论著

文章编号:1000-5404(2008)10-0900-03

体外培养豚鼠膀胱ICCs细胞表达NSE及nNOS

鄢俊安,李龙坤,宋 波,卢根生 (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 探讨体外培养豚鼠膀胱组织Cajal间质细胞(interstitial cells of Cajal, ICCs)神经元特异性烯醇酶(neurone specific enolase, NSE)及神经源性一氧化氮合酶(neuronal nitric oxide synthase, nNOS)的表达。**方法** 胶原酶消化法进行豚鼠膀胱组织ICCs细胞的原代培养,对照组为原代培养的膀胱平滑肌细胞,免疫荧光法进行c-kit及平滑肌肌动蛋白(SMA)染色,RT-PCR和Western blot法进行细胞培养后1、3 d和5 d的NSE及nNOS转录水平及蛋白水平的检测。**结果** 豚鼠膀胱ICCs细胞c-kit染色阳性,SMA染色阴性。豚鼠膀胱ICCs细胞NSE及nNOS转录及蛋白水平较高,膀胱平滑肌细胞不表达NSE及nNOS。**结论** 豚鼠膀胱ICCs培养细胞表达神经细胞特异性物质,提示豚鼠膀胱ICCs细胞参与膀胱功能调控。

关键词: 膀胱;Cajal间质细胞;神经元特异性烯醇酶;神经源性一氧化氮合酶

中图法分类号: R322.62;R329.25;R394.2 **文献标识码:** A

Expressions of NSE and nNOS of interstitial cells of Cajal *in vitro* from guinea pigs

YAN Jun-an, LI Long-kun, SONG Bo, LU Gen-sheng (Urinary Surgery Research Center, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the expression of neuron specific enolase (NSE) and neuronal nitric oxide synthase (nNOS) in the interstitial cells of Cajal (ICCs) *in vitro* from guinea pigs. Methods The ICCs of bladder were primary cultured from guinea pigs by collagenase digestion. The control group was smooth muscle cell (SMC) of bladder primary cultured from guinea pigs. The expression of c-kit and smooth muscle actin (SMA) were detected by immumofluorescence. RT-PCR and Western blotting were used to detect the mRNA level and protein content of NSE and nNOS at 1, 3 and 5 d after primary culture. Results The expression of c-kit was positive in the ICCs of bladder but negative in the control group, while the expression of SMA was negative in the ICCs of bladder but positive in the control group. Both NSE and nNOS of the ICCs of bladder were high in the mRNA and protein content, but were negative in the control group. Conclusion NSE and nNOS were expressed stably in the ICCs of bladder *in vitro*, indicating that the ICCs of bladder may be involved in the regulation of bladder function.

Key words: bladder; the interstitial cells of Cajal; neuron specific enolase; neuronal nitric oxide synthase

Cajal间质细胞(interstitial cells of Cajal, ICCs)是一种首先在胃肠道组织中发现的特殊间质细胞[1],对胃肠道基本电节律形成、神经信号传导调控及信号整合等多种生理功能起重要作用[2]。神经元特异性烯醇化酶(neurone specific enolase, NSE)是神经元和神经内分泌细胞所特有的一种酸性蛋白酶,nNOS是NO合成酶,NO是非常重要的非胆碱能、非肾上腺素能(NANC)抑制性神经递质之一,这两种生物因子在神经样细胞的研究中具有重要意义。本课题组发现在膀胱组织中存在ICCs细胞[3]。鉴于离体膀胱平滑肌条在去除了神经和体液因素干扰后,仍然可发生在应力状态下的自发性兴奋和收缩,本研究拟通过胶原酶消化法获取膀胱ICCs细胞,用免疫荧光法进行鉴定,动态观察膀胱ICCs细胞NSE及nNOS的表达变化,为探讨ICCs细胞在膀胱功能中的作用奠定基础。

基金项目: 国家自然科学基金(30772161)

Supported by the National Natural Science Foundation of China(30772161)

作者简介: 鄢俊安,男,湖北省黄石市人,博士研究生,主治医师,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)68753866

通信作者: 卢根生,电话:(023)68765841,E-mail: Lugensheng-mr@sohu.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

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。恒温细胞培养箱(Heraeus 公司),荧光显微镜(Leica 公司),胶原酶 P(Roche 公司),重组干细胞因子(SCF,R&D 公司),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(SMA,Santa Cruz 公司),兔抗鼠 NSE 抗体(Santa Cruz 公司),兔抗鼠 nNOS 抗体(Santa Cruz 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　豚鼠膀胱 ICCs 细胞原代体外培养　　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^3 的小块,0.2% 胶原酶 P 消化 30 ~ 45 min 制成细胞悬液,以细胞数10^5 ml^{-1} 接种于培养皿中并按照 50 ng/ml 加入重组 SCF,37 ℃、5% CO_2 培养箱中静置培养。

1.2.2　豚鼠膀胱平滑肌细胞体外培养　　按文献[4]方法进行。

1.3　检测指标及方法

1.3.1　培养细胞 c-kit 及 SMA 免疫荧光染色　　将培养于盖玻片上的两组细胞分别于贴壁后 3 d 用 4% 多聚甲醛固定 30 min,PBS 漂洗 3 次,每次 10 min,一抗(c-kit 及 SMA)4 ℃孵育过夜(1∶200),PBS 漂洗 3 次后加二抗(c-kit 用 FITC 标记的二抗,SMA 用 TRITC 标记的二抗)室温孵育 1 h(1∶200),PBS 漂洗 3 次,每次 10 min,显微镜下观察。

1.3.2　逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)测定 NSE 和 nNOS 转录水平　　取贴壁后 1、3、5 d 的细胞,Trizol 一步法提取细胞总 RNA,完成逆转录反应。引物序列 NSE 上游:5′-GGGACAAAC-AGCGTTACTT-3′,下游:5′-CAATGTGGCGATAGAGGG-3′,扩增片段长度 249 bp;nNOS 上游:5′-GGGGCTCAAATGGTATGG-3′,下游:5′-TCTTCTTGGCTACTTCCTCC-3′,扩增片段长度 170 bp;β-actin 上游:5′-CTGAGAGGGAAATCGTGCGT-3′,下游:5′-CG-GACTCATCGTACTCCTGCTTG-3′,扩增片段长度 486 bp。

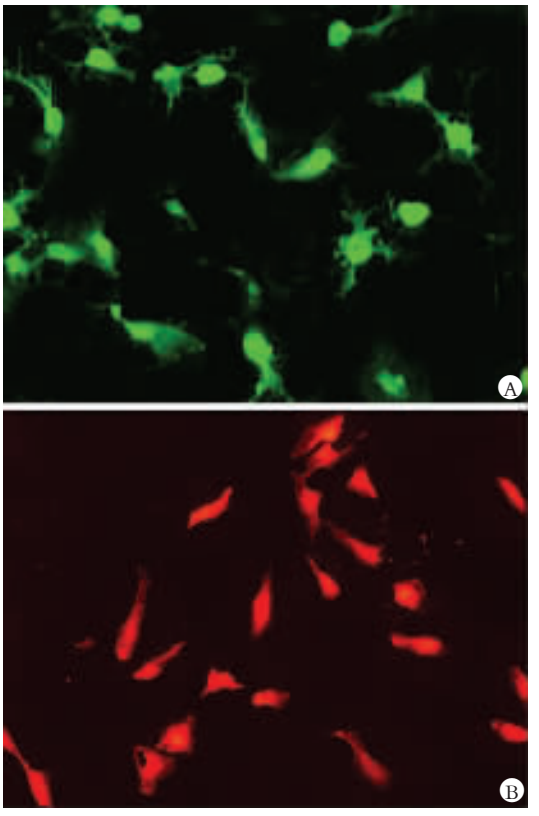
PCR 扩增:将反转录合成的 cDNA 再加入 5 × RT Buffer 1 μl,TaKaRa Ex *Taq* HS 0.25 μl,上游引物 0.5 μl,下游引物 0.5 μl,RNase Free dH_2O 至总体积 50 μl,94 ℃预变性 2 min,94 ℃ 变性 30 min,退火 30 min(NSE 56.3 ℃,nNOS 58.2 ℃),72 ℃延伸 40 min,进行 30 个循环,最后 72℃再延伸 5 min。2% 琼脂糖凝胶电泳,对扩增产物条带进行扫描,Quantity One 软件分析积分光密度,以 NSE/β-actin 和 nNOS/β-actin 值作为 NSE mRNA 和 nNOS mRNA 表达的相对含量。

1.3.3　Western blot 检测 NSE 和 nNOS 蛋白水平　　取贴壁后 1、3、5 d 的细胞,常规法提取培养细胞总蛋白,Lowry 法检测蛋白浓度,取 10 μg 的蛋白,用 10% 聚丙烯酰胺胶作 SDS-PAGE,常规法做免疫印迹分析,含 5% 脱脂奶粉的 TTBS 缓冲液封闭,NSE 和 nNOS 抗体(1∶2 000)、二抗(1∶5 000)分别与膜孵育,发光法显色,扫描条带,用 Quantity One 软件测定目的条带积分光密度,将 5 次实验结果的平均值作为蛋白含量的相对值。

2　结果

2.1　培养细胞 c-kit 及 SMA 免疫荧光染色结果

胶原酶消化后 ICCs 细胞于 1 d 内贴壁生长,细胞呈长梭形或纺锤形,可见分枝突起,排列不规则,与平滑肌细胞有明显区别。豚鼠膀胱 ICCs 细胞 c-kit 染色阳性,SMA 染色阴性,膀胱平滑肌细胞 c-kit 染色阴性,SMA 染色阳性。见图 1。



A:ICCs 组 c-kit 阳性;B:平滑肌细胞组 SMA 阳性

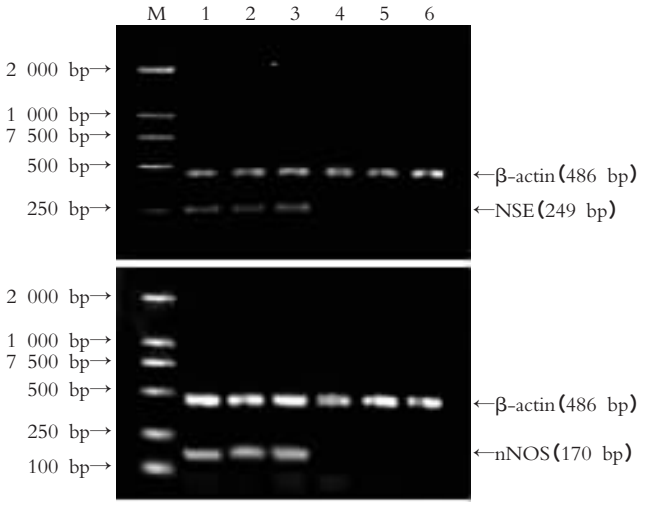
图 1　培养细胞 c-kit 及 SMA 免疫荧光染色观察　(×400)

2.2　培养细胞 NSE 和 nNOS RT-PCR 检测结果

ICCs 组 1、3 d 和 5 d NSE 积分光密度与 β-actin 积分光密度比值为(0.512 ± 0.042)、(0.545 ± 0.048)和(0.563 ± 0.044),平滑肌细胞组未见阳性结果。ICCs 组 1、3 d 和 5 d nNOS 积分光密度与 β-actin 积分光密度比值为(0.613 ± 0.051)、(0.654 ± 0.050)和(0.633 ± 0.048),平滑肌细胞组未见阳性结果。见图 2。

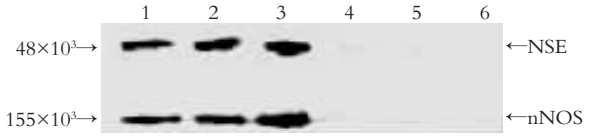
2.3　培养细胞 NSE 和 nNOS 蛋白水平 Western blot 检测结果

ICCs 组 1、3 d 和 5 d NSE 积分光密度为(65 423 ± 5 545)、(75 856 ± 6 432)和(87 996 ± 5 178),平滑肌细胞组未见阳性结果;ICCs 组 1、3 d 和 5 d nNOS 积分光密度为(71 658 ± 5 845)、(74 885 ± 6 156)和(89 757 ± 6 255),平滑肌细胞组未见阳性结果。见图 3。



M：DNA 标准(DL 2000)；1～3：ICCs 组 1、3、5 d；4～6：平滑肌细胞组 1、3、5 d

图 2 培养细胞 mRNA 水平检测结果



1～3：ICCs 组 1、3、5 d；4～6：平滑肌细胞组 1、3、5 d

图 3 培养细胞 Western blot 检测结果

3 讨论

研究表明，ICCs 细胞参与胃肠道慢波起搏信号的生成与传播，同时介导神经信号向平滑肌细胞的传送，对胃肠动力学有重要调控作用[5]。泌尿系器官特别是膀胱组织属于平滑肌器官，也存在 ICCs 细胞[6]。本课题组前期进行豚鼠膀胱 ICCs 细胞的体外培养，观察到体外培养的膀胱 ICCs 细胞呈长梭形或纺锤形，可见分枝突起，排列不规则。c-kit 是位于细胞质膜上的酪氨酸激酶生长因子受体(Tyrosine kinase growth factor receptor)，表达于 ICCs 细胞，在平滑肌细胞上不表达[7]。本研究中，豚鼠膀胱 ICCs 细胞c-kit 染色阳性，SMA 染色阴性，说明所获取的培养细胞是 ICCs 细胞。

NSE 是糖酵解途径中的关键催化酶，主要分布于中枢神经及末梢神经组织内，具有较高的特异性，很少表达于神经以外的其他正常组织，在一些肿瘤组织中有丰富表达[8-11]。本研究中培养的豚鼠膀胱 ICCs 细胞具有 NSE 表达特性，提示豚鼠膀胱 ICCs 细胞是一种神经样细胞，具有参与神经信号传递的作用。膀胱平滑肌细胞不表达 NSE，表明膀胱平滑肌细胞不具备神经样细胞的特征，而是一种效应细胞。nNOS 是 NOS 中的一种，主要存在于神经细胞中，eNOS 存在于内皮细胞中，iNOS 广泛存在于多种细胞中。脑组织表达 nNOS，nNOS 阳性细胞散在于脑实质及血管周围[12]。本研究中豚鼠膀胱 ICCs 细胞 nNOS 转录及蛋白水平均较高，说明豚鼠膀胱 ICCs 细胞具有神经组织类细胞特性。

关于豚鼠膀胱 ICCs 细胞还有大量内容需要去研究，如豚鼠 ICCs 细胞的电生理特性，ICCs 细胞与平滑肌细胞的关系，ICCs 细胞在张力性膀胱中的变化及作用等，这些问题的解决对于膀胱功能障碍相关性疾病研究具有重要意义。

参考文献：

[1] 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.

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

[3] 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.

[4] 周逢海，王养民，宋 波，等. 膀胱逼尿肌细胞的培养及鉴定[J]. 西北国防医学杂志, 2006, 27(1): 5-7.

[5] Lee H T, Hennig G W, Fleming N W, *et al*. The mechanism and spread of pacemaker activity through myenteric interstitial cells of Cajal in human small intestine[J]. Gastroenterology, 2007, 132(5): 1852-1865.

[6] 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.

[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] Celtik C, Acunas B, Oner N, *et al*. Neuron-specific enolase as a marker of the severity and outcome of hypoxic ischemic encephalopathy [J]. Brain Dev, 2004, 26(6): 398-402.

[9] Oh S H, Lee J G, Na S J, *et al*. Prediction of early clinical severity and extent of neuronal damage in anterior-circulation infarction using the initial serum neuron-specific enolase level [J]. Arch Neurol, 2003, 60(1): 37-41.

[10] Ge Y L, Lv R, Zhou W, *et al*. Brain damage following severe acute normovolemic hemodilution in combination with controlled hypotension in rats[J]. Acta Anaesthesiol Scand, 2007, 51(10): 1331-1337.

[11] 王德林，米 粲，陈在贤，等. 肾癌组织中 NF-kB 信号分子的表达及 As2O3 对人肾癌 786-O 细胞中 NF-kB 信号通路影响的研究[J]. 重庆医科大学学报, 2007, 32(3): 253-256.

[12] Zhang P, Liu Y, Li J, *et al*. Cell proliferation in ependymal/subventricular zone and nNOS expression following focal cerebral ischemia in adult rats[J]. Neurol Res, 2006, 28(1): 91-96.

(编辑 王 红)