文章编号:1000-5404(2007)02-0141-03

论著

糖尿病大鼠胃窦SCF-Kit信号改变及其对Cajal间质细胞的影响

龙庆林,房殿春,史洪涛,向国春,罗元辉 (第三军医大学西南医院全军消化内科中心,重庆 400038)

提 要:目的 研究糖尿病胃轻瘫大鼠胃Cajal间质细胞(interstitial cells of Cajal, ICC)的形态学改变,测定干细胞因子(stem cell factor, SCF)及Kit含量变化,探讨糖尿病大鼠胃窦SCF-Kit信号在Cajal间质细胞受损中作用。**方法** 用链尿佐菌素建立大鼠糖尿病模型,3个月后采用美蓝方法测定胃排空速率,对胃窦组织进行透射电镜观察Cajal间质细胞超微结构变化,采用RT-PCR方法测定胃窦平滑肌组织SCF mRNA的表达,Western blot法检测胃窦平滑肌组织c-kit蛋白变化。**结果** 与正常大鼠相比,糖尿病大鼠胃排空明显延迟,胃Cajal间质细胞与其他细胞间的缝隙连接显著减少、结构破坏、连接松散;细胞器变性、减少;胞质广泛溶解;核周间隙增宽。糖尿病大鼠胃窦平滑肌组织SCF mRNA以及c-kit蛋白表达均明显低于正常大鼠。**结论** SCF-Kit系统受损与糖尿病大鼠胃窦Cajal间质细胞变性、数量减少以及网络结构破坏有关,最终导致胃运动障碍。

关键词: 胃;Cajal间质细胞;胃轻瘫;SCF
中图法分类号: R322.44;R329.25;R587.102 **文献标识码:** A

Change of c-Kit/SCF signaling system and its effect on interstitial cells in gastric antrum of diabetic rats

LONG Qing-lin, FANG Dian-chun, SHI Hong-tao, XIANG Guo-chun, LUO Yuan-hui (Gastroenterology Research Center, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the changes of c-Kit/SCF signaling system in gastric antrum of diabetic rats and clarify their effects on interstitial cells of Cajal. **Methods** Wistar rats were randomly divided into diabetic group and control group. The rats in diabetic group were intraperitoneally injected of streptozotocin, while normal saline for control group. Gastric emptying rate was measured, the ultrastructure of antral tissue was observed through transmission electron microscope, the expressions of SCF mRNA and c-kit protein in muscular layer were measured after diabetic rat model establishment for 3 months. **Results** In the diabetic rats, gastric emptying time was significantly longer than that of normal rats. The number of the gap junction of interstitial cells of Cajal in gastric antrum of diabetic rats decreased significantly, the ultrastructure and the organelle were damaged, and vacuoles were formed. The expression of SCF mRNA and c-kit protein in muscular layer in gastric antrum of diabetic rats was significantly decreased as compared with that in normal rats. **Conclusion** c-Kit/SCF signaling system is crucial to the development, phenotype maintenance and function of interstitial cells of Cajal. The degeneration and decrease of interstitial cells of Cajal and loosening of network in gastric antrum of diabetic rats occurred because of impairment of c-kit/SCF signaling system.

Key words: stomach; interstitial cells of cajal; gastroparesis; stem cell factor

Cajal间质细胞是胃肠道运动的起搏细胞,许多胃肠运动障碍性疾病存在着Cajal间质细胞的改变[1-3],但原因不明。酪氨酸激酶受体(Kit)是Cajal间质细胞的膜受体之一,其配体为干细胞因子(stem cell factor, SCF)。目前认为SCF-Kit信号途径与Cajal间质细胞关系密切,它不仅对Cajal间质细胞发育相当重要,而且对Cajal间质细胞形态及功能的维持也相当重要。当编码Kit或SCF的基因位点发生突变、Kit-SCF信号途径受损后,Cajal间质细胞增生和分化受到影响。研究表明,小鼠SCF由10号染色体的steel(Sl)位点编码,Sl^d是编码SCF跨膜及细胞质内部分的4 kb碱基序列缺失,在Sl/Sl^d小鼠,SCF合成严重受损,小肠Cajal间质细胞网状结构松散且细胞内线粒体较少,缺乏胞膜小凹。因此,我们推测胃肠运动障碍性疾病可能存

作者简介:龙庆林(1970-),男,湖南省茶陵县人,博士,主治医师,主要从事胃肠动力学方面的研究,发表论文10篇。电话:(023)68754678
收稿日期:2006-02-21;修回日期:2006-06-28

在着 SCF-Kit 信号途径受损，从而导致 Cajal 间质细胞改变。为此，我们利用大鼠建立糖尿病胃轻瘫模型，观察糖尿病大鼠胃窦 Cajal 间质细胞的变化，并测定胃窦平滑肌组织 c-kit 蛋白及 SCF mRNA 表达的改变，探讨糖尿病胃轻瘫大鼠胃 SCF-Kit 信号途径在 Cajal 间质细胞改变中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物及糖尿病模型建立

健康 2 个月龄的 Wistar 大鼠 50 只，由第三军医大学实验动物中心提供，体质量 100～160 g，雌雄各半。采用完全随机方法分为实验组和对照组：实验组 Wistar 大鼠 30 只，用于建立糖尿病模型；正常对照组 20 只。实验组大鼠禁食 12 h 后，腹腔内注射链尿佐菌素（streptozotocin，STZ）60 mg/kg；正常对照组腹腔内只注射等量的生理盐水。2 组大鼠每 2 周采用快速血糖测定仪测定测血糖 1 次，同时测质量，并观察大鼠的食量、尿量、饮水情况等；糖尿病组大鼠以血糖≥16.9 mmol/L 者为糖尿病模型建立成功，血糖 <16.9 mmol/L 者剔除。

1.2 胃排空时间测定

大鼠禁食 12 h 后，将 1 mg/ml 的美蓝溶液 0.4 ml 灌胃，30 min 后脱臼处死大鼠，迅速开腹取出全胃放置于冰上，沿胃大弯侧剪开胃，将胃内残留物用 4 ml 蒸馏水冲洗并收集，3 500 r/min离心 15 min，取上清液用 Beckman Du640 分光光度计以 640 nm 波长比色测吸光度为胃内色素残留量，求出与对照均值的百分比即为各样本的胃内色素相对残留率。

1.3 电镜观察

记录完胃电信号后，立即剪开腹腔，取小块胃窦组织（距幽门 0.5 cm），置于 3% 戊二醛中固定，0.2 mol/L 蔗糖磷酸缓冲液漂洗 2 次，1% 四氧化锇固定 2 h，丙酮梯度脱水，环氧树脂 618 包埋，半薄切片定位，超薄切片，醋酸铀-柠檬酸铅双重电子染色，在 JEOL-2000EX 型透射电镜下观察、照相。

1.4 Western blot 检测胃窦平滑肌组织 c-kit 蛋白表达

取正常对照组及糖尿病组胃平滑肌组织 100 mg，用含酶抑制剂的 Complete mini 提取抗原蛋白，经 10% 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶（SDS-PAGE），每泳道加蛋白 100 μg 进行电泳，转至硝酸纤维滤膜。依次 5% 脱脂奶粉封闭，加入多克隆抗体，4 ℃孵育过夜。加入 1∶2 000 辣根酶标记的羊抗兔 IgG 室温孵育 1 h，ECL 免疫印迹化学发光试剂放射自显影。

1.5 胃窦平滑肌组织 SCF mRNA 的测定

采用 RT-PCR 方法检测胃窦平滑肌组织 SCF mRNA 表达。SCF 上游引物：5′-AGCTAAACGGAGTCGCCACAC-3′，下游引物：5′-TCCATACATGCCACGAGGTCA-3′（404 bp）；β-actin 上游引物：5′-TTGTAACCAACTGGGACGATATGG-3′，下游引物：5′-GATCTTGATCTTCATGGTGCTAG-3′（764 bp）。

取正常对照组及糖尿病组胃平滑肌组织 100 mg，用 Tripure 试剂提取总 RNA。先合成 cDNA 第 1 链，再行 PCR 反应。PCR 反应条件：94 ℃预处理 4 min，94 ℃变性 45 s，52 ℃退火 45 s，72 ℃延伸 1 min，共循环 35 次，最后延伸 72 ℃ 7 min，4 ℃保存。用紫外检测仪对 RT-PCR 产物电泳条带进行观测拍照。

1.6 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 统计软件进行 t 检验。

2 结果

2.1 一般资料

糖尿病组大鼠血糖明显升高，出现了多饮、多尿、多食现象。注射 STZ 3 个月后，糖尿病组大鼠平均血糖浓度为（22.3 ±2.4）mmol/L，显著高于正常对照组大鼠的（4.2 ± 0.9）mmol/L（$P < 0.01$）；糖尿病组大鼠的平均质量为（197.9 ± 45.26）g，明显低于正常对照组大鼠的平均质量［264.7 ± 55.80）g，$P < 0.01$］。

我们用美蓝测定胃液体排空时间，根据胃内美蓝相对残留率判断胃排空的速度。给大鼠胃内灌注美蓝，30 min 后用分光光度计测定大鼠胃内美蓝相对残留率：糖尿病大鼠胃内美蓝相对残留率为（134.38 ± 21.25）%，而正常对照大鼠胃内美蓝残留率仅为（100.00 ± 16.46）%，明显低于糖尿病组（$P < 0.01$），说明糖尿病大鼠胃排空明显延迟。

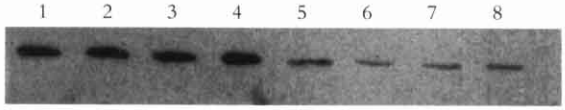
2.2 胃窦 Cajal 间质细胞超微结构

正常大鼠胃 Cajal 间质细胞的超微结构特点：该细胞主要分布于环行肌层与纵行肌层之间的肌间神经丛周围以及环肌细胞之间，并由许多的缝隙连接紧密连接在一起。沿细胞膜分布较多的胞膜小凹，基膜较完整，核大且多不规则，占细胞大部分，异染色质较多见，且沿核膜下分布，结构清晰，胞质较少，可见一个或多个突起，胞质和突起内细胞器丰富，线粒体非常丰富，常紧密排列在胞质里，可见到发达的粗面内质网、滑面内质网、高尔基体，有较多中间丝，无粗肌丝。

糖尿病时大鼠胃 Cajal 间质细胞超微结构变化特点：Cajal 间质细胞与其他的 Cajal 间质细胞、平滑肌和神经末梢之间的缝隙连接均显著减少，尚存的细胞间连接的结构也有破坏，结构不清，连接松散；细胞的基膜结构不完整，缺乏连续性，有的基膜与细胞膜分离，形成空洞；细胞内的细胞器数量明显少于正常 Cajal 间质细胞，如核糖体、线粒体等均显著减少，线粒体明显肿胀、空泡样变、髓鞘样改变甚至溶解，内质网扩张，粗面内质网脱颗粒；细胞内的胞质广泛溶解，有大量的胞质内空泡形成，空泡大多沿质膜分布；核周间隙增宽。

2.3 糖尿病大鼠胃窦 c-kit 蛋白的表达

Western blot 实验结果显示，正常大鼠胃窦平滑肌组织内有一定程度的 c-kit 蛋白表达，但在糖尿病大鼠的胃窦平滑肌组织内 c-kit 蛋白表达明显减少［861.95 ± 76.32）*vs*（476.39 ± 54.19），$P < 0.01$］（图 1）。



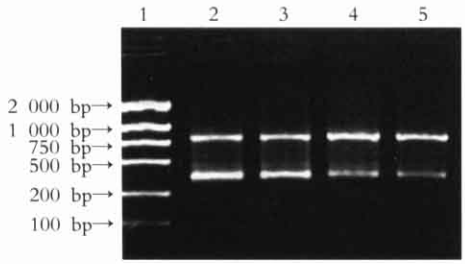
1～4：正常大鼠；5～8：糖尿病大鼠

图 1 胃窦 c-kit 蛋白表达

2.4 糖尿病大鼠胃窦 SCF mRNA 表达的检测

RNA 样品浓度为 1.5～6.9 μg/μl，$D(260)/D(280)$ 在 1.7～2.0，说明 RNA 提取质量合乎要求，可以用于 RT-PCR 实验。

正常大鼠胃窦平滑肌组织内有一定程度 SCF mRNA 表达，但在糖尿病大鼠的胃窦平滑肌组织内 SCF mRNA 的表达明显减少［(1.12 ± 0.1) *vs* (0.78 ± 0.06)，$P<0.01$］（图 2）。



1：标准；2、3：正常大鼠；4、5：糖尿病大鼠

图 2　胃窦平滑肌组织 SCF mRNA 表达

3　讨论

酪氨酸激酶受体（Kit）是 Cajal 间质细胞的膜受体之一，后者由 c-kit 原癌基因编码，其配体为 SCF。SCF-Kit 信号途径与 Cajal 间质细胞关系密切[4,5]。二个分子的 Kit 与二个分子的 SCF 结合形成二聚体后，细胞内的酪氨酸激酶被活化，从而导致酪氨酸的 Kit 自动磷酸化以及 Kit 与作用底物如 3-磷脂酰醇激酶（PI_3K）结合。信号通过不同途径导致 Cajal 间质细胞增生和分化，当编码 Kit 或 SCF 的基因位点发生突变、Kit 信号途径受损后，Cajal 间质细胞增生和分化受到影响。在 Ws/Ws 大鼠，由于 c-kit 基因的酪氨酸激酶区域有 12 个碱基对缺失，因此 Kit 激酶活性严重受损，胃肠道 Cajal 间质细胞明显减少[4]；小鼠编码 SCF 的 10 号染色体 steel（Sl）位点突变后，SCF 合成严重受损，仅能合成和分泌少量可溶性 SCF，Cajal 间质细胞变形、缺失；给刚出生的小鼠连续注射 kit 多克隆抗体 ACK_2 8 d 后小肠 Cajal 间质细胞几乎完全消失。本实验结果显示，在糖尿病大鼠胃窦中，c-kit 免疫反应阳性细胞明显减少，Cajal 间质细胞超微结构也发生了明显的变化：细胞间缝隙连接显著减少，尚存的细胞间连接的结构也有破坏，结构不清，连接松散；细胞的基膜结构不完整，缺乏连续性，有的基膜与细胞膜分离，形成空洞；细胞内的细胞器数量明显少于正常 Cajal 间质细胞，线粒体肿胀、空泡样变、髓鞘样改变甚至溶解，内质网扩张，粗面内质网脱颗粒；细胞内的胞质广泛溶解，有大量的胞质内空泡形成，空泡大多沿质膜分布；核周间隙增宽。

目前认为 Cajal 间质细胞与平滑肌细胞可能来源于相同的间叶细胞前体细胞，早期胚胎时，Cajal 间质细胞与平滑肌细胞的前体细胞都表达 kit，当 kit 表达下调而肌丝蛋白生成上调时，细胞分化为平滑肌细胞，当 kit 持续表达，细胞则分化为 Cajal 间质细胞细胞。在糖尿病大鼠中，当 kit 表达下调、SCF 分泌受抑时，Cajal 间质细胞是否会化生为平滑肌细胞有待进一步研究。

目前 Kit-SCF 系统作用于 Cajal 间质细胞时机及持续时间仍有较大争议[6]。Sean 认为 Kit 信号途径不仅对 Cajal 间质细胞发育相当重要，对成熟 Cajal 间质细胞形态及功能维持也相当重要，从细胞分化到成年 Cajal 间质细胞均依赖 Kit-SCF 信号途径。但 Tamas 等认为 Kit 信号途径是 Cajal 间质细胞胚胎发育所必需的，而对出生后 Cajal 间质细胞增生不重要。Young 的结论刚好相反，他发现当小鼠发生突变、kit 活性受抑后，出生后短时间内 Cajal 间质细胞分布与正常小鼠一致，成年后 Cajal 间质细胞排列明显破坏，认为 kit 在 Cajal 间质细胞胚胎发育过程中并不是必需的，而是出生后 Cajal 间质细胞增生所必需的。本研究中，大鼠糖尿病造模 3 个月后显示糖尿病大鼠胃窦 Cajal 间质细胞数量明显减少，超微结构也发生明显的改变，同时胃电节律失常明显增加，异常节律指数和慢波频率变异系数均明显高于正常对照组。糖尿病大鼠胃排空与正常大鼠比较明显延迟。c-kit 蛋白和 SCF mRNA 在糖尿病大鼠胃窦中表达明显低于正常大鼠，提示 SCF-Kit 信号途径对出生后 Cajal 间质细胞发育、形态及功能的维持也相当重要。在糖尿病大鼠胃窦中，正是由于 SCF-Kit 系统明显受损，从而导致 Cajal 间质细胞变性、数量减少以及网络结构破坏，以致出现胃电节律失常，继而使胃运动功能发生障碍。

参考文献：

[1] Piotrowska A P, Solari V, Puri P. Distribution of interstitial cells of Cajal in the internal anal sphincter of patients with internal anal sphincter achalasia and Hirschsprung disease[J]. Arch Pathol Lab Med, 2003, 127(9): 1192 - 1195.

[2] Sperelakis N, Daniel E E. Activation of intestinal smooth muscle cells by interstitial cells of Cajal in simulation studies[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2004, 286(2): G234 - G243.

[3] Kito Y, Suzuki H. Properties of pacemaker potentials recorded from myenteric interstitial cells of Cajal distributed in the mouse small intestine[J]. J Physiol, 2003, 553(Pt 3): 803 - 818.

[4] Mitsui R, Komuro T. Distribution and ultrastructure of interstitial cells of Cajal in the gastric antrum of wild-type and Ws/Ws rats[J]. Anat Embryol (Berl), 2003, 206(6): 453 - 460.

[5] Dickens E J, Edwards F R, Hirst G D. Selective knockout of intramuscular interstitial cells reveals their role in the generation of slow waves in mouse stomach[J]. J Physiol, 2001, 531(Pt 3): 827 - 833.

[6] Ward S M, Brennan M F, Jackson V M, *et al*. Role of PI3-kinase in the development of interstitial cells and pacemaking in murine gastrointestinal smooth muscle[J]. J Physiol, 1999, 516(Pt 3): 835 - 846.

（编辑　陈聪连）