文章编号:1000-5404(2010)05-0409-05

论著

# HCN2阳性细胞在小鼠胃肠道肌间神经丛内的分布

熊承杰,梅 峰,韩 鹃,田衍平,江忠勇,周德山 (400038 重庆,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)

**[摘要]** **目的** 探讨超级化激活环核苷酸调控的阳离子通道(hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel 2,HCN2)阳性细胞在小鼠胃肠道肌间神经丛的分布。**方法** 成年昆明小鼠的胃肠道,包括胃、小肠、结肠,制作全层铺片,免疫细胞化学染色HCN2阳性细胞、胆碱能神经及Cajal间质细胞(interstitial cells of Cajal, ICCs)。**结果** 成年小鼠胃肠道肌间神经丛的HCN2阳性细胞成簇紧密排列,多数阳性细胞为Dogiel Ⅱ型神经元,阳性产物分布在细胞质和细胞膜,每个神经节内可见数个至数十个阳性细胞;神经突起虽可见HCN2阳性产物,但主要存在于较粗的突起。HCN2阳性神经元分布密度在胃肠道各段存在较大差异($P<0.05$):以结肠密度最高,胃次之,小肠略低。利用胆碱能神经元标志物胆碱乙酰转移酶(ChAT)和ICCs的标志物(c-kit蛋白)分别与HCN2通道进行双重免疫染色,可见HCN2存在于胆碱能神经元,未见HCN2存在于ICCs的胞体,ICCs的突起与HCN2阳性神经元距离很近。**结论** HCN2离子通道广泛表达于肌间神经丛,主要表达于胆碱能神经元,可能参与该神经元调控胃肠神经活动、神经递质的释放以及胃肠功能的调节。

**[关键词]** HCN2;肠肌丛;胆碱能神经;Cajal间质细胞;c-kit;小鼠
**[中图法分类号]** R322.4; R322.85; R329.24 **[文献标志码]** A

# Distribution of HCN2-immunoreactive cells in myenteric nerve plexus of mouse digestive tract

Xiong Chengjie, Mei Feng, Han Juan, Tian Yanping, Jiang Zhongyong, Zhou Deshan (Department of Histology and Embryology, College of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the distribution of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel 2-positive cells (HCN2), in the myenteric nerve plexus of gastrointestinal tract of mice. **Methods** Gastrointestinal tract samples, which included the stomach, small intestine and colon, from mature Kunming mice were collected for the preparation of whole-mount preparations, and then examined by immunocytochemistry for HCN2, cholinergic nerves and interstitial cells of Cajal (ICCs) with fluorescence microscopy and laser confocal microscopy. The markers of cholinergic nerves (ChAT) and ICCs (c-kit) were used to double-immunostaining with HCN2 channel. **Results** Most of HCN2-positive cells within the myenteric plexus of mature mice were Dogiel Ⅱ type-neurons and positive products occurred on the cell membranes and cytoplasm. They often gathered in cluster in the ganglia, which contained several to dozens of IR cells for HCN2. IR products were seen on nervous process, but majority occurred on those which were thicker. The density of distribution for HCN2-positive cells in the gastrointestinal tract was different: that of the colon was highest ($P<0.05$), that of the stomach was lower than that of the colon ($P<0.05$), and that of the small intestine was lowest ($P<0.05$). HCN2 channel were found in the cholinergic nerves, although HCN2 channel not found in the soma of ICCs. The processes of ICCs were close to the HCN2-positive cells. **Conclusion** HCN2 channels are widely distributed in the myenteric nerve plexus, and primary expressed in the cholinergic nerves. HCN2 channels maybe involved in its regulation of gastrointestinal neural electrical activity, release of neurotransmitter and regulation of gastrointestinal function.

**[Key words]** hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel 2; myenteric plexus; cholinergic nerves; interstitial cells of Cajal; c-kit; mice

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30871310,30971349). Corresponding author: Zhou Deshan, Tel: 86-10-83911449, E-mail: zhoudeshan2008@163.com

超级化激活环核苷酸调控的阳离子通道(hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel, HCN)表达于心脏、中枢神经系统、视网膜和背根神经

**[基金项目]** 国家自然科学基金(30871310,30971349)
**[通信作者]** 周德山,电话:(010)83911449,E-mail:zhoudeshan2008@163.com

节[1]等。根据不同的电生理学特性,如通道被激活的速度、电压依赖性以及受 cAMP 的调控程度等,HCN 可以被分为4个亚型(HCN1~HCN4),各亚型的表达部位不完全相同[1]。HCN 通道为四聚体结构,可由同种亚型组成,也可以由不同亚型组成,两种结构的电生理学特性存在显著差异,如电压依赖性及对 cAMP 的反应程度等[2]。HCN 通道参与机体许多重要生理功能的调节,如维持心脏自主节律的起搏活动,调节神经元的功能活动,参与突触递质释放等神经信号传递调控[1]。与其他类型的离子通道相比,HCN 可被超级化激活、胞内环核苷酸调控[1]。HCN 通道允许 $K^+$ 和 $Na^+$ 以及少量的 $Ca^{2+}$ 通过,可被 $Cs^{2+}$ 和一些阻断剂,如 ZD7288 阻断。有报道[3] HCN2 通道亦存在于小肠的肌间神经丛,但在胃肠道的分布规律和功能意义尚不清楚。

胆碱能神经元是一种兴奋性的运动神经元,广泛分布于肌间神经丛,能表达分泌多种化学物质并且功能多样[4,5]。HCN2 表达于 Dogiel Ⅱ型神经元,但具体表达于何种功能的神经元尚不清楚。本实验通过阐明 HCN2 通道及胆碱能神经元在胃肠道肌间神经丛内的分布特点,为深入理解和研究 HCN2 离子通道在胃肠生理功能中的作用提供形态学基础。另外,ICCs 是胃肠自主节律性运动的起搏细胞和兴奋传导细胞[6],HCN2 被证明参与小鼠心脏的自主起搏活动[7]。鉴于此,HCN2 是否与胃肠自主节律运动的起搏有关也是一个非常有趣的科学问题。本实验对 HCN2 通道及 ICCs 在胃肠道肌间神经丛内的分布规律进行了研究,为探讨 ICCs 在胃肠道起搏的机制提供实验基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料及标本制备

45~55 d 昆明小鼠(本校实验动物中心),2~3 月龄,体质量 18~26 g,雌雄不限。27 只断颈处死,无菌下开腹,将整个消化管取出,置于预冷的磷酸盐缓冲液(PBS)中。经 PBS 反复冲洗去除内容物后,100% 丙酮充盈固定 12 h(4 ℃)。将胃分为胃底、胃体、幽门部;小肠分为十二指肠、空肠、回肠;结肠分为升结肠、横结肠、降结肠。解剖显微镜下分别制作肌间神经丛附着的纵肌全层铺片和黏膜下层含黏膜下神经节的全层铺片后,按间接法进行免疫细胞化学法染色。

### 1.2 试剂

兔抗 HCN2 抗体、HCN2 对照抗原(Alomone 公司),鼠抗 c-kit 抗体、羊抗兔 IgG HRP 酶标抗体、兔抗小鼠 CY3 抗体(DAKO 公司),山羊抗 ChAT 抗体、驴抗兔 CY3 抗体、驴抗兔 FITC 抗体、驴抗山羊 FITC 抗体(Chemicon 公司),稀释比例均为1∶100。S-P 试剂盒(北京中杉金桥公司)。

### 1.3 免疫细胞化学染色

根据解剖学部位,分为胃底、胃体、胃窦、十二指肠、空肠、回肠、升结肠、横结肠、降结肠9个实验组,全层铺片经含 0.5% Triton 的 0.01 mol/L PBS 漂洗后,0.3% $H_2O_2$ 甲醇封闭内源性过氧化物酶20 min(25 ℃),1% BSA 孵育 30 min, HCN2 多克隆抗体孵育 48 h(4 ℃),PBS 漂洗后,HRP 酶标羊抗兔 IgG 抗体孵育 45 min(25 ℃),PBS 漂洗后,0.5% $H_2O$ DAB Tris 缓冲液显色,镜下观察,适时终止反应,终产物为棕黄色。对照实验:预先用 HCN2 对照抗原吸收—抗后代替一抗,孵育,结果为阴性。

免疫荧光法:标本处理同上,铺片经 PBS 漂洗后,1% BSA 孵育 30 min,直接 HCN2 多克隆抗体孵育 24 h(4 ℃),但二抗为驴抗兔 CY3 荧光抗体(1 h,25 ℃),PBS 重复漂洗,DAPI 复染,荧光显微镜下观察。对照实验同免疫酶标染色。免疫双标法:铺片先进行 HCN2 染色,PBS 重复漂洗后,加入一抗(山羊抗 ChAT 抗体)24 ℃ 24 h,二抗(驴抗山羊 FITC 抗体),荧光显微镜和激光共聚焦显微镜下分别用不同的激发波长(FITC 和 CY3 分别为 490、543 nm)观察;铺片先进行 ICCs 染色,PBS 反复漂洗后,加入一抗(兔抗 HCN2 抗体)24 ℃ 24 h ,二抗(驴抗兔 FITC 抗体),荧光显微镜和激光共聚焦显微镜下分别用不同的激发波长观察。

### 1.4 半定量分析及统计学处理

每部位选取 HCN2 细胞化学染色铺片各 2~3 张,100 倍视野下,根据体视学的原理,在每张铺片上随机选取 9 个视野,分别用 Image Pro Plus 5.1 软件进行测量,以 HCN2 阳性细胞数与铺片面积比为变量,采用 SPSS 12.0 统计软件进行单因素方差分析。

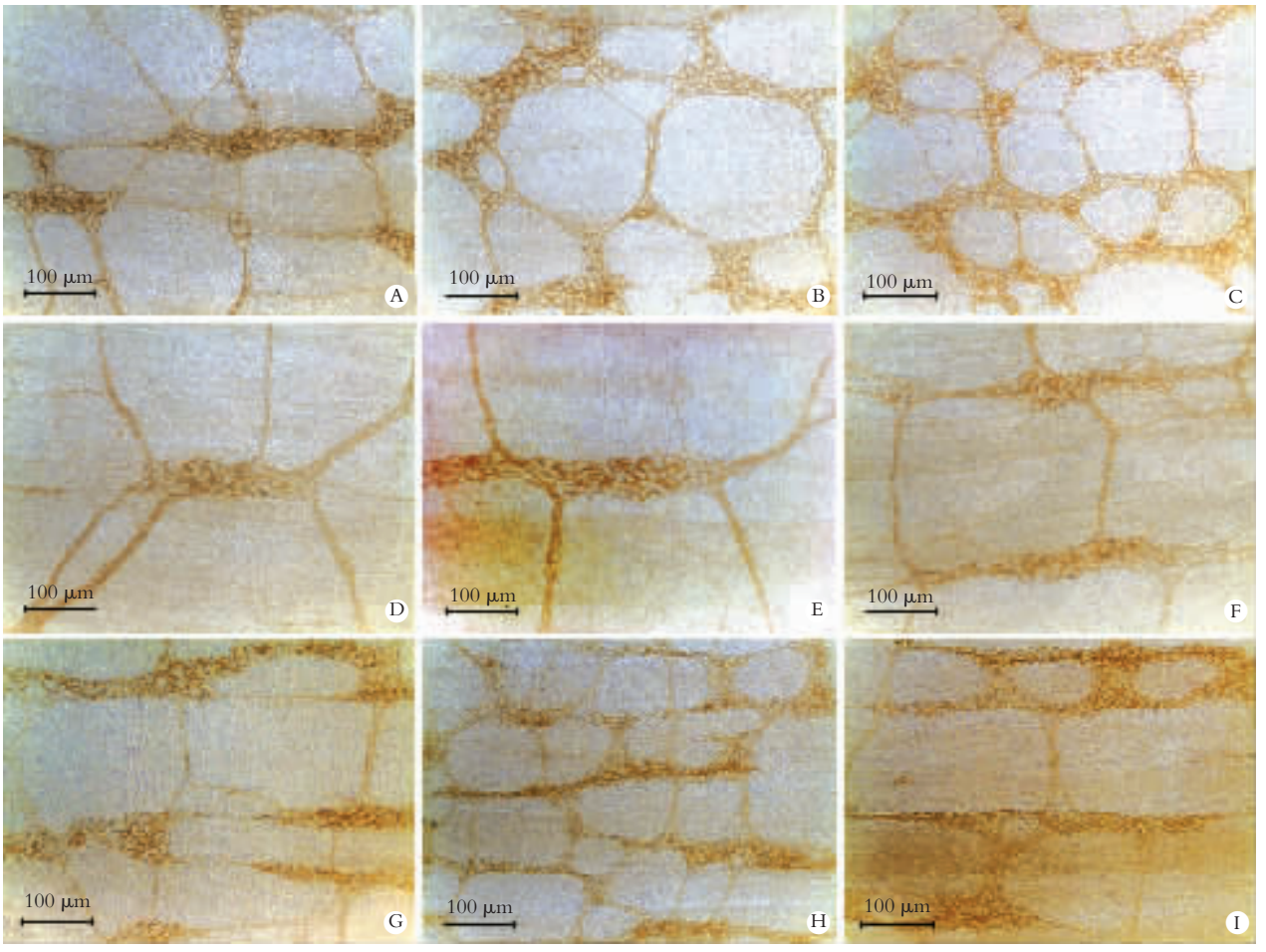
## 2 结果

### 2.1 HCN2 阳性神经为 Dogiel Ⅱ型神经元

HCN2 多克隆抗体的间接免疫酶标化学染色反应产物为棕黄色。全层铺片可见胃肠道 HCN2 阳性产物反应较强,主要位于细胞质和细胞膜,细胞核未着色,阳性细胞轮廓清晰,神经突起着色不明显。阳性细胞直径大小不等,数量从数个至数十个,甚至上百个位于同一神经节内,连接于神经节之间的节间束也为 HCN2 染色阳性,偶见少数 HCN2 染色阳性细胞位于节间束内(图1)。胃内 HCN2 阳性细胞较小,突起不明显,细胞膜着阳性,未见细胞质着色。小肠内 HCN2 阳性细胞较大,一部分细胞质、细胞膜均阳性,另一部分细胞仅细胞膜阳性,形状为圆形或者卵圆形,轴突细长,树突不明显,多为 Dogiel Ⅱ型神经元。结肠内 HCN2 阳性细胞形态与小肠内 HCN2 阳性细胞相似,较小肠内细胞小(图1)。

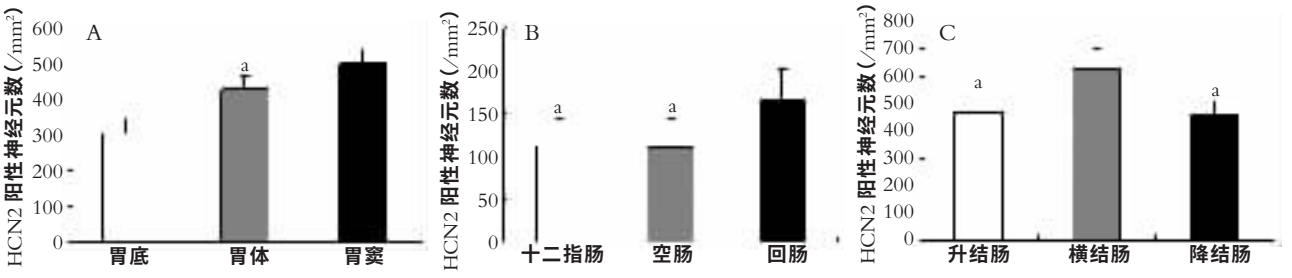
### 2.2 HCN2 阳性神经在小鼠胃肠道壁内的分布规律

胃内的 HCN2 阳性神经节数量较多,面积较小,多个神经节间界限常不清,形状不规则,节间神经突起较短较多,神经网络致密,网状分布,节内细胞胞体较小,数量较多,排列致密;小肠内 HCN2 阳性神经节数量少,只有 1~2 个神经节/$mm^2$,面积大,呈长梭形分布,节间神经突起较长较少,神经网络稀疏,节内细胞胞体较大,数量较少,排列致密;结肠内的 HCN2 阳性神经节数量较多,面积较小,多个神经节之间界限不清,呈长梭形,多沿平滑肌束呈平行排列,节间神经突起丰富,神经网络致密,节内细胞胞体较小,数量较多(图1)。统计结果显示,从胃底到胃窦,HCN2 阳性神经元增加;回肠的 HCN2 阳性神经元数最多,与十二指肠、空肠比较,有显著差异($P<0.05$),十二指肠与空肠比较,差异不显著($P>0.05$);横结肠的 HCN2 阳性神经元数最多($P<0.05$),升结肠和降结肠阳性神经元数相差不明显($P>0.05$)。见图2。在盲肠也发现了 HCN2 阳性神经元。




A:胃底;B:胃体;C:胃窦;D:十二指肠;E:空肠;F:回肠;G:升结肠;H:横结肠;I:降结肠

**图1 HCN2阳性神经在小鼠胃肠道各段的分布** (S-P)




A:胃内 a:$P<0.05$,与胃底和胃窦比较;B:小肠内 a:$P<0.05$,与回肠比较;C:结肠内 a:$P<0.05$,与横结肠比较

**图2 HCN2阳性神经元在胃肠道肌间神经丛的分布规律**

## 2.3 肌间神经丛内胆碱能神经的分布模式

ChAT显色结果显示:胆碱能阳性神经广泛分布于整个消化道的肌间神经丛中,构成神经节、节间束及神经纤维纵横交织成网(图3)。胆碱能阳性神经元轮廓较为清晰,形状为圆形或者卵圆形,轴突细长,树突不明显,多为Dogiel Ⅱ型神经元;细胞质着色,细胞核未观察到着色,数十个胆碱能阳性神经元成簇分布在神经节中,数个胆碱能阳性神经元散在分布在节间束上。

## 2.4 HCN2阳性神经与胆碱能神经免疫荧光双标观察

HCN2阳性神经与胆碱能神经免疫荧光双标的结果显示:HCN2阳性神经和胆碱能神经多为Dogiel Ⅱ型神经元。HCN2阳性神经元与胆碱能神经元的细胞质、细胞膜及突起均重合,HCN2阳性神经节间的突起和胆碱能神经的突起也重合(图4)。

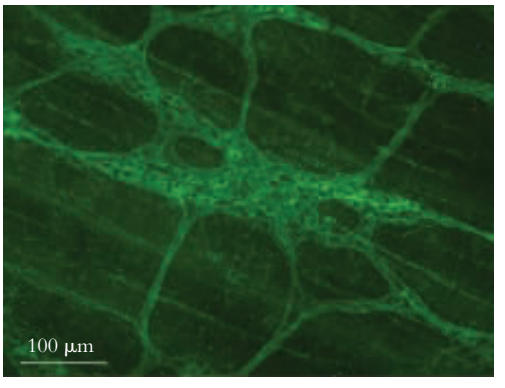
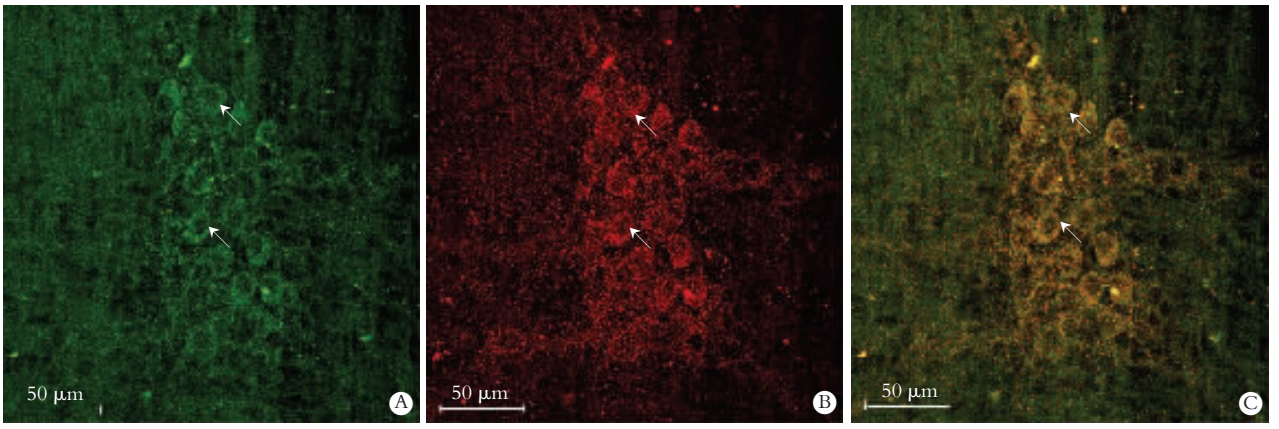


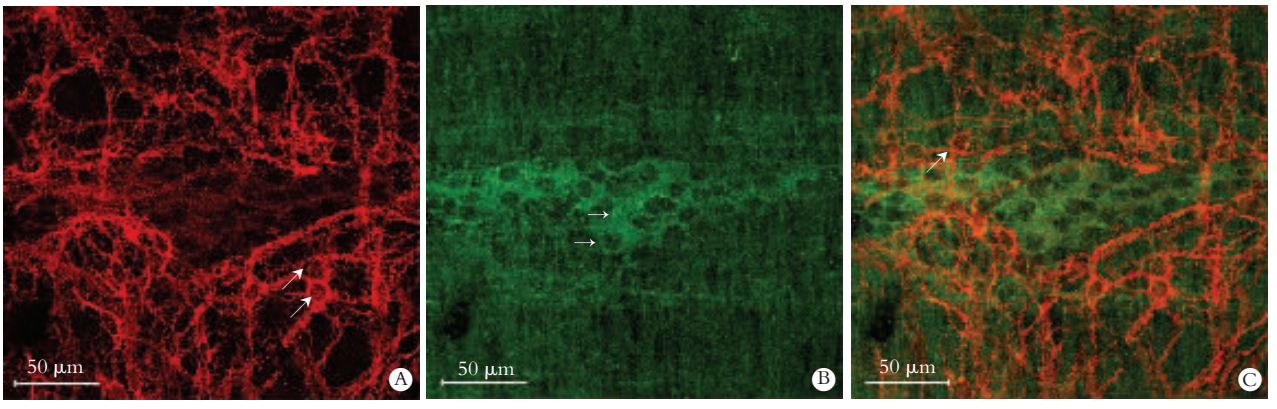

**图3 免疫荧光显微镜下观察横结肠肌间神经丛内胆碱能神经分布**




↑:双标的细胞质和神经突起

A:胆碱能神经;B:HCN2 阳性神经;C:胆碱能神经和 HCN2 阳性神经的双标

**图4 激光共聚焦显微镜下观察胆碱能神经和 HCN2 阳性神经双标结果**




A:ICCs ↑:ICCs 的胞体和突起;B:HCN2 阳性神经 ↑:HCN2 阳性神经元的细胞质和突起;C:ICCs 与 HCN2 阳性神经的双标

↑:ICCs 的突起与 HCN2 阳性神经元距离很近

**图5 激光共聚焦显微镜下观察 ICCs 与 HCN2 阳性神经双标结果**

### 2.5 HCN2 阳性神经与 ICCs 免疫荧光双标观察

HCN2 阳性神经与 ICCs 免疫荧光双标的结果显示:全层铺片可见 c-kit 阳性的 ICCs 为梭形或卵圆形,细胞质较少且着色浅,有 2~3 个细长的突起,突起间形成完整的独立的细胞网络(图 5A)。HCN2 阳性神经元(图 5B)聚集形成神经节,与 ICCs 各自形成完整的细胞网络,未见两者胞体有共存现象, ICCs 的突起与 HCN2 阳性神经元距离很近(图 5C)。

## 3 讨论

HCN 是一种特殊类型的阳离子通道,由超极化激活,环核苷酸调控。在神经系统,活化后的 HCN 通道通过进出的阳离子改变神经元的兴奋性,调节神经递质的释放,影响神经元的可塑性和神经网络的发育成熟。在中枢神经系统,HCN 与睡眠、醒觉等生理功能密切相关,HCN 功能失常与癫痫、神经性疼痛、窦性心动过缓等疾病的发生、发展有关[8,9]。据报道[3] HCN2 离子通道存在于胃肠神经系统,但国内外仍缺乏对其在胃肠道的分布模式和特点的详细研究。

本实验通过免疫细胞化学方法结合激光共聚焦显微镜观察,可见 HCN2 阳性产物存在于胃肠神经细胞质和细胞膜,轮廓清晰,神经突起少,多数为 Dogiel Ⅱ型神经元,广泛地分布于胃肠道肌间神经丛,分布趋势为结肠内神经元的密度最多,胃次之,小肠略少,与国内外的研究结果[10,11]相似。HCN2 阳性神经元密度的变化与该处神经元的功能相适应;神经元的密度越高,HCN2 通道表达量也相应的增加,因为 HCN 通道具有高度的功能可塑性,以适应胃肠神经元的功能变化。

HCN2 通道参与胃肠内 AH 神经的放电,提高胃肠神经的兴奋性[3,12],促进胃肠神经的活动,加速各种神经信息的整合与传导[13]。虽然本实验中未见 ICCs 的胞体与 HCN2 神经元共标,ICCs 与 HCN2 阳性神经各自形成独立的网络,但 ICCs 的突起与 HCN2 距离很近。ICCs 作为胃肠道的起搏细胞,它与神经元和平滑肌细胞关系密切且对胃肠道的运动功能进行调控。

ICCs的突起与HCN2阳性神经元距离很近,HCN2阳性神经元可能通过ICCs的突起对ICCs的电活动进行调控[14],或者将神经元的信息通过ICCs传递给胃肠道的平滑肌细胞。

胃内的电慢波起源于胃体部分,由平滑肌向远端和周围方向传播,传导速度由胃体到胃窦逐渐增加,远端胃电活动较活跃;近端结肠的电活动频率较低,到横结肠后频率升高,结肠末端又降低[15]。胃和结肠的电活动频率的变化与肌间神经丛内HCN2阳性细胞数量的变化一致,而HCN2通道参与了神经元的电活动,加速了神经信息的传导,可能影响到胃和结肠电慢波以及神经电活动,造成了胃和结肠电活动频率截断性的改变。然而,小肠不同于胃和结肠电活动,其基本电节率由十二指肠到回肠逐渐降低。虽然胃和十二指肠的基本电节律都单独产生,但是频率较低的胃电活动可以与频率较高的十二指肠电活动相混叠,造成近端小肠电频率较高;有研究[15]也曾用振荡理论来解释小肠慢波频率呈阶梯式下降的现象。这些原因可能抵消了HCN2阳性细胞数量的增加对小肠电活动的影响,具体机制还有待进一步研究。

我们进一步使用ChAT对胆碱能神经进行标记,研究HCN2阳性神经元与胆碱能神经的关系,发现双标结果显示两者高度重合。由于胆碱能神经是胃肠道的一种重要的神经,分化出多种功能,包括中间神经、内在感觉神经和支配平滑肌收缩的兴奋性运动神经;根据表达钙结合蛋白种类的不同,胆碱能神经被分为表达钙视网膜蛋白(calretinin)和钙结合蛋白(calbindin)的两种类型[5]。Xiao等[3]发现钙视网膜蛋白阳性神经在远端结肠全部表达HCN2,然而只有33%的HCN2阳性神经表达钙视网膜蛋白,证实了HCN2在部分胆碱能神经的表达。HCN通道的功能可塑性可能是胆碱能神经功能多样性的分子基础。另外,HCN2通道位于这些神经的轴突终末,还可能调节胆碱能神经递质的释放。

新近研究[8]显示HCN通道对于神经元的发育和神经网络的建立至关重要。神经网络成熟的过程需要发育中的神经元不断调节自身的特性以及它们的放电行为来适应不断变化的神经元微环境,HCN通道的功能可塑性尤其适合这个过程。在中枢神经系统,由不成熟阶段的神经网络发育到成熟阶断的神经网络伴随着HCN表达量的变化。HCN与神经功能的建立、神经网络的形成以及神经元的兴奋性密切相关,我们认为HCN2在胃肠道的生理、病理过程中发挥重要了作用。

## 参考文献:

[1] Craven K B, Zagotta W N. CNG and HCN channels: two peas, one pod[J]. Annu Rev Physiol, 2006, 68: 375-401.

[2] Chen S, Wang J, Siegelbaum S A. Properties of hyperpolarization-activated pacemaker current defined by coassembly of HCN1 and HCN2 subunits and basal modulation by cyclic nucleotide[J]. J Gen Physiol, 2001, 117(5): 491-504.

[3] Xiao J, Nguyen T V, Ngui K, *et al*. Molecular and functional analysis of hyperpolarisation-activated nucleotide-gated (HCN) channels in the enteric nervous system[J]. Neuroscience, 2004, 129(3): 603-614.

[4] Steele P A, Brookes S J, Costa M. Immunohistochemical identification of cholinergic neurons in the myenteric plexus of guinea-pig small intestine[J]. Neuroscience, 1991, 45(1): 227-239.

[5] Phillips R J, Powley T L. Innervation of the gastrointestinal tract: patterns of aging[J]. Auton Neurosci, 2007, 136(1/2): 1-19.

[6] 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.

[7] Biel M, Schneider A, Wahl C. Cardiac HCN channels: structure, function and modulation[J]. Trends Cardiovasc Med, 2002, 12(5): 206-212.

[8] Bender R A, Baram T Z. Hyperpolarization activated cyclic-nucleotide gated (HCN) channels in developing neuronal networks[J]. Prog Neurobiol, 2008, 86(3): 129-140.

[9] Biel M, Wahl-Schott C, Michalakis S, *et al*. Hyperpolarization-activated cation channels: from genes to function[J]. Physiol Rev, 2009, 89(3): 847-885.

[10] Karaosmanoglu T, Aygun B, Wade P R, *et al*. Regional differences in the number of neurons in the myenteric plexus of the guinea pig small intestine and colon: an evaluation of markers used to count neurons[J]. Anat Rec, 1996, 224(4): 470-480.

[11] 安书成, 徐畅, 徐金会, 等. NOS在棕色田鼠胃肠道各段肌间神经丛分布的比较[J]. 中国神经科学杂志, 2003, 19(5): 313-317.

[12] Linden D R, Sharkey K A, Mawe G M. Enhanced excitability of myenteric AH neurones in the inflamed guinea-pig distal colon[J]. J Physiol, 2003, 547(Pt 2): 589-601.

[13] Mawe G M, Strong D S, Sharkey K A. Plasticity of enteric nerve functions in the inflamed postinflamed gut[J]. Neurogastroenterol Motil, 2009, 21(5): 481-491.

[14] 丁砺鑫, 王永权, 方强, 等. 大鼠不稳定膀胱中ICCs细胞中HCN蛋白表达的变化[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(7): 578-581.

[15] 马德胜, 周斌, 付博, 等. 胃肠运动与临床[M]. 北京: 军事医学科学出版社, 2006: 32-55.

(**收稿**:2009-08-03;**修回**:2009-09-07)

(编辑 龙 亮)