论著

文章编号:1000-5404(2008)07-0570-04

牵张负荷对大鼠膀胱ICCs细胞数量及c-kit表达的影响

路 扬,李龙坤,王永权 (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 探讨牵张负荷条件对膀胱Cajal间质细胞(interstitial cells of Cajal,ICCs)数量及c-kit蛋白表达变化的影响,阐明牵张负荷对膀胱ICCs细胞兴奋性的调控作用。方法 构建大鼠不稳定逼尿肌模型,以光镜计数及免疫组化法检测牵张负荷下逼尿肌稳定组和逼尿肌不稳定组与正常对照组膀胱ICCs细胞数量及酪氨酸激酶受体(c-kit)在蛋白水平表达的差异。结果 逼尿肌稳定组和逼尿肌不稳定组ICCs细胞数量与c-kit表达量较正常对照组均有增高($P<0.01$),逼尿肌不稳定组较稳定组升高显著($P<0.01$)。结论 牵张负荷对ICCs细胞有调控作用;ICCs细胞数量及c-kit表达增多可能是其机制之一。

关键词:牵张负荷;Cajal间质细胞;c-kit 膀胱
中图法分类号:R322.62;R329.25;R394.2 文献标识码:A

Effects of stretch load on quantity and c-kit expression of rat bladder interstitial cells of Cajal

LU Yang, LI Long-kun, WANG Yong-quan (Urinary Surgery Research Institute, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of stretch load on the quantity of rat bladder interstitial cells of Cajal (ICCs) and c-kit expression in the cells. Methods Rat models of detrusor instability with partial outflow obstruction were established. The quantity of ICCs and c-kit expression in ICCs from stable, unstable and normal detrusor were studied with light microscopy and Western blotting. Results The quantity of ICCs and expression of c-kit in the stable and unstable detrusors were higher than that in normal control group ($P<0.01$), and those of the unstable detrusor were significant higher than those of the stable one ($P<0.01$). Conclusion Stretch load can regulate the function of ICCs, probably through increment of the quantity of ICCs and up-regulation of c-kit expression in the cells.

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

逼尿肌不稳定(detrusor instability, DI)是最常见的一种膀胱功能障碍,是引起尿急、尿频、急迫性尿失禁等临床症状的常见原因。导致这一疾病的起因尚不完全明确,因此寻找病因是解决问题的关键。研究表明:膀胱平滑肌具有自发兴奋性。在离体条件下,膀胱逼尿肌失去神经支配时,受到牵张负荷后,逼尿肌细胞仍然可产生自发性兴奋,启动逼尿肌肌条收缩[1]。理论上讲,它应该是兴奋起源和传导的中枢。而且膀胱逼尿肌可检测到与胃肠道相似的Cajal间质细胞(interstitial cells of Cajal, ICCs)[2],说明牵张对逼尿肌兴奋性有调控作用。本研究拟探讨逼尿肌不稳定时,大鼠膀胱ICCs细胞数量及c-kit在蛋白水平表达差异。

1 材料与方法

1.1 主要实验材料及相关仪器

体质量为200~250 g SD雌性大鼠,2~3月龄(来自第三军医大学实验动物中心);PVDF膜(GE公司);c-kit(M-14)多克隆抗体(santa公司);辣根酶标记兔抗山羊IgG(H+L)抗体(北京中杉公司);β-actin单克隆抗体(美国Sigma公司);ECL化学发光试剂盒(美国Pierce公司);PV-6003免疫组化染色试剂盒(北京中杉公司);浓缩型DAB试剂盒(北京中杉公司);Nidoc-970型尿动力学检测仪(成都维信公司);AVI-270型微量灌注泵(美国3M公司);冰处理系统(美国Millipore);Du640紫外分光光度仪(美国Beckman);蛋白垂直电泳系统(美国Bio-Rad);凝胶成像分析仪(美国Bio-Rad)。

1.2 实验方法

将大鼠采用完全随机方法分为实验组和对照组。实验组16只,用于逼尿肌不稳定模型的构建;正常对照组6只。对照

基金项目:国家自然科学基金(30500505)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30500505)
作者简介:路 扬,男,山东省淄博市人,硕士研究生,医师,主要从事尿动力学方面的研究。电话:(023)68765846
通信作者:李龙坤,电话:(023)68765371,E-mail:lilongk@hotmail.com
收稿日期:2007-12-05;修回日期:2008-02-04

组正常喂养，梗阻组手术建立膀胱出口部分梗阻（partial bladder outlet obstruction，PBOO）动物模型。6 周后行尿动力学检查。

1.2.1　膀胱出口梗阻模型的建立　　1% 戊巴比妥钠注射液 0.8～1.0 ml（约 40 mg/kg）大鼠腹腔内注射麻醉，经尿道外口插入直径为 1 mm 的麻醉用硬膜外导管（石蜡油润滑）入膀胱，沿腹侧中线方向剪开皮肤和皮下组织，钝性分离肌层，游离膀胱颈，避开输尿管、血管及膀胱外脂肪，以 1 号丝线将膀胱颈与套管结扎，形成膀胱出口部分梗阻，结扎松紧度以牵拉导管可带动周围组织，且导管略有阻力感为度。拔出导管分层缝合肌层、皮下组织及皮肤。同龄对照组正常大鼠 6 只相同条件下饲养 6 周。

1.2.2　膀胱充盈性压力测定　　将术后 6 周的大鼠，以 25% 乌拉坦注射液 1.0～1.2 ml（1 000 mg/kg）腹腔内注射麻醉，打开腹腔，找到结扎部位，将结扎部位线结剪开，经尿道外口置入 1 mm 的硬膜外麻醉导管入膀胱，导管外口与三通管分别连接于微量灌注泵、尿动力仪（导管中的气泡要排尽），尿动力仪调定零点，0.9% 生理盐水以 20 ml/h 灌注行膀胱测压，大鼠排尿时终止灌注，此时的灌注量记录为膀胱最大容积，继续测压至曲线回降到排尿前水平，根据膀胱充盈过程中压力-容积关系，大鼠膀胱充盈分为压力升高缓慢的低压充盈期和压力升高较快的高压充盈期。参照大鼠 DI 的判断标准[3]，在膀胱低压充盈期出现造成膀胱内压升高超过15 cmH_2O（1 cmH_2O = 0.098 kPa）的逼尿肌收缩时即为 DI。

1.2.3　免疫组化染色　　采用二步法免疫组化进行染色。取新鲜的膀胱组织，0.9% 生理盐水漂洗后浸泡于中性福尔马林溶液 48 h，石蜡包埋切片。65℃孵箱烤片 2 h 后，将切片脱腊至水；微波热修复；3% H_2O_2 去离子水 37 ℃孵育 10 min，以灭活内源性过氧化物酶活性；1∶100 稀释 c-kit（M-14）抗体，4 ℃孵育 15 h；滴加兔抗山羊 IgG 抗体-HRP 多聚体试剂（PV-6003），37 ℃湿盒内孵育 30 min；至水后，各步骤间用 PBS 漂洗 3 次，每次 5 min。DAB 显色，镜下观察显色情况，适时终止显色。苏木精轻度复染、盐酸酒精分化、反蓝、脱水透明、封片。每张切片随机选取 10 个视野（×200），计数每个视野中阳性细胞的数目，取均值，作为此切片中单位面积阳性细胞数目。分别计算对照组和手术组阳性细胞数目。

1.2.4　Western blot 检测　　在解剖显微镜下将大鼠膀胱黏膜层撕去，用干净的剪刀尽可能将组织剪碎，把组织放入在含有裂解液的匀浆器中匀浆，充分裂解组织；将匀浆液移至 1.5 ml 离心管中，然后在 4 ℃下 12 000 × g 离心 5 min，上清液置于 1.5 ml EP 管中；把含有上清液的 EP 管放置冰水中，用超声仪充分破碎细胞，使细胞中的蛋白释放出来；做蛋白标准曲线，用 BCA 法测 OD 值；配置 10% SDS-PAGE 分离胶及 5% SDS-PAGE 浓缩胶；将 15 μg 样品溶液分别与等体积 2 × SDS loading buffer 混合，用微量上样器上样；电泳仪电压设定 80 V 20 min，100 V 70 min；电泳完毕后转膜，电压设定 100 V 90 min；将 PVDF 膜放入 5% 脱脂奶粉 TBST 溶液封闭 2 h；1∶600 稀释 c-kit（M-14）抗体，4 ℃孵育 15 h；TBST 溶液中漂洗 4 次，每次 10 min；1∶5 000 稀释辣根酶标记兔抗山羊 IgG（H + L）抗体孵育 1 h；TBST 溶液中漂洗 4 次，每次 10 min；取化学发光 A、B 液各 100 μl，充分混匀后均匀滴加在 PVDF 膜蛋白面，用 Bio-RAD 凝胶成像系统拍照；以 β-actin 做内参，分析目的条带与内参净光密度值。

1.3　统计学方法

检验资料结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示，数据均采用 SPSS 13.0 统计软件进行单因素方差分析。

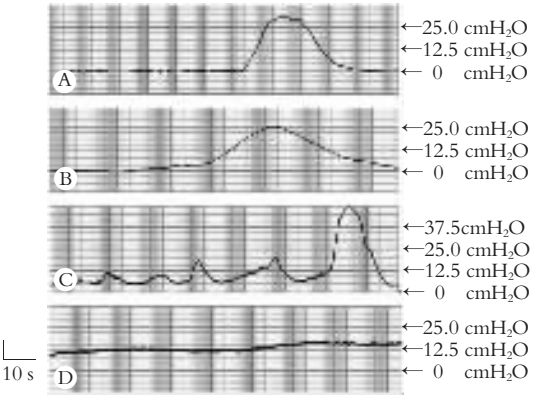
2　结果

2.1　模型制备情况

梗阻组死亡 2 只，手术组模型存活 14 只，有逼尿肌不稳定的 9 只，未发生 DI 4 只，膀胱无功能 1 只。成功率 64.2%（9/14）。2 组大鼠生长良好，体质量增加无显著性差别。

2.2　测压图形分析

正常对照组测压曲线：曲线平滑，膀胱容量及压力正常，排尿反射存在（图 1A）。梗阻组测压曲线可分类为：未发生 DI，曲线平滑，膀胱容量及压力基本正常，排尿反射存在（图 1B）；排尿反射存在的 DI，储尿期伴有明显的不稳定收缩波，膀胱容量及压力显著增加（图 1C）；膀胱无功能，无收缩波表现，排尿反射消失（图 1D）。



A：正常对照组；B：PBOO 术后非 DI 组；C：PBOO 术后 DI 组；D：PBOO 术后

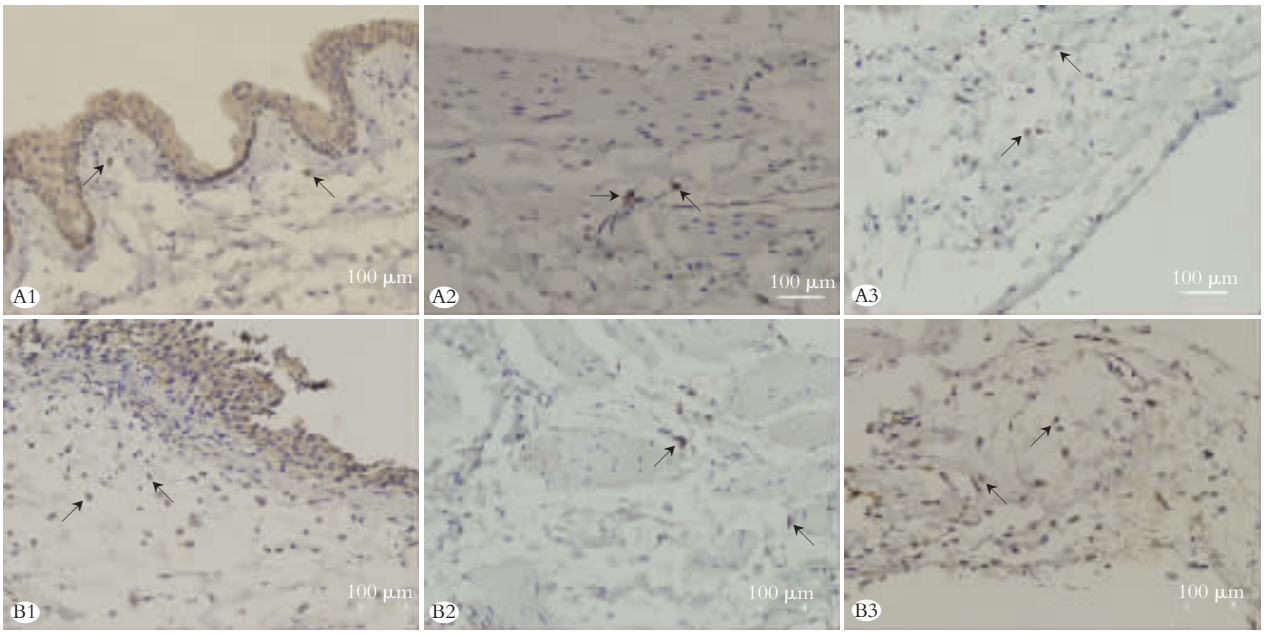
图 1　膀胱充盈性测压曲线

2.3　免疫组化染色结果

在大鼠膀胱黏膜下层、肌层及浆膜下均存在有 c-kit 染色阳性、形态与胃肠道 ICCs 细胞表达相似的细胞，胞体呈梭形，细胞核大而细胞质较少。梗阻后膀胱增厚，且 ICCs 细胞较正常对照组数量上有明显差异，黏膜下层、肌间隙及浆膜层均有增多。DI 组增多显著（图 2）。各组膀胱每个高倍视野 ICCs 细胞计数均值分别为正常对照组（6.25 ± 0.48）个，非 DI 组（13.75 ± 0.48）个，DI 组（35.25 ± 0.85）个。非 DI 组与正常对照组比较，有统计学意义（$P < 0.01$）；DI 组与非 DI 组比较，有统计学意义（$P < 0.01$）。

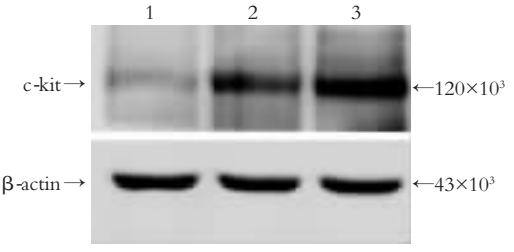
2.4　Western blot 检测结果

术后，膀胱中 c-kit 蛋白表达水平较正常对照组均有增高，逼尿肌不稳定组升高显著，β-actin 表达基本均匀（图 3）。各组膀胱中 c-kit 蛋白表达量灰度值比值（c-kit/β-actin）分别为正常对照组（0.631 ± 0.037），非 DI 组（0.924 ± 0.036），DI 组（1.301 ± 0.048）。非 DI 组与正常对照组比较，有统计学意义（$P < 0.01$）；DI 组与非 DI 组比较，有统计学意义（$P < 0.01$）。



A：正常对照组；B 梗阻后 DI 组 1 黏膜下层；2：肌层；3 浆膜下层

图2 ICCs 细胞免疫组化染色分布 （两步法）



1：正常对照组；2：PBOO 术后非 DI 组；3：PBOO 术后 DI 组

图3 Western blot 检测各组膀胱 c-kit 蛋白表达变化

3 讨论

逼尿肌是否存在自发性兴奋一直是泌尿外科研究者经常讨论的问题。我们在前期的研究发现：离体逼尿肌肌条在受到一定张力负荷下可出现自发性收缩，而不稳定逼尿肌与正常逼尿肌肌条相比，施加较小的张力负荷就可出现自发性的收缩；在同等张力负荷下不稳定逼尿肌肌条的自发收缩频率较正常逼尿肌肌条明显增加；在完全阻断神经后逼尿肌这一自发性收缩依然存在，表明这种收缩并不依赖于神经支配，是一种肌源性的兴奋和收缩。因此，可以认定膀胱在长期受张力的情况下，其兴奋性是有改变的。当逼尿肌不稳定时，临床上表现在尿频、尿急、急迫性尿失禁等，是导致膀胱功能障碍的最直接原因。因此阐明这种肌源性的自发兴奋、收缩的调控因素对于理解正常膀胱的生理功能和逼尿肌不稳定的发病机制，乃至于临床治疗都具有关键性的意义。

逼尿肌能产生不受神经源性干扰的自发性收缩，理论上讲应该是受到了某种具有自发兴奋性的起搏细胞的调控，否则逼尿肌将一直处于不规则的收缩状态下。胃肠道的基础研究和临床研究表明牵张负荷对胃肠道 ICCs 细胞兴奋性有重要的调控作用，而泌尿道平滑肌具有和胃肠道平滑肌相似的、不受神经控制的自发性肌源性兴奋性，从免疫组化和形态学上来说逼尿肌上应存在与胃肠道 ICCs 细胞相似的细胞，并提示它们的功能可能也存在着相似。研究表明，ICCs 细胞表达酪氨酸激酶受体（c-kit），它可以被选择性的标记出来[4]。自从 Smet 等[2]首先报道在豚鼠和人逼尿肌上发现与 ICCs 细胞类似的膀胱间质细胞以来，国外学者已确定 kit 阳性、形态与胃肠道 ICCs 细胞相似的细胞存在于在豚鼠的肾盏和肾盂输尿管交接部位及鼠的输尿管上[5]、兔子的尿道[6]、小鼠[7]、大鼠、猪和牛的上尿路[8]，以及人的全泌尿道[9]。牵张对逼尿肌兴奋性有调控作用，牵张负荷对 ICCs 细胞的调控可能表现在调控其数量等多重环节。如果在排尿障碍的患者膀胱中发现 ICCs 细胞显著改变，可能是因为该细胞的改变（数量和功能等方面）影响了膀胱平滑肌细胞间的信息传递及自发性电活动产生，导致排尿异常。

牵张负荷和起搏细胞理论上讲必然存在联系，一个是兴奋的枢纽，一个是兴奋的调控条件；牵张负荷很可能是通过调控 ICCs 细胞来起作用。本研究恰好证实了以上理论，在研究中，我们观察到 PBOO 术后的大鼠膀胱 ICCs 细胞在数量上及 c-kit 蛋白水平表达较正常对照组均有增多，尤其是当逼尿肌不稳定时，ICCs 细胞数量及 c-kit 表达增高显著。因此，明确了 c-kit 介导的膀胱 ICCs 细胞在逼尿肌不稳定时发生机制中

的作用机制,表明膀胱 ICCs 细胞可能在膀胱中具有起搏功能。我们还发现在进行梗阻干预后,仪器多次检测,有 4 只大鼠排尿压力曲线是正常的,说明未发生 DI,但免疫组化和 Western blot 实验显示该组(即非 DI 组)在 ICCs 细胞数量以及 c-kit 在蛋白水平表达较正常对照组也有增高,只是相对于 DI 组弱很多,很可能是因为该细胞数量或功能改变未达到一定的阈值所致。从这一角度也表明了该细胞数量及功能的改变与膀胱功能的改变密切相关。

膀胱动力障碍性疾病的起因目前尚不完全清楚,它可能起因于膀胱 ICCs 细胞产生紊乱的起搏信号,可能由于这些细胞不正确的电耦联或是由于其神经调节失调,这些问题都需要进一步去研究来做出回答。通过对比研究牵张负荷条件下的膀胱 ICCs 细胞与正常 ICCs 细胞兴奋性差异,系统探讨牵张反射在膀胱 ICCs 细胞兴奋性起源及调控中的作用,为 ICCs 细胞功能的进一步研究打下基础,并为临床治疗膀胱兴奋性异常所致疾病提供思路和方法。

参考文献:

[1] Ballaro A, Mundy A R, Fry C H, *et al*. Electromyographic detection of purinergic activity in Guinea pig detrusor smooth muscle[J]. J Urol, 2003, 169(1): 377 – 381.

[2] 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): 337 – 348.

[3] Malmgren A, Sjogren C, Uvelius B, *et al*. Cystometrical evaluation of bladder instability in rats with infravesical outflow obstruction[J]. J Urol, 1987, 137(6): 1291 – 1294.

[4] Sanders K M, Ordog T, Koh S D, *et al*. Development and plasticity of interstitial cells of Cajal[J]. Neurogastroenterol Motil, 1999, 11(5): 311 – 338.

[5] Klemm M F, Exintaris B, Lang R J. Identification of the cells underlying pacemaker activity in the guinea-pig upper urinary tract [J]. J Physiol, 1999, 519(Pt 3): 867 – 884.

[6] Sergeant G P, Hollywood M A, McCloskey K D, *et al*. Specialised pacemaking cells in the rabbit urethra[J]. J Physiol, 2000, 526(Pt 2): 359 – 366.

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

[8] Metzger R, Schuster T, Till H, *et al*. Cajal-like cells in the upper urinary tract: comparative study in various species[J]. Pediatr Surg Int, 2005, 21(3): 169 – 174.

[9] van-der-AA F, Roskams T, Blyweert W, *et al*. Identification of kit positive cells in the human urinary tract[J]. J Urol, 2004, 171(6 Pt 1): 2492 – 2496.

(编辑　王　红)

钱桂生教授荣获 2007 年度“振兴重庆争光贡献奖”



一年一度的“振兴重庆争光贡献奖”是重庆市委、市政府授予的全市最高综合性荣誉奖。本届争光贡献奖经过 350 多万市民公开投票、评委会无记名投票和市委常委会、市政府常务会审定,共评出了 10 位获奖者。我校新桥医院全军呼吸内科研究所钱桂生教授获此殊荣。

钱桂生教授从事临床、教学、科研 40 余年,是我国呼吸内科研究领域的开拓者和学术带头人,先后主持国家、军队、重庆市重大科研课题 10 余项。他致力于呼吸系统疾病的酸碱失衡和急性呼吸窘迫综合征(ARDS)的研究,使其病死率从 59.75% 下降到 41.86%,达到国际领先水平。他在国内首先阐明了慢性呼酸和呼碱代偿规律,并应用于临床,显著提高呼吸衰竭等患者的救治水平,处于国内领先水平。1999 年,他率先在国内开展以肺癌、哮喘为重点的人类疾病相关基因的克隆,组建全国第一个人类疾病基因研究所,找到了全国第一条肿瘤耐药基因。他先后获得国家科学技术进步二、三等奖各 1 项,军队科技进步二等奖 12 项,军队医疗成果一等奖 2 项。主编《急性呼吸窘迫综合征》等专著 7 部,填补国内空白。发表专业学术论文 220 余篇。培养博士后 9 名、博士研究生 108 名、硕士研究生 98 名。1993 年起享受国务院政府特殊津贴,2001、2005 年被解放军总后勤部评为“总后科技金星”,2001 年被中国科协评为“全国优秀科技工作者”,2004 年被解放军总参谋部评为“全军院校育才金奖”,2007 年荣获“中国医师奖”,先后荣立二等功 2 次、三等功 4 次。现任全国临床医学专业学位教育指导委员会委员,中华医学会内科学、呼吸病学分会常委,全军医学科学技术委员会委员等学术职务。

钱教授兼任我刊编委会常务副主任委员,在百忙之中总是按时保质地完成审稿工作,并尽可能地抽出时间参加定稿会,其兢兢业业、认真负责、甘为人梯的奉献精神,不愧为青年学者学习的楷模。

“振兴重庆争光贡献奖”自 1998 年设立以来,引起了广大市民的高度关注。我校获此奖项的有:王正国院士(1998 年)、蒋耀光教授(1999 年)、董家鸿教授(2000 年)、黄跃生教授(2002 年)、肖颖彬教授(2003 年)、阴正勤教授(2005 年)。