文章编号:1000-5404(2013)15-1641-03

技术方法

改良大鼠膀胱平滑肌细胞急性酶分离法及膜片钳应用

钟 晓[1,2],王青青[3],何 鹏[1],邓建平[3],李龙坤[3],黄赤兵[2],宋 波[1] (400038 重庆,第三军医大学西南医院全军泌尿外科研究所[1];400037 重庆,第三军医大学新桥医院:泌尿外2科[2],泌尿外1科[3])

[摘要] **目的** 改良大鼠膀胱平滑肌细胞急性酶分离方法,为利用膜片钳技术研究膀胱疾病提供必要的技术平台。**方法** 采用木瓜蛋白酶和胶原酶Ⅱ,采用一步法和二步法,分别消化5只新生和成年Wistar大鼠膀胱组织,在膜片钳工作台上分别对平滑肌细胞钠钙交换体电流行全细胞记录。**结果** 建立了稳定的新生和成年大鼠膀胱平滑肌细胞急性酶分离方法。新生大鼠钠钙交换体(Na^+/Ca^{2+} exchanger,NCX)电流密度(pA/pF)为[(0.21±0.07),$n=4$],成年大鼠NCX电流密度为[(0.19±0.06),$n=6$],差异有统计学意义($P<0.05$)。KB-R7943在5 μm浓度下,有阻滞NCX正向模式的能力。**结论** 本方法改良了大鼠膀胱平滑肌细胞急性酶分离,并成功应用于膜片钳技术检测。

[关键词] 大鼠;膀胱;平滑肌;膜片钳
[中图法分类号] R694;R337.5 [文献标志码] B

近年以尿急、尿频或尿失禁等症状为主的膀胱功能障碍性疾病发病率呈上升趋势,其中膀胱平滑肌细胞的离子通道功能异常是目前的研究热点[1]。而膜片钳技术是研究膀胱平滑肌细胞离子通道最重要的方法,细胞的获取又是进一步实施膜片钳技术的关键。目前国内外普遍采用的酶消化平滑肌法稳定性不高,细胞分离时间较长[2]。我们通过复习大量文献,反复实验,建立了稳定的大鼠膀胱平滑肌细胞急性酶分离法,并应用膜片钳全细胞模式,测定新生及成年大鼠膀胱平滑肌细胞的钠钙交换体电流,证明分离细胞的可靠性,旨在为进一步研究膀胱平滑肌离子通道功能提供支持。

1 材料与方法

1.1 动物

5只正常出生2~3 d Wistar大鼠和5只正常成年Wistar大鼠(2月龄),雌雄不拘,成年大鼠体质量200~220 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。

1.2 仪器

实验使用的膜片钳系统为Multiclamp 200B膜片钳放大器(Axon公司,美国)和Digidata 1440A模-数转换器(Axon公司,美国),记录和分析软件为pCLAMP 10.3(Axon公司,美国)。采样频率为10 kHz,滤波频率为2 kHz。

1.3 试剂

Ⅱ型胶原酶(Collagenase Ⅱ)、二硫苏糖醇(DTT)、氯化四乙铵(TEA-Cl)、三磷酸腺苷二钠(Na_2ATP)、氢氧化铯(CsOH)、羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES)、乙二醇双四乙酸(EGTA)、牛血清蛋白(BSA)、大豆胰蛋白酶抑制剂(Typsin inhibitor)均购自美国Sigma公司,木瓜蛋白酶(Papain,韩国Biosharp公司),D-Hanks液(美国Gibco公司),KB-R7943(英国Tocris公司),其余试剂均为国产分析纯试剂。

1.4 溶液配制

细胞外液(mmol/L):NaCl 137,KCl 5,$MgCl_2$ 1,$CaCl_2$ 1.5,HEPES 10,D-glucose 10,用NaOH调至pH=7.4±0.5;电极内液(mmol/L):NaCl 5,CsOH 100,KCl 5,$MgCl_2$ 2,TEA-Cl 20,HEPES 10,D-glucose 8,Na_2ATP 1,EGTA 5,$CaCl_2$ 4.94,用CsCl调至pH=7.2±0.5;细胞分离酶Ⅰ(mg/mL):Collagenase Ⅱ 0.5,DTT 1,BSA 1,Typsin inhibitor 1,Papain 0.5,配入D-Hanks液。细胞分离酶Ⅱ(mg/mL):Collagenase Ⅱ 1,DTT 1,BSA 1,配入D-Hanks液。

1.5 改良新生和成年大鼠膀胱平滑肌细胞分离方法

参照文献[3-4]方法并改良。①新生鼠单个膀胱平滑肌细胞急性酶分离(一步法):新生鼠处死后,暴露膀胱后离断,置于含细胞分离酶Ⅰ的EP管,剪成肉糜样后,迅速将EP管放置于37 ℃ 5% O_2和95% CO_2的孵箱中10 min。待观察到消化液中有游离单个平滑肌细胞后,1 000 r/min离心,终止消化,弃上清液并将底层组织吸出用预冷的D-Hanks液放置10 min,用圆滑的巴氏滴管继续轻轻吹打5 min,150目细胞筛筛后即可得到适合膜片钳技术的新生鼠膀胱平滑肌细胞。②成年大鼠单个膀胱平滑肌细胞急性酶分离(二步法):膀胱获取同新生鼠,在预冷的D-Hanks液中分离膀胱黏膜和浆膜层,然后在分离酶Ⅰ中将组织剪成肉糜样,37 ℃,5% O_2和95% CO_2的孵箱中放置8 min,离心机1 000 r/min终止消化第1步,弃上清液后将组织置于细胞分离酶Ⅱ中继续37 ℃孵箱孵育45~55 min,待观察到游离平滑肌细胞后,离心机1 000 r/min终止消化,弃上清液并将底层组织吸出用预冷的D-Hanks液放置10 min,用圆滑的

[基金项目] 国家自然科学基金(81170704)
[通信作者] 宋 波,E-mail:Bo_song@sina.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130329.1016.010.html(2013-03-29)

巴氏滴管继续轻轻吹打5 min,150目细胞筛筛后即可得到适合膜片钳技术的成年大鼠膀胱平滑肌细胞。分离好的细胞悬液置于4 ℃冰箱备用。

1.6 膜片钳全细胞记录

急性酶分离的新生大鼠和成年大鼠膀胱平滑肌细胞均采用全细胞膜片电压钳制技术记录钠钙交换体(Na^+/Ca^{2+} exchanger,NCX)电流。NCX电流参考文献[5],细胞静息电位为-40 mV,采用斜坡刺激从-100 ~ +60 mV,时程1 600 ms,可以得到一内向电流,为包括NCX在内的排除细胞内钙离子的电流,经NCX特异性阻滞剂KB-R7943(5 μm)前后相减所得电流差值即为NCX电流。

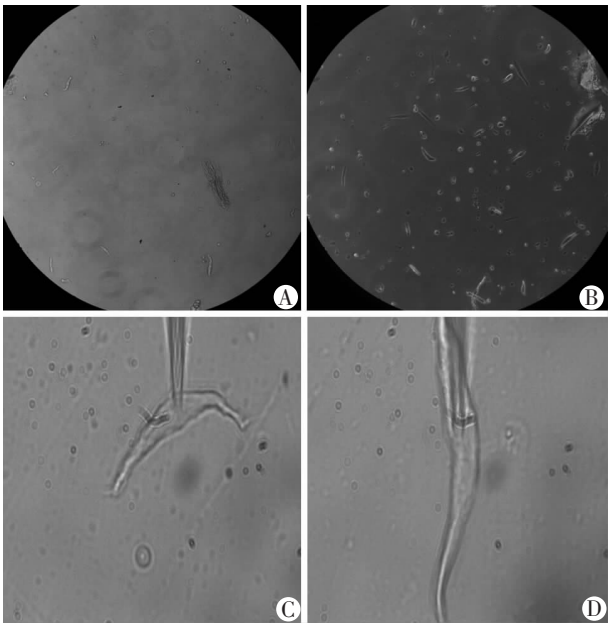
1.7 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 13.0统计软件对计数资料进行独立样本 t 检验和配对 t 检验。

2 结果

2.1 采用改良酶分离方法获取的新生和成年大鼠膀胱平滑肌细胞形态学观察

新生大鼠膀胱采用一步消化法10 min左右即可获得足够数量的平滑肌细胞,而成年大鼠需经过二步法消化50 ~ 60 min才能获取满足实验的平滑肌细胞。在倒置显微镜下分别(×100,×400)观察,膀胱平滑肌细胞呈蚯蚓状、纺锤状、圆棒状等多种形态,细胞长度为50 ~ 200 μm,其中新生大鼠膀胱平滑肌细胞长度普遍较成年大鼠短,活性良好的平滑肌细胞轮廓清晰,表面光滑无颗粒,且细胞贴壁时间快(15 ~ 20 min,图1)。



A:新生大鼠(×100);B:成年大鼠(×100);C:新生大鼠(×400);D:成年大鼠(×400)

图1 倒置显微镜观察新生和成年大鼠膀胱平滑肌细胞

2.2 新生和成年大鼠膀胱平滑肌细胞NCX电流

新生大鼠NCX电流密度(pA/pF)为[(0.21 ± 0.07),n = 4],大于成年大鼠NCX电流密度[(0.19 ± 0.06),n = 6,P < 0.05]。

3 讨论

目前膀胱排尿功能障碍性疾病的发病机制存在争议,膀胱肌源性理论越来越受到关注,但是国内外采用膜片钳技术研究膀胱平滑肌细胞并不多见[6],一方面可能受制于仪器设备的建立,另一方面与实验本身的难度有直接关系。稳定分离平滑肌细胞是困扰实验人员的关键因素,因此建立膀胱平滑肌细胞的急性酶分离方法至关重要。本课题组通过阅读文献和多次实验,摸索出了一套较可靠、稳定的新生和成年大鼠膀胱平滑肌细胞急性酶分离方法,同时初步研究了钠钙交换体在新生和成年大鼠膀胱平滑肌细胞中的电流,认为该电流可能在膀胱的发育中发挥作用。

新生大鼠较少应用于膀胱平滑肌细胞研究,与动物模型较难建立有关。本研究发现,由于新生大鼠膀胱几乎没有胶原组织,所以无论是酶的浓度还是作用时间,都需要尽量减小和缩短。国内外在膀胱平滑肌消化酶的选取上目前主要是胶原酶Ⅱ和Ⅲ。胶原酶是从溶组织梭状细胞芽孢杆菌提取制备的,主要水解结缔组织中胶原蛋白成分,胶原酶仅对细胞间质有消化作用而对上皮细胞影响不大,可使上皮细胞与胶原成分分离而不受损害。预实验中胶原酶Ⅱ体现了良好的分离效果,能明显地减少细胞间的胶原纤维,在吹打细胞后能使大量平滑肌细胞游离。但是国内外的新生大鼠的急性酶分离方法主要采用二步法,第1步主要以高浓度的木瓜蛋白酶为主,一般消化时间为20 min,第2步采用胶原酶Ⅱ,消化时间为10 min左右[7]。通过改进,将木瓜蛋白酶与胶原酶Ⅱ融合,不仅缩短了消化时间,减少了消化步骤,并且低浓度的木瓜蛋白酶减少了细胞膜的损伤,利于玻璃微电极与细胞表面形成巨阻封接。

成年大鼠膀胱平滑肌细胞的急性分离是研究膀胱功能,并进一步建立和研究模型大鼠膀胱平滑肌细胞电生理学的重要实验基础。与国内外成年大鼠膀胱平滑肌细胞分离技术相比,本实验虽然同样采用二步法,但区别在于采用胶原酶Ⅱ与木瓜蛋白酶的混合,时间缩短[8-9]。胶原酶Ⅱ和木瓜蛋白酶的混合酶作用时间,以8 min效果较好,不仅缩短第2步消化时间,同时保持细胞相应的活性,而第2步时间因成年大鼠膀胱剪碎的组织大小缺乏精确性,为45 ~ 50 min。实验者对于细胞分离消化状态的把握不可或缺,在消化作用时间的后期要勤于观察消化组织,需要实验者积累经验。

NCX是广泛分布于心肌、肾脏、平滑肌细胞膜上

的一种跨膜转运蛋白,不仅参与了多种细胞内钙稳态的维持,同时在平滑肌细胞兴奋-收缩耦联中发挥作用[10]。研究豚鼠膀胱平滑肌细胞发现,该通道生理状态下电流偏小,可能不会发挥重要作用[11],本实验检测NCX在正常新生大鼠和成年大鼠膀胱平滑肌细胞的电流密度偏小,且电流密度在成年大鼠膀胱平滑肌细胞中降低,提示该电流可能与膀胱平滑肌细胞发育相关。本实验应用了NCX的反向模式特异性阻滞剂KB-R7943,该阻滞剂是否对NCX的正向模式起阻滞作用存在争议[12],初步证实KB-R7943在低浓度下,同样可以阻滞NCX排除细胞内钙离子的能力,但因特异性较差,导致检测的NCX电流密度偏小。

综上,本实验建立了稳定的适合膜片钳技术的膀胱平滑肌细胞分离方法,为探讨膀胱平滑肌细胞离子通道功能在疾病中是否发挥作用提供了支持。同时应用KB-R7943证实膀胱平滑肌细胞存在NCX电流,新生和成年大鼠膀胱平滑肌细胞NCX电流密度存在差异,该差异在生理状态中发挥何种作用值得研究,并且研发NCX亚型的特异性阻滞剂是进一步研究NCX作用的重点方向。

参考文献:

[1] Drake M J. Emerging drugs for treatment of overactive bladder and detrusor overactivity [J]. Expert Opin Emerg Drugs, 2008, 13(3): 431-446.
[2] Wood D N, Brown R A, Fry C H. Characterization of the control of intracellular [Ca^{2+}] and the contractile phenotype of cultured human detrusor smooth muscle cells[J]. J Urol, 2004, 172(2): 753-757.
[3] 来利红, 王如兴, 蒋文平. 酶消化法急性分离大鼠主动脉平滑肌细胞及其鉴定[J]. 苏州大学学报:医学版, 2008,28(1): 23-25, 43.
[4] Sui G P, Wu C, Fry C H. Electrical characteristics of suburothelial cells isolated from the human bladder[J]. J Urol, 2004, 171(2 Pt 1): 938-943.
[5] Ander B P, Hurtado C, Raposo C S, *et al*. Differential sensitivities of the NCX1.1 and NCX1.3 isoforms of the Na^+-Ca^{2+} exchanger to alpha-linolenic acid[J]. Cardiovasc Res, 2007, 73(2): 395-403.
[6] Thorneloe K S, Nelson M T. Properties of a tonically active, sodium-permeable current in mouse urinary bladder smooth muscle[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2004, 286(6): C1246-C1257.
[7] Zheng J, Wenzhi B, Miao L, *et al*. Ca^{2+} release induced by cADP-ribose is mediated by FKBP12.6 proteins in mouse bladder smooth muscle[J]. Cell Calcium, 2010, 47(5): 449-457.
[8] Meredith A L, Thorneloe K S, Werner M E, *et al*. Overactive bladder and incontinence in the absence of the BK large conductance Ca^{2+}-activated K^+ channel[J]. J Biol Chem, 2004, 279(35): 36746-36752.
[9] Sanchez-Freire V, Blanchard M G, Burkhard F C, *et al*. Acid-sensing channels in human bladder: expression, function and alterations during bladder pain syndrome[J]. J Urol, 2011, 186(4): 1509-1516.
[10] Bers D M, Despa S. Cardiac myocytes Ca^{2+} and Na^+ regulation in normal and failing hearts[J]. J Pharmacol Sci, 2006, 100(5): 315-322.
[11] Wu C, Fry C H. Na^+/Ca^{2+} exchange and its role in intracellular Ca^{2+} regulation in guinea pig detrusor smooth muscle[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2001, 280(5): C1090-C1096.
[12] Iwamoto T. Na^+/Ca^{2+} exchange as a drug target--insights from molecular pharmacology and genetic engineering[J]. Ann N Y Acad Sci, 2007, 1099: 516-528.

(**收稿**:2012-12-28;**修回**:2013-01-23)
(编辑 龙 亮)

文章编号:1000-5404(2013)15-1643-03

技术方法

带蒂背阔肌肌皮瓣修复腹壁巨大缺损的临床疗效分析

匡 毅,蒋又新,李福沛 (400030 重庆,重庆市肿瘤研究所腹部肿瘤外科)

[**摘要**] **目的** 探讨带血管蒂背阔肌肌皮瓣修复腹壁肿瘤切除后遗留巨大缺损的临床效果。**方法** 1998年10月至2008年5月,采用带血管蒂背阔肌肌皮瓣修复6例因腹壁肿瘤切除致腹壁巨大缺损的患者,缺损范围12 cm×9 cm~18 cm×15 cm。**结果** 6例患者术后伤口均Ⅰ期愈合。随访1~6年,无肿瘤复发,无腹壁切口疝、肠粘连、肠梗阻和肠瘘等并发症发生。**结论** 带血管蒂背阔肌肌皮瓣修复腹壁缺损的方法疗效可靠,副作用少,在大面积腹壁全层缺损的修复中值得推广应用。

[**关键词**] 背阔肌肌皮瓣;腹壁巨大缺损;修复术
[**中图法分类号**] R628; R656.32 [**文献标志码**] B

[**通信作者**] 蒋又新,E-mail:447195029@qq.com
[**优先出版**] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130131.1708.012.html(2013-01-31)