论著

文章编号:1000-5404(2008)07-0574-04

牵张负荷对豚鼠膀胱ICCs细胞内钙波的影响

王永权,方 强,路 扬,宋 波,李龙坤 (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 探讨牵张负荷对豚鼠膀胱起搏细胞(interstitial cells of Cajal,ICCs)兴奋性的影响。方法 胶原酶消化豚鼠膀胱,于特制的牵张培养皿中体外培养膀胱起搏细胞,激光共聚焦技术检测Fluo-4负载的起搏细胞在牵张负荷下Ca^{2+}信号的变化。结果 以豚鼠膀胱组织铺片及体外培养细胞中观察到c-kit染色阳性及长梭形有突起的细胞鉴定为膀胱起搏细胞,即ICCs细胞。细胞于牵张膜上培养4~5 d后,予Fluo-4钙负载染色,激光共聚焦下检测,无应力状态时,ICCs细胞可观察到周期性的'钙波",且其平均荧光强度显著强于平滑肌细胞($P<0.05$)。当牵张膜被动拉伸延长20%时,ICCs细胞先于平滑肌细胞发生钙波增强现象。结论 静息状态下ICCs细胞可出现周期性钙波,牵张负荷可兴奋ICCs细胞。

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

Effect of stretch load on calcium wave of interstitial cells of Cajal in guinea pig bladder

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

Abstract: Objective To explore the regulation of stretch load on the interstitial cells of Cajal (ICCs, pacemaker cells) in guinea pig bladder. Methods Cells were isolated by collagenase digestion and were cultured in special stretch plate. [Ca^{2+}] variation was assessed on Fluo-4 NW dye loaded cells undergoing stretch load or ease state using confocal laser scanning microscopy. Results c-kit positive ICCs were identified with lateral branches in both cultured plate and whole mounted bladder samples. After 4 – 5 days' culture, cells were loaded with fluo-4 NW dye. Intermit calcium waves were found in ICCs. The mean fluorescence intensity of calcium waves in ICCs was higher than that in the smooth muscle cells ($P<0.05$). The [Ca^{2+}] in ICCs was significantly increased after stretch load and this change was initiated earlier than that in smooth muscle cells. Conclusion Cultured ICCs have periodical calcium wave, and facilitate calcium signals in response to stretch load.

Key words: interstitial cells of Cajal; stretch; Ca^{2+} signal; excitation; bladder

膀胱平滑肌的兴奋和收缩可受神经、体液等多种因素的调控和影响。然而离体的膀胱平滑肌条在去除了神经和体液因素的干扰后,仍然可以发生在应力状态下的自发性兴奋和收缩。这说明在神经和体液的调控因素之外可能还存在其他因素的影响[1]。

Cajal间质细胞(interstitial cells of Cajal,ICCs)是一种特殊的间质细胞,首先在胃肠道组织中发现,ICCs细胞对胃肠道基本电节律的形成、神经传导的调控、信号整合等多种生理功能起到了重要的作用。目前,研究人员在胃肠道组织以外的多种平滑肌组织(如输尿管、膀胱、子宫、胆囊等)陆续发现了ICCs细胞的存在[2-4],但是胃肠道外ICCs细胞的功能学研究尚处于起步阶段。

本研究将胶原酶消化后的ICCs细胞体外培养于牵张膜上,Fluo-4荧光负载,激光共聚焦显微镜下观察急性牵张应力状态下ICCs细胞和平滑肌细胞钙信号变化情况。探讨ICCs细胞对膀胱平滑肌细胞兴奋性的影响。

基金项目:国家自然科学基金(30500505,30672093)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30500505, 30672093)
作者简介:王永权,男,贵州省贵阳市人,博士研究生,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

1　材料与方法

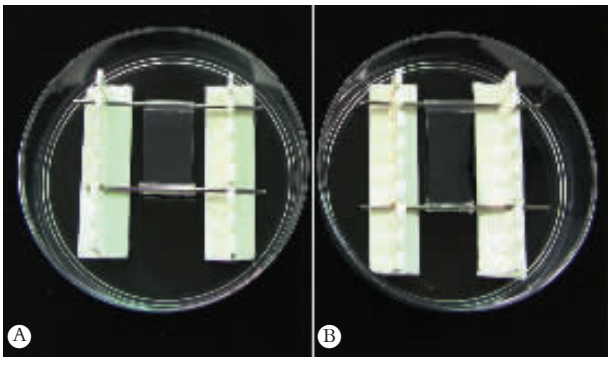
1.1　主要材料与试剂

20 只健康雌性豚鼠，体质量 250 ~ 300 g，3 ~ 4 月龄，购自第三军医大学实验动物中心。

Stage Flexer 硅胶膜（Flexcell 公司），自制应力牵张细胞培养皿，恒温细胞培养箱（Heraeus 公司），激光共聚焦显微镜（Leica 公司），胶原酶 P（Roche 公司），重组干细胞因子（SCF，R&D 公司），Fluo-4 NW 钙分析试剂盒（Molecular Probes 公司），羊抗鼠 c-kit 多克隆抗体（Santa Cruz 公司），兔抗鼠平滑肌肌动蛋白单克隆抗体（Sigma 公司），荧光二抗（Molecular Probes 公司），高糖 DMEM 培养基（Gibco 公司），标准胎牛血清（HyClone 公司）。

1.2　实验方法

1.2.1　静态牵张细胞培养皿的制作　　根据文献[5]方法经过改进制成细胞静态牵张模型。裁取 1.0 cm × 2.0 cm 大小的硅胶膜，于其两端用硅橡胶粘着固定 1.0 cm 长度的硅胶管（内径 1.5 mm，外径 3mm）并穿入 3 cm 长的金属杆固定，制成牵张膜。另在直径 6 cm 的细胞培养皿中置入两条齿梳状硬塑胶支架，硅橡胶固定，支架的齿梳间距 2.0 mm。将金属杆固定于支架的齿梳之间即制成牵张培养皿（图 1），牵张范围 4.0 ~ 18.0 mm（误差小于 0.2 mm）。将金属杆延支架远端每移动一格即可将牵张膜延长 10%。



A：静止状态；B：应力牵张状态

图 1　自制牵张培养皿

1.2.2　豚鼠膀胱 ICCs 细胞的体外培养　　断颈处死动物后，取出膀胱，解剖显微镜下剔除黏膜层和浆膜层，剪成 1 mm × 1 mm × 1 mm 的小块，0.2% 胶原酶 P 消化 30 ~ 45 min 制成细胞悬液，以 1×10^5/ml 的密度接种于牵张培养皿中并按照 50 ng/ml 加入重组 SCF，37℃、5% CO_2 培养箱中静置培养 4 ~ 5 d。

1.2.3　豚鼠膀胱组织铺片及培养细胞 c-kit 免疫荧光染色　　离体膀胱组织在解剖显微镜下仔细撕去黏膜层和浆膜层后用眼科镊将组织撕薄为 50 ~ 80 μm，组织片和培养于盖玻片上的细胞分别于 4% 多聚甲醛固定 30 min，PBS 漂洗 3 次，每次 10 min，一抗 4℃ 孵育过夜，PBS 漂洗 3 次后加二抗室温孵育 1 h，DAPI 复染细胞核 10 min，PBS 漂洗 3 次，每次 10 min。激光共聚焦显微镜观察。

1.2.4　Fluo-4 荧光染色及牵张负荷下的钙信号检测　　细胞生长 4 ~ 5 d 后，取出牵张培养皿，吸尽培养基，加入 Fluo-4 NW 荧光染料 10 ml，37 ℃ 孵育 30 min，取出后室温继续孵育 30 min 后激光共聚焦显微镜寻找有典型形态特征的 ICCs 细胞，并检测其静止状态下的荧光强度。将牵张膜拉伸延长 20% 后即刻观察 ICCs 细胞以及平滑肌细胞的荧光强度变化情况。

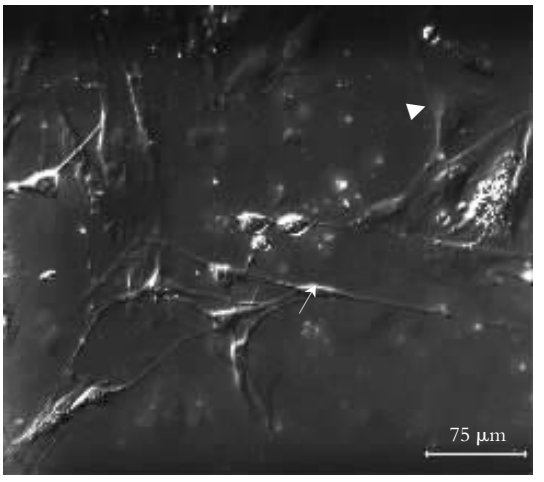
1.3　统计学处理

荧光强度数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 软件进行 t 检验。

2　结果

2.1　体外培养的豚鼠膀胱 ICCs 细胞形态学观察

胶原酶消化后的细胞于 1 d 内贴壁生长，在 c-kit 配体 SCF 的刺激下可见典型的 ICCs 细胞生长。细胞呈长梭形或纺锤形，可有分枝突起，胞体较小，排列不规则，与平滑肌细胞有明显区别（图 2）。

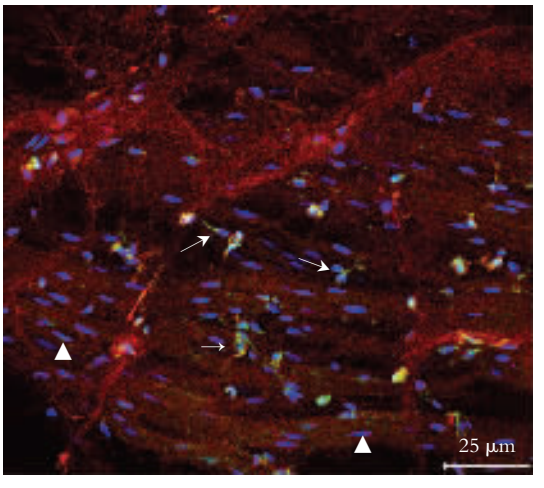


↑：ICCs 细胞；▲：平滑肌细胞

图 2　体外培养的膀胱 ICCs 细胞和平滑肌细胞　（相差显微镜）

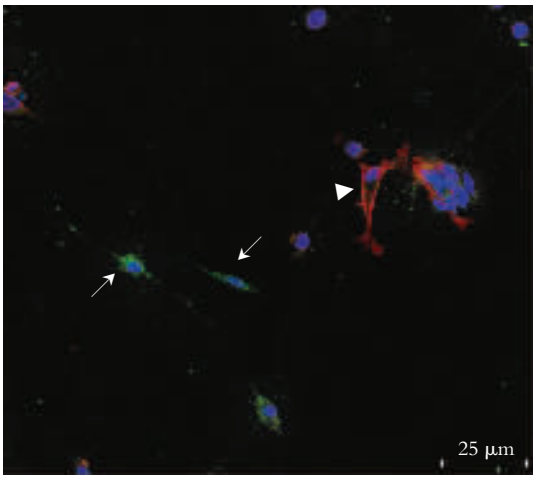
2.2　组织铺片和培养细胞免疫荧光染色

铺片荧光染色可见豚鼠膀胱组织平滑肌束间和肌束内有型态典型的 ICCs 细胞（图 3）；同样在培养的细胞中也可发现 c-kit 染色阳性的 ICCs 细胞（图 4）。



↑：ICCs 细胞；▲：平滑肌细胞

图 3　膀胱组织铺片免疫荧光染色　（免疫荧光）

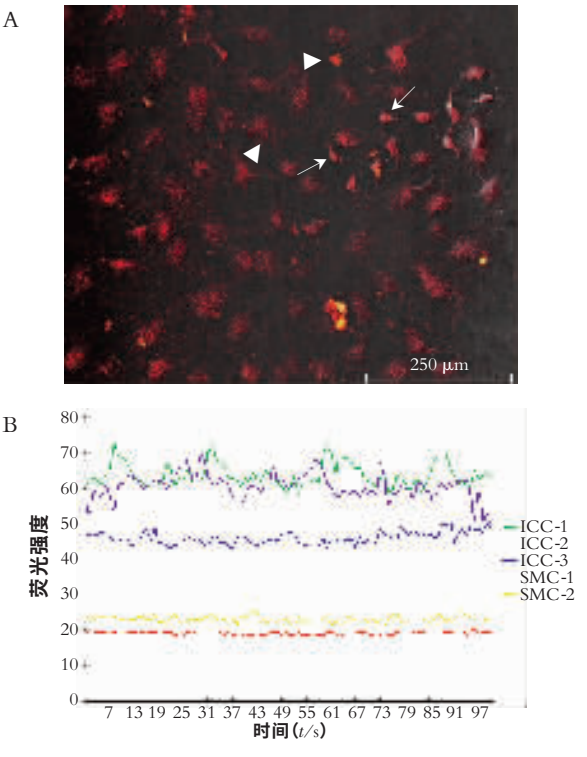


▲ :平滑肌细胞;↑ :ICCs 细胞

图4 体外培养的 ICCs 细胞和平滑肌细胞 (免疫荧光)

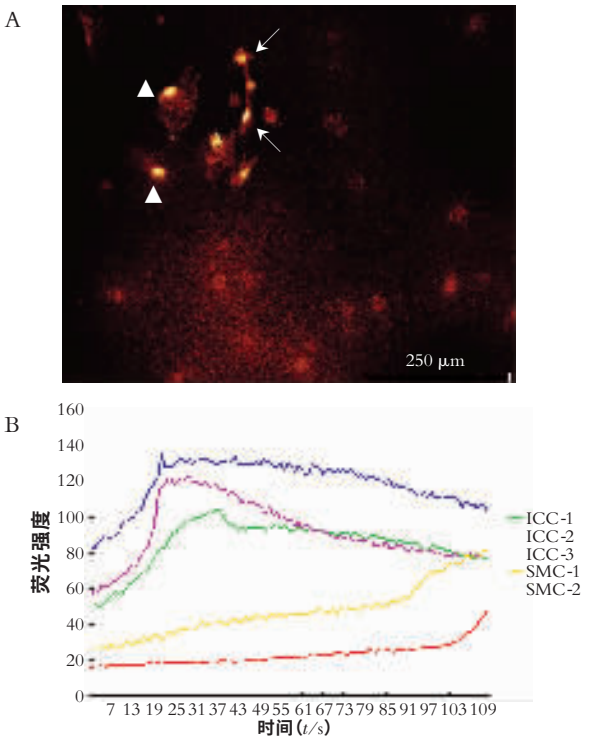
2.3 Fluo-4 负载钙信号分析

由于在体外培养下的 ICCs 细胞和平滑肌细胞的形态有明显区别,激光共聚焦检测细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 时,参照 McClosky[6] 的方法,先在可见光下寻找形态典型的 ICCs 细胞,然后观察其荧光强度变化[6]。无应力静止状态时,ICCs 细胞可观察到约 2 次/min 的周期性' 钙波 ",且其荧光强度(63.34 ± 3.38)显著强于平滑肌细胞(21.20 ± 2.08)($P < 0.05$)(图 5)。当牵张膜被动拉伸延长 20% 时,ICCs 细胞先于平滑肌细胞发生钙波增强现象(图 6)。



A:静止状态下 ICCs 细胞 fluo-4 钙负载分析(CLSM) ▲ :平滑肌细胞;↑ :ICCs 细胞;B:荧光强度分析

图5 静止状态下 ICCs 细胞的钙波信号



A:牵张负荷下 ICCs 细胞 fluo-4 钙负载分析(CLSM) ▲ :平滑肌细胞;↑ :ICCs 细胞;B:荧光强度分析

图6 牵张负荷下 ICCs 细胞钙波信号

3 讨论

泌尿道平滑肌具有和消化道类似的、不受神经系统控制的自发性肌源性兴奋,而这种肌源性兴奋的起源机制尚没有定论。ICCs 细胞的存在及其特殊功能在已受到越来越广泛的认识和重视。目前的研究表明,在上尿路和下尿路均存在 ICCs 细胞。上尿路的 ICCs 细胞主要分布在肾盂、肾盂肾盏连接部以及输尿管的固有层中,ICCs 细胞在上尿路的蠕动波产生和传递中可能起到重要的作用[7]。而在膀胱,ICCs 主要分布在黏膜下层、逼尿肌肌束周围以及肌束之间[8]。本研究结果也与国外的报道吻合。尿道中也发现了 c-kit 染色阳性的细胞而且很可能发挥了起搏细胞的作用,甚至在前列腺中也有 ICCs 细胞的存在[9]。McCloskey[6] 曾经在胶原酶消化后的豚鼠膀胱 ICCs 细胞中发现了自发的电位变化。目前倾向于 ICCs 细胞同平滑肌细胞、神经轴突一起构成了功能网络,而 ICCs 细胞则在平滑肌细胞和神经纤维之间发挥信号传递的作用[10,11]。但是 ICCs 细胞在体外培养状态下的功能研究尚少见相关报道。

牵张负荷可使机体的多种组织、细胞产生生物学行为变化,是机体多种生物学功能的刺激和调节因素之一[12]。牵张反射是平滑肌细胞的一种自身调节反射,它不依赖于神经-体液因素存在。在以往胃肠道平

滑肌为基础的研究中表明胃肠道 ICCs 细胞在牵张负荷的刺激下可发生兴奋,使胃肠道慢波频率增加,平滑肌收缩的幅度加大,并且在体外亦可诱导平滑肌的兴奋[13]。对膀胱平滑肌细胞而言,当牵张负荷作用于膀胱有兴奋性的细胞(如 ICCs 细胞)时,则可能诱导其产生兴奋,从而启动逼尿肌收缩。

本研究结果提示在膀胱平滑肌肌束间和肌束内存在 c-kit 染色阳性、形态典型的 ICCs 细胞,而且在体外培养的膀胱组织细胞中亦有该类细胞,说明膀胱 ICCs 细胞可以在 SCF 刺激下于体外稳定培养。目前的各种研究方法尚不能达到满意的分离纯化 ICCs 细胞的目的,因此我们仍然采用原代混合培养的方法进行细胞功能实验。我们的研究观察到部分型态典型的细胞 C-Kit 染色阳性,但是仍不排除成纤维细胞等间质细胞的干扰。然而免疫染色后活细胞的功能会受到影响,因此我们在实验中采用的方法是根据前期染色的经验选择 ICCs 细胞,加之 ICCs 细胞有典型的自发性钙波波动的特性,是为进一步确定 ICCs 细胞的方法。在牵张负荷实验中,培养于牵张膜上的 ICCs 细胞可观察到较强的钙信号,且呈现出平滑肌细胞所不具备的钙浓度周期性波动的变化特征,表明体外培养的 ICCs 细胞的功能比较活跃。而施与牵张负荷后 ICCs 细胞表现为钙信号的明显增强,而平滑肌对牵张负荷的反应迟于 ICCs 细胞兴奋约 60 ~ 90 s,说明牵张负荷很可能先兴奋 ICCs 细胞,然后通过 ICCs 细胞分泌某些细胞因子或者神经递质兴奋平滑肌细胞。由此我们可以推测膀胱的自发性收缩和兴奋很有可能是来源于膀胱中的 ICCs 细胞,而且这种兴奋性的变化可以独立于神经系统的调节和支配。膀胱 ICCs 细胞的功能研究是我们进一步理解膀胱“肌源性”兴奋起源和机制的开端,也是更好地解释一些膀胱功能障碍性疾病新的切入点。

参考文献:

[1] Jiang H H, Song B, Lu G S, *et al*. Loss of ryanodine receptor calcium-release channel expression associated with overactive urinary bladder smooth muscle contractions in a detrusor instability model[J]. BJU Int, 2005, 96(3): 428 – 433.

[2] Metzger R, Schuster T, Till H, *et al*. Cajal-like cells in the human upper urinary tract[J]. J Urol, 2004, 172(2): 769 – 772.

[3] Hinescu M E, Ardeleanu C, Gherghiceanu M, *et al*. Interstitial Cajal-like cells in human gallbladder[J]. J Mol Histol, 2007, 38(4): 275 – 284.

[4] Popescu L M, Gherghiceanu M, Cretoiu D, *et al*. The connective connection: interstitial cells of Cajal (ICCs) and ICC-like cells establish synapses with immunoreactive cells. Electron microscope study in situ [J]. J Cell Mol Med. 2005, 9(3): 714 – 730.

[5] Yost M J, Simpson D, Wrona K, *et al*. Design and construction of a uniaxial cell stretcher [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2000, 279(6): H3124 – H3130.

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

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

[9] Exintaris B, Klemm M F, Lang R J. Spontaneous slow wave and contractile activity of the guinea pig prostate[J]. J Urol, 2002, 168(1): 315 – 322.

[10] Lang R J, Zoltkowski B Z, Hammer J M, *et al*. Electrical characterization of interstitial cells of Cajal-like cells and smooth muscle cells isolated from the mouse ureteropelvic junction[J]. J Urol, 2007, 177(4): 1573 – 1580.

[11] Wang E C, Lee J M, Johnson J P, *et al*. Hydrostatic pressure-regulated ion transport in bladder uroepithelium[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2003, 285(4): F651 – F663.

[12] Trepat X, Deng L, An S S, *et al*. Universal physical responses to stretch in the living cell[J]. Nature, 2007, 447(7144): 592 – 595.

[13] Won K J, Sanders K M, Ward S M. Interstitial cells of Cajal mediate mechanosensitive responses in the stomach[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102(41): 14913 – 14918.

（编辑　王　红）

参考文献中英文作者名的著录方法

医学期刊的论文中,引用英文文献的比例很高,但有不少作者将英、美人的姓名搞错,以至用光盘核对时出现错姓、错名或姓名全错。英、美人姓名的习惯写法是:名-名-姓,“名”可以有 1 个、2 个或 3 个,但“姓”只有 1 个。因此,从书籍或期刊中的姓名转录到文献时,要将次序调整为姓-名-名。姓是不可以简写的;“名”可以缩写,用第一个字母大写,不用缩写点。数据库在著录作者姓名时,已经调整为姓-名-名,可照录。

例如:John Quincy Public 写为 Public J Q。

本刊编辑部