文章编号:1000-5404(2010)19-2101-04

论著

β肾上腺素受体在豚鼠输尿管ICC细胞上的表达及功能研究

吴康棋,邓建平,方 强,李为兵 (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 研究β肾上腺素受体在豚鼠输尿管ICC细胞上的表达及意义。方法 通过离体肌条实验,观察对照组(正常豚鼠肌条)和实验组(Glivec选择性阻断ICC细胞的肌条)在β肾上腺素激动剂作用下输尿管肌条的收缩幅度和频率的变化;采用免疫荧光双标技术检测豚鼠输尿管β肾上腺素受体亚型(β1、β2和β3)在ICC细胞上的表达情况。结果 非选择性β肾上腺素激动剂(异丙肾上腺素)作用后,对照组的收缩幅度[(0.070±0.035) g]较实验组的幅度[(0.100±0.028)g]下降显著($P<0.05$),频率[(2.480±1.210)/min]较实验组的频率[(7.200±3.580)/min]下降亦显著($P<0.01$),实验组在异丙肾上腺素作用下的舒张效应不如对照组显著;免疫荧光双标显示,输尿管ICC细胞仅表达β3受体亚型;选择性β3肾上腺素激动剂(CGP12177)作用后,对照组的收缩幅度[(0.068±0.023)g]和频率[(3.870±0.474)/min]较实验组的幅度[(0.115±0.031)g]和频率[(6.410±1.895)/min]均下降显著($P<0.05$),实验组在CGP12177作用下的舒张效应不如对照组显著。结论 去甲肾上腺素能神经可能通过激活ICC细胞上的肾上腺素β3受体来调节输尿管收缩与舒张。

【关键词】 豚鼠,输尿管;ICC;受体,β肾上腺素
【中图法分类号】 R322.63;R329.25;R341 【文献标志码】 A

Expression of β-adrenoceptor in interstitial cells of Cajal of guinea-pig ureters and its function

Wu Kangqi, Deng Jianping, Fang Qiang, Li Weibing (Institute of Urology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

【Abstract】 Objective To study the expression of β-adrenoceptor in interstitial cells of Cajal (ICC) of guinea-pig ureters and its function. Methods Guinea pigs were divided into control group and experimental group. Changes in ureteral muscle contraction amplitude and frequency of ureteral muscle contraction after treatment with β-adrenergic agonist, were observed. Expression of β-adrenergic receptor subtypes (β1, β2 and β3) in ICC of guinea-pig ureters was detected using immunofluorescence double labeling technique. Results After treatment with isoprenaline, the ureteral muscle contraction amplitude and the frequency of ureteral muscle contraction were significantly lower in control than in experimental group (0.070±0.035 *vs* 0.100±0.028, 7.200±3.580 *vs* 2.480±1.21, $P<0.05$), indicating that the relaxing action of isoprenaline on ureteral muscle was greater in control group than in experimental group. Immunofluorescence double labeling showed that β3 receptor subtypes were expressed only in ureteral ICC. After treatment with selective β3-adrenergic agonist (CGP12177), the ureteral muscle contraction amplitude and the frequency of ureteral muscle contraction were significantly lower in control group than in experimental group (0.068±0.023 *vs* 0.115±0.031, 3.870±0.474 *vs* 6.410±1.895, $P<0.05$), showing that the relaxing action of CGP12177 on ureteral muscle was weaker in experimental group than in control. Conclusion Noradrenergic nerves can regulate the ureter contraction and relaxation by activating the β3 adrenergic receptor subtypes of ICC.

【Key words】 guinea-pig ureter; interstitial cells of Cajal; adrenergic receptor beta

Cresponding author: Li Weibing, Tel: 86-23-68765347, E-mail: liweibing@yahoo.com.cn

Cajal间质细胞(interstitial cells of Cajal,ICC)是在胃肠道发现的一种特殊的间质细胞,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的信号传递的作用,是调节胃肠道平滑肌节律性收缩的重要因素。泌尿系统如肾盂、输尿管、膀胱平滑肌等均具有自发的肌源性活动,目前在多个部位也发现了ICC细胞,它可能参与神经元对平滑肌的调控[1]。研究[2]表明,输尿管上表达肾上腺素能β受体,兴奋β肾上腺素受体可以引起输尿管舒张,但输尿管中的ICC细胞

【通信作者】 李为兵,电话:(023)68765347,E-mail:liweibing@yahoo.com.cn

是否参与了去甲肾上腺能神经和平滑肌之间的信号传导至今尚不清楚。本研究应用肌条实验和免疫组化观察β肾上腺素受体在豚鼠输尿管ICC细胞上的表达，探讨ICC细胞在神经调控中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

清洁级健康Hartley豚鼠50只，雌雄不限，8～10周龄，体质量300～350 g，由第三军医大学实验动物中心提供。

1.2 试剂与仪器

山羊抗鼠c-kit多克隆抗体及兔抗鼠β1、β2和β3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)，β3受体激动剂CGP12177(Sigma公司)，Glivec胶囊(瑞士Novartis公司)。其余相关试剂均购于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)，RM6280C型多道生理信号采集处理系统(成都仪器厂)、肌肉张力换能器(高碑店市新航机电设备有限公司)、器官槽、混合气体装置。

1.3 肌条的制备

麻醉豚鼠后立即固定于仰卧位，腹部皮肤剪毛、消毒，采用腹正中切口，依次剪开皮肤、腹壁肌肉、腹膜，快速剪下输尿管中上段长度约为10 mm长的肌条，置于4 ℃ Kreb's液中。操作过程尽量避免不必要的钳夹和牵拉。

1.4 肌条实验

用丝线结扎肌条两端，分别固定于装有10 ml Kreb's液器官槽底部和肌肉张力换能器头。通以95% O_2、5% CO_2混合气体，肌肉张力换能器接RM6280C型多道生理信号采集处理系统，选择通道模式为张力，灵敏度为0.75 g，扫描速度为10.0 s/div。

1.4.1 对照组($n=8$) 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，向平滑肌内加入0.2 ml 1 mol/L KCl，肌条出现自发性收缩后观察并记录肌条-张力变化曲线3 min；加入10^{-3} mol/L的异丙肾上腺素1 ml，使器官槽的终浓度为10^{-4} mol/L。观察并记录肌条-张力变化曲线3 min。

1.4.2 实验组($n=8$) 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，向平滑肌内加入0.2 ml 1 mol/L KCl，肌条出现自发性收缩后观察并记录肌条-张力变化曲线3 min. 加入10^{-2} mol/L的Glivec(使用蒸馏水溶解配制) 50 μl，使器官槽的终浓度为5×10^{-5} mol/L，观察并记录肌条-张力变化曲线10 min；而后加入10^{-3} mol/L的异丙肾上腺素1 ml，使器官槽的终浓度为10^{-4} mol/L。观察并记录肌条-张力变化曲线3 min。

1.4.3 数据测量和统计 肌条收缩的波幅和频率使用RM6280系列多道生理信号采集处理系统4.2测量，选取肌条收缩稳定的1 min的结果进行统计分析。实验数据以$\bar{x}\pm s$表示，采用SPSS 10.0统计软件进行t检验。

1.5 铺片组织的制作

在肾盂输尿管交界处用丝线结扎输尿管，在膀胱入口处剪断输尿管，取下输尿管放入固定液(4%多聚甲醛)中，将硬脑膜管自输尿管下端开口插入并用丝线结扎固定，硬脑膜管接注射器向输尿管内缓慢注入固定液，使输尿管充分充盈，4 ℃固定液中过夜。纵行剪开，小心撕去黏膜层和浆膜层，将剩余的肌层组织撕成尽可能薄的组织片备用。

1.6 免疫荧光化学染色

组织片于0.01 mol/L PBS漂洗5 min×3次。0.1% Triton X-100室温10～15 min。0.01 mol/L PBS漂洗5 min×3次。用含1% BSA的PBS溶液37 ℃孵育1h，以去除非特异性染色。0.01 mol/L PBS漂洗5 min×3次。加入c-kit一抗(1∶300稀释)4 ℃过夜。0.01 mol/L PBS漂洗5 min×3次。加入荧光二抗Alex fluo 488(1∶200稀释)37 ℃孵育1 h。0.01 mol/L PBS漂洗5 min×3次，分别加入肾上腺素能β受体亚型抗体(β1、β2和β3，1∶300稀释)4 ℃过夜。0.01 mol/L PBS漂洗5 min×3次。加入荧光二抗Alex fluo 594(1∶200稀释)37 ℃孵育1 h。0.01 mol/L PBS漂洗5 min×3次，加入DAPI，室温孵育10 min。0.01 mol/L PBS漂洗5 min×3次。封片后4 ℃避光保存，激光共聚焦显微镜观察。以PBS代替一抗作为阴性对照；阳性对照采用肠肌标本进行。

1.7 肌条实验

步骤同1.3制备肌条，步骤同1.4进行肌条实验。但需选用CGP12177来代替异丙肾上腺素作用于实验组($n=10$)和对照组($n=10$)。

2 结果

2.1 抑制ICC细胞功能前后异丙肾上腺素对离体输尿管肌条的影响

实验组与对照组的自发性收缩的幅度和频率无统计学差异($P>0.05$)；当加入异丙肾上腺素后，实验组的收缩幅度较对照组差异显著($P<0.05$)，实验组的收缩频率较对照组差异亦显著($P<0.01$，表1)。表明实验组异丙肾上腺素作用下的舒张效应不如对照组显著。

表1 异丙肾上腺素对实验组和对照组离体输尿管肌条的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	n	自发性收缩		异丙肾上腺素作用后	
		幅度(g)	频率(/min)	幅度(g)	频率(/min)
对照组	8	0.140±0.034	7.880±5.620	0.070±0.035	2.480±1.210
实验组	8	0.150±0.016	7.600±3.280	0.100±0.028[a]	7.200±3.580[b]

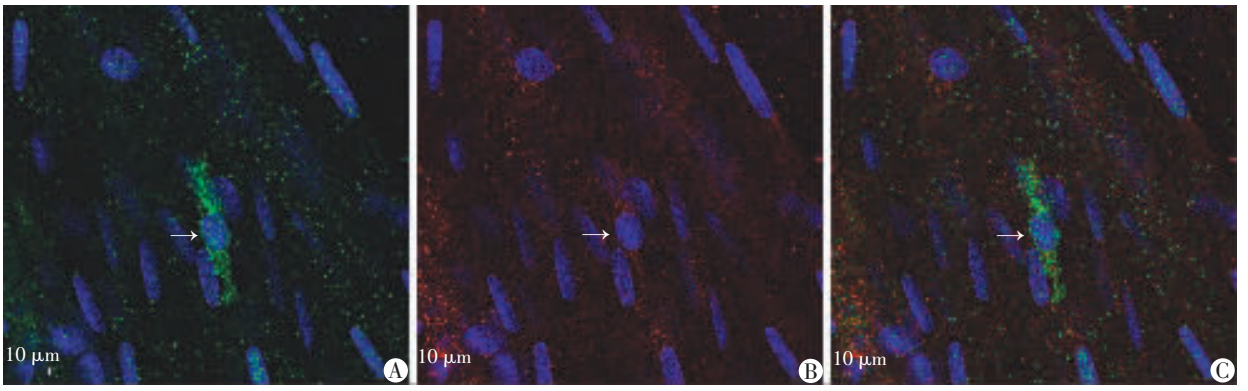
a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与对照组比较

2.2 豚鼠输尿管ICC细胞上β肾上腺素亚型分布

免疫荧光双标检测显示，输尿管ICC细胞可表达β3肾上腺素受体，未见β1、β2受体表达(图1～3)。

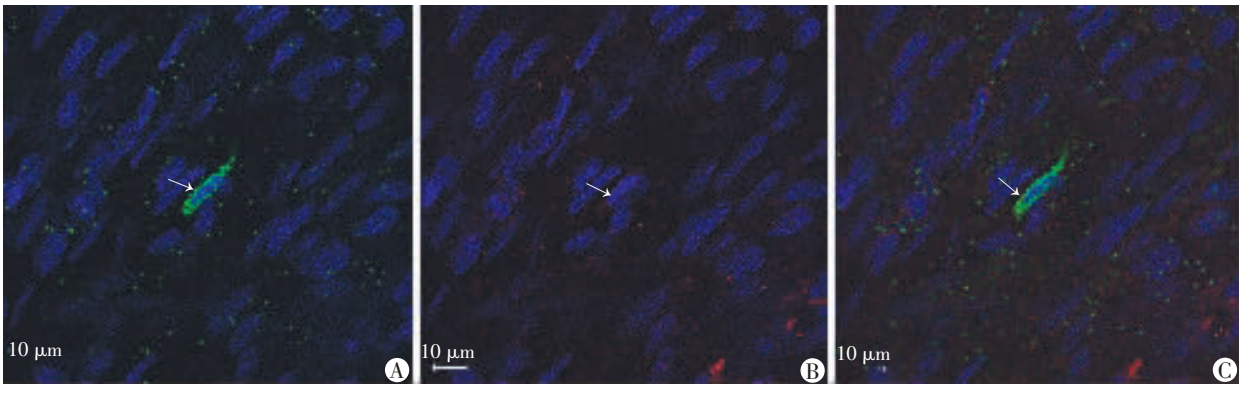
2.3 抑制ICC细胞功能前后CGP12177对离体输尿管肌条的影响

实验组与对照组的自发性收缩的幅度和频率无统计学差异($P>0.05$)；当加入CGP12177后，实验组的收缩幅度和频率较对照组差异显著($P<0.05$，表2)。表明CGP12177作用下实验组的舒张效应不如对照组显著。



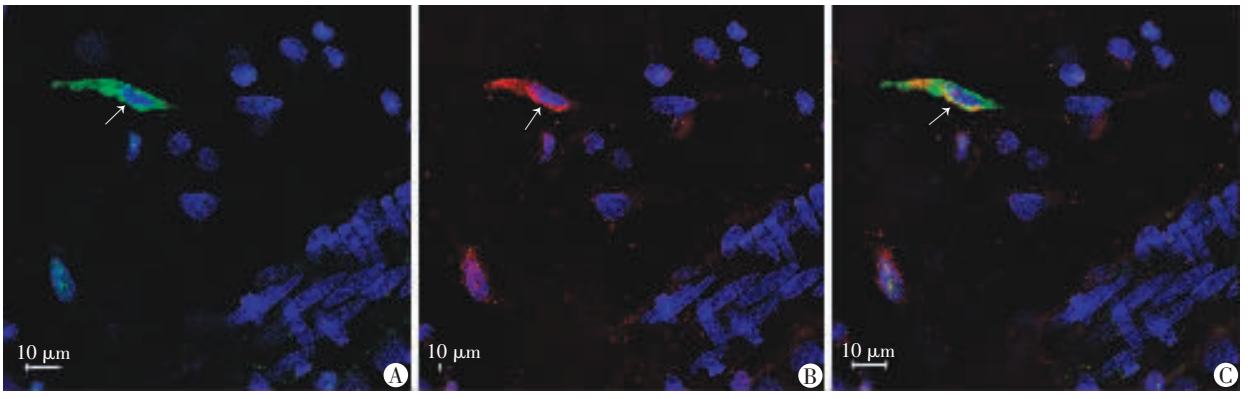
A:c-kit 阳性细胞(↑);B:β1 阳性细胞(↑);C:c-kit 和 β1 共表达(↑)

图 1 激光共聚焦显微镜观察豚鼠输尿管 ICC 细胞上的 β1 受体的表达



A:c-kit 阳性细胞(↑);B:β2 阳性细胞(↑);C:c-kit 和 β2 共表达(↑)

图 2 激光共聚焦显微镜观察豚鼠输尿管 ICC 细胞上的 β2 受体的表达



A:c-kit 阳性细胞(↑);B:β3 阳性细胞(↑);C:c-kit 和 β3 共表达(↑)

图 3 激光共聚焦显微镜观察豚鼠输尿管 ICC 细胞上的 β3 受体的表达

表 2 CGP12177 对实验组和对照组离体输尿管肌条的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	自发性收缩		CGP12177 作用后	
		幅度(g)	频率(/min)	幅度(g)	频率(/min)
对照组	10	0.156 ± 0.021	6.190 ± 1.229	0.068 ± 0.023	3.870 ± 0.474
实验组	10	0.155 ± 0.025	6.990 ± 2.324	0.115 ± 0.031[a]	6.410 ± 1.895[b]

a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与对照组比较

3 讨论

本研究初步探讨 ICC 细胞是否参与输尿管的神经调控,特别是 ICC 细胞是否可以介导去甲肾上腺素能神经调节输尿管平滑肌的舒缩,从而进一步阐明去甲肾上腺素能神经作用于输尿管的具体机制。ICC 细胞首先在胃肠道中被发现,并可受神经调控,存在多种神经递质的受体,如 VIP、M_1、M_2、NO 等[3,4],神经可能是通过 ICC 细胞来调控平滑肌的输缩[4]。我们前期的研究表明,在豚鼠输尿管中也存在 ICC 细胞,并且与输尿管的自发性收缩相关。同时,β 肾上腺素能受体(分为 β1、β2 和 β3 3 个亚型)广泛存在于输尿管中,对其起到舒张作用[2,5]。

首先,我们进行离体肌条实验,选用异丙肾上腺素(β 受体的非选择性激动剂)作为 β 受体的激动剂,它可以抑制输尿管的节律性收缩[2]。ICC 细胞特异性表达 c-kit 受体(kit 是一种编码酪氨酸激酶受体的原癌

基因),kit 信号通路对细胞的发育和表型维持至关重要。甲磺酸伊马替尼(Glivec)是一个特异性的 c-kit 受体酪氨酸激酶抑制剂,所以我们选用 Glivec 来特异性拮抗 ICC 细胞。研究发现 Glivec 不仅可以抑制胃肠道 ICC 细胞的表达,还可以抑制离体豚鼠输尿管自发性活动[6-8]。Biers 等[6]认为,Glivec 可呈剂量依赖性的方式抑制 ICC 细胞的功能,从而降低输尿管平滑肌肌条自发性收缩的幅度。采用 5×10^{-5} mol/L 的 Glivec 阻断 ICC 细胞后,肌条的收缩幅度下降(但不如直接加入异丙肾上腺下降得明显),频率无明显变化。我们将豚鼠分成对照组和实验组,对照组记录肌条的自发性收缩和加入异丙肾上腺素的幅度和频率的变化;实验组记录肌条的自发性收缩和加入 Glivec 选择性拮抗 ICC 细胞后再加入异丙肾上腺素后幅度和频率的变化。结果表明异丙肾上腺舒张输尿管平滑肌受到 ICC 细胞的影响,ICC 细胞参与了离体输尿管舒张的调控。

通过肌条实验,我们观察到激动 β 肾上腺素能受体可以舒张输尿管,并且 ICC 细胞可以影响平滑肌的舒张,那么 ICC 细胞是否通过表达 β 肾上腺素能受体发挥作用还少见文献报道。本研究采用免疫荧光双标技术来观察 β 肾上腺素能受体在 ICC 细胞上的表达情况。应用 c-kit 抗体标记 ICC 细胞的方法在多种平滑肌组织中(如输尿管、膀胱等)发现了 ICC 细胞的存在[9-12]。目前认为豚鼠上尿路中只有 ICC 细胞和肥大细胞具有 c-kit 染色阳性,故可以通过形态学特点排除肥大细胞而筛选出 ICC 细胞。因此,我们就利用特异性的 c-kit 抗体来标记 ICC 细胞。在此基础上,再用 β1、β2 和 β3 3 个亚型受体的抗体进行分别标记。实验结果示,豚鼠输尿管的 ICC 细胞上存在 β 肾上腺素能受体的表达,并且以 β3 亚型为主。

肌条实验和免疫荧光双标实验的结果表明,ICC 细胞可能通过肾上腺素能受体 β3 亚型来调控输尿管的舒张。为了进一步从功能学的方面观察,我们再次进行肌条实验,选用 β3 亚型的选择性激动剂 CGP12177。研究[2]表明,CGP12177 能够降低的自发性收缩的幅度和改变其收缩方式。因此,我们同样将豚鼠分成对照组和实验组,对照组记录肌条在自发性收缩和加入 CGP12177 的幅度和频率的变化;实验组记录肌条的自发性收缩和加入 Glivec 选择性拮抗 ICC 细胞后再加入 CGP12177 后幅度和频率的变化。结果表明 CGP12177 舒张输尿管平滑肌受到 ICC 细胞的影响,肾上腺素能 β3 受体参与了 ICC 细胞对离体输尿管的调控。

本研究发现 ICC 细胞通过肾上腺素能 β3 受体来调控输尿管的舒张,据此推测 ICC 细胞可能为肾上腺素能神经控制输尿管的另一重要通路。去甲肾上腺素能神经不仅可以直接控制平滑肌细胞舒张,还可以通过 ICC 细胞作为中转站来间接调控输尿管的舒张。去甲肾上腺素神经通过分泌去甲肾上腺素可以直接作用于平滑肌细胞上的肾上腺素 β 受体,使 G 蛋白 Gs 异三聚体解离成 Gsα 和 Gsβγ,Gsα 可激活腺苷酸环化酶,使 ATP 降解为 cAMP,cAMP 作为第 2 信使可激活蛋白激酶 A,参与调解细胞内水平,产生生物学效应,从而使平滑肌松弛[13]。但神经递质作用于 ICC 细胞上的肾上腺素 β 受体后,ICC 细胞引起平滑肌的舒张的机制还不清楚,还需进一步对神经-ICC 细胞-平滑肌的具体调控通路进行研究。这对于全面阐明输尿管生理及病理机制有着重要意义,并且对输尿管的梗阻性疾病的治疗提供了理论基础和依据。

参考文献:

[1] 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.

[2] 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.

[3] Alberti E, Mikkelsen H B, Larsen J O, *et al*. Motility patterns and distribution of interstitial cells of Cajal and nitrergic neurons in the proximal, mid- and distal-colon of the rat [J]. Neurogastroenterol Motil, 2005, 17(1): 133-147.

[4] Iino S, Horiguchi K, Nojyo Y, *et al*. Interstitial cells of Cajal contain signalling molecules for transduction of nitrergic stimulation in guinea pig caecum [J]. Neurogastroenterol Motil, 2009, 21(5): 542-550, e12-e13.

[5] Wanajo I, Tomiyama Y, Yamazaki Y, *et al*. Pharmacological characterization of beta-adrenoceptor subtypes mediating relaxation in porcine isolated ureteral smooth muscle [J]. J Urol, 2004, 172(3): 1155-1159.

[6] Biers S M, Reynard J M, Doore T, *et al*. The functional effects of a c-kit tyrosine inhibitor on guinea-pig and human detrusor [J]. BJU Int, 2006, 97(3): 612-616.

[7] 葛亮,方强,熊智勇,等. Cajal 间质细胞在输尿管平滑肌自发性收缩中的作用[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(22): 2214-2216.

[8] Han J, Zhou Y P, Jiang Y Z, *et al*. Postnatal development of interstitial cells of Cajal in mouse colon in response to Kit signal blockade with Imatinib(Glivec) [J]. Acta Histochem, 2010, 112(3): 215-221.

[9] Metzger R, Neugebauer A, Rolle U, *et al*. C-Kit receptor (CD117) in the porcine urinary tract [J]. Pediatr Surg Int, 2008, 24(1): 67-76.

[10] Metzger R, Schuster T, Till H, *et al*. Cajal-like cells in the human upper urinary tract [J]. J Urol, 2004, 172(2): 769-772.

[11] Hinescu M E, Ardeleanu C, Gherghiceanu M, *et al*. Interstitial Cajal-like cells in human gallbladder [J]. J Mol Histol, 2007, 38(4): 275-284.

[12] 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.

[13] Hall I P. Second messengers, ion channels and pharmacology of airway smooth muscle [J]. Eur Respir J, 2000, 15(6): 1120-1127.

(收稿:2010-05-06 修回:2010-08-08)

(编辑 王小宴)