

·专题·肾积水·

血小板源性生长因子受体 α 阳性细胞 在先天性肾盂输尿管连接部梗阻 发病中的表达及意义



全文二维码 开放科学码

汪添益 张潍平 韩文文 刘 超

【摘要】 目的 探讨血小板源性生长因子受体 α (platelet-derived growth factor receptor α -positive, PDGFR α) 阳性细胞在儿童先天性肾盂输尿管连接部梗阻 (ureteropelvic junction obstruction, UPJO) 发病中的表达与意义。**方法** 应用免疫组织荧光双染方法对首都医科大学附属北京儿童医院 30 例 UPJO 患儿肾盂输尿管连接部 (ureteropelvic junction, UPJ) 组织 (为 UPJO 组) 及 10 例因肾脏肿瘤行肾输尿管切除术患儿的 UPJ 组织 (排除肾盂输尿管连接部狭窄以及其他泌尿系统畸形, 病理结果证实肿瘤未侵犯肾盂输尿管交界处, 为对照组) 进行染色观察, 同时分析所有患儿 PDGFR α 阳性细胞表达的小电导钙离子激活钾离子通道 3 型 (small conductance calcium-activated potassium channel 3, SK3) 表达水平。**结果** PDGFR α 阳性细胞表型区别于 Cajal 间质细胞, 与平滑肌细胞、神经纤维关系密切。PDGFR α 细胞在 UPJO 组中的分布与对照组相似, 而该细胞表达的 SK3 通道在 UPJO 组中显著低于对照组。**结论** UPJO 患儿肾盂输尿管连接部 PDGFR α 细胞上 SK3 通道表达降低, 推测 SK3 通道可能通过干扰 UPJ 蠕动参与 UPJO 发病过程。

【关键词】 受体, 血小板源生长因子 α ; 肾盂输尿管连接部梗阻

【中图分类号】 R726.9 R692.7

Expression and significance of platelet-derived growth factor receptor α -positive cells in stenotic tissue of congenital ureteropelvic junction obstruction. Wang Tianyi, Zhang Weiping, Han Wenwen, Liu Chao.

Department of Urology, Beijing Children's Hospital, Beijing, 100045, China. Corresponding author: Zhang weiping, Email: zhangwpp@163.com

【Abstract】 Objective To observe the expression of platelet-derived growth factor receptor α -positive (PDGFR α^+) cells in congenital ureteropelvic junction obstruction (UPJO) for exploring their role in the pathogenesis of congenital hydronephrosis in children. **Methods** UPJO group was composed of specimens of ureteropelvic junction (UPJ) harvested during pyeloplasty ($n=30$) while control group involved the specimens of normal ureter (nephrectomy for tumor; $n=10$). The immunofluorescence of specimens was examined by light microscopy and computerized image analysis for the expression and distribution of PDGFR α^+ cells in each group. In addition, small conductance calcium-activated potassium channel 3 (SK3) and closely associated cells consisting of smooth muscle cells (SMCs), interstitial cells of Cajal (ICCs) and nerve fibers were examined. **Results** Located in close proximity to SMCs, ICCs and nerve fibers, PDGFR α^+ cells expressed SK3 channels capable of mediating purinergic inhibitory neurotransmission in SMCs. The expression of SK3 channels decreased obviously in UPJ obstruction in PDGFR α^+ cells as compared with controls. **Conclusion** There is a down-regulation of SK3 channels in UPJO in PDGFR α^+ cells. And SK3 channels may be involved in the pathogenesis of UPJO by perturbing normal peristalsis of human UPJ.

【Key words】 Receptor, Platelet-Derived Growth Factor Alpha; Ureteropelvic Junction Obstruction

DOI:10.3969/j.issn.1671-6353.2020.03.005

基金项目:北京市自然科学基金(编号:7172073);北京市医管局
儿科协同发展专项课题(编号:XTZD20180303)

作者单位:首都医科大学附属北京儿童医院泌尿外科(北京市,
100045)

通信作者:张潍平, Email: zhangwpp@163.com.

先天性肾盂输尿管连接部梗阻 (ureteropelvic junction obstruction, UPJO) 是常见的小儿先天泌尿系疾病之一。过去十年, 学者开展了大量 UPJO 解剖学、病理学、遗传学以及分子生物学等方面的研

究,但其确切病因仍存在争议^[1,2]。近年来国内外研究表明,UPJO病因包括神经支配异常,肾盂输尿管连接部(ureteropelvic junction, UPJ)平滑肌细胞(smooth muscle cells, SMCs)功能紊乱、胶原替代以及UPJ间质细胞表达异常。最新研究表明,血小板源性生长因子受体- α (platelet-derived growth factor receptor α)阳性细胞作为一种新型间质细胞,存在于人类肾盂输尿管连接部。同时该研究发现PDGFR α 阳性细胞表达的SK3通道在UPJO患儿中的表达显著减少,考虑这一变化可能在UPJO发病中具有重要作用^[3]。然而目前关于PDGFR α 阳性细胞在UPJO发病中作用的相关研究较少,且国内尚无文献报道,因此仍需进一步研究证实。本研究通过免疫组织荧光染色方法了解PDGFR α 阳性细胞在UPJ处的分布,并分析其与Cajal细胞(interstitial cells of Cajal, ICCs)、平滑肌细胞以及神经纤维的作用关系,探讨它们在先天性肾盂输尿管连接部梗阻发病中的作用和临床意义。

材料与方法

一、标本来源

于2018年7月至2019年1月收集首都医科大学附属北京儿童医院泌尿外科因先天性肾积水行肾盂成形术的单侧肾盂输尿管连接部狭窄段组织样本30例为UPJO组,其中男26例,女4例,中位年龄42个月(5~150个月)。30例均在肾盂成形术中证实为肾盂输尿管连接部狭窄。选择在此期间因肾脏肿瘤行肾输尿管切除术患儿的UPJ组织(排除肾盂输尿管连接部狭窄以及其他泌尿系统畸形,病理结果证实肿瘤未侵犯肾盂输尿管交界处)10例作为对照组,其中男3例,女7例,中位年龄27.5个月(2~84个月)。每个病例纵行取包含UPJ的组织5~8 mm,置入2%多聚甲醛和2.5%戊二醛的固定液中,4℃冰箱保存并固定24 h以上。每份标本均在肾盂端缝4~0丝线做标记。所有入组(包括UPJO组和对照组)患儿监护人均签署知情同意书,本研究经过首都医科大学附属北京儿童医院伦理委员会批准(编号:2016-73)。

二、实验方法

对30例UPJO组和10例对照组的UPJ组织标本进行免疫荧光染色:①PDGFR α 和C-kit采用免疫荧光双染,探讨PDGFR α 阳性细胞与Cajal细胞的分布关系;②PDGFR α 和鬼笔环肽采用免疫荧光

双染,探讨PDGFR α 阳性细胞与平滑肌细胞的分布关系,并对平滑肌细胞表型进行对比分析;③PDGFR α 和PGP9.5免疫荧光双染,探讨PDGFR α 阳性细胞与神经纤维的分布关系;④PDGFR α 和SK3免疫荧光双染。标本石蜡包埋,10 μ m厚横切后,将切片置入65℃烤箱60 min。脱蜡后用10%牛血清白蛋白(Solarbio,中国北京)阻断30 min,避免非特异性吸收。随后切片在4℃环境下、1%牛血清白蛋白稀释磷酸盐缓冲液中予一抗孵育一夜。切片用磷酸盐缓冲液冲洗,与相应的二抗或鬼笔环肽在室温下孵育1 h(相应一抗、二抗种类、来源和浓度等信息见表1)。最后所有切片用4',6-二脒基-2-苯吲哚盐酸抗体(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)染色10 min,用荧光封闭剂冲洗、安装、封片。

表1 相应抗体及鬼笔环肽信息

Table 1 Antibodies and phalloidin for immunofluorescence

抗体	来源	货号	浓度	生产厂家
一抗				
PDGFR α	兔	ab203491	1:200	Abcam, UK
C-kit	兔	ab5505	1:200	Abcam, UK
SK3	兔	ab28631	1:200	Abcam, UK
PGP9.5	兔	ab108986	1:200	Abcam, UK
鬼笔环肽	兔	CA1610	1:50	solarbio
二抗				
HRP 标记山羊抗兔 IgG	山羊	074-1506	1:200	Abcam, UK

三、结果判定

1. 免疫荧光结果判定:双盲法下用共焦显微镜进行独立评估。采用Vectra Polaris全自动定量病理成像系统进行荧光扫描,并选择视野进行光谱扫描,用inform软件对光谱进行拆分,对免疫荧光强度进行半定量分析。20倍显微镜下(放大200倍)每例标本用显微镜计算机图像分析处理系统随机截取5处视野图片测量免疫荧光强度。计算公式:免疫荧光强度=截取区域抗体积分光度值/共轭化面积。

2. 平滑肌细胞表型分析:20倍显微镜下(放大200倍)观察鬼笔环肽(红色)染色部分,每例标本用显微镜计算机图像分析处理系统截取5处不同视野。双盲法下用Image Pro Plus 6.0软件计算每200倍高倍镜下载取的每张图片平滑肌细胞所占面积百分比,取每例5处平均值。

四、统计学处理

利用SPSS21.0进行统计学分析。应用单样本K-S检验验证是否正态分布,应用Levene检验验证

是否具有方差齐性。对服从正态分布的计量资料以均值、标准差表示,若为非正态分布则采用中位数表示。若资料为正态且方差齐采用两独立样本 t 检验;若资料为正态但方差不齐采用 t' 检验;若资料非正态采用 Wilcoxon 秩和检验。 $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

结 果

一、PDGFR α 阳性细胞的分布

PDGFR α 阳性细胞在 UPJ 中广泛分布,呈纺锤形或星形,且环绕于 DAPI 标记的细胞核周围(图 1)。光镜下可见 PDGFR α 阳性细胞形成离散的网络状结构,并分布于尿道上皮细胞、内层环形肌以及外层纵行肌细胞之间。而免疫荧光结果显示 PDGFR α 阳性细胞在 UPJO 组与对照组之间分布无

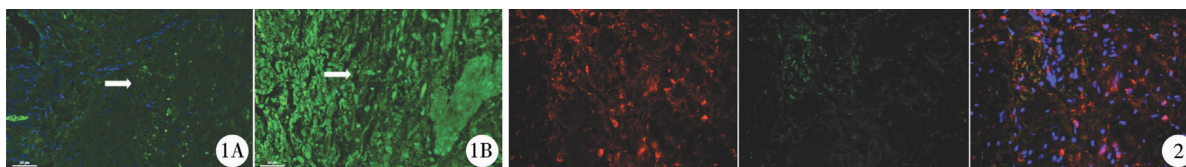


图 1 UPJO 组(1A)与对照组(1B)PDGFR α 阳性细胞免疫荧光染色($\times 200$);图中绿色部分代表 PDGFR α 表达阳性,蓝色部分为以 DAPI 标记的细胞核。可见 PDGFR α 阳性细胞(白色箭头标记)形成离散的网络状结构 图 2 UPJO 组 PDGFR α 和 C-kit 免疫荧光双染($\times 200$);图中绿色部分代表 PDGFR α 表达阳性,红色部分代表 C-kit 表达阳性,蓝色部分为以 DAPI 标记的细胞核
Fig. 1 Immunolabeling of PDGFR α in human UPJ (green area) in muscle layers. (A; UPJO group; B; control group). Nuclei were counterstained with DAPI (blue area) Fig. 2 Double immunolabeling of PDGFR α (green area) and C-kit (red area) in human UPJ in UPJO group. Nuclei were counterstained with DAPI (blue area)

三、PDGFR α 阳性细胞与平滑肌细胞的关系

鬼笔环肽广泛适用于标记平滑肌细胞。本研究结果显示,PDGFR α 阳性细胞分布于鬼笔环肽阳性平滑肌细胞周围(图 3),二者分布关系密切,平滑肌细胞在 UPJO 组分布密度较对照组显著增加($P = 0.016$),见表 2。

四、PDGFR α 阳性细胞与神经纤维的关系

泛神经元标记蛋白基因产物 9.5 (pan-neuronal marker protein gene product 9.5, PGP9.5) 是神经纤维中的一种特异性泛素羧基水解酶,可用作神经轴突标记物,抗 PGP9.5 抗体则可以与各种有髓或有髓的神经纤维相结合。本研究结果显示,光镜下可见 PDGFR α 阳性细胞分布于 PGP9.5 阳性神经纤维周围(图 3),神经纤维在 UPJO 组 UPJ 组织免疫荧光表达强度较对照组显著降低($P < 0.001$),见表 2。

五、PDGFR α 阳性细胞 SK3 通道的表达

本研究结果显示,PDGFR α 阳性细胞的细胞膜上 SK3 通道表达明显(图 3)。此外,与对照组相比,UPJO 组 PDGFR α 阳性细胞 SK3 通道免疫荧光表达

明显差异($P = 0.30$),见表 2。

表 2 两组免疫荧光及平滑肌细胞表型分析结果

Table 2 Results of fluorescent intensity and phenotypic analysis of SMCs in UPJO group versus control group

指标	平滑肌细胞 (百分比)	神经纤维	PDGFR α 阳性 细胞 SK3 通道
UPJO 组	69.41 \pm 15.44	3.37 \pm 0.59	3.59 \pm 0.21
对照组	64.03 \pm 15.84	3.73 \pm 0.44	3.82 \pm 0.56
t 值	2.416	-7.535	-2.328
P 值	0.016	<0.001	0.026

二、PDGFR α 阳性细胞与 Cajal 细胞的关系

C-kit 抗体广泛适用于标记上尿路 Cajal 间质细胞,通过免疫荧光双染法检测 C-kit 抗体是否定位于 PDGFR α 阳性细胞。结果证实,在 UPJO 组与对照组中,PDGFR α 阳性细胞均分布于 Cajal 细胞附近(图 2),但却不同于 Cajal 细胞(C-kit 阳性细胞)。

强度显著降低($P < 0.001$),见表 2。

讨 论

UPJO 通常由内源性因素引起(约占 75%),最常见的是肾盂输尿管连接部狭窄(本研究主要针对肾盂输尿管交界处狭窄,提及的所有 UPJO 均指此类病变)。过去几十年来,对 UPJO 的病因学研究已经取得一定进展。自 1893 年 Santiago Ramon y Cajal 首次在胃肠道中发现 Cajal 间质细胞以来,相关研究数量逐渐增多。Solari 等^[4]首先报道 UPJ 处 Cajal 间质细胞密度的降低可能与 UPJO 发病有关,进一步的研究则证实 UPJ 处 Cajal 间质细胞与内层纵行肌纤维平行排列,并与神经纤维关系密切,提示 Cajal 间质细胞参与神经信号传导,并调控输尿管蠕动。同时该研究发现,UPJO 患儿肾盂输尿管连接部纤维化明显,因此认为 Cajal 间质细胞数量的减少与输尿管蠕动功能的变化相关^[5]。Iino 等^[6]首次在小鼠胃肠道中发现一种新型的间质细胞,其本质为

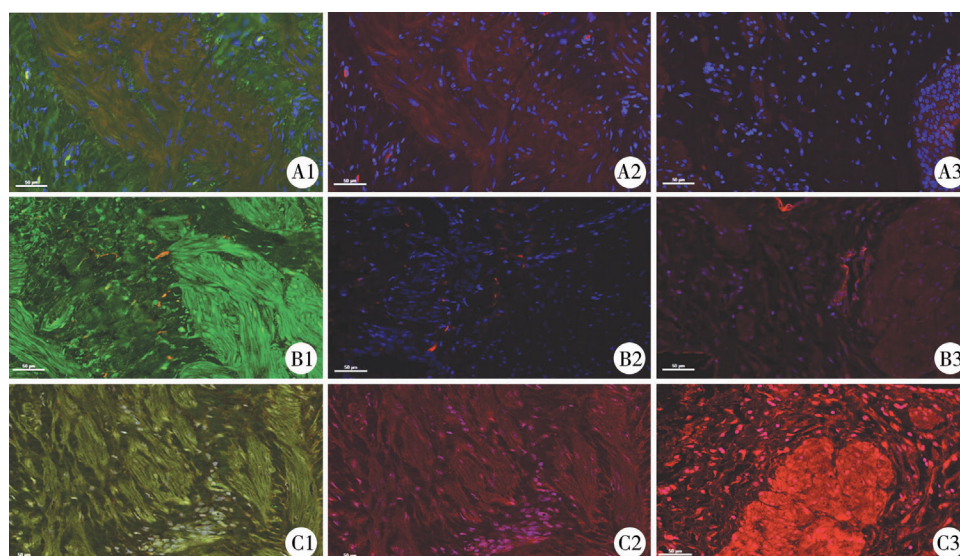


图3 免疫荧光染色($\times 200$) A1:UPJO组PDGFR α 和鬼笔环肽免疫荧光双染(图中绿色部分代表PDGFR α 表达阳性,红色部分代表鬼笔环肽表达阳性);A2:红色部分为UPJO组鬼笔环肽免疫荧光染色;A3:红色部分为对照组鬼笔环肽免疫荧光染色;B1:UPJO组PDGFR α 和PGP9.5免疫荧光双染(图中绿色部分代表PDGFR α 表达阳性,红色部分代表PGP9.5表达阳性);B2:红色部分为UPJO组PGP9.5免疫荧光染色;B3:红色部分为对照组PGP9.5免疫荧光染色;C1:UPJO组PDGFR α 和SK3免疫荧光双染(图中绿色部分代表PDGFR α 表达阳性,红色部分代表SK3表达阳性);C2:红色部分为UPJO组SK3免疫荧光染色;C3:红色部分为对照组SK3(红色)免疫荧光染色。所有图片蓝色部分为以DAPI标记的细胞核

Fig. 3 Immunofluorescence staining ($\times 200$) A1: Double immunolabeling of PDGFR α (green area) and phalloidin (red area) in UPJO; A2: Immunolabeling of phalloidin in UPJO (red area); A3: Immunolabeling of phalloidin in UPJ control (red area); B1: Double immunolabeling of PDGFR α (green area) and PGP9.5 (red area) in UPJO; B2: Immunolabeling of PGP9.5 in UPJO (red area); B3: Immunolabeling of PGP9.5 in UPJ control (red area); C1: Double immunolabeling of PDGFR α (green area) and SK3 (red area) in UPJO; C2: Immunolabeling of SK3 in UPJO (red areas); C3: Immunolabeling of SK3 in UPJ control (red area). Nuclei were counterstained with DAPI (blue area)

“成纤维样细胞”(即PDGFR α 阳性细胞),随后证实PDGFR α 阳性细胞同样存在于小鼠以及人类膀胱中^[7]。近年来,Hunziker等^[3]研究证实在人类UPJ处同样存在PDGFR α 阳性细胞,可能在UPJO发病中起重要作用。本研究表明在UPJ处至少存在两种不同的间质细胞,即C-kit阳性细胞(即Cajal间质细胞)及C-kit阴性细胞(即PDGFR α 阳性细胞)。免疫荧光结果显示PDGFR α 细胞呈梭形或星形,交错形成网络状结构,并分布于UPJ内层尿道上皮细胞以及平滑肌肌层之间。

UPJO患儿病理可见平滑肌细胞肥大/增生和萎缩/发育不全以及神经纤维耗竭^[1]。与既往研究一致,本研究免疫荧光结果表明UPJO患儿平滑肌细胞分布密度较正常儿童显著增加,而神经纤维免疫荧光强度较正常儿童显著减少,提示存在平滑肌细胞肥大/增生以及神经纤维耗竭。Benedetto等^[9]认为Cajal间质细胞作为UPJ处起搏细胞,参与神经信号传导,并调控平滑肌细胞收缩。同时有研究表明在小鼠胃肠道,PDGFR α 阳性细胞可导致周围平

滑肌细胞超极化,从而调控平滑肌细胞松弛^[10]。因此越来越多学者认为在胃肠道中,PDGFR α 阳性细胞、Cajal样细胞以及平滑肌细胞分布关系密切,形成SIP(SMCs-ICCs-PDGFR α positive cells)功能性合胞体,表达多种离子通道和受体,调节神经信号传导,进而调控平滑肌细胞收缩^[10-12]。同样,本研究结果显示儿童UPJ处PDGFR α 阳性细胞、Cajal间质细胞以及平滑肌细胞在位置分布上关系密切,提示形成的SIP功能性合胞体可能共同参与神经信号传导,调节UPJ处平滑肌细胞收缩。

既往动物实验证实,在豚鼠胃肠道及小鼠膀胱逼尿肌组织中存在PDGFR α 阳性细胞丰富表达的SK3通道^[13,14]。SK3通道属于小电导钙离子激活钾离子通道蛋白中的一种亚型,对细胞膜电位的变化并不敏感,其激活完全依赖胞内钙离子浓度的升高,激活后导致细胞内钾离子外流,通过嘌呤能机制抑制周围神经传递,从而导致平滑肌细胞超极化以及平滑肌松弛^[13-15]。与既往研究一致,本研究发现在人类UPJ组织中存在PDGFR α 阳性细胞SK3

通道表达,且相较于对照组,UPJO 组患儿 PDGFR α 阳性细胞 SK3 通道表达显著减少。Lee^[13]发现,阻断小鼠膀胱逼尿肌处 SK3 通道可以诱导 PDGFR α 阳性细胞的细胞膜去极化,并增加周围平滑肌的张力。结合本研究结果,笔者认为 PDGFR α 阳性细胞与 Cajal 间质细胞、平滑肌细胞在分布及功能上关系密切。Cajal 间质细胞与 PDGFR α 阳性细胞共同调节神经传递,进而调节平滑肌细胞的收缩。而当 UPJ 处 PDGFR α 阳性细胞表达的 SK3 通道减少,抑制性神经传递也会减少,导致平滑肌过度收缩,远期可能导致神经纤维耗竭以及平滑肌细胞肥大/增生,最终导致肾盂输尿管连接部蠕动功能的异常。

总之,UPJ 处平滑肌细胞、Cajal 样细胞、神经纤维以及 PDGFR α 阳性细胞上 SK3 通道表达和分布的改变与 UPJO 病因密切相关,但仍需通过更多研究证实这些病理改变与 UPJO 发病的因果关系。

参考文献

- Jackson L, Woodward M, Coward RJ. The molecular biology of pelvi-ureteric junction obstruction [J]. *Pediatr Nephrol*, 2018, 33:553-571. DOI:10.1007/s00467-017-3629-0.
- 张滩平, 杨洋, 汪添益. 关于肾盂输尿管连接部梗阻病因和治疗的认知与争议 [J]. *临床小儿外科杂志*, 2018, 17(6):401-404. DOI:10.3969/j.issn.1671-6353.2018.06.001.
- Zhang WP, Yang Y, Wang TY. Recent advances in the etiology and treatment of ureteropelvic junction obstruction [J]. *J Clin Ped Sur*, 2018, 17(6):401-404. DOI:10.3969/j.issn.1671-6353.2018.06.001.
- Hunziker M, O'Donnell AM, Puri P. Platelet-derived growth factor receptor alpha-positive cells: a new cell type in the human ureteropelvic junction [J]. *Pediatr Res*, 2017, 82(6):1080-1087. DOI:10.1038/pr.2017.193.
- Solari V, Piotrowska AP, Puri P. Altered Expression of Interstitial Cells of Cajal in Congenital Ureteropelvic Junction Obstruction [J]. *J Urol*, 2003, 170(6):2420-2422. DOI:10.1097/01.ju.0000097401.03293.f0.
- Senol C. Changes in Cajal cell density in ureteropelvic junction obstruction in children [J]. *J Pediatr Urol*, 2016, 12(2):89.e1-e5. DOI:10.1016/j.jpuro.2015.08.010.
- Iino S, Horiguchi K, Horiguchi S, et al. c-Kit-negative fibroblast-like cells express platelet-derived growth factor receptor alpha in the murine gastrointestinal musculature [J]. *Histochem Cell Biol*, 2009, 131(6):691-702. DOI:10.1007/s00418-009-0580-6.
- Monaghan KP, Johnston L, McCloskey KD. Identification of PDGFR alpha positive populations of interstitial cells in human and guinea pig bladders [J]. *J Urol*, 2012, 188(2):639-647. DOI:10.1016/j.juro.2012.03.117.
- Zhang PL, Peters CA, Rosen S. Ureteropelvic junction obstruction: morphological and clinical studies [J]. *Pediatr Nephrol*, 2000, 14(8-9):820-826. DOI:10.1007/s004679900240.
- Di Benedetto A, Arena S, Nicotina PA, et al. Pacemakers in the upper urinary tract [J]. *Neurourol Urodyn*, 2013, 32(4):349-353. DOI:10.1002/nau.22310.
- Lu C, Huang X, Lu HL, et al. Different distributions of interstitial cells of Cajal and platelet-derived growth factor receptor- α positive cells in colonic smooth muscle cell/interstitial cell of Cajal/platelet-derived growth factor receptor- α positive cell syncytium in mice [J]. *World J Gastroenterol*, 2018, 24(44):4989-5004. DOI:10.3748/wjg.v24.i44.4989.
- Koh SD, Ward SM, Sanders KM. Ionic conductances regulating the excitability of colonic smooth muscles [J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2012, 24(8):705-718. DOI:10.1111/j.1365-2982.2012.01956.x.
- Blair PJ, Rhee PL, Sanders KM, et al. The significance of interstitial cells in neurogastroenterology [J]. *J Neurogastroenterol Motil*, 2014, 20(3):294-317. DOI:10.5056/jnm14060.
- Lee H, Koh BH, Peri LE, et al. Purinergic inhibitory regulation of murine detrusor muscles mediated by PDGFR α + interstitial cells [J]. *J Physiol*, 2014, 592(6):1283-1293. DOI:10.1113/jphysiol.2013.267989.
- Klemm MF, Lang RJ. Distribution Of Ca²⁺ + -Activated K + Channel (SK2 and SK3) Immunoreactivity In Intestinal Smooth Muscles Of The Guinea-Pig [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2002, 29(1-2):18-25. DOI:10.1046/j.1440-1681.2002.03601.x.
- Yeoh JW, Corrias A, Buist ML. A mechanistic model of a PDGFR α + cell [J]. *J Theor Biol*, 2016, 408:127-136. DOI:10.1016/j.jtbi.2016.08.004.

(收稿日期:2019-10-20)

本文引用格式:汪添益, 张滩平, 韩文文, 等. 血小板源性生长因子受体 α 阳性细胞在先天性肾盂输尿管连接部梗阻发病中的表达及意义 [J]. *临床小儿外科杂志*, 2020, 19(3):213-217. DOI:10.3969/j.issn.1671-6353.2020.03.005.

Citing this article as: Wang TY, Zhang WP, Han WW, et al. Expression and significance of platelet-derived growth factor receptor alpha-positive cells in stenotic tissue of congenital ureteropelvic junction obstruction [J]. *J Clin Ped Sur*, 2020, 19(3):213-217. DOI:10.3969/j.issn.1671-6353.2020.03.005.