论著

文章编号:1000-5404(2007)01-0078-03

激光共聚焦显微镜观察三磷酸肌醇对大鼠逼尿肌细胞内钙的影响

王 军,宋 波,金锡御,熊恩庆 (第三军医大学西南医院全军泌尿外科研究所,重庆 400038)

提 要:目的 探讨 IP_3/Ca^{2+} 信号转导过程与逼尿肌细胞内游离 Ca^{2+} 浓度[Ca^{2+}]i 的关系。**方法** 建立逼尿肌过度活动大鼠模型,利用激光共聚焦显微镜观察原代培养的逼尿肌稳定及逼尿肌过度活动大鼠逼尿肌培养细胞内钙荧光强度的变化以及 10^{-5}mol/L IP_3及其抑制剂肝素影响逼尿肌稳定大鼠逼尿肌培养细胞后细胞内钙荧光强度在有钙液及无钙液中的变化。**结果** 逼尿肌过度活动鼠逼尿肌培养细胞内钙荧光强度较逼尿肌稳定鼠显著增强($P<0.01$),经 10^{-5}mol/L IP_3处理后,逼尿肌稳定大鼠逼尿肌培养细胞内钙荧光强度较处理前显著增强($P<0.01$),且有钙液中细胞内钙荧光强度显著高于无钙液中细胞($P<0.01$)。肝素能显著抑制由 IP_3引起的逼尿肌培养细胞内钙荧光强度的增强。**结论** 由 IP_3激活引起的逼尿肌细胞内游离钙浓度的升高可能是逼尿肌过度活动发生的重要原因之一。

关键词: 三磷酸肌醇;激光共聚焦显微镜;逼尿肌过度活动

中图法分类号: R329.24; R334.3; R694.02 **文献标识码:** A

Effect of inositol (1,4,5)-trisphosphate on intracellular calcium in rat detrusor cells

WANG Jun, SONG Bo, JIN Xi-yu, XIONG En-qing (Urinary Surgery Research Center, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the relationship between IP_3/Ca^{2+} signal transduction process and the changes of intracellular calcium in detrusor cells in rats. **Methods** The model of overactive detrusor (OAD) was successfully established in female Wistar rats. Intracellular calcium fluorescence intensity of cultured detrusor cells in OAD rats and detrusor stability (DS) rats was measured by laser scanning confocal microscopy (LSCM). After pretreated by 10^{-5} mol/L IP_3 alone or with its inhibitor heparin, the intracellular calcium fluorescence intensity of cultured detrusor cells of DS rats in Ca^{2+}-contained and Ca^{2+}-free solutions was measured with LSCM. **Results** Intracellular calcium fluorescence intensity of cultured detrusor cells in OAD rats was stronger than that of DS rats ($P<0.01$). After pretreated by 10^{-5} mol/L IP_3, the intracellular calcium fluorescence intensity in cultured detrusor cells of DS rats was obviously enhanced as compared with that before pretreatment ($P<0.01$), and stronger in the cells cultured in Ca^{2+}-contained solution than that in Ca^{2+}-free solution ($P<0.01$). Heparin could inhibit the intracellular calcium fluorescence intensity enhanced by IP_3. **Conclusion** The increase of intracellular free calcium concentration in detrusor cells caused by IP_3 may be one of important factors inducing detrusor instability.

Key words: inositol(1,4,5)-trisphosphat; laser scan confocal microscopy; overactive detrusor

钙离子作为细胞内信号转导的第二信使,参与了体内众多重要生理活动,细胞在外界或不同生理病理状态下胞内钙离子浓度都会发生相应变化,本研究采用体外培养逼尿肌稳定及逼尿肌过度活动大鼠逼尿肌细胞,利用激光共聚焦显微镜动态观察 IP_3对2组大鼠逼尿肌细胞内游离钙的影响,并初步探讨二者之间的关系,以进一步阐明逼尿肌过度活动(overactive detrusor, OAD)的发病机制。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

健康雌性 Wistar 大鼠 50 只,体质量 200~300 g,3~4 月龄,购自本校实验动物中心。

拉力传感器(中国航天医学工程研究所产品),尿动力学检测仪(丹麦 Medtronic 公司产品),AVI270 型微量灌注泵(美国 3M 公司产品),四通道多功能生理放大器(第三军医大学大坪医院野战外科研究所产品),501 型恒温水浴器官槽(重庆实验设备厂产品),高糖 DMEM 培养基(Gibco 公司),胎牛血清(Hy-

作者简介:王 军(1969-),男,新疆维吾尔族自治区乌鲁木齐市人,博士,副主任医师,主要从事泌尿系结石形成机制及膀胱排尿功能障碍方面的研究。电话:(023)68773086, E-mail: wj7567@163.com

收稿日期:2005-12-15;修回日期:2006-03-06

clone 公司),Ⅰ型胶原酶、胰蛋白酶(Roche 公司),激光共聚焦显微镜(德国 Leica TCS-TIV 型),Fluo-4/AM,F-127(Molecular probes 公司),IP_3、Hanks (Sigma 公司),D-Hanks (Hyclon 公司)

1.2　实验方法

1.2.1　OAD 大鼠模型建立及动物分组方法

1.2.1.1　OAD 大鼠模型制作　　1% 苯巴比妥腹腔注射麻醉大鼠(40 mg/kg),取仰卧位固定,75% 乙醇消毒下腹及会阴部,以直径 1 mm 聚乙烯探子插入尿道,剪开会阴部皮肤,仔细分离出尿道,2-0 丝线结扎前尿道,松紧适中,轻拔出探子,缝合皮肤,碘伏消毒切口。假手术组只在相同部位进行相同操作,但不结扎尿道。术后保持动物笼洁净,所有手术动物术后给予庆大霉素 0.5 mg/kg 腹腔注射,每天 1 次,共 3 d。实验动物手术组 30 只,假手术组 20 只。

术后 6 周,乌拉坦皮下注射麻醉(1 g/kg)大鼠,仰卧固定,75% 乙醇消毒术野,将硬膜外导管经尿道插入膀胱,尿道结扎组大鼠经原切口进入,分离尿道后拆除结扎线,同法插入硬膜外导管。轻压大鼠下腹部排净尿液,侧压管经三通管与尿动力仪及微量灌注泵相连,以 0.2 ml/min 的速度向膀胱灌注 37 ℃ 生理盐水,记录膀胱压力波形、大小变化,记录到膀胱不稳定收缩波压力介于 10 ~ 20 cmH_2O 之间,改变灌注速度为 0.1 ml/min,再次记录不稳定收缩波。

1.2.1.2　动物分组　　采用随机数字表法从假手术组大鼠中经膀胱测压后选出逼尿肌稳定者 10 只作为逼尿肌稳定组(DS 组),从尿道结扎组中经膀胱测压后选出逼尿肌过度活动鼠 10 只做为逼尿肌过度活动组(OAD 组)。实验过程中假手术组大鼠死亡 5 只,尿道结扎组大鼠死亡 9 只。

1.2.2　DS 及 OAD 大鼠逼尿肌细胞原代培养及鉴定方法

1.2.2.1　原代培养　　OAD 及 DS 大鼠断颈处死,在无菌条件下快速切取膀胱,置于预冷的 Hanks 液中,纵向剪开膀胱,用刀片轻轻刮除膀胱黏膜及周围结缔组织,Hanks 液冲洗 3 次,将膀胱逼尿肌剪成 1 mm^3 小块,Hanks 液再次冲洗组织 2 次,将组织块放入 50 倍体积的 0.1% 胶原酶溶液中,37 ℃ 水浴中消化 5 min,用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液终止消化,吹管轻轻吹打,得到分散的平滑肌细胞,将细胞悬液离心(1 000 r/min,5 min),弃上清,DMEM 液混悬细胞,调整细胞浓度为 5×10^5/ml,将细胞接种在 100 ml 培养瓶中,于 37 ℃、5% CO_2 孵箱中培养。

1.2.2.2　传代培养　　原代培养 3 d 后,观察见 80% 细胞已贴壁生长,细胞舒展成长梭形,层叠成"峰、谷"状,倒去瓶中培养液,加入 0.125% 胰蛋白酶与 0.02% EDTA 混合液(体积分数 1∶1)约 1 ml,室温放置 30 s,镜下观察见细胞渐收缩成接近圆形并从瓶壁即将脱落下来时,加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 液 1 ml 终止消化,吸去瓶中消化液,加入完全 DMEM 培养液约 2.5 ml,充分吹打使细胞成单细胞悬液,按 1∶2 接种传代。实验所用细胞为 3 ~ 4 代。

1.2.2.3　原代培养细胞的鉴定　　采用免疫组化 S-P 染色法,按试剂盒说明操作,细胞内布满棕黄色丝状物为阳性。

1.2.3　原代培养的逼尿肌细胞进行六孔培养板传代　　取用于传代的指数期生长细胞,倒去培养瓶中旧液,沿瓶壁加入 0.25% 胰蛋白酶与 0.02% EDTA 混合液(体积分数 1∶1)约 1 ml,使消化液刚好覆盖细胞表面,室温静置 20 ~ 30 s,显微镜下观察见细胞收缩成圆形,细胞间隙清楚,在细胞即将从瓶底脱落时,加入含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养液约 1.5 ml 中止消化,吸去消化液,重新加入约 2.5 ml DMEM 完全培养液,充分吹打瓶底使贴壁细胞脱落,悬浮于培养液中,将细胞按 1∶3 比例接种于已放置 20 mm × 20 mm 盖玻片的六孔培养板中,置培养箱中培养,传代第 3 天镜下观察见细胞已在盖玻片上完全贴壁,展开,呈典型的极向性生长,可用于进行下一步实验。实验所用细胞为第 3 代。

1.2.4　培养细胞的 Fluo-4/Am 负载　　取六孔培养板中的盖玻片,D-Hanks 液冲洗 2 遍,用 100 μl 的 Fluo-4/AM 与 F-127 混合工作液(10 μmol/L Fluo-4/AM ,0.02% F-127)滴于盖玻片上,37 ℃ 避光 40 min,D-Hanks 液再次冲洗玻片 3 遍,洗去多余染料,保留少许 D-Hanks 液平衡细胞 10 min,于 10 min 内进行细胞内钙离子浓度检测。当测定在有钙液下细胞内钙离子浓度时,将 D-Hanks 换为 Hanks 液。

1.2.5　无钙液下 OAD、DS 大鼠逼尿肌培养细胞质游离钙浓度测定　　将负载后的各组细胞在激光共聚焦显微镜下动态扫描,激发波长 488 nm,发射波长 525 nm,观察细胞内钙荧光强度变化,扫描间隔 10 s。

1.2.6　IP_3 及其抑制剂肝素对 DS 大鼠逼尿肌培养细胞细胞质内游离钙浓度的影响　　分别用 Hanks 液及 D-Hanks 液处理 DS 组负载细胞,将细胞置于激光共聚焦显微镜下动态扫描 20 s,用微量加样器将二甲亚砜(DMSO)配制的终浓度为 10^{-5} mol/L 的 IP_3 以及终浓度为 10^{-5} mol/L IP_3 + 0.01 μmol/L 肝素加注到盖玻片上,镜下取 3 ~ 4 个细胞,动态观察胞内钙荧光强度变化。

1.3　统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 统计软件进行 t 检验。

2　结果

尿道结扎组大鼠术后 6 周经膀胱测压记录到明显膀胱不稳定收缩波,压力介于 10 ~ 20 cmH_2O 之间,改变灌注速度为 0.1 ml/min,再次记录不稳定收缩波。

LSCM 观察显示,与 DS 组相比,OAD 组逼尿肌细胞细胞质内钙荧光强度显著增强($P < 0.05$)。加入 10^{-5} mol/L IP_3 后,DS 组细胞细胞质内钙荧光强度显著高于加药前($P < 0.05$),在有钙液中 DS 组逼尿肌细胞细胞质内钙荧光强度显著高于无钙液中 DS 细胞($P < 0.01$),0.01 μmol/L 肝素能显著抑制由 IP_3 引起的逼尿肌培养细胞内钙荧光强度的增强($P < 0.01$)。见表 1。

表 1　DS、OAD 大鼠逼尿肌培养细胞质钙荧光强度变化

组别	例数	Ca^{2+} 荧光强度
DS	4	23.74 ± 0.21
OAD	4	38.26 ± 1.23[a]
D-Hanks DS + IP_3	4	48.03 ± 0.60[a]
Hanks DS + IP_3	4	52.98 ± 0.22[ab]
D-Hanks DS + IP_3 + 肝素	4	24.26 ± 0.97[b]
Hanks DS + IP_3 + 肝素	4	24.77 ± 0.78[b]

a: $P < 0.05$,与 DS 组比较; b: $P < 0.01$,与 D-Hanks DS + IP_3 组比较

3 讨论

钙离子作为细胞内信号转导的第二信使，参与了诸如肌肉收缩，神经传导等多种重要生理活动，其浓度变化是细胞重要的信息系统，细胞在外界或不同生理、病理状态下胞内钙离子浓度都会发生相应变化[1]。细胞内钙主要贮存于内质网（endoplasmic reticulum，ER）和肌质网（sarcoplasmic reticulum，SR）内，目前已知有二类钙库，即 IP_3 敏感和 IP_3 不敏感钙库，分别通过 IP_3 受体（IP_3R）通道和斯里兰卡肉桂碱受体（ryanodine receptor，RrR）通道释放钙离子。平滑肌的收缩反应必须在 Ca^{2+} 参与下激活收缩蛋白方能实现，逼尿肌细胞收缩时游离 Ca^{2+} 增加主要来源于细胞外液 Ca^{2+} 内流或细胞内存贮 Ca^{2+} 释放，而细胞外 Ca^{2+} 进入细胞和胞内 Ca^{2+} 向肌质中释放对触发逼尿肌整体性收缩具有同等的重要性，二者促成胞内游离 Ca^{2+} 浓度增加，触发逼尿肌收缩[2-4]。研究显示，IP_3 能迅速引起细胞内钙库释放 Ca^{2+} 以及使胞外 Ca^{2+} 跨膜内流，提高膜内 Ca^{2+} 浓度，使平滑肌细胞去极化诱发动作电位[5]。

有研究者发现 OAD 逼尿肌细胞中 Ca^{2+} 浓度较正常逼尿肌增高，并认为细胞内钙库释放在其中起主导作用[6,7]。一般认为，细胞质内游离钙浓度 $[Ca^{2+}]i$ 升高有二大来源，即内贮 Ca^{2+} 释放和胞外 Ca^{2+} 内流，前者使 $[Ca^{2+}]i$ 迅速增高到峰值，后者是维持 $[Ca^{2+}]i$ 于平台期持续性增高及贮钙池再充盈的重要来源。IP_3 除可引起内钙释放，还可促进胞膜上 Ca^{2+} 池操纵的 Ca^{2+} 通道（store-operated calcium channels，SOC）开放，触发外 Ca^{2+} 内流[8]。在可兴奋细胞中，SOC 通过与兴奋不相关的途径（excitation-independent pathway）对细胞的生理功能起着不可替代的作用，如平滑肌的收缩，神经递质的产生[9]。

目前测量细胞内钙浓度的方法有放射示踪法、荧光标记法等多种方法[10]，激光共聚焦显微镜能连续动态观察标本，在活组织上进行观察和测量，并能实际地反映生理状态的变化，是目前检测细胞内钙的一种较好工具。本研究通过 LSCM 对大鼠逼尿肌原代培养细胞内游离 Ca^{2+} 检测结果显示，OAD 组逼尿肌细胞内钙荧光强度较 DS 组显著增强，这与文献报道的结果一致。使用 10^{-5}mol/L IP_3 作用 DS 细胞后，胞内钙荧光强度较作用前明显增强，这可能是由于 IP_3 作用 DS 细胞后引起胞内 Ca^{2+} 释放的结果，与细胞外无钙环境相比，IP_3 作用于有钙液 DS 细胞，除了引起胞内 Ca^{2+} 释放外，还通过胞膜上 SOC 通道开放，使胞外 Ca^{2+} 跨膜内流，进一步提高胞内 $[Ca^{2+}]i$，这也是有 Ca^{2+} 液中 DS 细胞较无 Ca^{2+} 液中 DS 细胞内钙荧光强度显著增加的原因。最近的研究表明，肝素除作为一种常规抗凝剂外，它还是 IP_3R 的特异性抑制剂，可能正是肝素抑制了 IP_3 与 IP_3R 结合，使胞内 $[Ca^{2+}]i$ 下降，抑制了由 IP_3 引起的逼尿肌培养细胞内钙荧光强度的增强。

通过本研究，我们认为由 IP_3 激活引起的逼尿肌细胞内 $[Ca^{2+}]i$ 升高，使逼尿肌细胞 Ca^{2+} 超载[11]，导致细胞失去或减弱对其收缩、舒张的调节，诱发膀胱逼尿肌的无抑制收缩，可能是逼尿肌过度活动的发病原因之一，深入探讨其作用机制对其临床治疗有一定的现实意义。

参考文献：

[1] 张 旻，王美青，王景杰. 维生素 D3 刺激髁突软骨细胞内钙释放及机械压力对其影响的研究[J]. 华西口腔医学杂志，2004，22(1)：69-72.

[2] 陈政良，谢佩蓉. IP_3R、RYR 与 Ca^{2+} 信号[J]. 国外医学：分子生物学分册，1994，16(5)：216-222.

[3] 曹文峰，陈昭颉，王庆堂. 钙离子在逼尿肌收缩机制中的作用[J]. 西南国防医药，2005，15(1)：103-105.

[4] Fry C H, Wu C. The cellular basis of bladder instability [J]. Br J Urol, 1998, 81(1): 1-18.

[5] Yamanishi T, Chapple C R, Yasuda K, *et al*. The role of M(2)-muscarinic receptors in mediating contraction of the pig urinary bladder *in vitro*[J]. Br J Pharmacol, 2000, 131(7): 1482-1488.

[6] Chambers P, Neal D E, Gillespie J I. Ca^{2+} mobilization in cultured human bladder smooth muscle cells in response to hypotonic stimuli [J]. Exp Physiol, 1997, 84(4): 677-686.

[7] Damaser M S, Kim K B, Longhurst P A, *et al*. Calcium regulation of urinary bladder function[J]. J Urol, 1997, 157(2): 732-738.

[8] Pirotton S, Communi D, Motte S, *et al*. Endothelial P2-purinoceptors: subtypes and signal transduction[J]. J Auton Pharmacol, 1996, 16(6): 353-356.

[9] Putney J W, Jr.. "Kissin' cousins": intimate plasma membrane-ER interactions underlie capacitative calcium entry[J]. Cell, 1999, 99(1): 5-8.

[10] Kurebayashi N, Ogawa Y. Effect of luminal calcium on Ca^{2+} release channel activity of sarcoplasmic reticulum *in situ*[J]. Biophys J, 1998, 74(4): 1795-1807.

[11] Levin R M, Monson F C, Haugaard N, *et al*. Genetic and cellular characteristics of bladder outlet obstruction[J]. Urol Clin North Am, 1995, 22(6): 263-283.

（编辑 薛国文）