·论 著·

ATP 对原代培养大鼠膀胱 Cajal 间质细胞及逼尿肌细胞兴奋性的影响

樊汝会,王永权,李雪梅,李为兵,宋 波,周占松,方 强 (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** 探讨外源性 ATP 对大鼠膀胱 Cajal 间质细胞(ICC)兴奋性的影响。**方法** 采用胶原酶消化法急性分离 SD 大鼠膀胱 ICC 和逼尿肌细胞(DSMC),通过激光共聚焦技术检测外源性 ATP 作用前后 ICC 及 DSMC 内 Ca^{2+} 信号的变化。**结果** 胶原酶 P 消化后,在干细胞因子(SCF)的刺激下,经 c-kit 免疫荧光染色阳性的 ICC 呈长梭形或纺锤形,胞体较小,并且带有分枝状突起,而 DSMC 呈纤维形或短棒状,二者形态有明显区别。Fluo-4 NW 染色后,激光共聚焦显微镜观察显示,静止状态下 ICC 内 $[Ca^{2+}]_i$ 平均荧光强度(55.16 ± 3.23)显著强于平滑肌细胞(45.59 ± 2.08),$P < 0.05$;20 μmol/L 和 100 μmol/L ATP 可诱发体外培养的 ICC 及 DSMC 细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 一过性升高,随后缓慢下降。**结论** 在 SCF 刺激条件下,SD 大鼠膀胱 ICC 和 DSMC 可在体外稳定混合培养。外源性 ATP 可兴奋体外混合培养的 ICC 和 DSMC。

[关键词] 膀胱;ATP;Cajal 间质细胞;兴奋性

[中图分类号] R694;R329.25 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2011)02-0117-03

Effect of ATP on excitability of interstitial cells of Cajal and detrusor smooth muscle cell in primary cultured rat bladder

FAN Ru-hui, WANG Yong-quan, LI Xue-mei, LI Wei-bing, SONG Bo, ZHOU Zhan-song, FANG Qiang (Urological Research Institute of PLA, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the effect of ATP on excitability of interstitial cells of Cajal (ICC) and detrusor smooth muscle cells (DSMC) in SD rat bladder. **Methods** ICC and DSMC in SD rat bladder were isolated by collagenase digestion and the effects of ATP on variation of Ca^{2+} in ICC and DSMC were assessed by confocal laser scanning microscopy (CLSM). **Results** Obvious morphological differences were observed between ICC and DSMC. The positive ICC were long shuttle-shaped or spindle-shaped, small with branch-like protrusion while those of DSMC were in fiber shape or short-bar shape after immunofluroescence staining by c-kit. The results of CLSM showed that the mean intensity of Ca^{2+} in ICC was (55.16 ± 3.23), obvious higher than that of (45.59 ± 2.08) in DSMC under static condition after Fluo-4 NW staining ($P < 0.05$). Continue application of ATP at concentrations of 20 μmol/L and 100 μmol/L caused a transient rise of Ca^{2+} followed by a slow decline in both ICC and DSMC. **Conclusion** ICC and DSMC in SD rat bladder can be co-cultured in vitro under stem cell factor (SCF) stimulation and ATP can excite ICC and DSMC in vitro.

Keywords: bladder; ATP; interstitial cells of Cajal; excitability

迄今为止,有关逼尿肌收缩的神经调控机制尚未完全阐明,导致许多排尿异常的治疗缺乏针对性,疗效欠佳。Cajal 间质细胞(interstitial cells of Cajal, ICC)最早是在胃肠道内发现的一类特殊的间质细胞,ICC 对胃肠道基本电节律的形成、神经传导的调控、信号整合等多种生理功能起到了重要的作用[1]。近年来,ICC 在膀胱功能调控中的作用逐渐受到重视,成为排尿功能障碍性疾病研究热点之一[2-3]。我所前期研究证实大鼠膀胱内的 ICC 和神经末梢的解剖位置紧密相邻,并且 ICC 可表达 $P2X_2$ 和 $P2X_5$ 两种嘌呤受体[4-5],提示 ATP 介导的嘌呤能神经信号极有可能通过兴奋 ICC 调控膀胱功能。本研究通过激光共聚焦显微镜观察外源性 ATP 对体外混合培养的 ICC 及逼尿肌细胞(DSMC)内 Ca^{2+} 的影响,从细胞水平证实嘌呤能神经递质 ATP 是否能够兴奋 ICC,以期为进一步探明 ATP 介导的嘌呤能信号在膀胱功能调控中的作用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

采用健康 60~90 d 龄 SD 大鼠 10 只,雌雄不限,体重 200~250 g,购自第三军医大学实验动物中心。恒温细胞培养箱,激光共聚焦显微镜,胶原酶 P,重组干细胞因子(stem cell fac-

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30700270,81070604)

[作者简介] 樊汝会(1968-),女,重庆市人,主管技师,本科,主要从事排尿功能障碍方面的研究。电话:(023)68765346

[通讯作者] 方 强,电话:(023)-68765345,E-mai:fangqiang@ tmmu.edu.cn

[收稿日期] 2010-12-13 [修回日期] 2011-01-12

tor,SCF),Fluo-4 NW 钙分析试剂盒,FITC 标记的羊抗鼠 c-kit 单抗。

1.2 实验方法

过量 25% 乌拉坦麻醉 SD 大鼠,超净工作台内开腹,取出膀胱。PBS 漂洗 3 次,用镊子去除膀胱周围结缔组织及粘膜层,将剩余肌层组织剪成约 1 mm × 1 mm × 1 mm 碎块,0.1% 胶原酶 P 消化 45 min 到 1 h 制成细胞悬液,以 10^5/mL 的密度接种于预置载玻片的 6 孔培养板中,按照 50 ng/mL 加入重组 SCF,37 ℃、5% CO_2 培养箱中静置培养 4 ~ 5 d。培养于盖玻片上的细胞取出后 0.01 mol/L PBS 漂洗 5 min × 3 次;4% 多聚甲醛固定 30 min;0.01 mol/L PBS 漂洗 5 min × 3 次;1% BSA 室温下孵育 30 min;弃去多余孵育液,滴加 0.2% BSA/0.01 mol/L PBS 稀释的 FITC 标记 c-kit(1∶200),湿盒内 4 ℃ 12 h ;0.01 mol/L PBS 漂洗 5 min × 3 次;DAPI 复染细胞核 10 min;0.01 mol/L PBS 漂洗 5 min × 3 次;75% 甘油封片,激光共聚焦显微镜下观察。细胞生长 4 ~ 5 d 后,吸尽培养基,加入 Fluo-4 NW 荧光染料 10 mL,37 ℃孵育 30 min,取出后室温继续孵育 30 min,激光共聚焦显微镜寻找有典型形态特征的 ICC 及 DSMC,并检测其静止状态下的荧光强度。分别加入相应浓度的 ATP 液,保持终浓度分别为 20 μmol/L(A 组)和 100 μmol/L(B 组),观察 ICC 以及 DSMC 内 $[Ca^{2+}]_i$ 荧光强度变化情况。

1.3 统计学处理

计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,加药前后比较采用配对资料 t 检验,$P < 0.05$ 时有显著性差异,$P < 0.01$ 时差异非常显著,$P > 0.05$ 时无显著性差异。所有统计分析均采用 SPSS 13.0 统计软件进行。

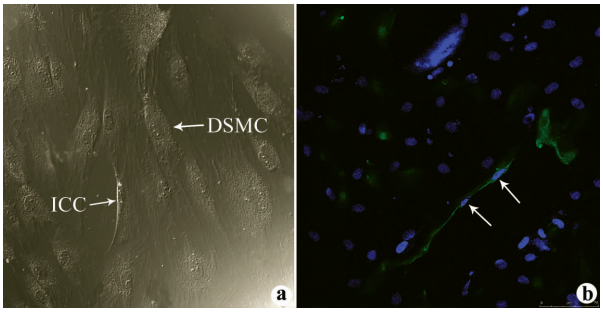
2 结果

2.1 原代混合培养的 ICC 及 DSMC 形态学特征

胶原酶 P 消化后的细胞于 1 d 内贴壁生长,SCF 的刺激下可见典型的 ICC 生长。倒置显微镜下观察,细胞呈长梭形或纺锤形,可见分枝状突起,胞体较小,排列不规则;而 DSMC 呈纤维形或短棒状,二者形态有明显区别(图 1a)。

2.2 ICC 免疫荧光染色鉴定

免疫荧光染色结果显示,体外培养的细胞中可见 c-kit 呈绿色荧光的 ICC(图 1b)。



a:原代混合培养的 ICC 与 DSMC;b:c-kit 阳性的原代培养 ICC

图 1 原代混合培养的 ICC 与 DSMC 镜下观察

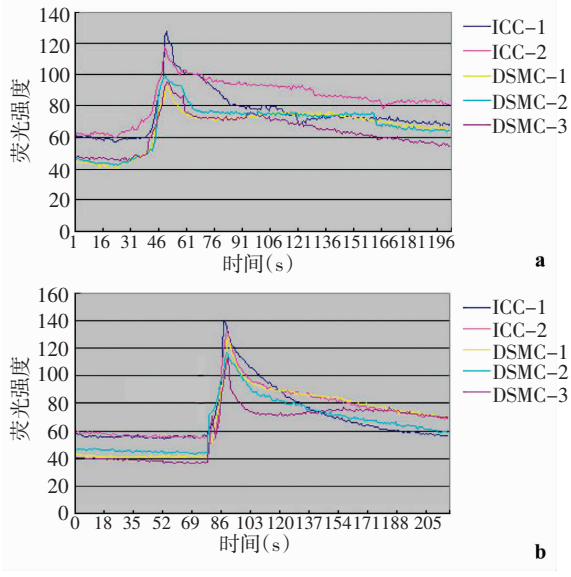
2.3 ATP 对 ICC 及 DSMC 内 $[Ca^{2+}]_i$ 荧光强度的影响

20 μmol/L 和 100 μmol/L 的 ATP 均可诱发 DSMC 内 $[Ca^{2+}]_i$ 出现一过性升高,然后缓慢下降。B(100 μmol/L)组上升幅度略高于 A(20 μmol/L)组($P < 0.05$),见表 1、图 2、图 3。

表 1 ATP 对 DSMC 及 ICC 内 $[Ca^{2+}]_i$ 荧光强度的影响

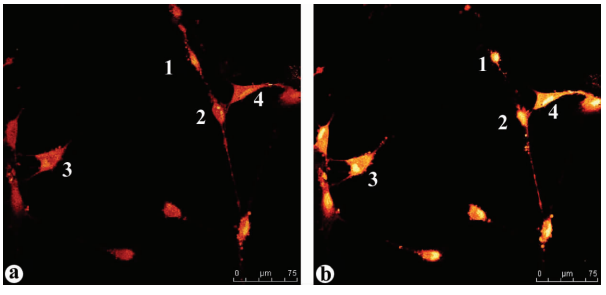
组别	DSMC		ICC	
	加药前	加药后	加药前	加药后
A 组	45.59 ± 2.46	90.32 ± 4.35 *	57.16 ± 3.23	123.38 ± 5.39 *
B 组	43.47 ± 1.68	124.65 ± 9.54 *△	56.47 ± 2.65	132.24 ± 7.31 *#

*:与加药前比较,$P < 0.01$;#:与加药前比较,$P < 0.05$,△:与 A 组加药后比较,$P < 0.01$



a:20 μmol/L ATP;b:100 μmol/L ATP

图 2 ATP 对 ICC 及 DSMC 内 $[Ca^{2+}]_i$ 的影响



a:加药前;b:加药后 1 s;1、2:ICC;3、4:DSMC

图 3 100 μmol/L ATP 对体外培养的 ICC 和 DSMC 细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 的影响

3 讨论

3.1 膀胱 ICC 的原代培养

为了能够获得纯度较高的 ICC 进行体外培养,本课题组尝试过采用德国 Miltenyi Biotec 公司的免疫磁珠细胞分选系统对膀胱 ICC 进行分离和纯化培养,而

流式细胞计数显示分离出的细胞中 c-kit 阳性率仅20%左右。并且由于分选时间较长,分选后的细胞不仅数量少,而且活性差。而本研究培养 ICC 的目的是为了观察外源性 ATP 对膀胱 ICC 以及 DSMC 细胞内钙信号的影响,以确定 ATP 是否能对 ICC 发挥作用。体外培养的 ICC 和 DSMC 形态学上差异很大,倒置显微镜下容易鉴别,故本课题组舍去分选过程,直接将膀胱 ICC 与 DSMC 混合培养。

SCF 是 KIT 受体的配体,分为膜结合型和可溶性,由 Sl 位点的基因编码,是一种糖基化非共价同型二聚体,也称 Steel 因子、肥大细胞生长因子等。SCF-KIT 信号通路对 ICC 的正常发育、分化有重要的作用。编码 KIT 蛋白的基因 c-kit 或编码 SCF 的基因 Steel 发生突变时,KIT 信号途径被阻断,均会导致 ICC 的发育异常[6-7]。我们在培养液中加入浓度为 5 ng/mL 的 SCF,以保证 ICC 正常生长和维持细胞表型。通过 c-kit 免疫荧光染色,证实 ICC 能够稳定维持细胞表型。

3.2 ATP 诱发 ICC 及 DSMC 内 $[Ca^{2+}]_i$ 升高及其意义

钙离子是细胞内的第二信使,它在肌肉收缩、细胞运动、信息传递、物质代谢等多种细胞功能调节中起重要作用[8]。生理情况下,细胞外钙浓度远高于细胞内,通常情况下,细胞外液 Ca^{2+} 浓度为 1×10^6 nmol/L,细胞内仅为 100 ~ 200 nmol/L。由于细胞膜对 Ca^{2+} 通透性很低,细胞内外的 Ca^{2+} 流动主要依靠三种机制:Ca^{2+} 内流,主要通过细胞膜上的钙通道;钙泵或 $Ca^{2+}/2H^+$-ATP 酶,它利用能量将 Ca^{2+} 泵出细胞;细胞内钙库,如内质网、线粒体等释放的 Ca^{2+}。

本课题组在前期证实 ATP 参与了逼尿肌功能调控的基础上,进一步从细胞水平观察了 ATP 对 DSMC 和 ICC 内 $[Ca^{2+}]_i$ 的影响。Wu 等[9]研究显示,30 μmol/L 的 ATP 作用于急性分离的胎羊膀胱逼尿肌细胞,可引起细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 一过性升高,细胞膜去极化,进而激活电压依赖的 L-型钙通道,使 Ca^{2+} 进一步快速内流增加,产生动作电位,激发逼尿肌收缩。本研究结果与上述报道类似。提示支配膀胱的副交感神经释放的 ATP 能够直接兴奋逼尿肌。而有关 ATP 对膀胱 ICC 内 $[Ca^{2+}]_i$ 的影响,目前尚未见文献报道。本研究结果显示,加入外源性的 ATP 后,ICC 内 $[Ca^{2+}]_i$ 同样会出现一过性升高,随后缓慢下降,其变化趋势与 DSMC 非常类似。这一结果提示,ATP 不仅能够兴奋 DSMC,而且可以兴奋膀胱内的 ICC。

已有研究显示,在体情况下,支配膀胱的副交感神经兴奋时可释放 ATP 调节逼尿肌收缩功能,另一方面,膀胱充盈过程中,受牵拉的膀胱上皮细胞也会释放 ATP 参与膀胱感觉功能的形成[10]。P2X 受体是 ATP 在膀胱发挥生理功能的重要靶分子之一。到目前为止,已有 7 个 P2X 受体亚型被克隆,根据结构不同分别命名为 $P2X_{1-7}$。P2X 受体是一种 ATP 门控的阳离子通道,在机体组织中广泛分布,对钠和钾几乎有相同的通透性,尤其是钙离子的通透具有重要生理意义[11]。本课题组前期研究证实,大鼠膀胱内 7 种 P2X 亚型均有表达,但定位于 DSMC 的只有 $P2X_1$,与 Lee 等[12]的报道一致。而在膀胱 ICC 上,我们检测到了 $P2X_2$ 和 $P2X_5$ 两种亚型[5]。结合本实验结果,尽管 DSMC 和 ICC 都能被 ATP 激活,但具体的分子机制并不相同。进一步明确 ATP 介导的嘌呤能神经信号在各种排尿功能障碍性疾病中的作用将为这类疾病的治疗提供全新的切入点。

[参考文献]

[1] Gfroerer S, Metzger R, Fiegel H, et al. Differential changes in intrinsic innervation and interstitial cells of Cajal in small bowel atresia in newborns[J]. World J Gastroenterol, 2010, 16(45): 5716 - 5721.

[2] Kim SO, Song SH, Ahn KY, 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.

[3] 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.

[4] 方 强,杨 景,潘进洪,等. 大鼠膀胱 ICC 与逼尿肌神经调控关系的形态学研究[J]. 中华外科杂志, 2008, 20(46): 1542 - 1545.

[5] 方 强,杨 景,潘进洪,等. P2X 嘌呤受体在大鼠膀胱 ICCs 细胞中的表达[J]. 第三军医大学学报, 2008, 7(30): 564 - 566.

[6] 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.

[7] Lin L, Xu LM, 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.

[8] Pinheiro AC, Gomez RS, Guatimosim C, et al. The effect of sevoflurane on intracellular calcium concentration from cholinergic cells[J]. Brain Res Bull, 2006, 69(2): 147 - 152.

[9] Wu C, Bayliss M, Newgreen D, et al. A comparison of the mode of action of ATP and carbachol on isolated human detrusor smooth muscle [J]. J Urol, 1999, 162(5): 1840 - 1847.

[10] Sugaya K, Nishijima S, Tasaki S, et al. Effects of propiverine and naftopidil on the urinary ATP level and bladder activity after bladder stimulation in rats[J]. Neurosci Lett, 2007, 429(2-3): 142 - 146.

[11] Evans RJ. Structural interpretation of P2X receptor mutagenesis studies on drug action[J]. Br J Pharmacol, 2010, 161(5): 961 - 971.

[12] Lee HY, Bardini M, Burnstock G. Distribution of P2X receptors in the urinary bladder and the ureter of the rat[J]. J Urol, 2000, 163(6): 2002 - 2007.

(编辑:余汇洋)