文章编号:1000-5404(2010)01-0023-03

论著

ICCs细胞在糖尿病大鼠膀胱中的密度分布及其对糖尿病膀胱功能的影响

邓建平,沈文浩,张永革,贾卓敏,方 强,宋 波 (400038 重庆,第三军医大学西南医院全军泌尿外科研究所)

[摘要] **目的** 观察ICCs细胞(interstitial cells of Cajal,ICCs)在糖尿病(diabetes mellitus,DM)大鼠膀胱中的密度分布情况,探讨其在糖尿病膀胱逼尿肌肌条兴奋性改变以及膀胱功能改变中的作用。**方法** 腹腔注射链脲佐菌素(streptozotocin,STZ)建立糖尿病SD大鼠模型。12周后,行充盈性膀胱测压,比较DM组大鼠与对照组膀胱残余尿量、最大膀胱容量、最大膀胱压力及膀胱顺应性变化;行离体逼尿肌肌条实验,比较肌条兴奋性与对照大鼠的差异;应用免疫组织荧光染色法检测2组大鼠膀胱ICCs细胞的密度分布情况。**结果** DM组大鼠膀胱残余尿量[(0.50±0.28)ml]、最大膀胱容量[(1.72±0.73)ml]和膀胱顺应性[(0.04±0.02)ml/cmH_2O]较对照组明显增加($P<0.01$),而最大膀胱压力明显降低($P<0.05$)。DM组逼尿肌肌条收缩频率较对照组明显降低($P<0.05$),而且收缩幅度有降低趋势。DM大鼠膀胱ICCs细胞数量较对照组明显减少($P<0.01$)。**结论** DM大鼠膀胱中ICCs细胞数量减少可能是糖尿病性膀胱病逼尿肌肌条兴奋性降低及在体膀胱功能改变的重要原因之一。

[关键词] ICCs细胞;糖尿病;糖尿病性膀胱病;c-kit受体
[中图法分类号] R329.24;R587.2;R334.3 **[文献标志码]** A

Density distribution of interstitial cells of Cajal in bladder of diabetic cystopathy rats and its role in bladder function

Deng Jianping, Shen Wenhao, Zhang Yongge, Jia Zhuomin, Fang Qiang, Song Bo (Urinary Surgery Research Institute, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[Abstract] **Objective** To explore the density distribution of interstitial cells of Cajal (ICCs) in the bladder of rats with diabetes mellitus (DM) and its effects on the excitability of the detrusor and the bladder function. **Methods** Animal models of DM were made in SD rats by intraperitoneal injection of streptozotocin and identified by fast blood glucose over 16.7 mmol/L. There were 2 groups of rats, DM group ($n=20$) and age-matched group ($n=10$). The residual urine volume, the maximum bladder capacity, the maximum bladder pressure and bladder compliance were examined by cystometry and compared between DM group and control group 12 weeks later. The changes of detrusor excitability and contractility compliance were examined by the detrusor strip study *in vitro*. The ICCs in detrusor tissue pieces were detected by immunofluorescent staining. At last, these parameters got from both groups were analyzed with t test. **Results** In diabetic rats, the residual urine volume ($P<0.01$), the maximum bladder capacity ($P<0.01$) and compliance ($P<0.01$) were increased, however the maximum bladder pressure ($P<0.05$) was decreased compared to that in the controls. The contraction frequency ($P<0.05$) and amplitude of strips of diabetic rat bladder were decreased. There were less ICCs in the bladder detrusor of rats with DM than that in controls ($P<0.05$). **Conclusion** ICCs in bladder of rats with DM are significantly decreased, which may play an important role in the changes of the excitability of detrusor and bladder function in DM rats.

[Key words] interstitial cells of Cajal; diabetes mellitus; diabetic cystopathy

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30801146) and the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2009BB5333).
Corresponding author: Song Bo, Tel: 86-23-68754186, E-mail: songbo-08@163.com

糖尿病性膀胱病(diabetic cystopathy,DCP)是糖尿病患者常见的一种泌尿系统并发症,常见症状是由膀胱感觉功能减退、残余尿量增多、排尿期逼尿肌收缩力减弱导致的排尿困难、尿潴留、膀胱输尿管返流及泌尿系感染等,严重影响患者的生活质量。糖尿病(diabetes mellitus,DM)患者中DCP发生率达40%~90%[1]。目前DCP的具体发病机制尚不完全清楚,传统观点认为主要是由糖尿病周围神经病变引起。近年的研究表明,逼尿肌肌源性因素也参与DCP的发病[2]。我们前期研究发现,膀胱ICCs细胞很可能是膀胱逼尿肌自发性兴奋性的起源,并证实ICCs细胞数量与膀胱逼尿肌

[基金项目] 国家自然科学基金(30801146);重庆市自然科学基金(CSTC2009BB5333)
[通信作者] 宋 波,电话:(023)68754186,E-mail:songbo-08@163.com

兴奋性改变呈正相关关系[3]。那么,ICCs 在糖尿病性膀胱病发生中的作用如何?本研究将针对此问题进行初步的探讨。我们采用充盈性膀胱测压、肌条兴奋性和收缩性测定、免疫组化及激光共聚焦等技术,通过对比研究糖尿病大鼠与正常大鼠膀胱中 ICCs 细胞的形态及数量的特征以及膀胱兴奋性和收缩性变化情况,初步探讨 ICCs 细胞与 DCP 的关系及相关机制,旨在为临床治疗提供新的可能靶点。

1 材料与方法

1.1 DM 动物模型的建立

健康雌性清洁级 SD 大鼠 30 只,3 月龄,体质量 250~280 g,购自第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心。分为糖尿病组(DM,$n=20$)和对照组(age-matched controls,AMC;$n=10$)。禁食 12 h 后,将 60 mg/kg 链脲佐菌素(STZ)溶于 3 ml 柠檬酸钠缓冲液(0.1 mol/L,pH 4.2~4.5)中,进行一次性腹腔注射 DM 组大鼠;AMC 组大鼠行一次性腹腔注射 3 ml 柠檬酸钠缓冲液。3 d 后测 2 组大鼠空腹血糖,DM 组大鼠空腹血糖水平大于 16.7 mmol/L 的入选,与 AMC 组大鼠同样条件下饲养 12 周,观察大鼠的饮食、排尿等一般情况。

1.2 残余尿量及充盈性膀胱压力的测定

DM 组和 AMC 组大鼠用戊巴比妥钠(35 mg/kg)腹腔注射达浅麻醉,以硬膜外导管经尿道插入膀胱。轻压下腹部排空膀胱,排出的尿液作为膀胱残余尿量。将导管经三通管与尿动力仪及微量灌注泵相连。标定零点,用生理盐水以 0.2 ml/min 的速度灌注膀胱,用多道生理信号采集系统记录膀胱充盈过程中压力-容积变化情况,记录开始灌注到出现排尿的时间和最大膀胱压力,计算出最大膀胱容量及膀胱顺应性。

1.3 离体逼尿肌肌条收缩特性检测

选取 DM 组 SD 大鼠 10 只和 AMC 组大鼠 5 只。在充盈性膀胱测压后第 2 天,取出大鼠膀胱,置于 4 ℃ Krebs 营养液中,将其纵行切剪成 10 mm×2 mm 大小的逼尿肌肌条。肌条两端以丝线结扎,下端固定于器官槽底部。肌条全部浸入37 ℃ Krebs 营养液中,上端经拉力传感器连至可调节肌条长度的微调螺栓上,拉力传感器与生理记录仪相连。Krebs 液中通 95% O_2、5% CO_2,肌条平衡 30 min 后,缓慢牵拉肌条至初始张力为 0.75 g,通过 RM6280 生理信号采集处理系统进行记录肌条自发性收缩频率和收缩幅度。

1.4 免疫荧光检测 ICCs 细胞的表达

选取 DM 组大鼠 10 只和 AMC 组大鼠 5 只。用戊巴比妥钠(40 mg/kg)腹腔注射至深度麻醉,以硬膜外导管经尿道插入膀胱。下腹正中切开,结扎双侧输尿管,用 4% 多聚甲醛溶液尽可能充盈膀胱,固定 30 min 后结扎膀胱颈并取下膀胱,浸泡于 4% 多聚甲醛溶液中常温过夜。取膀胱标本,撕去黏膜、浆膜和部分肌层,制成组织铺片行免疫组织荧光染色,具体方法参见文献[4],在激光共聚焦显微镜下观察,2 组分别选取 20 个同等放大倍数视野,记录每个视野 c-kit 阳性细胞的表达,即为 ICCs 细胞数量。

1.5 统计学处理

实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间计量资料比较应用 SPSS 11.5 统计软件进行 t 检验。

2 结果

2.1 DM 大鼠模型建立

3 d 后,AMC 组大鼠诱导前后空腹血糖分别为(5.16±0.83)mmol/L 和(6.06±0.41)mmol/L,无统计学差异($P>0.05$);DM 组大鼠 STZ 诱导前后空腹血糖分别为(5.32±1.05)mmol/L 和(28.59±2.73)mmol/L,诱导后空腹血糖显著升高($P<0.01$),且均明显大于 16.7 mmol/L,大鼠均成模。

2.2 AMC 组和 DM 组大鼠膀胱尿动力学检测

12 周后 AMC 组与 DM 组大鼠膀胱尿动力学指标检测结果见表 1。可见 DM 大鼠较 AMC 组膀胱残余尿量增加、最大膀胱容量增大、最大膀胱压力下降及膀胱顺应性增高,且 2 组检测结果的差异均有统计学意义($P<0.05$,$P<0.01$)。

表 1 12 周后 2 组大鼠尿动力学指标观察结果比较($\bar{x}\pm s$)

组别	残余尿量 (ml)	最大膀胱容量 (ml)	最大膀胱压力 (cmH_2O)	膀胱顺应性 (ml/cmH_2O)
AMC 组	0.50±0.28	1.72±0.73	46.76±6.62	0.04±0.02
DM 组	1.20±0.48[b]	3.31±1.22[b]	35.26±10.46[a]	0.09±0.04[b]

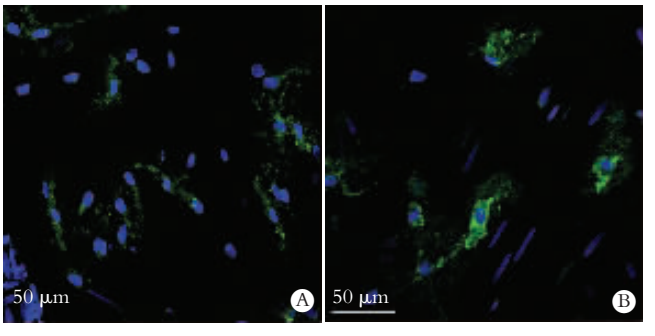
a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与 AMC 组比较

2.3 AMC 组和 DM 组逼尿肌肌条收缩特性的差异

取 AMC 组和 DM 组大鼠膀胱行肌条收缩实验,在初始张力为 0.75 g 时,将 2 组大鼠逼尿肌肌条收缩频率[分别为(4.99±1.01)、(3.74±1.22)次/min]和收缩幅度[(0.54±0.15)、(0.39±2.73)g]进行比较,DM 组大鼠较 AMC 组逼尿肌肌条收缩频率低,有统计学差异($P<0.05$);逼尿肌肌条收缩幅度也有降低趋势,但无统计学差异($P>0.05$)。

2.4 AMC 组和 DM 组膀胱中 ICCs 细胞密度分布差异

AMC 组和 DM 组大鼠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均可以看到 c-kit 阳性的 ICCs 细胞,其形态学特点为纺锤状或星状,核大而明显,有 2~5 个长的突起。2 组标本分别观察 20 个同等放大倍数的视野,计数以每视野观察到的 ICCs 细胞数目为单位,取各视野 ICCs 细胞平均数进行比较。观察结果显示,AMC 组逼尿肌中 ICCs 细胞数[(10.60±3.33)个/视野]较多,DM 组逼尿肌中 ICCs 细胞数[(5.35±1.31)个/视野]较少,差异有统计学意义($P<0.01$)。见图 1。



A:AMC 组;B:DM 组 绿色代表 c-kit 阳性细胞,蓝色代表细胞核

图 1 膀胱 c-kit 阳性细胞免疫荧光组织化学染色 (激光共聚焦显微镜)

3 讨论

实验性糖尿病动物模型不仅对研究DM病因和发病机制有重要意义,而且广泛用于研究DM相关并发症的发病机制。目前国内外使用较多的是通过腹腔注射链脲佐菌素(STZ)建立DM动物模型。STZ可以选择性破坏胰岛β细胞,进而使动物产生糖尿病,其对组织毒性小,动物成模率及存活率高[5]。本实验通过给SD大鼠一次性大剂量腹腔注射STZ(60 mg/kg)诱导DM大鼠模型,3 d后DM组大鼠均出现持久性高血糖,空腹血糖均大于16.7 mmol/L,表明腹腔注射STZ可以成功建立DM大鼠模型。

Esteghamati等[6]对DM患者尿动力学研究发现,膀胱残余尿量、膀胱最大容量、膀胱顺应性及逼尿肌收缩力等指标发生改变。本实验对建模12周后DM大鼠进行尿动力学指标检测,在测压过程中,保证大鼠处于浅麻醉状态,使测压过程更接近于生理状态。结果显示,DM大鼠膀胱残余尿量增加,最大膀胱容量增大及膀胱顺应性增高,最大膀胱收缩压力降低。此与临床DM患者尿动力学改变相似[7]。本实验还在一定的前负荷下检测离体逼尿肌肌条收缩特性,发现离体膀胱逼尿肌在一定前负荷的条件下存在自发性收缩,DM组大鼠逼尿肌肌条自发性收缩频率较AMC组明显降低,收缩幅度也有降低趋势,表明离体DCP逼尿肌兴奋性降低。

已有研究表明,ICCs细胞可能在膀胱逼尿肌兴奋性调控中起重要作用[8]。Piaseczna-Piotrowska等[9]发现巨膀胱-小结肠-肠蠕动不良综合征患者的膀胱ICCs细胞缺乏,可能影响了膀胱中平滑肌细胞间的信息传递、神经传递及自发性电活动的产生,而这些就可能导致该病患者的膀胱出现排尿功能障碍[10]。膀胱出口梗阻(bladder outlet obstruction, BOO)时,膀胱ICCs细胞数量增加,表现为逼尿肌不稳定[11]。在脊髓损伤性排尿功能障碍的研究中,研究者发现骶髓上损伤膀胱中ICCs细胞数量增加,表现为膀胱逼尿肌反射亢进;而骶髓损伤膀胱中ICCs细胞数量减少,表现为膀胱逼尿肌无反射[12]。本实验中离体DCP逼尿肌收缩特性改变亦暗示ICCs细胞在DCP的发病机制中可能起重要作用。因此,我们进一步采用免疫荧光组织化学c-kit染色法[13,14]检测DM组及AMC组大鼠膀胱中ICCs细胞的密度分布变化。结果表明建模12周后,DM大鼠膀胱中ICCs细胞数量较AMC组明显减少。结合DM逼尿肌收缩兴奋性降低,而膀胱顺应性增加,可见ICCs细胞对膀胱兴奋收缩排尿有重要作用。进一步对DM膀胱中ICCs细胞进行功能学研究,将有助于全面阐明糖尿病性膀胱病发病机制,为其治疗提供全新的切入点。

参考文献:

[1] Sasaki K, Yoshimura N, Chancellor M B. Implications of diabetes mellitus in urology[J]. Urol Clin North Am, 2003, 30(1): 1-12.

[2] Vahabi B, Mckay N G, Lawson K, *et al*. Identification of C-Kit positive cells in rat urinary bladder and characterization of their functional role in spontaneous activity in control and diabetic bladders[J]. Eur Urol Suppl, 2008, 7(3): 181.

[3] 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.

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

[5] 黄琛, 顾志峰, 曹晓蕾, 等.1型糖尿病大鼠模型建立及稳定性研究[J]. 现代检验医学杂志, 2007, 22(3):49-51.

[6] Esteghamati A, Rashidi A, Nikfallah A, *et al*. The association between urodynamic findings and microvascular complications in patients with long-term type 2 diabetes but without voiding symptoms[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2007, 78(1): 42-50.

[7] Lee W C, Wu C C, Wu H P, *et al*. Lower urinary tract symptoms and uroflowmetry in women with type 2 diabetes mellitus with and without bladder dysfunction[J]. Urology, 2007, 69(4): 685-690.

[8] Shafik A, El-Sibai O, Shafik A A, *et al*. Identification of interstitial cells of Cajal in human urinary bladder: concept of vesical pacemaker [J]. Urology, 2004, 64(4): 809-813.

[9] Piaseczna-Piotrowska A, Rolle U, Solari V, *et al*. Interstitial cells of Cajal in the human normal urinary bladder and in the bladder of patients with megacystis-microcolon intestinal hypoperistalsis syndrome [J]. BJU Int, 2004, 94(1): 143-146.

[10] 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.

[11] Kubota Y, Kajioka S, Biers S M, *et al*. Investigation of the effect of the c-kit inhibitor Glivec on isolated guinea-pig detrusor preparations [J]. Auton Neurosci, 2004, 115(1-2): 64-73.

[12] 张永革, 贾卓敏, 郑霁, 等. 逼尿肌反射亢进和逼尿肌无反射大鼠膀胱Cajal间质细胞数量变化[J]. 新乡医学院学报, 2009, 26(3): 217-219.

[13] 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.

[14] 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.

(**收稿**:2009-06-17;**修回**:2009-07-16)

(编辑 龙 亮)