豚鼠输尿管 Cajal 间质细胞毒蕈碱受体的表达及功能研究

吴康棋,葛 亮,方 强,蒙明森,鄢俊安,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** 研究毒蕈碱受体在豚鼠输尿管 Cajal 间质细胞(ICC)上的表达,初步探讨 ICC 在胆碱能神经递质传递中的作用。**方法** 将 20 只豚鼠随机分成对照组和实验组,进行输尿管肌条实验,观察在卡巴胆碱作用下输尿管肌条的收缩幅度和频率的变化;10 只豚鼠,将输尿管进行固定、撕片和荧光染色,检测豚鼠输尿管毒蕈碱受体亚型(M_1 ~ M_5)在 ICC 上的表达情况。**结果** 卡巴胆碱作用后,实验组肌条的收缩幅度为 0 g,频率为 0 次/分,对照组的幅度为(0.106 ± 0.021)g,频率为(4.900 ± 0.875)次/分,两组差异显著($P < 0.01$)。免疫荧光双标显示,输尿管 ICC 仅表达 M_2、M_3受体亚型。**结论** 胆碱能神经可能通过 ICC 来调控输尿管平滑肌。

[关键词] 豚鼠;输尿管;Cajal 间质细胞;毒蕈碱受体

[中图分类号] R334.2;R338;R693 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2011)02-0120-04

Expression and function of muscarinic receptors in interstitial cells of Cajal

WU Kang-qi, GE Liang, FANG Qiang, MENG Ming-sen, YAN Jun-an, LI Wei-bing (Urological Research Institute of PLA, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the expression of muscarinic receptors in interstitial cells of Cajal (ICC) and to discuss preliminarily on the role of ICC in the transmission of cholinergic neurotransmitter. **Methods** Twenty guinea pigs were randomly divided into control and experiment group. The changes of ureteral muscle contraction amplitude and frequency were observed after applying ureteral muscle strip experiment in vitro. Fixation, tear film and fluorescence staining were performed on the ureters of 10 guinea pigs. The expressions of the muscarinic receptors subtypes (M_1 ~ M_5) in ICC of guinea-pig ureters were detected. **Results** Statistical differences were observed between the two group in ureteral muscle contraction amplitude and frequency, which were (0) g and (0) per minute in experiment group and (0.106 ± 0.021) g and (4.900 ± 0.875) per minute in control group ($P < 0.01$). Immunofluorescence double labeling showed that ureteral ICC only expressed M_2 and M_3 receptor subtypes. **Conclusion** Cholinergic nerve may regulate ureteral smooth muscle by ICC.

Keywords: guinea-pig; ureter; interstitial cells of Cajal; muscarinic receptors

Cajal 间质细胞(interstitial cells of Cajal, ICC)是分布在消化道自主神经末梢与平滑肌细胞之间的一类特殊细胞。目前认为 ICC 是胃肠基本电节律(basic electrical rhythm, BER)的起搏者,其突起形成的网络可传播 BER;ICC 是作为壁内神经信息向平滑肌传送的中转站,并对有关信号起着整合作用,尤其是在调节 NO 依赖性的神经递质方面起重要作用[1-2]。近年来,在豚鼠和人的逼尿肌、肾盂、输尿管平滑肌等多个部位发现了 ICC。也有人认为 ICC 与神经联系紧密,它可能参与了神经元对平滑肌的调控过程[3]。本实验应用肌条实验和免疫组化方法观察输尿管 ICC 细胞毒蕈碱受体的表达以及 ICC 在胆碱能神经递质传递中的作用,供后续研究及临床研究参考。

[基金项目] 国家杰出青年基金项目(39925022)

[作者简介] 吴康棋(1982 -),男,四川省巴中市人,医师,博士,主要从事泌尿外科临床与基础方面的研究。电话:(023)68765347

[通迅作者] 李为兵,E-mail:liweibing@yahoo.com.cn

[收稿日期] 2010-12-13 [修回日期] 2011-01-10

1 材料与方法

1.1 实验动物

清洁级健康 Hartley 豚鼠 30 只(雌雄不限),8 ~ 10 周龄,体质量 250 ~ 350 g,由第三军医大学实验动物中心提供。运用完全随机数字表法分为对照组 10 只和实验组 10 只,其余 10 只进行免疫荧光化学染色。

1.2 输尿管肌条实验

豚鼠致晕或致死后,立即开腹,快速分离并切取输尿管中上段长度约 10 mm 的肌条,置于 4 ℃ Kreb's 液中。将肌条一端固定于盛有 9.7 mL Kreb's 液器官槽底部,另一端与肌肉张力换能器相连,槽内通以 95% O_2、5% CO_2 混合气体。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 2.5 s/div。

对照组($n = 10$):待肌条在器官槽内平衡 30 min 后,调节一维位移,使肌条张力升至 2.0 g,向器官槽内加入 1 mol/L KCl 200 μl,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 0.1 mol/L 的卡巴胆碱 100 μl,使器官槽的终浓度为 0.001 mol/L,观察并记录肌条张力变化曲线 3 min。

实验组($n = 10$):待肌条在器官槽内平衡 30 min 后,调节

一维位移,使肌条张力升至 2.0 g,向器官槽内加入 1 mol/L KCl 200 μl,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 0.1 mol/L 的 Glivec 100 μl,使器官槽的终浓度为 0.001 mol/L,观察并记录肌条张力变化曲线 10 min;而后,加入 0.1 mol/L 的卡巴胆碱 100 μl,使器官槽的终浓度为 0.001 mol/L,观察并记录肌条张力变化曲线 3 min。

数据测量和统计:肌条收缩的波幅和频率使用 RM6280 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 2 min 的结果统计分析。实验数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 10.0 统计软件进行 t 检验。

1.3　组织铺片免疫荧光双标检测

取豚鼠输尿管置 4% 多聚甲醛中,自输尿管下端插入硬脑膜管并用丝线固定,经硬脑膜管向输尿管内缓慢注入多聚甲醛,使输尿管充分充盈,4 ℃固定液中过夜。纵行剖开输尿管,撕去粘膜和浆膜层,制成肌层薄组织片备用。

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 1 h,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(稀释比例 1∶300)4 ℃过夜。0.01 mol/L PBS 漂洗 5 min × 3 次。加入荧光二抗 Alex fluo 488(驴抗羊、绿色荧光,1∶200)37 ℃孵育 1 h。0.01 mol/L PBS 漂洗 5 min × 3 次,分别加入 M 受体亚型抗体(M_1、M_2、M_3、M_4和 M_5)4 ℃过夜。0.01 mol/L PBS 漂洗 5 min × 3 次。加入荧光二抗 Alex fluo 594(驴抗兔、红色荧光,1∶200)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。

2　结果

2.1　卡巴胆碱对肌条自发性收缩的影响

两组在 KCl 的诱导下,均出现规律的自发性收缩。在对照组加入卡巴胆碱后,自发性收缩的频率明显增加,幅度无明显增加;实验组在加入 0.001 mol/L 的 Glivec 后,自发性收缩完全消失,再加入卡巴胆碱后,自发性收缩未出现(表 1)。

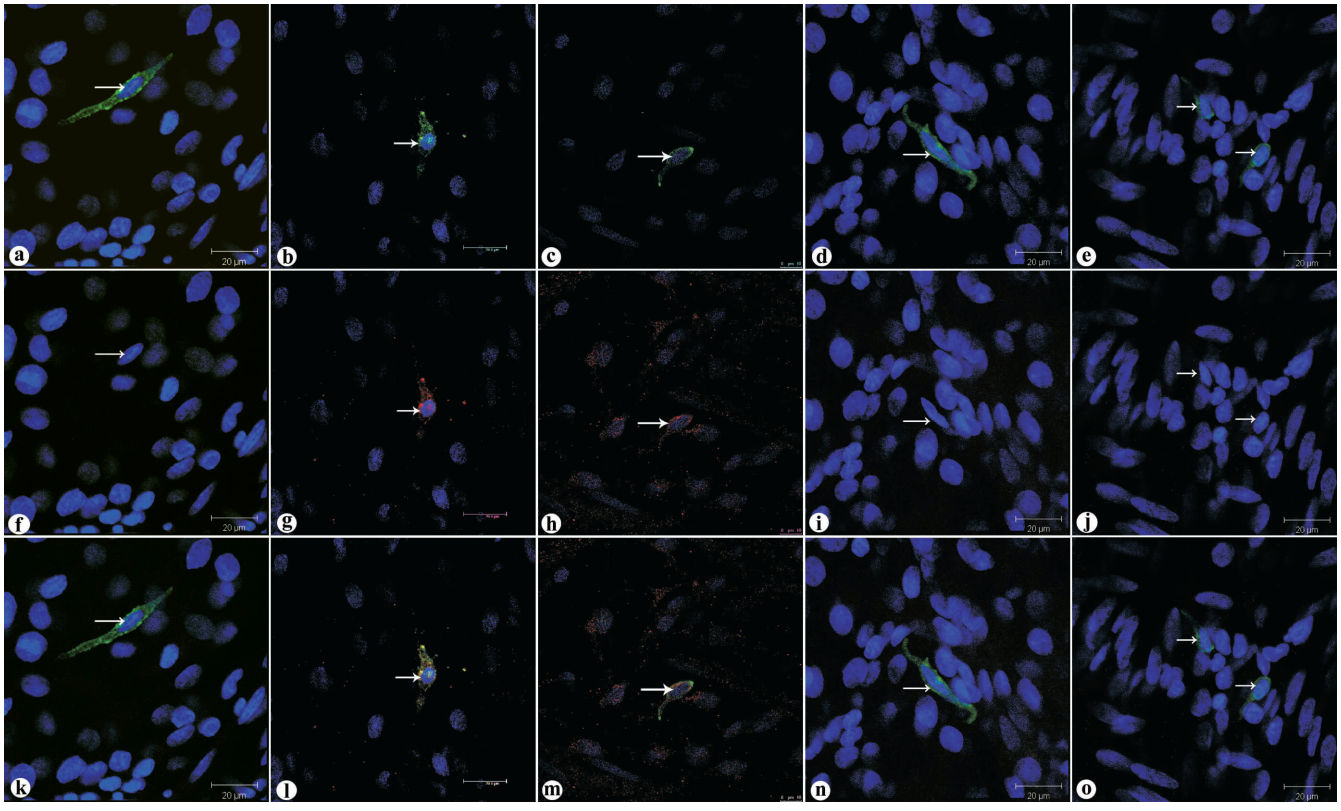
表 1　卡巴胆碱对输尿管肌条自发性收缩的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	自发性收缩		卡巴胆碱作用后	
	幅度(g)	频率(次/分)	幅度(g)	频率(次/分)
对照组	0.104 ± 0.022	3.400 ± 0.843	0.106 ± 0.021 *	4.900 ± 0.875 *
实验组	0.097 ± 0.012	3.400 ± 0.734	0	0

*:与实验组比较,$P < 0.01$

2.2　豚鼠输尿管 ICC 上 M 受体亚型分布

免疫荧光双标检测显示,在已知的 5 种 M 受体亚型中,输尿管 ICC 可表达 M_2、M_3两种亚型,未见 M_1、M_4和 M_5受体表达(图 1)。



a ~ e:c-kit 的表达(绿色);f:M_1受体未见表达;g:M_2受体表达(红色);h:M_3受体表达(红色);i:M_4受体未见表达;j:M_5受体未见表达;k:c-kit 和 M_1双标仅 c-kit 表达(绿色);l: c-kit 和 M_2共表达(绿色和红色);m:c-kit 和 M_3共表达(绿色和红色);n:c-kit 和 M_4双标仅 c-kit 表达(绿色);o: c-kit 和 M_5双标仅 c-kit 表达(绿色)

图 1　激光共聚焦显微镜观察豚鼠输尿管 ICC 上 c-kit 和 M 受体亚型的表达

3 讨论

ICC 首先是在胃肠道中被发现,主要参与胃肠基本电节律(BER)调控和神经递质信号传导,并且表达多种神经递质的受体,如 VIP、NO 和 M_3 等[1,5-7]。近年来的研究表明,在泌尿系统中发现的 ICC 和胃肠道中的形态相似,并能产生自发性的电活动或起搏电流,其功能可能与某些动力障碍性疾病的发病有关。本研究通过观察 ICC 上毒蕈碱受体的表达,来初步探讨输尿管 ICC 在胆碱能神经调控中的作用,从而进一步阐明胆碱能神经作用于输尿管平滑肌的具体机制。

本研究采用离体输尿管肌条实验从功能学上初步观察 ICC 在介导胆碱能神经传递中的作用。卡巴胆碱为 M 受体的激动剂,其作用与 Ach 相似,可以增强输尿管的节律性收缩[8]。对照组豚鼠的输尿管平滑肌肌条,在自发性收缩的基础上,加入 0.001 mol/L 卡巴胆碱后,出现收缩频率明显增加,幅度变化不明显。可见,卡巴胆碱明显地增加了豚鼠输尿管的收缩节律。Glivec 可以抑制输尿管中的 c-kit 受体(kit 是一种编码酪氨酸激酶受体的原癌基因),从而特异性地抑制输尿管中 ICC 的功能[9-10]。实验组豚鼠的平滑肌肌条,用浓度为 0.001 mol/L 的 Glivec 作用 ICC 后,自发性收缩消失(因为 ICC 与自发性收缩相关),再加入 0.001 mol/L 卡巴胆碱,自发性收缩未出现。可见,实验组肌条的收缩幅度和频率较对照组均显著降低,即在卡巴胆碱作用下实验组的收缩效应与对照组差异显著,这种差异与 ICC 相关,表明 ICC 在卡巴胆碱收缩输尿管平滑肌中起到了重要作用。

应用 c-kit 抗体标记 ICC 的方法在多种平滑肌组织中(如输尿管、膀胱、胃肠道、胆囊、子宫等)发现了 ICC 的存在[11-14]。目前认为豚鼠上尿路中只有 ICC 和肥大细胞具有 c-kit 染色阳性,ICC 呈纺锤状或星形,细胞核大,椭圆形,染色质分散,细胞质少,通常具有 2 ~ 5 条长突起;肥大细胞胞核呈圆形,胞膜没有突起,故可以通过形态学特点排除肥大细胞而筛选出 ICC。因此,本研究利用特异性的 c-kit 抗体来标记 ICC。在此基础上,再用 M_1 ~ M_5 五个亚型受体的抗体进行分别标记。实验结果显示,豚鼠输尿管的 ICC 存在毒蕈碱受体的表达,并且以 M_2、M_3 亚型为主。

在胃肠道卡巴胆碱通过作用于 ICC 毒蕈碱受体后,与 G 蛋白偶联,使 $[Ca^{2+}]_i$ 发生变化,从而来调节 ICC 的电流的变化,产生生物学效应[15]。本研究观察到 ICC 通过表达毒蕈碱受体来参与卡巴胆碱对输尿管平滑肌的收缩,据此推测胆碱能神经分泌的 Ach 首先作用于 ICC 膜上的 M_2、M_3 受体,致使 ICC 内部发生变化,从而进一步引起平滑肌的收缩,但具体作用机制还不清楚。有研究表明,反流性巨输尿管症的 ICC 数量明显减少,蠕动明显减弱[16]。可能有两方面的原因:一是 ICC 数量减少,自发性收缩减弱;二是 ICC 数量减少,胆碱能神经递质作用的靶细胞减少,Ach 不能充分与受体结合,导致收缩减弱。本研究表明 ICC 在输尿管的自发性收缩中发挥了重要作用,并且通过 M_2 和 M_3 两种受体接受毒蕈碱神经的调控。

[参考文献]

[1] 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.

[2] Iino S, Horiguchi K, Nojyo Y. Interstitial cells of Cajal are innervated by nitrergic nerves and express nitric oxide-sensitive guanylate cyclase in the guinea-pig gastrointestinal tract[J]. Neuroscience, 2008, 152(2): 437 – 448.

[3] Davidson RA, McCloskey KD. 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.

[4] 吴康棋,邓建平,方 强,等. 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[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(19): 2101 – 2104.

[5] Epperson A, Hatton WJ, Callaghan B, et al. Molecular markers expressed in cultured and freshly isolated interstitial cells of Cajal[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2000, 279(2): C529 – C539.

[6] Chen H, Redelman D, Ro S, et al. Selective labeling and isolation of functional classes of interstitial cells of Cajal of human and murine small intestine[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2007, 292(1): C497 – C507.

[7] McKay CM, Huizinga JD. Muscarinic regulation of ether-a-go-go-related gene K^+ currents in interstitial cells of Cajal[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2006, 319(3): 1112 – 1123.

[8] Tomiyama Y, Wanajo I, Yamazaki Y, et al. Functional muscarinic cholinoceptors in the isolated canine ureter[J]. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2003, 367(4): 348 – 52.

[9] Biers SM, Reynard JM, 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.

[10] Han J, Zhou YP, Jiang YZ, 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.

[11] 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.

[12] 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.

[13] Hinescu ME, Ardeleanu C, Gherghiceanu M, et al. Interstitial CaJal-like cells in human gallbladder[J]. J Mol Histol, 2007, 38(4): 275 – 284.

[14] Popescu LM, 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.

[15] So KY, Kim SH, Sohn HM, et al. Carbachol regulates pacemaker activi-

ties in cultured interstitial cells of Cajal from the mouse small intestine [J]. Mol Cells, 2009, 27(5): 525 - 531.

[16] Kang HJ, Lee HY, Jin MH, et al. Decreased interstitial cells of Cajal-like cells, possible cause of congenital refluxing megaureters: Histopathologic differences in refluxing and obstructive megaureters[J]. Urology, 2009, 74(2): 318 - 323.

(编辑:余汇洋)

· 个案与短篇 ·

颊脂体疝 1 例报告

钟河清[1],杜芯瑜[1],罗 瑛[1],雍刘军[2] (成都医学院:1. 临床系三队;2. 人体解剖学教研室,四川 成都 610083)

[关键词] 颊脂体;颊脂体疝;解剖学
[中图分类号] R323 [文献标识码] B [文章编号] 1672-5042(2011)02-0123-01

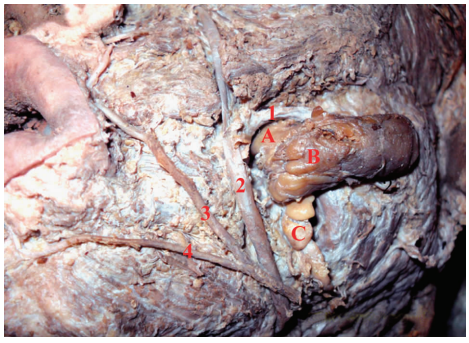
颊脂体的正常位置大部分隐藏在颊肌和嚼肌背面,紧邻颊部口腔粘膜,分为一体四突[1]。正常情况下不易发现,但在外力撞击或刺戳情况下会导致颊脂体穿过肌肉筋膜间隙而突出于皮下形成团块,从而将其称之为"颊脂体疝"。作者在解剖一具幼年女性尸体时发现小孩左侧颊部皮下有一黄色团块隆起,疑似为"颊脂体疝",现报告如下,供临床参考。

1 材料与方法

10% 福尔马林固定的幼年女性尸体 1 具,发育正常,外观无任何畸形,将面部皮瓣掀开后可见离下颌下角 2.8 cm 上方有一黄色团块隆起,疑似为"颊脂体疝"。仔细观察毗邻并测量,相机拍照。

2 结果

掀开面部皮瓣后可见下颌下角上方 2.8 cm 处有一大小为 3.2 cm × 1.2 cm × 1.3 cm,表面有光滑包膜的软组织块,呈黄色,近似长方形,游离可动,其边界清晰,表面皮肤正常(图 1)。靠近嘴角处的组织块其上缘与腮腺管下缘平齐,而另一端覆盖在腮腺管的上方,同时两者皆位于咬肌的表面。组织块下缘离下颌平面 3 cm 处有面动脉分支进入,其外径为 1.1 cm,同时还有一些小营养血管分布于组织块。在包块上可见神经分布。



1:腮腺管;2:面静脉;3:面动脉;4:下唇动脉;A、B、C:组织取样部位

图 1 颊脂体疝

3 讨论

该组织块是颊脂体还是颊脂体脂肪瘤? 就其组织成分而言,不论是颊脂体还是颊脂体脂肪瘤都很难下定论,因为它们都是脂肪细胞。但将其命名为"颊脂体疝"较为恰当,主要有以下原因。该小孩硬脑膜下全是血凝块,头部应该受过重创,同时颈部、下颌缘、腮腺处可见大量淋巴结聚集,较符合疝由外伤、挤压等造成。从病理学的角度分析,依次取了三个不同位置 A、B、C 的组织作分析,结果显示,三个组织块的成分一样,都是空泡状的脂肪。若是脂肪瘤,组织块应呈分叶状,无压缩性,无体位移动改变[2],与所观察到的组织块相悖。

颊脂体为脂肪组织,由一体四突起组成,体以咬肌前内侧缘为界分为浅、深两部,浅部分布在表情肌深面,深部附着在上颌骨后面,其突起深入翼颌间隙、嚼肌间隙、颞下间隙及颞间隙等,内部紧邻颊部口腔粘膜[3]。若其筋膜薄弱,外伤、挤压等都可以造成颊脂体突出、外溢,形成包块。该情况多见于幼儿及儿童,大部分向口腔内突出,也有少部分向体表突出。针对此情况,临床上一般主张不论早期晚期均切除,而有的也采取颊脂体复位,主要针对早期,其嵌顿时间短,血供影响不大者。去除颊脂体后,不但不影响面容,还在一定程度上有美容效果。随着科学技术的发展和人们生活水平的不断提高,人们对美的要求越来越高,人们通过颊脂体部分切除术来矫正"孩童样"面颊,以达到美容效果[3]。同时也可通过颊脂体瓣转位术来修复缺损部,如面横裂修复及治疗颞下颌关节强直,这些对全面部的美学改造有显著效果[1]。

[参考文献]

[1] 方祥源,陈晓杰,尚效贤,等. 以颊脂体作填塞材料的应用解剖学研究[J]. 局解手术学杂志,2004,13(6):364 - 366.

[2] 钟来平,陈关福. 17 例口腔颌面部脂肪瘤的临床和 B 超分析[J]. 现代口腔医学杂志,2003,17(4):372.

[3] 余文林,曾 东,程 飚,等. 颊脂垫部分切除的临床解剖及应用[J]. 解剖学杂志,2007,30(4):474 - 476.

[收稿日期] 2010-12-09 [修回日期] 2011-01-04

(编辑:张天飞)