论著

文章编号:1000-5404(2006)02-0172-02

胃肠道起搏细胞ICCs在豚鼠泌尿道分布研究

沈文浩,李为兵,熊恩庆,宋 波,卢根生,金锡御 (第三军医大学西南医院全军泌尿外科中心,重庆 400038)

提 要:目的 研究胃肠道起搏细胞-Cajal间质细胞(interstitial cells of Cajal, ICCs)在豚鼠泌尿道的分布情况。**方法** 取8只豚鼠肾盂、输尿管、膀胱和尿道组织,经铺片处理后,行ICCs特异性标志物KIT免疫细胞化学染色。**结果** KIT染色阳性,形态与胃肠道起搏细胞ICCs相似的细胞(ICCs样细胞)存在于豚鼠全泌尿道的黏膜下层和肌层。**结论** 在豚鼠全泌尿道存在有ICCs样细胞分布,豚鼠可作为研究人泌尿道ICCs样细胞功能的理想动物模型。

关键词:Cajal间质细胞;分布;KIT蛋白;泌尿道;c-kit

中图法分类号:R322.44;R322.63;R329.24 **文献标识码**:A

Distribution of interstitial cells of Cajal – the pacemaker cells of the gut in the guinea pig urinary tract

SHEN Wen-hao, LI Wei-bing, XIONG En-qing, SONG Bo, LU Gen-sheng, JIN Xi-yu (Urinary Surgery Research Center, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the distribution of interstitial cells of Cajal (ICCs)—the pacemaker cells of the gut in the guinea pig urinary tract. **Methods** The ureteral, vesical, and urethral tissues harvested from 8 guinea pigs were performed KIT immunocytochemical staining in stretched preparations. **Results** Cells with positive staining by KIT and with similar morphology to ICCs were found in the submucosal and muscular layers of the entire urinary tract of guinea pigs. **Conclusion** ICCs-like cells exist in the entire guinea pig urinary tract. The guinea pig is a good animal model for further research on the function of ICC-like cells in the human urinary tract.

Key words: interstitial cells of Cajal; distribution; KIT; urinary tract; c-kit

Cajal间质细胞(interstitial cells of Cajal, ICCs)是存在于胃肠道一种特殊类型细胞,起着起搏胃肠道慢波、传递电信号、介导肠神经与平滑肌之间调节信号的作用;并与病理状态下的多种胃肠动力紊乱疾病(便秘、假性肠道梗阻等)密切相关,是胃肠道平滑肌节律性收缩功能调节的重要因素[1-3]。泌尿道平滑肌具有胃肠道平滑肌相似的生理特性,提示我们ICCs存在于泌尿道和发挥相似功能的可能性。

KIT免疫细胞化学染色阳性结合细胞具有的特殊形态是目前公认的鉴定ICCs的方法[4]。应用该方法,国外学者已确定KIT阳性、形态与ICCs相似的ICCs样细胞存在于豚鼠膀胱[5],小鼠[6]、大鼠、猪和牛的上尿路[7],兔尿道[8]以及人的全泌尿道[9]。为了进一步研究ICCs样细胞在人泌尿道的功能,需有这类细胞在泌尿道分布与人相对应的动物模型。本研究通过组织铺片和KIT免疫细胞化学染色技术,探讨ICCs样细胞在豚鼠全泌尿道的分布情况。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(304717401)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (304717401)

作者简介:沈文浩(1979-),男,湖北省襄樊市人,博士研究生,医师,主要从事尿动力学方面研究。电话:(023)68754000-73086

通讯作者:宋 波,电话:(023) 68754186,E-mail :song-bo@263.com

收稿日期:2005-07-08;**修回日期**:2005-09-17

1 材料与方法

1.1 材料

30~60日龄豚鼠(第三军医大学实验动物中心),体质量200~300 g,雌雄不限,共8只。

1.2 方法

1.2.1 全层铺片 豚鼠4%苯巴比妥钠麻醉后,取肾盂,输尿管,膀胱和尿道新鲜组织,沿腹侧面纵行剪开,100%丙酮固定30 min。在解剖显微镜下,小心剔除黏膜层。分别得到肾盂、输尿管和尿道的黏膜下层、内纵和外环肌层组织。膀胱逼尿肌层较厚且呈网状走形,分层不明显,取其黏膜下层和1~2层肌层组织。所有标本均剪切成4~5 mm长、1~2 mm宽行以下实验。

1.2.2 免疫细胞化学染色 染色方法为间接酶标抗体法(IELA)。铺片经0.01 mol/L PBS充分漂洗后,0.03% H_2O_2/甲醇封闭内源性过氧化物酶20 min(25 ℃),1% BSA孵育30 min后加入KIT单克隆抗体(ACK2,1∶100,eBIOSCIENCE公司)4 ℃ 48 h,辣根过氧化物酶标记的兔抗大鼠IgG抗体(1∶100,DAKO公司)25 ℃ 60 min,0.05 % Tris-HCl/0.05% DAB/0.01% H_2O_2 pH 7.5显色,镜下观察,适时终止反应,终产物为棕褐色,水溶性封片剂封片。各步骤间用PBS漂洗3次,每次5 min。将上述第一和第二抗体分别用肥大细胞类胰蛋白酶单克隆抗体(E-17,1∶100,Santa Cruz公司)和辣根过氧化物酶标记的兔抗羊IgG抗体(1∶100,DAKO公司)替代,以鉴定肥大细胞。对照实验以正常鼠血清代替一抗,或兔血清代替二抗,结果均为阴性。选取豚鼠肠壁进行全层铺片作为阳性对照,染色方法同上。

2　结果

在豚鼠肾盂、输尿管、膀胱和尿道的黏膜下层和肌层均存在有 KIT 染色阳性、形态与胃肠道 ICCs 相似的 ICCs 样细胞（图 1－5）。这类细胞胞体呈梭形，有一个或多个突起，细胞核大而细胞质较少。肥大细胞 KIT 染色也为阳性，胞体为圆形，无突起，肥大细胞类胰蛋白酶染色为阳性（图 1、6）。

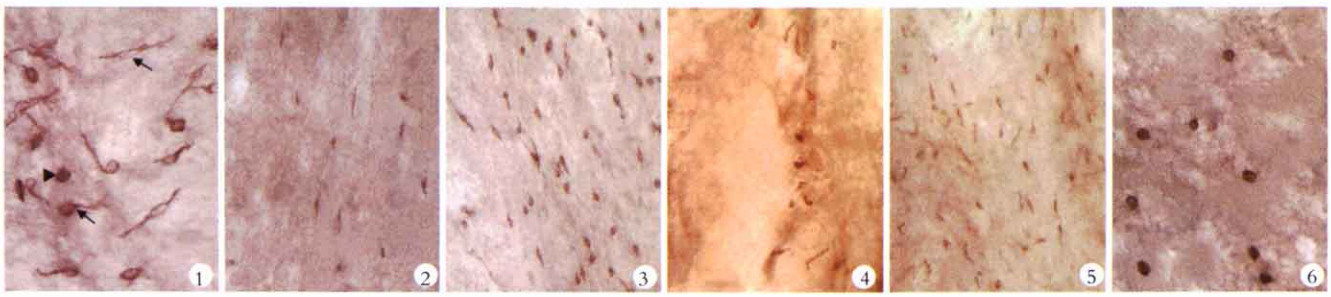


图 1　全层铺片 KIT 免疫细胞化学染色显示肾盂肌层 ICCs 样细胞（▲）和肥大细胞（↑）（IELA ×400）
图 2　全层铺片 KIT 免疫细胞化学染色显示输尿管黏膜下层 ICCs 样细胞（IELA ×200）
图 3　全层铺片 KIT 免疫细胞化学染色显示输尿管肌层 ICCs 样细胞（IELA ×200）
图 4　全层铺片 KIT 免疫细胞化学染色显示膀胱肌层 ICCs 样细胞（IELA ×200）
图 5　全层铺片 KIT 免疫细胞化学染色显示尿道肌层 ICCs 样细胞（IELA ×200）
图 6　全层铺片肥大细胞类胰蛋白酶免疫细胞化学染色显示肾盂肌层肥大细胞（IHC ×400）

3　讨论

3.1　泌尿道 ICCs 样细胞研究现状

泌尿道平滑肌具有和胃肠道平滑肌相似的、不受神经控制的自发性肌源性兴奋性，其兴奋起源和调节机制目前尚不清楚。ICCs 在胃肠道兴奋起源、动力产生和功能调控方面的重要作用以及泌尿道和胃肠道平滑肌相似的生理特性，让我们联想到该类细胞在泌尿道存在和发挥相似功能的可能性。由于该类细胞是否在泌尿道发挥其在胃肠道一样的功能尚有待进一步证实，泌尿道 ICCs 被称为 ICCs 样细胞以与胃肠道 ICCs 相区别。

ICCs 样细胞在泌尿道可能起着重要作用。存在于兔尿道的 ICCs 样细胞具有自发性去极化能力，被证明是尿道的起搏细胞。McCloskey 等[5]对新鲜分离的 ICCs 样细胞采用激光共聚焦显微镜观察荧光标记的 Ca^{2+} 浓度变化情况，发现在所记录的细胞中有 1/5 具有自发性 Ca^{2+} 浓度波动，推测其在膀胱中可能具有起搏细胞样活性。

3.2　豚鼠可作为研究 ICCs 样细胞在人泌尿道功能的理想动物模型

在已有关于泌尿道 ICCs 样细胞的分布研究报道中，仅在人的全泌尿道发现有 ICCs 样细胞[9]；在小鼠上尿路有 ICCs 样细胞分布，而在膀胱则无[6]；与之相反，在豚鼠膀胱发现有该类细胞存在[5]，而在上尿路无[10]。预实验我们曾对小鼠全泌尿道做过相似研究，结果同国外报道相吻合；而在对豚鼠全泌尿道进行研究后，我们则发现在豚鼠的全泌尿道均有 ICCs 样细胞存在。ICCs 样细胞在豚鼠和人泌尿道分布的一致性为进一步研究该类细胞在人泌尿道具体功能提供了一个理想的动物模型。

3.3　ICCs 样细胞在泌尿道的生理功能有待深入研究

ICCs 样细胞为探求上、下尿路兴奋起源提供了一个研究靶点，其生理功能有待进一步深入研究，结果将有助于丰富尿路神经生理理论，并为理解尿路某些疾病的病理生理机制提供新的切入点。

参考文献：

[1] HANANI M, FREUND H R. Interstitial cells of Cajal – their role in pacing and signal transmission in the digestive system[J]. Acta Physiol Scand, 2000, 170(3): 177 – 190.

[2] ROLLE U, PIOTROWSKA A P, NEMETH L, *et al*. Altered distribution of interstitial cells of Cajal in Hirschsprung disease[J]. Arch Pathol Lab Med, 2002, 126(8): 928 – 933.

[3] FELDSTEIN A E, MILLER S M, EL YOUSSEF M, *et al*. Chronic intestinal pseudoobstruction associated with altered interstitial cells of cajal networks[J]. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2003, 36(4): 492 – 497.

[4] VANNUCCHI M G. Receptors in interstitial cells of Cajal: identification and possible physiological roles[J]. Microsc Res Tech, 1999, 47(5): 325 – 335.

[5] McCLOSKEY K D, GURNEY A M. Kit positive cells in the guinea pig bladder[J]. J Urol, 2002, 168(2): 832 – 836.

[6] PEZZONE M A, WATKINS S C, ALBER S M, *et al*. Identification of c-kit-positive cells in the mouse ureter: the interstitial cells of Cajal of the urinary tract[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2003, 284(5): F925 – F929.

[7] METZGER R, SCHUSTER T, TILL H, *et al*. Cajal-like cells in the upper urinary tract: comparative study in various species[J]. Pediatr Surg Int, 2005, 21(3): 169 – 174.

[8] SERGEANT G P, HOLLYWOOD M A, MCCLOSKEY K D, *et al*. Specialised pacemaking cells in the rabbit urethra[J]. J Physiol, 2000, 526 Pt 2: 359 – 366.

[9] VAN DER AA F, ROSKAMS T, BLYWEERT W, *et al*. Identification of kit positive cells in the human urinary tract[J]. J Urol, 2004, 171(6 Pt 1): 2492 – 2496.

[10] KLEMM M F, EXINTARIS B, LANG R J. Identification of the cells underlying pacemaker activity in the guinea-pig upper urinary tract[J]. J Physiol, 1999, 519 Pt 3: 867 – 884.

（编辑　周　芳）