

三型酸敏感离子通道在大鼠 OAB 模型膀胱组织中表达的意义*

刘孝东¹, 陈剑珩¹, 李海源¹, 李 颢¹, 殷 烁^{2△}

1. 昆明医科大学第一附属医院 泌尿外一科(昆明 650032); 2. 安徽省肥西县医院 泌尿外科(合肥 230123)

【摘要】 目的 探讨大鼠膀胱组织中三型酸敏感离子通道(ASIC3)的表达与大鼠膀胱过度活动症(OAB)的关系。方法 成年雌性大鼠膀胱造瘘后,随机分为对照组(0.9%氯化钠盐水腹腔注射)、OAB组(环磷酰胺腹腔注射)、干预组(OAB组基础上加入 ASIC3 抑制剂阿米洛利),每组 20 只。24 h 后对各组大鼠进行尿流动力学检测;取 3 组大鼠的膀胱组织,进行病理学检查;并通过免疫组织化学染色、RT-PCR 和 Western blot 方法检测其 ASIC3 的表达。结果 尿流动力学检测结果显示:对照组大鼠储尿期及排尿期未见明显不稳定收缩;与对照组相比,OAB 组及干预组在储尿期可见不稳定收缩,即排尿间隔缩短($P < 0.01$),排尿次数增加($P < 0.01$)。干预组与 OAB 组相比,排尿间隔延长($P < 0.05$),排尿次数减少($P < 0.05$)。病理学检测提示:OAB 组、干预组中大鼠膀胱黏膜破坏;免疫组化染色提示:大鼠膀胱组织有 ASIC3 表达,主要分布于膀胱黏膜;RT-PCR 及 Western blot 提示:OAB 组中膀胱黏膜上 ASIC3 基因及蛋白表达较对照组升高($P < 0.01$),加入 ASIC3 抑制剂后,干预组 ASIC3 基因及蛋白表达低于 OAB 组($P < 0.05$),但仍高于正常组($P < 0.01$)。结论 大鼠膀胱组织有 ASIC3 基因及蛋白表达,OAB 大鼠膀胱组织 ASIC3 基因及蛋白表达增高,ASIC 抑制剂可抑制其表达,干预后,大鼠 OAB 症状减轻,说明膀胱组织 ASIC3 表达升高与膀胱逼尿肌反射亢进相关。

【关键词】 三型酸敏感离子通道 OAB 阿米洛利

Expression of Type 3 Acid Sensitive Ion Channels in Bladder of OAB Rat Model LIU Xiao-dong¹, CHEN Jian-heng¹, LI Hai-yuan¹, LI Hao¹, YIN Shuo^{2△}. 1. Urology Department, First Affiliated Hospital of Kunming University, Kunming 650032, China; 2. Urology Department, Feixi Country Hospital of Anhui Province, Hefei 230123, China

△ Corresponding author, E-mail: 632591129@qq.com

【Abstract】 Objective To investigate the expression of type 3 acid-sensing ion channels (ASIC3) in bladder tissue of over active bladder (OAB) rat model. **Methods** Sixty adult female rats were randomly divided into control group (intraperitoneal injection of 0.9% sodium chloride), OAB group (intraperitoneal injection of cyclophosphamide) and the intervention group (OAB rats treated with ASIC3 inhibitor amiloride). The rats underwent urodynamic testing. The bladder tissues were collected for pathological examination, while the expressions of ASIC3 were measured by the methods of immunohistochemistry, RT-PCR and Western blot. **Results** Urodynamic study found that the rats in control group had no significant contraction instability in both storage and voiding stages. Compared with the control group, OAB group and intervention group showed instability of visible contraction in urine storage stage, with shorter micturition interval ($P < 0.01$) and increased frequency of urination ($P < 0.01$). Compared with the OAB group, the intervention group showed significantly prolonged micturition interval ($P < 0.05$) and reduced frequency of urination ($P < 0.05$). Pathologic examination showed rat bladder mucosal damage in both OAB group and intervention group. Immunohistochemistry found the expression of ASIC3 on bladder mucosa. RT-PCR and Western blot showed significantly higher expression of ASIC3 in OAB group ($P < 0.01$), but the expression of ASIC3 decreased in intervention group after adding ASIC3 inhibitor. **Conclusion** ASIC3 expresses mainly on bladder mucosa. The gene and protein expression of ASIC3 in rat bladder tissue of OAB rats is higher, which can be significantly decreased by ASIC inhibitor. The symptoms of OAB reduce after intervention, which demonstrates the increased expression of ASIC3 in bladder tissue is closely related to bladder detrusor.

【Key words】 Type 3 of acid-sensing ion channels Over active bladder Amiloride

膀胱过度活动症(over active bladder, OAB)是泌尿外科一种常见疾病^[1],发病率较高。然而其致病机制尚不明确,目前多以对症治疗为主,效果欠佳。酸

* 云南省应用基础研究基金(No. 2014FB042)资助

△ 通讯作者, E-mail: 632591129@qq.com

敏感离子通道(acid-sensing ion channels, ASICs)是一类由胞外酸化所激活的阳离子通道^[2],酸化激活后产生不同的电流并影响相关靶器官。目前已初步探明 ASICs 在人体内广泛分布,在心血管^[3]、疼痛^[4]、肌肉活动^[5,6]等方面具有重要作用。临床工作中发现:碱化尿液可以缓解泌尿系统感染患者的尿路刺激症状。研究显示:ASICs 既与感觉^[4]有关又与平滑肌收缩^[6]有关,因此我们大胆设想:ASICs 可能在膀胱组织中表达,并可能参与膀胱的感觉与运动功能。本研究通过建立大鼠 OAB 模型,进行尿流动力学检测,观察 ASICs 抑制剂对 OAB 的干预作用,并采用 HE 染色、免疫组化染色、RT-PCR 和 Western blot 方法检测 ASIC3 表达的差异。

1 材料

1.1 实验动物

健康雌性 SD 大鼠 60 只,体质量(250±10)g,由昆明医科大学动物中心提供。

1.2 主要试剂及仪器

盐酸阿米洛利注射液、FITC 标记羊抗兔二抗、HRP 羊抗兔二抗(Sigma 公司);10%水合氯醛、环磷酰胺粉针剂(昆明制药有限公司);兔抗 ASICs 一抗(Abcam 公司);RNA 抽取试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司),cDNA 逆转录合成试剂盒(北京全式金生物技术有限公司)。尿流动力学仪器(昆明医科大学第一附属医院泌尿外科,购自北京西格力公司,型号 Delphis);硬膜外导管、输液泵及相关手术器械(昆明医科大学第一附属医院手术室);中国科学院昆明植物研究所提供免疫组化、RT-PCR、Western blot 相关仪器。

1.3 实验方法

1.3.1 引物合成 根据 GenBank 数据库提供的基因序列,使用在线 Primer-BLAST 引物设计软件设计引物。ASIC3 上游引物:5'-AGGGAGAAGTCC CAAAGCAT-3',下游引物:5'-GACACTCCATTC CCAGGAGA-3',扩增产物为 107 bp;内参基因 β -actin 上游引物:5'-TGGACATCCGCAAAGAC-3',下游引物:5'-AAGGGTGTAAACG CAACTAA-3',扩增产物为 302 bp。引物均由上海生工生物有限公司合成。

1.3.2 OAB 模型的构建及干预 60 只大鼠随机分为正常组、OAB 组和干预组 3 组,每组 20 只。3 组大鼠按文献^[7]膀胱造瘘,并留置硬膜外导管, OAB 组和干预组按照文献^[8]构建 OAB 模型,即用

环磷酰胺(CYP)200 mg/kg 腹腔注射(对照组大鼠腹腔注射等量 0.9%氯化钠盐水),12 h 后经尿流动力学检测确定 OAB 模型构建成功。所有大鼠单间隔离饲养,置于阴凉处,自然光照。建模开始 24 h 后进行实验,实验前 12 h 禁食不禁水。

3 组大鼠膀胱造瘘管接上 T 型三通管,主管接入尿流动力学仪器。侧管接入输液泵并持续输入 pH7.0 的生理盐水(2 mL/min),持续 3 min,共输入生理盐水 6 mL。干预组灌注 pH7.0 的生理盐水+ASIC3 抑制剂阿米洛利 200 mg/L^[2],共输入阿米洛利生理盐水溶液 6 mL。同时记录尿流动力学数据。所有大鼠实验结束后立即空气注射法处死。

1.3.3 尿流动力学检测 按 1.3.2 将 3 组大鼠膀胱造瘘管接 T 型三通管,进行尿流动力学检测。

1.3.4 膀胱组织病理学观察 所有大鼠尿动力学实验结束后,立即空气注射法处死。切开膀胱,摄像后取两输尿管口间的膀胱壁全层组织,分装入无菌容器内,标记后放入液氮罐中,送病理科做病理学检测。

1.3.5 膀胱组织 ASIC3 免疫组化染色 按 1.3.4 取部分膀胱组织,送至中科院昆明植物研究所,按说明书采用 SP 两步法对膀胱黏膜及肌层组织进行 ASIC3 免疫组织化学染色,阴性对照组采用 PBS 代替一抗,ASIC3 工作浓度为 1:100,以细胞膜上出现褐色颗粒为表达阳性。每张切片在 400 倍光镜下拍 10 个视野,染色后经 Motif image advanced 6.0 软件分析,转化为灰度值后进行统计。

1.3.6 RT-PCR 检测膀胱组织 ASIC3 基因的表达 将膀胱黏膜组织经过 Trizol 裂解后,根据 TRIzol Reagent 说明书提取细胞总 RNA,经紫外分光光度计检测 260 nm 处吸光度(A)值,根据各组 A 值计算并调整总 RNA 量。逆转录步骤参照试剂盒说明。PCR 反应条件^[9]为:94 °C 预变性 5 min,94 °C 变性 30 s,55 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,40 个循环,最后 72 °C 继续延伸 10 min,反应终止。PCR 产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测。GEL-Pro4 图像分析软件导出灰度值。以目的条带与内参 β -actin 灰度值的比值为目的基因的相对表达量。实验重复 3 次。

1.3.7 Western blot 检测膀胱组织 ASIC3 蛋白的表达 常规提取膀胱组织蛋白。收集到 1.5 mL 离心管中,沸水变性 10 min。紫外分光光度计测定蛋白含量。取相同总量总蛋白(50 μ g)的各样本,经 100 g/L SDS-PAGE 电泳,PVDF 膜转印 2 h,以 5%脱脂奶粉封闭 80 min,加相应的一抗 ASIC3

(1:200)、GAPDH(1:4 000)于 4 °C 过夜,HRP 羊抗兔二抗(1:6 000)室温孵育 2 h,ECL 化学发光法显色,曝光,显影,定影。扫描仪扫描结果,GEL-Pro4 图像分析软件导出灰度值分析结果。以目的条带与内参 GAPDH 灰度值的比值为目的蛋白的相对表达量。

1.4 统计学方法

数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠尿流动力学变化

正常组大鼠储尿期及排尿期逼尿肌收缩平稳,未见明显不稳定收缩,OAB 组、干预组在储尿期出现明显不稳定收缩,排尿间隔明显缩短($P < 0.01$),排尿次数明显增多($P < 0.01$),说明 OAB 模型构建成功。加入阿米洛利后,尿路刺激症有所缓解($P < 0.05$)。见表 1、图 1。

2.2 各组大鼠膀胱组织病理学检测

表 1 三组大鼠尿流动力学检测($n=20, \bar{x} \pm s$)

Table 1 Urodynamic investigation ($n=20, \bar{x} \pm s$)

Group	Micturition interval (s)	Micturition number	Spontaneous activet
Control	60.83 ± 3.42	3.00 ± 0.00	0
OAB	24.56 ± 4.37*·#	8.12 ± 1.08*·#	13.75 ± 2.53*·#
Treatment	41.88 ± 2.21*	5.21 ± 0.79*	2.20 ± 0.32*

* $P < 0.01$, vs. control group; # $P < 0.05$, vs. treatment group

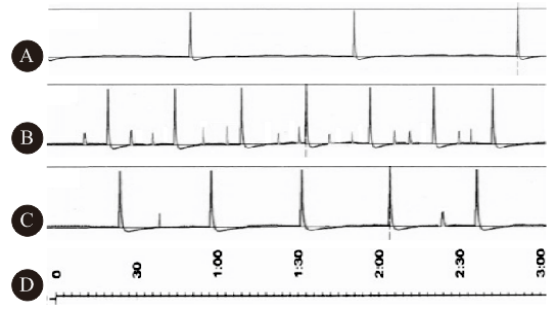


图 1 正常大鼠与 OAB 大鼠尿流动力学比较

Fig 1 Urodynamic investigation

A: Control group; B: OAB group; C: Treatment group; D: Time mark

见图 2。正常组大鼠膀胱黏膜及黏膜下层完好无损,而 OAB 组及干预组大鼠可见膀胱黏膜损伤明显,黏膜层出现连续性破坏,黏膜下层脱落,膀胱壁组织可见广泛的出血与充血现象。

2.3 各组大鼠膀胱组织 ASIC3 免疫组化染色

见图 3、表 2。结果显示,正常大鼠膀胱组织有 ASIC3 表达,主要分布于膀胱黏膜及黏膜下层。OAB 组大鼠膀胱黏膜上 ASIC3 表达较正常组升高($P < 0.01$),干预组膀胱黏膜 ASIC3 表达也较正常组升高($P < 0.05$),但不及 OAB 组($P < 0.05$)。各组膀胱肌层 ASIC3 表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。

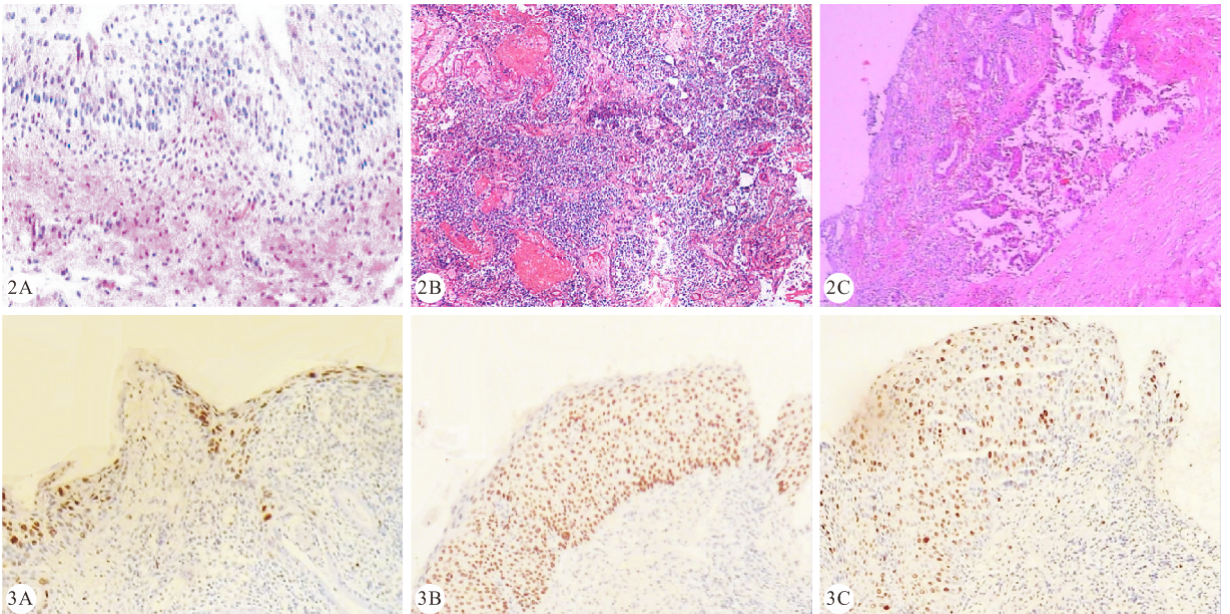


图 2 大鼠膀胱黏膜病理学检测。HE ×40

图 3 大鼠膀胱组织 ASIC3 染色。SP ×40

Fig 2 HE staining of bladder in rats. ×40

Fig 3 The expression of ASIC3 protein of bladder in rats. SP ×40

A: Control group; B: OAB group; C: Treatment group

表 2 各组大鼠膀胱 ASIC3 含量比较 (n=20, 灰度值)

Table 2 The expression of ASIC3 protein of bladder in rats (n=20, gray value)

Group	Bladder mucosal	Bladder muscle
Control	210.389±28.042	134.670±23.774
OAB	245.412±33.505*·#	133.845±23.894
Treatment	223.594±31.257*	135.495±24.132

* P<0.01, vs. control group; # P<0.05, vs. treatment group

2.4 RT-PCR 及 Western blot 检测膀胱组织 ASIC3 基因和蛋白的表达

见图 4、图 5。与正常组大鼠相比, OAB 组和干预组大鼠膀胱黏膜上 ASIC3 基因和蛋白表达升高 (P<0.01), 干预组 ASIC3 基因和蛋白表达低于 OAB 组 (P<0.05)。

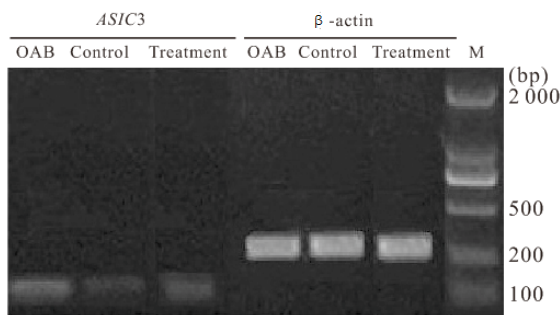


图 5 RT-PCR 检测大鼠膀胱黏膜 ASIC3 表达

Fig 5 The expression of ASIC3 gene of bladder in rats (RT-PCR)

M: Marker. * P<0.01, vs. control group; # P<0.05, vs. treatment group

3 讨论

OAB 是在排除感染以及其他病理改变的前提下, 出现尿急、伴或不伴有急迫性尿失禁、通常有尿频和夜尿增多等症候群^[2,10]。目前 OAB 病因不明确, 其治疗多以膀胱训练为主, 辅 M 受体拮抗剂治疗, 但很多患者服用 M 受体拮抗剂后产生副作用, 无法长期坚持服药, 因而治疗效果欠佳, 是一个亟待解决的难题。因此寻找新的治疗 OAB 以及膀胱逼尿肌反射亢进的药物非常必要。

OAB 的病理机制有很多假说, 如卡哈尔间质细胞 (interstitial cells of Cajal, ICC) 细胞相关理论^[11,12]、尿路上皮^[13,14] 异常变化与 OAB 的发病可能有一定的关系。然而各项研究尚处于起步阶段, 具体作用机制并不是十分明确, 也没有相应的治疗方法。因而寻找其他可能的机制, 对 OAB 的治疗可能具有指导意义。

ASICs 是一类由胞外液体酸化所激活的阳离子通道^[2], 酸化激活后产生不同的电流并影响相关靶

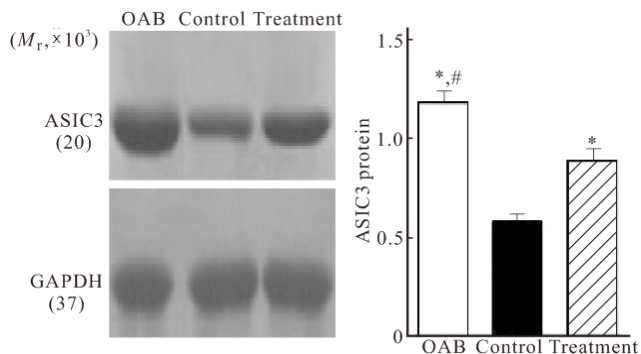
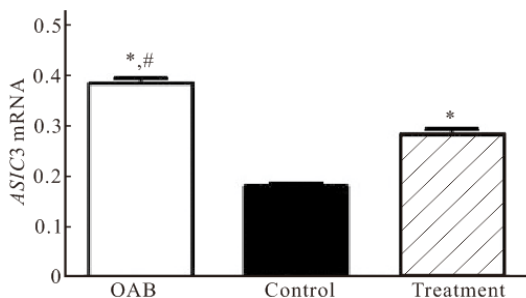


图 4 Western blot 检测大鼠膀胱 ASIC3 表达

Fig 4 The expression of ASIC3 protein of bladder in rats (Western blot)

* P<0.01, vs. control group; # P<0.05, vs. treatment group



器官。到目前为止, 已经发现 ASICs 家族的 6 个亚基 ASIC1a、ASIC1b、ASIC2a、ASIC2b、ASIC3、ASIC4。这 6 个亚基可以按照不同的模式, 组成同聚体或异聚体酸敏感离子通道^[15,16]。ASIC3 是疼痛相关的酸敏感离子通道, 主要分布在周围神经系统^[4], 是对 pH 值改变最敏感的酸受体。研究发现, 脊髓背根神经节 (dorsal root ganglia, DRG) 有 ASIC3 较多的表达, 与痛觉及伤害性感受密切相关, 在慢性炎性疼痛的病理过程中发挥重要的作用, 在炎性痛模型中可以增加脊髓背角 ASIC3 在转录和蛋白水平的表达; 阻断或敲除 ASIC3 基因 (ASIC3^{-/-}) 能明显抑制炎症性关节炎。表明在生理或病理情况下, DRG 中 ASIC3 对脊髓水平的感觉信息传递特别是痛觉的传导可能发挥着重要作用, 这可能是关节炎疼痛的治疗靶点^[17]。有学者研究发现, 激活 ASIC3 可以刺激小肠迷走神经传入神经元产生相应的电流改变, 进而影响小肠平滑肌的收缩。由此提出 ASIC3 与胃肠道收缩^[18] 可能有一定的联系, Nitta 等^[6] 则提出 ASIC 可能与肺动脉平

滑肌收缩密切相关。

由于 ASIC3 在人体内分布广泛,其与痛觉和平滑肌收缩密切相关,而尿路刺激征通常伴有不同程度的膀胱疼痛以及膀胱逼尿肌亢进。因此膀胱内是否同样存在 ASIC3? 膀胱内 ASIC3 是否与膀胱逼尿肌亢进有一定的关系? 值得进一步研究。

对于 OAB 来说,最准确的定量方法便是尿流动力学检测^[7]。本次实验参考华中科技大学同济医学院发明的动物尿流动力学模型^[7],在麻醉下对大鼠膀胱造瘘,待其清醒后再做尿流动力学检测,避免麻醉对尿流动力学检测的影响。同时严格控制体质量及饲养条件,在较短的时间内(3 min)对大鼠进行膀胱灌注,最大程度上避免了不同大鼠间的偶然误差,因此实验结果是较为准确的。同时,本次实验中,所有大鼠经过尿流动力学检测后,迅速经空气注射法处死,切除膀胱组织并迅速封存,避免标本变质所造成的实验误差。其中病理切片提示:经过大剂量 CYP 腹腔注射后,OAB 大鼠均出现了不同程度的膀胱炎改变,主要包括膀胱黏膜损伤明显,黏膜层出现连续性破坏,黏膜下层脱落,膀胱壁组织广泛的出血与充血现象。这为后续的实验提供了保障。

本实验参考 Ho 等^[8]的方法,采用 CYP 注射液,按照 200 mg/kg 剂量对大鼠进行腹腔注射,12 h 后建立 CYP 介导下的 OAB 模型。同时参考同济医学院泌尿外科尿流动力学模型^[7]构建方法,对 OAB 大鼠模型经过适当的外科处理,使其符合进行尿流动力学实验的条件。通过尿流动力学检测可以发现:对于正常大鼠,储尿期不会出现不稳定收缩,其排尿次数及排尿间隔亦较为稳定。而 OAB 大鼠模型的排尿次数明显增多,排尿间隔明显缩短,且储尿期出现大量不稳定收缩。可见 CYP 介导下 OAB 大鼠出现了明显的尿路刺激症状,OAB 大鼠模型构建成功。同时也验证了 CYP 腹腔注射诱导的化学性膀胱炎可出现较为明显的 OAB 症状,该模型也被广泛应用于 OAB 的研究。

ASIC3 抑制剂阿米洛利临床上为保钾利尿药^[19]或钠氢交换抑制剂^[20]。目前除抑制 ASICs 外,短时间低剂量的膀胱灌注不会产生任何的药理作用。本实验结果显示,加入 ASIC3 抑制剂阿米洛利后,CYP 介导下干预组尿路刺激症状明显缓解,其排尿及不稳定收缩次数均明显下降。可见 ASIC3 抑制剂可以在一定程度上缓解尿路刺激症状,由此提示 CYP 介导下 OAB 大鼠表现出的逼尿肌亢进可能与 ASIC3 有一定的关系。

对膀胱标本进行免疫组化染色发现,大鼠膀胱内存在大量 ASIC3 通道,且 ASIC3 主要存在于膀胱黏膜上。肌层含有少量 ASIC3。且 OAB 大鼠中 ASIC3 表达明显升高。进一步分析数据可知:干预组中 ASIC3 表达高于正常组,但不及 OAB 模型组。由此说明,经过 ASIC3 抑制剂阿米洛利处理过的大鼠膀胱内,ASIC3 含量有所下降。阿米洛利可以抑制甚至关闭部分 ASIC3。无论是否给予相关处理,各组肌层组织染色图片经过统计学分析后,ASIC3 表达始终无明显差异。由此提示 OAB 与 ASIC3 的关系可能只限于黏膜层的变化。

两种定量方法结果看出,OAB 模型大鼠膀胱黏膜上 ASIC3 表达升高($P < 0.01$),加入阿米洛利后,干预组中 ASIC3 表达有所下降,但仍然高于正常组($P < 0.01$)。由于所有大鼠在尿流动力学后均迅速处死,标本封存。对于干预组产生改变的原因,应该只有尿流动力学检测中,由膀胱灌入的 ASIC3 抑制剂阿米洛利。结合阿米洛利的药理学作用看出,短时间的膀胱灌注可以抑制甚至关闭部分 ASIC3。这一点在体外实验^[2]中也得到了验证。

目前 OAB 发病机制尚不明确,在除外尿路感染、神经源性膀胱以及尿路梗阻之后,有相当一部分患者仍然出现不明原因的尿路刺激征。本次实验提示膀胱内 ASIC3 与尿路刺激征确有一定的关系。由此大胆猜测,某些不明原因的尿路刺激征(如 OAB),可能与患者膀胱内 ASIC3 表达异常有关。膀胱内 ASIC3 表达升高,导致其在正常酸度尿液的刺激下过度放电,造成膀胱肌层无抑制不稳定收缩,继而产生 OAB 症状。然而由于检测方法复杂,检测费用过于昂贵,ASIC3 并不能作为 OAB 患者的常规检查;阿米洛利灌注液治疗 OAB,其临床依据、远期效果也难以保证。尽管如此,针对 ASIC3 的深入研究,或许可以为 OAB 的发病机制、治疗、乃至新药研发提供更广阔的空间。

参 考 文 献

- 1 Abrams P, Cardozo I, Fall M, *et al.* The standardisation of terminology of lower urinary tract function: report from the standardisation sub-committee of the international continence society. *Neurourol Urodyn*, 2002; 21(2): 167-178.
- 2 Sánchez-Freire V, Blanchard MG, Burkhard FC, *et al.* Acid-sensing channels in human bladder: expression, function and alteration during bladder pain syndrome. *J Urol*, 2011; 186(4): 1509-1516.
- 3 Tan ZY, Lu Y, Whiteis CA, *et al.* Chemoreceptor

- hypersensitivity, sympathetic excitation, and overexpression of ASIC and TASK channels before the onset of hypertension in SHR. *Circ Res*, 2010; 106(3): 536-545.
- 4 Rios ER, Rocha NF, Carvalho AM, *et al.* TRP and ASIC channels mediate the antinociceptive effect of citronellyl acetate. *Chem Biol Interact*, 2013; 203(3): 573-579.
- 5 Gautam M, Benson CJ. Acid-sensing ion channels (ASICs) in mouse skeletal muscle afferents are heteromers composed of ASIC1a, ASIC2, and ASIC3 subunits. *Chem Biol Interact*, 2013; 27(2): 793-802.
- 6 Nitta CH, Osmond DA, Herbert LM, *et al.* Role of ASIC1 in the development of chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2014; 306(1): H41-H52.
- 7 Pan F, Liu D, Han XM, *et al.* Urodynamic investigation of cyclophosphamide-induced overactive bladder in conscious rats. *Chin Med J (Engl)*, 2012; 125(2): 321-325.
- 8 Ho DR, Chen CS, Lin WY, *et al.* Effect of hyaluronic acid on urine nerve growth factor in cyclophosphamide-induced cystitis. *Int J Urol*, 2011; 18(7): 525-531.
- 9 郑云洁, 唐明, 刘长金等. COS-7 细胞上转染的人类三型酸敏感离子通道的生理学和药理学特性. *华中科技大学学报(医学版)*, 2006; 4(35): 421-325.
- 10 那彦群主编. 中国泌尿外科疾病诊断治疗指南手册. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 435-436.
- 11 Anderson UA, Carson C, McCloskey KD. KCNQ currents and their contribution to resting membrane potential and the excitability of interstitial cells of Cajal from the guinea pig bladder. *J Urol*, 2009; 182(1): 330-336.
- 12 He P, Deng J, Zhong X, *et al.* Identification of a hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel and its subtypes is the urinary bladder of the rat. *Urology*, 2012; 79(6): 1411. e7-13. doi:10.1016/j.urology.2012.01.037.
- 13 Parsons CL. The role of a leaky epithelium and potassium in the generation of bladder symptoms in interstitial cystitis/overactive bladder, urethral syndrome, prostatitis and gynaecological chronic pelvic pain. *BJU Int*, 2011; 107(3): 370-375.
- 14 Parsons CL. The role of the urinary epithelium in the pathogenesis of interstitial cystitis/prostatitis/urethritis. *Urology*, 2007; 69(4): S9-S16.
- 15 Jing L, Chu XP, Jiang YQ, *et al.* N-glycosylation of acid-sensing ion channel 1a regulates its trafficking and acidosis-induced spine remodeling. *J Neurosci*, 2012; 32(12): 4080-4091.
- 16 Babinski K, Catarsi S, Biagini G, *et al.* Mammalian ASIC2a and ASIC3 subunits co-assemble into heteromeric proton-gated channels sensitive to Gd³⁺. *J Biol Chem*, 2000; 275(37): 28519-28525.
- 17 李霞, 袁凤来, 陈飞虎等. 酸敏感离子通道 3 在关节炎疼痛中的作用. *中国临床药理学与治疗学*, 2010; 9(15): 1064-1069.
- 18 罗萍, 孙碧英, 李倩等. 小鼠小肠迷走神经初级传入神经元酸敏感电流的特征. *上海交通大学学报(医学版)*, 2010; 7(30): 783-787.
- 19 国家药典委员会. 中国药典. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 713-714.
- 20 李家明, 何勇, 周鹏等. 阿魏酰胍丁胺类似物的设计, 合成及 Na⁺/H⁺ 交换器-1 抑制活性. *药学报*, 2011; 46(8): 936-941.

(2015-06-11 收稿, 2015-10-02 修回)

编辑 沈进