论著

文章编号:1000-5404(2009)23-2306-03

胆碱能受体在大鼠膀胱ICC样细胞的表达

贾卓敏,张永革,方 强,王永权,卢根生,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 探讨胆碱能受体(muscarinic acetylcholine receptors,M受体)各亚型在大鼠膀胱ICC样细胞(interstitial cells of Cajal,ICC)的表达及意义。**方法** 制备SD大鼠膀胱组织铺片,通过免疫荧法检测大鼠膀胱组织内ICC样细胞分布情况,并进一步采用免疫荧光双标法(c-kit抗体及M受体亚型抗体)检测膀胱ICC样细胞上M受体亚型的表达。**结果** 在大鼠膀胱肌层及肌间发现膀胱ICC样细胞呈散在或者彼此连接的分布,M受体的5种亚型中,ICC样细胞上不表达M_1、M_4、M_5受体亚型,表达M_2和M_3两种受体亚型。**结论** 胆碱能神经可能通过激活膀胱ICC样细胞上胆碱能受体来调节膀胱功能。

关键词: ICC样细胞;膀胱;胆碱能受体

中图法分类号: R322.62;R329.26;R334.3 **文献标识码:** A

Expression of muscarinic acetylcholine receptors on Cajal-like cells in stretched prepared rat bladder

JIA Zhuo-min, ZHANG Yong-ge, FANG Qiang, WANG Yong-quan, LU Gen-sheng, SONG Bo (Urinary Surgery Research Institute, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the expressions of subtypes of muscarinic acetylcholine receptors and to explore the roles of the receptors on interstitial cells of Cajal-like cells of SD rat bladder. Methods Stretched preparations of SD rat bladder were made firstly. Then immunohistochemical analyses with c-Kit as markers for ICC-like cells were performed. Immunoflurorescence (double-label) was used to detect the expression of subtypes of the receptors in ICC-like cells. Results C-kit positive cells in SD rat bladder were mainly distributed at the edge of smooth muscle bundles and among smooth muscle scattered or conjoining in network. We found that there were only M_2 and M_3 receptor subtypes but no M_1, M_4 or M_5 on ICC-like cells of SD rat bladder. Conclusion ICC-like cells may be activated by cholinergic nerve via cholinergic receptors on them to modulate the bladder function.

Key words: interstitial cells of Cajal; bladder; muscarinic acetylcholine receptors

Cajal细胞(Interstitial cells of Cajal,ICC)是一类在胃肠道发现的具有起搏胃肠道慢波、传递电信号、介导肠神经与平滑肌之间调节信号的作用,在胃肠道平滑肌节律性收缩功能调节中起重要作用的细胞[1]。近年来研究证实人及豚鼠膀胱内同样存在形态学及免疫学上类似的ICC样细胞(ICC-like cells)[2,3]。虽然泌尿道ICC样细胞在形态上及功能上与胃ICC样细胞具有一些共同的特性,但是胃肠道ICC样细胞所具有的特殊功能在泌尿道上还没有同这类细胞联系上。免疫荧光标记显示肌间ICC样细胞的位置同壁内神经较为接近[3]。而膀胱的主要兴奋性神经是副交感神经,并且在排尿过程中胆碱能神经的活化激活胆碱能受体可以引起膀胱逼尿肌的收缩。那么膀胱ICC样细胞上是否具有胆碱能受体来接受胆碱能神经的激活?我们采用免疫荧光组织化学方法观察大鼠膀胱ICC样细胞的分布及胆碱能受体亚型的表达,为探明胆碱能受体激活膀胱ICC样细胞的分子机制提供实验依据。

基金项目: 国家自然科学基金(30700270);重庆市自然科学基金(CSTC2007BB0091)

Supported by the National Natural Science Foundation of China(30700270) and the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2007BB0091)

作者简介: 贾卓敏,男,吉林省白城市人,博士,主治医师,主要从事膀胱功能障碍方面的研究。E-mail:52962676@163.com

通信作者: 方 强,E-mail: fangqiang@tmmu.edu.cn

收稿日期: 2009-06-24;**修回日期:** 2009-08-25

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 选用SD大鼠10只,雌雄不拘,体质量200~250 g(第三军医大学实验动物中心)。

1.1.2 试剂与仪器 山羊抗鼠c-Kit多克隆抗体及兔抗鼠M_1、M_2、M_3、M_4和M_5多克隆抗体均购自Santa Cruz生物技术公司,荧光二抗选用molecular probes公司的Alex fluo 488(驴抗羊、绿色荧光)及Alex Fluo 594(驴抗兔、红色荧光)。其余相关试剂均购自北京中杉生物技术有限公司。激光共聚焦显微镜(Leica,TCSSP-2,第三军医大学中心实验室)。

1.2 方法

1.2.1 组织铺片的制作 大鼠1%戊巴比妥钠麻醉后,将1 mm粗导尿管从尿道口插入大鼠膀胱,在膀胱颈部结扎,将4%多聚甲醛自膀胱颈处注入膀胱内,维持充盈状态30 min后置入4%多聚甲醛溶液中固定6~8 h后,纵行剪开膀胱壁,在解剖显微镜下,小心剔除黏膜层,将肌层组织制成含1~2层肌

细胞的铺片用于检测 ICC 样细胞的分布情况[4,5]。

1.2.2　组织铺片 c-Kit 免疫荧光染色　　组织铺片经 0.01 mol/L PBS 充分漂洗后,1% BSA 孵育 1 h 后加入 c-Kit 抗体(稀释浓度 1∶300),37 ℃孵育 1 h 后置入 4 ℃孵育 12 h,用 0.01 mol/L PBS 漂洗 5 min × 3 次,加入 Alex Fluo 488 荧光二抗(稀释浓度 1∶200) 37 ℃ 1 h。加入 DAPI 进行细胞核染色室温 10 min,0.01 mol/L PBS 漂洗 5 min ×3 次,甘油剂封片,激光共聚焦显微镜观察[4,5]。

1.2.3　c-Kit、胆碱能受体免疫荧光双标　　组织铺片经 0.01 mol/L PBS (pH 7.5)漂洗 5 min × 3 次,1% BSA 封闭37 ℃ ×1 h,分别加入 c-Kit 多克隆抗体和 M 抗体中的一种(稀释浓度1∶300),37 ℃孵育 1 h 后置入 4 ℃孵育 12 h,0.01 mol/L PBS 漂洗 5 min × 3 次,加入 Alex Fluo 594 驴抗兔 IgG 以及 Alex Fluo 488 驴抗羊 IgG(稀释浓度 1∶200),37 ℃孵育 1 h,0.01 mol/L PBS 漂洗 5 min × 3 次,加入 DAPI 进行细胞核染色室温 10 min,0.01 mol/L PBS 漂洗 5 min × 5 次,甘油剂封片,激光共聚焦显微镜下观察。

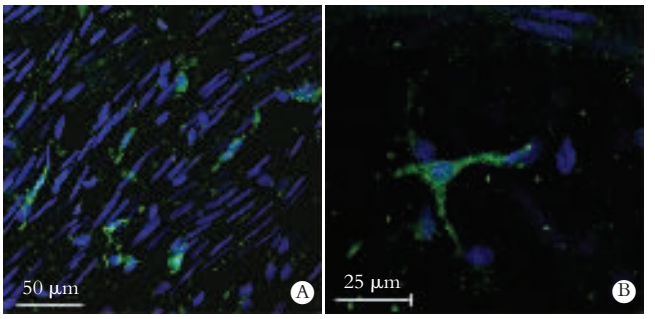
1.3　对照实验

阴性对照采用抗体稀释液(100 mg BSA + 10 ml 0.3% Triton-X100 溶液)代替一抗,阳性对照分别采用脑组织冰冻切片表达 M_1 ~ M_5受体,小肠组织撕片表达 c-kit 抗体。

2　结果

2.1　c-Kit 免疫荧光染色结果

图1A为膀胱逼尿肌组织铺片c-kit免疫荧光组织化学染色后在激光共聚焦显微镜下观察到的 c-kit 阳性细胞,其形态学特点为仿锤状或星状,核为椭圆形、大而明显,有 2 ~ 5 个长的突起。图 1B 为放大的单个 c-kit 阳性细胞,见有 3 个细胞分支。所有阴性对照标本均为阴性。

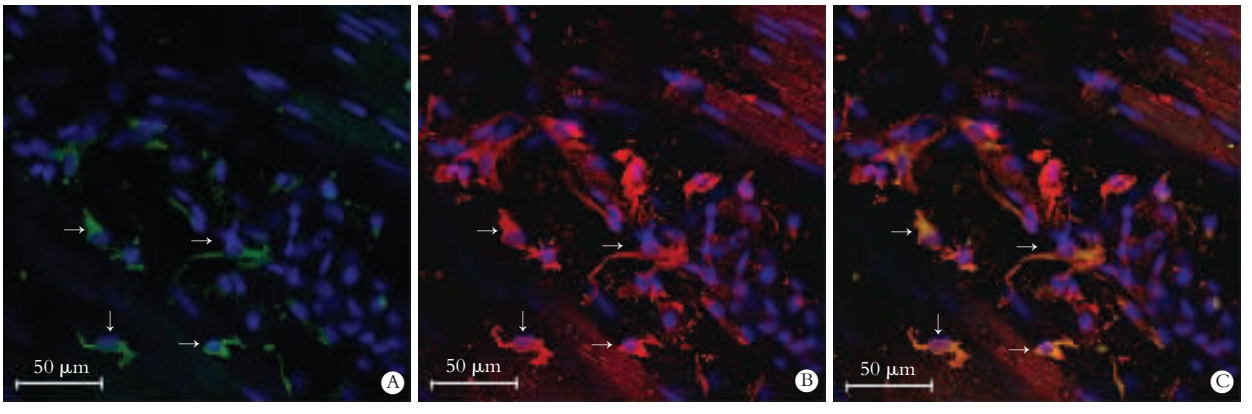


A:肌间散在分布的膀胱 ICC 样细胞;B:放大的膀胱 ICC 样细胞

图 1　激光共聚焦显微镜观察 SD 大鼠膀胱内散在分布的肌束间 ICC 样细胞

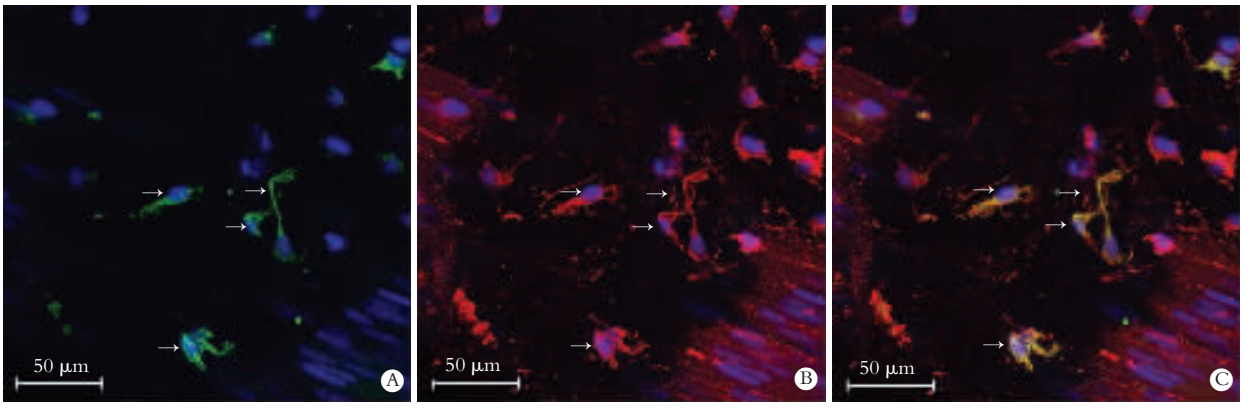
2.2　SD 大鼠膀胱 ICC 样细胞上胆碱能受体亚型的表达

c-Kit 阳性的细胞呈现绿色荧光,而 M 受体亚型阳性的细胞呈现红色荧光,如果这两种荧光都在同一个细胞上共存,使之表现出混合色橘黄色的荧光,细胞核呈蓝色荧光,免疫双标的结果显示说明,在 5 种胆碱能受体亚型中,膀胱 ICC 样细胞上同时有 M_2受体(图 2)和 M_3受体(图 3)蛋白抗原的表达,未见 M_1受体、M_4受体、M_5受体蛋白的表达。由此说明 SD 大鼠膀胱 ICC 样细胞上存在 M_2受体和 M_3受体分布。



A:c-kit 受体表达;B:M_2受体表达;C:ICC 样细胞上 M_2受体表达　　↑:ICC 样细胞

图 2　激光共聚焦显微镜观察 SD 大鼠膀胱 ICC 样细胞上 M_2受体的表达



A:c-kit 受体表达;B:M_3受体表达;C:ICC 样细胞上 M_3受体表达　　↑:ICC 样细胞

图 3　激光共聚焦显微镜观察 SD 大鼠膀胱 ICC 样细胞上 M_3受体的表达

3 讨论

电镜仍然被认为是鉴定ICC样细胞和说明其超微结构特征的金标准,但是电镜不能显示不同组织的细胞的分布,此外电镜不能作为常规实验室检测和诊断技术,所以当发现c-kit后ICC样细胞的生物研究得到很大发展。c-kit是一种编码酪氨酸激酶受体kit的原癌基因[6]。在胃肠道内c-kit只在ICC样细胞和肥大细胞上唯一表达[7]。随着c-kit受体的标记或者c-kit mRNA的检测来鉴定ICC样细胞方法的成熟,极大促进了我们对ICC样细胞网络结构和分布的理解,并且提高了对ICC样细胞同运动神经元及平滑肌之间关系的认识。目前在泌尿系统,c-Kit阳性的ICC样细胞已经发现存在与小鼠肾盂部输尿管的纵形肌内和环形肌层外部,豚鼠的膀胱和兔尿道[3,8,9]。我们的研究也发现ICC样细胞存在大鼠膀胱内,位于肌束边缘的c-kit阳性ICC样细胞多数紧贴肌束膜分布,大多呈纺锤形,肌束间也可见到c-kit阳性ICC样细胞,从形态上看以纺锤形为主,间或夹杂些星状细胞,部分肌束间c-kit阳性细胞之间以及肌束间c-kit阳性细胞与肌束边缘c-kit阳性细胞之间彼此以突起相连接。这种类似网络状的结构分布在逼尿肌细胞周围,据此考虑,膀胱ICC样细胞同逼尿肌细胞间可能会有某种通讯连接。

神经递质是神经系统实现对靶器官功能调控的重要分子,膀胱的主要兴奋性神经是副交感神经,Ach为递质的毒蕈碱样胆碱能神经在膀胱功能调控中扮演着非常重要的角色,毒蕈碱样胆碱能受体(M受体)广泛分布于中枢及周围神经组织、心肌、平滑肌和各种腺体,属于G蛋白耦联受体,通过与不同的鸟苷酸调节蛋白(G蛋白)结合引起不同的生理生化效应。其产生作用的不同可能与其存在多种亚型和分布部位不同有关。M受体共有5个亚型,前期研究显示,在大鼠膀胱逼尿肌只含有M_2和M_3受体,在排尿过程中胆碱能神经的活化激活胆碱能受体引起膀胱平滑肌的收缩,其中,M_2受体是通过抑制鸟苷酸环化酶,减少cAMP的生成,抑制β-肾上腺素能神经对膀胱的舒张作用来完成的,而M_3受体是通过激活PLC促进磷脂酰肌醇(phosphatidylinositol,PI)分解产生IP3和DG双信使进一步导致细胞内Ca^{2+}升高引起逼尿肌收缩[10],对膀胱收缩起主导作用。

Davidson等[11]通过c-Kit和神经特异性标志物PGP9.5(protein gene product 9.5)双标法证实膀胱ICC样细胞与神经末梢关系密切。我们的研究显示ICC样细胞分布于膀胱逼尿肌肌间及肌束边缘,McCloskey等[12]利用Fluo-4/AM荧光示踪剂能与钙离子结合产生钙荧光,通过激光共聚焦显微镜观察发现豚鼠膀胱逼尿肌束边缘的ICC样细胞能产生自发性电活动,提示这类细胞可能具有自发性活性。我们通过c-kit抗体和M受体亚型抗体双标法发现,在大鼠膀胱ICC样细胞上存在M_2和M_3受体亚型,据此我们推测胆碱能神经纤维到ICC样细胞再到逼尿肌细胞间可能存在一定的调控机制,ICC样细胞上的M_2和M_3受体极有可能作为胆碱能神经控制膀胱功能的另一重要通路,胆碱能神经在直接控制逼尿肌细胞收缩的基础上,还可以通过ICC样细胞作为中转站将信号传递到逼尿肌细胞,或者通过ICC样细胞来调控逼尿肌功能进而完成膀胱的生理功能。所以,进一步从功能学角度证实上述假设,将为膀胱功能性疾病如逼尿肌不稳定的治疗提供全新的切入点。

参考文献:

[1] Ward S M, Sanders K M, Hirst G D. Role of interstitial cells of Cajal in neural control of gastrointestinal smooth muscles[J]. Neurogastroenterol Motil, 2004, 16(Suppl 1): 112 - 117.

[2] 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.

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

[4] 方 强, 杨 景, 潘进洪, 等. P2X嘌呤受体在大鼠膀胱ICCs细胞中的表达[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(7): 564 - 566.

[5] 封建立, 方 强, 丁砺蠡, 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] Romert P, Mikkelsen H B. c-kit immunoreactive interstitial cells of Cajal in the human small and large intestine[J]. Histochem Cell Biol, 1998, 109(3): 195 - 202.

[7] Torihashi S, Ward S M, Sanders K M. Development of c-kit-positive cells and the onset of electrical rhythmicity in murine small intestine[J]. Gastroeneterology, 1997, 112(1): 144 - 155.

[8] Sergeant G P, Hollywood M A, McCloskey K D, *et al*. Role of IP(3) in modulation of spontaneous activity in pacemaker cells of rabbit urethra[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2001, 280(5): C1349 - C1356.

[9] Pezzone M A, Watkins S C, Alber S M, *et al*. Identification of c-kit-positive cells in the mouse ureter: the interstitial cells of Cajal of the urinary tract[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2003, 284(5): F925 - F929.

[10] Igawa Y. Discussion: functional role of M(1), M(2), and M(3) muscarinic receptors in overactive bladder[J]. Urology, 2000, 55(5A Suppl): 47 - 49.

[11] 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.

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

(编辑 吴培红)