论著

文章编号:1000-5404(2009)10-0918-04

胞外钙及胞内钙库钙在膀胱ICCs细胞自发性钙瞬变中的作用

郑 霁,贾卓敏,张永革,潘进洪,沈文浩,李为兵,金锡御,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 观察离体活膀胱肌条铺片中卡哈尔间质细胞(interstitial cells of cajal,ICCs)自发性钙瞬变,并检测胞外钙及胞内钙库钙对ICCs细胞自发性钙瞬变的影响,探讨ICCs细胞自发性钙瞬变产生的机制。**方法** 制作离体膀胱肌条铺片,生理液灌流保持肌条铺片活性。待肌条自发性收缩活动出现后,Fluo-4负载肌条铺片,激光共聚焦显微镜观察其中ICCs细胞自发性钙瞬变,随后观察尼莫地平(Nimodipine)、2-氨基乙基二苯硼酸盐(2-aminoethoxydip henylborate,2-APB)、雷诺丁(Ryanodine)、毒胡萝卜素(Thapsigargin)及无钙、高钙生理液对ICCs细胞自发性钙瞬变的影响,探讨ICCs细胞自发性钙瞬变产生的机制。**结果** 可见离体活膀胱肌条铺片中平滑肌细胞和ICCs细胞均产生节律性自发性钙瞬变,平滑肌细胞钙瞬变频率较快,而ICCs细胞钙瞬变频率相对较慢。尼莫地平能完全抑制平滑肌细胞的自发性钙瞬变,但对ICCs细胞的自发性钙瞬变无显著影响。2-APB、雷诺丁、毒胡萝卜素及无钙生理液均可完全抑制ICCs细胞的自发性钙瞬变,高钙生理液可显著增加ICCs细胞自发性钙瞬变的频率。**结论** 细胞外钙离子通过非L型钙离子通道入胞及细胞内钙库放钙均参与ICCs细胞自发性钙瞬变的产生。

关键词:ICCs细胞;自发性钙瞬变;膀胱

中图法分类号:R322.62;R329.27;R977.5 **文献标识码**:A

Role of Ca^{2+} entry and Ca^{2+} store in ICCs' spontaneous Ca^{2+} transients in rat bladder

ZHENG Qi, JIA Zhuo-min, ZHANG Yong-ge, PAN Jin-hong, SHEN Wen-hao, LI Wei-bing, JIN Xi-yu, SONG Bo
(Urinary Surgery Research Institute, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the spontaneous Ca^{2+} transients of interstitial cells of cajal (ICCs) and explore its mechanism in the rat bladder. **Methods** Single layer of smooth muscle bundles attached to the serosal layer of rat bladder were prepared and superfused with warmed physiological saline (PSS) to recover and maintain their activity. After spontaneous muscle movements of the muscle layers were visually detected, the tissues were loaded with the fluo-4 AM and then spontaneous Ca^{2+} transients of ICCs in the muscle layers were observed with laser scanning confocal microscopy. Nimodipine, 2-aminoethoxydiphenylborate (2-APB), ryanodine, thapsigargin, Ca^{2+} free PSS and high Ca^{2+} PSS were then used to investigate the mechanisms of spontaneous Ca^{2+} transients in ICCs. **Results** Spontaneous Ca^{2+} transients of smooth muscle cells (SMCs) and ICCs in the smooth layers were successfully detected. Nimodipine suppressed significantly Ca^{2+} transients in SMCs but not in ICCs. Spontaneous Ca^{2+} transients of ICCs were completely abolished by 2-aminoethoxydiphenylborate (2-APB), ryanodine, thapsigargin, Ca^{2+} free PSS and partly increased by high Ca^{2+} PSS. **Conclusion** These results suggest that spontaneous Ca^{2+} transients of ICCs rely on both Ca^{2+} release from intracellular Ca^{2+} stores and extracellular Ca^{2+} entry through non L type Ca^{2+} channels.

Key words: interstitial cells of cajal; spontaneous Ca^{2+} transients; bladder

我们前期的研究发现膀胱平滑肌具有不依赖于神经因素的自发性兴奋收缩的能力[1,2]。但逼尿肌自发性兴奋产生的具体机制仍不清楚[3]。Cajal间质细胞(interstitial cells of cajal,ICCs)是一类与平滑肌细胞在形态及功能上均不相同细胞。业已证明这些细胞是胃肠道、输尿管等器官的起搏细胞[4],膀胱肌层和固有层中均存在着ICC样细胞[5]。膜片钳技术研究显示膀胱ICC具有起搏细胞的特征性电流[6],提示ICCs细胞可能与逼尿肌的自发性收缩有关。但目前的研究也发现,膀胱平滑肌细胞自身也具有自发性兴奋能

基金项目:国家自然科学基金(30672093,30670776)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30672093,30670776)

作者简介:郑 霁,男,江西省九江市人,博士研究生,医师,主要从事膀胱功能障碍方面的研究。电话:(023)68754186

通信作者:宋 波,电话:(023)68754186, E-mail: Songb-mr@vip.sina.com

收稿日期:2009-03-12;**修回日期**:2009-03-23

力[7],膀胱自发性兴奋是起源于 ICCs 细胞还是起源于膀胱平滑肌细胞本身仍不清楚。本研究以离体活膀胱肌条铺片为研究对象,采用 Fluo-4 负载,激光共聚焦显微镜高速扫描为手段,观察组织铺片中 ICCs 细胞自发性钙瞬变,随后观察尼莫地平、2-氨基乙基二苯硼酸盐(2-aminoethoxydiphenylborate, 2-APB)、雷诺丁、毒胡萝卜素及无钙、高钙生理液对 ICCs 细胞自发性钙瞬变的影响,探讨 ICCs 细胞自发性钙瞬变产生的机制,为探索膀胱自发性兴奋的起源提供实验依据。

1　材料与方法

1.1　主要材料和试剂

羊抗大鼠 C-kit 多克隆抗体(Santa Cruz 公司,美国),Fluo-4 及 F127、Alexa Fluor 594 或 Alexa Fluor 488 标记的驴抗羊二抗(Molecular Probes 公司,美国), DAPI 购自碧云天生物公司。尼莫地平、2-APB、雷诺丁、毒胡萝卜素购自美国 Sigma 公司。JG-23 Chamber(Warner 公司,美国),IPC/IPC-N 蠕动泵 (Ismatec 公司,瑞士), FV-500 激光共聚焦显微镜(Olympus 公司,日本)。

1.2　实验方法

1.2.1　免疫荧光检测膀胱 ICCs 细胞　　常规免疫荧光组织化学法染色方法参见封建立等[5]建立的方法。简要步骤:将制作好的薄层逼尿肌组织片于含 1% BSA 的 0.01 mol/L PBS 中封闭 1 h,然后于 0.01 mol/L PBS 中漂洗 3 次 ×5 min;加入 1∶100 羊抗大鼠 C-kit,4 ℃孵育过夜;0.01 mol/L PBS 中漂洗 3 次;加入 Alexa Fluor 594 或 Alexa Fluor 488 标记的驴抗羊二抗(免疫荧光双标时)稀释液,37 ℃避光孵育 1 h;0.01 mol/L PBS 中漂洗 3 次;于 DAPI 中常温避光孵育 10 min,0.01 mol/L PBS 中漂洗 3 次;前 2 次每次 30 min,最后 1 次 2 h;将组织片平铺于载玻片上,用甘油封片。激光共聚焦显微镜下观察显色情况,照相记录。

1.2.2　膀胱组织铺片的制作　　参照 Hashitani 等[7]的方法制作膀胱铺片。选择健康雌性 SD 大鼠,2 ~ 3 月龄,体质量 200 ~ 250 g,购自第三军医大学实验动物中心。将其麻醉及断颈处死后取出膀胱,置于无钙生理液(Ca^{2+} free physiological saline)中。在无钙生理液中将膀胱自颈部向顶部纵向剪开,轻柔剪去膀胱内膜及数层膀胱肌肉组织,保留 1 ~ 2 层肌肉组织于膀胱外膜上。

1.2.3　膀胱组织铺片 Fluo-4 负载　　将制作好的膀胱组织铺片放在 JG-23 记录 Chamber 底部,35 ℃生理液持续灌流铺片。待膀胱铺片出现自发性收缩活动后,将膀胱铺片放在含有 10 μmol/L,Fluo-4 AM 和 10 μmol/L F127 的无钙生理液中,Fluo-4负载约 60 min。负载完成后,再将膀胱组织铺片放入记录 Chamber 底部,35 ℃生理液持续灌流铺片约 30 min。

1.2.4　组织铺片中 ICCs 细胞和平滑肌细胞自发性钙瞬变检测　　选取组织活性好,细胞自发性钙瞬变明显规律的视野进行观察。选取好目标区域后,选择激光共聚焦显微镜高速扫描模式,扫描 1 幅图片的时间为 100 ~ 180 ms,扫描完成后,利用 Fluoview FV10-ASW software (Version 1.4a, Olympus 公司)软件分析平滑肌中 ICCs 细胞和平滑肌细胞自发性钙瞬变。

1.2.5　药物的添加及生理液的成分　　尼莫地平、2-APB、雷诺丁、毒胡萝卜素及无钙、高钙生理液等药物和液体的添加均通过 IPC/IPC-N 蠕动泵完成,待药物作用 20 min 后,再观察和记录药物对细胞自发性钙瞬变的影响。

生理液(physiological saline)的成分(mmol/L):NaCl 120;KCl 4.7;$MgCl_2$ 1.2;$CaCl_2$ 2.5;$NaHCO_3$ 15.5;KH_2PO_4 1.2 和 glucose 11.5 (pH 7.4),持续通 95% O_2 和 5% CO_2,以维持生理液 pH 值的稳定。将生理液配方中的 $CaCl_2$ 去除即为无钙生理液,高钙生理液中的 $CaCl_2$ 浓度为 5 mmol/L。

1.3　统计学处理

将平滑肌细胞中的基础钙荧光强度设定为 F0, 钙瞬变的钙荧光强度为 F, 观察分析连续时间段自发性钙瞬变幅度(F/F0)及自发性钙瞬变波动幅度(△F/F0 = F/F0 − 1)的变化可反映出自发性钙瞬变的变化。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 11.0 统计软件进行 t 检验。

2　结果

2.1　大鼠膀胱逼尿肌中 ICCs 细胞免疫荧光染色检测

ICCs(C-kit 免疫荧光阳性细胞)分布于肌束旁和肌束内(图 1A、B)。免疫荧光双染结果显示,ICCs 细胞(C-kit 免疫荧光阳性细胞)除分布于肌束旁,还分布于肌束间(图 1C)。肌束旁和肌束间的 ICCs 细胞有时可连成一片,有可能成为相邻肌束之间联系的“桥梁”(图 1C 中黄色虚线所示)。

2.2　膀胱铺片 ICCs 细胞和平滑肌细胞自发性钙瞬变检测

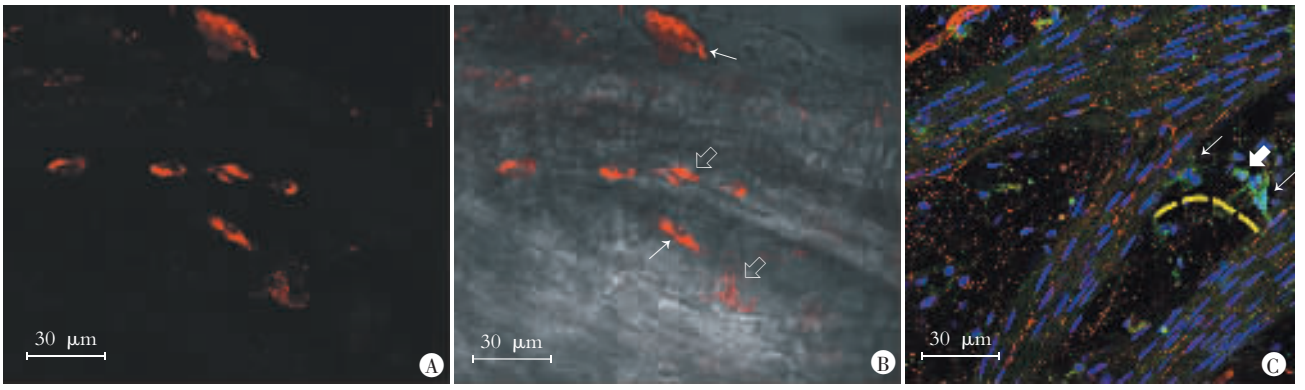
选取细胞方法见图 2A。结果显示,平滑肌细胞(n = 18) F/F0 为(2.18 ± 0.26),钙瞬变频率为(9.97 ± 2.34)次/min;而 ICCs 的自发性钙瞬变频率则要慢得多,为(0.95 ± 0.18)次/min,其 F/F0 为(2.03 ± 0.17)(图 2B)。

2.3　尼莫地平对膀胱铺片 ICCs 细胞和平滑肌细胞自发性钙瞬变的影响

从图 3 中可见,尼莫地平作用 20 min 后,平滑肌细胞的自发性钙瞬变被完全抑制。而尼莫地平对 ICCs 的自发性钙瞬变无明显影响。用药前后 ICCs 的 F/F0 分别为(2.05 ± 0.16)和(1.97 ± 0.18),相应的频率分别为(0.93 ± 0.20)、(0.91 ± 0.25)次/min (n = 6, P > 0.05)。

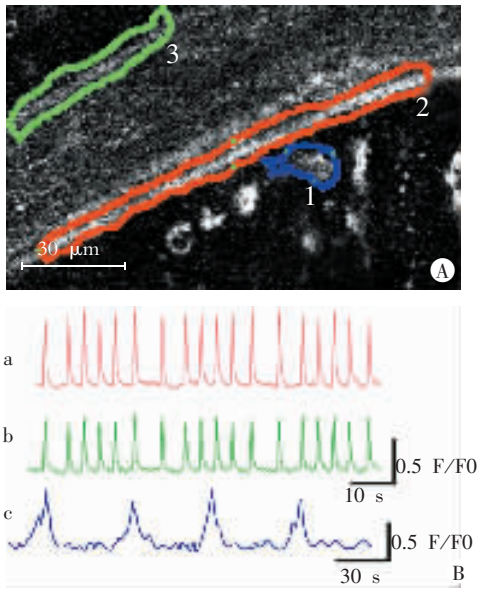
2.4　不同钙离子通道阻断剂及无钙、高钙生理液对 ICCs 细胞自发性钙瞬变的影响

IP3 钙离子通道阻断剂 2-APB(50 μmol/L),雷诺丁敏感的钙离子通道阻断剂雷诺丁(50 μmol/L)及平滑肌内质网钙泵抑制剂毒胡萝卜素(10 μmol/L)作用 20 min 后,均可显著抑制 ICCs 细胞的自发性钙瞬变。与干预细胞内钙库钙释放药物的作用类似,无钙生理液作用 15 ~ 20 min 后,ICCs 的自发性钙瞬变也被显著抑制。雷诺丁、2-APB、毒胡萝卜素及无钙生理液作用后,ICCs 细胞中的钙瞬变波动幅度(ΔF/F0 = F/F0 − 1)从对照组的(1.08 ± 0.22)分别下降为(0.03 ± 0.02)、(0.04 ± 0.02)、(0.05 ± 0.02)和(0.03 ± 0.02)(P < 0.01)。



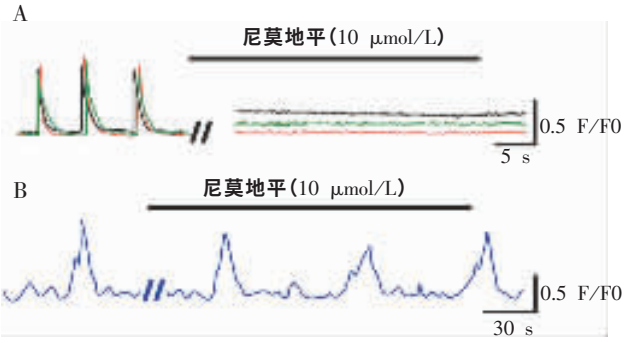
A:ICCs 细胞(anti-c kit,红色荧光);B:图 1A 和相应光镜照片的叠加;C:ICCs 细胞(anti-c kit,绿色荧光)和神经末梢(anti-PGP9.5,红色荧光)
↑:ICCs 分布于肌束旁;⇧:ICCs 分布于肌束内;⬆:ICCs 分布于肌束间

图 1 膀胱 ICCs 细胞免疫荧光检测 (激光共聚焦显微镜)



A:Fluoview 软件分析目标 ICCs 细胞和平滑肌细胞 1:ICCs 细胞;2、3:平滑肌细胞;B:Fluoview 软件分析细胞获得的自发性钙瞬变曲线 a、b:A 图中 2、3 号平滑肌细胞;c:A 图中 1 号 ICCs 细胞

图 2 膀胱铺片 ICCs 细胞和平滑肌细胞自发性钙瞬变检测及分析



A:平滑肌细胞;B:ICCs 细胞

图 3 尼莫地平对 ICCs 细胞和平滑肌细胞自发性钙瞬变的影响

与此相反,将生理液置换为高钙生理后 15 min,ICCs 细胞的自发性钙瞬变频率显著增加至(1.22 ± 0.23)次/min (n = 8, P < 0.01),同时其自发性钙瞬变幅度(F/F0)显著下降至(1.69 ± 0.23)(P < 0.01)。

3 讨论

本研究表明,在膀胱平滑肌束旁,肌束间及肌束内均有 ICCs 细胞分布。由于目前没有有效手段观察肌束内 ICCs 自发性钙瞬变,且我们的前期研究发现平滑肌束自发性钙瞬变多起源于肌束边缘,而肌束旁 ICCs 细胞分布邻近肌束边缘,故我们选定同时观测比较空间上联系较密切的肌束旁 ICCs 细胞和平滑肌细胞的自发性钙瞬变。本研究以激光共聚焦显微镜高速扫描为手段,同时观察分析组织铺片中肌束旁 ICCs 细胞和相邻平滑肌细胞自发性钙瞬变,以探讨平滑肌细胞自发性钙瞬变是否是起源于肌束旁 ICCs 细胞。我们采用目前国外研究通用的 2 个原则区分 ICCs 细胞和平滑肌细胞[8,9]。①2 种细胞的形状不同:我们前期研究[5]及本实验免疫荧光检测结果提示 ICCs 多为梭形,部分细胞可见到侧支,而平滑肌细胞多为长条状;②2 种细胞的大小不同:ICCs 细胞大小通常为 10 ~ 25 mm,很少超过 30 mm;而平滑肌细胞则要大得多。

与我们的推测相反,本研究结果显示肌束旁 ICCs 细胞的自发性钙瞬变频率与平滑肌细胞的钙瞬变频率并不一致,肌束旁 ICCs 细胞的自发性钙瞬变要明显慢于平滑肌细胞,平滑肌细胞的自发性钙瞬变来自肌束旁 ICCs 细胞的可能性不大[10],但不排除目前技术手段的限制(如激光共聚焦显微镜成像焦距相对较短)和选择目标肌束旁 ICCs 细胞的问题导致观测结果的偏颇[11]。

本研究表明,尼莫地平作用 20 min 后,平滑肌细胞的自发性钙瞬变被完全抑制;而尼莫地平对 ICCs 的自发性钙瞬变无明显影响,与前期研究结果类似[12],这提示与平滑肌细胞相反,胞外钙通过 L 型钙离子通道内流对 ICCs 细胞自发性钙瞬变不起主要作用。后续研究发现,无钙生理液可完全抑制 ICCs 细胞的自发性钙瞬变,而高钙生理液使 ICCs 细胞的自发性钙瞬变频率显著增加,这说明胞外钙内流通过非 L 型钙离子通道内流对 ICCs 细胞自发性钙瞬变起重要作用。

胞内钙库钙释放入细胞质也可能参与 ICCs 细胞自发性钙瞬变的发生,IP3 钙离子通道阻断剂 2-APB,雷诺丁敏感的钙离子通道阻断剂雷诺丁及平滑肌内质网钙泵抑制剂毒胡萝卜素被用于验证胞内钙库钙释放在 ICCs 细胞自发性钙瞬变发生中的作用。本研究结果显示,2-APB、雷诺丁和毒胡萝卜素作用 20 min 后均能完全抑制 ICCs 细胞自发性钙瞬变,提示细胞内钙库中钙通过 IP3 通道及雷诺丁敏感的钙通道释放入细胞质,也参与细胞自发性钙瞬变的发生。细胞外钙可能通过 ICCs 细胞细胞膜上的非 L 型钙离子通道入胞,随后通过诱导 ICCs 细胞内质网上的 RyR/IP3R 通道开放,导致内质网中的钙离子释放入细胞质而引起 ICCs 细胞的自发性钙瞬变。

本研究表明,在高钙生理液中,细胞内基础钙离子浓度升高的情况下,ICCs 细胞自发性钙振荡仍然存在,这提示细胞外钙通过钠钙交换体(NCX)入胞可能不参与细胞自发性钙振荡的发生或同时还存在其他的内向钙离子流共同起作用[9,12,13]。McCloskey 等[14]利用膜片钳技术观察豚鼠膀胱 ICCs 细胞内向钙离子流的研究发现,ICCs 细胞内向钙离子流的特征与 T 型钙离子通道钙离子流特征不符,提示可能有另外的钙离子通道参与。Liu 等[15]的研究发现,细胞外钙通 TRP 通道入胞及细胞钙库中的钙通过 IP3 受体通道释放入细胞质共同参与胃肠道 ICCs 细胞自发性钙振荡的产生。

由于膀胱 ICCs 细胞内向钙离子流的构成较为复杂,在 ICCs 细胞自发性钙振荡产生的过程中,不排除同时有几个通道共同参与细胞外钙离子内流的可能性,参与膀胱 ICCs 细胞自发性钙瞬变产生的细胞膜上的非 L 型钙离子通道有可能是 NCX、T 型钙离子通道和 TRP 离子通道[16]中的多个,但其具体机制仍需后续实验阐明。

综上所述,细胞外钙离子通过非 L 型钙离子通道入胞及细胞内钙库放钙均参与 ICCs 细胞自发性钙瞬变的产生。虽然目前研究没有发现平滑肌细胞自发性钙瞬变起源于 ICCs 细胞的证据,考虑到肌束内 ICCs 尚无好的方法观察,不排除其是膀胱起博细胞的可能性。

参考文献:

[1] 李　新, 宋　波, 李益人, 等. M 受体及其亚型与逼尿肌功能的关系研究[J]. 第三军医大学学报, 2002, 24(2): 164 - 166.

[2] 卢根生, 宋　波. 逼尿肌过度活动的研究进展[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(10): 1128 - 1130.

[3] Fry C H, Sui G P, Severs N J, *et al*. Spontaneous activity and electrical coupling in human detrusor smooth muscle: implications for detrusor overactivity? [J]. Urology, 2004, 63(3 Suppl 1): 3 - 10.

[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] 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.

[6] 沈文浩, 熊恩庆, 宋　波, 等. 成年豚鼠膀胱 ICCs 细胞起搏电流的鉴定[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(7): 567 - 569.

[7] 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.

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

[9] Hashitani H, Suzuki H. Properties of spontaneous Ca^{2+} transients recorded from interstitial cells of Cajal-like cells of the rabbit urethra *in situ*[J]. J Physiol, 2007, 583(Pt 2): 505 - 519.

[10] Hashitani H, Yanai Y, Suzuki H, *et al*. Role of interstitial cells and gap junctions in the transmission of spontaneous Ca^{2+} signals in detrusor smooth muscles of the guinea-pig urinary bladder[J]. J Physiol, 2004, 559(Pt 2): 567 - 581.

[11] Lang R J, Klemm M F. Interstitial cell of Cajal-like cells in the upper urinary tract[J]. J Cell Mol Med, 2005, 9(3): 543 - 556.

[12] Sergeant G P, Hollywood M A, McHale N G, *et al*. Ca^{2+} signalling in urethral interstitial cells of Cajal[J]. J Physiol, 2006, 576(Pt 3): 715 - 720.

[13] Han C, Tavi P, Weckstrom M. Role of the Na^{+}-Ca^{2+} exchanger as an alternative trigger of CICR in mammalian cardiac myocytes[J]. Biophys J, 2002, 82(3): 1483 - 1496.

[14] McCloskey K D. Characterization of outward currents in interstitial cells from the guinea pig bladder[J]. J Urol, 2005, 173(1): 296 - 301.

[15] Liu H N, Ohya S, Furuzono S, *et al*. Co-contribution of IP3R and Ca^{2+} influx pathways to pacemaker Ca^{2+} activity in stomach ICC[J]. J Biol Rhythms, 2005, 20(1): 15 - 26.

[16] Walker R L, Koh S D, Sergeant G P, *et al*. TRPC4 currents have properties similar to the pacemaker current in interstitial cells of Cajal[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2002, 283(6): C1637 - C1645.

(编辑　汪勤俭)