论著

文章编号:1000-5404(2008)07-0558-03

ICCs细胞在正常大鼠膀胱中的分布及对逼尿肌收缩的影响

封建立[1],方 强[1],丁砺蠡[1],杨 景[2],宋 波[1],李为兵[1] (第三军医大学西南医院:[1]全军泌尿外科研究所,[2]病理学研究所,重庆 400038)

摘 要:**目的** 研究正常SD大鼠膀胱不同部位ICCs细胞(interstitial cells of Cajal, ICCs)的分布及其对局部逼尿肌收缩的影响。**方法** 分别于正常SD大鼠膀胱顶部、体部、底部及三角区取3 mm×4 mm逼尿肌组织进行免疫荧光组织化学法检测c-kit阳性细胞的表达情况;再于上述部位取2 mm×7 mm肌条进行张力测定实验,比较各部位肌条频率及幅度的变化,分析其与ICCs密度变化的相关性。**结果** 正常膀胱中存在ICCs,三角区及顶部的ICCs密度较体部和基底部明显增加,差异显著($P<0.05$);三角区和顶部以及体部和基底部的ICCs密度均没有显著区别($P>0.05$);各部位肌条收缩频率和幅度不同,但顶部和三角区的肌条收缩频率和幅度较体部和基底部明显增大,差异显著($P<0.05$),顶部和三角区以及体部和基底部的肌条之间则没有显著区别($P>0.05$)。相关性分析结果表明逼尿肌肌条收缩频率和幅度与局部ICCs密度呈显著正相关性($P<0.05$)。**结论** 大鼠膀胱中存在ICCs,膀胱各部位ICCs的分布有显著差异,其与膀胱局部肌条收缩有密切关系。

关键词:ICCs细胞;c-kit受体;膀胱
中图法分类号:R329.24;R334.3;R337.2 **文献标识码**:A

Distribution of interstitial cells of Cajal in normal rat bladder and its effect on detrusor contraction

FENG Jian-li[1], FANG Qiang[1], DING Li-li[1], YANG Jing[2], SONG Bo[1], LI Wei-bing[1] ([1]Urinary Surgery Research Institute, [2]Institute of Pathology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To explore the distribution of interstitial cells of Cajal (ICCs) in normal rat bladder and its effects on detrusor contraction. **Methods** Detrusor tissue pieces of about 3 mm×4 mm were obtained from the dome, triangle, lateral or base of rat bladder. The c-kit positive cells were detected by immunofluorescent staining. Detrusor strips of 2 mm×7 mm were dissected from the same sites respectively for muscle tone determination. The frequency and amplitude of the detrusor strips were compared among different sites of bladder. **Results** ICCs did exist in rat bladder, and had different distribution in different sites of bladder. There were more ICCs in the dome and triangle than in the lateral or base of bladder ($P<0.05$), and there was no difference between the dome and triangle or between the lateral and base. The contraction of strips in different sites varied according to the distribution of ICCs. The amplitude and frequency of strips from the dome and triangle of bladder were significantly higher than those from the lateral and base ($P<0.05$). The contraction amplitude and frequency of strips were positively correlated with the number of ICCs ($P<0.05$). **Conclusion** ICCs is unevenly distributed in rat bladder, and the contraction amplitude and frequency of detrusor strips are correlated with the number of ICCs in different sites of bladder.

Key words: interstitial cells of Cajal; c-kit receptor; bladder

Cajal细胞是胃肠道的起搏细胞。ICCs细胞(interstitial cells of Cajal, ICCs)是一类与Cajal细胞有着相似形态及功能的细胞。目前已被证实存在于大多数平滑肌器官中,并且很可能是所在器官的自发性电位的起源[1]。我们的前期研究证实豚鼠尿路平滑肌中存在ICCs细胞[2]。在此基础上,本研究拟探讨ICCs细胞在大鼠膀胱中的存在情况、分布差异及其与局部

基金项目:国家自然科学基金(30672093, 30670776)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30672093, 30670776)
作者简介:封建立,男,河南省太康县人,博士研究生,医师,主要从事膀胱功能障碍方面的研究。电话:(023)60735314
通信作者:李为兵,电话:(023)68765347,E-mail:liweibing63@yahoo.com.cn
收稿日期:2007-12-05;修回日期:2008-02-04

逼尿肌肌条收缩特性改变的关系，进而探讨膀胱局部兴奋性特点及其可能的兴奋起源部位。

1　材料与方法

1.1　实验对象

健康雌性清洁级 SD 大鼠 10 只，3 月龄，体质量 180～210 g，购自第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心。

1.2　主要试剂

羊抗大鼠 c-kit 多克隆抗体购自 Santa Cruz 公司，Cy3 标记的兔抗羊二抗购自北京中杉生物公司，细胞核染料 DAPI 购自碧云天生物公司。

1.3　逼尿肌组织铺片的制作

断颈处死正常 SD 大鼠，结扎双侧输尿管，经尿道向膀胱内灌注约 3 ml 4% 多聚甲醛后结扎膀胱颈部。固定 10 min 后将膀胱连同双侧输尿管及近端尿道一同取下，浸泡于 4% 多聚甲醛溶液中常温过夜。分别于膀胱顶部、三角区、两侧部及底部取相同大小逼尿肌组织（约 3 mm×4 mm），作好部位标记，然后置于 0.1 mol/L PBS 中常温过夜，次日于外科手术显微镜下撕去黏膜层、浆膜层以及部分肌层，0.01 mol/L PBS 漂洗后留做免疫组化。

1.4　免疫荧光检测 c-kit 阳性细胞的表达

常规免疫荧光组织化学法染色方法参见文献[3]，简要步骤如下：将制作好的薄层逼尿肌组织片于含 1% BSA 的 0.01 mol/L PBS 中封闭 1 h，然后于 0.01 mol/L PBS 中漂洗 3 次，每次 5 min；加入 1∶100 羊抗大鼠 c-kit 一抗稀释液（含 1% BSA 及 0.1% triton-100），4 ℃孵育过夜；0.01 mol/L PBS 中漂洗 3 次；加入 1∶100 兔抗羊二抗稀释液，37 ℃避光孵育 1 h；0.01 mol/L PBS 中漂洗 3 次；于 DAPI 中常温避光孵育 10 min，0.01 mol/L PBS 中漂洗 3 次，前 2 次每次 30 min，最后 1 次 2 h；将组织片平铺于载玻片上，用甘油封片。激光共聚焦显微镜下观察显色情况，照相记录。对照实验以羊血清代替二抗。

1.5　不同部位逼尿肌肌条收缩特性检测

快速断颈处死正常 SD 大鼠，依次于膀胱顶部、三角区、基底部和侧部取 2 mm×7mm 肌条组织，置于 38℃ Kreb 溶液中，通以 95% O_2 和 5% CO_2，平衡 30 min 后依次将肌条放置于肌条检测装置上，肌条通过张力传感器与电脑连接，通过 RM6240 生理信号采集处理系统进行记录，分析肌条收缩的频率和幅度。每个肌条检测 20～30 min，取其中 5 min 的平均值。

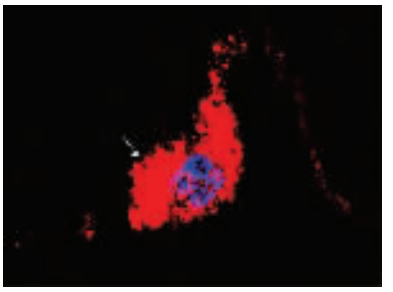
1.6　统计学处理

多组均数的两两比较采用单因素方差分析；ICCs 细胞数目改变与局部肌条收缩改变是两个不同的变量，其相互关系采用相关性分析。

2　结果

2.1　逼尿肌中存在 c-kit 阳性细胞

所有膀胱逼尿肌标本中均可以看到 c-kit 阳性细胞的表达。图 1 所示为膀胱逼尿肌组织铺片 c-kit 免疫荧光组织化学染色后在激光共聚焦显微镜下观察到的 c-kit 阳性细胞，其形态学特点为纺锤状或星状，核大而明显，有 2～5 个长的突起。对照标本均为阴性。

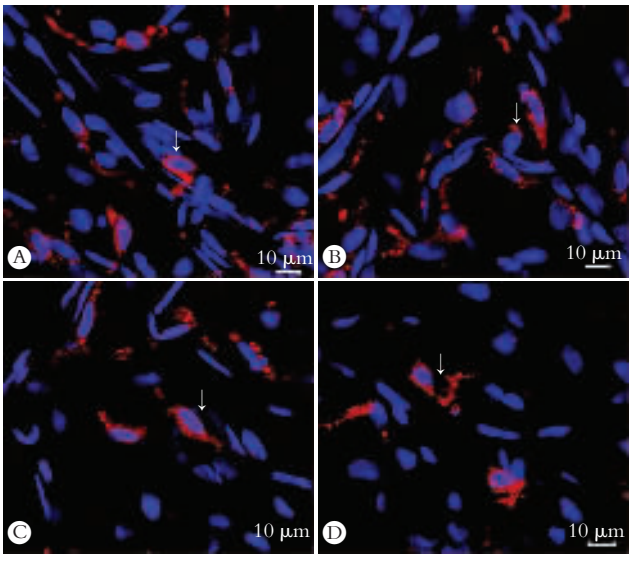


↑：c-kit 阳性细胞，蓝色为细胞核

图 1　膀胱逼尿肌中 c-kit 阳性细胞　（激光共聚焦显微镜×1 000）

2.2　c-kit 阳性细胞的分布差异

逼尿肌组织铺片经免疫荧光组织化学法染色后在激光共聚焦显微镜下观察，可以看到红色的 c-kit 阳性细胞。计数以每视野观察到的细胞数目为单位，每个标本随机观察 3 个视野，共观察 5 个标本，取各视野细胞平均数进行比较。观察结果显示，c-kit 阳性细胞以顶部[（13.00±2.10）个/视野]和三角区[（12.33±1.97）个/视野]较多，体部[（8.17±1.47）个/视野]和基底部[（7.50±1.52）个/视野]较少，差异有统计学意义（$P<0.05$）。顶部和三角区以及体部和基底部差异无统计学意义（$P>0.05$）。见图 2。

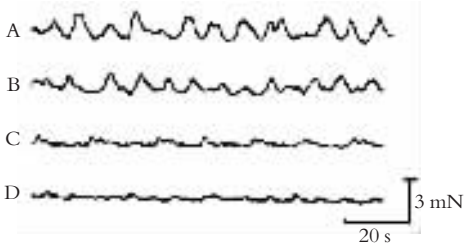


A：顶部；B：三角区；C：体部；D：基底部。↑：c-kit 阳性细胞，蓝色为细胞核

图 2　正常膀胱不同部位 c-kit 阳性细胞免疫荧光组织化学染色（激光共聚焦显微镜）

2.3　不同部位逼尿肌肌条收缩特性的差异变化

肌条收缩实验共检测 6 个标本，取各部位肌条收缩幅度和收缩频率的平均值进行比较。检测结果显示，顶部（6.83±0.75）次/min 和三角区（6.50±0.55）次/min 肌条收缩频率较体部（3.83±0.75）次/min 和基底部（4.00±0.63）次/min 为高，差异显著（$P<0.05$），顶部和三角区以及体部和基底部收缩频率没有显著差异（$P>0.05$）；顶部（1.47±0.20）mN 和三角区（1.67±0.20）mN 肌条收缩幅度较体部（0.49±0.20）mN 和基底部（0.39±0.10）mN 为高，差异显著（$P<0.05$）；顶部和三角区以及体部和基底部收缩幅度没有显著差异（$P>0.05$）。见图 3。



A:顶部;B:三角区;C:体部;D:基底部

图3 不同部位逼尿肌肌条收缩特性差异

2.4 c-kit阳性细胞数与局部肌条收缩频率和幅度的相关性

c-kit阳性细胞密度与局部肌条收缩频率和收缩幅度是不同的变量,其相互关系需要进行相关性分析。相关性分析采用SPSS 16.0进行。分析结果显示,c-kit阳性细胞密度与局部肌条收缩频率和收缩幅度的pearson相关系数r分别为0.753和0.826,$P<0.05$,故可以认为c-kit阳性细胞密度与局部肌条的收缩频率和幅度呈显著正相关。

3 讨论

膀胱是一个储尿和排尿器官,传统观点认为膀胱的排尿活动是一种高级中枢控制下的纯神经活动。近年的观点有所改变,认为膀胱排尿活动是一种由神经源性因素和肌源性因素共同参与的综合性反射活动。目前,肌源性因素是膀胱功能研究领域的一个热点。

早在20世纪90年代,Shafik等[4]就从人的静息膀胱表面记录到自发性电活动,并且发现这种电活动表现为慢波和动作电位,但当时没有引起人们太多的注意。我们的前期研究发现,离体逼尿肌肌条在一定张力负荷下均可出现自发性收缩,采取多种神经因素干预后这种自发性收缩依然存在,提示这种自发性收缩的兴奋起源在于逼尿肌本身。

我们一度认为离体肌条的自发性兴奋起源于逼尿肌细胞。但2001年,Sui等[5]发现从逼尿肌组织急性分离的混合细胞中只有很少部分能够记录到自发性电位,其余的大多数细胞则记录不到,如果我们认为这种自发性电位来源于逼尿肌细胞,那么这与逼尿肌细胞在逼尿肌组织中所占的数目比例明显不符,提示我们逼尿肌细胞不应该是自发性兴奋的来源,逼尿肌组织可能存在逼尿肌细胞之外能够产生自发性兴奋的起搏细胞,而逼尿肌细胞则受其控制而产生自发性收缩。

ICCs细胞是胃肠道的慢波起搏细胞,对胃肠道的动力学功能有着重要的调控作用,近年来逐渐成为研究许多平滑肌器官动力学功能的热点,更有学者认为,ICCs细胞可能是绝大多数平滑肌器官自发性电兴奋的起源[6]。

c-kit抗体是目前国际上公认的ICCs细胞标记性抗体,我们参照文献[7]选用其多克隆抗体对ICCs细胞进行了一系列形态学研究。目前认为膀胱中只有ICCs细胞和肥大细胞具有c-kit染色阳性,故可以通过形态学特点排除肥大细胞而筛选出ICCs细胞[8]。

我们的前期研究显示,豚鼠尿路平滑肌组织中存在c-kit阳性的ICCs细胞,且分布广泛。在此基础上,本研究发现大鼠膀胱中亦存在ICCs细胞,且不同部位ICCs细胞的分布数量不同,以顶部和三角区较多,体部和基底部较少;局部肌条的收缩幅度和频率以顶部和三角区最大,体部和基底部较小,且与局部ICCs细胞的分布数量呈明显的正相关性。本研究结果显示大鼠膀胱中亦存在ICCs细胞,且不同部位ICCs细胞的分布数量不同,以顶部和三角区较多,体部和基底部较少;局部肌条的收缩频率和幅度以顶部和三角区最大,体部和基底部较小,且与局部ICCs细胞的分布数量呈显著的正相关性。

本研究的意义在于:①揭示了ICCs细胞在大鼠膀胱中的存在及其分布特点,为进一步研究膀胱ICCs细胞的功能提供了形态学基础;②局部肌条的收缩特性反应了局部肌条的兴奋程度,局部肌条收缩频率和幅度的差异提示膀胱不同部位的兴奋程度可能存在差异,整体情况下膀胱的兴奋性可能存在一个最高控制点,即膀胱起搏点。正常膀胱逼尿肌组织中ICCs的存在及其分布的不均一性及其与局部逼尿肌收缩的强正相关性提示ICCs细胞具有作为潜在起搏细胞的条件,以此为切入点可以对膀胱起搏点假设进行逐步深入的探讨。

参考文献:

[1] Huizinga J D, Robinson T L, Thomsen L. The search for the origin of rhythmicity in intestinal contraction: from tissue to single cells[J]. Neurogastroenterol Motil, 2000, 12(1): 3-9.

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

[3] McCloskey K D, Gurney A M. Kit positive cells in the guinea pig bladder[J]. J Urol, 2002, 168(2): 832-836.

[4] Shafik A. Study of the electromechanical activity of the urinary bladder An experimental study [J]. World J Urol, 1994, 12(6): 316-318.

[5] Sui G P, Wu C, Fry C H. The electrophysiological properties of cultured and freshly isolated detrusor smooth muscle cells[J]. J Urol, 2001, 165(2): 627-632.

[6] McHale N, Hollywood M, Sergeant G, *et al*. Origin of spontaneous rhythmicity in smooth muscle[J]. 2006, 570(Pt 1): 23-28.

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

[8] Hashitani H, Suzuki H. Identification of interstitial cells of Cajal in corporal tissues of the guinea-pig penis[J]. Br J Pharmacol, 2004, 141(2): 199-204.

(编辑 王 红)