论著

文章编号:1000-5404(2007)23-2264-03

抑制 Kit 信号通路对豚鼠膀胱间质细胞增殖及自主节律性运动的影响

唐仕明[1],何大朋[1],王 忠[1],辜福贤[1],王明荣[2] ([1]四川省广元市人民医院泌尿外科,广元 628000;[2]第三军医大学西南医院胸心外科,重庆 400038)

提 要:目的 探讨抑制 Kit 表达对豚鼠膀胱间质细胞(interstitial cells, ICs)增殖及自主节律性运动的影响。**方法** 成年豚鼠分别予伊马替尼灌胃 20 d 和 40 d,免疫荧光、Western blot 和体外灌流观察间质细胞形态和功能的变化。**结果** 正常豚鼠膀胱壁内可见较多的间质细胞,用药 20 d 和 40 d 后,细胞数量逐渐减少,Kit 蛋白的表达逐渐降低,同时,膀胱的自主节律性运动受到抑制。**结论** 膀胱内含间质细胞,这些细胞可能是膀胱运动的起搏细胞,其细胞表面表达的 Kit 蛋白对间质细胞的存活和功能维持都具有重要的作用。

关键词:Kit 蛋白;间质细胞;伊马替尼

中图法分类号:R322.62;R329.28 **文献标识码**:A

Effects of inhibiting Kit signal pathway on proliferation and spontaneous rhythmic motility of interstitial cells in bladder of guinea pigs

TANG Shi-ming[1], HE Da-peng[1], WANG Zhong[1], GU Fu-xian[1], WANG Ming-rong[2] ([1]Department of Urinary Surgery, Guangyuan People's Hospital, Guangyuan 628000; [2]Department of Cardiothoracic Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To investigate the role of Kit signal pathway in the proliferation and spontaneous rhythmic motility of interstitial cells (ICs) in the bladder of guinea pigs. **Methods** Fourteen Guinea pigs aged 45 – 60 days were administered with Imatinib intragastrically for 20 and 40 days. Three were fed on normal saline as control. The morph and number of ICs were observed by immunofluorescence, Kit protein expression was detected by Western blot and spontaneous rhythmic motility of bladder were investigated in *in vitro* organ bath. **Results** Quite a few ICs were observed in the bladder of controls. After administration of Imatinib, the amount of ICs and the expression of Kit protein decreased gradually, and the spontaneous rhythmic contraction weakened. **Conclusion** ICs might be the pacemaker of bladder in guinea pigs. Kit protein might play an important role in the survival and functional maintenance of ICs.

Key words: Kit protein; interstitial cell; Imatinib

Cajal 间质细胞(interstitial cells of Cajal, ICCs)是胃肠道运动的起搏细胞,在调控消化道运动中起着重要的作用[1]。有报道在消化道以外的脏器,如膀胱[2]、子宫[3]、胆囊[4]、心肌等均存在着类似 ICCs 样的细胞,称为间质细胞(interstitial cells, ICs)。由于膀胱具有自主节律性收缩的特点,因此目前认为 ICs 可能作为膀胱的起搏细胞,具有调控膀胱运动的作用。胃肠道的 ICCs 表达一种Ⅲ型酪氨酸激酶受体——Kit 蛋白[5],该蛋白对胃肠道 ICCs 的发育和功能维持都具有重要的作用。体外实验显示用 Kit 受体的阻断剂伊马替尼(Imatinib)阻断该受体,消化道 ICCs 将失去起搏功能,同时细胞不能存活。膀胱 ICs 也表达 Kit 蛋白,但是该蛋白对 ICs 是否也具有调控作用尚少见文献报道。因此,本研究拟应用伊马替尼,探讨 Kit 信号通路对膀胱 ICs 的形态和功能的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

45 ~ 60 天龄豚鼠(重庆医科大学实验动物中心),体质量 200 ~ 250 g,雌雄不限,共 17 只。

1.2 方法

1.2.1 Kit 阻断的动物模型 17 只豚鼠根据随机数字表法分为实验组(14 只)和对照组(3 只),实验组分为 2 组,各 7 只,分别给予伊马替尼 60 mg·kg^{-1}·d^{-1}灌胃 20、40 d,对照组给予生理盐水。

1.2.2 免疫荧光染色 豚鼠麻醉后,取膀胱,经生理盐水冲洗后,丙酮充盈灌注固定 30 min。解剖显微镜(Leica)下撕成 5 mm × 5 mm × 0.3 mm 大小的肌条,经 0.01 mol/L PBS 充分漂

作者简介:唐仕明(1957 –),男,四川省仪陇县人,副主任医师,主要从事膀胱运动功能失调方面的研究,发表论文 10 篇。电话:(0839)3265115,E-mail: shiming57@126.com

通讯作者:王明荣,电话:(023)68773084,E-mail:wangmingrong@sohu.com

收稿日期:2007-07-17;修回日期:2007-10-22

洗后，1% BSA 孵育 30 min 后加入第一抗体，Kit 单克隆抗体（1∶100，eBIOSCIENCE 公司）4 ℃ 48 h，Cy3 标记的兔抗大鼠 IgG 抗体（1∶100，DAKO 公司）25 ℃ 60 min，DAPI 复染细胞核，水溶性封片剂封片，Leica 共聚焦显微镜（第三军医大学西南医院中心实验室）观察。阴性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。各步骤间用肌条 PBS 漂洗 3 次。

1.2.3　Western blot 检测 Kit 蛋白的表达　　采用 RIPA 裂解缓冲液提取膀胱平滑肌标本蛋白，Bradford 法测定蛋白浓度。蛋白质经过不连续 SDS-PAGE 和半干电转后进行染色。染色过程为：TBST 溶解的 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h，加入用 TBST 适当稀释的一抗（大鼠抗小鼠单克隆抗体，1∶400），与硝酸纤维膜 4 ℃孵育过夜，TBST 洗涤后加入用 TBST 稀释的二抗，与硝酸纤维膜室温孵育 1 h，轻柔摇动，TBST 洗涤后用滤纸将硝酸纤维膜上的水分吸干，在暗室内将 SuperSignal 化学发光剂（Pierce Biotechnology 公司）的试剂 A 和试剂 B 各 1 ml 混匀，滴在膜上，见荧光后静置 2 ~ 3 min，用塑料薄膜将硝酸纤维膜封好，压片 1 ~ 15 s 取出，依次显影、冲洗、定影。将胶片扫描入电脑进行蛋白条带的灰度测定。

1.2.4　体外自主节律性收缩检测　　取膀胱经生理盐水冲洗后，取 10 mm × 5 mm × 3 mm 肌条置于 8 通道体外灌流器中（Powerlab，澳大利亚），浸于 Kreb-Ringer 平衡碳酸盐缓冲溶液中，予 95% O_2/5% CO_2 的混合气体，用丝线将肌条一端固定于灌流槽底部，一端固定在张力感受器上，予以 0.2 g 的初始张力。平衡 30 min 后开始记录，每 15 分钟换液 1 次。

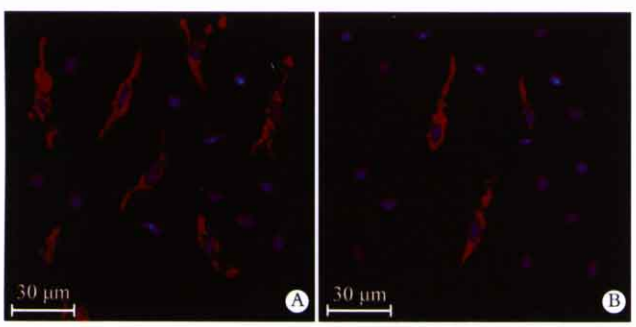
1.3　统计学处理

采用 SPSS 11.0 统计软件进行 t 检验。

2　结果

2.1　ICs 的数量变化

Kit 免疫荧光染色结果示在膀胱底、膀胱顶和膀胱颈的黏膜下和肌束间均分布有大量的 ICs，其形态多为双极或三极突起，突起有少量短小的分支，但是细胞间并不形成网络状（图 1），统计结果示，正常膀胱 ICs 的细胞数量为（30.5 ± 2.8）个（200 倍视野）；予伊马替尼灌胃 20 d 后，ICs 的数量有一定减少，为（25.3 ± 3.20）个，细胞形态并无明显变化，而用药 40 d 后，ICs 的数量明显减少，为（15.3 ± 2.9）个。各组间均有显著差异（$P < 0.05$）。

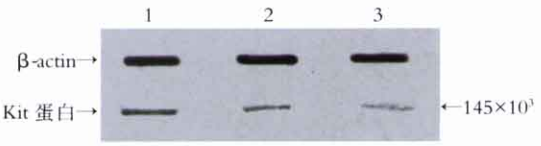


A：正常对照；B：用药 40 d 后

图 1　Kit 免疫荧光染色检测用药前后间质细胞的变化

2.2　Kit 蛋白的表达

正常豚鼠膀胱的平滑肌中可以检测到 145 × 10^3 大小的 Kit 蛋白的表达，灰度值为（0.98 ± 0.21）。使用伊马替尼 20 d 后，表达量逐渐降低，测灰度值约为正常（0.68 ± 0.14）的 70%，到 40 d 时，达到最低，仅为正常的 30% 左右，为（0.29 ± 0.13）（图 2），各组间均有显著差异（$P < 0.05$）。

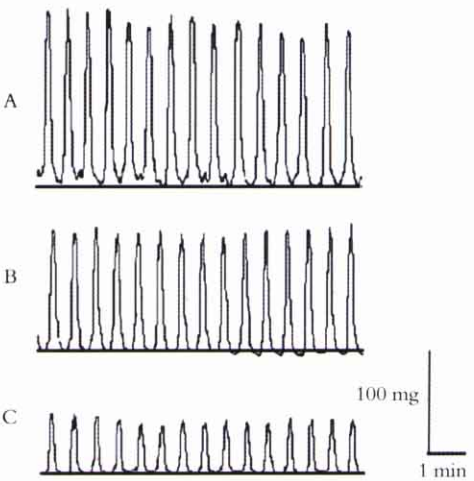


1：正常对照；2：用药 20 d 后；3：用药 40 d 后

图 2　Western blot 检测予伊马替尼前后 Kit 蛋白的变化

2.3　膀胱自主节律性收缩的变化

将正常豚鼠膀胱肌条置于体外灌流槽中，出现自主节律性收缩，频率约 2 次/min，收缩幅度为（200 ± 34）mg；用药 20 d 后，收缩幅度有一定降低，为（150 ± 24）mg；40 d 后，收缩频率明显降低至（50 ± 25）mg（图 3），各组间的波幅均有显著差异（$P < 0.05$），而各组收缩频率基本相同。



A：正常对照；B：用药 20 d 后；C：用药 40 d 后

图 3　体外器官灌流检测予以伊马替尼前后膀胱平滑肌条的自主节律性收缩变化

3　讨论

胃肠道的 ICCs 目前已证实是消化道运动的起搏细胞，如果该细胞缺失则会引起胃肠道运动功能障碍性疾病，如糖尿病性胃轻瘫、慢传输性便秘等。膀胱也具有自主节律性收缩功能，在很多膀胱运动功能失调症中，这种节律性收缩常常减弱或消失。有报道膀胱存在 ICs（也称 ICCs 样细胞），目前认为膀胱 ICs 和消化道 ICCs 一样是运动的起搏细胞[6,7]。

Kit 蛋白是表达于 ICCs 细胞膜的一种Ⅲ型酪氨酸受体激酶，对消化道 ICCs 的发育、正常形态和功能的维持起着重要的作用。如果该蛋白被阻断或基因突变导致该信号通路失活则 ICCs 不能发育，而且 ICCs 的形态和功能维持都依赖于 Kit 蛋白，同时其也可作为 ICCs 的特异性标志物[8,9]。膀胱 ICs 也表达 Kit 蛋白，但 Kit 对 ICs 的作用目前尚不清楚。因此，本研究从 ICCs 特异性表达的 Kit 蛋白入手，观察阻断该信号通路后，是否影响 ICs 的形态和功能。结果显示，正常豚

鼠膀胱内分布有大量的ICs，用伊马替尼在体阻断Kit信号通路后，ICs逐渐减少，且呈时间依赖性，提示成体膀胱ICs的存活依赖于Kit信号通路。Western blot检测结果显示，予以伊马替尼后Kit蛋白的表达逐渐下降，到40 d时仅为正常的30%左右，而细胞数的下降约为50%，说明Kit蛋白的下降可能是由于细胞数减少和ICs的Kit表达降低共同引起的。体外功能学实验结果显示，ICs减少后，膀胱的自主节律性收缩逐渐减弱，提示ICs可能为膀胱自主节律性运动的起搏细胞。

Kubota等[2]在体外阻断Kit信号通路后发现，膀胱的自主节律性收缩被抑制，解除抑制后，运动功能恢复。在小肠和子宫的体外功能学检测都得出相同的结论[10,11]，提示Kit信号通路对ICCs或ICs正常功能的维持也是必需的。本研究中ICs数量和Kit蛋白的表达都有所下降，这两个因素可能共同导致膀胱自主节律性收缩被抑制，提示Kit蛋白对膀胱ICs功能的维持也具有重要作用。

综上所述，膀胱内含ICs，这些细胞可能是膀胱自主节律性收缩的起搏细胞，其细胞表面表达的Kit蛋白对ICs的存活和功能维持都具有重要的作用，但其下游信号通路尚有待进一步研究。

参考文献：

[1] Sanders K M, Koh S D, Ward S M. Interstitial cells of cajal as pacemakers in the gastrointestinal tract[J]. Annu Rev Physiol, 2006, 68: 307-343.

[2] Kubota Y, Biers S M, Kohri K, *et al*. Effects of imatinib mesylate (Glivec) as a c-kit tyrosine kinase inhibitor in the guinea-pig urinary bladder[J]. Neurourol Urodyn, 2006, 25(3): 205-210.

[3] Popescu L M, Vidulescu C, Curici A, *et al*. Imatinib inhibits spontaneous rhythmic contractions of human uterus and intestine[J]. Eur J Pharmacol, 2006, 546(1-3): 177-181.

[4] Sun X, Yu B, Xu L, *et al*. Interstitial cells of Cajal in the murine gallbladder[J]. Scand J Gastroenterol, 2006, 41(10): 1218-1226.

[5] Beckett E A, Ro S, Bayguinov Y, *et al*. Kit signaling is essential for development and maintenance of interstitial cells of Cajal and electrical rhythmicity in the embryonic gastrointestinal tract[J]. Dev Dyn, 2007, 236(1): 60-72.

[6] McCloskey K D. Characterization of outward currents in interstitial cells from the guinea pig bladder[J]. J Urol, 2005, 173(1): 296-301.

[7] Shafik A, El-Sibai O, Shafik A A, *et al*. Identification of interstitial cells of Cajal in human urinary bladder: concept of vesical pacemaker[J]. Urology, 2004, 64(4): 809-813.

[8] Roskoski R, Jr.. Signaling by Kit protein-tyrosine kinase--the stem cell factor receptor[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 337(1): 1-13.

[9] 沈文浩，李为兵，熊恩庆，等. 胃肠道起博细胞ICCs在肠鼠泌尿道分布研究[J]. 第三军医大学学报，2006，28(2)：172-173.

[10] Shimojima N, Nakaki T, Morikawa Y, *et al*. Imatinib blocks spontaneous mechanical activities in the adult mouse small intestine: possible inhibition of c-Kit signaling[J]. Pharmacology, 2005, 74(2): 95-99.

[11] 梅 峰，于 彬，马 华，等. 豚鼠空肠吻合术后ICCs的再生及细胞网络再形成研究[J]. 第三军医大学学报，2005，27(5)：376-378.

（编辑 王 红）

（上接2263页）

药物回奶。可用溴隐停2.5 mg，每日2~3次，1周后减量，连服14 d。溴隐停作为多巴胺受体的长效激活剂，有很强的抑乳作用。使用溴隐停回奶时，患者有恶心、呕吐症状，应在饭后30~60 min用药，呕吐严重者可适当应用止吐药。乳腺肿胀时要排空乳汁，可用吸乳器抽吸，或用手、烤热的木梳背轻轻向乳头方向按摩、梳理，促使乳汁流出以减轻疼痛，注意避免用力过度，使乳房表面皮肤破损，加重感染。防止乳房受压。

2.3 伤口护理

隆乳术后乳腺炎感染严重时，应及时抽出水凝胶，分别用生理盐水、双氧水、庆大霉素反复冲洗，如脓肿已经形成，应尽早穿刺或者切开引流。密切观察伤口敷料渗出情况，及时换药，保持敷料干燥。TDP局部照射每日3~4次，每次20~30 min，促进血液循环，利于炎症的消退，照射时严密观察，防止局部烫伤。如有伤口引流管，注意观察引流液颜色、性质和量，如伤口引流量少于10 ml，引流物中未见乳汁和其他渗出时，即可拔管。

2.4 高热护理

定时测体温、脉搏、呼吸，畏寒时应注意保暖，体温过高时应给予物理降温，及时更换衣裤、大单、被套，避免感冒，适当休息，注意个人卫生。随时了解血常规结果，白细胞总数和(或)中性粒细胞计数有无升高，注意用药反应。

2.5 饮食指导

给予高热量、高维生素、高蛋白、低脂肪、易消化饮食，并注意水分的补充。

3 讨论

注射式隆乳术后哺乳，在理论上是可行的，但由于隆乳材料注射层次不当、乳房受压、妊娠时大量雌激素、哺乳不当均可引起腺叶组织的感染，因此整形医师必须严格控制适应证，对有生育愿望的年轻妇女，应慎用注射式隆乳[2]。注射式隆乳术后若发生哺乳期急性乳腺炎，会给患者造成很大的痛苦，为防治其发生、发展，我们一定要做好有注射式隆乳术史的孕妇妊娠期的保健及宣教。孕妇在哺乳期应注意保护乳腺，发现异常情况要及时处理，如已经发生了较严重的乳腺炎，为保证隆乳术的远期效果应果断回奶，并做好心理护理、伤口护理、高热护理。本组患者均顺利恢复。

关键词：注射式隆乳；乳腺炎；护理

中图法分类号：R473.6 **文献标识码**：B

参考文献：

[1] 古凤仪，兰志祯，潘新珍. 注射式隆乳术后哺乳期急性乳腺炎15例诊治分析[J]. 广东医学院学报，2006，24(2)：192-193.

[2] 陈 莉，姜 军，范林军，等. 注射式隆乳术后哺乳期内发生乳腺炎2例报告[J]. 中国普外基础与临床杂志，2005，12(6)：547.

（编辑 陈聪连）