文章编号:1000-5404(2007)01-0053-03

论著

胎鼠胃上皮细胞增殖、凋亡与胃形态发生的关系

林雪梅,汪维伟,李芳菲 (重庆医科大学基础医学院组织学与胚胎学教研室,基础医学研究所,重庆市生物化学与分子药理学重点实验室,重庆 400016)

提 要: 目的 研究胎鼠胃上皮细胞增殖、凋亡的时空规律及其与胃形态发生的关系。**方法** 每间隔0.5 d取E11~15.5 d小鼠整胎,横断连续切片,观察胃形态发生,体视学法测量胃贲门、幽门、大弯、小弯上皮分裂细胞密度(DMC)、凋亡小体密度(DAB)。**结果** ①E11.5 d胃开始发育,E12 d胃底膨出,胃大、小弯出现。②上皮细胞DMC峰值均在DAB峰值之前。③贲门处DMC无明显峰值,DAB峰值在E11.5、12.5、13.5 d;幽门处DMC峰值在E12.5 d,DAB峰值在E14 d;大弯DMC峰值在E11.5、12 d时,DAB值持续较低;小弯DMC峰值在E11.5 d,DAB峰值在E12.5 d。**结论** 胎鼠胃上皮细胞的增殖及凋亡与胃发生有密切的时空关系。

关键词: 胎鼠;胃;增殖;凋亡;形态发生
中图法分类号: Q954.48; Q954.58 **文献标识码**: A

Correlation of gastric morphogenesis with proliferation and apoptosis of gastric epithelium in embryonic mice

LIN Xue-mei, WANG Wei-wei, LI Fang-fei (Department of Histology and Embryology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: **Objective** To study the spatiotemporal distributions of epithelial proliferation and apoptosis, and the correlation of morphogenesis with them in developing stomach. **Methods** Serial sections of fetal mice aged 11 – 15.5 days were made. The morphogenesis of stomach was observed under light microscope. The density of mitotic cells (DMC) and apoptotic bodies (DAB) of epithelium in the developing cardia, pylorus, greater curvature, lesser curvature were measured with stereological method. **Results** The morphological development of stomach took place on the 11th day of mouse embryo development. The fundus, greater curvature and lesser curvature were observed on the 12th day. The peak value of DMC all appeared before the peak value of DAB. In the epithelium of cardia, no obvious peak value of DMC was observed and the peak value of DAB was on the 11.5th, 12.5th, 13.5th day. In the epithelium of pylorus, the peak value of DMC was on the 12.5th day, the peak value of DAB was on the 14th day. In the epithelium of greater curvature, the peak value of DMC was on the 11.5th and 12th day, the DAB value was low. In the epithelium of lesser curvature, the peak value of DMC was on the 11.5th day, the peak value of DAB was on the 12.5th day. **Conclusion** There was very close spatiotemporal relationship between the cell proliferation, cell apoptosis and the morphological development of stomach.

Key words: fetal mouse; stomach; proliferation; apoptosis; morphogenesis

由于涉及器官众多,又受复杂外环境的影响,长久以来,胚胎消化管的发生是一研究难点,迄今机制尚不清楚[1,2]。既往研究较多的是小肠,一般认为与其上皮细胞增殖及凋亡、肠壁平滑肌的限制作用、间充质及某些活性物质的诱导作用有关[3-5]。胚胎胃的发生,具有各部分不等速生长、形态变化等特点,推测其机制可能较为复杂,相关文献极少,其形态发生与上皮细胞的增殖和凋亡关系如何,亦少见报道。本研究拟通过对胎鼠胃上皮细胞增殖与凋亡的动态研究,初步探索胃形态发生机制,为后续研究调控因素及胃组织工程提供有价值的资料。

基金项目:重庆市教委课题(渝教科9916)
Supported by the Foundation of Chongqing Municipal Education of Committee (9916)
作者简介:林雪梅(1969-),女,重庆市人,博士研究生,讲师,主要从事组织工程与药理学方面的研究。电话:(023)68485087
通讯作者:汪维伟,电话:(023)68485087
收稿日期:2006-04-28;**修回日期**:2006-06-19

1 材料与方法

1.1 标本制备

健康成年未交配昆明小鼠共60只(重庆医科大学实验动物中心提供),体质量25~35 g,雌雄2∶1,每晚10:00合笼,次晨7:30检查雌鼠,发现阴栓者于该日中午12:00定为E0.5 d。分别于E11~15.5 d,每隔0.5 d断颈处死孕鼠,取出胚胎,每个胎龄选中间体质量的3只作标本。整胎Bouin液固定24 h,常规石蜡包埋,横断连续切片(7~8 μm),HE染色。

1.2 观察

光镜观察胃形态变化;并参照Hall等[6]的方法对贲门、幽门、大弯、小弯上皮作体视学观察。每间隔2张切片,在测微网格下测量其面积。油镜下以中、后期核分裂像计数分裂细胞数,计算分裂细胞密度(density of mitotic cells, DMC,即DMC=分裂细胞数/面积)。油镜下计数凋亡小体数,计算凋亡小体密度(density of apoptotic bodies, DAB,即DAB=凋亡小体数/面积)。每胎龄各计数20张切片。

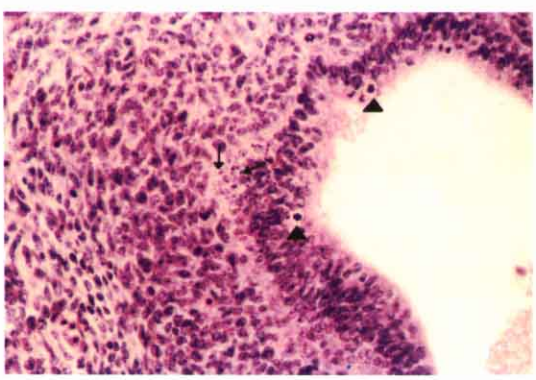
1.3 统计学处理

用SAS 8.0统计软件进行单因素方差分析及q检验。

2 结果

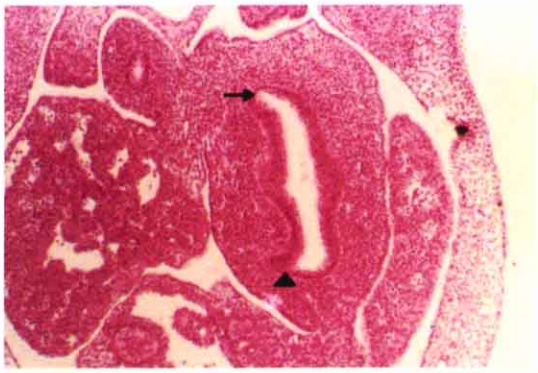
2.1 形态观察结果

在胃形态发生过程中,上皮内可见核分裂像及凋亡小体(图1)。E11 d,胃腔小而圆,直径稍大于食管及十二指肠,与后两者相连处管径较细。E11.5d,胃两侧壁膨出,上皮增厚,核分裂像多(图2)。E12 d,胃底膨出,胃大弯出现,上皮变薄,大弯及贲门处的核分裂像多,凋亡小体多见于小弯。E12.5 d时,胃底膨出更明显,连续切片追踪可见贲门处有突向右侧的盲囊(图3),核分裂像多分布于幽门,凋亡小体多见于贲门和小弯上皮(图1)。E13~13.5 d变化基本同E12 d,大弯侧上皮薄,小弯侧上皮厚,凋亡小体多。E14~14.5 d胃大弯更明显,上皮薄,小弯侧上皮厚,凋亡小体多。E15~15.5 d,胃大弯上皮2~3列柱状核,核分裂像多,未见凋亡小体。贲门上皮排列二至数层柱状核,有核分裂像、凋亡小体。幽门2~3层柱状核,核分裂像及凋亡小体多。



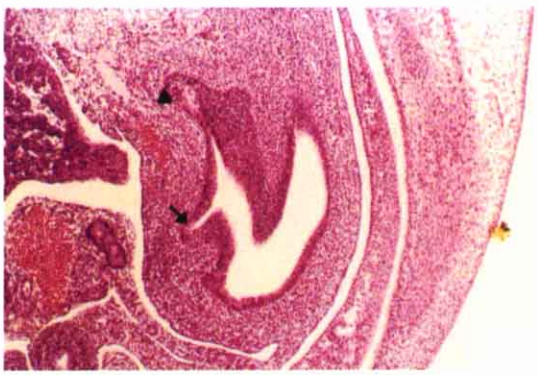
↓:凋亡小体;▲:核分裂像

图1 E12.5 d胎鼠胃贲门上皮的形态观察 (HE ×100)



→:胃与食管相连处;▲:胃与小肠相连处

图2 E11.5 d胎鼠胃的形态观察 (HE ×40)



▲:食管;↘:贲门处胃的盲囊

图3 E12.5 d胎鼠胃底更膨出 (HE ×40)

2.2 体视学观测统计结果

体视学法测得E11~15.5 d胃各部上皮DMC、DAB值。

正常胃发育中贲门、幽门、大弯、小弯4个部位上皮的DMC峰值均在DAB峰值之前。DMC和/或DAB最低值在E13~13.5 d。

贲门处DMC无明显峰值;DAB峰值在E12.5 d,与其余各天间差异有统计学意义($P<0.01$)。

幽门处DMC峰值在E12.5 d,DAB峰值在E14 d,与其余各天间差异均有统计学意义($P<0.01$)。E14.5~15.5 d的DAB值也较高,与其余各天间差异有统计学意义($P<0.05$)。

大弯DMC峰值在E11.5~12 d,与其余各天间差异有统计学意义($P<0.01$),E13 d最低。DAB值均较低。

小弯DMC值峰值在E11.5 d,DAB峰值在E12.5 d,与其余各天间差异均有统计学意义($P<0.01$)。

3 讨论

细胞增殖与凋亡是器官形态发生中的基本方式。胚胎胃发生中的形态变化,胃底及大弯外突、小弯侧内陷,与上皮细胞的增殖及凋亡有无时空相关性?为此,我们观察了胎鼠胃贲门、幽门、大弯、小弯上皮细胞的增殖、凋亡,并探讨其与形态发生的关系。

本实验沿用 Hall 等[6]方法识别和计数胎鼠胃上皮的凋亡小体。在相关研究中，我们采用部分石蜡切片脱蜡复水后以 TUNEL 法标记凋亡细胞，证实其与 HE 染色切片中凋亡小体的分布一致[5]，凋亡相关蛋白 bcl-2、bax 的表达也与凋亡小体密度值的变化相吻合[7]。故光镜下计数消化管上皮内的凋亡小体，可在一定程度上反映上皮内细胞凋亡的情况，且较易定位和定量。

本实验观察到胎鼠胃形态发生中的主要变化是大、小弯的形成。E11 d，胃为细长圆柱形，E11.5 d，胃两侧壁开始膨出，E12 d，胃底膨出，胃大、小弯出现，E12.5 d 时，胃底膨出更明显，胃大弯较明显，小弯侧内陷，E13 ~ 15.5 d 胃大弯进一步向外膨出，小弯明显。整个观测时段贲门、幽门处变化较小。

体视学结果提示上述胃形态发生与其上皮细胞增殖及凋亡有密切的时空关系。

大、小弯 DMC 峰值均在 E11.5 ~ 12 d，与胃整个体积的增大有关。大弯侧 DMC 值持续高水平，DAB 值持续低水平；小弯侧 DMC 值持续低水平，DAB 值持续高水平，表明大弯侧以上皮细胞增殖为主，这与该时段大弯侧外突，上皮表面积的扩大相一致；小弯侧以上皮细胞凋亡为主，在胃的整体生长中，仍保持表面积不扩大，适应胃小弯的形成。

同时，贲门处 DMC 值普遍较低，无明显峰值，而 DAB 值出现多个高峰，表明贲门处以凋亡趋势为主，推测可能与贲门处扩大，或为相临部位延伸起开拓空间的作用有关。幽门处 DMC、DAB 峰值出现较其他 3 个部位晚，与既往测得十二指肠近幽门段 DMC、DAB 峰值时间较吻合[5]，可能与十二指肠的发生稍晚有关。

本实验还显示上述 4 个部位 DMC 峰值均在 DAB 峰值之前，表明上皮细胞增殖是凋亡的基础。有意思的是，在 E13 ~ 13.5 d 时，4 个部位上皮细胞的 DMC 和/或 DAB 均最低，此后 DMC 值有回升，DAB 值增加明显，同时除胃大弯外，多个 DAB 值均明显高于相同时段与部位的 DMC 值，表明胎胃发生似乎也具有其他器官发生所有的“雏形期”与“完善期”，E13 ~ 13.5 d 正是其分水岭。此后随着胃体积增大，虽仍然需要一定数量的细胞增殖，但更为突出的是胎胃将进入结构的精细调整阶段，细胞凋亡在此“塑形”过程中发挥重要作用[8]。例如胃大、小弯在原有细胞增殖的基础上通过细胞凋亡的参与，以适应形态发生的需要。

参考文献：

[1] Sreedharan R, Mehta D I. Gastrointestinal tract[J]. Pediatrics, 2004, 113(4 Suppl): 1044 - 1050.

[2] Hiramatsu H, Yasugi S. Molecular analysis of the determination of developmental fate in the small intestinal epithelium in the chicken embryo[J]. Int J Dev Biol, 2004, 48(10): 1141 - 1148.

[3] Jaklevic B, Su T T. Cell turnover: flexible coupling meets the needs of development[J]. Curr Biol, 2003, 13(20): R805 - R807.

[4] Matsumoto A, Hashimoto K, Yoshioka T, *et al*. Occlusion and subsequent re-canalization in early duodenal development of human embryos: integrated organogenesis and histogenesis through a possible epithelial-mesenchymal interaction[J]. Anat Embryol (Berl), 2002, 205(1): 53 - 65.

[5] 汪维伟，曾小川. 小鼠胚胎食管和肠上皮的体视学研究[J]. 解剖学报，2000，31(1)：73 - 76.

[6] Hall P A, Coates P J, Ansari B, *et al*. Regulation of cell number in the mammalian gastrointestinal tract: the importance of apoptosis[J]. J Cell Sci, 1994, 107(Pt 12): 3569 - 3577.

[7] 林雪梅，李　均，汪维伟. 小鼠胚胎胃发育中细胞凋亡及凋亡相关蛋白的表达[J]. 重庆医科大学学报，2006，31(2)：200 - 203.

[8] 高福莲，岳保红，马开颜，等. 胃上皮永生细胞、胃腺癌细胞和胃腺癌淋巴结转移细胞多耐药基因 1 和 P-糖蛋白的表达[J]. 郑州大学学报：医学版，2006，41(3)：514 - 517.

（编辑　陈聪连）

关于医学符号的使用

统计学符号不论用哪种字母，也不论大写或小写一律都用斜体。要注意区分拉丁字母和希腊字母。例如均数的符号是字母 x，卡方的符号是希腊字母 χ^2，自由度的符号是希腊文“υ”，不是拉丁文“V”。样本的相关系数是英文“r”，不能误为希腊文“γ”。

化学元素及核素在医学写作时一般多采用符号，都是拉丁字母正体大写。离子态是在右上角用数字加“-”或“+”表示。例如 Na^+、Ca^{2+}、P^{3-} 等等，不采用 Ca^{++}、P^{---}、Al^{+3}、O^{-2} 表示。核素的核子素（质量数）应写在元素符号的左上角，例如：^{131}I、^{32}P。表示激发状态的 m 写在右上角，例如：$^{99}Tc^{m}$、$^{113}In^{m}$。在科技论文和专著中不应写核素的中文名称，即不能写成^{131}碘、铟^{113m}、^{32}P、^{99m}Tc。

近几年分子生物学发展很快，并已渗透到许多学科，大多数分子生物学名词术语的符号已有统一的确定形式，要对符号的来源及其内涵有深刻的了解，使用时不致发生错误，例如：RNA 有 rRNA（ribosomal RNA）、tRNA（transfer RNA）、mRNA（messenger RNA）3 类。r、t、m 是表示类型的符号应小写，RNA 应大写。

本刊编辑部