

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00721

Cajal 细胞调节豚鼠胆囊动力的实验研究

徐 龙¹, 余保平^{2*}, 陈灵丹², 吕农华¹, 朱 莹¹, 陈幼祥¹

1. 南昌大学第一附属医院消化内科, 南昌 330006
2. 武汉大学人民医院消化内科, 武汉 430060

[摘要] **目的** 证实豚鼠胆囊 Cajal 间质细胞(ICC)是胆囊平滑肌动力的起搏细胞。**方法** 采用在体记录和组织钳细胞内记录的方式,研究胆囊自发电活动。亚甲蓝+光照的方法破坏胆囊 ICC。胶原酶分离方法分离胆囊平滑肌细胞,并对分离的单个细胞进行形态学分析,联合激光共聚焦显微镜检测 c-kit 蛋白表达的方法鉴定 ICC。膜片钳用于证明胆囊 ICC 能产生具有起搏活性的自发去极化电流。**结果** 豚鼠胆囊在体记录的慢波每分钟(58±3.2)次,细胞内记录时可记录到慢波和动作电位。采用亚甲蓝+光照的方法后,慢波和动作电位明显减弱或消失。豚鼠胆囊新鲜分离的细胞经过贴壁之后,可见少量具有典型 ICC 光镜特征的细胞,占细胞总数的(5±1.2)%(n=12),(21±4)%细胞的 c-kit 蛋白表达阳性。全细胞膜片钳记录胆囊 ICC 的自发去极化电流,发现豚鼠胆囊 ICC 自发去极化电流频率每分钟(58.4±3.5)次(n=21),幅度约-(72±3.5) pA。

结论 豚鼠胆囊平滑肌中存在 ICC 起搏细胞,参与起搏胆囊自发节律性电活动和自动节律性收缩活动。

[关键词] 胆囊;Cajal 间质细胞;动力;起搏

[中图分类号] R 333.4 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2010)07-0721-04

Interstitial cell of cajal regulates motility of gallbladder smooth muscle in guinea pigs

XU Long¹, YU Bao-ping^{2*}, CHEN Ling-dan², LÜ Nong-hua¹, ZHU Xuan¹, CHEN You-xiang¹

1. Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi, China
2. Department of Gastroenterology, People's Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei, China

[Abstract] **Objective** To prove that the interstitial cells of cajal (ICCs) are the pacemaker of gallbladder smooth muscle in guinea pigs. **Methods** The contraction of gallbladder was observed by isometric transducer and spontaneous electrophysiology was recorded *in vivo* and *in vitro*. ICCs were damaged with methylene and illumination. The ICCs were isolated by collagenase digestion and the morphology of single ICC was analyzed. C-kit expression was detected by laser confocal microscopy to identify the isolated ICCs. Spontaneous currents of ICCs were recorded with EPC-10 Patch Clamp. **Results** Slow wave and action potential were recorded in gallbladder *in vivo*, with the frequency of slow wave being (58±3.2) bpm (n=16). Methylene blue and illumination treatment led to decrease or disappearance of slow wave and action potentials. Some cells isolated from gallbladder smooth muscle ([5±1.2]%, n=12) showed the morphological characteristics of ICCs under light microscope, with (21±4)% of the cells were positive for c-kit. When the membrane potential was at -60 mV, the frequency of spontaneous inward currents was (58.4±3.5) bpm (n=21) and the amplitude was -(72±3.5) pA. **Conclusion** ICC-like cells are present in the gallbladder smooth muscle of the guinea pigs, and participate in the pacemaking of spontaneous current and action potential of gallbladder smooth muscle.

[Key words] gallbladder; interstitial cell of Cajal; motility; pacemaker

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(7):721-724]

Cajal 间质细胞(interstitial cells of Cajal, ICC)是平滑肌组织的起搏细胞。最早是在胃肠道中发现,近年研究发现其他平滑肌组织中也有 ICC^[1]。我们的前期研究^[2-3]发现小鼠胆囊平滑肌中可能存在 ICC。然而胆囊组织中的 ICC 是否也有起搏平滑

肌运动的功能尚不清楚,本研究进一步证实了胆囊 ICC 具有起搏胆囊平滑肌运动的功能。

1 材料和方法

1.1 在体胆囊自发电活动的记录 以戊巴比妥钠

[收稿日期] 2009-12-21 **[接受日期]** 2010-04-01

[基金项目] 江西省自然科学基金(2008GQY0036). Supported by Natural Foundation of Jiangxi Province(2008GQY0036).

[作者简介] 徐 龙, 博士, 主治医师, 硕士生导师. E-mail: dlxulong@yahoo.com.cn

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 027-88041911, E-mail: yubaoping62@yahoo.com.cn

30 mg/kg 腹腔注射麻醉豚鼠,背卧位固定于恒温手术台,手术区严格消毒,作无菌剖腹术,充分暴露胆囊,在胆囊体 1/2 处接除尖端裸露外其余部分绝缘的铂电极。经微电极放大器放大后,输出的信号在 RM-6200 型四导生理记录仪上绘出。检测胆囊的自发在体电活动。

1.2 离体胆囊自发电活动的记录 将豚鼠胆囊纵向剖开,浆膜面向上。在连续变倍电视显微镜下,将内充 3 mol/L KCl 溶液、尖端直径约 0.01~0.1 μm 、阻抗为 30~60 M Ω 的玻璃微电极通过微电极固定器与探头相连,并将其固定在微电极操纵器上并推进至胆囊浆膜面,再改用步进式微电极推进器穿刺细胞。当微电极尖端抵近至细胞膜表面时,经微电极放大器注入一串高频脉冲以利微电极刺入细胞,记录平滑肌组织自发电活动。

1.3 亚甲基蓝+光照破坏胆囊 ICC 的生理功能 美蓝(methyleneblue)50 μmol +光照 50 mW/cm² 可以选择性破坏 ICC。将离体胆囊置于 CaPSS 中,温度(37 \pm 5) $^{\circ}\text{C}$,充以 95%O₂ 和 5%CO₂ 的混合气,pH 为 7.4,以 50 μmol 美蓝孵育 20 min。同时采用可调聚光灯,为可见光,光波长 540 nm,照射在距光源 3.5 cm 远的组织表面,照射时间 5 min。光照强度用数字测光表测出。该方法只破坏 ICC 结构而不破坏肌间神经网及平滑肌细胞。

1.4 胆囊单细胞的制备 每次实验使用 3 只豚鼠胆囊。禁食后,断颈处死取胆囊,迅速置于持续充以 95%O₂ 和 5%CO₂ 的含 Ca²⁺-free PSS 的平皿中。在解剖显微镜下,去除黏膜,将其置入无钙消化液中,37 $^{\circ}\text{C}$ 轻微振荡消化约 23 min,用 Ca²⁺-free PSS 洗 5 次,然后组织块用广口火抛光的吸管吹打以产生细胞悬液。

1.5 激光扫描共聚焦显微镜检测 用 700 目一次性滤网过滤,并低速离心 10 min,浓缩细胞至 10⁴/ml。随后接种于盖玻片上。30 min 后纯冰丙酮固定 15 min,PBS 充分洗涤,置 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。急性分离胆囊单细胞爬片自 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱取出后,室温平衡 10 min,1% 牛血清白蛋白封闭 30 min;依次加入一抗(小鼠抗兔 c-kit 多克隆抗体, Santa Cruz),二抗(FITC 标记的大鼠抗小鼠 IgG,北京中山生物科技公司);PBS 充分洗脱后,甘油-PBS 封片。然后在激光扫描共聚焦显微镜(Leica, Germany)下观察。PBS 缓冲液代替一抗作为阴性对照。观察和鉴定胆囊平滑肌的 ICC。

1.6 胆囊 ICC 自发性去极化电流的测量 将细胞悬液接种于盖玻片上,待贴片并稳定 1 h 后,将其放置于倒置相差显微镜下的灌流槽中,此时可以根据细胞的光镜特征分辨出平滑肌细胞和 ICC^[4]。采用 EPC-10 放大器,在全细胞模式下记录 ICC 的自发性节律性内向电流,记录其频率、幅度、持续时间等。

1.7 溶液与试剂 生理盐水(CaPSS)含有(mmol/L):135 NaCl,5.0 KCl,2.0 CaCl₂,1.2 MgCl₂,10.0 Glucose 和 10 HEPES,用 Tris 调 pH 至 7.4,Ca-free PSS 除了不含 CaCl₂ 外其余试剂与 CaPSS 相同。无钙消化液是含有如下试剂的 Ca²⁺-free PSS:II 型胶原酶(collagenase II,1.2 mg/ml),胰蛋白酶抑制剂(trypsin inhibitor,2.0 mg/ml),小牛血清白蛋白(bovine serum albumin,BSA,2.0 mg/ml)。

1.8 统计学处理 数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示。采用 Sigma-plot 9.0 软件包进行统计处理,在 Sigmaplot 9.0 或者 Excel 中成图。

2 结果

2.1 胆囊自发收缩活性 采用等长换能器记录离体胆囊平滑肌组织的收缩时,预先设置肌张力为 0.23 g,平稳 1 h 后开始测量。所有豚鼠未记录到明显的节律性收缩活动,但加入不同浓度的 1 $\mu\text{mol/L}$ E4031 后,能记录到平稳的肌张力变化,肌张力逐渐增高,肌张力加药前(0.27 \pm 0.04) g,于 40 s 升高(0.25 \pm 0.04) g,达到峰值,无明显的剂量-效应趋势(图 1)。使用亚甲基蓝结合蓝光照射的方法破坏 ICC 后,E4031 不能增加胆囊的肌张力。

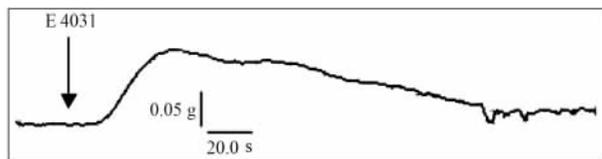


图 1 等长换能器所测 E4031 对豚鼠离体胆囊收缩基础肌张力的作用
Fig 1 Effect of E4031 on isotonic contraction of guinea pig gallbladder

2.2 在体胆囊自发电活动的记录 在体记录时,豚鼠以戊巴比妥钠 30 mg/kg 腹腔注射麻醉。然后剪去腹部正中的毛,无菌切开腹腔,暴露肝脏,用钝性的组织钳牵拉暴露胆囊,固定组织钳。将电极置于胆囊体的正中,记录的豚鼠慢波约每分钟(58 \pm 3.2)次($n=7$,图 2)。

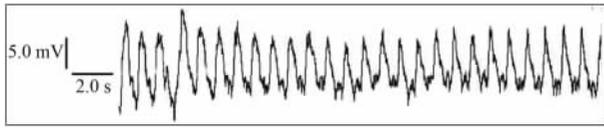


图 2 豚鼠胆囊慢波

Fig 2 Slow waves in guinea pig gallbladder

2.3 离体胆 豚鼠胆囊全层组织置于灌流槽中时,浆膜面朝上。行细胞内记录时,可记录到慢波和动作电位,慢波频率约每分钟(58.4 ± 3.1)次($n=12$),幅度约(18 ± 2.5) mV($n=12$)。慢波的上升支可见到动作电位,幅度约(46.5 ± 13) mV($n=12$),扫描曲线和基线之间的面积(mV×s)用于表示自发活动强度(图3)。采用亚甲基兰结合蓝光照射的方法破坏 ICC 后,豚鼠胆囊不能记录到动作电位和慢波($n=10$)。

2.4 豚鼠 ICC 分离和鉴定 每次实验取 3 只豚鼠胆囊,快速酶消化法分离单个细胞,细胞悬液进行低速离心。经过贴壁之后,可见少量具有典型 ICC 光镜

特征的细胞(图 4A、4B),约占细胞总数(5 ± 1.2)% ($n=12$)。其特征是:呈星状或者纺锤状,具有 2~5 个突起,有次级分支,中间部分的胞体稍膨大。

豚鼠胆囊 ICC 的 c-kit 蛋白表达的免疫荧光检测,约(21 ± 4)% 细胞阳性表达。阳性细胞中,约 2/3 相差显微镜中呈分支状,另外 1/3 呈纺锤状(图 4C、4D)。还有少量小的圆形细胞也呈阳性表达。

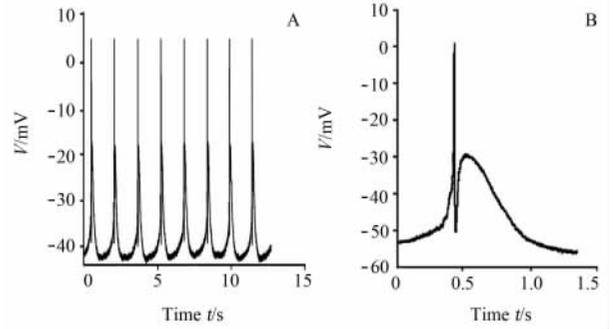


图 3 组织钳记录的豚鼠胆囊平滑肌慢波(A)和动作电位(B)

Fig 3 Slow waves(A) and action potentials(B) recorded in guinea pig gallbladder

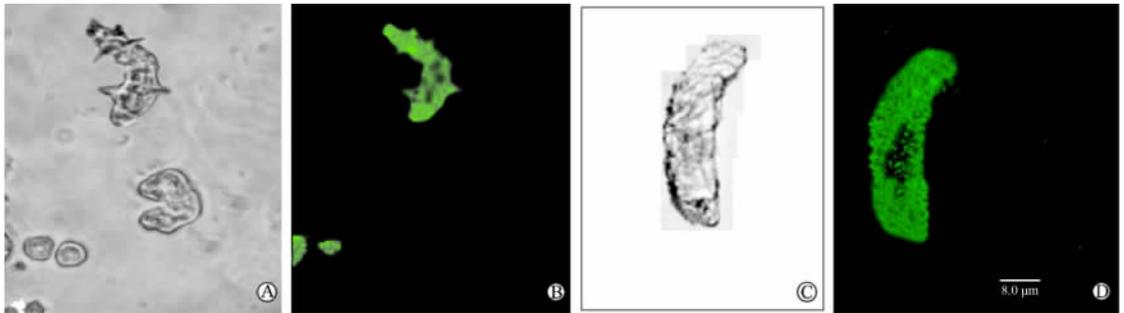


图 4 豚鼠胆囊 ICC 的 c-kit 免疫荧光阳性

Fig 4 c-Kit protein positive cells in guinea pig gallbladder

A: Cells isolated from smooth muscle of guinea pig gallbladder; B: c-kit immunofluorescence of cells in A; C: A spindle-shaped cell; D: c-kit immunofluorescence of the cell in C. Original magnification; $\times 200$ (A, B); $\times 400$ (C)

2.5 胆囊平滑肌 ICC 自发内向电流的记录 根据文献,在进行膜片钳记录时,牵制在 $-60 \sim -70$ mV, ICC 细胞可产生自发去极化电流。本研究中,在光镜下鉴定后, ICC 样的细胞在全细胞模式下,钳制在 -70 mV,部分细胞可以记录到自发去极化电流,记录到自发去极化电流则认为是胆囊 ICC。

发现胆囊 ICC 细胞自发去极化电流频率为每分钟(58.4 ± 3.5)次 ($n=21$,图 5A),与在体和离体记录的慢波基本一致,幅度约 $-(72 \pm 3.5)$ pA。加入 $1 \mu\text{mol/L}$ E4031 ($n=6$,图 5B)和 $1 \mu\text{mol/L}$ Cisapride ($n=6$,图 5C)后,频率分别为每分钟(61.4 ± 3.5)次和每分钟(63.4 ± 4.5)次,两组间差异无统计

学意义。而幅度的改变有统计学差异,分别为 $-(145 \pm 42)$ pA ($P < 0.01$)和 $-(142 \pm 34)$ pA ($P < 0.01$)。

3 讨论

前期研究提示胆囊组织中存在酪氨酸受体阳性的细胞^[5-6],即是 c-kit 阳性细胞,提示胆囊组织中存在 ICC,推测豚鼠胆囊中的 c-kit 阳性细胞有自发的细胞内钙震荡,可能参与平滑肌运动的起搏^[8]。本研究进一步采用电生理方法,证实了胆囊 ICC 具有起搏胆囊平滑肌收缩活动的功能,是胆囊平滑肌电生理活动的起搏细胞。

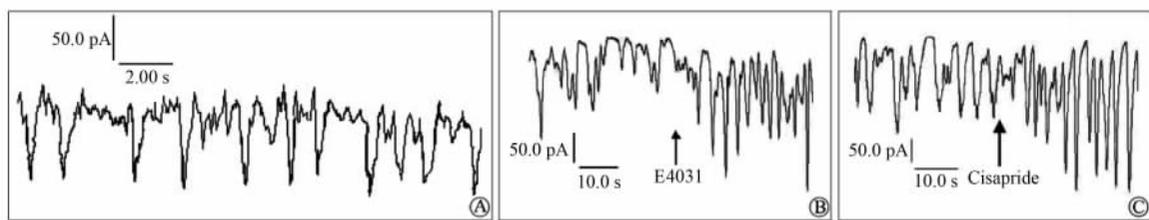


图5 豚鼠胆囊 ICC 自发内向电流

Fig 5 Spontaneous inwards currents in ICC of guinea pig gallbladder

A: Normal spontaneous inwards currents in ICC; B: Effect of 1 μmol/L E4031 on spontaneous inwards currents in ICC; C: Effect of 1 μmol Cisapride on spontaneous inwards currents in ICC

小鼠胆囊平滑肌组织肌力非常弱,换能器不能检测到任何收缩活动。本试验首先研究等长换能器记录的离体豚鼠胆囊平滑肌组织收缩活动^[7]。然而,绝大部分的豚鼠胆囊都不能记录到自发性节律性收缩,考虑为自发性节律性的肌力太弱,幅度较低,低于换能器阈值所致。加入兴奋剂后豚鼠胆囊的肌张力明显升高。经过亚甲基兰孵育和蓝光照射后,ICC 受到破坏时,加入 E4031 并不能使肌张力增高。E4031 是 ERG 钾离子通道的拮抗剂,能促进平滑肌的收缩^[8]。提示 E4031 的兴奋作用是通过 ICC 起作用。可以推测 ICC 调节胆囊的收缩活动。

平滑肌运动起搏最显著的就是自发性电活动^[9],即慢波和动作电位。本研究的在体慢波和离体器官组织钳试验中,记录到明显的慢波和动作电位,提示豚鼠胆囊有自发性电活动。该慢波和动作电位的特点与胃肠道平滑肌组织记录的基本相似。离体组织钳作细胞内记录试验中,将平滑肌组织用亚甲基兰孵育和蓝光照射后,同样也不能记录到慢波和动作电位,与离体胆囊收缩试验一致。因此,我们推测豚鼠胆囊平滑肌的电活动是胆囊组织 ICC 所起搏的。

c-kit 基因是 ICC 起搏活性的决定基因,国内外的研究表明,c-kit 阳性表达是鉴定 ICC 的金标准。本研究采用酶分离方法,新鲜分离了胆囊平滑肌的各种细胞,并对分离的单个细胞进行形态学分析。采用激光共聚焦显微镜检测 c-kit 蛋白的表达,约 (21±4)% 细胞的 c-kit 蛋白表达阳性。阳性细胞中,约 2/3 相差显微镜中呈分支状,另外 1/3 呈纺锤状,符合 ICC 的特征。典型 ICC 的光镜特征是:呈星状或者纺锤状,具有 2~5 个突起,有次级分支,中间部分的胞体稍膨大。由于还有肥大细胞呈 c-kit 蛋白阳性,但是肥大细胞是圆形,结合光镜下结构特征,ICC 可以与其鉴别开来。

自发性电活动本部分采用光镜下直接识别 ICC,膜片钳全细胞模式下记录自发去极化电流。本研究中全细胞膜片钳记录的胆囊 ICC 自发去极化电流,频

率为每分钟 (58.4±3.5) 次,与在体和离体记录的慢波基本一致,幅度约 -(72±3.5) pA。笔者认为,在采用膜片钳技术进行 ICC 研究时,以光镜形态加自发去极化电流,可确认为 ICC,如果是倒置荧光显微镜,有一步法抗体标记 c-kit 蛋白,则更可确认 ICC。

据此可以得出结论,豚鼠胆囊平滑肌组织中存在 ICC,和其他平滑肌组织一样,胆囊 ICC 起搏胆囊平滑肌的运动。胆囊 ICC 可能是胆囊运动功能调节的关键一环。但参与胆囊 ICC 起搏活动的离子通道,自发电活动和收缩的传播,及其与胆道疾病之间的关系缺乏足够的认识,有待进一步研究。

[参考文献]

[1] Huizinga J D. Frontiers in research into interstitial cells of Cajal [J]. J Cell Mol Med, 2005, 9: 230-231.
 [2] Sun X, Yu B, Xu L, Dong W, Luo H. Interstitial cells of Cajal in the murine gallbladder [J]. Scand J Gastroenterol, 2006, 41: 1218-1226.
 [3] 孙晓敏,余保平,徐龙,高礼层,董卫国,罗和生. 小鼠胆囊酪氨酸激酶受体的表达及其意义 [J]. 中华肝胆外科杂志, 2007, 13: 475-479.
 [4] 徐龙,余保平,陈明锴,董卫国,罗和生. 5-羟色胺对结肠平滑肌细胞膜通道电流和膜电位的影响 [J]. 中华消化杂志, 2004, 24: 672-675.
 [5] Huang Y, Mei F, Yu B, Zhang H J, Han J, Jiang Z Y, et al. Distribution of the interstitial Cajal-like cells in the gallbladder and extrahepatic biliary duct of the guinea-pig [J]. Acta Histochem, 2009, 111: 157-165.
 [6] Hinescu M E, Ardeleanu C, Gherghiceanu M, Popescu L M. Interstitial Cajal-like cells in human gallbladder [J]. J Mol Histol, 2007, 38: 275-284.
 [7] Faussone-Pellegrini M S. Interstitial cells of Cajal: once negligible players, now blazing protagonists [J]. Ital J Anat Embryol, 2005, 110: 11-31.
 [8] Zhu Y, Golden C M, Ye J, Wang X Y, Akbarali H I, Huizinga J D. ERG K⁺ currents regulate pacemaker activity in ICC [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2003, 285: G1249-G1258.
 [9] Sanders K M, Koh S D, Ward S M. Interstitial cells of Cajal as pacemakers in the gastrointestinal tract [J]. Annu Rev Physiol, 2006, 68: 307-343.