论著

文章编号:1000-5404(2009)13-1284-03

牵张负荷对大鼠膀胱 Cajal 间质细胞超微形态及 c-kit 基因表达影响

路 扬,李龙坤,王永权 (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 通过研究膀胱 Cajal 间质细胞(Interstitial cells of cajal,ICCs)超微形态及 c-kit 基因水平变化,阐明牵张负荷对膀胱 Cajal 细胞兴奋性的调控作用。**方法** 结扎膀胱颈,构建大鼠膀胱出口部分梗阻致逼尿肌过度活动模型,通过扫描电镜方法观察牵张负荷条件下逼尿肌过度活动组与正常对照组膀胱 ICCs 细胞超微形态变化,观察牵张负荷条件下逼尿肌稳定组和逼尿肌过度活动组与正常对照组膀胱 ICCs 细胞酪氨酸激酶受体(c-kit)在基因水平表达差异。**结果** 逼尿肌过度活动组 ICCs 细胞形态和 c-kit 基因水平表达量较正常对照组有明显改变($P<0.01$)。**结论** 牵张负荷对 ICCs 细胞有调控作用,可能的作用机制在于改变 ICCs 细胞形态及上调 c-kit 表达。

关键词: 牵张负荷;ICCs 细胞;c-kit

中图法分类号: R322.62; R329.27; R334.3 **文献标识码:** A

Effects of stretch load on the ultramicrostructure and c-kit gene expression of the bladder ICCs in rats

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

Abstract: Objective To investigate the effects of stretch load on the ultramicrostructure and c-kit expression of the bladder interstitial cells of cajal (ICCs) in rats. **Methods** Rat model with detrusor overactivity due to partial outflow obstruction with bladder neck ligation were established. The effects of stretch load on the changes of ultramicrostructure of the bladder ICCs were observed by scanning electron microscopy. The changes in c-kit gene expression of ICCs in stable, overactive, and normal detrusors were analyzed with RT-PCR. **Results** The ultramicrostructure of the ICCs changed significantly. The expression of c-kit was significantly higher in the overactive group than that in stable and normal groups ($P<0.01$). **Conclusion** Stretch load can regulate the function of ICCs. The possible mechanism may be associated with the morphological changes in ICCs and up-regulation of c-kit expression.

Key words: stretch load; interstitial cells of Cajal; c-kit

逼尿肌兴奋性异常是临床上膀胱功能障碍性疾病的主要内在原因之一,了解逼尿肌兴奋性起源和调控对于膀胱兴奋性异常的基础研究和临床诊治有相当重要意义。研究表明:在离体条件下,膀胱逼尿肌失去神经支配时,受到牵张负荷后,逼尿肌细胞仍然可产生自发性兴奋,启动逼尿肌肌条收缩[1]。在前期的研究中,通过 c-kit 免疫组织化学染色方法,已经证实成年大鼠膀胱存在有与胃肠道相同的 Cajal 间质细胞(interstitial cells of Cajal,ICCs),并且在给予一定的牵张负荷后,ICCs 细胞数量及功能有明显改变[2]。说明 ICCs 细胞应该是兴奋起源和传导的中枢,而牵张负荷对逼尿肌的兴奋性有调控作用。本研究拟进一步探讨逼尿肌过度活动(detrusor overactivity, DO)时,ICCs 细胞超微结构的变化及 c-kit 在基因水平表达差异,阐明 ICCs 细胞在膀胱兴奋性的作用,以及牵张负荷对其调控机制。

1 材料与方法

1.1 主要实验材料及相关仪器

体质量为 200~250 g 健康 SD 雌性大鼠 20 只,2~3 个月龄(来自第三军医大学实验动物中心);PV6003 免疫组化染色试剂盒(中杉公司);浓缩型 DAB 试剂盒(中杉公司);c-Kit(M-14)抗体(Santa Cruz 公司);Trizol(invitrogen 公司);RNA PCR Kit(AMV)Ver.3.0 试剂盒(TaKaRa 公司);Nidoc-970 型尿动力学检测仪(维信公司);AVI-270 型微量灌注泵(3M 公司);Du640 紫外分光光度仪(美国 Beckman);凝胶成像分析仪(美国 Bio-Rad)。S3400N 型扫描电子显微镜(日立公司)。

1.2 实验方法

将大鼠采用完全随机方法分为实验组和对照组。实验组 16

基金项目:国家自然科学基金(30500505)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30500505)

作者简介:路 扬,男,山东省淄博市人,硕士研究生,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)68765317, E-mail:lilongk@hotmail.com

收稿日期:2008-09-25;修回日期:2008-12-13

只,用于逼尿肌过度活动模型的构建;正常对照组 4 只。对照组正常喂养,梗阻组手术建立膀胱出口部分梗阻(partial bladder outlet obstruction,PBOO)动物模型。6 周后行尿动力学检查。

1.2.1　膀胱出口梗阻模型的建立　　1% 戊巴比妥钠注射液大鼠腹腔内注射(40 mg/kg)麻醉后,以直径为 1 mm 的导管插入尿道,打开腹腔,游离膀胱颈,以 1 号丝线将膀胱颈与套管结扎,形成膀胱出口部分梗阻,结扎松紧度以牵拉导管可带动周围组织,且导管略有阻力感为度。拔出导管分层缝合。与同龄对照组正常大鼠 6 只相同条件下饲养 6 周。

1.2.2　膀胱充盈性压力测定　　将术后 6 周的大鼠,以 25% 乌拉坦注射液(1 000 mg/kg)腹腔内注射麻醉,打开腹腔,将结扎部位线结剪开,经尿道外口置入 1 mm 的硬膜外麻醉导管入膀胱,导管外口与三通管分别连接于微量灌注泵、尿动力仪,尿动力仪调定零点,轻压腹部,排空尿液,0.9% 生理盐水以 15 ml/h 灌注行膀胱测压,根据膀胱充盈过程中压力 - 容积关系,参照大鼠 DO 的判断标准[3]在膀胱低压充盈期出现造成膀胱内压升高超过 15 cmH_2O (1 cmH_2O = 0.098 kPa) 的逼尿肌收缩时即为 DO。

1.2.3　扫描电镜标本制备　　将测压分组后的大鼠开胸,经左心室插管到主动脉,剪开右心耳,以 4% 多聚甲醛溶液灌注(pH 值 7.4),灌注后取出膀胱,小心撕去黏膜层。逼尿肌层较厚且呈网状走形,分层不明显,取 1 ~ 2 层肌层组织,采用两步法免疫组化进行免疫染色。微波热修复;3% H_2O_2 去离子水 37 ℃孵育 10 min,灭活内源性过氧化物酶活性;1∶100 稀释 c-Kit(M-14)抗体,4 ℃孵育 15 h;滴加兔抗山羊 IgG 抗体-HRP 多聚体试剂(PV-6003),37 ℃孵箱内孵育 30 min;各步骤间用 PBS 漂洗 3 次,每次 5 min。DAB 显色,镜下观察显色情况,适时终止显色。在解剖显微镜下选取免疫阳性区域,修成 3 mm × 3 mm × 1 mm 大小,放入 2.5% 戊二醛溶液于 4 ℃固定 2 h,0.1 mol/L PBS 洗涤 2 次,5 min/次,乙醇梯度脱水,叔丁醇置换干燥,离子溅射镀膜后用 HITACHI S3400N 扫描电镜观察。

1.2.4　RT-PCR 检测　　根据文献[4]设计,由 invitrogen 公司合成引物。大鼠 c-kit 引物序列(产物大小:346 bp)上游 5′-AG-CAAGAGTTAA CGATTCCGGAG-3′下游 5′-CCAGAAAGGTGTA-AGTGC CTCCT-3′;以 β-actin(产物大小:138 bp) 做内参,上游 5′-TATTGGCAACGAGCGGTTCc-3′下游 5′-GGCATAAGG TCTT-TACGGATGTC -3′。用 Trizol 提取正常对照组、非 DO 组和 DO 组 RNA,Du640 紫外分光光度仪检测 RNA 样品浓度,计算上样量。按 RNA PCR Kit(AMV)Ver.3.0 试剂盒要求合成 cDNA,反应条件(50 ℃ 30 min, 99 ℃ 5 min, 5 ℃ 5 min)1 循环。按 RNA PCR Kit(AMV)Ver.3.0 试剂盒要求进行 PCR 反应,β-actin反应条件 94 ℃ 2 min 1 循环,(94 ℃ 30 s,46 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min)30 循环,72 ℃ 10 min 1 循环,c-kit 反应条件 96 ℃ 2 min 1 循环,(96 ℃ 30 s,56 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s)50 循环,72 ℃ 10 min 1 循环,将产物与 10 × loading buffer 按比例混合,在含有核酸染料的 1.5% 琼脂糖凝胶 0.5 × TAE 缓冲液里电泳,凝胶成像仪观察条带变化并分析。

1.3　统计学方法

试验数据采用 SPSS 13.0 统计软件进行单因素方差分析。检验资料结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

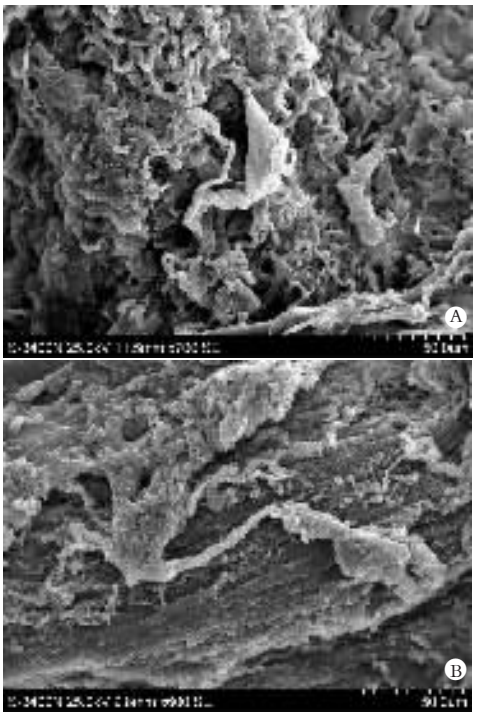
2　结果

2.1　模型制备情况

梗阻组意外死亡 2 只,手术组模型存活 12 只,出现 DO 的 8 只,未发生 DI 的 3 只,膀胱无功能 1 只。成功率 66.7% (8/12)。2 组大鼠生长良好,体质量增加无显著性差别。

2.2　免疫电镜结果

在大鼠逼尿肌间隙发现与胃肠道 ICCs 细胞形态相同的细胞,胞体呈梭形,细胞核大而细胞质较少。梗阻后,膀胱 ICCs 细胞形态与正常组有明显差异,胞体成圆形或多角形,伸出多个细长突起相互连接成网状。见图 1。

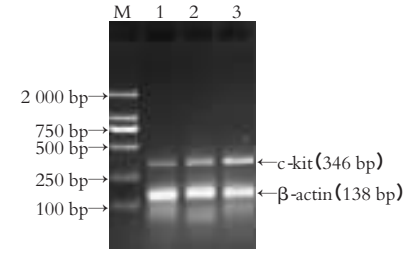


A:正常对照组;B:DO 组

图 1　ICCs 细胞超微形态学观察　(SEM)

2.3　RT-PCR 检测结果

β-actin 内参照表达均匀。逼尿肌过度活动组 c-kit 表达较稳定组和正常组升高显著,各组膀胱中 c-kit 表达量灰度值比值(c-kit/β-actin)分别为正常对照组(0.369 ± 0.025),非 DO 组(0.517 ± 0.044),DO 组(0.646 ± 0.055)(图 2)。非 DO 组与正常对照组比较,有统计学意义($P < 0.01$);DO 组与非 DO 组比较,有统计学意义($P < 0.01$)。



M:标准;1:正常对照组;2:PBOO 术后非 DO 组;3:PBOO 术后 DO 组

图 2　RT-PCR 检测各组膀胱中 c-kit 基因表达

3 讨论

膀胱是储存并排空尿液的肌性囊,膀胱逼尿肌受到牵张而收缩,括约肌松弛引起排尿。传统观念认为膀胱的排尿活动是一种高级中枢控制下的纯神经活动。但目前研究表明离体条件下,膀胱逼尿肌条失去神经支配时,受到牵张负荷后,逼尿肌细胞仍可产生自发性兴奋,启动逼尿肌条收缩[1]。同时,我们通过研究表明:过度活动逼尿肌的肌条在较低张力条件下,即出现自发性收缩活动;在同样张力条件下,过度活动逼尿肌较之正常逼尿肌收缩频率增高,提示过度活动逼尿肌兴奋性增高。因此我们认为牵张负荷在启动肌源性逼尿肌收缩及调控逼尿肌兴奋性中有重要作用。

逼尿肌能产生不受神经源性干扰的自发性收缩,提示逼尿肌中可能存在某种具有自发兴奋性,具有起搏细胞特征的细胞兴奋性调控。胃肠道中的 ICCs 细胞是胃肠道的慢波起搏细胞,对胃肠道的动力学功能有着重要的调控作用[5],其自身即可以感受牵张刺激,并以此调控其自发兴奋性[6],而泌尿系平滑肌具有和胃肠道平滑肌相似的、不受神经控制的自发性肌源性兴奋性。在豚鼠和人逼尿肌上同样存在与胃肠组织 ICCs 细胞相似的膀胱间质细胞,对膀胱平滑肌细胞组织基本电节律形成、神经信号传导调控、信号整合等起重要作用[7]。

研究表明,ICCs 细胞表达酪氨酸激酶受体(c-kit),它可以被选择性的标记出来[8]。受到胃肠道起搏细胞的启示,在前期的工作中通过免疫组化染色明确了成年大鼠的膀胱在受到牵张负荷后,ICCs 细胞的数量会有明显改变[2],为了进一步阐明牵张负荷与 ICCs 细胞的关系,我们通过扫描电镜方法对正常 SD 大鼠膀胱 ICCs 细胞与 DO 膀胱扫描 ICCs 细胞进行形态学对比研究发现,2 组 ICCs 细胞超微形态上也有明显差异,正常对照组 ICCs 细胞呈梭行,有少量突起,DO 组 ICCs 细胞胞体成圆形或多角形,伸出多个细长突起相互连接成网状。正是因为突起增多互相连接,很可能使细胞间的通讯增加,即一旦 ICCs 细胞兴奋,可以有效的将信号在细胞间相互传递,同时增加了有效传递,从而引起膀胱组织的兴奋收缩,起到起搏作用。提示大鼠膀胱 ICCs 细胞具备作为神经末梢调控逼尿肌“中转站的结构基础”。

牵张负荷和起搏细胞理论上讲必然存在联系,一个是兴奋的枢纽,一个是兴奋的调控条件;牵张负荷对膀胱兴奋性的调控有可能通过调控 ICCs 细胞来实现。本研究发现 PBOO 术后的大鼠膀胱 ICCs 细胞在 c-kit 基因水平表达较正常对照组均有增多,尤其是当逼尿肌过度活动时,ICCs 细胞 c-kit 表达增高显著。因此,明确了 c-kit 介导的膀胱 ICCs 细胞在逼尿肌过度活动时发生机制中的作用,表明膀胱 ICCs 细胞可能在膀胱中具有起搏功能。我们还发现在进行梗阻干预后,仪器多次检测,有 3 只大鼠排尿压力曲线是正常的,说明未发生 DO,但 RT-PCR 检测显示该组(即非 DO 组)在 c-kit 在基因水平表达较正常对照组也有增高,只是相对于 DO 组较弱,很可能是因为该细胞功能改变未达到一定的阈值所致。从这一角度也表明了该细胞功能的改变与膀胱功能的改变密切相关。

本研究提示 ICCs 细胞与膀胱的兴奋性密切相关,细胞形态的改变,c-kit 表达的升高,提示其兴奋性提高,并可能是导致 DO 膀胱运动异常亢进的原因,也提示 ICCs 细胞具有作为潜在起搏细胞的条件。以此为切入点对膀胱起搏点假设进行逐步深入的探讨,将可能为我们深入研究膀胱兴奋性,以及兴奋性异常的机制和临床应用提供崭新思路。

参考文献:

[1] Ballaro A, Mundy A R, Fry C H, *et al*. Electromyographic detection of purinergic activity in Guinea pig detrusor smooth muscle[J]. J Urol, 2003, 169(1):377 - 381.

[2] 路 扬, 李龙坤, 王永权. 牵张负荷对大鼠膀胱 ICCs 细胞数量及 c-kit 表达的影响[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(7): 570 - 573.

[3] Malmgren A, Sjogren C, Uvelius B, *et al*. Cystometrical evaluation of bladder instability in rats with infravesical outflow obstruction[J]. J Urol ,1987,173(6): 1291 - 1294.

[4] Rachdi L, El-Ghazi L, Bernex F, *et al*. Expression of the receptor tyrosine kinase KIT in mature beta-cells and in the pancreas in development[J]. Diabetes, 2001, 50(9): 2021 - 2028.

[5] Sanders K M, Koh S D, Ward S M. Interstitial cells of cajal as pacemakers in the gastrointestinal tract[J]. Annu Rev Physiol, 2006, 68: 307 - 343.

[6] Orsola A, Estrada C R, Nguyen H T, *et al*. Growth and stretch response of human exstrophy bladder smooth muscle cells: molecular evidence of normal intrinsic function[J]. BJU Int, 2005, 95(1):144 - 148.

[7] 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.

[8] Sanders K M, Ordog T, Koh S D, *et al* . Development and plasticity of interstitial cells of Cajal[J]. Neurogastroenterol Motil, 1999, 11(5): 311 - 338.

(编辑 王 红)