文章编号:1000-5404(2005)08-0703-04

论著

小鼠小肠 Cajal 间质细胞的分布与 c-kit mRNA 表达初步研究

贾后军[1],刘宝华[1],童卫东[1],张连阳[1],文亚渊[1],刘 韧[2] (第三军医大学大坪医院野战外科研究所:[1]普通外科,[2]第二研究室,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400042)

提 要:目的 观察 Cajal 间质细胞在 BALB/c 小鼠小肠中的分布及 c-kit mRNA 表达的研究。**方法** 选取成年 BALB/c 小鼠,采用免疫组化法鉴定 Cajal 间质细胞,采用 RT-PCR 及 mRNA 提取法检测 c-kit mRNA 的表达情况。**结果** Cajal 间质细胞主要分布在小肠环肌层纵肌层间以及浆膜下区,小肠肌条中 c-kit mRNA 表达量很低,需经过 mRNA 提取后方能检测出。**结论** 明确了 Cajal 间质细胞在 BALB/c 小鼠小肠中的分布,探讨了 c-kit mRNA 表达情况并进一步提出了研究 c-kit mRNA 表达的方法,为更深入研究 Cajal 间质细胞奠定了基础。

关键词:Cajal 间质细胞;c-kit;BALB/c 小鼠
中图法分类号:R322.45; R329.25; R394.2 **文献标识码**:A

Study on distribution of interstitial cells of Cajal and expression of c-kit mRNA in the murine small intestine

JIA Hou-jun[1], LIU Bao-hua[1], TONG Wei-dong[1], ZHANG Lian-yang[1], WEN Ya-yuan[1], LIU Ren[2] ([1]Department of General Surgery, [2]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Department 2, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To investigate the distribution of interstitial cells of Cajal and study the expression of c-kit mRNA in the BALB/c murine small intestine. **Methods** Interstitial cells of Cajal were identified by immunohistochemistry. The expressions of c-kit mRNA were measured by RT-PCR and mRNA extraction. **Results** Interstitial cells of Cajal distributed mainly between the circular and longitudinal muscle layers and in the subserosa in the small intestine. The expressions of c-kit mRNA could be detected by mRNA extraction and RT-PCR. **Conclusion** The distribution of interstitial cells of Cajal and the expressions of c-kit mRNA in the BALB/c murine small intestine were determined.

Key words: interstitial cells of Cajal; c-kit; BALB/c murine

Cajal 间质细胞(interstitial cells of Cajal, ICC)是胃肠道的一种特殊的间质细胞,既不属于原始的神经细胞、神经胶质细胞,也不是特殊的平滑肌细胞[1]。现已证实,ICC 为胃肠道慢波的起搏点,并参与慢波的传导。近年来,其已越来越受到关注。最早,ICC 常通过光镜及电镜来鉴定[2],传统的染色技术有亚甲蓝染色、金属掺合剂染色、碘化锌-锇酸染色、潘若明 123 染色等,但光镜检查缺乏特异性的染色方法,最终仍需电镜来确认,而电镜检查费时、费力且有明显的局限性。免疫组化及分子生物学技术的发展,给 ICC 的研究带来了较大的发展。ICC 特异性表达 c-kit 的发现,使人们有了鉴定 ICC 的可靠方法,对于深入研究 ICC 有重要意义[3]。本实验从 c-kit 着手观察 Cajal 间质细胞在 BALB/c 小鼠小肠中的分布及 c-kit mRNA 表达的情况,为更深入研究 Cajal 间质细胞奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

成年 BALB/c 小鼠 12 只,体质量(20±2)g,雌雄不拘,由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供。

1.2 主要试剂及仪器

抗 c-kit 抗体(ACK2)购自美国 Ebioscience 公司,为大鼠抗小鼠单克隆抗体。SABC 免疫组化试剂盒购自武汉博士德公司。Trizol 试剂及 SuperscriptⅡ逆转录酶均为 Invitrogen 产品,磁架为 Promega 公司产品,PCR 试剂为丹麦 Fermentas 产品,mRNA 纯化用 Dynbeads dT(25)为挪威 Dynal Biotech 产品,DNA Marker 为北京鼎国生物技术有限公司产品 DGL 2000 型。主要仪器有 PTC-

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30300156)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30300156)
作者简介:贾后军(1975-),男,湖北省洪湖市人,博士研究生,主治医师,主要从事胃肠动力学及胃肠肿瘤基础与临床方面的研究。电话:(023)66120901
通讯作者:刘宝华,电话:(023)68757268
收稿日期:2004-07-06;**修回日期**:2004-10-02

200型PCR扩增仪(美国)及Amersham Biosciences ImageMaster VDS-CL生物成像仪。

1.3 免疫组化

动物禁食6 h后,颈椎脱臼处死。剖腹立即取近段小肠(距屈氏韧带约1 cm)一小段,PBS冲净肠内容物,用4%多聚甲醛于4 ℃固定2.5 h,再用20%蔗糖于4 ℃脱水过夜后行冰冻切片,片厚7 μm。免疫组化步骤参照SABC免疫组化试剂盒说明书进行。其中ACK2抗体(5 μg/ml)于4 ℃孵育过夜,免疫反应通过SABC-DAB检测,反应产物显示为棕黄色。

1.4 小肠肌条总RNA提取及RT-PCR

动物禁食6 h后,颈椎脱臼处死。取近段小肠于系膜缘侧剪开肠管,用尖刀去除肠粘膜层,PBS漂洗干净,制成小肠肌条。用Trizol提取总RNA,于紫外分光光度计下行RNA定量及$D(260)/D(280)$测定。取9 μl(约9 μg)总RNA,用Superscript Ⅱ逆转录酶行逆转录过程,反应体系共20 μl。PCR反应参照Epperson等[4]条件进行,反应体系共50 μl,其中模板cDNA 10 μl、2.0 mmol/L dNTP 5 μl、25 mmol/L $MgCl_2$ 4 μl、10×PCR buffer 5 μl、上游引物及下游引物各1 μl、*Taq* DNA聚合酶0.5 μl。C-kit的扩增条件为:先94 ℃,5 min;再40个循环:94 ℃,15 s;48 ℃,60 s;72 ℃,90 s;最后72 ℃,10 min。阳性对照β-actin扩增条件为:先94 ℃,5 min;再33个循环:94 ℃,30 s;55 ℃,30 s;72 ℃,20 s;最后72 ℃,10 min。C-kit上游引物序列:5′-GTACATAGAAAGAGACGTGACTCCT-3′,下游引物序列:5′-GAGTTGACCCTCACGGAATGGTCCA-3′,扩增产物为642 bp。β-actin上游引物序列:5′-GGCTACAGCTTCACCACCAC-3′,下游引物序列:5′-TACTCCTGCTTGCTGATCCAC-3′。扩增产物(7 μl)在1.2%琼脂糖/1×TAE凝胶中电泳分离,EB染色观察DNA条带。

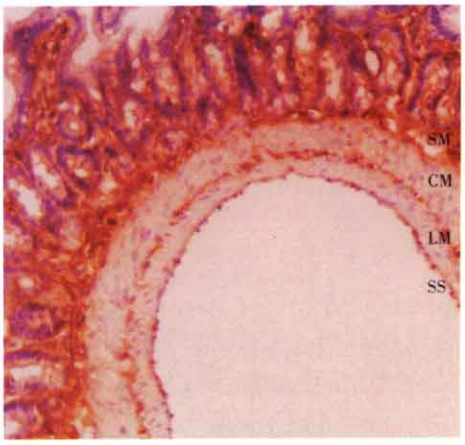
1.5 小肠肌条总mRNA提取及RT-PCR

先提取小肠肌条总RNA,方法同上;再应用Dynbeads dT(25)从所提取的总RNA中提取出总mRNA,具体步骤如下:①取总RNA约55 μg,以10 mmol/L Tris-HCl稀释至100 μl;②1∶1加入Binding buffer,于65 ℃中水浴2 min;③取200 μl Dynbeads到1.5 ml离心管中,在磁架上吸去上清,并用100 μl Binding buffer洗涤后,重新加入100 μl Binding buffer混匀,备用;④将水浴好的总RNA加入到上述离心管中混匀,于磁架上室温放置3~5 min,吸去上清,并用200 μl Washing buffer洗涤2遍;⑤加入20 μl 10 mmol/L Tris-HCl混合,于80~90 ℃中水浴2 min;⑥快速吸出上清(即为mRNA)至另一干净的离心管中,于-70 ℃保存。取9 μl mRNA逆转录成cDNA,反应体系同前。取5 μl cDNA在50 μl PCR反应体系中行PCR过程,反应条件同前,扩增产物(3 μl)在1.2%琼脂糖/1×TAE凝胶中电泳分离,EB染色观察DNA条带。

2 结果

2.1 ICC在BALB/c小鼠小肠中的分布

共取6只成年小鼠,通过c-kit免疫组化方法鉴定ICC。结果显示6只成年BALB/c小鼠小肠中均存在ICC,主要分布在环肌层纵肌层间区以及浆膜下区。其中环肌层纵肌层间区分布较明显,且环肌层纵肌层间区ICC在切面上几乎呈现连续性分布(图1)。



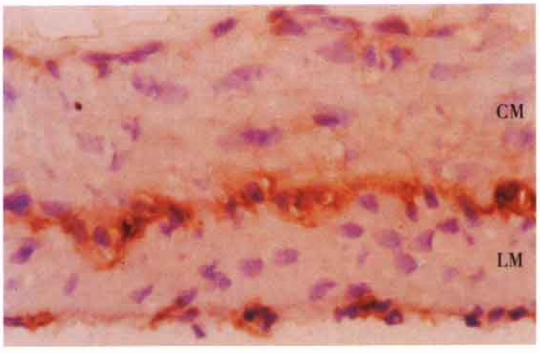
SM: Submucosa; CM: Circular muscle layers; LM: Longitudinal muscle layers; SS: Subserosa

图1 BALB/c小鼠小肠ICC分布 (SABC×100)

Fig 1 Distribution of interstitial cells of Cajal in BALB/c murine small intestine (SABC×100)

2.2 小肠肌条ICC表达c-kit观察

同上6只成年小鼠,制成小肠肌条,通过c-kit免疫组化方法观察ICC表达c-kit情况。结果显示环肌层纵肌层间区ICC表达c-kit明显,并且为胞膜特异性表达(图2)。



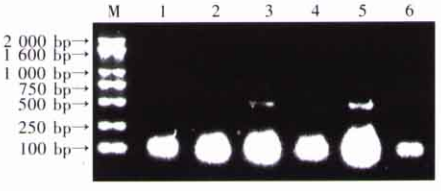
CM: Circular muscle layers; LM: Longitudinal muscle layers

图2 BALB/c小鼠小肠肌条c-kit免疫组化 (SABC×400)

Fig 2 Muscular strips c-kit immunohistochemistry in BALB/c murine small intestine (SABC×400)

2.3 总RNA的RT-PCR检测c-kit mRNA表达

共取3只小鼠,提取小肠总RNA,并行RT-PCR,检测β-actin及c-kit基因mRNA表达。结果显示3只小鼠小肠均见明显β-actin mRNA表达,但没能检测出来c-kit mRNA表达(图3)。



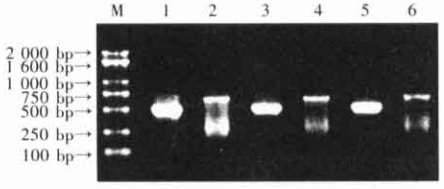
M: Marker; 1, 3, 5: β-actin; 2, 4, 6: c-kit

图3 小肠肌条总RNA提取法检测c-kit mRNA表达

Fig 3 Expression of c-kit mRNA in the muscular strips by total RNA extract

2.4　总 mRNA 的 RT-PCR 检测 c-kit mRNA 表达

共取 3 只小鼠，提取小肠总 mRNA，按照与总 RNA 同样的反应条件行 RT-PCR，检测 β-actin 及 c-kit 基因 mRNA 表达。结果显示 β-actin 扩增条带非常显著，并且也可见明显的 c-kit mRNA 表达，但其表达明显低于 β-actin（图 4）。



M: Marker; 1, 3, 5: β-actin; 2, 4, 6: c-kit

图 4　小肠肌条总 mRNA 提取法检测 c-kit mRNA 表达

Fig 4　Expression of c-kit mRNA in the muscular strips by total mRNA extract

3　讨论

ICC 是胃肠道的一种特殊的间质细胞，不但起搏胃肠电慢波活动，参与慢波的传导，也对神经肌肉信号传导起重要调节作用[5,6]；而且与众多胃肠动力紊乱性疾病[7,8]以及胃肠道肿瘤的发病有关[9,10]。ICC 作为一类特殊的细胞，已成为胃肠动力学领域的一个新的研究方向。随着 ICC 标志物 c-kit 的发现，目前对 ICC 的研究更加深入。c-kit 受体是Ⅲ型酪氨酸激酶受体家族中的重要成员，与其同属一个家族的受体分子还包括巨噬细胞集落刺激因子受体、血小板衍生的生长因子受体和 flk2/flk3 受体等。人类 c-kit 基因定位于 4 号染色体长臂（4q11-12），编码一种跨膜蛋白，分子量为 145 $\times 10^3$。C-kit 受体的分子结构由细胞外区、跨膜区和胞浆区 3 部分组成，其中最重要的是细胞外区，该区担负着与配体结合的功能。C-kit 对于黑色素细胞、生殖细胞、造血干细胞及肥大细胞的发育是必要的，c-kit 与配体相互作用在这些细胞的分化与增殖中具有重要的作用。研究发现几乎所有 ICC 均表达 c-kit，胃肠道内表达 c-kit 的细胞绝大多数为 ICC，从而将 c-kit 作为 ICC 的标志物来鉴定 ICC 为 ICC 的研究开辟了新纪元[3]。

尽管肥大细胞也表达 c-kit，但其在小鼠小肠肌肉层中很少被观察到[1]，因此，本实验特将 c-kit 作为 ICC 的特异性标志物来研究小鼠小肠主要是小肠肌肉层 ICC 分布及 mRNA 表达情况。我们通过免疫组化方法鉴定了 BALB/c 小鼠小肠中 ICC 的分布情况，发现其主要分布在小肠环肌层纵肌层间区以及浆膜下区。这与国外报道的情况基本一致[11,12]，其中环肌层纵肌层间区 ICC 相当于肠肌丛 ICC。尽管在粘膜下及肠腺附近出现了染色情况，但通过未加一抗的阴性对照结果考虑其为非特异性染色，出现这种非特异性染色的原因可能与固定剂的应用方式及标本的取材有关，并且也可能与切片技术有一定关系。本实验结果也显示环肌层纵肌层间区 ICC 在切面上几乎呈现连续性分布，因而我们推测其在肠道可能成网络状分布，从而更好发挥其肠道慢波起搏与传导的功能。既然 c-kit 是小鼠小肠肌肉层 ICC 的特异性标志物，并且我们研究发现 ICC 主要分布在小鼠小肠肌肉层内，而且目前许多研究[1,2,13,14]均表明 c-kit 在 ICC 发生、发育及表型维持中具有重要的作用，那么，更进一步研究 ICC c-kit 基因表达情况就非常必要，势必将有助于我们更好地探索 ICC 在小鼠小肠中的作用。本实验通过 RT-PCR 方法检测了 BALB/c 小鼠小肠肌条中 c-kit mRNA 表达情况。我们先用小肠肌条总 RNA 行 RT-PCR 来检测 c-kit mRNA 表达情况，但未能检测出来，而阳性参照 β-actin mRNA 表达却很明显，那么出现这种结果是否是因为检测方法的反应条件的原因呢，还是因为小鼠小肠肌条中 c-kit 基因 mRNA 表达量太少导致行 RT-PCR 时模板量太少？为此，我们再通过提取小肠肌条总 mRNA 按照与总 RNA 行 RT-PCR 同样条件来检测其表达，结果显示 β-actin 扩增条带非常显著，并且也可见明显的 c-kit mRNA 表达，但其表达明显低于 β-actin。我们得出结论，BALB/c 小鼠小肠肌条中 c-kit mRNA 表达量太少，若单纯通过提取小肠肌条总 RNA 来行 RT-PCR，则因模板量太少而不能扩增出来，而必须通过提取总 mRNA 来大大增加模板量后方能经 RT-PCR 检测出其表达。尽管 ICC 在小鼠小肠中成网络状分布，但其仍仅部分分布于小肠环肌层纵肌层间区以及浆膜下区，因此，我们认为出现上述现象的原因主要与小鼠小肠肌肉层中 ICC 所占总细胞数量较少，而 mRNA 占总 RNA 的比例仅为 2%，导致所提取的小肠肌条总 RNA 中 c-kit mRNA 的含量就更少有关，并不是因为 ICC 本身不表达 c-kit mRNA 或表达低的原因。这为我们今后研究 ICC c-kit 基因表达提供了适当的途径。

总之，ICC 作为胃肠道一类重要细胞，其具有起搏及传导胃肠慢波的作用，在胃肠道运动功能中扮演了重要角色，但国内尚无系统的研究报道。本实验明确了 Cajal 间质细胞在 BALB/c 小鼠小肠中的分布情况，并探讨了 c-kit mRNA 表达情况且进一步提出了研究 c-kit mRNA 表达的方法，为下一步更深入地了解 Cajal 间质细胞将起到重要作用。

参考文献：

[1] Sanders K M, Ordog T, Koh S D, *et al*. Development and plasticity of interstitial cells of Cajal[J]. Neurogastroenterol Motil, 1999, 11(5): 311-338.

[2] Ward S M, Sanders K M. Physiology and pathophysiology of the interstitial

cell of Cajal: from bench to bedside. I. Functional development and plasticity of interstitial cells of Cajal networks[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2001, 281(3): G602 - G611.

[3] Rich A, Hanani M, Ermilov L G, *et al*. Physiological study of interstitial cells of Cajal identified by vital staining[J]. Neurogastroenterol Motil, 2002, 14(2): 189 - 196.

[4] Epperson A, Hatton W J, 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.

[5] Takayama I, Horiguchi K, Daigo Y, *et al*. The interstitial cells of Cajal and a gastroenteric pacemaker system[J]. Arch Histol Cytol, 2002, 65(1): 1 - 26.

[6] Mitsui R, Komuro T. Direct and indirect innervation of smooth muscle cells of rat stomach with special reference to the interstitial cells of Cajal[J]. Cell Tissue Res, 2002, 309(2): 219 - 227.

[7] He C L, Burgart L, Wang L, *et al*. Decreased interstitial cell of Cajal volume in patients with slow-transit constipation[J]. Gastroenterology, 2000, 118(1): 14 - 21.

[8] Lyford G L, He C L, Soffer E, *et al*. Pan-colonic decrease in interstitial cells of Cajal in patients with slow transit constipation[J]. Gut, 2002, 51(4): 496 - 501.

[9] Hirota S, Isozaki K, Nishida T, *et al*. Effects of loss-of-function and gain-of-function mutations of c-kit on the gastrointestinal tract[J]. J Gastroenterol, 2000, 35(Suppl 12): 75 - 79.

[10] Robinson T L, Sircar K, Hewlett B R, *et al*. Gastrointestinal stromal tumors may originate from a subset of CD34-positive interstitial cells of Cajal[J]. Am J Pathol, 2000, 156(4): 1157 - 1163.

[11] Vanderwinden J M, Rumessen J J, De-Laet M H, *et al*. CD34 immunoreactivity and interstitial cells of Cajal in the human and mouse gastrointestinal tract[J]. Cell Tissue Res, 2000, 302(2): 145 - 153.

[12] Vanderwinden J M, Rumessen J J, Bernex F, *et al*. Distribution and ultrastructure of interstitial cells of Cajal in the mouse colon, using antibodies to Kit and Kit(W-lacZ) mice[J]. Cell Tissue Res, 2000, 302(2): 155 - 170.

[13] Sanders K M, Ordog T, Ward S M. Physiology and pathophysiology of the interstitial cells of Cajal: from bench to bedside. IV. Genetic and animal models of GI motility disorders caused by loss of interstitial cells of Cajal[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2002, 282(5): G747 - G756.

[14] Torihashi S, Nishi K, Tokutomi Y, *et al*. Blockade of kit signaling induces transdifferentiation of interstitial cells of cajal to a smooth muscle phenotype[J]. Gastroenterology, 1999, 117(1): 140 - 148.

(编辑 刘洪娥)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2005)08-0706-01

尸解1例脑血管造影阴性的动脉瘤患者报告

A case of cerebral aneurysm negative in angiography confirmed by autopsy

刘启锋,朱 刚,陈 志 (第三军医大学西南医院神经外科,重庆 400038)

我院2004年3月收入1例自发性蛛网膜下腔出血(subarachnoid hemorrhage, SAH)患者,行二次脑血管造影均为阴性,最后患者再次出血死亡。死亡后行尸体解剖证实为动脉瘤破裂。现报告如下。

1 资料与方法

患者,男,58岁。因突发头痛,呕吐1 d,意识不清30 min入院。查体:神志清楚,精神差,对答切题,双侧瞳孔等大等圆,对光反应略迟钝,颈部抵抗感明显,四肢肌力5级,肌张力正常,双下肢病理征阴性。CT示:蛛网膜下腔出血,鞍上池积血。

诊疗经过:患者入院后急诊行脑血管造影检查,术中见脑血管走行正常,未发现动脉瘤显影。但仍考虑存在动脉瘤的可能性大。首次发病后第10天患者突然出现头痛,昏迷不醒,CT检查:右额部脑出血,并破入脑室。拟行手术探察,但患者家属仍坚持行介入治疗。再次行脑血管造影术,术中可见脑血管痉挛,仍未发现动脉瘤显影。住院13 d后患者死亡,行尸体解剖

2 结果

常规开颅,完整取出脑组织及脑血管颅内段,可见鞍上池内有血凝块存留,右侧额叶脑内血肿,约2 cm×3 cm,并破入脑室。小心解剖脑底动脉环(Willis环)血管,发现右侧前交通动脉起始端,有1动脉瘤直径约为2 mm,瘤体不完整。瘤体顶端有破口存在,瘤体内有血栓形成。光镜病理检查为真性动脉瘤。其它血管未发现异常

3 讨论

自发性SAH出血的患者占13% ~ 25%,首次全脑血管造影无明显异常[1],分析其原因认为是由于被出血、血栓、血管痉挛所掩盖的微小动脉瘤,隐匿性血管畸形,血管造影技术欠缺等。本患者二次造影均未发现动脉瘤,分析造影动脉瘤不显影的原因为:①动脉瘤较小,瘤颈窄;②动脉瘤内血栓形成;③载瘤血管痉挛。Hayward探讨了脑血管造影阴性的SAH的CT特征认为,CT上SAH的部位和数量可能与脑血管造影发现动脉瘤的可能性有关,这被许多研究所证实。对于CT提示出血位于

(下转712页)

作者简介:刘启锋(1972-),男,山东省泰安市人,硕士,主治医师,主要从事显微神经外科及神经介入方面的研究,现在解放军第88医院神经外科。电话:(0538)6216176

通讯作者:朱 刚,电话:(023)68765252

收稿日期:2004-09-02;修回日期:2004-11-13