论著

文章编号:1000-5404(2009)22-2214-03

Cajal间质细胞在输尿管平滑肌自发性收缩中的作用

葛 亮,方 强,熊智勇,宋 波,李为兵 (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Glivec特异性地阻断Cajal间质细胞后观察豚鼠输尿管平滑肌肌条自发性收缩活动的变化,从功能学上探讨Cajal间质细胞在输尿管平滑肌自发性收缩中的作用。**方法** 采用c-kit免疫荧光化学染色,激光共聚焦显微镜观察豚鼠输尿管组织内的ICCs;通过离体肌条实验观察特异性地阻断ICCs后豚鼠输尿管平滑肌肌条自发性收缩的变化。**结果** c-kit免疫荧光染色显示,在豚鼠输尿管组织中存在c-kit阳性的ICCs。在2.0 g的前负荷下,终浓度为2×10^{-2} mol/L的KCl可诱发对照组肌条出现稳定的自发性收缩,自发性收缩的波幅为(0.104 5±0.021 6) g,频率为(6.8±1.6)次/min;实验组经终浓度为10^{-4} mol/L Glivec孵育30 min后,再给予终浓度为2×10^{-2} mol/L的KCl不能诱发肌条出现明显自发性收缩,更换Kreb's液洗脱Glivec 30 min后,肌条又恢复了自发性收缩,但收缩幅度略有降低。**结论** 输尿管的ICCs在输尿管平滑肌的自发性收缩中起着重要作用,极有可能是输尿管的起搏细胞。

关键词: Cajal间质细胞;豚鼠;输尿管;平滑肌;自发性收缩
中图法分类号: R322.63;R329.28;R337.2 **文献标识码:** A

Role of interstitial cells of Cajal in spontaneous contraction of smooth muscles in guinea pig ureter

GE Liang, FANG Qiang, XIONG Zhi-yong, SONG Bo, LI Wei-bing (Urinary Surgery Research Institute, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the effects of interstitial cells of Cajal in the ureter on the spontaneous contraction of smooth muscles. **Methods** The interstitial Cajal cells of ureter tissue were identified by c-kit immunofluorescence and laser scanning confocal microscopy. Smooth muscle strips were used to study the effect of Glivec on the spontaneous contraction of smooth muscles *in vitro*. **Results** By using immunofluorescence staining, c-kit-positive, ICC-like cells were found in the ureter of guineapigs. With a preload of 2.0 g, KCl (final concentration 2×10^{-2} mol/L) induced stable spontaneous contraction in the smooth muscle strips of control group. The frequency of spontaneous contraction was (6.8±1.6) times/min, and the amplitude was (0.104 5±0.021 6) g. After the smooth muscle strips of experiment group were incubated with Glivec (final concentration 10^{-4} mol/L) for 30 min, KCl (final concentration 2×10^{-2} mol/L) was added into them, but didn't induce spontaneous contraction. Then the Glivec Kreb's solution was substituted with normal Kreb's solution without Glivec. After 30 min, the spontaneous contractions reoccurred in the muscle strips with a slightly decreased amplitude. **Conclusion** ICC-like cells of smooth muscles, which play a very important role in the spontaneous contraction of guinea-pig ureter, are most likely to be the pacemakers of ureter.

Key words: interstitial cells of Cajal; guinea-pig; ureter; smooth muscle; spontaneous contraction

Cajal细胞(Interstitial cells of Cajal, ICC)是胃肠道的起搏细胞。近年来在豚鼠和人的泌尿道的输尿管、膀胱以及尿道相继发现了在形态和功能与胃肠道Cajal细胞非常相似的ICC样细胞(ICC-like cells, ICCs)[1,2],但其功能尚不明确。目前国内外对ICCs的研究多集中在生理,尤其是电生理领域,功能学的研究报道较少。本研究采用酪氨酸激酶受体抑制剂甲磺酸伊马替尼(Glivec)特异性地阻断ICCs后观察豚鼠输尿管平滑肌肌条自发性收缩活动的变化,旨在从功能学上对ICCs在输尿管平滑肌自发性收缩活动中的作用做出初步判断。

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(30670776)
Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China(30670776)
作者简介: 葛 亮,男,江西省丰城市人,硕士研究生,医师,主要从事泌尿外科及普通外科方面的研究。E-mail: geliang_marshal@yahoo.com.cn
通信作者: 李为兵,电话:(023)68765347,E-mail: liweibing@yahoo.com.cn
收稿日期: 2009-06-16;**修回日期:** 2009-07-09

1　材料与方法

1.1　实验动物

清洁级健康 Hartley 豚鼠 23 只,雌雄不限,8 ~ 10 周龄,体质量(361 ±33)g,由第三军医大学实验动物中心提供[许可证号:SCXK(军)2002007]。按照完全随机数字表法分为对照组 10 只,实验组 10 只;余 3 只用于免疫荧光化学染色及阳性对照。

1.2　输尿管标本的制备

1% 戊巴比妥钠(40 mg/kg)腹腔注射麻醉豚鼠,仰卧位固定于大鼠手术台。采用腹正中切口进腹,将输尿管在膀胱入口处剪断,适当加压灌入 4% 多聚甲醛,并在肾盂输尿管交界处结扎输尿管。约 15 min 后待输尿管固定、成形,结扎输尿管下端开口,置于 4 ℃ 4% 多聚甲醛中过夜。剪开输尿管并剥除浆膜、黏膜,将剩余的平滑肌肌层剪成约 5 mm ×5 mm 大小的组织片。

1.3　免疫荧光化学染色

用 0.01 mol/L PBS 液(NaCl 7.05 g, KCl 0.44 g, $MgCl_2$-$6H_2O$ 0.244 g, NaH_2PO_4-$2H_2O$ 0.187 g, $NaHCO_3$ 1.294 g, $CaCl_2$ 0.278 g, 葡萄糖 2.22 g, 双蒸水加至 1 000 ml 后将 pH 值调定至 7.35 ~ 7.45)漂洗组织片 5 min ×3 次后,用 0.3% Triton X-100(100 ml/瓶,美国 Sigma 公司)室温下透化 20 min,再次漂洗后用 1% BSA(10 g/瓶,瑞士 Roche 公司)37 ℃封闭 1 h,放入 1∶400 山羊抗鼠 c-kit 多克隆抗体(200 μg/ml,美国 Santa Cruz 公司)稀释液中 4 ℃孵育过夜,漂洗后放入 1∶200 驴抗山羊荧光二抗(标记 Alexa Fluor 488 绿色荧光,2 mg/ml,美国 Invitrogen 公司)稀释液中 37 ℃避光孵育 1 h,漂洗后用 DAPI 染色液(50 ml/瓶,上海碧云天生物技术研究所)室温下避光孵育 10 min,漂洗后封片(GVA 水溶性封片剂,5 ml/瓶,北京中杉金桥公司)制成玻片上激光共聚焦显微镜(LSM 510 META 激光共聚焦显微镜,德国 Zeiss 公司)检查后结合形态学特点鉴定 ICCs。

1.4　肌条的制备

击打豚鼠头部致昏或致死后立即固定于仰卧位,腹部皮肤剪毛、消毒,采用腹正中切口,剪开皮肤、腹壁肌肉、腹膜,上至胸骨、下至耻骨。在左侧肾盂输尿管交界处以下剪取长度约 1.0 cm 的输尿管,置于 4 ℃ Kreb's 液中备用。操作过程尽量避免对输尿管进行不必要的钳夹和牵拉。

1.5　肌条实验

将平滑肌肌条垂直且无张力固定于装有 9.7 ml 37 ℃ Kreb's 液的平滑肌槽(麦氏皿,容量约 10 ml)中,并通以 95% 的 O_2 和 5% 的 CO_2,肌条下端固定于平滑肌槽底部,上端用丝线和蛙心夹固定于装有一维位移微调器(成都仪器厂)的 JZ 100 型肌肉张力换能器(高碑店市新航机电设备有限公司)上,肌肉张力换能器接 RM 6280C 型多道生理信号采集处理系统(成都仪器厂),选择通道模式为张力,灵敏度为 0.75 g,扫描速度为 2.0 s/div。

1.5.1　对照组　　向平滑肌槽内加入 100 μl Kreb's 液,待肌条在平滑肌槽内平衡 30 min 后,调节一维位移微调器,使肌条张力升至 2.0 g,向平滑肌槽内加入 200 μl 1.0 mol/L KCl 溶液,肌条出现自发性收缩后观察 10 min。记录时间 - 张力曲线。

1.5.2　实验组　　向平滑肌槽内加入 100 μl 0.01 mol/L Glivec(Glivec 胶囊,0.1 g/粒,瑞士 Novartis 制药公司)溶液,待肌条在平滑肌槽内平衡 30 min 后,调节一维位移微调器,使肌条张力升至 2.0 g,向平滑肌槽内加入 200 μl 1.0 mol/L KCl 溶液,观察 20 min。记录时间 - 张力曲线。

1.6　数据测量

取平滑肌肌条自发性收缩最为稳定的 1 min 进行检测,波幅使用 RM 6280 系列多道生理信号采集处理系统 4.2 版软件进行测量。

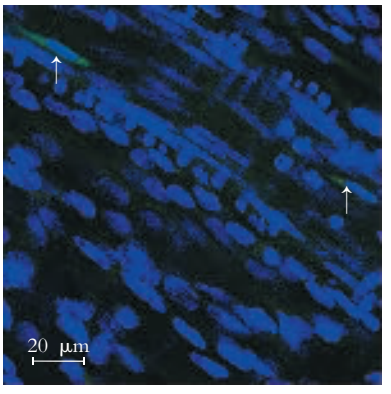
1.7　统计学方法

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析。

2　结果

2.1　c-kit 免疫荧光染色结果

在豚鼠输尿管组织片中,激光共聚焦显微镜下可观察到一类 c-kit 染色阳性的细胞,该类细胞呈梭形或纺锤状,常可见 1 ~ 2 个突起,细胞核大而细胞质相对较少,结合形态学特点可鉴定为 ICCs(图 1)。

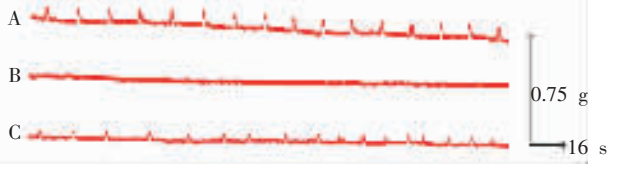


↑:c-kit 染色阳性的细胞

图 1　豚鼠输尿管 ICCs 激光共聚焦显微镜观察

2.2　Glivec 对离体输尿管平滑肌肌条的作用

对照组及实验组各检测 10 根肌条,取肌条收缩幅度和收缩频率的平均值进行统计学处理并比较。结果显示,在 2.0 g 的前负荷下,终浓度为 2×10^{-2} mol/L 的 KCl 可诱发对照组肌条出现稳定的自发性收缩,其收缩幅度为(0.104 5 ±0.021 6) g,频率为(6.8 ± 1.6)次/min;实验组经终浓度为 10^{-4} mol/L Glivec 孵育 30 min 后,再给予终浓度为 2×10^{-2} mol/L 的 KCl,不能诱发肌条出现明显自发性收缩,更换 Kreb's 液洗脱 Glivec 30 min 后,肌条又恢复了自发性收缩,但收缩幅度略有降低。见图 2。



A:对照组; B:实验组; C:实验组肌条 Glivec 洗脱后

图 2　各组豚鼠输尿管平滑肌肌条时间 - 张力曲线

3　讨论

ICC 是胃肠道的慢波起搏细胞,参与起搏信号的产生与传播,并且可以介导神经信号向平滑肌细胞的传送,对胃肠道的动力学功能有着重要的调控作用。ICCs 是指与胃肠道 ICC 细胞具有相似生物学功能和

形态学特点的一类细胞,其典型形态特点与 ICC 细胞类似,即呈纺锤状或星状,细胞核大,卵圆形,染色质分散,细胞质少,通常具有 2 ~5 条长的突起,有时发出多级细支形成网络。ICC 由于其能产生自发性电活动或起搏电流,导致平滑肌的收缩,进而影响器官功能活动,因此有关 ICCs 的研究已经成为许多平滑肌器官动力学功能的热点。有学者认为,ICCs 可能是绝大多数平滑肌器官自发性电兴奋的起源[3]。已经有学者使用透射电镜在膀胱的 ICCs 和逼尿肌细胞之间发现了所谓"电突触"的缝隙连接结构,并且进一步使用荧光漂白恢复实验证实了 ICCs 可以将荧光染料传递给相邻的逼尿肌细胞[4]。可见,泌尿道 ICCs 是存在成为"起搏细胞"起搏平滑肌细胞的结构和功能基础的。我们使用 Glivec 特异性阻断 ICCs 正是为了从功能学的角度对 ICCs 在泌尿道平滑肌的自发性收缩起什么作用进行初步的探讨。

Glivec 的药物成份是甲磺酸伊马替尼,它通过与 ATP 竞争性结合酪氨酸激酶催化部分的核苷酸结合位点,使激酶不能发挥催化活性,底物的酪氨酸残基不能被磷酸化,不能与下游的效应分子进一步作用,是一种小分子的酪氨酸激酶受体抑制剂。我们使用 Glivec 特异性阻断了 ICCs 的输尿管平滑肌肌条,与未使用 Glivec 实施阻断的肌条在同一实验条件下进行检测,对比两者间的差异。结果发现,在终浓度为 10^{-4} mol/L 的 Glivec 溶液的作用下,豚鼠输尿管平滑肌肌条的自发性收缩被完全抑制。同时我们还发现,将实验组被 Glivec 阻断过的输尿管平滑肌肌条在实验结束后更换 Kreb's 液并重新平衡 30 min,然后采用对照组的实验方法,肌条又恢复了自发性收缩。这应该是由于 Glivec 对酪氨酸激酶受体的竞争性抑制是属于可逆性抑制,同时这也进一步说明了实验组平滑肌肌条自发性收缩的消失是使用 Glivec 所引起的。

在取豚鼠的输尿管肌条时,我们采用直接敲击实验动物的头部致昏或致死的方法,而不使用麻醉药物麻醉动物,目的是避免麻醉药物对输尿管自发性收缩产生影响,干扰实验结果的准确性。另一方面,因为本实验的目的在于对比输尿管平滑肌自发性收缩的变化情况,而不是对平滑肌肌条张力数值的具体大小进行研究,故无需兼顾纵形肌和环形肌的张力。所以,我们没有将输尿管肌条制作成大血管药理实验中所常用的螺旋形肌条。

目前,尽管观察输尿管蠕动的检查方法较多,如 X 线动态观察、同位素示踪显影、腔内超声检查、尿流率、肌电图测定等,但对输尿管平滑肌张力进行直接检测和观察的报道并不多见。我们参考国外同类的实验方法[5-8],以 KCl 溶液(终浓度为 2×10^{-2} mol/L)诱发离体输尿管肌条的自发性收缩,效果满意。该方法的主要原理是通过提高细胞外 K^+ 的浓度降低静息电位,从而诱发动作电位。McHale 等[3]曾在体外细胞实验中证实,在使用 Glivec 抑制逼尿肌 ICCs 后,逼尿肌平滑肌细胞的收缩受到了明显抑制。Golenhofen 等[9]发现,应用河豚毒素后并不能使离体的输尿管停止自发性蠕动;Teele 等[10]应用多种神经阻滞剂后也仍然无法使离体的输尿管停止自发性蠕动。可见,输尿管平滑肌的蠕动,也就是输尿管的自发性收缩并不是由神经因素所诱发的。那么,在排除了神经细胞起搏输尿管平滑肌的可能性后,是什么细胞使得输尿管平滑肌出现自发性收缩呢? 根据本研究的输尿管平滑肌离体肌条实验结果,结合泌尿道 ICCs 透射电镜下的超微结构,我们认为输尿管的 ICCs 极有可能是输尿管平滑肌自发性收缩的起源,进一步从细胞电生理角度予以证实将有助于全面阐明 ICCs 在输尿管收缩功能中的作用。

参考文献:

[1] Smet P J, Jonavicius J, Marshall V R, *et al*. Distribution of nitric oxide synthase-immunoreactive nerves and identification of the cellular targets of nitric oxide in guinea-pig and human urinary bladder by cGMP immunohistochemistry[J]. Neuroscience, 1996, 71(2): 337 -348.

[2] 钟 晓, 李为兵, 方 强, 等. ICC 样细胞在正常豚鼠上尿路的分布及对平滑肌收缩的影响[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(6): 495 -497.

[3] McHale N, Hollywood M, Sergeant G, *et al*. Origin of spontaneous rhythmicity in smooth muscle[J]. J Physiol, 2006, 570(Pt 1): 23 -28.

[4] 丁砺鑫, 方 强, 封建立, 等. 膀胱 Cajal 间质细胞对膀胱逼尿肌细胞兴奋调控的结构和功能特征的初步研究[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(12): 1118 -1121.

[5] de-Moura R S, de-Lemos-Neto M. Effects of potassium channel modulators cromakalim, tetraethylammonium and glibenclamide on the contractility of the isolated human ureter[J]. J Urol, 1996, 156(1): 276 -280.

[6] Yamamoto Y, Koike K. The effects of beta-adrenoceptor agonists on KCl-induced rhythmic contraction in the ureter of guinea pig[J]. J Smooth Muscle Res, 2000, 36(1): 13 -19.

[7] Santicioli P, Maggi C A. Myogenic and neurogenic factors in the control of pyeloureteral motility and ureteral peristalsis[J]. Pharmacol Rev, 1998, 50(4): 683 -722.

[8] Kirkali Z, Esen A A, Hayran M, *et al*. The effect of extracorporeal electromagnetic shock waves on the morphology and contractility of rabbit ureter[J]. J Urol, 1995, 154(5): 1939 -1943.

[9] Golenhofen K, Hannappel J. Normal spontaneous activity of the pyeloureteral system in the guinea-pig[J]. Pflugers Arch, 1973, 341(3): 257 -270.

[10] Teele M E, Lang R J. Stretch-evoked inhibition of spontaneous migrating contractions in a whole mount preparation of the guinea-pig upper urinary tract[J]. Br J Pharmacol, 1998, 123(6): 1143 -1153.

(编辑 邓强庭)