

肝硬化大鼠肠道 Cajal 间质细胞的研究

朱金照^{1*}, 季天海², 刘庆宏²

(1. 南京军区福州总医院消化内科, 福州 350025; 2. 福州总医院病理科)

[摘要] **目的:** 观察肝硬化大鼠肠道 Cajal 间质细胞的改变, 探讨肝硬化胃肠道动力障碍的相关机制。 **方法:** Wistar 大鼠 20 只随机分为肝硬化模型组和对照组, 每组 10 只, 采用 CCl₄ 溶剂大腿根部皮下注射法制作肝硬化模型, 用葡聚糖蓝-2000 为胃肠内标记物, 观察大鼠肠道传输, 免疫组化染色观察空肠 c-kit 阳性 Cajal 间质细胞的变化, 并用透射电镜观察 Cajal 间质细胞超微结构的改变。 **结果:** 与对照组比较, 肝硬化组大鼠小肠动力明显减弱 ($P < 0.01$), 空肠 c-kit 阳性 Cajal 间质细胞减少 ($P < 0.01$), 透射电镜观察显示 Cajal 间质细胞的超微结构发生明显改变。 **结论:** 肝硬化大鼠肠道传输减弱与肠道 Cajal 间质细胞减少及其超微结构改变有关。

[关键词] 肝硬化; 肠; Cajal 间质细胞

[中图分类号] R 575.2

[文献标识码] A

[文章编号] 0258-879X(2006)01-0065-03

Study of Cajal interstitial cells in intestine of rats with liver cirrhosis

ZHU Jin-zhao^{1*}, JI Tian-hai², LIU Qing-hong² (Department of Gastroenterology, Fuzhou General Hospital, PLA Nanjing Military Area Command, Fuzhou 350025, China; 2. Department of Pathology, Fuzhou General Hospital)

[ABSTRACT] **Objective:** To observe the changes of Cajal interstitial cells (CIC) in the intestine of rats with liver cirrhosis, so as to study the mechanism of gastrointestinal dysfunction. **Methods:** Twenty Wistar rats were equally randomized into control group and cirrhosis model group. Cirrhosis model was established by CCl₄ in rats. The intestinal motility changes were assayed using Dextran blue-2000 as an indicator. Immunohistochemical staining was used to investigate the distribution of c-kit positive CIC in jejunum of rats. Meanwhile, the ultrastructure of CIC was observed by electron microscope. **Results:** Compared with control group, the intestinal motility and the c-kit positive CIC in jejunum were both markedly decreased in model group (both $P < 0.01$). The CIC, with less organelles and dissolved cytoplasm, had decreased connections with other cells and damaged structure. **Conclusion:** The intestinal motility of rats with liver cirrhosis is significantly decreased, which may be associated with the changes of CIC number and ultrastructure in intestine.

[KEY WORDS] liver cirrhosis; intestines; Cajal interstitial cells

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(1): 65-67]

研究发现 Cajal 间质细胞 (Cajal interstitial cells, CIC) 是胃肠道的起搏细胞, 具有自发性电活动和产生、传播慢波的功能^[1], 超微结构研究发现 CIC 与胃肠平滑肌细胞间存在缝隙连接^[2], 并能够传导肠神经系统至平滑肌的信号, 对胃肠运动具有非常重要的调节作用。目前有关 CIC 在肝硬化胃肠道动力障碍发病中的作用研究较少。本研究通过建立肝硬化大鼠模型, 观察大鼠肠道 CIC 的变化, 探讨肝硬化胃肠道动力障碍的发病机制。

1 材料和方法

1.1 动物建模和分组 选用清洁级 Wistar 大鼠 (上海实验动物中心提供), 雌雄不限, 体质量 200~250 g。将 20 只 Wistar 大鼠随机分为对照组和肝硬化模型组 (下称模型组) 各 10 只。模型组大鼠给予 50% CCl₄ 溶剂大腿根部皮下注射, 每次每只 0.5 ml/

100 g, 2 次/周, 并根据体质量变化调整剂量, 共 12 周。同时给予含 30% 食用猪油、0.5% 胆固醇的饲料, 自由饮水。

1.2 大鼠肠道动力测定^[3] 制模成功后, 大鼠禁食不禁水 12 h, 处死前 20 min 灌入 2% 葡聚糖蓝-2000 0.4 ml, 处死后立即开腹取全胃肠, 量取幽门括约肌至小肠内色素最前端及全小肠的长度, 以两者之比为小肠推进百分率, 以此表示肠道传输速率。

1.3 c-kit 阳性 CIC 免疫组化染色方法 将空肠标本入 4% 多聚甲醛 PB 液中固定 24 h, 常规梯度乙醇脱水, 石蜡包埋备用。将石蜡切片, 60℃ 烤片 4~6 h; 组织于二甲苯及乙醇中脱蜡, 自来水冲洗; 3% H₂O₂ 室温下孵育 10 min, 以消除内源性过氧化物酶活性; 蒸馏水冲洗, PBS 浸泡 5 min; 5% 正常山羊血

[作者简介] 朱金照, 硕士, 副主任医师。

* Corresponding author. E-mail: zhujinzhao@haoyisheng.com

清封闭,室温孵育 10 min;倾去多余血清,滴加 1 : 100 兔抗人多克隆 c-kit 一抗(由北京中山生物技术有限公司提供),4℃过夜;PBS 漂洗 5 min×3 次;滴加 1:100 生物素标记二抗 50 μl,37℃孵育 30 min;PBS 漂洗 5 min×3 次;滴加 1 : 100 辣根酶标记链霉孵白素 50 μl,37℃孵育 30 min;PBS 漂洗 5 min×3 次;加入新配制的 DAB 显色,3~5 min 后光镜下观察结果。自来水冲洗,复染,脱水,封片。采用 MAS-5 图像分析系统。选取同一染色条件下 c-kit 免疫组化片,每张切片于 200 倍光镜下选取 5 个视野,观察染色及分布情况,将图像扫描入计算机,设定基础统计面积,调定灰度值。滤去非阳性部分,得到阳性表达面积,通过计算机分析即可得到阳性表达的密度。

1.4 电镜组织标本制备及 CIC 的电镜观察 空肠标本入 3%戊二醛固定,2%PBS 冲洗,再用 1%锇酸后固定 1 h,2%PBS 冲洗,乙醇、丙酮梯度脱水,通过浸透,树脂聚合,精确定位,70 nm 超薄切片,1%醋酸铀、枸缘酸铅染色。然后在 Philips S-206 透射电镜 1 500 倍下观察。

1.5 统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 肝脏的病理学观察 肝硬化建模成功后,大鼠出现食欲、体质量下降,毛色无光泽,B 超下有腹水形成,肝脏包膜波浪状,肝脏实质回声不均匀。取大鼠肝组织肉眼观察肝脏包膜欠光滑,部分表面呈结节状,肝切面可见较多类圆型岛状结节,大小不一,结节间见灰白色纤维组织分隔。光镜下肝实质内汇管区、肝叶间静脉或中央静脉之间有纤维间隔相连,汇管区胶原纤维向肝实质延伸,肝脏的实质被增生的纤维间隔分割、包绕,形成大小不等的假小叶,假小叶内肝细胞排列不整,有些肝细胞增大或萎缩,中央静脉不清,一些肝细胞内可见脂肪变性。

2.2 肝硬化大鼠肠道传输的变化 与对照组比较,肝硬化模型组大鼠小肠推进比百分率明显下降 [(48.02±3.36) vs (57.45±5.72), *P*<0.01],表明大鼠肠道传输速率显著延迟。

2.3 c-kit 阳性 CIC 免疫组化染色结果 对照组大鼠免疫组化染色显示 c-kit 阳性 CIC 呈棕黄色,肌间

分布较明显,主要在环肌与纵肌层之间,形状以圆型较多或不规则,模型组大鼠空肠 c-kit 阳性 CIC 染色浅,分布较少(图 1)。图像分析表明模型组大鼠空肠 c-kit 阳性 CIC 密度明显低于对照组 [(1.71±0.38) vs (3.58±0.72), *P*<0.01]。

2.4 大鼠空肠 CIC 的超微结构观察 对照组大鼠透射电镜观察显示 CIC 主要分布于肌层,与平滑肌细胞及神经纤维末梢有缝隙连接,核大,胞质少,线粒体、内质网、核糖体丰富。模型组 CIC 与神经细胞、平滑肌细胞的细胞间连接减少或连接结构破坏,内质网扩张、脱粒,线粒体肿胀、空泡变,细胞器明显减少,胞质溶解,胞质内空泡形成,CIC 超微结构较模糊(图 2)。

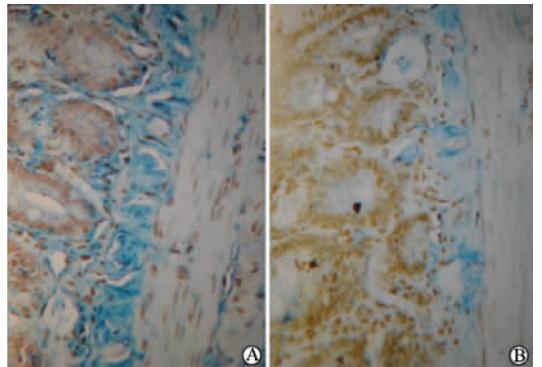


图 1 对照组(A)、模型组(B)大鼠空肠 c-kit 免疫组化染色结果

Fig 1 Immunohistochemical staining of c-kit positive CIC in jejunum of rats in control(A) and model(B) group(IH×200)

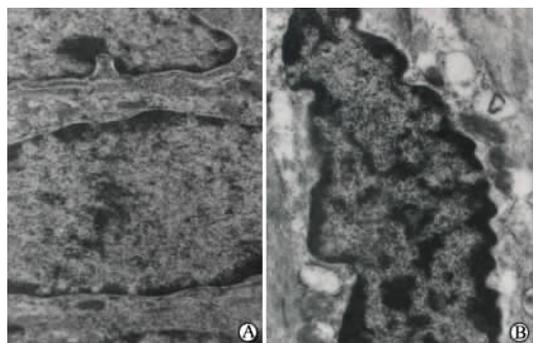


图 2 对照组(A)、模型组(B)大鼠空肠 Cajal 间质细胞超微结构变化

Fig 2 Ultrastructure of CIC in jejunum of rats in control(A) and model(B) group (US×1 500)

3 讨论

1989年 Barajas-Lopez 等^[4]首先报道胃肠道基

本电节律发生于 CIC,近年研究证明 CIC 不仅是胃肠电活动的起搏者,也是基本电节律的主要传播者,起源于 CIC 的慢波通过 CIC 网络及与之相连的平滑肌细胞传播,从而引起和调节胃肠平滑肌的节律性收缩。目前认为 CIC 主要有以下几个方面的功能^[5-8]:(1)胃肠平滑肌慢波活动的起搏;(2)推进电活动的传播;(3)调节神经递质的功能;(4)免疫调节作用等。目前研究认为多种胃肠动力疾病的发生与 CIC 的变化有关。Tamas 等^[9]研究发现糖尿病小鼠胃体、胃窦内 CIC 明显减少,以胃窦远端最明显。国内学者^[10]也发现糖尿病大鼠胃肠道 CIC 明显减少,其超微结构发生改变。研究还发现 CIC 与其他胃肠动力障碍疾病也有一定关系^[1,11]。肝硬化患者出现胃肠动力障碍较为多见,目前 CIC 在肝硬化胃肠动力障碍发病中的作用机制研究较少。

由于 CIC 表达酪氨酸蛋白激酶受体 c-Kit,现已公认 c-Kit 是标记胃肠道 CIC 的研究方法^[12]。本实验对空肠组织进行 c-Kit 免疫组化染色,结果表明 c-Kit 免疫组化染色能较好的显示 CIC 的分布;c-kit 阳性 CIC 呈棕黄色,形状以圆型较多或不规则,肌间分布较明显,主要在环肌与纵肌层之间。模型组大鼠空肠 c-kit 阳性染色浅,分布较少。CIC 的数量明显低于对照组。同时透射电镜观察 CIC 的超微结构表明,肝硬化模型组空肠 CIC 的超微结构发生明显改变,CIC 与其他细胞间连接减少,内质网扩张、脱粒,线粒体肿胀、空泡变,细胞器减少,胞质内空泡形成。因此,本实验结果提示,肝硬化大鼠肠道传输下降可能与肠道 CIC 的减少及其超微结构的改变有一定关系。CIC 的变化是否为肝硬化大鼠肠道动力下降的直接因素,还是通过其他途径发挥效应,有待进一步探讨。

[参考文献]

- [1] 朱金照,许其增. Cajal 间质细胞在胃肠动力疾病中的作用[J]. 医学研究生学报,2004,17:562-564.
- [2] Daniel EE, Wang YF, Cayabyab FS. Role of gap junction in structural arrangements of interstitial cell of Cajal and canine ileal smooth muscle [J]. Am J Physiol, 1998, 274: G1125-G1141.
- [3] 朱金照,许其增. 肝硬化大鼠肠道动力的变化及机制[J]. 胃肠病学和肝病杂志,2005,14:150-152.
- [4] Barajas-Lopez C, Berezin I, Daniel EE, et al. Pacemaker activity recorded in interstitial cells of Cajal of the gastrointestinal tract [J]. Am J Physiol, 1989, 257: C830-C835.
- [5] Pardo A, Bartoli R, Lorenzo-Zuniga V, et al. Effect of cisapride on intestinal bacterial overgrowth and bacterial translocation in cirrhosis [J]. Hepatology, 2000, 31: 858-863.
- [6] Huizinga JD, Robinson TL, Thomsen L. The search for the origin of rhythmicity in intestinal contraction from tissue to single cells [J]. Neurogastroenterol Motil, 2000, 12: 3-9.
- [7] Ward SM, Beckett EA, Wang X, et al. Interstitial cells of cajal mediate cholinergic neurotransmission from enteric motor neurons [J]. J Neurosci, 2000, 20: 1393-1403.
- [8] Powell DW, Mifflin RC, Valentich JD, et al. Myofibroblasts. II: Intestinal subepithelial myofibroblasts [J]. Am J Physiol, 1999, 277: C183-C201.
- [9] Tamas O, Ichiro T, Wai KTC. Remodeling of networks of interstitial cells of Cajal in a murine model of diabetic gastroparesis [J]. Diabetes, 2000, 49: 1731-1739.
- [10] 张亚萍,张宽学,罗金燕,等. 糖尿病大鼠肠道 Cajal 间质细胞结构变化的研究[J]. 中华内科杂志,2002,41:310-312.
- [11] Jain D, Moussa K, Tandon M, et al. Role of interstitial cells of Cajal in motility disorders of the bowel [J]. Am J Gastroenterol, 2003, 98: 618-624.
- [12] 张根葆,左保华. Cajal 细胞与胃肠起搏[J]. 生理科学进展, 2001, 32: 74-76.

[收稿日期] 2005-05-08

[修回日期] 2005-09-20

[本文编辑] 贾泽军