

## 糖尿病大鼠膀胱逼尿肌超微结构的改变

冯建华 邓丽萍 曾祥建

**摘要** 目的 观察 2 型糖尿病大鼠膀胱逼尿肌超微改变,从细胞形态学分析糖尿病膀胱功能障碍发病机理。方法 建立 STZ 诱导糖尿病大鼠模型,在 4、12 周时电镜下观察膀胱逼尿肌超微结构。结果 电镜下逼尿肌表现为逼尿肌细胞体积增大,SMC 之间的间隙缩小,细胞间胶原纤维增多,细胞间中间连接减少,胞突连接及缝隙连接多见。12 周时上述改变较 4 周明显加重。与时间有明显相关性,此损害过程为一个神经纤维束减少、膀胱逼尿肌代偿与重建,最后导致膀胱功能障碍的过程。结论 糖尿病早期,大鼠膀胱逼尿肌的平滑肌、细胞间质和神经纤维均有改变,随着时间的延长变明显。形态学方面的检测为神经电生理检查和尿动力学提供佐证,为临床诊断治疗糖尿病膀胱病提供依据。

**关键词** 糖尿病;糖尿病膀胱病;超微结构

**中图分类号** R587.1 **文献标识码** A **文章编号** 1009-9727(2012)1-15-03

Ultrastructural changes of bladder detrusor of non-insulin dependent diabetes mellitus rats. FENG Jian-hua, DENG Li-ping, ZENG Xiang-jian. (Longgang District Central Hospital, Shenzhen 518116, Guangdong P. R. China)

**Abstract** Objective To investigate pathological changes of the diabetic rats detrusor and pathogenesis of bladder dysfunction. Methods STZ induction diabetes rat model was established, the ultrastructure of detrusor of rats in control group and observation group was observed 4 and 12 weeks later under electron microscope. Results The detrusor under the electron microscope demonstrated the increase of detrusor muscle cell volume, the gap between SMC was narrowing, collagen fibers among cells increased, intercellular connections reduced, bursting cellular connection joints and connections. Such changes were significant at 12 weeks than at 4 weeks and apparently associated with time, the damage resulted in a process of a nerve fiber bundle reduction, adaptation and reconstruction of bladder detrusor muscle and finally dysfunction of the urinary bladder. Conclusion The smooth muscle, interstitial cells and nerve fibers of diabetic rat bladder detrusor, have changed in the early stage under the electron microscope, with the extension of the time, this change significantly may affect bladder function. Detection of morphology can accurately provide support for urodynamic and nerve electrophysiological examination, accurate and provide the basis for clinical diagnosis and treatment of diabetic bladder disease.

**Key words** Diabetes; Diabetic bladder disease; Ultrastructure

糖尿病膀胱病(Diabetic cystopathy, DCP)亦称为糖尿病神经源性膀胱(DNB)、糖尿病神经源性膀胱尿道功能障碍(NVUDD),是糖尿病引起的泌尿系统并发症之一。DCP 是糖尿病患者的常见病发症,其发病率约为 25%~85%<sup>[1]</sup>。DCP 的发生率与患者的性别和年龄无关,发生率随糖尿病病程延长而增加,病程 10 年约有 25% 的发生率,病程超过 25 年则发生率大于 50%<sup>[2]</sup>。我们建立 2 型糖尿病(T2DM)大鼠模型,观察膀胱组织电镜下逼尿肌形态学改变,探讨 DCP 逼尿肌形态学改变与发病时间的关系以及确定影响的时期。

### 1 材料与方法

1.1 实验大鼠 Sprague Dawley (SD) 雌性大鼠 40 只(暨南大学医学院动物中心提供),体重 200-250g,经 12:12h 光照和黑暗循环以及充足的水和食物适应性喂养 1 周后用于实验。

1.2 实验仪器、试剂 标准大鼠饲料、高糖高脂饲料

(沈阳嘉乾程生物科技),链脲佐菌素(STZ)(SIGMA 公司),电镜(日本电子公司)。

### 1.3 方法

1.3.1 T2DM 大鼠模型的建立及实验分组 SD 雌性大鼠 40 只,经 12:12h 光照和黑暗循环以及充足的水和食物适应性喂养 1 周后随机分为正常对照组(16 只)、糖尿病组(24 只)。正常对照组喂养标准大鼠饲料,糖尿病组喂养高糖高脂饲料(其中含蔗糖 10%,熟猪油 15%,胆固醇 2%,胆酸 0.25%)。喂养 4 周后糖尿病组空腹 18~24h 腹腔注射小剂量链脲佐菌素(STZ) 30mg/kg(用前以 pH4.4 0.1mol/L 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液配成 0.75% 的浓度),正常对照组仅注射柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液。注射 STZ 后的第 4 周,选择空腹血糖大于正常大鼠空腹血糖 +3 个标准差,且胰岛素敏感性降低者确定为 T2DM 大鼠纳入实验。对照组给普通饲料,腹腔内注射等体积的枸橼酸缓冲液。连续 4 周尾

作者单位:深圳市龙岗中心医院 广东 深圳 518116

作者简介:冯建华(1964~),男,汉族,硕士,主任医师,主要从事泌尿系疾病研究。

静脉血葡萄糖浓度  $>16.7\text{mmol/L}$  模型成功 24 只。在模型成功的 1 型糖尿病大鼠中随机再分为喂养 4 周糖尿病大鼠组(12 只) 喂养 12 周糖尿病大鼠组(12 只)。对照组正常饲料喂养, 随机分为相应时间 4 周组(8 只), 12 周组(8 只)。制备逼尿肌标本进行电镜观测。

**1.3.2 标本制备** 应用 10% 水合氯醛腹腔注射 ( $3\text{ml/kg}$ ) 麻醉, 快速完整切下膀胱, 电镜超微结构病理标本制作: 取膀胱顶部膀胱全层, 在冰块上切成大小约  $1\text{mm}^3$  小块, 经戊二醛和锇酸双重固定, 丙酮脱水, 环氧树脂包埋, 超薄切片, 醋酸枸橼酸电子又重染色, 透射电镜观察。扫描电镜标本经戊二醛和锇酸双重固定, 乙醇逐级脱水,  $\text{CO}_2$  临界点干燥, 真空喷金。

**1.3.3 电镜检测** 电镜常规观察膀胱逼尿肌结构: 平滑肌、细胞间质和神经纤维, 在  $12\times 10^3$  倍观察线粒体, 用 Imagine Tool 图像分析软件测量线粒体相对密度: 每组分别随机取 20 个线粒体, 每个线粒体取 20 个点, 分别测量每个点灰度, 20 个点灰度平均值为该线粒体平均灰度。为避免各个视野在摄片时的差异, 同时在观察的线粒体周围细胞质随机取 60 个点, 平均值为胞质平均灰度。将线粒体灰度与周围胞质平均密度之比定义为线粒体相对灰度。图像分析软件将最高灰度定义为 0, 最低灰度定义为 255。

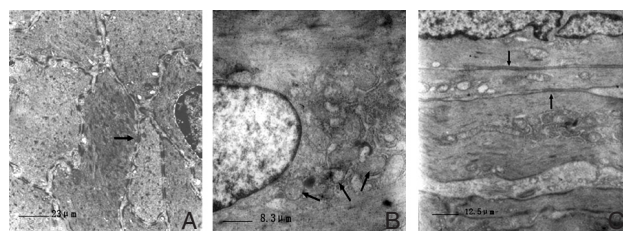
**1.4 统计学处理** 应用 SPSS-13.0 统计软件包进行数据分析。以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。数据经正态性检验若符合正态分布多样本均数比较采用单因素方差分析, 应用 LSD 法进行样本均数两两比较; 若数据为偏态分布, 多组间差异采用 Kruskal-Wallis 非参数秩和检验, 两组间差异采用 Mann-Whitney U 检验。

## 2 结果

**2.1 对照组电镜形态** 肌束内平滑肌细胞 (Smooth Muscle Cell, SMC) 排列分布均匀整齐。肌细胞周边为连续分布的肌膜, 肌膜下可见少量大小均一的质膜微囊和正常的线粒体。胞浆大量肌丝、局灶性高密度肌丝及各种形态正常的细胞器如线粒体、粗面内质网等。肌细胞核呈缘锯齿状, 其内染色质向核膜聚集。SMC 之间由致密带耦合形成大量的中间连接 (Intermediate junction)。细胞间隙小, 间隙间可见少量胶原纤维和弹性纤维以及血管、神经。神经末梢为胆碱能, 有雪旺氏细胞的有髓神经末梢, 可见清亮囊泡。见图 1。4 周对照组线粒体相对灰度为  $1.08 \pm 0.10$  与 12 周对照组的  $1.14 \pm 0.12$  差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

**2.2 糖尿病 4 周组电镜形态** 肌束内 SMC 体积明显较正常组增大, 密度深浅不一加重。部分 SMC 肌膜呈锯齿状, 肌膜致密带密度减少, 细胞肌膜形成凹陷与突起, 中间连接减少, 胞突连接可见。肌膜下可见质膜

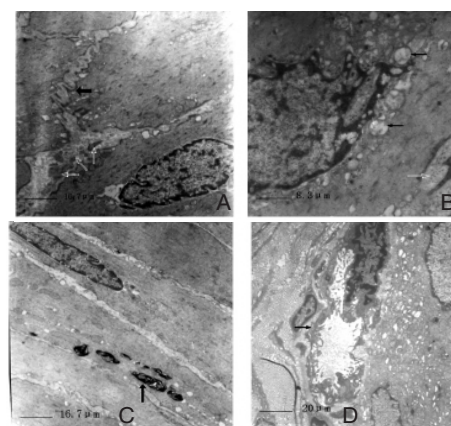
微囊增多、增大及肿大、退化的线粒体。线粒体可见肿胀明显, 灰度值增高, 线粒体相对灰度为  $1.31 \pm 0.19$ , 与 4 周对照组差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。同时线粒体亦可见少量钙化及退化。胞浆内局灶性高密度肌丝有所减少, 同时可见髓样小体。肌细胞核缘锯齿状明显, 核膜亦出现的质膜微囊。SMC 之间的间隙缩小, 胶原纤维增多, 可见大量的糖原颗粒。毛细血管上皮细胞被拉长的线粒体包围, 其基底外侧可见大量的胶原累积。神经细胞间间距增大, 被胶原填充, 神经突触内小泡有所增加。见图 2。



A. 肌束内平滑肌细胞分布均匀, 排列整齐。肌细胞周边为连续分布的肌膜。B. 肌膜下可见少量大小均一的质膜微囊和正常的线粒体。胞浆大量肌丝、局灶性高密度肌丝及各种形态正常的细胞器如线粒体、粗面内质网等。C. SMC 之间由致密带耦合形成大量的中间连接。细胞间隙小, 间隙间可见少量胶原纤维和弹性纤维以及血管、神经。  
A. Evenly arranged smooth muscle cell (SMC) B. Caveolae and mitochondrion, normal cells C. Interconnection of SMC tissue, vessel and nerve.

图 1 电镜观察对照组大鼠膀胱逼尿肌

Fig.1 Electron microscopic observation of rats detrusor in control group



A. 肌束内 SMC 体积明显较正常组增大。部分 SMC 肌膜呈锯齿状, 细胞肌膜形成凹陷与突起, 中间连接减少。B. 肌细胞核缘锯齿状明显, 线粒体肿胀明显, 线粒体亦可见少量钙化及退化。SMC 间隙可见大量的糖原颗粒。C. 胞浆内局灶性高密度肌丝有所减少, 同时可见髓样小体。D. SMC 之间的间隙缩小, 胶原纤维增多。神经细胞间间距增大, 被胶原填充。

A. Enlarged smooth muscle cell (SMC) B. Abnormal myocyte with calcified/degenerated mitochondria glucogenosome among SMC C. Gap among nervous cells increased congested with collagen.

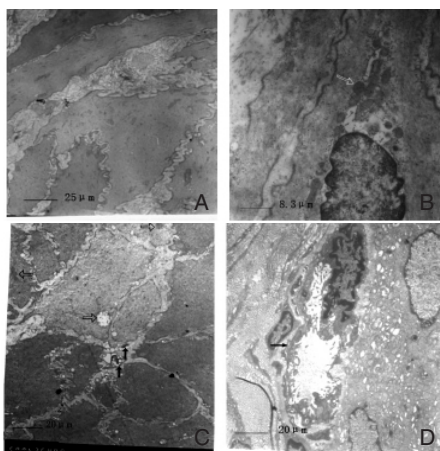
图 2 电镜观察 4 周糖尿病大鼠膀胱逼尿肌

Fig.2 Electron microscopic observations on the 4 week diabetic rat bladder detrusor

**2.3 糖尿病 12 周组电镜形态** 肌束内 SMC 体积较 4 周组无明显增大, 深色 SMC 增多, 排列紊乱, 少量



SMC 细胞可见坏死。SMC 肌膜呈锯齿大波浪状,细胞肌膜形成凹陷与突起显著,中间连接少见,胞突连接及缝隙连接多见。肌膜下可见质膜微囊多且大,肿大、退化及钙化的线粒体边聚明显。线粒体钙化及退化增多,灰度值减少,线粒体相对灰度为  $0.83 \pm 0.11$ ,较 12 周对照组差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。胞浆内局灶性高密度肌丝减少,髓样小体可见。肌细胞核皱缩明显,核膜亦出现明显的质膜微囊,较 4 周组多且大。SMC 之间的间隙增宽,大量的胶原纤维,糖原颗粒量多见。肌膜致密带密度减小,肌膜密度趋于一致,细胞间中间连接较 4 周组更为减少。毛细血管数量减少明显,血管平滑肌细胞萎缩、变性,使基底膜变薄、不连续。神经细胞较实验 4 周组减少,少数可见变性、退化。见图 3。



A 肌束内 SMC 体积增大,且大小不均排列紊乱。SMC 肌膜呈锯齿大波浪状,中间连接少见。SMC 之间的间隙增宽,大量的胶原纤维,糖原颗粒量多见。B 线粒体钙化及退化增多,胞浆内局灶性高密度肌丝减少。C 肌膜下可见退化及钙化线粒体边聚明显,肌膜致密带密度减小。神经细胞可见变性、退化。D 毛细血管数量减少明显,血管平滑肌细胞萎缩、变性,使基底膜变薄、不连续。

A Enlarged uneven SMC unevenly SMC myofibril, lot fibronogen; B. Calcified, degenerated mitochondria; C. Calcified/degenerated mitochondria and nervous cells; D. Capillary reduced and SMC shrunk.

图 3 电镜观察 12 周糖尿病大鼠膀胱逼尿肌

Fig.3 Electron microscopical observations on the 12 week diabetic rat bladder detrusor

### 3 讨论

糖尿病膀胱病(Diabetic Cystopathy, DCP)是糖尿病常见的并发症之一。具体发病机制目前尚不完全清楚,近年的研究表明,DCP 的发生是一个缓慢的、渐进的以及隐匿的过程,其特点是膀胱的感觉降低、逼尿肌功能受损或不稳定。正常逼尿肌镜下有三种主要结构:平滑肌、细胞间质和神经纤维。作为膀胱功能的执行单位平滑肌,形态的正常、线粒体,直接决定膀胱收缩;膀胱间质中弹性组织(胶原纤维和弹力纤维)为膀胱在收缩是提供被动张力,舒张时增加膀胱的顺应

性;神经冲动可引起膀胱逼尿肌收缩,充盈性的牵拉刺激也可引起膀胱逼尿肌收缩。本研究观察到糖尿病大鼠 4 周时膀胱肌细胞中线粒体即出现不同程度的肿胀,基质密度下降,其灰度值增加。线粒体嵴稀疏、变短、断裂甚至消失,部分线粒体钙化、退化,到糖尿病大鼠 12 周时此种情况更为明显。这些超微结构的改变均可使得 SMC 丧失正常的收缩功能和相互偶联作用下降,导致逼尿肌收缩无力或无收缩。4 周时候可见毛细血管上皮细胞被拉长的线粒体包围,12 周时膀胱逼尿肌肌间血管中膜胶原沉积及平滑肌细胞萎缩、变性,使基底膜变薄、不连续。糖尿病大鼠 4 周时神经细胞间距增大,被胶原填充,神经突触内小泡有所增加,神经纤维已经出现了损害,到了 12 周时能观察到的神经细胞较 4 周组减少,少数可见变性,影响到膀胱功能。本研究观察到的超微结构改变,可以推断在糖尿病早期也可能出现膀胱逼尿肌不稳定,临床上表现为逼尿肌过度活动。随着时间的延长神经纤维损害更加严重,神经肌肉传导障碍亦加重,膀胱逼尿肌的收缩逐渐失去神经的支配,形成神经源性膀胱。

临床上大多数病人在糖尿病进展中没有任何临床症状,其原因是神经和膀胱功能的下降是多变的,糖尿病膀胱疾病很难界定和量化。出于这个原因糖尿病引起的严重并发症之前的症状往往是无法辨识的<sup>[3]</sup>。我们的研究发现糖尿病膀胱是一个神经功能障碍、膀胱逼尿肌代偿与重建,最后导致膀胱功能障碍的过程。糖尿病的病程与显微、超微结构下观察到的膀胱损伤有着相关性,而且与时间也相关。为无症状功能障碍的糖尿病膀胱提供正确的形态学分析。神经电生理检查和尿动力学研究仍是诊断亚临床型糖尿病膀胱病的基本技术<sup>[4]</sup>。形态学方面的检测可为神经电生理检查和尿动力学提供佐证,为临床诊断治疗糖尿病膀胱病提供依据。

### 参考文献:

- [1] Li WR, Ding GF, Wang QJ. Research progress of diabetic bladder disease[J]. International Journal of Urology and Nephrology, 2007, 27: 517-520. (In Chinese)  
(李维仁, 丁国富, 王勤章. 糖尿病膀胱病变的研究进展[J]. 国际泌尿系统杂志, 2007, 27: 517-520.)
- [2] Frimodt-Møller C. Diabetic cystopathy: Epidemiology and related disorders[J]. Ann Intern Med, 1980, 92(2): 318-321.
- [3] Siracusano S, Aloia G, Lentini MG, Silvestre G. Diabetic cystopathy[J]. Diab Nutr Metab, 2002, 15: 41-44.
- [4] Elbadawi A, Resnick NM, Dorsam J, Yalla SV, Haferkamp A. 2003 Structural basis of neurogenic bladder dysfunction. I. Methods of prospective ultrastructural study and overview of the findings [J]. J Urol, 2003, 169: 540-546.

收稿日期 2011-09-09 编辑 符式刚