论著

文章编号:1000-5404(2008)07-0564-03

P2X嘌呤受体在大鼠膀胱ICCs细胞中的表达

方 强[1],杨 景[2],潘进洪[1],封建立[1],李为兵[1],王永权[1],丁励蠡[1],宋 波[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 探讨P2X嘌呤受体各亚型在大鼠膀胱ICCs细胞(interstitial cells of Cajal, ICCs)的表达及意义。方法 制备SD大鼠膀胱组织铺片及冰冻切片,通过免疫荧光法检测大鼠膀胱组织内ICCs细胞分布情况,并进一步采用免疫荧光双标法检测ICCs细胞上P2X嘌呤受体各亚型的表达。结果 SD大鼠膀胱中的ICCs细胞主要集中于黏膜下层、肌束边缘以及肌束间,并相互连接呈网络状分布。在7种P2X嘌呤受体亚型中,ICCs细胞上可检测到$P2X_2$和$P2X_5$两种亚型表达。结论 大鼠膀胱ICCs细胞可表达$P2X_2$和$P2X_5$两种嘌呤受体亚型,从功能学上证实嘌呤能信号对ICCs细胞功能有影响。

关键词:ICCs细胞;嘌呤受体;膀胱
中图法分类号:R69;R322.62;R329.25;R334.3 文献标识码:A

Expression of P2X purinoceptor in interstitial cells of Cajal in rat bladder

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

Abstract: Objective To investigate the role and significance of P2X purinoceptor in the interstitial cells of Cajal (ICCs) of SD rat bladder. Methods SD rat bladders were collected and stored in ice-cold PBS, then cryostat sections were sliced to 10-μm thickness. Immunohistochemical analysis was used to observe the distribution of ICCs with c-kit as the markers. Double-label immunoflurorescence was used to study the expression of P2X purinoceptor subtypes in ICCs. Results c-kit positive cells were mainly distributed in the sub-mucous layer of bladder, along the edge of smooth muscle bundles and between them. They connected with each other and formed a network distribution in the sub-mucous layer of bladder. Double-labeled tissues with c-kit and P2X antibodies showed that there were P2X2 and P2X5 purinoceptors on ICCs of rat bladder. Conclusion ICCs of rat bladder express P2X2 and P2X5 purinoceptors, suggesting that the purinoceptors may play important roles in ATP-mediated modulation to bladder function.

Key words: interstitial cells of Cajal; purinoceptor; bladder

西班牙神经解剖学家Cajal于1893年用甲基蓝及嗜银染色法在胃肠道神经系统中观察到一类特殊的间质细胞,命名为Cajal间质细胞(interstitial cells of Cajal, ICCs)。ICCs具有起搏胃肠道慢波、传递电信号、介导肠神经与平滑肌之间调节信号的作用,在胃肠道平滑肌节律性收缩功能调节中起重要作用[1]。近年来研究证实人及豚鼠膀胱内同样存在形态学及免疫学上类似的ICCs细胞[2,3],深入研究神经对膀胱ICCs功能调控有助于全面阐明逼尿肌神经调控理论。

药理学研究已证实ATP介导的嘌呤能信号在膀胱的感觉及运动功能调控中起重要作用。P2X嘌呤受体是ATP发挥生理作用的重要分子,在机体各组织中广泛分布,其对钠和钾几乎有相同的通透性,尤其是钙离子的通透具有重要生理意义。那么膀胱内的ICCs细胞是否受ATP调控的,其具体的分子机制尚不明确。本研究采用免疫荧光组织化学-激光共聚焦显微镜观察大鼠膀胱ICCs细胞的分布及P2X嘌呤受体的表达,为探明ATP激活膀胱ICCs细胞的分子机制提供实验依据。

基金项目:国家自然科学基金(30700270,30670776)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30700270, 30670776)
作者简介:方 强,男,安徽省宿松县人,博士研究生,主管技师,主要从事排尿功能障碍性疾病的基础及临床方面的研究。电话:(023)68765345, E-mail:fangqiang@tmmu.edu.cn
通信作者:宋 波,电话:(023)68754186, E-mail:songb-mr@sina.com
收稿日期:2007-12-05 修回日期:2008-02-04

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　动物　选用 45 ~ 60 d 龄 SD 大鼠 20 只,体质量 200 ~ 250 g,雌雄不拘(购自第三军医大学实验动物中心)。

1.1.2　试剂与仪器　山羊抗鼠 c-kit 单克隆抗体及兔抗鼠 $P2X_1$-$P2X_7$ 单克隆抗体均购自 Santa Cruz 生物技术公司,罗丹明标记的小鼠抗山羊 IgG 购自北京中杉生物技术有限公司。Cy3 标记的驴抗兔 IgG 以及 AF488 标记的驴抗羊 IgG 购自 molecular probes 公司,其余分析试剂均购自上海华美公司。

激光共聚焦显微镜型号为 Leica TCSSP-2,冰冻切片机型号为 LeicaCM1900。

1.2　方法

1.2.1　组织铺片的制作　大鼠 25% 乌拉坦按 4 ml/kg 腹腔注射麻醉后,取膀胱新鲜组织,将 100% 丙酮自膀胱颈处注入膀胱内,维持充盈状态,置入 100% 丙酮中固定 6 ~ 8 h 后,沿腹侧面纵行剪开,在解剖显微镜下,小心剔除黏膜层。取其黏膜下层,由于膀胱逼尿肌层较厚且呈网状走形,分层不明显,将肌层组织制成含 1 ~ 2 层肌细胞的铺片。所有标本剪切成 4 ~ 5 mm 长、1 ~ 2 mm 宽,置于 4℃的 0.01 mol/L PBS 中过夜后用于检测 ICCs 细胞的分布情况。

1.2.2　冰冻切片的制备　25% 乌拉坦 1 ~ 1.2 ml (4 ml/kg) 大鼠腹腔注射麻醉,常规消毒后,下腹部正中切口暴露并取出膀胱,处死动物。膀胱组织行 15 μm 冰冻切片,-20℃ 冻存备用。

1.2.3　组织铺片 c-kit 免疫荧光染色　组织铺片或冰冻切片经 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 30 min(37 ℃),1% BSA 孵育 30 min 后加入 c-kit 单抗 4℃孵育 12 h,阴性对照采用 0.01 mol/L PBS 代替一抗。0.01 mol/L PBS 漂洗 5 min × 3 次。加入罗丹明标记小鼠抗山羊 IgG 37 ℃ 60 min。加入 DAPI 进行细胞核染色,0.01 mol/L PBS 漂洗 5 min × 5 次,甘油封片,激光共聚焦显微镜观察。

1.2.4　c-kit、P2X 嘌呤受体免疫荧光双标　冰冻切片经 0.01 mol/L PBS (pH = 7.5) 漂洗 5 min × 3 次,0.1 mol/L BSA 封闭 37 ℃ × 1 h。分别加入 c-kit 单抗和 $P2X_1$-$P2X_7$ 单抗中的一种(稀释浓度 1∶200),阴性对照采用 0.01 mol/L PBS 代替一抗,4 ℃孵育 12 h。0.01 mol/L PBS 漂洗 5 min × 3 次。加入 Cy3 标记的驴抗兔 IgG 以及 AF 488 标记的驴抗羊 IgG(稀释浓度1∶100),37 ℃孵育 30 min,0.01 mol/L PBS 漂洗 5 min × 3 次,加入 DAPI 进行细胞核染色,0.01 mol/L PBS 漂洗 5 min × 5 次。激光共聚焦显微镜下观察 ICCs 细胞上 P2X 嘌呤受体亚型的表达。

2　结果

2.1　c-kit 免疫荧光染色结果

免疫荧光组织化学染色显示:SD 大鼠膀胱黏膜下层、肌束边缘以及肌束间均可见 c-kit 染色阳性细胞。黏膜下层的 c-kit 阳性细胞相互连接呈网络状(图 1),而肌束间仅见散在的 c-kit 阳性细胞。

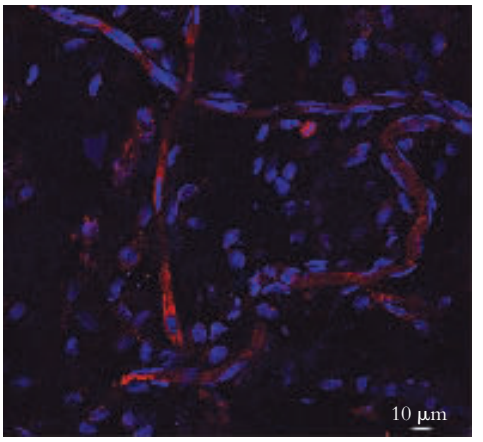
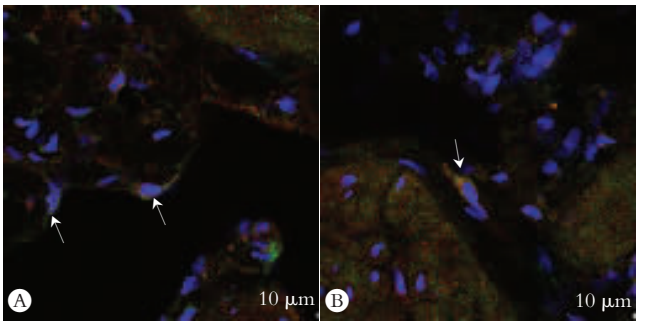


图 1　SD 大鼠膀胱内呈网络状分布的 ICCs 细胞(激光共聚焦显微镜)

2.2　SD 大鼠膀胱 ICCs 细胞上 P2X 嘌呤受体的表达

免疫荧光双标染色显示:在 7 种 P2X 嘌呤受体亚型中,SD 大鼠膀胱肌束边缘可检测到 $P2X_2$(图 2A)和 $P2X_5$(图 2B)阳性染色的 ICCs 细胞。



A:$P2X_2$ 受体;B:$P2X_5$ 受体;↑:ICCs 细胞

图 2　SD 大鼠膀胱 ICCs 细胞上 P2X 受体表达(激光共聚焦显微镜)

3　讨论

自从 Smet 等[4] 率先证实在豚鼠和人膀胱内存在与胃肠道 ICCs 细胞类似的 ICCs 细胞以来,ICCs 细胞在膀胱功能调控中的作用逐渐受到重视。目前对膀胱 ICCs 细胞的功能还知之甚少,以往多以形态学研究为主。Davidson 等[5] 研究显示,c-kit 标记阳性的 ICCs 细胞在豚鼠膀胱中主要有分布于三个区域:膀胱黏膜下层,逼尿肌平滑肌肌束边缘和肌束间的组织间隙。通过 c-kit 和神经特异性标志物 PGP9.5 (protein gene product 9.5) 双标法证实膀胱 ICCs 细胞与神经末梢关系密切。McCloskey 等[6] 利用 Fluo-4/AM 荧光示踪剂能与钙离子结合产生钙荧光,通过激光共聚焦显微镜观察显示 SD 大鼠膀胱逼尿肌束边缘的 ICCs 细胞能产生自发性电活动,提示这类细胞可能具有起搏功能。然而在生理情况下,膀胱并不像胃、肠及输尿管等平滑肌器官一样具有自发性收缩的特性,而是在某些特殊

的情况下才出现不依赖于神经的自发性收缩，如在一定的前负荷下，离体的逼尿肌肌条可出现有节律的自发性收缩。无论这种自发性收缩是否起源于膀胱内的ICCs细胞，深入研究神经对膀胱ICCs细胞的调控作用将为全面阐明逼尿肌神经调控机制提供新的实验依据。

传统的平滑肌神经支配理论认为，神经与平滑肌细胞间不具备神经-肌肉接头结构，而是以游离的神经末梢形式存在于肌细胞和肌束之间，神经兴奋后通过分泌囊泡释放Ach和ATP经细胞间液扩散最终作用于平滑肌细胞。而超微结构显示神经末梢的分泌囊泡与平滑肌细胞的距离不固定，为80～100 nm。那么从神经递质释放到引起平滑肌收缩必然存在时间延迟，如此一来各逼尿肌肌束的收缩则无法同步，排尿活动也就不能顺利完成。据此，我们推测支配膀胱的神经释放的神经递质在激活附近的逼尿肌细胞的同时，极有可能通过某种中间环节将兴奋迅速传递至整个膀胱。本研究显示膀胱内ICCs细胞呈网络状分布，加之形态学上已证实膀胱ICCs细胞与神经联系密切，并且与逼尿肌细胞间存在能够快速传导电信号的缝隙连接[6]，极有可能在介导神经冲动向全膀胱传递中发挥重要作用。

神经递质是神经系统实现对靶器官功能调控的重要分子。已有研究表明，以ATP为递质的嘌呤能神经在膀胱感觉及运动功能调控中均扮演着非常重要的角色，在膀胱充盈过程中，受牵拉的膀胱上皮细胞会主动释放ATP，参与膀胱感觉功能形成。而与ATP结合的受体为P2受体，P2受体包括P2X和P2Y两类。P2X嘌呤受体属于配体ATP门控离子通道，目前已发现了7种亚型，广泛分布于脑、脊髓、支气管上皮、平滑肌等组织[7]。我们前期研究显示，在大鼠膀胱内可检测到除$P2X_6$以外的其余6种P2X嘌呤受体mRNA表达[8,9]，但具体的细胞定位尚不明确。目前认为其机制为膀胱上皮细胞释放的ATP通过激活位于膀胱黏膜下层感觉传入神经纤维上的$P2X_3$和$P2X_{2/3}$受体参与正常膀胱容量感觉和排尿反射。而本研究显示位于膀胱肌束边缘的ICCs细胞可表达$P2X_2$和$P2X_5$两种亚型，据此我们推测ICCs细胞上的$P2X_2$和$P2X_5$受体极有可能作为膀胱感觉传入另一重要通路，进一步从功能学角度予以证实，将为膀胱感觉过敏引起的下尿路症状，如尿频、尿急的治疗提供全新的切入点。此外，排尿时，副交感神经末梢释放的ATP极有可能通过激活ICCs细胞上的$2X_2$和$P2X_5$受体，导致细胞内钙升高，将神经冲动传导至整个膀胱，启动全膀胱同步有力的收缩。

总之，膀胱内的ICCs细胞极有可能作为神经对膀胱功能调控的中继站，而膀胱ICCs细胞上的ICCs细胞上的$P2X_2$和$P2X_5$受体则是嘌呤能信号参与膀胱感觉及运动功能调节的分子基础。

参考文献：

[1] Ward S M, Sanders K M, Hirst G D. Role of interstitial cells of Cajal in neural control of gastrointestinal smooth muscles[J]. Neurogastroenterol Motil, 2004, 16 (Suppl 1): 112－117.

[2] Lang R J, Klemm M F. Interstitial cell of Cajal-like cells in the upper urinary tract[J]. J Cell Mol Med, 2005, 9(3): 543－556.

[3] 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.

[4] Smet P J, Jonavicius J, Marshall V R, *et al*. Distribution of nitric oxide synthase-immunoreactive nerves and identification of the cellular targets of nitric oxide in guinea-pig and human urinary bladder by cGMP immunohistochemistry[J]. Neuroscience, 1996, 71(2): 336－348.

[5] Davidson R A, McCloskey K D. Morphology and localization interstitial cells in the guinea pig bladder: structural relationships with smooth muscle and neurons[J]. J Urol, 2005, 173(4): 1385－1390.

[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] Koles L, Furst S, Illes P. Purine ionotropic (P2X) receptors [J]. Curr Pharm Des, 2007, 13(23): 2368－2384.

[8] 杨 昕，宋 波，方 强，等. P2X受体亚型在大鼠逼尿肌不稳定中的作用研究[J]. 第三军医大学学报，2004，26(8)：710－713.

[9] 方 强，杨 景，李为兵，等. P2X3受体在逼尿肌不稳定大鼠膀胱组织的表达及其意义[J]. 第三军医大学学报，2007，29(13)：1355－1356.

（编辑 王 红）

作者书写数字须知

根据《关于出版物上数字用法的规定》，本刊实行三位分节法（即从小数点算起，向左向右每3位分1节，节间留出一定空隙），废除千分撇分节法（如2,431改为2 431）。但年份、页数、部队编号、仪表型号、标准号不用三位分节法。中文出现的数字，凡属计数数值，一律用阿拉伯数字表示。

本刊编辑部