DOI:10.16016/j.1000-5404.201602036

# 外源性干细胞因子对逼尿肌活动低下大鼠 Cajal 间质细胞数及逼尿肌收缩力的影响

封建立,刘元丰,高 瑾,钟 渝,舒 勇,蒙明森,颜加强,孙道冬,孙丹宁 (400020 重庆,解放军324医院泌尿外科)

[**摘要**] **目的** 探讨干细胞因子(stem cell factor,SCF)对活动低下逼尿肌中 Cajal 间质细胞(interstitial cells of Cajal, ICCs)数及逼尿肌收缩力的影响。**方法** 将 SD 大鼠分为3组:对照组、逼尿肌活动低下(detrusor underactive,DU)组以及 DU+SCF 组。采用 ELISA 检测血清 SCF 水平,免疫荧光组织化学法检测 ICCs 细胞数目,RT-PCR 以及 Western blot 检测 c-kit 以及 SCF 的组织水平表达;体外肌条实验检测逼尿肌收缩能力。**结果** 活动低下逼尿肌组织中 ICCs 数显著减少($P<0.05$),SCF 及 c-kit 表达显著降低($P<0.05$),逼尿肌收缩频率及收缩幅度显著下降($P<0.05$);外源性 SCF 可以显著增加活动低下逼尿肌组织中 ICCs 数($P<0.05$),增加 SCF 及 c-kit 的表达($P<0.05$),显著提升逼尿肌收缩幅度和收缩频率($P<0.05$)。**结论** 外源性 SCF 可以影响活动低下逼尿肌组织中 ICCs 数,进而改变逼尿肌收缩能力。

[**关键词**] 膀胱功能障碍;逼尿肌活动低下;干细胞因子;间质细胞;膀胱出口梗阻
[**中图法分类号**] R322.62; R361.2; R694.5 [**文献标志码**] A

# Effect of exogenous stem cell factor on numbers of interstitial cells of Cajal and detrusor contraction in rats with underactive bladder

Feng Jianli, Liu Yuanfeng, Gao Jin, Zhong Yu, Shu Yong, Meng Mingsen, Yan Jiaqiang, Sun Daodong, Sun Danning (Department of Urology, No. 324 Hospital of PLA, Chongqing, 400020, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of stem cell factor (SCF) on the number of interstitial cells of Cajal (ICCs) and the contraction of detrusor in the rats with underactive bladder. **Methods** A total of 54 SD rats were randomly divided into 3 groups: control group, detrusor underactivity group (DU, inflicted with bladder outlet obstruction), and DU + SCF group [intra-peritoneal injection of 0.2 μg/(kg·d) SCF], with 18 animals in each group. After the rats were sacrificed in 2 weeks later, their blood and bladder samples were harvested. The number of ICCs was analyzed by immunohistochemical and immunofluorescent staining. The serum SCF levels were detected by ELISA. The expression levels of c-kit and SCF in the detrusor tissues were detected by RT-PCR and Western blotting. Change of detrusor spontaneous contraction was tested with detrusor strips *in vitro*. **Results** The number of ICCs was decreased significantly, the serum SCF level was also reduced significantly, so were the expression of c-kit and SCF at mRNA and protein levels, and the contraction of detrusor was decreased significantly in the DU group compared to the control group (all $P<0.05$). However, exogenous SCF resulted in the increase of ICCs number, enhancement of c-kit and SCF expression levels, and significant improvement of the contraction amplitude and frequence of detrusor (all $P<0.05$). **Conclusion** Exogenous SCF improves the number of ICCs and the contraction of detrusor in DU rats.

[**Key words**] bladder dysfunction; detrusor underaction; stem cell factor; interstitial cells of Cajal; bladder outlet obstruction

Supported by the Chongqing National Natural Science Foundation (CSTC2012jjA1566). Corresponding author: Feng Jianli, E-mail: f-jianli@163.com

[**基金项目**] 重庆市自然科学基金项目一般项目(CSTC2012jjA1566)
[**通信作者**] 封建立,E-mail:f-jianli@163.com
[**优先出版**] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20160505.1620.003.html(2016-05-05)

逼尿肌活动低下(detrusor underactive,DU)是临床常见的膀胱功能障碍性疾病,严重影响患者的生活质量,病理生理机制不清楚[1]。Cajal 间质细胞(interstitial cells of Cajal, ICCs)是一种首先发现于胃肠道的特殊间质细胞。ICCs 细胞的增殖分化及其功能维持与其表面的 c-kit 受体激活密切相关,c-kit 受体激活依赖于其配体干细胞因子(stem cell factor,SCF)[2]。因此,SCF 对于 ICCs 的增殖分化及其功能维持具有重要作用[3-4]。研究表明,ICCs 在胃肠道具有起搏作用[5],且其表达改变可以导致 ICCs 数改变,进而导致胃肠道动力功能紊乱[6]。在泌尿道,ICCs 已经被证实存在于肾盂、输尿管组织中并发挥起搏作用[7-8]。目前,ICCs 在膀胱中的存在也已被证实[9-10],其与膀胱功能障碍性疾病的关系研究正逐渐成为研究的热点。膀胱过度活动症是一种常见的膀胱功能障碍性疾病,研究发现其发生与 ICCs 数增加关系密切[11-12]。逼尿肌活动低下是一种与逼尿肌过度活动症相反的膀胱功能障碍性疾病,但其与 ICCs 的关系目前研究较少。我们推测,逼尿肌活动低下的发生可能与 SCF 介导的 ICCs 表达改变密切相关。为证实此推测,本研究观察 DU 逼尿肌中 ICCs 的表达改变,并进一步分析外源性 SCF 对 ICCs 表达及逼尿肌收缩力的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物及分组

雌性 Sprague-Dawley(SD)大鼠 50 只,2 月龄,体质量 190~220 g,购自第三军医大学实验动物中心(动物批准号:SYXK-PLA-20120031),清洁级条件下饲养。近端尿道结扎法制作膀胱出口梗阻(bladder outlet obstruction, BOO)大鼠动物模型[13]。8 周后行膀胱充盈性测压,筛选出 DU 动物模型。实验分为 3 组:对照组、DU 组、DU + SCF 组,每组 18 只。给药方法:将 SCF 以 PBS 进行稀释,按照 0.2 μg/(kg · d)对 18 只 DU 大鼠进行腹腔注射,对照组及 DU 组以等量的 PBS 进行处理。2 周后行膀胱充盈性测压观察膀胱功能改变,然后腹腔内注射 3% 戊巴比妥钠(100 mg/kg)处死大鼠,收集膀胱标本,检测各组逼尿肌组织中 ICCs 数、c-kit 及 SCF 的表达,体外肌条实验检测逼尿肌收缩力的改变。

### 1.2 免疫组织荧光化学法检测逼尿肌组织中 ICCs 的表达

大鼠处死后,经尿道注入 4% 多聚甲醛至膀胱明显膨胀,快速结扎近端尿道及双侧输尿管后将膨胀的膀胱完整取出置于 4% 多聚甲醛 21 ℃放置约 30 min,置于 0.1 mol/L PBS 中 21 ℃过夜。第 2 天于膀胱侧壁剪取大小约 4 mm × 4 mm 的组织片,剥离黏膜层及浆膜层后置于 1% BSA 室温放置封闭 1 h,置于羊抗大鼠一抗中(1∶100)4 ℃孵育 24 h,再加入兔抗羊荧光标记二抗室温孵育 1 h。以 0.01 mol/L PBS 漂洗 2 h 后置于载玻片上用激光共聚焦显微镜观察 c-kit 阳性细胞表达情况。每个标本取 5 个随机视野,由观察者在不清楚组别的情况下计数 c-kit 阳性细胞数。

### 1.3 ELISA 检测血清中 SCF 表达

在大鼠处死前取 2 mL 血液样本,应用 ELISA 试剂盒按照说明书检测血清 SCF 浓度。SCF 标准曲线根据已知的 SCF 浓度制作,每个样本的血清 SCF 浓度根据标准曲线进行计算得出。

### 1.4 Western blot 检测逼尿肌组织中 c-kit 以及 SCF 的表达

取大约 25 mg 逼尿肌组织标本,常规提取总蛋白质并测定浓度。取各组总蛋白 50 μg 进行 SDS-PAGE 电泳,电转移至硝酸纤维素膜,以 5% 脱脂奶粉-PBS 室温封闭 2 h 后加入一抗,包括 SCF(1∶200)、c-kit(1∶100)以及 GAPDH(1∶500)。室温放置半小时,然后 4 ℃过夜,PBST 洗涤 3 次,加入辣根过氧化物酶标记的二抗(1∶500),37 ℃孵育 1 h,PBST 洗涤 3 次,DAB 染色,适时终止,光密度扫描,Quantity One 图像分析系统分析显色条带。相关蛋白表达采用目标条带与 GAPDH 条带的光密度比值表示。

### 1.5 半定量 RT-PCR 检测逼尿肌组织中 c-kit 以及 SCF 的表达

取膀胱侧壁组织约 30 mg,常规提取组织总 RNA 并进行定量,凝胶电泳检测总 RNA 完整性。取各组总 RNA 各 2 μg 作为模板进行逆转录。设计扩增用 c-kit 正义链:5′-TGCCGGTCGATTCCAAGTTT-3′,反义链:5′-GCCGACGGAATTGACCCTC-3′,目的片段为 269 bp。SCF 正义链:5′-CCTGCAATATGAAGCCCCAAGAC-3′,反义链:5′-GGTGCCCTCCTGCTACTTTTAC-3′,目的片段为 166 bp。GAPDH 正义链:5′-CCGCCCCTTCCGCTGATG-3′,反义链:5′-CCGCCTGCTTCACCACCTTCTT-3′,目的片段为 432 bp。循环参数:94 ℃ 5 min,94 ℃ 30 s,56 ℃ 1 min,68 ℃ 2 min,共 30 个循环,68 ℃ 7 min。反应结束后行 2% 琼脂糖凝胶电泳,采用 Quantity One 图像分析系统分析计算曲线下面积,以目标条带与 GAPDH 光密度比值表示相关基因相对表达水平。

### 1.6 体外肌条实验检测逼尿肌收缩功能

快速处死大鼠后于膀胱侧壁取大小约 7 mm × 2 mm 肌条组织,置于通以 95% $O_2$ 和 5% $CO_2$ 37 ℃内含 5 mL Kreb' 溶液(pH 7.4)的器官槽中,肌条两端纵向置于两个金属钩之间,上端通过张力传感器与生物实验数据收集系统相连接。肌条在器官槽内平衡约 30 min 后开始记录等张收缩情况,初始张力为 0.3 g。

收缩波的幅度为其基底至其波峰的高度,收缩频率取其每5分钟收缩次数的平均值。

### 1.7　统计学方法

采用SPSS 19.0统计软件,计量资料以$\bar{x} \pm s$表示,两样本均数比较采用独立样本$t$检验。$P<0.05$为差异有统计学意义。

## 2　结果

### 2.1　膀胱充盈性测压检测膀胱收缩功能

DU组膀胱排尿收缩幅度[(12.3±1.4)$cmH_2O$]及排尿收缩频率[(0.56±0.04)次/min]较对照组膀胱排尿收缩幅度[(24.8±2.6)$cmH_2O$]及排尿收缩频率[(0.82±0.07)次/min]显著降低($P<0.05$),膀胱活动明显低下。加入外源性SCF后,DU+SCF组膀胱排尿收缩幅度[(21.6±1.9)$cmH_2O$]及排尿收缩频率[(0.73±0.06)次/min]较DU组显著增强($P<0.05$,图1),提示外源性SCF可以显著改善活动低下逼尿肌的收缩功能。

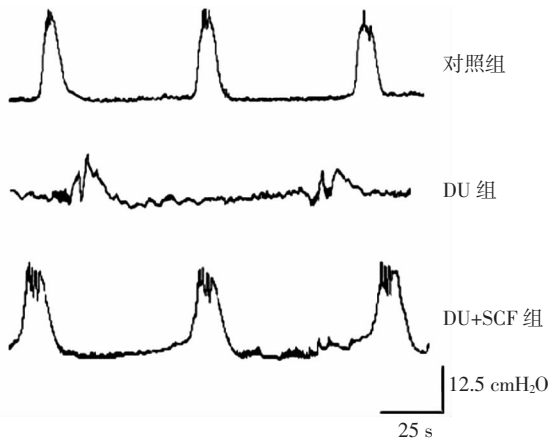


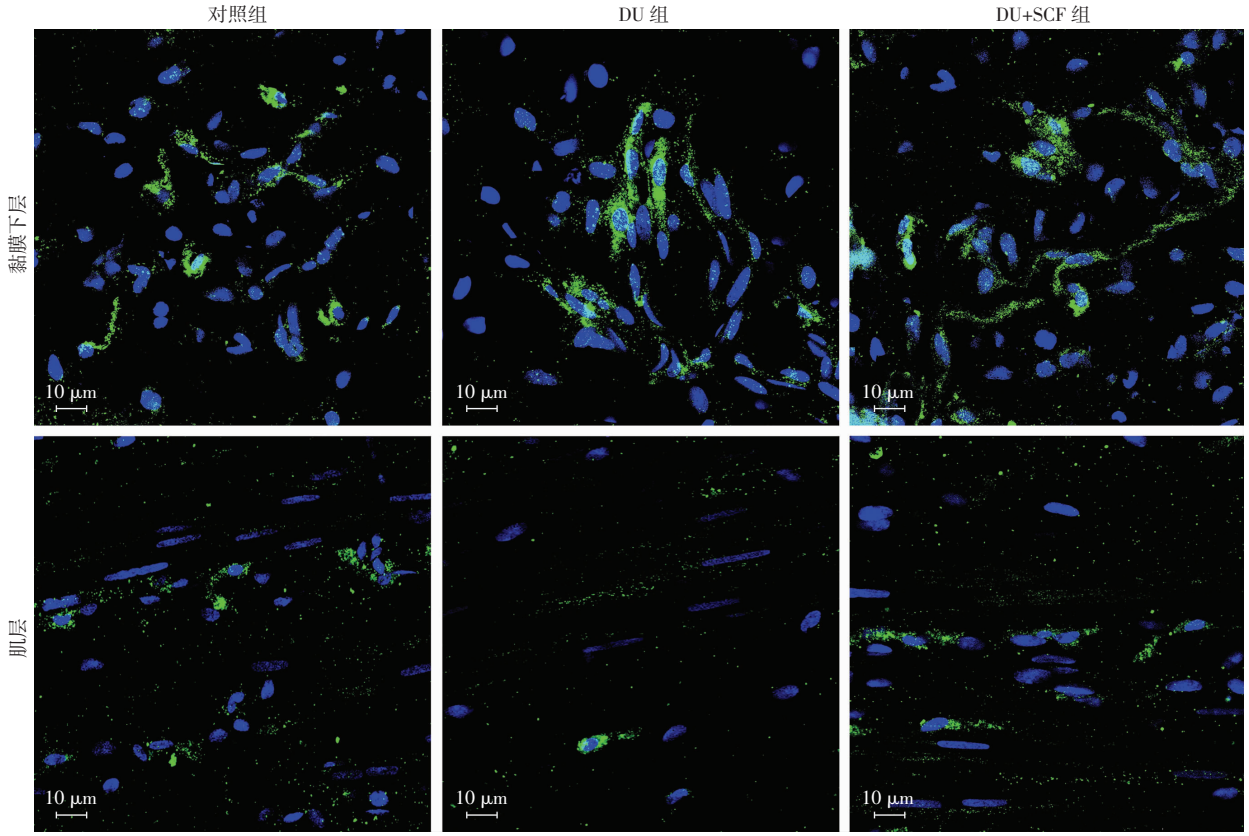

**图1　膀胱充盈性测压检测膀胱收缩功能**

### 2.2　ELISA检测血清中SCF水平

DU组大鼠血清SCF水平为(206.1±14.1)ng/L,较对照组[(390.8±19.8)ng/L]降低($P<0.05$)。加入外源性SCF后,DU+SCF组大鼠血清SCF水平[(387.5±17.9)ng/L]显著提升($P<0.05$),提示外源性SCF可以显著恢复DU大鼠血清SCF水平。

### 2.3　免疫组织荧光化学法检测ICCs数

典型的梭形ICCs细胞广泛分布于膀胱黏膜下层以及肌层。DU组大鼠膀胱黏膜下层ICCs数(4.1±0.3)较对照组(12.3±1.1)显著减少($P<0.05$),肌层ICCs数(3.7±0.2)较对照组(10.93±0.9)亦显著减少($P<0.05$)。加入外源性SCF后,DU+SCF组黏膜下层(6.8±0.5)及肌层(5.9±0.4)ICCs数较DU组显著提升($P<0.05$,图2),提示外源性SCF可以显著恢复活动低下逼尿肌组织中的ICCs数。

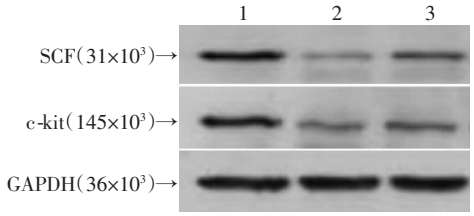



蓝色为细胞核,绿色为ICCs

**图2　ICCs激光共聚焦成像观察**

2.4 Western blot 检测 SCF 及 c-kit 蛋白水平

DU 组 SCF 蛋白水平(0.43 ±0.03)较对照组(0.88 ±0.07)显著降低($P<0.05$);c-kit 蛋白水平(0.37 ±0.03)亦较对照组(0.90 ±0.08)显著降低($P<0.05$)。加入外源性 SCF 后,DU + SCF 组 SCF(0.79 ±0.07)及 c-kit(0.81 ±0.07)蛋白水平较 DU 组均显著提高($P<0.05$),提示外源性 SCF 可以显著恢复 DU 膀胱中 SCF 以及 c-kit 蛋白水平(图 3)。

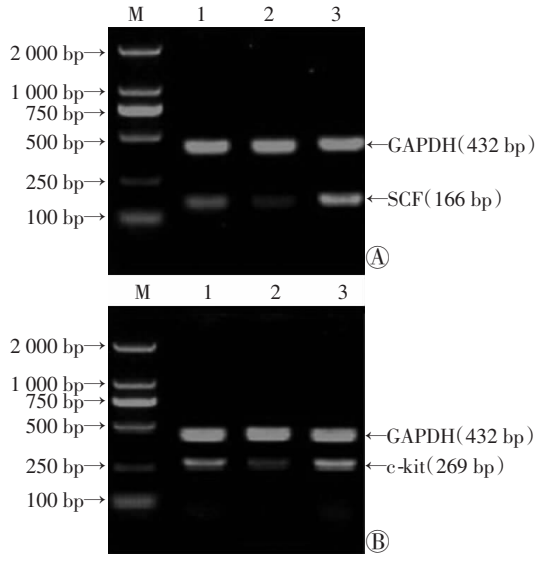



1:对照组;2:DU 组;3:DU + SCF 组

**图 3 Western blot 检测 SCF 及 c-kit 蛋白表达**

2.5 半定量 RT-PCR 检测 SCF 及 c-kit 基因表达

DU 组 SCF mRNA (0.21 ±0.01)较对照组(0.91 ±0.07)显著降低($P<0.05$); DU 组 c-kit mRNA (0.34 ±0.02) 较对照组(0.92 ±0.08)亦显著降低($P<0.05$)。加入外源性 SCF 后,DU + SCF 组 SCF mRNA (0.52 ±0.04)及 c-kit mRNA(0.73 ±0.05)较 DU 组均显著提高($P<0.05$),提示外源性 SCF 可以显著恢复 DU 膀胱中 SCF 及 c-kit 基因表达水平(图 4)。




M:标准;1:DU + SCF 组;2:DU 组;3:对照组

**图 4 RT-PCR 检测 SCF(A)及 c-kit(B) mRNA 表达水平**

2.6 体外肌条收缩实验检测逼尿肌收缩能力

DU 组大鼠逼尿肌收缩幅度[(0.09 ±0.01)g]较对照组[(0.22 ±0.02)g]显著降低($P<0.05$);收缩频率[(1.61 ±0.01)次/min]较对照组[(2.92 ±0.02)次/min]亦显著降低($P<0.05$);加入外源性 SCF 后,DU + SCF 组逼尿肌条收缩幅度[(0.18 ±0.01)g]及频率[(2.78 ±0.02)次/min]较 DU 组均显著提高($P<0.05$),提示外源性 SCF 可以显著恢复活动低下逼尿肌的收缩能力(图 5)。

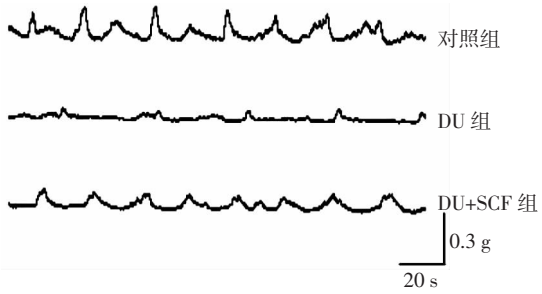



**图 5 肌条实验检测逼尿肌收缩能力**

## 3 讨论

大鼠膀胱出口梗阻动物模型为研究膀胱功能障碍的发生机制提供了良好的平台。既往研究发现膀胱出口部分梗阻可以导致膀胱过度活动[14-15]。本研究发现,膀胱出口部分梗阻较长时间后膀胱逼尿肌出现收缩幅度及频率的显著降低,提示出现 DU。既往研究多集中于膀胱过度活动,对 DU 关注较少。近年 DU 发病率逐渐升高,引起人们的重视,其病理生理机制研究逐渐成为新的热点领域。

ICCs 是一种广泛存在于多种平滑肌器官的间质细胞,与多种器官功能障碍性疾病的发生密切相关。我们前期研究发现,梗阻 6 周后膀胱逼尿肌功能活动明显增强,逼尿肌 ICCs 数显著增加[13],与 Kim 等[16]的研究结果一致,提示 ICCs 与逼尿肌功能活动改变密切相关,为研究 DU 提供了新的切入点,即 DU 的发生可能与逼尿肌组织内 ICCs 的改变有关。

本研究表明,活动低下逼尿肌组织中黏膜下层及肌肉层 ICCs 数均显著降低,但导致 ICCs 数改变的病理生理机制不清楚。c-kit 是存在于 ICCs 表面的一种酪氨酸激酶受体,其天然配体是 SCF[17]。ICCs 的分化和增殖有赖于 c-kit 和 SCF 的结合[4-5]。研究表明,ICCs 细胞数的减少并不是由于细胞死亡造成的,而是由于 ICCs 细胞表型再分化导致[3],而这可能与 SCF 有密切关系。Lin 等[6]研究发现,糖尿病小鼠结肠中 ICCs 细胞减少与 SCF 减少关系密切。本研究结果显示,DU 膀胱中 SCF 及 c-kit 表达均显著减少,伴随逼尿肌收缩功能减弱,提示 SCF 可能影响 ICCs 的增殖分化,进而导致逼尿肌出现动力功能障碍。

虽有很多研究提示 ICCs 数减少可以导致脏器功能受损,但对于如何逆转或修复这种损伤目前尚不清楚。Nakahara 等[18]进行体外细胞实验证实 ICCs 表现出对于 SCF 剂量依赖及时间限制的增殖应答反应。研究证实,外源性 SCF 可以通过 SCF/c-kit 途径促进 ICCs 细胞数及功能恢复,且高浓度的 SCF 作用更强[19]。本研究亦证实,外源性 SCF 可以一定程度上提高受损逼尿肌中 c-kit 的表达,增加 ICCs 数,进而部分恢复受损逼尿肌的收缩能力。这些结果提示,ICCs 数及功能改变可以通过外源性 SCF/c-kit 途径对其加以调控,通过局部应用外源性 SCF 可以改善由于 ICCs 改变导致的脏器功能受损状况,为给包括 DU 在内的器官功能障碍性疾病研究提供方向。

**参考文献:**


[1] Aggarwal H, Zimmern P E. Underactive Bladder[J]. Curr Urol Rep, 2016, 17(3): 17. DOI: 10.1007/s11934-016-0582-6

[2] Lorincz A, Redelman D, Horvath V J, *et al*. Progenitors of interstitial cells of cajal in the postnatal murine stomach[J]. Gastroenterology, 2008, 134(4): 1083 - 1093. DOI: 10.1053/j.gastro.2008.01.036

[3] Torihashi S, Nishi K, Tokutomi Y, *et al*. Blockade of kit signaling induces transdifferentiation of interstitial cells of cajal to a smooth muscle phenotype[J]. Gastroenterology, 1999, 117(1): 140 - 148. DOI: 10.1016/S0016-5085(99)70560-3

[4] Wu J J, Rothman T P, Gershon M D. Development of the interstitial cell of Cajal: origin, kit dependence and neuronal and nonneuronal sources of kit ligand[J]. J Neurosci Res, 2000, 59(3): 384 - 401. DOI: 10.1002/(SICI)1097-4547(20000201)

[5] Thomsen L, Robinson T L, Lee J C, *et al*. Interstitial cells of Cajal generate a rhythmic pacemaker current[J]. Nat Med, 1998, 4(7): 848 - 851. DOI: 10.1038/nm0798-848

[6] Lin L, Xu L M, Zhang W, *et al*. Roles of stem cell factor on the depletion of interstitial cells of Cajal in the colon of diabetic mice[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2010, 298(2): G241 - G247. DOI: 10.1152/ajpgi.90706.2008

[7] Pezzone M A, Watkins S C, Alber S M, *et al*. Identification of c-kit-positive cells in the mouse ureter: the interstitial cells of Cajal of the urinary tract[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2003, 284(5): F925 - F929. DOI: 10.1152/ajprenal.00138.2002

[8] Yang X, Zhang Y, Hu J. The expression of Cajal cells at the obstruction site of congenital pelviureteric junction obstruction and quantitative image analysis[J]. J Pediatr Surg, 2009, 44(12): 2339 - 2342. DOI: 10.1016/j.jpedsurg.2009.07.061

[9] Gevaert T, Vanstreels E, Daelemans D, *et al*. Identification of different phenotypes of interstitial cells in the upper and deep lamina propria of the human bladder dome[J]. J Urol, 2014, 192(5): 1555 - 1563. DOI: 10.1016/j.juro.2014.05.096

[10] Davidson R A, McCloskey K D. Morphology and localization of interstitial cells in the guinea-pig bladder: structural relationships with smooth muslce and neurons[J]. J Urol, 2005, 173(4): 1385 - 1390. DOI: 10.1097/01.ju.0000146272.80848.37

[11] Kim S O, Song S H, Ahn K Y, *et al*. Distribution of interstitial cells of cajal in menopausal rat urinary bladder showing detrusor overactivity[J]. Int Neurourol J, 2010, 14(1): 48 - 53. DOI: 10.5213/inj.2010.14.1.48

[12] Kubota Y, Kojima Y, Shibata Y, *et al*. Role of KIT-Positive Interstitial Cells of Cajal in the Urinary Bladder and Possible Therapeutic Target for Overactive Bladder[J]. Adv Urol, 2011, 2011: 816342. DOI: 10.1155/2011/816342

[13] Wang Y, Fang Q, Lu Y, *et al*. Effects of mechanical stretch on interstitial cells of Cajal in guinea pig bladder[J]. J Surg Res, 2010, 164(1): e213 - e219. DOI: 10.1016/j.jss.2010.04.040

[14] 封建立, 孙道冬, 蒙明森, 等. 膀胱出口梗阻对逼尿肌收缩力的影响及其与神经支配的关系[J]. 第三军医大学学报, 2014, 36(13): 1433 - 1436. DOI: 10.16016/j.1000-5404.2014.13.021

[15] 封建立, 李龙坤, 杨景, 等. 不稳定逼尿肌中 ICCs 细胞与逼尿肌收缩的关系[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(10): 894 - 896. DOI: 10.16016/j.1000-5404.2008.10.017

[16] Kim S O, Oh B S, Chang I Y, *et al*. Distribution of interstitial cells of Cajal and expression of nitric oxide synthase after experimental bladder outlet obstruction in a rat model of bladder overactivity[J]. Neurourol Urodyn, 2011, 30(8): 1639 - 1645. DOI: 10.1002/nau.21144

[17] Nishimura M, Koda K, Oda K, *et al*. Mesenteric transection decreases expression of interstitial cells of Cajal in an experimental model[J]. Br J Surg, 2007, 94(4): 483 - 490. DOI: 10.1002/bjs.5529

[18] Nakahara M, Isozaki K, Vanderwinden J M, *et al*. Dose-dependent and time-limited proliferation of cultured murine interstitial cells of Cajal in response to stem cell factor[J]. Life Sci, 2002, 70(20): 2367 - 2376. DOI: 10.1016/S0024-3205(02)01517-5

[19] Tong W, Jia H, Zhang L, *et al*. Exogenous stem cell factor improves interstitial cells of Cajal restoration after blockade of c-kit signaling pathway[J]. Scand J Gastroenterol, 2010, 45(7/8): 844 - 851. DOI: 10.3109/00365521003782371


(**收稿**:2016-02-18;**修回**:2016-04-04)

(编辑 龙 亮)