论著

文章编号:1000-5404(2008)12-1118-04

膀胱 Cajal 间质细胞对膀胱逼尿肌细胞兴奋调控的结构和功能特征的初步研究

丁砺鑫,方 强,封建立,宋 波 (第三军医大学全军泌尿外科研究所,重庆 400038)

摘 要:目的 探讨膀胱 Cajal 细胞(ICC 细胞)在逼尿肌细胞兴奋调控中所起的作用。**方法** ①透射电镜观察 ICC 细胞和逼尿肌细胞之间的超微结构联系;②以荧光光漂白恢复(FRAP)对相邻的 ICC 细胞和逼尿肌细胞进行检测,观察 ICC 细胞和相邻逼尿肌细胞之间的荧光强度的变化。**结果** ①超微结构可见 ICC 细胞和逼尿肌细胞之间有缝隙连接;②对与单个 ICC 细胞相邻的逼尿肌细胞进行荧光漂白后,可发现逼尿肌细胞内的荧光强度有显著恢复($P<0.01$),同时 ICC 细胞的荧光强度逐渐减弱,说明 ICC 细胞与逼尿肌细胞间有信号通讯的通路。**结论** ①ICC 细胞与逼尿肌细胞之间存在结构上联系;②ICC 细胞可以将兴奋信号传递给周围的逼尿肌细胞。

关键词: ICC 细胞;荧光漂白(FRAP);膀胱逼尿肌

中图法分类号: R322.62;R329.27;R337.5 **文献标识码:** A

Interstitial cells of Cajal regulates excitability of detrusor myocytes: structure evidence

DING Li-li, FANG Qiang, FENG Jian-li, SONG Bo (Urinary Surgery Research Institute, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the role of bladder interstitial cells of Cajal (ICCs) in regulating the excitability of detrusor myocytes. Methods 1) Ultrastructural connection between ICCs and detrusor myocytes was detected by transmission electron microscope (TEM). 2) Fluorescence redistribution after photobleaching (FRAP) was carried out to detect the intercellular communication between detrusor myocytes and its neighboring ICCs. Results 1) Gap junction between the 2 kinds of cells was confirmed by TEM. 2) After target detrusor myocyte was photobleached, fluorescence intensity in detrusor myocytes was recovered gradually. In the meantime, fluorescence intensity in the ICCs neighboring to the target detrusor myocyte was decreased. This indicates a signal transmission from the neighboring ICCs to the target detrusor myocyte. Conclusion Structural connection is seen between ICCs and detrusor myocytes. Excitability signals might be transferred from ICCs to detrusor myocyte.

Key words: interstitial cells of Cajal; fluorescence redistribution after photobleaching; detrusor myocyte

离体膀胱组织在一定张力作用下可产生自发收缩,这种收缩不能被神经阻滞剂所去除[1],说明膀胱组织表现出一定的自律性。进一步研究表明,膀胱肌层内存在大量的 Cajal 细胞(ICC 细胞),膜片钳观测到该细胞具有自发性电位,免疫组化显示细胞膜上存在 HCN 离子通道[2],体外细胞实验证实,ICC 细胞被阻断后逼尿肌细胞的收缩受到明显抑制[3]。在胃肠道这种特殊的间质细胞发动基本电节律和慢波,被认为是胃肠道运动的起搏细胞[4],这提示我们 ICC 细胞可能也是膀胱运动的起搏细胞。

既然 ICC 细胞可能作为膀胱逼尿肌兴奋收缩的"发动者"存在,那么广泛存在的 ICC 细胞网络与逼尿肌系统之间在逻辑上应该存在一种兴奋传递关系,使 ICC 细胞网络的兴奋能够迅速有效地传递到逼尿肌系统,导致膀胱的兴奋收缩,使之真正起到起搏的作用。

本研究拟从结构和功能两方面研究,首先探讨 ICC 细胞与逼尿肌细胞在超微结构上的联系,其次利用荧光漂白技术模拟信号从 ICC 细胞传递到逼尿肌细胞的过程,说明 ICC 细胞与逼尿肌细胞之间的信号交流,从而进一步深入阐明膀胱运动的生理。

1 材料与方法

1.1 实验动物

清洁级 SD 大鼠(第三军医大学实验动物中心)40 只,体质量 180~250 g,雌雄不限。无菌条件下取膀胱供细胞培养使用。

基金项目: 国家自然科学基金(30700270)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30700270)

作者简介: 丁砺鑫,男,安徽省怀宁县人,博士研究生,主治医师,主要从事膀胱功能障碍方面的研究。电话:(023)68754832,E-mail: ding@mail.tmmu.com.cn

通信作者: 宋 波,电话:(023)68754332

收稿日期: 2007-12-05;**修回日期:** 2008-01-11

1.2　主要试剂

6-碳氧荧光素醋酸盐(6-carboxvfluoresceindiaeetate,6-CF-DA,Molecular Probe Inc. MW460.4),溶于二甲亚砜(DMSO)中配成 1 mg/ml 储备液,－20 ℃贮存。负载时用 PBS 液稀释成 10 μg/ml 的应用液。DMEM、胎牛血清(Gibco 公司),分装后于－70 ℃保存备用。山羊抗大鼠 c-Kit 单抗(1∶100,Santa Cruz 公司),兔抗大鼠 α-actin 单抗(1∶100,Sigma 公司),FITC 标记小鼠抗山羊抗体、罗丹明标记山羊抗兔抗体(1∶200,北京中杉公司分装),DAPI(0.1 μg/ml, DAKO)。

1.3　共聚焦显微镜

激光扫描共聚焦显微成像仪(Leica TCSNT,德国):具备 FRAP 技术要求的所有硬件设备,包括:Ar-laser488 nm、发射(阻挡)滤片 513 nm、DSP(digital signal processor)和 AOTFs(acousto-optic tunable filters)。AOTFs 不仅提供激光强度的准确控制,而且可以以针点(Pin-point)精度,保证激光束在特定位点的准确开(关)。因此,在 FRAP 分析中可以准确控制感兴趣区域(regions of interest,ROI)细胞的荧光漂白程度,而相邻区域细胞不产生任何程度的荧光淬灭。在 Image Browser 窗口,由 Leica TCS image Examiner(ROI mean 功能)完成 ROI(或选择的漂白细胞)和相邻未漂白细胞,在不同时间序列扫描中的荧光强度均值,并得出相应的时间－荧光强度变化趋势图。该仪器还可以对活细胞的荧光强度实时定量检测,包括:5 W 的氩离子激光器,可以激发紫外光和可见光;声光调制器 AOM,用于控制激光的脉冲强度和时间;OLYMPUS 倒置显微镜;X-Y 轴扫描载物台;Z 轴步进马达控制器;冷电耦合器件(cCCD)摄取荧光图成像;光电倍增管 PMT 用于检测荧光信号;专用的计算机用于处理数据;SONY 监视器用于显示图像。

1.4　透射电镜

大鼠麻醉后经左心室灌注电镜固定液(1% 多聚甲醛,2.5% 戊二醛),膀胱组织冠状切片,于电镜固定液中固定24 h,按常规方法锇酸固定染色,在 Tecnai 10(荷兰 Philips)型透射电镜下观察。

1.5　细胞培养

膀胱逼尿肌新鲜组织块来源正常大鼠膀胱,在无菌条件下手术切取膀胱,用灭菌生理盐水冲洗膀胱血迹后,剔除浆膜和黏膜组织,剪成 0.5 mm×0.5 mm×0.5 mm 大小,在 4 ℃条件下Ⅳ型胶原酶消化 12 h,用含 15% 胎牛血清的 DMEM 培养液,于 5% CO_2、37 ℃条件下常规培养。

1.6　免疫荧光染色鉴定

细胞经 0.01 mol/L 的 PBS 充分漂洗后,0.03% H_2O_2/甲醇封闭内源性过氧化物酶 20 min(25 ℃),1% BSA 孵育 30 min 后加入 c-Kit 单抗 4 ℃过夜,FITC 标记小鼠抗山羊抗体 25 ℃ 60 min。漂洗 3 次,每次 5 min,最后 DAPI 复染细胞核后甘油封片,共聚焦显微镜观察,ICC 细胞呈绿色荧光。逼尿肌细胞染色鉴定一抗为 α-actin 单抗、二抗为罗丹明标记抗兔抗体,操作步骤相同,逼尿肌细胞共聚焦显微镜下为红色荧光。

1.7　荧光漂白实验(FRAP)

取出细胞 40% ~50% 贴壁生长的圆形盖玻片,先用 PBS 液清洗 2 次,再加入 10 μg/ml 的 6-CFDA 0.3 ~0.5 ml,37 ℃,5% CO_2 孵箱中孵育 20 ~25 min,取出后用 PBS 液洗去 6-CFDA,然后再加少量 PBS,置于共聚焦显微镜下观测。6-CFDA 很容易通过细胞膜,并在细胞内被多种非特异性酯酶分解成代谢产物 6-碳氧荧光素(6-CF),带电荷的 6-CF 不能通过细胞膜,但很容易通过缝隙联结在细胞之间扩散。6-CF 激发光波长为490 nm,发射光波长为 518 nm。

镜下首先寻找细胞数量比较合适,有单独存在的 ICC 细胞和逼尿肌细胞的区域,这样在研究 ICC 细胞和逼尿肌细胞之间的信号通讯时可以避免其他细胞的影响,结果更为真实可靠。其次选择 3 种细胞:第 1 种是需要荧光漂白的目标逼尿肌细胞,我们观察它被高强度激光漂白后荧光是否有恢复,第 2 种是与漂白逼尿肌相邻且有接触的 ICC 细胞,我们观察在目标逼尿肌细胞的荧光减弱了之后,它的荧光强度是否有变化。因为它不经过荧光漂白,且只可能与目标逼尿肌细胞有信号交通,所以 ICC 细胞荧光强度的减少可以提示我们细胞间信号通讯的存在。第 3 种是孤立细胞,它与其他细胞分离,根本不与任何细胞有任何的连接,作为对照。为了保证细胞活力,所有实验必须在 40 min 内结束。

调试仪器参数,选择好检测细胞,以高强度激光对目标逼尿肌细胞进行漂白,每间隔 5 s 检测收集一次荧光强度变化的数据,共收集 240 s,在电脑上自动生成荧光强度-时间拟合曲线。

1.8　统计学分析

结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 12.0 统计软件进行 t 检验。

2　结果

2.1　ICC 细胞与逼尿肌细胞超微结构上的联系

ICC 细胞超微结构上有如下特征:①胞质和突起内含丰富的线粒体、核糖体;②有胞膜小凹,胞膜不完整;③有较多中间丝,无粗肌丝;④非常接近三级神经束等[5,6],根据此特点我们在透射电镜下找到 ICC 细胞。镜下观察可见,逼尿肌细胞和 ICC 细胞组织结构清晰,二者的细胞膜之间相邻,且形成了缝隙连接的结构。这说明,在结构上逼尿肌细胞和 ICC 细胞之间存在着直接的联系,这也是细胞间信号可能得以传递的基础,见图 1。

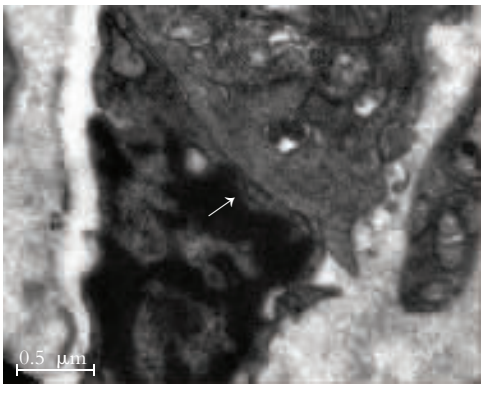


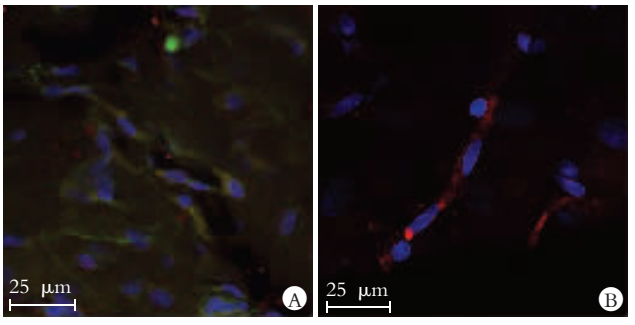
图 1　透射电镜下 ICC 细胞与逼尿肌细胞的缝隙连接(箭头示)

2.2　细胞混合培养及 ICC 细胞的鉴定

2.2.1　细胞生长形态　　培养细胞置于倒置显微镜下观察,培养 24 h 后细胞已开始贴附在瓶底,呈条梭状或短棒状,3 ~4 d 后可以看到混合细胞表现出明显不同的形态:逼尿肌细胞

表现为梭形或不规则形，而 ICC 细胞的形态为核大，细胞质少，细长且常具有多个突起。两种细胞镜下形态有很大差别。

2.2.2　细胞的免疫荧光鉴定　　ICC 细胞 c-Kit 免疫荧光染色，共聚焦显微镜下可见的细胞呈 FITC 绿色荧光；逼尿肌细胞 α-actin 染色可见细胞呈罗丹明的红色荧光，见图 2。



A：ICC 细胞；B：逼尿肌细胞

图 2　ICC 细胞、逼尿肌细胞的免疫荧光鉴定　ICC 细胞绿色荧光，逼尿肌细胞红色荧光

2.3　荧光漂白恢复实验

混合培养的细胞都被荧光标记，通过细胞形态可以分辨出典型的 ICC 细胞和逼尿肌细胞。在视野中找到单个 ICC 细胞和单个逼尿肌相邻且有接触的区域，用激光漂白逼尿肌细胞（细胞 1），记录该细胞和相邻的 ICC 细胞（细胞 2）漂白后 0、10、20 s 的荧光强度的变化，选择孤立细胞（细胞 3）作为背景对照，见图 3。实验结果显示，逼尿肌细胞在漂白的瞬间荧光迅速减弱，随着时间推移，荧光逐渐有明显恢复；相邻的 ICC 细胞的荧光强度在激光漂白逼尿肌细胞瞬间基本保持，而随着时间推移，在逼尿肌细胞荧光逐渐恢复的同时，ICC 细胞的荧光强度却逐渐减弱，孤立细胞在整个荧光漂白恢复过程中荧光强度几乎不变。这说明荧光染料通过细胞间的连接从 ICC 细胞传递给了逼尿肌细胞。

240 s 后对各组细胞荧光强度的变化分析，取 1 min 平均值，可以发现，与对照组（孤立细胞）相比，ICC 组细胞的平均荧光强度恢复率显著降低（$P<0.05$），而逼尿肌细胞组的平均荧光强度的恢复率显著增高（$P<0.01$，表 1）。

表 1　细胞平均荧光强度恢复率的比较组别

组别	例数	平均荧光强度恢复率（/min）
ICC 组	45	-25.72 ± 0.19^{a}
逼尿肌细胞组	45	32.88 ± 0.29^{b}
对照组（孤立细胞）	45	5.00 ± 0.31

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与对照组比较

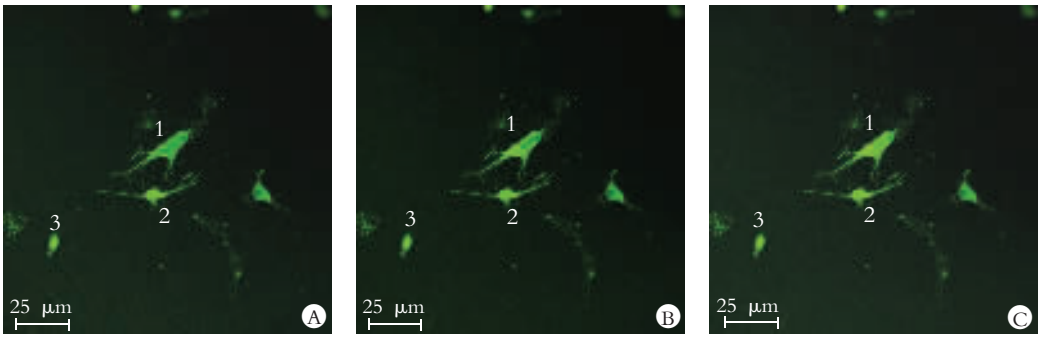
3　讨论

膀胱 ICC 细胞被认为是膀胱运动的起搏细胞，但是关于它是如何起到启动膀胱逼尿肌细胞兴奋的，研究并不充分。以往的形态学研究发现膀胱 ICC 细胞与逼尿肌细胞之间细胞相互缠绕[7]，这说明二者之间形态学上是很有可能发现电信号通讯结构的。

缝隙连接（gap junction，GJ）又称“电突触”，是细胞间电信号通讯的结构基础。GJ 是位于细胞膜上的蛋白通道结构，由六聚体蛋白亚单位及缝隙连接蛋白相互嵌合而成。它为相邻细胞缝隙连接通讯提供低阻力通道，从而实现细胞间的信息和能量交换传递[8]。细胞间存在 GJ 说明它们之间有信号通讯的能力。

荧光漂白技术（FRAP）是研究细胞之间信号通讯的成熟方法。FRAP 是将待测细胞从表面用荧光物标记，根据被漂白细胞内荧光强度恢复程度对细胞间缝隙连接进行评估。由于光漂白过程是不可逆的，荧光恢复过程可完全准确地反映荧光标记物的运动。还可以用计算机精确控制淬灭激光脉冲强度的时间，对细胞内荧光强度进行定时定量监测。所用的荧光染料 6-CFDA 对细胞无毒性，并有较强的膜通透性，它本身不发荧光，进入细胞后被多种非特异性酯酶分解成代谢产物 6-CF，带电荷的水解产物可被 488 nm 的激光激发出黄绿色荧光，且无膜通透性，因此荧光物质进入细胞后无法通过细胞膜出来，即只有通过细胞间缝隙连接通道才能相互交换。因此，FRAP 方法可研究细胞之间是否存在 GJ，并且可以细胞间的信号通讯进行直观的观察[9]。

本实验首先通过透射电镜从超微结构上发现了 ICC 细胞与逼尿肌细胞之间具有缝隙连接的结构；其次，建立了 ICC 细胞与逼尿肌细胞混合培养的细胞模型，在此基础上对逼尿肌细胞和与之相连的 ICC 细胞进行 FRAP 实验，发现荧光染料从 ICC 细胞传递给了相邻的逼尿肌细胞，又从功能上说明 ICC 细胞与逼尿肌细胞之间是可以发生细胞间信号通讯的。正是因为



A：漂白后 0 s；B：漂白后 10 s；C：漂白后 20 s；1：逼尿肌细胞；2：ICC 细胞；3：孤立细胞

图 3　FRAP 观察 ICC 细胞和逼尿肌细胞之间的信号通讯

有这样的结构和功能基础，ICC 细胞一旦兴奋，就可以通过缝隙连接把信号迅速有效地传递给逼尿肌细胞，进而引起膀胱组织的兴奋收缩，从而起到了“起搏细胞”的作用。

参考文献：

[1] Hashitani H, Brading A F, Suzuki H. Correlation between spontaneous electrical, calcium and mechanical activity in detrusor smooth muscle of the guinea-pig bladder[J]. Br J Pharmacol, 2004, 141(1): 183 – 193.

[2] 丁砺鑫, 王永权, 方　强, 等. 大鼠不稳定膀胱中 ICC 细胞 HCN 蛋白表达[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(7): 578 – 581.

[3] Sui G P, Wu C, Fry C H. The electrophysiological properties of cultured and freshly isolated detrusor smooth muscle cells[J]. J Urol, 2001, 165(2): 627 – 632.

[4] McHale N, Hollywood M, Sergeant G, *et al*. Origin of spontaneous rhythmicity in smooth muscle[J]. J Physiol, 2006, 570(Pt 1): 23 – 28.

[5] Reynhout J K, Duke G E. Identification of interstitial cells of cajal in the digestive tract of turkeys (Meleagris gallopavo) [J]. J Exp Zool, 1999, 283(4 – 5): 426 – 440.

[6] Horiguchi K, Komuro T. Ultrastructural characterization of interstitial cells of Cajal in the rat small intestine using control and Ws/Ws mutant rats[J]. Cell Tissue Res, 1998, 293(2): 277 – 284.

[7] Gillespie J I, Harvey I J, Drake M J. Agonist- and nerve-induced phasic activity in the isolated whole bladder of the guinea pig: evidence for two types of bladder activity[J]. Exp Physiol, 2003, 88(3): 343 – 357.

[8] Hashitani H, Fukuta H, Takano H, *et al*. Origin and propagation of spontaneous excitation in smooth muscle of the guinea-pig urinary bladder[J]. J Physiol, 2001, 530(Pt 2): 273 – 286.

[9] Drake M J, Harvey I J, Gillespie J I. Autonomous activity in the isolated guinea pig bladder[J]. Exp Physiol, 2003, 88(1): 19 – 30.

（编辑　王　红）

（上接 1117 页）

够，我们对除头颅及手、足以外骨骼进行细分。每块骨骼外轮廓模型以独立 STL 文件存档及导出，每块骨骼用不同颜色显示，初步建立起全身骨骼数据库。

1.5　数字模型的输出

数字模型各组件可输出用作 CAD（计算机辅助设计）、RP（快速成型）及 FEA（有限元分析）研究。

2　结果

建立“中国数字人女 1 号”全身骨骼系统三维数字模型（图 1），实现单块骨骼单独与组合显示（图 2）。

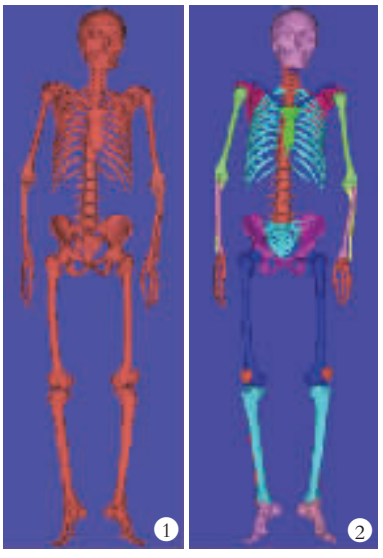


图 1　全身骨骼系统重建模型正面观

图 2　全身骨骼系统重建模型组合正面观

数字模型输出 IGES 格式用作 CAD、CAE，STL 格式用于 RP、CAM，面单元或面网格转化成体单元用作 FEA 研究。以腰椎 L_5 三维模型为例，输出 .out 后缀名 Patran neutral 文件，在 MSC. AFEA 2005 成功建立 56 573 个四面体单元实体网格（图 3）。

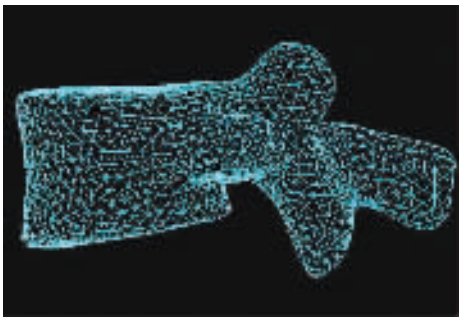


图 3　腰椎 L_5 骨骼有限元网格侧面观

3　讨论

全身数字化骨骼模型精度最高是 VIP-MAN[1]。国内学者建立高精度骨骼系统模型计算机为浪潮天梭 10 000 高性能计算集群，17 个计算节点，每个节点配 2 个 Intel Xeon 2.4 GHz CPU。装备超高级计算机费用巨大[2]，势将影响这项科技成果广泛应用。本研究对“中国数字人女 1 号”CT 断层图像在家用娱乐级个人计算机上重建和显示人体全身骨骼系统三维图像，数字模型几何外型逼真，具有较佳视觉效果，可以多彩色、透明或任意组合显示，实体感强。能够任意角度旋转及缩放观察，可供三维可视化及进一步生物力学研究。

考虑到“中国数字人女 1 号”CT 数据是 4 层螺旋 CT 机分 7 序列扫描采集，对骨骼局部细节显示不够，重建要对三维模型进行立体配对，我们没有对全部骨骼进行细分。下一步工作准备以 64 层螺旋 CT 采集全身骨骼数据。

关键词：CT 图像；中国数字人；骨骼；数字模型

中图法分类号：R318　　**文献标识码**：B

参考文献：

[1] Xu X G, Chao T C, Bozkurt A. VIP-Man: an image-based whole-body adult male model constructed from color photographs of the Visible Human Project for multi-particle Monte Carlo calculations[J]. Health Phys, 2000, 78(5): 476 – 486.

[2] 李安安, 刘　谦, 龚　辉, 等. “虚拟中国人男性一号”高精度骨骼系统的三维建模[J]. 中国临床解剖学杂志, 2006, 24(3): 292 – 294, 307.

（编辑　汪勤俭）