留置正常儿童空腹血和清晨尿,同法处理低温保存。②采用酶联免疫方法:ET-1 + ET-1 抗体(ET-1 capture antibody) + 抗 ET-1 抗体的抗体(anti-ET-1 antibody),anti-ET-1 antibody 与辣根过氧化物酶结合,37 ℃ 孵育 20 min,然后用缓冲液清洗掉未结合的标记抗体。加入 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/TMB 孵育 3

min,然后进行比色测定。

3. 血浆、尿中 NO 的检测:以血清 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>、NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 浓度之和作为 NO 生成的指标。本试剂盒用硝酸还原酶特异性地将 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 还原为 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>,NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 与显色剂作用生成有色物质,通过显色深浅测定其浓度的高低,OD 值大小代表 NO 水平。

三、统计学方法

所有数据通过 SPSS10.0 统计软件进行统计学分析,组间比较采取 *t* 检验,*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

一、血浆和尿中 ET-1 含量

实验组血浆和尿中 ET-1 含量分别为(0.487 ± 0.039)fmol/L、(0.453 ± 0.029)fmol/L,两两比较差异有统计学意义(*t* = 3.93, *P* < 0.01),血浆 ET-1 含量对照组[(0.494 ± 0.117)fmol/L]与实验组比较差异无统计学意义(*t* = 0.26, *P* > 0.05),对照组与实验组尿中 ET-1 含量分别为(0.548 ± 0.073)fmol/L、(0.453 ± 0.029)fmol/L,差异有统计学意义(*t* = 2.52, *P* < 0.05),详见表 1。

二、血浆和尿中 NO 含量

实验组血浆和尿中 NO 含量分别为(69.57 ± 36.68)μmol/L、(392.36 ± 121.1)μmol/L,二者比较差异有统计学意义(*t* = 4.96, *P* < 0.01);血浆中 NO 含量实验组与对照组(74.55 ± 11.39)μmol/L 比较,差异无统计学意义(*t* = 1.06, *P* > 0.05);尿中 NO 含量实验组与对照组(268.92 ± 88.38)μmol/L 比较,差异有统计学意义(*t* = 2.78, *P* < 0.05),详见表 1。

表 1 血浆和尿液中 ET-1、NO 含量( $\bar{x} \pm s$ )  
Table 1 ET-1, the NO content in plasma and urine( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	ET-1 (fmol/L)		血浆 NO(μmol/L)	尿中 NO (μmol/L)
		血浆	尿液		
实验组	22	0.487 ± 0.039	0.453 ± 0.029	69.57 ± 36.68	392.36 ± 121.1
对照组	30	0.494 ± 0.117	0.548 ± 0.073	74.55 ± 11.39	268.92 ± 88.38
<i>t</i> 值		0.26	2.52	1.06	2.78
<i>P</i> 值		>0.05	<0.05	>0.05	<0.05

注:实验组血浆与尿液中 ET-1 比较,*t* = 3.93, *P* < 0.01, NO 含量比较,*t* = 4.96, *P* < 0.01。

讨 论

ET 与膀胱病理改变的关系近年来已引起了临床重视,正常膀胱组织中都有 ET 的表达,且分布大

量的 ET 受体,发挥着一定的生理功能。ET 在膀胱组织中的作用主要与维持膀胱的张力有关,其表达的增加与减少影响着膀胱的生理功能。

Uckert 等<sup>[1]</sup>研究一些活性肽对膀胱的影响,包括心钠素(atrial natriuretic peptide ANP),钙调素

(calcitonin gene related peptide, CGRP), ET-1, P 物质(SP)和血管活性肠肽(vasoactive intestinal polypeptide, VIP),认为是 ET-1、SP 和 VIP 调节膀胱的收缩与松弛。Schrode 等<sup>[2]</sup>通过给膀胱出口梗阻的小鼠口服 ET 转换酶抑制剂(endothelin converting enzyme, ECE)-WO-03028719,发现对膀胱组织重量无影响,但能明显改善膀胱功能,降低逼尿肌的过度活动,降低膀胱压力。Mumtaz 等<sup>[3]</sup>观察发现 ET 能明显促进糖尿病新西兰白兔(New Zealand White rabbit)膀胱平滑肌细胞的增殖,并能被 ET 受体抑制剂 BQ123、BQ788 所抑制,认为 ET 对糖尿病平滑肌细胞的增殖具有重要的作用。

本研究结果显示,神经源性膀胱病人尿液中 ET-1 的含量明显少于正常人,其机制尚不明确;正常人血浆和尿液中 ET-1 的含量无明显差异,而神经源性膀胱病人尿中 ET-1 含量低于血浆浓度,同时低于正常人尿中 ET-1,引起这种改变的机制目前不清楚。正常情况下尿液中 ET-1 是由肾小球的滤过,肾小管、输尿管黏膜、膀胱黏膜、尿道黏膜等部位产生,其产生的量目前没有明确报道,我们的检测结果是 $(0.548 \pm 0.073)$  fmol/L。神经源性膀胱病人多伴有膀胱出口梗阻,剩余尿多,尿中 ET-1 含量下降。Girchev 等<sup>[4]</sup>结扎小鼠单侧输尿管并观察该侧尿液中 ET-1 的含量,发现尿中 ET-1 含量升高,而 NO 降低,并发现 ETA 和 ETB 受体表达增高。因此,尿中 ET-1 的降低可能发生在下尿路。下尿路可能存在着尿中 ET-1 减少的机制,可能存在着膀胱黏膜屏障功能障碍。既往的研究提示肾组织如:肾小球内皮细胞(EC)、肾小球表皮细胞(GEC)、肾小球系膜细胞(MC)和肾小管表皮细胞都能合成 ET-1 和 ET-3。因此尿液中 ET-1 的减少,可能与膀胱黏膜的功能改变有关,Birder 等<sup>[5]</sup>的研究显示该类病人膀胱黏膜屏障功能差,容易诱发间质性膀胱炎。因此,膀胱组织成份可以与尿中成份相互渗透,一方面反射亢进型膀胱组织血运差,针对膀胱组织而言,血源性 ET 下降,膀胱组织 ET 产生有可能下调;另一方面病理情况下膀胱组织 ET 的利用增加。

本研究结果显示,神经源性膀胱病人尿液中 ET-1 和 NO 的处于失衡状态,Khan 等<sup>[6]</sup>研究认为 ET 与 NO 在膀胱尿道中应保持一定的平衡比例,一旦这种平衡遭到破坏或异常,就容易发生膀胱出口梗阻,这种病理改变仅次于机械性尿路出口梗阻。本组 22 例,均为反射亢进性膀胱,多数表现为膀胱出口梗阻。

目前已确定的一氧化氮合酶(NOS)有 3 种亚型,分为神经元型 NOS(nNOS)、诱导型 NOS(iNOS)和内皮型 NOS(eNOS)。nNOS 和 eNOS 在生物状态下即有表达,又合称为结构型 NOS(cNOS),活性均为  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM 依赖性,受细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度的生理性调节。iNOS 受细胞因子等刺激后诱导性表达,其活性为非  $\text{Ca}^{2+}$  依赖性,但其诱导过程则为  $\text{Ca}^{2+}$  依赖性。Ehren 等<sup>[7]</sup>发现在人尿道中存在着高  $\text{Ca}^{2+}$  依赖性 NOS 活性,其次为膀胱颈部,逼尿肌中最低。非  $\text{Ca}^{2+}$  依赖性的 NOS 则未见于下尿路。另有研究提示,泌尿生殖道中 nNOS 对 NO 的合成起主要作用。NO 普遍存在于下尿路,尤其以膀胱颈和尿道为主,形态学研究证实人体和动物的膀胱、尿道中均有 NOS 阳性神经存在,其黏膜上皮及血管内皮、平滑肌细胞等也可表达 NOS 免疫反应活性(NOS IR)。Bennett 等<sup>[8]</sup>为了阐明 NO 在排尿时尿道出口活动中的作用,排尿时记录尿道压力和尿道括约肌电活动,并应用 NOS 抑制剂 N-硝基-L-精氨酸(N-nitro-L-arginine),发现能明显抑制尿道的松弛,提出排尿过程中平滑肌和提纹肌共同参与尿道松弛反射活动,处于主导地位的神传递因子并介导尿道平滑肌松弛反应的递质是 NO。Wai 等<sup>[9]</sup>对小鼠尿道去神经的研究认为尿道周围神经元包括氮能神经元支配尿道内层平滑肌的活动,尿道周围去神经引起尿道平滑肌松弛障碍,而对外括约肌收缩性没有影响。

Birder 等<sup>[10]</sup>在体外膀胱平滑肌条放置微传感器即时检测组织 NO 的含量,分别加入神经传入毒素(辣椒素,capsaicin)、 $\alpha/\beta$  肾上腺素激动剂(去甲肾上腺素,NE),发现肾上腺素在去神经膀胱组织中介导的 NO 释放来自于膀胱黏膜,辣椒素介导的膀胱去神经组织 NO 明显降低,认为 NE 能促进膀胱黏膜产生 NO,而辣椒素既能促进膀胱上皮细胞产生 NO,又能促进有神经的膀胱组织产生 NO。认为 NO 既能调整膀胱上皮细胞的完整性,又可以在其他组织中发挥机能,这种肾上腺素激动剂调整结构型 NOS(cNOS)活性,在膀胱和尿道中提供了一种新的 NO 调节机制。因此,正常膀胱组织 nNOS 的表达主要分布在膀胱颈部的平滑肌和膀胱间质中,提示 nNOS 主要分布在膀胱颈和尿道中,其 NO 的合成主要受 nNOS 的调节。而很多研究显示神经源性膀胱组织 nNOS 表达下调<sup>[11]</sup>。

NOS 普遍存在于下尿路,尤其以膀胱颈和尿道为主,NOS 免疫组化方法显示:在豚鼠膀胱壁内神经元中有 50%~68% 呈 NOS-IR,而人则为 72%~

96%。无论在人或豚鼠的膀胱逼尿肌中,均存在中等分布的 NOS-IR 神经末梢,在尿道肌则较密集。免疫活性神经也投射到上皮下层及血管周围,但很少见于壁内神经节。很多研究显示如前列腺肥大等造成的膀胱出口梗阻病人,膀胱壁 NOS-IR 神经末梢,膀胱平滑肌肥厚,而 iNOS 表达增加,因此尿液中 NO 的增高可能源于 iNOS。

Birder 等<sup>[12]</sup>通过测定间质性膀胱炎的猫膀胱平滑肌细胞和黏膜细胞 NO 含量,发现随着组织 iNOS 表达增高,NO 产生明显高于健康组。间质性膀胱炎黏膜上皮受损,而 iNOS 介导的 NO 可引起膀胱尿道黏膜上皮屏障功能受损,提出源于 iNOS 的 NO 可以导致上皮屏障机能不良。结合本组资料,我们认为神经源性膀胱病人尿中 ET-1 和 NO 比例失衡,一方面可能引起膀胱黏膜机能不良,另一方面组织中大量的 NO 通过弥散原理扩散到尿液中,引起尿液中 NO 的增高,这种 iNOS 源性的 NO 将直接影响着膀胱的生理功能影响。

膀胱的功能活动主要依赖于膀胱的神经活动,任何原因引得膀胱的去神经改变,必然导致膀胱功能异常。失神经支配的膀胱组织常常对非肾上腺素能和非胆碱能递质敏感,一方面通过平滑肌细胞表面受体的改变而适应组织功能,另一方面异常分布的受体又可以改变或加速膀胱其他病理过程。

## 参 考 文 献

- 1 Uckert S, Stief CG, Lietz B, et al. Possible role of bioactive peptides in the regulation of human detrusor smooth muscle-functional effects in vitro and immunohistochemical presence [J]. World J Urol, 2002,20(4):244-249.
- 2 Schroder A, Tajimi M, Matsumoto H, et al. Protective effect of an oral endothelin converting enzyme inhibitor on rat detrusor function after outlet obstruction[J]. J Urol, 2004, 172(3):1171-1174.
- 3 Mumtaz FH, Shukla N, Sullivan ME, et al. Inhibition of diabetic bladder smooth muscle cell proliferation by endothelin receptor antagonists[J]. Urol Res,2000,28(4):254-259.
- 4 Girchev R, Markova P, Mikhov D, et al. Renal nerves and endothelins interaction in the control of renal excretory function in conscious Long-Evans rats [J]. Auton Neurosci, 2000,84(1-2):107-110.
- 5 Birder LA, Apodaca G, De Groat WC, et al. Adrenergic- and capsaicin-evoked nitric oxide release from urothelium and afferent nerves in urinary bladder[J]. Am J Physiol, 1998,275(2 Pt 2):F226-229.
- 6 Khan MA, Thompson CS, Dashwood MR, et al. Endothelin-1 and nitric oxide in the pathogenesis of urinary tract disorders secondary to bladder outlet obstruction[J]. Curr Vasc Pharmacol,2003,1(1):27-31.
- 7 Ehren I, Adolfsson J, Wiklund NP. Nitric oxide synthase activity in the human urogenital tract[J]. Urol Res, 1994, 22(5):287-290.
- 8 Bennett BC, Kruse MN, Roppolo JR, et al. Neural control of urethral outlet activity in vivo: role of nitric oxide[J]. J Urol,1995,153(6):2004-2009.
- 9 Wai CY, Liehr P, Tibbals HF. Effect of periurethral denervation on function of the female urethra[J]. Am J Obstet Gynecol, 2003,189(6):1637-1645.
- 10 Birder LA, Apodaca G, De Groat WC, et al. Adrenergic- and capsaicin-evoked nitric oxide release from urothelium and afferent nerves in urinary bladder[J]. Am J Physiol, 1998,275(2 Pt 2):F226-229.
- 11 杨险峰, 范应中, 王家祥, 等. 反射亢进型神经性膀胱逼尿肌氮能神经分布和一氧化氮含量的变化[J]. 河南医科大学学报, 2000, 35: 301-303.
- 12 Birder LA, Wolf-Johnston A, Buffington CA, et al. Altered inducible nitric oxide synthase expression and nitric oxide production in the bladder of cats with feline interstitial cystitis[J]. J Urol, 2005,173(2):625-629.