论著

文章编号:1000-5404(2010)01-0026-04

大鼠膀胱平滑肌细胞自发性钙瞬变及其机制研究

郑 霁,方 强,陈 可,鄢俊安,潘进洪,卢根生,金锡御,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** 观察大鼠离体活膀胱肌条铺片中平滑肌细胞自发性钙瞬变,并探讨平滑肌细胞自发性钙瞬变产生的机制。**方法** 制作大鼠离体膀胱肌条铺片,生理液灌流保持肌条铺片活性。采用 Fluo-4 负载肌条铺片,激光共聚焦显微镜法观察其中平滑肌细胞自发性钙瞬变,并观察尼莫地平(Nimodipine)、2-氨基乙基二苯硼酸盐(2-aminoethoxydiphenylborate, 2-APB)、雷诺丁(Ryanodine)、毒胡萝卜素(Thapsigargin)对平滑肌细胞自发性钙瞬变的影响,探讨平滑肌细胞自发性钙瞬变产生的机制。**结果** 可见大鼠离体活膀胱肌条铺片中平滑肌细胞产生节律性自发性钙瞬变,自发性钙瞬变幅度(F/F0)和频率分别为(2.20±0.13)和(10.31±2.74)次/min。L 型钙离子通道阻断剂 Nimodipine 能完全抑制平滑肌细胞的自发性钙瞬变,2-APB、Ryanodine 可将钙瞬变幅度分别降低至(1.98±0.14)、(1.81±0.11),而相应的钙瞬变频率则被减少为(8.18±1.97)($P<0.05$,$n=18$)、(7.59±2.16)次/min($P<0.01$,$n=17$)。Thapsigargin 可抑制平滑肌自发性钙瞬变幅度至(1.76±0.11)($P<0.01$,$n=20$),但对钙瞬变频率却无显著影响。**结论** 细胞外钙离子通过 L 型钙离子通道入胞在平滑肌细胞自发性钙瞬变产生中起主要作用,而细胞内钙库中的钙释放入细胞质可能起辅助作用。

[关键词] 平滑肌细胞;自发性钙瞬变;膀胱

[中图法分类号] R322.62; R329.25; R337 **[文献标志码]** A

Properties and mechanism of spontaneous Ca^{2+} transients of smooth muscle cells in rat bladder

Zheng Ji, Fang Qiang, Chen Ke, Yan Jun'an, Pan Jinhong, Lu Gensheng, Jin Xiyu, 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 smooth muscle cells (SMCs) and explore its mechanism in the rat bladder. **Methods** Single layer of smooth muscle bundles attached to the serosal layer were prepared and superfused with warmed physiological saline to recover and maintain their activity. After spontaneous muscle movements of the tissues were visually observed, the muscle layers were loaded with the fluo-4 and then spontaneous Ca^{2+} transients of SMCs in the muscle layers were observed by confocal laser scanning microscopy. Nimodipine, 2-aminoethoxydiphenylborate (2-APB), ryanodine and thapsigargin were then used to investigate the mechanism of spontaneous Ca^{2+} transients of SMCs. **Results** Spontaneous Ca^{2+} transients of SMCs in the smooth layers were successfully detected. Amplitude (F/F0) and frequency of spontaneous Ca^{2+} transients of SMCs in the smooth layers were (2.20±0.13) and (10.31±2.74) times/min. Spontaneous Ca^{2+} transients of SMCs were completely abolished by nimodipine. Amplitude and frequency of spontaneous Ca^{2+} transients were significantly reduced to (1.98±0.14) and (8.18±1.97) times/min respectively by 2-APB ($P<0.05$, $n=18$). Similarly, amplitude and frequency of spontaneous Ca^{2+} transients of SMCs were significantly decreased to (1.81±0.11) and (7.59±2.16) times/min respectively by ryanodine ($P<0.01$, $n=17$). Amplitude of spontaneous Ca^{2+} transients were notably suppressed to (1.76±0.11) ($P<0.01$, $n=20$) by thapsigargin. **Conclusion** SMCs generate spontaneous Ca^{2+} transients *via* extracellular Ca^{2+} entry through L-type Ca^{2+} channels, which may be supported by Ca^{2+} release from intracellular Ca^{2+} stores.

[Key words] smooth muscle cells; spontaneous Ca^{2+} transients; bladder

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30672093, 30670776). Corresponding author: Song Bo, Tel: 86-23-68754186, E-mail: songb-mr@vip.sina.com

[基金项目] 国家自然科学基金(30672093,30670776)

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

逼尿肌不稳定(detrusor instability, DI)是泌尿科常见的排尿功能障碍性疾病之一,严重影响患者的生活质量。20 世纪 80 年代后期至今,DI 的治疗一直受胆碱能神经超敏等神经源性学说的指导,虽有许多新药进入临床,但总的来看疗效并无明显的提高[1]。要提高 DI 的治疗效果,可能需要从研究其他的发病机制入手。膀胱平滑肌具有自发性兴奋收缩的能力,且逼尿肌组织兴奋性的改变是导致 DI 发生的重要原因之一[2,3],但逼尿肌自发性兴奋产生的具体机制仍不清楚。本实验以离体具有活性的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的方法观察组织铺片中平滑肌细胞自发性钙瞬变,并检测尼莫地平(Nimodipine)、2-氨基乙基二苯硼酸盐(2-aminoethoxydiphenylborate, 2-APB)、雷诺丁(Ryanodine)、毒胡萝卜素(Thapsigargin)对平滑肌细胞自发性钙瞬变的影响,探讨平滑肌细胞自发性钙瞬变产生的机制。

1 材料与方法

1.1 主要材料和试剂

Fluo-4 及 F127 购自美国 Molecular probes 公司,Nimodipine, 2-APB、Ryanodine、Thapsigargin 购自美国 Sigma 公司。JG-23 Chamber(美国 Warner 公司),IPC/IPC-N 蠕动泵 (瑞士 Ismatec 公司), FV-500 激光共聚焦显微镜(日本 Olympus 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 膀胱组织铺片的制作 参照 Hashitani 等[4]的方法制作膀胱铺片。选择体质量 200 ~ 250 g 的 3 月龄雌性 SD 大鼠,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 层肌肉组织于膀胱浆膜层上。

1.2.2 膀胱组织铺片 Fluo-4 负载 参照 Hashitani 等[4]的方法,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,使其负载 Fluo-4 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。

1.2.3 组织铺片中平滑肌细胞自发性钙信号检测 首先观察组织铺片中的平滑肌细胞中的自发性钙信号情况,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)软件分析平滑肌中自发性钙瞬变。

1.2.4 药物的添加及生理液的成分 对照组为未加药组,Nimodipine 组、2-APB 组、Ryanodine 组、Thapsigargin 组为相应药物作用组,药物的添加均通过 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信号的影响。生理液(physiological saline)的成分为: NaCl 120 mmol/L, KCl 4.7 mmol/L, $MgCl_2$ 1.2 mmol/L, $CaCl_2$ 2.5 mmol/L, $NaHCO_3$ 15.5 mmol/L, KH_2PO_4 1.2 mmol/L 和 glucose 11.5 mmol/L (pH 7.4), 并持续通 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。

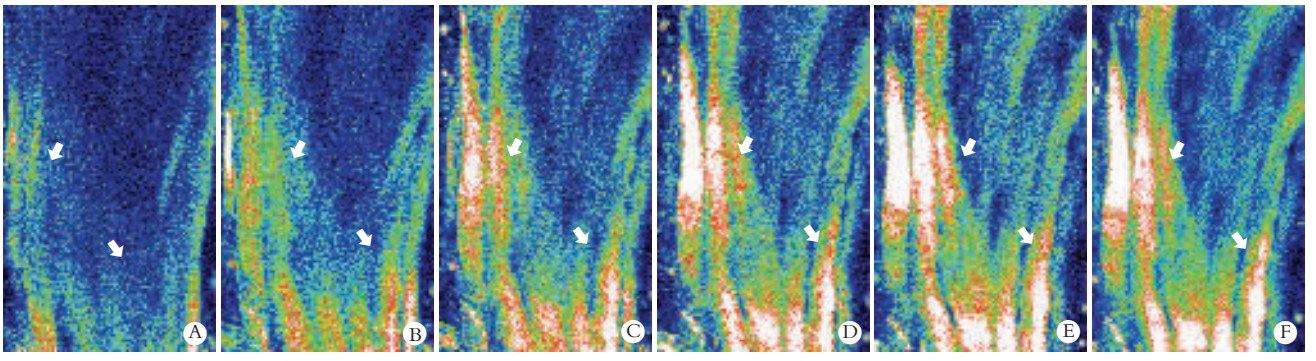
1.3 统计学处理

荧光强度和钙在细胞内的浓度波动成正比,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 F/F0 的变化。数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 11.0 统计软件进行 t 检验。

2 结果

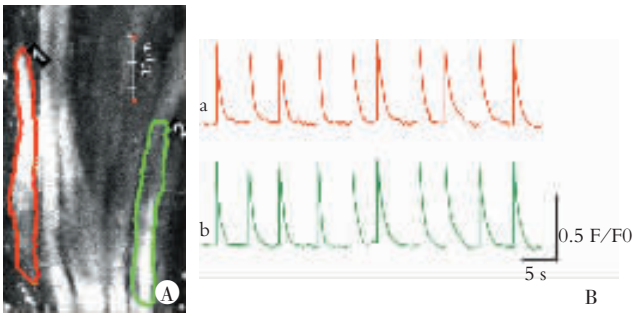
2.1 膀胱铺片平滑肌细胞自发性钙信号的检测

膀胱组织铺片刚完成 Fluo-4 负载时,也可在组织铺片的平滑肌细胞中观察到自发性钙瞬变,但此时的自发性钙瞬变没有节律性,同一个肌束中相邻的平滑肌细胞钙瞬变频率多不一致。经过 20 ~ 30 min 的热生理液灌流,可观察到同一肌束中平滑肌细胞频率一致的自发性钙瞬变。图 1 是激光共聚焦显微镜高速扫描同一区域所获得的 1 组照片,图 1 中每幅图片的间隔约为 180 ms,可见平滑肌细胞中钙荧光强度逐渐升高(高峰为图 1E),随后逐渐回落(图 1F)。利用 Fluoview FV10-ASW 选定肌束两侧各一平滑肌细胞对其自发性钙瞬变进行分析,可以看到平滑肌细胞自发性钙瞬变呈节律性发生,肌束中平滑肌细胞的钙瞬变同步一致(图 2)。



A ~ F:钙荧光强度逐渐升高,随后逐渐回落(箭头示)

图 1 激光共聚焦显微镜高速扫描记录同一个肌束中多个平滑肌细胞自发性钙瞬变 (标尺:30 μm)



A：Fluoview 软件中选取拟分析的目标平滑肌细胞 1、2：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：A 图中 1 号平滑肌细胞；b：A 图中 2 号平滑肌细胞

图 2 平滑肌细胞自发性 Fluoview 软件钙瞬变分析结果

2.2 Nimodipine、2-APB、Ryanodine、Thapsigargin 对膀胱铺片平滑肌细胞自发性钙信号的影响

对照组（$n=16$）平滑肌细胞自发性钙瞬变幅度（F/F0）为（2.20 ± 0.13），钙瞬变频率为（10.31 ± 2.74）次/min；L 型钙离子通道阻断剂 Nimodipine 可完全抑制膀胱平滑肌自发性钙瞬变（$P<0.01$，$n=18$）。使用 IP3 钙离子通道阻断剂 2-APB（50 μmol/L）、Ryanodine 敏感的钙离子通道阻断剂 Ryanodine（50 μmol/L）后 20 min，平滑肌细胞自发性钙瞬变仍然存在，但钙瞬变幅度分别被降低至（1.98 ± 0.14）（$P<0.05$，$n=18$）、（1.81 ± 0.11）（$P<0.01$，$n=17$），而相应的钙瞬变频率则减少为（8.18 ± 1.97）（$P<0.05$，$n=18$）、（7.59 ± 2.16）次/min（$P<0.01$，$n=17$）。使用平滑肌内质网钙泵抑制剂 Thapsigargin（10 μmol/L）可抑制平滑肌自发性钙瞬变幅度至（1.76 ± 0.11）（$P<0.01$，$n=20$），但对钙瞬变频率却无显著影响，用药后其频率为（9.95 ± 2.22）次/min（$P>0.05$，$n=20$）。

3 讨论

以往对膀胱平滑肌细胞钙瞬变的研究，多以单细胞为研究对象[5]。本研究以离体活膀胱肌条铺片为研究对象，实验条件和实验结果相对更贴近生理状态。我们采用 Fluo-4 负载，激光共聚焦显微镜高速扫描为手段，成功观察到膀胱平滑肌细胞自发性钙瞬变，并对平滑肌细胞自发性钙瞬变产生的机制进行了探讨。

钙离子是细胞内信号转导的第二信使，参与了诸如肌肉收缩、神经传导等多种重要生理活动。目前已知平滑肌内钙主要储存于细胞内质网，钙库中的钙离子分别通过 IP3 受体和 Ryanodine receptor（RyR）通道释放入细胞质，而后再通过内质网上的钙泵（SERCA）重新泵入内质网。本研究结果显示，膀胱平滑肌铺片组织在热的生理液中灌流 30 min 后，平滑肌细胞的自发性钙瞬变与组织的收缩活动密切同步，与文献[6，7]类似，表明平滑肌铺片组织活性较好，保证了平滑肌细胞自发性钙瞬变记录及后续药理研究所获得数据的可靠性。本研究还发现，同一组织铺片中，虽然同一肌束中平滑肌细胞自发性钙瞬变协调一致，但不同的肌束的自发性钙瞬变和收缩活动却缺乏同步性，即使相邻的肌束也是如此。不同肌束收缩活动缺乏同步性，可降低膀胱逼尿肌发生同步收缩的概率，可能是保持膀胱储尿期间平滑肌组织高顺应性的因素之一[8]。

文献[9－11]报道，在气管、尿道、淋巴管平滑肌中，细胞内钙库中的钙释放入细胞质，是平滑肌产生自发性兴奋的主要因素。在膀胱平滑肌单细胞上的研究也取得类似结果，Imaizumi 等[5]发现去极化诱导的细胞内钙瞬变主要是由钙库中的钙释放来完成的。但在豚鼠膀胱肌条中的研究结果发现，细胞外钙入胞和细胞内钙库的钙释放均参与神经兴奋诱导的平滑肌细胞钙瞬变及膀胱逼尿肌的收缩[12]。本研究发现，L 型钙离子通道阻断剂 Nimodipine 能完全抑制平滑肌细胞的自发性钙瞬变，尽管 2-APB、Ryanodine 均可对平滑肌细胞的自发性钙瞬变产生显著影响，但不能完全抑制细胞的自发性钙瞬变，这提示大鼠膀胱自发性钙瞬变主要由细胞外钙离子通过平滑肌细胞膜上的 L 型钙离子通道进入细胞内引起，细胞内钙库中的钙释放可能对自发性钙瞬变起协调和增能的作用。内质网钙泵抑制剂 Thapsigargin 也仅能部分抑制而不能完全消除平滑肌自发性钙瞬变，这进一步证实了细胞外钙入胞是平滑肌细胞自发性钙瞬变产生的主要动力这一推测。

我们也注意到，膀胱组织铺片中同一肌束中自发性钙信号多起源于肌束最外侧的平滑肌细胞。由于目前有不少证据表明膀胱肌束旁存在着类似胃肠道起博细胞的卡哈尔间质细胞（interstitial cells of cajal，ICCs）[13－15]，所以不排除膀胱平滑肌自发性钙瞬变起源于膀胱 ICCs 细胞的可能。后续的研究可从同时观察膀胱平滑肌细胞及 ICCs 细胞的自发性钙瞬变方面入手，分析比较两者自发性钙瞬变特征，探索 ICCs 是膀胱自发性兴奋起源的可能性。

参考文献：

[1] Jiang H H, Song B, Lu G S, *et al*. Loss of ryanodine receptor calcium-release channel expression associated with overactive urinary bladder smooth muscle contractions in a detrusor instability model[J]. BJU Int, 2005, 96(3): 428－433.

[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] Hashitani H, Yanai Y, Suzuki H. 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.
[5] Imaizumi Y, Torii Y, Ohi Y, *et al*. Ca^{2+} images and K^+ current during depolarization in smooth muscle cells of the guinea-pig vas deferens and urinary bladder[J]. J Physiol, 1998, 510(Pt 3): 705 - 719.
[6] Kuo K H, Dai J, Seow C Y, *et al*. Relationship between asynchronous Ca^{2+} waves and force development in intact smooth muscle bundles of the porcine trachea[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2003, 285(6): L1345 - L1353.
[7] 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.
[8] Streng T, Hedlund P, Talo A, *et al*. Phasic non-micturition contractions in the bladder of the anaesthetized and awake rat[J]. BJU Int, 2006, 97(5): 1094 - 1101.
[9] Bramich N J. Electrical behavior of guinea pig tracheal smooth muscle [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2000, 278(2): L320 - L328.
[10] Hashitani H, Hayase M, Suzuki H. Effects of imatinib mesylate on spontaneous electrical and mechanical activity in smooth muscle of the guinea-pig stomach[J]. Br J Pharmacol, 2008, 154 (2): 451 - 459.
[11] Von-der-Weid P Y, Rahman M, Imtiaz M S, *et al*. Spontaneous transient depolarizations in lymphatic vessels of the guinea pig mesentery: pharmacology and implication for spontaneous contractility[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008, 295(5): H1989 - H2000.
[12] Hashitani H, Bramich N J, Hirst G D. Mechanisms of excitatory neuromuscular transmission in the guinea-pig urinary bladder[J]. J Physiol, 2000, 524(Pt 2): 565 - 579.
[13] 李龙坤, 宋波. 膀胱ICCs细胞与逼尿肌兴奋性关系研究现状[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(7): 555 - 557.
[14] McCloskey K D, Anderson U A, Davidson R A, *et al*. Comparison of mechanical and electrical activity and interstitial cells of Cajal in urinary bladders from wild-type and W/Wv mice[J]. Br J Pharmacol, 2009, 156(2): 273 - 283.
[15] 郑霁, 贾卓敏, 张永革, 等. 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[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(10): 918 - 921.

(**收稿**:2009-03-12;**修回**:2009-04-20)
(编辑 龙 亮)

文章编号:1000-5404(2010)01-0029-01

个案与短篇

EB病毒相关外周T细胞淋巴瘤1例

刘 瑜 (400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所血液科)

[关键词] 淋巴瘤;EB病毒感染;化疗
[中图法分类号] R733.4 **[文献标志码]** B

1 临床资料

患者,男性,55岁,以"反复颈部淋巴结肿大2年余,复发伴进行性增大3个月"入院。患者于2年前始出现鼻阻,受凉后症状明显并加重,伴有流脓涕及嗅觉减退,反复予以鼻炎治疗,病情无好转,上述症状加重,在我院耳鼻喉科就医,见鼻黏膜充血,右侧鼻腔狭窄,右侧中鼻道、双侧下鼻道见大量脓性分泌物,双侧总鼻道后端见暗红色息肉样新生物,表面不光滑部分由鼻咽部突入鼻腔;多次鼻腔、鼻咽部新生物活检:鼻腔淋巴组织增生,慢性炎症,散在异形细胞,高度可疑NK/T细胞淋巴瘤。遂入住我科诊治。查体:颈部、腹股沟多个肿大淋巴结,最大约5.0 cm×5.0 cm;胸、腹部CT检查无异常;再次行右侧颈部、左侧腹股沟淋巴结活检:(鼻腔、左侧腹股沟淋巴结)EB病毒相关淋巴组织不典型增生;血常规、骨髓检查无异常;EB病毒DNA(阳性)。患者EB病毒相关淋巴组织不典型增生诊断明确,予以抗炎、抗病毒治疗,上述症状好转出院。出院后因受凉颈部淋巴结反复增大,但抗炎治疗有效;院外多次复查EB病毒DNA(+)。2009年3月,患者因劳累,双侧颈部淋巴结进行性增大,抗炎治疗无效。2009年6月再次入院,肝炎1号检查示:乙肝e抗体(+)、乙肝核心抗体(+)、乙肝表面抗原(+);鼻窦、鼻咽部CT示:①鼻咽部软组织饱满,双侧上颌窦见少许黏膜增厚;②双侧颈部多发肿大淋巴结。再次左侧颈部淋巴结活检示:送检颈部淋巴结结构破坏,T区细胞增生活跃,免疫组化CD21(-)、CD30(-)、CD2(-)、CD5(+)、CD7(±)、CD4(+)、CD8(+)、Ki-67(约30%)。诊断:颈部淋巴结形态符合非霍奇金T细胞淋巴瘤,考虑外周T细胞淋巴瘤(非特殊类型)。复查骨髓:①骨髓增生活跃;②淋巴肉瘤细胞占2.0%。患者诊断明确后,予以CTOP、CTOPE方案各联合化疗2个疗程,第3个疗程结束后,患者肿大浅表淋巴结完全消失。第1疗程化疗后复查骨髓未见淋巴肉瘤细胞;外周T细胞淋巴瘤属侵袭性淋巴瘤,预后差。患者对化疗敏感,化疗顺利,已予CTOPE方案动

(下转45页)

[通信作者] 刘 瑜,电话:(023)60633676,E-mail:cqyuliu@163.com