

Gja1 基因重组慢病毒对糖尿病豚鼠膀胱病变模型中缝隙连接蛋白 43 蛋白及 mRNA 表达的影响

张永强¹, 潘凤^{2,3}, 孙鹏¹, 谭明辉¹, 轩留明¹, 王勤章¹<https://doi.org/10.12307/2022.1017>

投稿日期: 2021-12-27

采用日期: 2022-02-15

修回日期: 2022-04-20

在线日期: 2022-05-30

中图分类号:

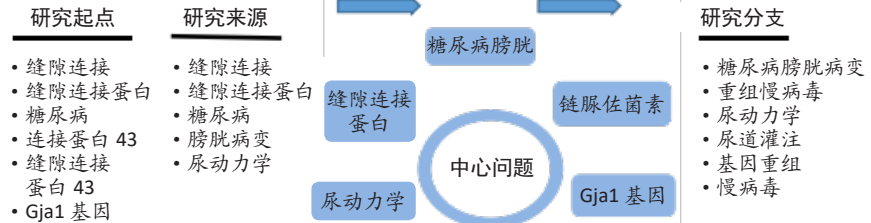
R446; R318; R694

文章编号:

2095-4344(2023)08-01161-05

文献标识码: B

文章快速阅读: 经尿道灌注 Gja1 基因重组慢病毒药物与豚鼠的糖尿病膀胱



文题释义:

糖尿病膀胱: 糖尿病是一组以血糖升高为特征的慢性系统性代谢疾病, 糖尿病膀胱是糖尿病常见慢性并发症之一, 可导致膀胱感觉受损、容量增加等病理生理变化, 临床常见为尿频、尿急、尿潴留等, 最终引起尿毒症等严重不良后果, 严重影响患者生活质量。

连接器: 6个连接蛋白亚单位在细胞膜上形成六聚体, 称为连接器或半通道, 可以作为独立的通道, 或与同位膜中的半通道对接, 形成完整的缝隙连接通道, 允许小分子物质自由通过, 从而形成间隙连接的细胞间通讯功能, 促进细胞间的物质信息和能量交换。

摘要

背景: 缝隙连接蛋白43又被称为Gja1蛋白, Gja1基因重组慢病毒对糖尿病膀胱引起的收缩功能障碍可能有改善作用。

目的: 构建豚鼠糖尿病膀胱病变模型, 研究经尿道灌注Gja1基因重组慢病毒药物的方式, 观察对受损膀胱逼尿肌细胞表面缝隙连接蛋白43蛋白和 mRNA表达的影响。

方法: 选取80只鼠龄及体质量相近的健康豚鼠, 随机原则挑选15只豚鼠常规饲养, 设为正常组; 剩余65只高糖高脂饮食喂养4周后给予腹腔注射1%链脲佐菌素200 mg/kg建立糖尿病豚鼠膀胱模型; 尿动力学筛选出符合糖尿病膀胱病变豚鼠模型, 依据随机分组原则分为3组: 空白组($n=12$)、对照组($n=12$)、实验组($n=12$)。空白组经尿道灌注0.2 mL磷酸缓冲盐溶液; 对照组经尿道灌注0.2 mL空载基因重组慢病毒; 实验组经尿道灌注0.2 mL Gja1基因重组慢病毒。每组在转染后第2, 7, 14, 28天分别处死3只豚鼠, 通过免疫组织化学染色法观察豚鼠膀胱组织缝隙连接蛋白43蛋白的表达及分布, 分别采用Western-Blot和qRT-PCR检测缝隙连接蛋白43蛋白和 mRNA的表达水平。

结果与结论: ①经尿道灌注Gja1基因重组慢病毒后, 实验组较空白组及对照组的缝隙连接蛋白43蛋白和 mRNA表达水平均明显升高($P < 0.01$, $P < 0.01$), 且基因重组慢病毒在转染后第14天缝隙连接蛋白43蛋白和 mRNA表达最佳; 空白组较对照组缝隙连接蛋白43蛋白和 mRNA表达水平差异无显著性意义($P > 0.01$); ②结论: 经尿道灌注Gja1基因可以稳定表达于膀胱组织中, 并能上调缝隙连接蛋白43蛋白和mRNA的表达, 有利于修复细胞间受损的信号转导及物质交换通路。

关键词: Gja1基因; 重组慢病毒; 糖尿病膀胱; Cx43蛋白

缩略语: 缝隙连接蛋白43: Connexin43, Cx43

Effect of Gja1 gene recombinant lentivirus on Cx43 protein and mRNA expression in a diabetic guinea pig bladder model

Zhang Yongqiang¹, Pan Feng^{2,3}, Sun Peng¹, Tan Minghui¹, Xuan Liuming¹, Wang Qinzhang¹

¹Department of Urology, ²Department of Pathology, The First Affiliated Hospital, Shihezi University School of Medicine, Shihezi 832000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China; ³Department of Pathology, Shihezi University School of Medicine, Shihezi 832000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China
Zhang Yongqiang, Master candidate, Department of Urology, The First Affiliated Hospital, Shihezi University School of Medicine, Shihezi 832000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Corresponding author: Wang Qinzhang, MD, Professor, Chief physician, Department of Urology, The First Affiliated Hospital, Shihezi University School of Medicine, Shihezi 832000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

石河子大学医学院第一附属医院, ¹泌尿外科, ²病理科, 新疆维吾尔自治区石河子市 832000; ³石河子大学医学院病理系, 新疆维吾尔自治区石河子市 832000

第一作者: 张永强, 男, 1990年生, 安徽省阜阳市人, 汉族, 石河子大学在读硕士, 主要从事泌尿外科尿动力学的研究。

通讯作者: 王勤章, 博士, 教授, 主任医师, 石河子大学医学院第一附属医院泌尿外科, 新疆维吾尔自治区石河子市 832000

<https://orcid.org/0000-0003-3211-3301> (张永强)

基金资助: 国家自然科学基金项目 (8196030314); 项目负责人: 王勤章

引用本文: 张永强, 潘凤, 孙鹏, 谭明辉, 轩留明, 王勤章. Gja1 基因重组慢病毒对糖尿病豚鼠膀胱病变模型中缝隙连接蛋白 43 蛋白及 mRNA 表达的影响 [J]. 中国组织工程研究, 2023, 27(8):1161-1165.



Abstract

BACKGROUND: Connexin 43 is also known as Gja1 protein. Gja1 recombinant lentivirus may improve bladder contractile dysfunction in diabetes.

OBJECTIVE: To establish a guinea pig model of diabetic cystopathy, study the way of transurethral infusion of Gja1 recombinant lentiviral drugs, and observe the effect on the expression of connexin 43 protein and mRNA on the surface of detrusor muscle cells in the damaged bladder.

METHODS: Eighty healthy guinea pigs of similar age and body mass were selected, 15 of which were randomly selected and conventionally fed and the remaining 65 were given intraperitoneal injection of 1% streptozotocin (200 mg/kg) to establish a guinea pig model of diabetic cystopathy. Urodynamics screening was performed to identify guinea pigs with diabetic cystopathy, which were further randomized into three groups: blank group ($n=12$), control group ($n=12$) and experimental group ($n=12$). The blank group was perfused with 0.2 mL of phosphate buffered saline, the control group was perfused with 0.2 mL of empty recombinant lentivirus, and the experimental group was perfused with 0.2 mL of Gja1 recombinant lentivirus. Three guinea pigs from each group were killed at each observation time point (2, 7, 14, and 28 days) after transfection. Expression and distribution of connexin 43 protein in the bladder were observed by immunohistochemical staining, and the protein and mRNA levels of connexin 43 were detected by western blot and qRT-PCR assays, respectively.

RESULTS AND CONCLUSION: After transurethral infusion of Gja1 recombinant lentivirus, the expression levels of connexin 43 protein and mRNA were significantly higher in the experimental group than the blank and control groups ($P < 0.01$, $P < 0.01$), and the best expression levels of connexin 43 protein and mRNA were found at 14 days after transfection with Gja1 recombinant lentivirus. There were no significant differences in the expression levels of connexin 43 protein and mRNA between the blank and control groups ($P > 0.01$). To conclude, Gja1 gene via transurethral perfusion can stably express in bladder tissue and up-regulate the expression of connexin 43 at protein and mRNA levels, which may be beneficial to repair damaged signal transduction and exchange pathways between cells.

Key words: Gja1 gene; recombinant lentivirus; diabetic cystopathy; connexin 43

Funding: the National Natural Science Foundation of China, No. 8196030314 (to WQZ)

How to cite this article: ZHANG YQ, PAN F, SUN P, TAN MH, XUAN LM, WANG QZ. Effect of Gja1 gene recombinant lentivirus on Cx43 protein and mRNA expression in a diabetic guinea pig bladder model. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2023;27(8):1161-1165.

0 引言 Introduction

糖尿病是一种以血糖升高为特征的慢性系统性代谢疾病,发病率和死亡率明显高于普通人群,预测到2040年,20~79岁的糖尿病患者人数将增至约6.42亿^[1]。糖尿病可致全身多种细胞与器官损害,进而导致病变器官功能改变;在泌尿系统中,糖尿病膀胱病变是糖尿病主要并发症之一,其伴随有多种下尿路症状,典型症状为膀胱感觉减退、容量增加和排空受损^[2-3],长期发展可并发泌尿系感染、肾功能不全,最终引起尿毒症等严重不良后果,对患者生活质量造成严重影响^[4-6]。目前糖尿病膀胱病变发病机制尚不明确,多项研究表明,缝隙连接蛋白在动物体内广泛表达,相邻细胞间通过缝隙连接蛋白形成缝隙连接通道,参与细胞间信号传导、物质交换等功能,对维持细胞正常的生理功能有重大意义^[7-8]。目前已发现缝隙连接蛋白多达21种;其中,缝隙连接蛋白43(Connexin43, Cx43),又被称为Gja1蛋白,是由定位于染色体6q22-24的Gja1基因编码的膜蛋白,是连接子膜通道的一个组成部分,在人体中细胞膜广泛表达^[9-10]。推测Cx43蛋白改变可能在糖尿病膀胱病变中起到重要作用,在课题组前期研究中也提示糖尿病膀胱病变中Cx43蛋白较正常膀胱组织明显减少^[11],因而Cx43蛋白改变可能是导致糖尿病膀胱的重要原因之一^[12-14]。此研究旨在以慢病毒为载体构建Gja1基因药物,将Gja1基因重组慢病毒经尿道成功导入糖尿病膀胱病变豚鼠膀胱,通过观察Gja1基因药物导入膀胱组织中mRNA及Cx43蛋白表达,初步探讨经尿道灌注Gja1基因药物对豚鼠糖尿病膀胱的影响,为临床治疗糖尿病膀胱病变提供新的思路。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照动物实验。组间比较采用两独立样本t检验,多样本比较采用方差分析加SNK-q检验。

1.2 时间及地点 实验于2019年9月至2021年6月在石河子大学医学院动物房及病理实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 选取雄性荷兰豚鼠80只,8~12周龄,体质量350~450g,室内无噪声环境中分笼常规饮食饲养,所用实验豚鼠由新疆医科大学动物实验中心提供,生产许可证号:SCXK(新)2018-0002。该研究经石河子大学医学院第一附属医院动物实验伦理委员会审核批准,并按照国家科学委员会要求对实验动物给予人道主义照顾。

1.3.2 实验主要仪器与试剂 高速离心机、反转录试剂盒(Thermo-Fermentas公司);PCR仪ABI 7500 FAST(美国ABI公司);尿流动力学检测仪(Laborie公司);DYCZ-24DN垂直电泳槽(北京六一仪器厂);链脲佐菌素(Streptozotocin, STZ,美国Sigma公司);Gja1基因重组慢病毒载体药物(上海吉玛公司);PCR引物(上海生工生物工程公司);小鼠抗体 β -actin单抗、山羊抗小鼠IgG二抗、山羊抗兔IgG二抗(北京中杉金桥);Anti-Cx43(Abcam公司)。

1.3.3 高糖高脂饲料 高糖高脂饲料中热量占比30%脂肪、52%碳水化合物、18%蛋白质,来自南通特洛菲饲料科技有限公司。

1.4 实验方法

1.4.1 豚鼠糖尿病膀胱病变模型制备 适应性饲养2周,随机数字法从80只豚鼠中选取65只为糖尿病模型组,余15只为正常对照组,给予糖尿病模型组高糖高脂喂养4周后,禁食12h,立即以1%链脲佐菌素200mg/kg腹腔一次性注射进行糖尿病豚鼠诱导,继续给予高糖高脂饲养,使用血糖仪从耳郭外周静脉测量血糖,糖尿病豚鼠模型诱导成功以随机血糖连续4周 ≥ 16.7 mmol/L为标准进行筛选,余15只豚鼠正常饲养。诱导成功的动物模型及正常豚鼠继续饲养至10周后,采用尿流动力学方法筛选糖尿病膀胱病变模型:膀胱残余尿 $> 10\%$ 膀胱容量,尿动力学提示逼尿肌压降低、最大膀胱容量增大、膀胱顺应性增强等改变。

1.4.2 动物分组及给药 将造模成功糖尿病膀胱病变豚鼠随机分为3组:空白组、对照组和实验组,每组12只。实验

实验动物造模过程中的相关问题

造模目的	构建豚鼠糖尿病膀胱病变模型, 观察经尿道灌注 Gja1 基因重组慢病毒药物对膀胱组织 Cx43 蛋白及 mRNA 表达的影响
动物来源及品系	雄性豚鼠, 新疆医科大学动物中心实验室提供
造模技术描述	高糖高脂喂养后 4 周后, 禁食 12 h, 经腹腔一次性注射 1% 链脲佐菌素 200 mg/kg 进行糖尿病豚鼠诱导, 继续给予高糖高脂饲养
造模主要诱导用药	链脲佐菌素
动物数量及分组方法	80 只豚鼠随机分组原则分为正常对照组 (n=15) 和糖尿病模型组 (n=65)
造模成功评价指标	链脲佐菌素诱导后以随机血糖连续 4 周 ≥ 16.7 mmol/L 为标准进行筛选, 第 10 周行尿流动力学检测对糖尿病膀胱病变模型进行验证
造模后实验观察指标	①豚鼠尿流动力学参数; ②膀胱组织免疫组化染色结果; ③膀胱 Cx43 蛋白和 mRNA 表达
造模过程中动物死亡原因	制备豚鼠糖尿病膀胱病变模型过程中, 死亡 5 只, 糖尿病诱导失败 13 只, 尿流动力学检测仪筛选弃去 10 只
如何补充造模过程中缺失的动物	最终共 37 只糖尿病膀胱病变豚鼠模型诱导成功, 此次实验需要糖尿病豚鼠膀胱病变模型 36 只
造模后动物处理	造模成功的糖尿病豚鼠膀胱病变模型随机分为 3 组: 空白组、对照组和实验组。对照组经尿道灌注未携带 Gja1 基因的慢病毒; 空白组灌注 PBS; 实验组灌注的 Gja1 基因重组慢病毒药物。于转染后第 2, 7, 14, 28 天分别麻醉后处死 3 只豚鼠, 取膀胱组织并固定
伦理委员会批准	石河子大学医学院第一附属医院动物实验伦理委员会审核批准 A2019-167

前禁食禁水 6 h, 2% 戊巴比妥钠以 40 mg/kg 腹腔注射充分麻醉后将豚鼠固定于操作台上, 暴露阴茎, 消毒后铺一次性洞巾, 插入导尿管, 排空豚鼠膀胱尿液。空白组灌注 PBS 0.2 mL; 对照组经尿道灌注未携带 Gja1 基因的慢病毒 0.2 mL; 实验组灌注 Gja1 基因重组慢病毒药物 0.2 mL; 灌注后于膀胱中保存 2 h。2 h 后将豚鼠放回笼中继续饲养。

1.4.3 免疫组织化学染色检测膀胱组织 Cx43 蛋白分布及表达 每组在转染后第 2, 7, 14, 28 天 4 个时间节点分别处死 3 只豚鼠, 取膀胱组织并固定。将固定于甲醛溶液中的膀胱组织进行石蜡包埋并制成石蜡切片后, 依次进行烤片 → 脱蜡 → 脱二甲苯、脱水 → 冲洗 → 抗原修复 → 阻断内源性过氧化物酶活性 → 滴加一抗 (Anti-Connexin 43, 1 : 100), 过夜孵育后二抗 → DAB 显色 → 复染 → 返蓝 → 封固 → 扫片、采图。

1.4.4 qRT-PCR 实验检测 Gja1 基因的表达 将膀胱组织用研磨皿捣成粉末状, 通过 Trizol 法提取总 RNA 并反转录为 cDNA, 在 ABI 7500 快速实时 PCR 仪器上进行检测, 以 GAPDH 作为内参, 每个基因设置 3 个复孔, 并重复 3 次。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算, 引物序列列表 1。

表 1 | qRT-PCR 引物序列
Table 1 | Sequences of primers for qRT-PCR

基因	上游引物	下游引物	产物长度 (bp)
Gja1	TAC TTC AAG GGC TGC TCC TC	GGT TCT GCT CCG CAC TGT AG	156
GAPDH	AGA TGG TGA AGG TCG GAG TG	ACT TGC CGT GGG TAG AAT CA	162

1.4.5 Western-Blot 实验检测膀胱组织 Cx43 蛋白表达 研磨皿碾碎膀胱组织后, 使用 RIPA 裂解缓冲液在冰上裂解组织 15 min, 使用 BCA 蛋白质分析试剂盒测定裂解物的蛋白质浓度。取适当样品置于聚丙烯酰胺凝胶中, 电泳后将蛋白转移至 PVDF 膜 (0.45 μ m)。将膜浸入 5% 脱脂牛奶室温封闭 1.5 h 阻断非特异性结合, 将膜与一抗 (Anti-Connexin 43, 1 : 1 000) 放在 4 $^{\circ}$ C 的环境下过夜孵育; 次日孵育结束经 TBST 液洗涤后, 将膜与二抗 (山羊抗兔 IgG 二抗, 1 : 5 000) 室温摇床孵育 2 h。以 β -actin 作为内参分析目标蛋白的表达水平, 曝光并显影。

1.5 主要观察指标 ①豚鼠尿流动力学参数; ②膀胱组织免疫组化染色结果; ③膀胱 Cx43 蛋白和 mRNA 表达。

1.6 统计学分析 采用 IBM SPSS 22.0 版统计软件分析和处理数据, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示; 符合正态分布数据, 组间比较采用两独立样本 t 检验; 多样本比较采用方差分析, 两两比较采用方差分析加 SNK-q 检验; 不符合正态分布数据使用秩和检验, 以 $P < 0.01$ 为差异有显著性意义。文章统计学方法在石河子大学统计学专家指导下完成的, 已被专家审核。

2 结果 Results

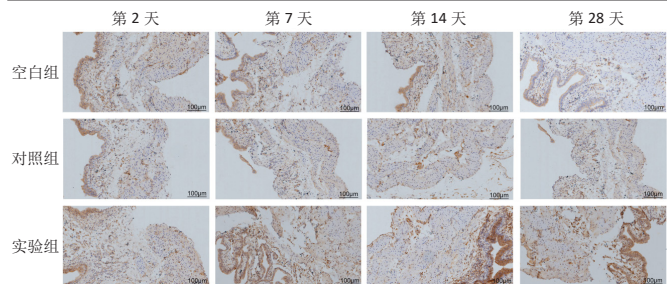
2.1 糖尿病膀胱病变豚鼠模型制备 37 只糖尿病膀胱病变豚鼠模型诱导成功。糖尿病膀胱病变豚鼠模型逼尿肌压显著低于正常组差异有显著性意义 ($P < 0.01$), 残余尿、最大膀胱容量、膀胱顺应性均大于正常对照组, 差异有显著性意义 ($P < 0.01$), 见表 2。

表 2 | 两组豚鼠尿流动力学参数比较
Table 2 | Comparison of urodynamic parameters between two groups

组别	n	残余尿 (mL)	逼尿肌压 (kPa)	最大膀胱容量 (mL)	顺应性 (mL/kPa)
正常对照组	15	0.07 \pm 0.01	2.40 \pm 0.19	1.61 \pm 0.06	1.33 \pm 0.20
糖尿病模型组	37	0.69 \pm 0.58	1.52 \pm 0.24	2.08 \pm 0.15	4.18 \pm 1.43
t 值		采用秩和检验	12.60	采用秩和检验	-11.921 2
P 值		< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01

2.2 豚鼠膀胱免疫组织化学染色结果 各组糖尿病膀胱病变豚鼠膀胱的免疫组化结果提示结缔组织疏松, 逼尿肌肌束排列紊乱, 形态多样, 结构松散。膀胱逼尿肌细胞上 Cx43 蛋白显示胞膜及胞质被染成棕黄色, 空白组和对照组阳性染色强度低于实验组, 且空白组和对照组之间染色强度无明显差异。实验组中随着时间推移 Cx43 蛋白表达逐渐增强, 第 14 天染色强度表达最高, 第 28 天表达强度较第 14 天略下降, 见图 1。

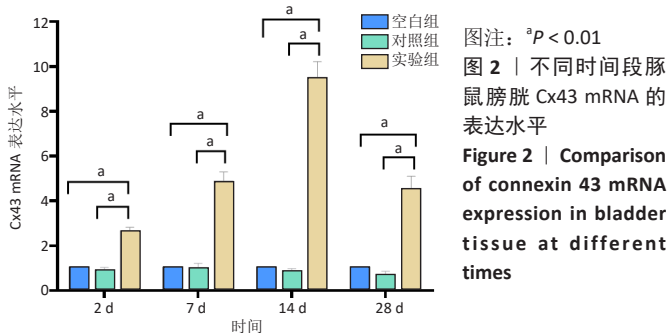
2.3 qRT-PCR 检测豚鼠膀胱组织 Gja1 基因 (Cx43 mRNA) 的表达 通过 qRT-PCR 实验检测经豚鼠尿道灌注基因重组慢病毒后 Gja1 基因转录情况, 结果显示, 实验组较对照组及空白组豚鼠膀胱 Cx43 mRNA 表达水平明显升高 ($P < 0.01$, $P < 0.01$), 空白组及对照组 Cx43 mRNA 表达水平差异无显著性变化 ($P > 0.05$), 实验组豚鼠膀胱 Cx43 mRNA 表达水平随时间变化逐渐升高, 第 14 天最为显著, 见图 2。



图注：实验组随着时间推移 Cx43 蛋白表达逐渐增强，第 14 天染色强度表达最高，第 28 天表达强度较第 14 天略下降；空白组和对照组阳性染色强度低于实验组

图 1 | 不同时间段豚鼠膀胱组织中 Cx43 的蛋白表达 (免疫组织化学染色, $\times 200$)

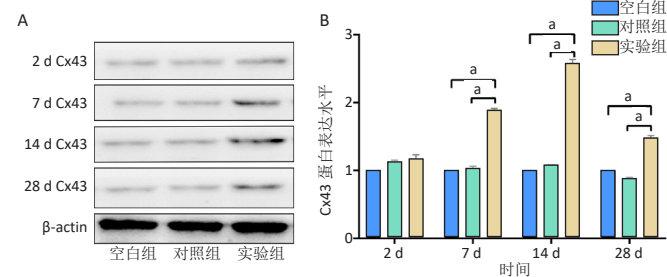
Figure 1 | Expression of connexin 43 protein in bladder tissue at different times (immunohistochemical staining, $\times 200$)



图注： $^a P < 0.01$
图 2 | 不同时间段豚鼠膀胱 Cx43 mRNA 的表达水平

Figure 2 | Comparison of connexin 43 mRNA expression in bladder tissue at different times

2.4 Western-Blot 实验检测豚鼠膀胱 Cx43 蛋白表达 结果显示，实验组豚鼠膀胱 Cx43 蛋白表达量较空白组和对照组升高 ($P < 0.01$, $P < 0.01$)，空白组和对照组对比差异无显著性意义 ($P > 0.01$)，且随着时间变化，实验组豚鼠膀胱中 Cx43 蛋白表达量逐渐升高，以第 14 天最为显著，第 28 天略有下降，见图 3。



图注：图 A 为蛋白免疫印迹条带图；B 为蛋白相对表达分析， $^a P < 0.01$

图 3 | Gja1 转染后不同时间段豚鼠膀胱 Cx43 蛋白的表达
Figure 3 | Comparison of connexin 43 protein expression in bladder tissue at different times after Gja1 transfection

3 讨论 Discussion

糖尿病作为一种慢性全身性疾病，是全球增长最快的疾病之一，已成为各国人群不可忽视的健康问题，糖尿病通常有明显下尿路症状，从而引起人们生活质量下降^[15]；糖尿病是以持续高血糖为主要特征的代谢紊乱综合征，其长期并发症被称为经典三重病变，表现为糖尿病肾病、糖尿病视网膜病变和糖尿病神经病变^[16]；有研究表明糖尿病神经病变是糖

尿病膀胱病变最主要因素^[17]，主要表现为膀胱容积增大、顺应性增强，逼尿肌收缩功能等障碍^[18]，其中逼尿肌收缩障碍是最重要发病机制之一，目前研究发现缝隙连接蛋白与膀胱逼尿肌收缩活动密切相关^[14, 19]。

缝隙连接是细胞间主要连接方式，广泛分布于脊椎动物及无脊椎动物体内，其参与细胞间离子与分子的交换，从而介导化学与电信号的产生^[20-22]。缝隙连接主要由连接蛋白构成，为 6 个连接蛋白亚单位在细胞膜上形成一个连接子或半通道，可以作为独立的通道或与同位膜中的半通道对接，形成完整的缝隙连接通道^[21, 23]。Cx43 是表达最普遍和研究最多的缝隙连接蛋白，多项研究显示，Cx43 功能、结构及数量改变可以导致多种疾病发生，包括癌症^[24]、心脏病^[25]、糖尿病视网膜病变等^[26]，并与皮肤愈合密切相关^[27]；而 Cx43 作为逼尿肌最重要一种缝隙连接蛋白与逼尿肌活动密切相关^[28-29]，其可能与糖尿病膀胱病变相关。既往研究提示膀胱过度活动症 Cx43 蛋白表达明显增高，膀胱内信号传导增多，细胞间物质能量交换增加，从而加强膀胱收缩频率^[30]。OSHIRO 等^[19] 研究显示 Cx43 蛋白在年龄相关性膀胱逼尿肌活动不足表达减少，逼尿肌之间信号传输减少，可见 Cx43 表达改变可能影响逼尿肌收缩活动。而糖尿病膀胱病变膀胱中，目前少有证实 Cx43 能够影响膀胱逼尿肌收缩功能的文献报道，因此作者考虑通过经尿道灌注 Gja1 基因重组慢病毒，提高膀胱组织 Cx43 蛋白表达，增加并修复细胞间信息及物质交换，从而可能使逼尿肌收缩功能得以恢复。

此次研究中，通过腹腔注射链脲佐菌素成功建立糖尿病豚鼠模型^[31-33]，并经尿道灌注 Gja1 基因重组慢病毒^[34]，分为 4 个时间段 (第 2, 7, 14, 28 天) 分别观察糖尿病豚鼠膀胱 Cx43 蛋白及 mRNA 表达，免疫组织化学染色结果发现实验组豚鼠逼尿肌组织 Cx43 阳性染色强度随着时间变化高于空白组及对照组；Western-Blot 实验及 qRT-PCR 实验结果显示实验组豚鼠膀胱 Cx43 蛋白及 mRNA 的表达随时间变化明显高于空白组及对照组，空白组及对照组 Cx43 蛋白及 mRNA 表达水平对比差异无统计学意义，表明 Gja1 基因随时间变化能稳定表达于豚鼠膀胱组织中，并能使膀胱逼尿肌组织中 Cx43 蛋白表达增高。

该实验以豚鼠糖尿病模型为基础，经尿道灌注 Gja1 基因慢病毒，实现基因药物在膀胱中稳定表达。前期课题组证实糖尿病膀胱中 Cx43 蛋白较正常豚鼠膀胱明显减少^[11]，由此推测 Cx43 蛋白可能对糖尿病膀胱功能起到改善作用，目前研究中尚未行相关功能实验予以验证；实验中也证实糖尿病豚鼠模型中 Cx43 蛋白及 mRNA 水平可显著增加，未与正常豚鼠膀胱组织进行对比，难以确定 Cx43 蛋白及 mRNA 水平增加程度，仍需完善相关实验。

综上所述，研究通过经尿道介导 Gja1 基因转染豚鼠膀胱组织中，可实现 Gja1 基因在膀胱组织中的稳定持续表达，有利于修复逼尿肌细胞间受损的信号及物质交换，也将为进一步研究 Gja1 基因慢病毒上调 Cx43 蛋白影响受损糖尿病膀

胱病变的膀胱功能奠定基础，为临床中糖尿病膀胱病变的治疗提供了可能。

作者贡献：通讯作者王勤章为课题全局统筹负责人，指导研究方向，提供研究思路，参与文章设计与实施，盲法评估。第一作者张永强参与课题具体设计、实施、论文撰写及模型制作饲养和数据收集。潘凤参与提供实验场地及实验方法具体指导。孙鹏、谭明辉、轩留明参与动物模型制作饲养、数据收集及实验实施。

利益冲突：文章的全部作者声明，在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

开放获取声明：这是一篇开放获取文章，根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款，在合理引用的情况下，允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展，同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献，并为之建立索引，用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

版权转让：文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

出版规范：文章撰写遵守了《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。文章经小同行外审专家双盲外审，同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

4 参考文献 References

- OGURTSOVA K, DA ROCHA FERNANDES JD, HUANG Y, et al. IDF Diabetes Atlas: Global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040. *Diabetes Res Clin Pract.* 2017;128:40-50.
- YUAN Z, TANG Z, HE C, et al. Diabetic cystopathy: A review. *J Diabetes.* 2015;7(4):442-447.
- 郭文敏, 孙李斌, 王东文. 糖尿病膀胱研究进展 [J]. *中国全科医学*, 2020,23(17):2095-2101.
- NICHOLS GA, BRODOVICZ KG, KIMES TM, et al. Prevalence and incidence of urinary tract and genital infections among patients with and without type 2 diabetes. *J Diabetes Complications.* 2017;31(11):1587-1591.
- LIU Y, WANG X, WANG L, et al. Platelet-to-Lymphocyte Ratio Predicts the Presence of Diabetic Neurogenic Bladder. *Diabetes Metab Syndr Obes.* 2022;15:7-13.
- BOLGEO T, MACONI A, BERTOLOTTI M, et al. Physiopathology of the diabetic bladder. *Arch Ital Urol Androl.* 2020;92(4). doi: 10.4081/aiua.2020.4.314.
- 乔颜春, 孙青. 连接蛋白 Connexin43 的研究进展 [J]. *国际病理科学与临床杂志*, 2005,25(4):345-347.
- 石瑶瑶, 崔玉双, 高宏程, 等. 缝隙连接蛋白 43 在糖尿病视网膜病变中的作用 [J]. *中国眼耳鼻喉科杂志*, 2021,21(2):144-147.
- MOLICA F, FIGUEROA XF, KWAK BR, et al. Connexins and Pannexins in Vascular Function and Disease. *Int J Mol Sci.* 2018;19(6):1663.
- TAŞDELEN E, DURMAZ CD, KARABULUT HG. Autosomal Recessive Oculodentodigital Dysplasia: A Case Report and Review of the Literature. *Cytogenet Genome Res.* 2018;154(4):181-186.
- 李朋, 钱彪, 申茂磊, 等. 缝隙连接蛋白 -43 在糖尿病膀胱豚鼠模型中的表达及意义 [J]. *天津医药*, 2020,48(1):25-29.
- POLADIA DP, SCHANBACHER B, WALLACE LJ, et al. Innervation and connexin isoform expression during diabetes-related bladder dysfunction: early structural vs. neuronal remodelling. *Acta Diabetol.* 2005;42(3):147-152.
- RIZK D, PADMANABHAN RK, TARIQ S, et al. Ultra-structural morphological abnormalities of the urinary bladder in streptozotocin-induced diabetic female rats. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct.* 2006;17(2):143-154.
- KONO J, UEDA M, SENGIKU A, et al. Urothelium-Specific Deletion of Connexin43 in the Mouse Urinary Bladder Alters Distension-Induced ATP Release and Voiding Behavior. *Int J Mol Sci.* 2021;22(4):1594.
- COLE JB, FLOREZ JC. Genetics of diabetes mellitus and diabetes complications. *Nat Rev Nephrol.* 2020;16(7):377-390.
- EID S, SAS KM, ABCOUWER SF, et al. New insights into the mechanisms of diabetic complications: role of lipids and lipid metabolism. *Diabetologia.* 2019;62(9):1539-1549.
- POWELL CR. Is the Diabetic Bladder a Neurogenic Bladder? Evidence from the Literature. *Curr Bladder Dysfunct Rep.* 2014;9(4):261-267.
- ESTEGHAMATI A, RASHIDI A, NIKFALLAH A, et al. The association between urodynamic findings and microvascular complications in patients with long-term type 2 diabetes but without voiding symptoms. *Diabetes Res Clin Pract.* 2007;78(1):42-50.
- OSHIRO T, MIYAZATO M, SAITO S. Relationship between connexin43-derived gap junction proteins in the bladder and age-related detrusor underactivity in rats. *Life Sci.* 2014;116(1):37-42.
- HARRIS AL. Electrical coupling and its channels. *J Gen Physiol.* 2018;150(12):1606-1639.
- BEYER EC, BERTHOUD VM. Gap junction gene and protein families: Connexins, innexins, and pannexins. *Biochim Biophys Acta Biomembr.* 2018;1860(1):5-8.
- GÜIZA J, BARRÍA I, SÁEZ JC, et al. Innexins: Expression, Regulation, and Functions. *Front Physiol.* 2018;9:1414.
- SCHULZ R, GORGE PM, GORBE A, et al. Connexin 43 is an emerging therapeutic target in ischemia/reperfusion injury, cardioprotection and neuroprotection. *Pharmacol Ther.* 2015;153:90-106.
- LEITHE E. Regulation of connexins by the ubiquitin system: Implications for intercellular communication and cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2016;1865(2):133-146.
- HULSMANS M, CLAUSS S, XIAO L, et al. Macrophages Facilitate Electrical Conduction in the Heart. *Cell.* 2017;169(3):510.
- MUGISHO O, GREEN C, ZHANG J, et al. Immunohistochemical Characterization of Connexin43 Expression in a Mouse Model of Diabetic Retinopathy and in Human Donor Retinas. *Int J Mol Sci.* 2017;18(12):2567.
- FANIKU C, O SHAUGHNESSY E, LORRAINE C, et al. The Connexin Mimetic Peptide Gap27 and Cx43-Knockdown Reveal Differential Roles for Connexin43 in Wound Closure Events in Skin Model Systems. *Int J Mol Sci.* 2018;19(2):604.
- SEKIDO N, OTSUKI T, KIDA J, et al. EP2 and EP3 receptors as therapeutic targets for underactive bladder/detrusor underactivity due to diabetic cystopathy in a type 1 diabetic rat model. *Lower Urin Tract Symptoms.* 2020;12(3):285-291.
- LI K, YAO J, SAWADA N, et al. beta-Catenin signaling contributes to platelet derived growth factor elicited bladder smooth muscle cell contraction through up-regulation of Cx43 expression. *J Urol.* 2012;188(1):307-315.
- IMAMURA M, NEGORO H, KANEMATSU A, et al. Basic fibroblast growth factor causes urinary bladder overactivity through gap junction generation in the smooth muscle. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2009;297(1):F46-F54.
- HUANG Y, GAO J, ZHOU Y, et al. Therapeutic effect of integrin-linked kinase gene-modified bone marrow-derived mesenchymal stem cells for streptozotocin-induced diabetic cystopathy in a rat model. *Stem Cell Res Ther.* 2020;11(1):278.
- 罗广承, 何志华, 罗建珍, 等. 构建糖尿病膀胱豚鼠模型及其尿动力学评价 [J]. *中国组织工程研究*, 2014,18(7):1063-1068.
- PODELL BK, ACKART DF, RICHARDSON MA, et al. A model of type 2 diabetes in the guinea pig using sequential diet-induced glucose intolerance and streptozotocin treatment. *Dis Model Mech.* 2017;10(2):151-162.
- 魏艳青, 王江平, 王勤章, 等. 经尿道灌注慢病毒转染豚鼠膀胱的研究 [J]. *天津医药*, 2015,43(11):1275-1277.

(责任编辑: WZH, ZN, ZJP)