文章编号:1000-5404(2008)07-0567-03

论著

成年豚鼠膀胱ICCs细胞起搏电流的鉴定

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

摘 要:目的 确定成年豚鼠膀胱卡哈尔间质细胞(interstitial cells of Cajal, ICCs)细胞是否具有起搏电流。方法 采用胶原酶消化法,得到原代培养的成年豚鼠膀胱ICCs细胞。采用膜片钳技术,在全细胞记录模式下,记录其超级化激活的内向电流(hyperrepolarization-activated inward current, Ih)。结果 原代培养的ICCs细胞和逼尿肌细胞的静息膜电位、膜电容存在明显差异;ICCs细胞可记录到起搏细胞特征电流Ih,而在逼尿肌细胞则记录不到。结论 记录到成年豚鼠膀胱ICCs细胞具有起搏细胞的特征电流Ih,提示ICCs细胞在膀胱具有起搏作用。

关键词:Cajal间质细胞;起搏电流;膀胱
中图法分类号:R322.62;R329.27;R337.5 文献标识码:A

Identification of pacemaker-like current in interstitial cells of Cajal in bladder of adult guinea pigs

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

Abstract: Objective To ascertain the presence of pacemaker-like current in interstitial cells of Cajal (ICCs) in the bladder of adult guinea pigs. Methods Primarily cultured bladder ICC of adult guinea pigs were harvested by collagenase digestion. Hyperrepolarization-activated inward current (Ih) and pacemaker specific current were recorded using whole-cell patch clamp technique. Results There was significant difference in resting membrane potential and membrane capacitance between ICCs and detrusor myocytes. Ih was confirmed in the ICCs, but not in the detrusor myocytes. Conclusion We have confirmed the existence of the specific pacemaker current in the ICCs in the bladder of adult guinea pigs, implying that ICCs might play an important role as pacemaker in the bladder.

Key words: interstitial cells of Cajal; pacemaker current; bladder

离体的膀胱平滑肌肌条在完全阻断了神经影响(切断神经支配以及加入神经阻滞剂)的情况下,仍然存在有节律的自发性收缩。该现象提示离体膀胱平滑肌的收缩不依赖于神经因素而与膀胱平滑肌本身特性有关,是一种肌源性的自发兴奋、收缩[1]。逼尿肌不稳定(detrusor instability, DI)是泌尿外科最常见的一种膀胱功能障碍性疾病,表现为病理状态下储尿期全膀胱或大部分膀胱组织的协调收缩。要达到这种状态至少应有两个重要条件:一是有一个兴奋性最高的控制点(即起搏点);二是有一细胞间的兴奋传递系统。只有这样才能使膀胱产生协调性的收缩。这一特征与心脏收缩控制十分相似。在有关细胞间兴奋传递研究中我们已证明细胞间缝隙连接是逼尿肌细胞间兴奋传递的主要结构基础[2],而理论上存在的兴奋起搏点目前仍是未解之谜。

在前期研究工作中,采用KIT免疫组织化学染色方法,我们已经证实在成年豚鼠膀胱存在有胃肠道起搏细胞(interstitial cells of Cajal, ICCs)[3],并通过酶消化法,体外得到了原代培养的膀胱ICCs细胞[4]。ICCs细胞是研究膀胱起搏细胞的一个重要切入点,推测其可能就是膀胱的起搏细胞,但目前尚缺少相关证据。超级激活的内向电流(hyperrepolarization-activated inward current, Ih)是起搏细胞的特征。本研究利用膜片

基金项目:国家自然科学基金(30670776,30471740)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30670776, 304717401)
作者简介:沈文浩,男,湖北省襄樊市人,博士研究生,主治医师,主要从事尿动力学方面的研究。发表论文5篇。电话:(023)68765342, E-mail:chongqingswh@yahoo.com.cn
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

钳技术,在全细胞记录模式下观察原代培养的成年豚鼠膀胱 ICCs 细胞是否具有 Ih,以证明其是否为膀胱的起搏细胞。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 实验动物采用健康 45 ~ 60 d 龄豚鼠 2 只,雌雄不限,体质量 400 ~ 600 g,购自第三军医大学实验动物中心。

1.1.2 主要试剂及其配制 DMEM 细胞培养液:将 DMEM 粉(HyClone 公司)按常规配成 DMEM 液后,分装成 80 ml/瓶,使用时每瓶加入 20 ml 的牛血清白蛋白(bovine serum albumin,BSA,Roche 公司)和 25 ng 的干细胞生长因子(stem cell factor,SCF,Sigma 公司)。0.1% 胶原酶 P 液(Roche 公司)、0.25% 胰蛋白酶液、D-Hanks 液均按常规配置。Ih 电流记录电极液:133 mmol/L KCl,1 mmol/L $MgCl_2$,0.5 mmol/L EGTA,HEPES 10 mmol/L,KOH 调 pH = 7.2 ~ 7.4。普通试剂均为国产分析纯。

1.1.3 主要仪器和设备 P-97 电极拉管仪:三菱,日本;Axopatch 200B 放大器和 pCLAMP8.0 运行平台:Axon Instruments,美国。

1.2 方法

1.2.1 成年豚鼠膀胱 ICCs 细胞和逼尿肌细胞的原代培养 按照文献[4]的方法进行细胞的原代培养和分离。细胞分离后,细胞团接种于 18 mm × 18 mm 清洁玻片上,密度为 1×10^6/ml,培养液为含 20% BSA 和 5 ng/ml SCF 的 DMEM 细胞培养液,ICCs 细胞接种 3 h,贴壁于玻片上后即进行膜片钳实验;逼尿肌细胞静置 3 d,大部分细胞贴壁后行膜片钳实验。

1.2.2 膜片钳全细胞记录 取接种有目标细胞的玻片转入倒置显微镜上的自制灌流槽中,以 D-Hanks 液进行灌流,速度为 1 ml/min。采用 P-97 水平微电极拉制仪拉制微电极,冲灌电极内液后阻抗 2 ~ 5 MΩ,将电极固定在电极夹持器上与 Axon200B 放大器相连,在倒置显微镜下找到目标细胞(图 1);迅速将电极靠近细胞,电位补偿后利用负压抽吸,使形成高阻抗封接(封接阻抗在 1 GΩ 以上);破膜后即可对细胞进行电压钳制,建立全细胞记录模式。刺激脉冲通过 pCLamp8.0 软件控制的 D/A 转换器操纵,记录的信号经膜片钳放大器(Axon200B)A/D 转换及滤波放大后存入计算机硬盘。实验均在室温(22 ~ 25 ℃)下进行。



图 1 膜片钳实验实物图

1.2.2.1 超级化激活的内向电流(Ih)记录 微电极内灌充 K^+ 电流记录电极液,选择电压钳模式,输出各类刺激信号。设置钳制电压(HP)为 -60 mV;检测电压(TP)每步阶跃 10 mV,从 -40 mV 均跳至 -150 mV,根据实验要求进行改变;时程 500 ms;刺激脉冲刺激间隔 5 s;实验温度 21 ℃。

1.2.2.2 不同浓度 ZD7288 对 ICCs 细胞 Ih 的影响 微电极内灌充 K^+ 电流记录电极液,选择电压钳模式,设置钳制电压(HP)为 -150 mV,细胞浴池液中 ZD7288 浓度分别为 5、10、20 mmol/L,记录 Ih,并与细胞浴池液中未加 ZD7288 相比较。实验温度 21 ℃。

1.3 实验数据处理

数据分析采用 pCLAMP9.0(Axon Instruments)和 Excel(Microsoft)软件程序。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组内、组间的显著性用 t 检验。n 为检测的细胞数。采用 SPSS 10.0 统计软件,用药前后的比较采用自身配对 t 检验。

2 结果

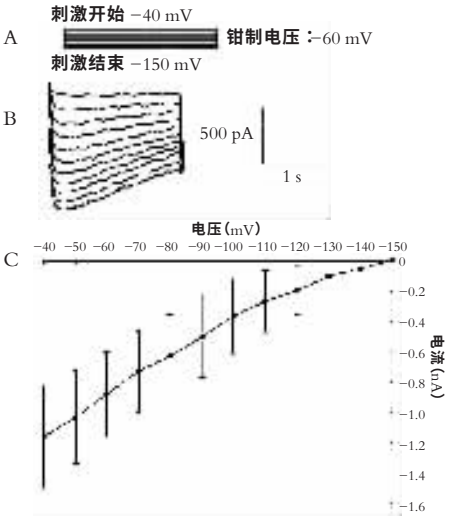
2.1 膜电容和膜电位

ICCs 细胞静息膜电位为(-39.8 ± 1.1)mV(n = 18),膜电容为(-58 ± 3.2)pF,逼尿肌细胞静息膜电位为(-56.6 ± 1.9)mV(n = 16),膜电容为(-48.3 ± 1.5)pF。两项参数两种细胞间对比有显著差异(P < 0.05)。

2.2 全细胞模式下 Ih 电流记录

2.2.1 ICCs 细胞 Ih 电流 被检测的 ICCs 细胞均可记录到 Ih 电流(n = 18)。激活电压 -50 mV,呈电压依赖性(图 2)。当浴池中加入 Ih 通道特异阻滞剂 ZD7288 时,对比检测电压 -150 mV 时电流强度,发现其幅度明显减小(P < 0.05),并呈剂量依赖性(图 3)。

2.2.2 逼尿肌细胞的 Ih 电流 被检测的逼尿肌细胞中 Ih 电流不明显(图 4)。电压阶跃至 -150 mV 时仍记录不到 Ih 电流。



A 检测电压与钳制电压;B:ICCs 细胞 Ih 电流曲线;C:ICCs 细胞 Ih 电流 I-V 曲线

图 2 ICCs 细胞 Ih 电流及 I-V 曲线

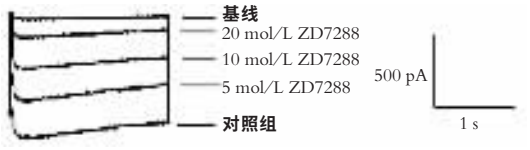
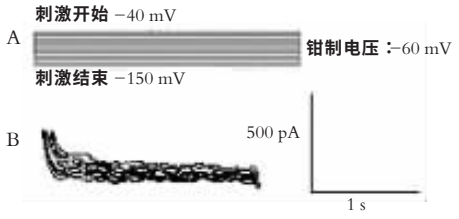


图 3　不同浓度 ZD7288 对 Ih 的影响　（钳制电压 = －150 mV）



A：检测电压与钳制电压；B：逼尿肌细胞 Ih 曲线

图 4　逼尿肌细胞 Ih 电流记录结果

3　讨论

Ih 是指在膜片钳全细胞记录模式下，细胞膜钳制电位向超级化阶跃时，所记录到的内向电流。它于 1979 年首先被发现存在于兔心脏的窦房结细胞，由于其被激活方式与其他电流不同，Brown 等[5] 称其为“ funny current ”，简称 I_f。随后在中枢和外周神经元等其他可产生自发性兴奋性的细胞中也记录到了这种电流，为与心脏相区别，存在于心脏外其他组织的超级化内向电流被称为“ queer current ”，简称 I_Q[6]。因为在不能产生自发性动作电位的组织记录不到 Ih，Ih 被认为是起搏细胞的特征电流（specific pacemaker current）[7]。

细胞的体外培养是单独研究细胞功能所常用的一种实验方法。但细胞在体外条件下生长，由于外环境的改变，培养时间过长或经过传代以后，其细胞特性将发生变化。对比研究胃肠道新鲜分离（贴壁后不久）和培养 3 d 以后的 ICCs 表面膜抗原，发现后者 KIT、α-SM-Actin 和Ⅱ型血管活性肠肽受体（VIP-2）染色均为阳性，而新鲜分离的 ICCs 仅 KIT 染色为阳性，提示 ICCs 在体外长时间的培养过程中，其胞膜表面分子标记物将发生变化[8]。因此电流特性研究应以新鲜分离的 ICCs 细胞为研究对象。我们对新鲜分离的 ICCs 细胞行 KIT 和 α-SM-Actin 染色[4]，提示用于膜片钳实验的新鲜分离的 ICCs 细胞 KIT 染色阳性，α-SM-Actin 染色为阴性。对新鲜分离的 ICCs 细胞的电流特性研究结果可代表其在体情况。

超极化激活的内向电流是起搏细胞的特征电流，使得 Ih 成为证实细胞具有起搏功能的另一间接证据。本实验显示成年豚鼠 ICCs 细胞具有 Ih，而在相同模式下逼尿肌细胞无 Ih 产生；Ih 特异性阻断剂 ZD7288 对 ICCs 细胞 Ih 有明显抑制作用[9]，并呈剂量依赖性。ICCs 细胞存在有 Ih 提示该类细胞在成年豚鼠膀胱可能具有起搏作用。

本研究结果提示在膀胱的 ICCs 细胞存在有起搏特征电流，ICCs 细胞可能就是理论上存在于膀胱的起搏细胞。对该细胞功能的进一步研究将有助于丰富膀胱神经生理理论，对于理解与排尿有关的生理和病理生理机制增加全新的认识，并为临床上治疗某些疾病（如 DI）提供新的靶点。

（致谢：膜片钳全细胞记录部分实验在第三军医大学基础医学部神经生物学教研室完成，特此感谢。）

参考文献：

[1] Andersson K E, Arner A. Urinary bladder contraction and relaxation: physiology and pathophysiology[J]. Physiol Rev, 2004, 84(3): 935－986.

[2] 周逢海，宋　波，金锡御，等. 逼尿肌不稳定缝隙连接介导的细胞间通讯的研究[J]. 中华泌尿外科杂志，2004，25(4): 260－262.

[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] 沈文浩，熊恩庆，李为兵，等. 酶消化法获得成年豚鼠膀胱卡哈尔间质细胞样细胞的体外原代培养及其特征鉴定[J]. 中国临床康复，2006，10(1): 36－38.

[5] Brown H F, DiFrancesco D, Noble S J. How does adrenaline accelerate the heart?[J]. Nature, 1979, 280(5719): 235－236.

[6] Halliwell J V, Adams P R. Voltage-clamp analysis of muscarinic excitation in hippocampal neurons[J]. Brain Res, 1982, 250(1): 71－92.

[7] Robinson R B, Siegelbaum S A. Hyperpolarization-activated cation currents: from molecules to physiological function[J]. Annu Rev Physiol, 2003, 65: 453－480.

[8] Epperson A, Hatton W J, Callaghan B, *et al*. Molecular markers expressed in cultured and freshly isolated interstitial cells of Cajal[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2000, 279(2): C529－C539.

[9] Baruscotti M, Bucchi A, Difrancesco D. Physiology and pharmacology of the cardiac pacemaker (“ funny ”) current[J]. Pharmacol Ther, 2005, 107(1): 59－79.

（编辑　王　红）