论著

文章编号:1000-5404(2005)05-0376-05

豚鼠空肠吻合术后ICCs的再生及细胞网络再形成研究

梅 峰,于 彬,马 华,张红军,周德山 (第三军医大学基础医学部组织学与胚胎学教研室,重庆市神经科学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 探讨豚鼠空肠壁内ICCs再生及细胞网络重新形成过程。**方法** 利用手术切断的方法,制造ICCs损伤丢失、网络断裂动物模型,冰冻切片和全层铺片免疫细胞化学染色观察。**结果** 术后30~50 d,断端KIT阳性细胞开始增多;术后70 d左右,KIT阳性细胞在断端形成以正常肠壁为底面,顶端向吻合部位的三角形增生区域,在该区域中部KIT阳性细胞的数量较多,且排列不规则,呈团状,突起较短,胞浆丰富,细胞核较大;而靠近三角形底部的KIT阳性细胞逐渐与肌间神经丛周围和深肌丛附近的ICCs相延续。在术后6个月,近端和远端的肠壁已逐渐恢复延续性,肠壁各层结构基本正常,此时KIT阳性细胞亦趋于恢复正常细胞网络分布模式。**结论** 当肠壁内ICCs及其网络损伤后,ICCs可通过再生恢复正常的细胞网络和分布模式。

关键词: Cajal间质细胞;再生;KIT蛋白;小肠;c-kit

中图法分类号: R322.45; R329.25 **文献标识码:** A

Regeneration of interstitial cells of Cajal and restoration of the cellular network after reanastomosis of the small intestine in guinea-pigs

MEI Feng, YU Bin, MA Hua, ZHANG Hong-jun, ZHOU De-shan (Department of Histology and Embryology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the regeneration of interstitial cells of Cajal (ICCs) and the restoration of the cellular network after reanastomosis of the small intestine in guinea-pigs. **Methods** Animal model was established by semi-transection and reanastomosis. ICCs were observed by immunocytochemical staining. **Results** During the operative period from 30 to 50 d, KIT-positive cells began to increase in the reanastomosed ends. At 70 d after operation, the number of KIT-positive cells adjacent to the reanastomosed ends increased significantly. These ICCs in the regenerated region showed a triangle-like structure in the reanastomosed ends. In the middle of the triangle-like region, many KIT-positive cells characterized by two to three short processes and enriched cytoplasm irregularly organized into groups whereas in the vicinity of the base, a large number of KIT-positive cells tended to connect with IC-MY and IC-DMP. At 6 months after operation, the microstructure of the intestinal wall and the distribution of KIT-positive cells in the region of the reanastomosed ends appeared to be similar to those of the control. **Conclusion** ICCs in adult guinea-pigs could regenerate and restore their normal distribution and cellular network in the gut after ICCs are damaged.

Key words: interstitial cells of Cajal; regeneration; KIT; small intestine; c-kit

Cajal细胞(interstitial cells of cajal, ICCs)是100多年前Cajal应用镀银技术和甲基蓝染色,在豚鼠和家兔小肠描述的一种特殊的间质细胞,现通常称为Cajal细胞或ICCs。在胃肠道根据其存在部位,一般分为4种亚型:IC-MY,位于环形和纵行平滑肌之间的肌间神经丛周围;IC-IM,位于环行和纵行平滑肌内;IC-DMP,位于靠近粘膜下层部位的环行平滑肌内的深部肌神经丛附近;IC-SM,位于结肠环行平滑肌层的内侧,紧靠粘膜下层的部位。不同亚型间ICCs的形态亦存在一定的差异,如:IC-MY有2个以上的细长突起,胞核椭圆,胞质较少;而IC-DMP胞体细长,胞浆丰富[1]。目前已经证明ICCs是胃肠道自主节律性运动的起搏细胞和兴奋传导细胞[2],在调节消化管的运动功能方面具有重要作用。

近年研究表明ICCs与一些胃肠运动功能障碍性

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30470911)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30470911)
作者简介:梅 峰(1979-),男,重庆市人,硕士研究生,主要从事胃肠运动调控机制方面的研究,电话:(023)68752229
通讯作者:周德山,电话:(023)68752230,E-mail:dszhou2000@163.com
收稿日期:2004-12-09;修回日期:2005-02-06

疾病，如贲门失迟缓症、糖尿病性胃轻瘫以及慢性便秘等密切相关[3,4]。尽管这些疾病发生机制尚不清楚，但均可见 ICCs 数量存在不同程度减少，细胞网络完整性被破坏等病理改变。设想在上述疾病情况下如果能够使 ICCs 再生，细胞突起延长，将有助于 ICCs 网络的恢复，对相关疾病的临床治疗具有重要意义。但正常情况下 ICCs 能否再生，细胞网络能否重新形成，目前尚不清楚。我们最近研究发现，胎儿小肠 ICCs 在妊娠 10～12 周出现后，数量随胎龄增加而增加，突起亦逐渐延长、出现分支，彼此间形成独立的完整细胞网络[5]；但成年后 ICCs 是否具有增殖再生能力仍不清楚。在预实验中，我们给成年豚鼠注射 Brdu(4 mg/只，隔日注射)3～7 次，标记分裂增殖的细胞，但未发现肠壁内 ICCs 呈 Brdu 阳性。推测可能是正常情况下，成体 ICCs 不具有增殖能力或增殖速度较慢，Brdu 难以标记。因此，本实验通过外科手术的方法，制造 ICCs 丢失和细胞网络断裂模型，结合 ICCs 特异性标志物——KIT 蛋白的免疫细胞化学染色，观察 ICCs 能否通过再生和突起延长等，重新恢复正常的细胞网络，为胃肠运动功能障碍性疾病的治疗开辟新的思路和方法。

1　材料与方法

1.1　材料

45～60 d 龄豚鼠(第三军医大学实验动物中心)，雌雄不限，共 18 只。

1.2　方法

1.2.1　空肠半横断端－端吻合术　　方法简述如下：术前禁食、禁水 12 h，1%戊巴比妥钠 40 mg/kg 腹腔内注射麻醉，消毒、无菌条件下开腹，在距屈氏韧带 5～8 cm 处，半横断小肠后，行端端单层浆肌层间断缝合，确认无肠漏、梗阻等后，关闭腹腔[6]。术后禁食 24 h，阿米卡星 4 mg/只，每日注射 1 次，连续 3 d 腹腔内注射预防术后感染。

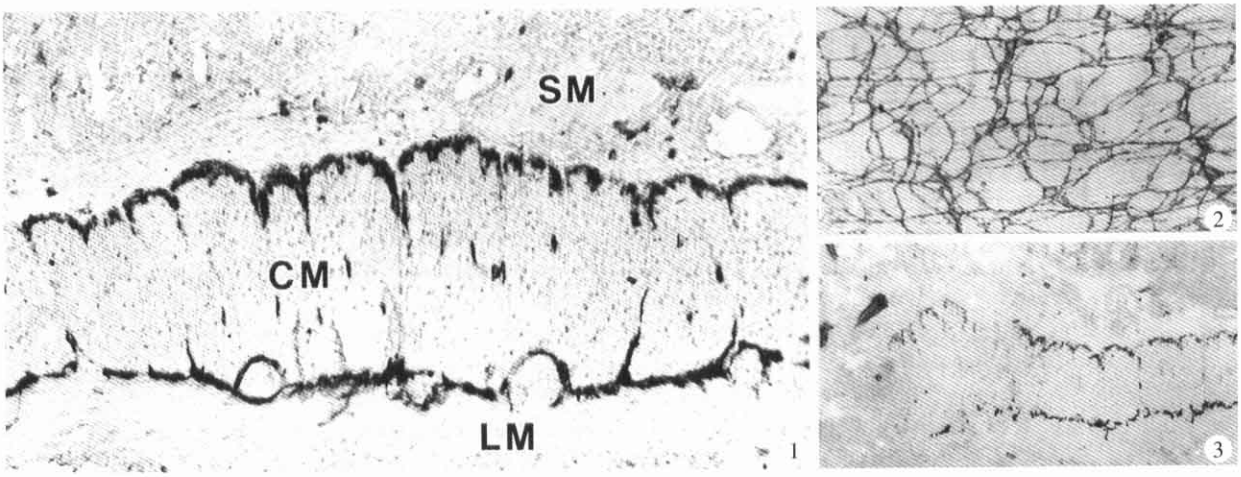
1.2.2　免疫细胞化学染色　　实验分为 6 组，每组 3 只动物，分别在术后 10、30、50、70、90、150 d 取吻合部位小肠，经生理盐水冲洗后，OCT 包埋，恒冷箱冰冻机切片，厚 7～10 μm，风干，100%丙酮固定 30 min(25 ℃)。染色方法为间接酶标抗体法[7]。切片经 0.01 mol/L PBS 充分漂洗后，0.03% H_2O_2/甲醇封闭内源性过氧化物酶 20 min(25 ℃)，1% BSA 孵育 30 min 后加入第一抗体，KIT 单克隆抗体(1∶100，eBIOSCIENCE 公司)4 ℃ 48 h，HRP 标记的兔抗大鼠 IgG 抗体(1∶100，DAKO 公司)25 ℃，60 min，0.05% Tris-HCl/0.05% DAB/0.01% H_2O_2 pH 7.5 显色，镜下观察，适时终止反应，终产物为棕褐色，水溶性封片剂封片。对照实验以正常鼠血清代替一抗，或兔血清代替二抗，结果均为阴性。各步骤间用 PBS 漂洗 3 次。选取正常肠壁进行冰冻切片和全层铺片作为正常对照，染色方法同上。

1.3　半定量分析及统计学处理

选取正常和各实验组切片 15 张，进行 KIT 免疫细胞化学染色，断端图片用 Image-Pro Plus 5.0 软件进行量化，以 KIT 阳性细胞与肠壁肌层面积比为变量，统计结果用 SPSS11.0 软件进行单因素方差分析。

2　结果

正常豚鼠空肠的 ICCs 主要分布在肠壁肌间神经丛周围、深肌丛附近及环行平滑肌内，肠壁全层铺片可见 IC-MY 呈网络状分布，见图 1、2。间接酶标免疫细胞化学染色显示术后 10 d 断端附近和吻合口部位，可见紧靠断端的 IC-MY 已经断裂，细胞数量亦减少，此时虽可见粘膜下结缔组织和粘膜增厚，但未见 KIT 阳性细胞数增加，见图 3。至术后 30 d，断端附近肠壁内可见 KIT 阳性细胞有所增加，并可见细胞突起向吻合口部位延伸，见图 4。术后 50 d，在断端附近粘膜和增生结缔组织间的平



SM: Submucosa; CM: Circular muscle layer; LM: Longitudinal muscle layer

图 1　冰冻切片显示豚鼠小肠 ICCs 的正常分布　(IHC×50)

Fig 1　Normal distribution of ICCs in the guinea-pig small intestine in the cryosection　(IHC×50)

图 2　全层铺片显示 IC-MY 细胞网络　(IHC×100)

Fig 2　Whole-mount preparation showing the normal network of IC-MY　(IHC×100)

图 3　术后 10 d，免疫细胞化学染色未见断端 KIT 阳性细胞增加　(IHC×70)

Fig 3　No increased KIT positive cells in the reanastomosed ends at 10 d after operation　(IHC×70)

滑肌内可见散在的 KIT 阳性细胞，并向吻合口生长，此时吻合口部位亦可见少量散在 KIT 阳性的 ICCs 样细胞，见图 5。随着时间的推移，约术后 70 d，在断端附近可见以正常肠壁为底面，顶端指向吻合口的三角形的增生区域，在三角形的顶部和中部 KIT 阳性细胞数量较多，呈团状，分布在平滑肌细胞间，细胞突起较短，胞浆丰富，核明显；而靠近三角底部的 KIT 阳性细胞逐渐与肌间神经丛和深肌丛的 ICCs 网相延续；此时吻合口处亦可见 KIT 阳性细胞散在分布，但排列较紊乱，见图 6、7；术后 3 个月左右，断端附近 ICCs 的数量已趋于恒定，而此时吻合口部位的 ICCs 数量则进一步增多，见图 8。至术后 5 个月左右，吻合口部位肠壁的各层结构和延续性已基本恢复正常，与此同时 ICCs 细胞网络亦趋向于重新形成正常分布模式，见图 9。半定量分析结果表明，与正常肠管相比，断端 KIT 阳性细胞面积与肠壁肌层面积的比值在术后降低，10 d 左右较明显，约减少 1/3。以后随着时间的推移，KIT 阳性细胞数量增多，二者的比值随之增加，在术后 30 d 左右，接近正常对照水平，至术后 50 d，二者的比值进一步增加；术后 70 d 达高峰，约为正常的 2.7 倍。以后虽有所下降，但二者的比值仍维持在正常的 2 倍左右。多因素方差分析结果表明，除正常组与术后 30 d 组间无明显差异外，其余各组间均有显著性差异（$P<0.05$），见图 10。

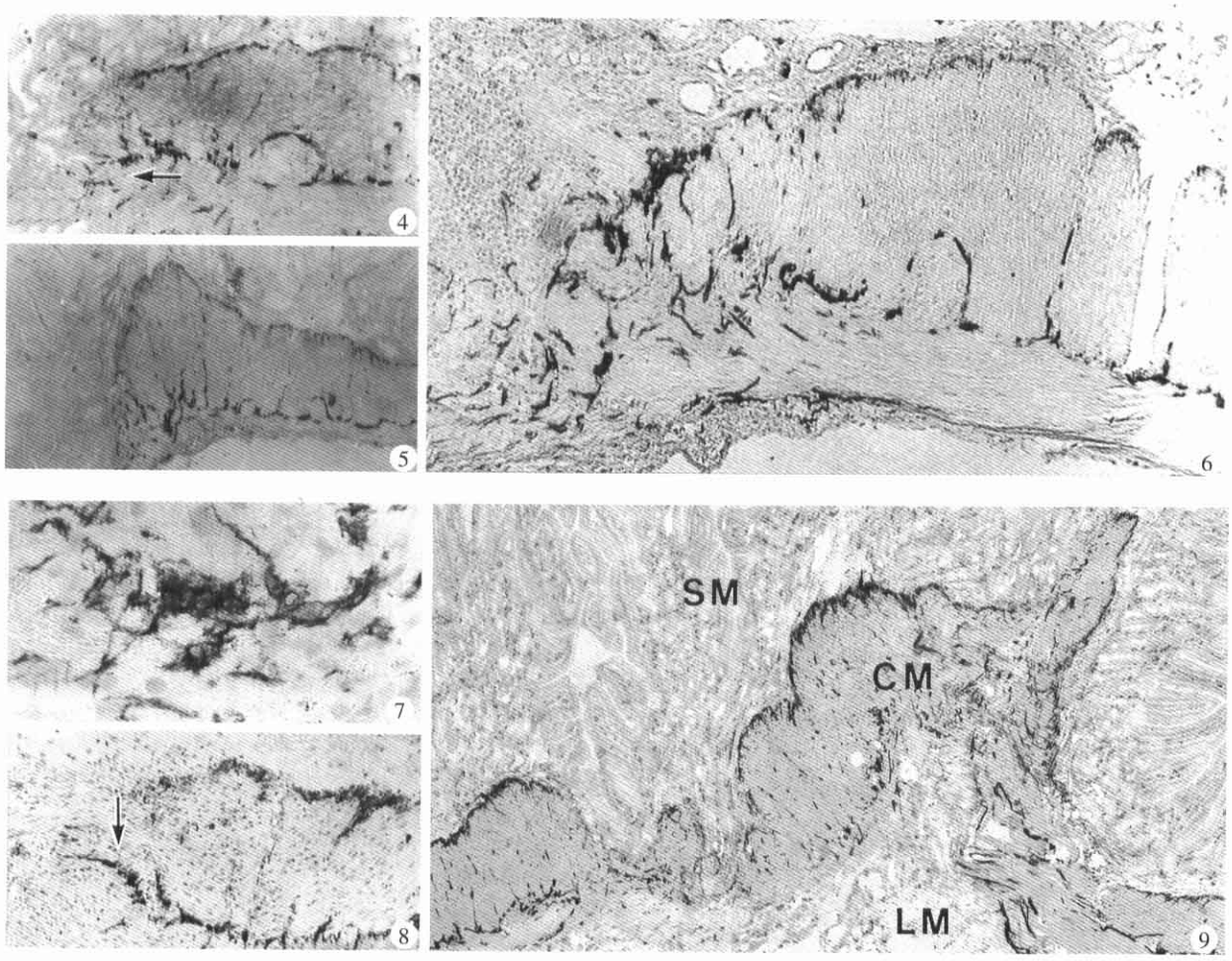


图 4 术后 30 d 可见断端 KIT 阳性细胞突起向吻合口方向延伸（箭头）（IHC × 70）

Fig 4 Processes of KIT positive cells in the reanastomosed ends extending towards the region of reanastomosis at 30 d after operation （arrow）（IHC × 70）

图 5 术后 50 d 断端可见 KIT 阳性细胞增多 （IHC × 60）

Fig 5 Increased KIT positive cells in the reanastomosed ends at 50 d after operation （IHC × 60）

图 6 术后 70 d 断端可见大量 KIT 阳性细胞 （IHC × 100）

Fig 6 A large number of KIT positive cells in the reanastomosed ends at 70 d after operation （IHC × 100）

图 7 术后 70 d 高倍镜下可见吻合口部位 KIT 阳性细胞成团分布 （IHC × 200）

Fig 7 The groups of KIT positive cells in the area of reanastomosis at 70 d after operation under high power lens （IHC × 200）

图 8 术后 90 dKIT 阳性细胞从断端向吻合口生长（箭头）（IHC × 90）

Fig 8 KIT positive cells extending from the reanastomosed ends towards the region of reanastomosis at 90 d after operation （arrow）（IHC × 90）

图 9 术后 150 d，吻合口部位 KIT 阳性细胞趋于恢复正常分布 （IHC × 15）

Fig 9 KIT positive cells in the region of reanastomosis tending to restore normal distribution at 150 d after operation （IHC × 15）

SM：Submucosa；CM：Circular muscle layer；LM：Longitudinal muscle layer

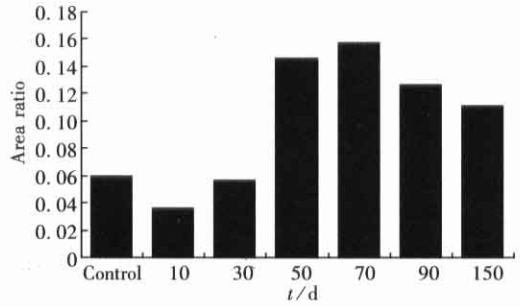


图 10　术后断端 KIT 阳性细胞与肠壁肌层面积比

Fig 10　Area ratio of KIT positive cells to smooth muscle layer in the reanastomosed ends after operation

3　讨论

我们最近研究发现，胎儿小肠壁内 ICCs 在妊娠 9 ~ 12 周出现后，数量随胎龄增加而增多，突起逐渐延长，至胚胎中晚期 ICCs 彼此间形成完整的细胞网络。Kluppel 等[8]报道在小鼠 E12 ~ 14 可见 ICCs 出现，随后 ICCs 逐渐增多，分别构成 IC-MY 和 IC-IM 细胞群，出生后数日内 ICCs 的数量可迅速增加到出生时的 3 倍以上。体外培养研究也表明，在 SCF 存在下，小鼠 E18 和 P2 的 ICCs 具有增殖能力，且在一定范围内与 SCF 的浓度呈正相关[9]。以上结果提示在胚胎发育阶段，ICCs 具有一定的增殖能力，细胞突起亦能生长延长，但成体 ICCs 是否具有增殖能力尚少见报道。前面已经提及在预实验中，我们给成年豚鼠注射 Brdu，标记分裂、增殖的细胞，但未能发现 ICCs 呈 Brdu 阳性，推测可能与 ICCs 的存活时间较长、更替慢、正常情况下难以捕捉有关。本研究通过外科手术的方法，使正常肠壁内 ICCs 受损、丢失及细胞网络破坏，造成有利于 ICCs 新生的环境，结果表明成年豚鼠 ICCs 在损伤等因素刺激下，能够再生，且随着时间的延长，亦可恢复正常的细胞网络，提示成年动物的胃肠道 ICCs 在一定条件下具有分裂增殖能力，这对维持 ICCs 的恒定和细胞网络完整性方面具有重要意义，但当 ICCs 增加受阻或丢失大于增加，细胞数量减少不足以维持正常细胞网络完整性时，可能与部分胃肠运动功能障碍性疾病的发生和发展有关。

本实验观察到在术后 70 d 左右，断端附近 ICCs 数量增加较多，成团分布，细胞突起短而粗，胞浆丰富，形态上属于幼稚型细胞，推测这部分增加的 ICCs 可能来源于未分化的间充质细胞，但有关成年动物新生 ICCs 的来源问题仍有待进一步研究。尽管有报道 ICCs 与平滑肌细胞可能源于同一前体细胞（progenitor cells）[10]，但不能排除胃肠壁内 ICCs 丢失后，残存的 ICCs 分裂增殖恢复正常的细胞网络可能性。从本研究 ICCs 增加过程看，ICCs 从断端肌间神经丛部位向吻合口生长的趋势，随着时间逐渐与肌间神经丛周围 ICCs 和深肌丛附近 ICCs 延续，也提示成年动物胃肠壁内 ICCs 具有一定的分裂增殖潜能。

已证明 KIT 蛋白在 ICCs 持续大量表达，对维持 ICCs 的正常结构和细胞网络的完整性及功能具有重要作用。据报道用 KIT 蛋白的中和性抗体（ACK2）注射 P0 ~ 5 新生小鼠，可见其肠壁内 ICCs 发育受阻，生后 ICCs 的数量仍保持在出生前的水平，不足以形成完整的细胞网络[11]。我们知道 KIT 蛋白的生理作用发挥需要与其配体——干细胞因子（stem cell factor，SCF）结合，当小鼠编码 SCF 的 steel 基因突变后，肌间神经丛的 ICCs 明显减少，甚至缺如[12]。体外培养也显示 E18 和 P2 的小鼠 ICCs，在 SCF 存在的条件下具有一定的增殖能力[9]，上述研究均表明 KIT/SCF 信号通路对 ICCs 的分裂增殖和正常发育具有重要的调节作用。因此，我们认为本实验 ICCs 增加过程中 KIT/SCF 信号通路也可能有重要作用，有关问题有待今后进一步研究。

我们通过外科手术的方法成功地建立了 ICCs 损伤再生动物模型，并证明成年豚鼠胃肠壁内 ICCs 仍具有一定的分裂增殖潜力，在适当条件下可以通过再生或新生等恢复正常的细胞网络，这对研制以 ICCs 为靶点治疗胃肠运动功能障碍性疾病提供了新的理论依据。

参考文献：

[1] Komuro T, Tokui K, Zhou D S. Identification of the interstitial cells of Cajal[J]. Histol Histopathol, 1996, 11 (3): 769 - 786.

[2] Huizinga J D, Thuneberg L, Klüppel M, *et al*. W/kit gene required for interstitial cells of Cajal and for intestinal pacemaker activity[J]. Nature, 1995, 373 (6512): 347 - 349.

[3] Wedel T, Spiegler J, Soellner S, *et al*. Enteric nerves and interstitial cells of Cajal are altered in patients with slow-transit constipation and megacolon [J]. Gastroenterology, 2002, 123(5): 1459 - 1467.

[4] 于　彬，梅　峰，童卫东，等. 慢传输型便秘患者结肠壁内 Cajal 细胞的形态学研究[J]. 消化外科，2004，3(3)：185 - 189.

[5] 于　彬，周德山，何扬涛，等. 胎儿小肠 Cajal 细胞的发育研究[J]. 中国组织化学杂志，2003，12(3)：263 - 267.

[6] Kease J R, Furness J B, Costa M. Origins of peptide and norepinephrine nerves in the mucosa of the guinea-pig small intestine[J]. Gastroenterology, 1984, 86(4): 637 - 644.

[7] Komuro T, Zhou D S. Anti-c-kit protein immunoreactive cells corresponding to the interstitial cells of Cajal in the guinea-pig small intestine [J]. J Auton Nerv Syst, 1996, 61(2): 169 - 174.

[8] Klüppel M, Huizinga J D, Malysz J, *et al*. Developmental origin and Kit-dependent development of the interstitial cells of cajal in the mammalian

small intestine[J]. Develop Dynamics, 1998, 211 (1): 60-71.
[9] Nakahara M, Isozaki K, Vanderwinden J M, *et al*. Dose-dependent and time-limited proliferation of cultured murine interstitial cells of Cajal in response to stem cells factor[J]. Life Sci, 2002, 70 (20): 2367-2376.
[10] Wu J J, Rothman T P, Gershon M D. Development of the interstitial cell of Cajal: origin, kit dependence and neuronal and nonneuronal sources of kit ligand[J]. J Neuroscience Res, 2000, 59(3): 384-401.
[11] Torihashi S, Ward S M, Nishikawa K, *et al*. C-kit dependent development of interstitial cells and electrical activity in the murine gastrointestinal tract[J]. Cell Tissue Res, 1995, 280(1): 97-111.
[12] Ward S M, Burns A J, Torihashi S, *et al*. Impaired development of interstitial cells and intestinal electrical rhythmicity in steel mutants[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 1995, 269 (6 Pt 1): C15772-C15785.

(编辑 王 红)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2005)05-0380-01

涎腺腺样囊性癌中层粘连蛋白受体表达及其意义

Expression and significance of laminin receptor in adenoid cystic carcinoma of the salivary gland

李 萍,宋 琦 (遵义医学院口腔组织病理学教研室,遵义 563003)

层粘连蛋白受体(laminin receptor, LN-R),是一种跨膜糖蛋白,广泛存在于正常上皮细胞和肿瘤细胞表面。它与层粘连蛋白一起在细胞增殖、分化、迁移、粘附、胚胎发育、神经生长以及肿瘤发生、癌变与转移等多方面发挥着重要的作用。本研究拟用免疫组化方法研究 LN-R 在涎腺腺样囊性癌中的表达及其与涎腺腺样囊性癌临床病理分型和临床分期的关系。

1 材料与方法

标本:涎腺腺样囊性癌34例,为本院口腔颌面外科手术切除标本及附属医院病理科标本。所有标本经10%甲醛固定,石蜡包埋,连续切片,切片厚5 μm。根据WHO(1991年)涎腺肿瘤组织学分型标准,34例涎腺腺样囊性癌分型如下:腺样(筛状)-管状型19例,实性型15例。根据WHO(1992年)TNM临床分期标准,其分期如下:Ⅰ~Ⅱ期20例,Ⅲ~Ⅳ期14例。

试剂及方法:LN-R(鼠抗人)单克隆抗体,超敏S-P试剂盒,DAB显色剂均为福州迈新公司产品。以同一切片中小血管壁作阳性对照,以PBS代替一抗作阴性对照。LN-R单抗经0.01 mol/L柠檬酸高温高压处理2 min,实验步骤严格按说明书进行。

判断标准:LN-R(+):肿瘤细胞胞浆染色数>10%;LN-R(-):肿瘤细胞胞浆染色数<10%或未着色。

统计学处理:采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 阳性对照

小血管管壁见一层连续棕黄色染色带。

2.2 腺样囊性癌中 LN-R 的表达

LN-R 表达于癌细胞的基底膜面和细胞质内,呈黄褐色颗粒状,见图1,2。

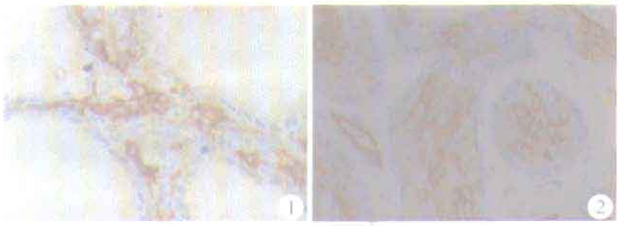


图1 腺样型腺样囊性癌中 LN-R 的表达 (S-P×200)
图2 实性型腺样囊性癌中 LN-R 的表达 (S-P×200)

2.3 34例腺样囊性癌 LN-R 的免疫组化与临床病理指标的关系

统计学分析,病理分型不同(腺样-管状型和实性型比较),LN-R 表达程度有显著差异($\chi^2=4.48$, $P<0.05$),临床分期与 LN-R 之间亦有显著差异($\chi^2=6.28$, $P<0.05$)(表1)。

表1 34例各型腺样囊性癌免疫组化结果

临床病理指标	例数	LN-R(+)	LN-R(-)
病理分型			
腺样-管状型	19	7	12
实性型	15	11	4
临床分期			
Ⅰ~Ⅱ期	20	7	13
Ⅲ~Ⅳ期	14	11	3

作者简介:李 萍(1970-),女,四川省绵阳市人,硕士,讲师,主要从事涎腺肿瘤癌基因表达方面的研究,发表论文6篇。电话:(0852)8640374

收稿日期:2004-03-18;修回日期:2004-10-12

(下转384页)