文章编号:1000-5404(2009)06-0495-03

论著

ICC样细胞在正常豚鼠上尿路的分布及对平滑肌收缩的影响

钟 晓,李为兵,方 强,宋 波 (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 研究正常豚鼠上尿路不同部位起搏细胞(interstitial cells of Cajal, ICCs)的分布及其对局部平滑肌收缩的影响。**方法** 取10只豚鼠分别取肾盂输尿管交界处、上、中、下段输尿管组织,经全层铺片处理后,行ICCs特异性标志物KIT免疫荧光染色,对各段组织进行细胞计数,单因素方差分析各段ICCs的分布及其差异;再于上述部位(除输尿管壁内段外)分别剪取2 mm×6 mm肌条进行张力测定实验,比较各部位肌条收缩频率及幅度的变化,分析其与ICCs密度变化的相关性。**结果** KIT染色阳性、形态与胃肠道起搏细胞ICCs相似的细胞(ICCs样细胞)存在于豚鼠上尿路的各段中,上尿路ICC样细胞密度在肾盂肾盏交界处、输尿管上、中、下段分别为(5.20±0.98)、(3.90±0.98)、(3.03±0.98)、(2.50±0.81)个/视野;各部位肌条收缩频率及幅度不同,但肾盂输尿管交界处、输尿管上段的肌条收缩频率及幅度较输尿管中段和下段明显增大,差异显著($P<0.05$),输尿管中段和下段之间没有显著区别($P>0.05$);相关性分析结果表明局部平滑肌肌条收缩频率和幅度与ICCs密度呈显著正相关性($P<0.05$)。**结论** 豚鼠上尿路平滑肌中存在ICCs,肾盂输尿管各部位ICCs的分布有显著差异,其与上尿路平滑肌局部肌条收缩有密切关系。

关键词:Cajal间质细胞;c-kit受体;上尿路
中图法分类号:R329.24;R334.2;R337.2 **文献标识码**:A

Distribution of interstitial cells of Cajal in normal guinea pig upper urinary tract and its effect on smooth muscle contraction

ZHONG Xiao, LI Wei-bing, FANG Qiang, SONG Bo (Urinary Surgery Research Institute, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the distribution of interstitial cells of Cajal (ICCs) —the pacemaker cells of the gut in the different parts of guinea pig pyeloureteral tract and explore the effect on the contraction of smooth muscle. **Methods** The ureteropelvic junction, upper ureteral, middle ureteral, lower ureteral tissues harvested from 10 guinea pigs were performed KIT immunofluorescent staining in stretched preparations. Smooth muscle strips of 2 mm×6 mm were dissected from the sites for tone determination. The frequency and amplitude of the smooth muscle were compared among different sites of pyeloureteral tract. **Results** Cells with positive staining by KIT and with similar morphology to ICCs were found in the entire pyeloureteral tract of guinea pigs. The density of ICCs-like cells in the ureteropelvic junction, upper ureteral, middle ureteral, and lower ureteral tissues were (5.20±0.98), (3.90±0.98), (3.03±0.98) and (2.50±0.81) respectively. The contraction of strips in different sites varied according to the distribution of ICCs. The amplitude and frequency of strips from the ureteropelvic junction and upper ureteral were significantly higher than those from middle ureteral and lower ureteral ($P<0.05$). The contraction amplitude and frequency of strips were positively correlated with the number of ICCs ($P<0.05$). **Conclusion** ICCs is unevenly distributed in the upper ureteral tract of guinea pig. The contraction amplitude and frequency of smooth muscle strips are correlated with the number of ICCs in different of sites of pyeloureteral tract.

Key words: interstitial cells of Cajal; c-kit receptor; upper urinary tract

输尿管具有不受神经、体液调节的自发兴奋性[1],这种自发兴奋性是输尿管蠕动输送尿液的基础。近年来在多种动物及人类尿路中发现的一类KIT免疫染色阳性的细胞,因形态和功能类似胃肠道Cajal细胞,被推测为泌尿道的起搏细胞(interstitial cells of

基金项目:国家自然科学基金(30670776)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30670776)
作者简介:钟 晓,男,广东省新会市人,硕士研究生,主要从事上尿路功能障碍方面的研究。电话:(023)68755033,E-mail: mauricezx@sohu.com
通信作者:李为兵,电话:(023)68765347,E-mail:liweibing63@yahoo.com.cn
收稿日期:2008-08-04;**修回日期**:2008-12-11

Cajal, ICCs)[2],为我们研究尿路的兴奋起源提供了新的探索方向。我们的前期研究证实豚鼠上尿路平滑肌中存在 ICCs 细胞[3]。在此基础上,本研究拟探讨 ICCs 细胞在豚鼠上尿路的分布情况、局部平滑肌肌条收缩特性与 ICCs 细胞关系,进而探讨豚鼠上尿路局部兴奋特点及可能的兴奋起源部位。

1 材料与方法

1.1 实验对象

取材自 10~12 周龄健康雌性哈德莱豚鼠 10 只,体质量 400~450 g,购自第三军医大学西南医院实验动物中心。

1.2 实验方法

1.2.1 ICC 样细胞在豚鼠上尿路的分布密度

1.2.1.1 全层铺片 豚鼠以 20% 乌拉坦(0.1 ml/kg)麻醉后,将左侧输尿管用硬膜外导管灌注 4% 多聚甲醛使输尿管膨胀,导管退出后在输尿管远段打结,浸入 4% 多聚甲醛 4 ℃冰箱固定过夜。0.1 mol/L PBS 脱水 12 h,分别取肾盂输尿管交界处、输尿管上、中、下段剪切成 0.2 cm×0.6 cm 大小(输尿管上段为距肾盂输尿管交界处 0.5 cm,下段为距膀胱 0.5 cm,中段为 2 者正中),最后用眼科镊小心撕去浆膜和黏膜层制成铺片备用。

1.2.1.2 免疫荧光细胞化学染色法 染色方法为间接荧光标记抗体法。铺片经 1% BSA 及 0.05% TritonX-100 孵育 90 min,去除特异性染色后加入 KIT 山羊抗鼠多克隆抗体(sc-1494,1∶100,美国 Santa Cruz 公司),4 ℃ 48 h 孵育,FITC 标记的兔抗山羊 IgG 抗体(1∶100,北京中杉金桥公司) 25 ℃ 90 min 孵育,DAPI(碧云天公司)细胞核染色 10 min,最后甘油封片剂封片。各步骤间用 0.01 mol/L PBS 漂洗 3 次,每次 5 min。阴性对照采用 0.01 mol/L PBS 代替一抗。阳性对照采用豚鼠十二直肠上段,染色方法同上。组织片最后采用德国 Leica TCS SP5 激光共聚焦显微镜观察,ICC 样细胞显绿色荧光,激发光波长为 488 nm,每个组织在 200 倍视野下采 3 张图片,结合 ICC 样细胞形态学特征行细胞计数。

1.2.2 上尿路平滑肌肌条收缩实验 取其中 4 只豚鼠,检测豚鼠上尿路正常平滑肌肌条收缩特性。麻醉同上,打开豚鼠腹腔找到并分离出输尿管,用眼科器械依次于输尿管的肾盂输尿管交界处、输尿管上段、中段以及下段分别剪取 0.2 cm×0.6 cm 肌条,放于 38 ℃ Krebs 溶液中平衡 30 min 备用。将张力换能器与计算机及 RM6240 生理信息信号采集系统相连接;配制好的 Krebs 溶液加入平滑肌浴槽内,通以 95% 的 O_2 和 5% 的 CO_2 并加热温度至 38 ℃保持。用微量位移器将张力换能器固定于万能支架上;将平衡后的肌条一端用丝线固定于平滑肌槽的底部,另一端悬挂于张力换能器;调节微量位移器,给肌条逐步增加张力至 0.3 g;分析肌条的收缩的频率及幅度[4]。每根肌条检测 10 min,检测结果取其中 5 min 的平均值。

1.3 统计学方法

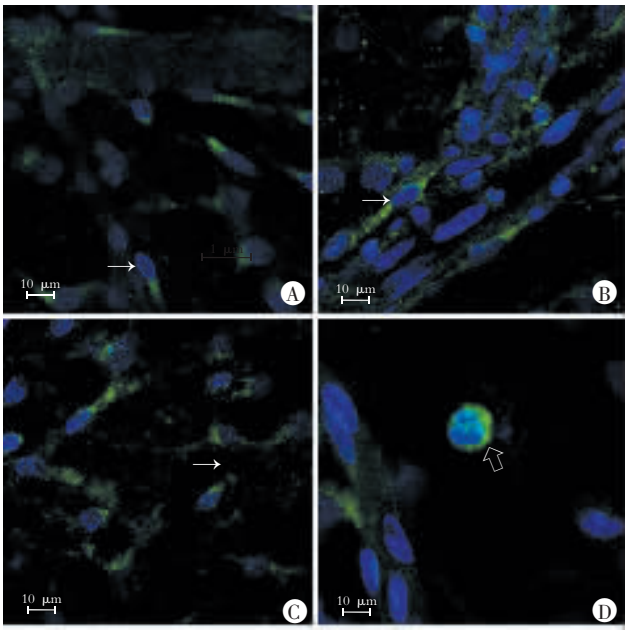
实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计学软件处理。多组均数间比较采用单因素方差分析;ICCs 细胞数目改变与局部肌条收缩改变是 2 个不同的变量,其相互关系采用相关性分析。

2 结果

2.1 形态学观察

2.1.1 ICC 样细胞 在豚鼠肾盂输尿管交界处、输尿管上、中、下段均可观察到一类 KIT 染色阳性的细胞,其形态类似胃肠道 ICC 细胞,该类细胞呈梭形或纺锤状,有 1~3 个突起,细胞核大而胞质小,经形态学鉴定为 ICC 样细胞。阴性对照肾盂肾盏交界处组织铺片标本中未见 c-kit 阳性细胞。阳性对照标本中可见 c-kit 阳性细胞,符合胃肠道 ICC 分布特点(图 1)。

2.1.2 肥大细胞 在组织中有一类细胞也是 KIT 染色阳性,但其胞体为圆形,且无突起,与周围细胞很少构成连接,经形态学鉴定为肥大细胞(图 1)。



↑:ICCs 细胞;蓝色为细胞核;⇧:肥大细胞

A:肾盂输尿管交界处; B:脉管周围; C:网络状结构; D:肥大细胞

图 1 正常豚鼠上尿路各部位 c-kit 阳性细胞免疫荧光组织化学染色结果 (激光共聚焦显微镜)

2.2 ICC 样细胞上尿路分布特点

上尿路 ICC 样细胞计数在肾盂输尿管交界处,输尿管上、中、下段分别为(5.20±0.98)、(3.90±0.98)、(3.03±0.98)、(2.50±0.81)个/视野。ICC 样细胞分布密度在肾盂输尿管交界、输尿管上段、输尿管中段之间差异显著($P<0.05$),输尿管中段与输尿管下段之间没有显著差异($P>0.05$)。上尿路 ICC 样细胞分布密度从肾盂肾盏交界处沿输尿管呈递减趋势。

2.3 正常离体上尿路各部位肌条收缩特性

2.3.1 正常输尿管各部位离体平滑肌肌条收缩幅度 正常输尿管各部位离体平滑肌肌条收缩幅度实验结果显示:肾盂输尿管交界处[(0.140±0.008)mN]、输尿管上段[(0.080±0.011) mN]与输尿管中段[(0.026±0.005)mN]、输尿管下段[(0.024±0.015)mN]之间差异显著($P<0.05$)。

2.3.2 正常上尿路各部位离体平滑肌肌条收缩频率 正常输尿管各部位离体平滑肌肌条收缩频率实验结果显示:肾盂输尿管交界处[(6.8±0.8)次/min]及输尿管上段[(4.0±0.7)次/min]与输尿管中段[(1.6±0.547)次/min]、输尿管下段[(2.0±0.7)次/min]之间差异显著($P<0.05$)。

2.4　c-kit 阳性细胞密度与局部平滑肌收缩频率及收缩幅度的相关性分析

结果显示 c-kit 阳性细胞密度与局部平滑肌肌条收缩频率和收缩幅度 Pearson 相关系数 r 分别为 0.686 和 0.661($P < 0.05$),提示 c-kit 阳性细胞密度与局部平滑肌肌条收缩频率和收缩幅度呈正相关。

3　讨论

长久以来人们对上尿路的研究表明,输尿管平滑肌并非只受神经控制,主要有两方面的证据:①Wharton[5]于 1932 年就证实输尿管在手术去除神经因素后仍存在有效的蠕动;②Golenhofen 等[6]应用河豚毒素以及 Teele 等[7]应用多种神经阻滞剂并不能使离体的输尿管停止自发性蠕动。Lang 等[8]于 1998 年在对豚鼠上尿路的研究中发现一种形态及功能类似胃肠道 ICCs 的细胞可能参与了尿路的调控。由于目前已经证明 ICCs 细胞是胃肠道的慢波起搏细胞[9],对胃肠道的动力学功能有着重要的调控作用,由此人们推测泌尿道 ICCs 细胞对尿路平滑肌同样起着兴奋及调控功能。c-kit 抗体是目前国际上公认的 ICCs 细胞标记性抗体,研究人员应用该方法陆续在多种平滑肌组织中(如输尿管、膀胱、胆囊等)发现了 ICCs 细胞的存在[10-12]。目前认为豚鼠上尿路中只有 ICCs 细胞和肥大细胞具有 kit 染色阳性,故可以通过形态学特点排除肥大细胞而筛选出 ICCs 细胞。

本研究应用全层铺片免疫荧光的方法在上尿路各部位均可观察到 kit 阳性细胞,与 Megan 等[13]应用冰冻切片结果相似,且采用全层铺片法可增加平面下 ICC 样细胞阳性数目,更接近生理条件下该细胞在组织中的分布且利于统计分析。在本研究中 4 ℃冰箱孵育 c-kit 抗体 48 h 较孵育 24 h 的结果更好。

我们的前期研究中豚鼠全尿道广泛存在 c-kit 阳性的 ICCs 细胞[3]。在本研究中可以看出 ICCs 细胞在上尿路肾盂肾盏交界处的分布密度最高,然后向远端呈递减趋势。这个结果与 Metzger 等[10]应用免疫荧光技术对人的上尿路 c-kit 分布研究类似。我们也观察到部分脉管周围存在 ICCs 细胞的聚集现象,Harhun 等[14,15]应用免疫组化技术在家兔门静脉的肌肉层中也同样发现 ICC 样细胞,并且应用膜片钳技术观测到这些细胞,能产生自发性电信号,并释放一些未知的扩散性物质,由此推测该细胞可能是门静脉平滑肌的起搏细胞,与脉管的自发性收缩有关,这些有待进一步研究。

本研究中局部 c-kit 细胞的分布密度与局部肌条收缩频率和幅度呈正相关性,反映上尿路不同部位的兴奋性差异可能与 ICC 样细胞的分布差异有关。

本研究结果提示了 ICCs 细胞在豚鼠上尿路中的分布特点,为进一步研究该细胞的功能奠定了形态学基础;证实局部肌条的收缩特性与 ICCs 细胞的分步存在正相关性,反映了上尿路不同部位的兴奋差异可能与 ICCs 细胞的分布有关,提示泌尿道 ICCs 细胞为潜在起搏细胞的可能,以此为切入点可以对上尿路起搏部位进行更深入的研究。

参考文献:

[1] Finberg J P, Peart W S. Function of smooth muscle of rat renal pelvis-response of the isolated pelvis muscle to angiotensin and some other substances[J]. Br J Pharmacol, 1970, 39(2): 373-381.

[2] Huizinga J D, Robinson T L, Thomsen L. The search for the origin of rhythmicity in intestinal contraction; from tissue to single cells[J]. Neurogastroenterol Motil, 2000, 12(1): 3-9.

[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] 封建立, 方　强, 丁砺鑫, 等. ICCs 细胞在正常大鼠膀胱中的分布及对逼尿肌收缩的影响[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(7): 558-560.

[5] Wharton L R. The innervation of the ureter with respect to denervation [J]. J Urol, 1932, 28: 639-673.

[6] Golenhofen K, Hannappel J. Normal spontaneous activity of the pyeloureteral system in the guinea-pig[J]. Pflugers Arch, 1973, 341(3): 257-270.

[7] Teele M E, Lang R J. Stretch-evoked inhibition of spontaneous migrating contractions in a whole mount preparation of the guinea-pig upper urinary tract[J]. Br J Pharmacol, 1998 , 123(6): 1143-1153.

[8] Lang R J, Exintaris B, Teele M E, *et al*. Electrical basis of peristalsis in the mammalian upper urinary tract[J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 1998, 25(5): 310-321.

[9] Sanders K M. A case for interstitial cells of Cajal as pacemakers and mediators of neurotransmission in the gastrointestinal tract[J]. Gastroenterology, 1996, 111(2): 492-515.

[10] 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.

[11] 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.

[12] 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.

[13] Megan F. Klemm Betty Exintaris, *et al*. Identification of the cells underlying pacemaker activity in the guinea-pig upper urinary tract[J]. J Physiol, 1999, 519 Pt 3: 867-884.

[14] Harhun M I, Gordienko D V, Povstyan O V, *et al*. Function of interstitial cells of Cajal in the rabbit portal vein[J]. Circ Res, 2004, 95(6): 619-626.

[15] Povstyan O V, Gordienko D V, Harhun M I, *et al*. Identification of interstitial cells of Cajal in the rabbit portal vein[J]. Cell Calcium, 2003, 33(4): 223-239.

(编辑　王　红)