论著

文章编号:1000-5404(2011)10-1020-04

重型颅脑损伤对小鼠小肠平滑肌自主节律运动和Cajal间质细胞的影响

张丽梅[1],朱京慈[1],梅 峰[2],方 欢[1] (400038 重庆,第三军医大学:护理学院基础护理学教研室[1],基础医学部组织学与胚胎学教研室[2])

【摘要】 **目的** 通过观察重型颅脑损伤(severe head injury, SHI)后小鼠离体小肠平滑肌自主节律运动和小肠肠肌丛Cajal间质细胞(interstitial cells of cajal, ICC)数量及功能的变化,探讨重型颅脑损伤后肠动力障碍的可能机制。**方法** 选取36只6~8周龄清洁级健康雄性昆明小鼠,体质量(35±5)g。重型颅脑损伤组($n=18$)参照Feeney自由落体法制作小鼠SHI模型,假伤对照组($n=18$)只开颅骨不致颅脑伤。于伤后1、3、7 d取材检测离体末端回肠平滑肌肌条运动的模式、幅度、频率及末端回肠ICC数量变化。**结果** ①SHI后平滑肌自主节律运动的幅度1 d[(0.16±0.04)g *vs* (0.31±0.05)g]、3 d[(0.16±0.04)g *vs* (0.23±0.06)g]、7 d[(0.22±0.07)g *vs* (0.27±0.05)g]均显著低于假伤对照组($P<0.05$);平滑肌自主节律运动的频率1 d[(30.23±3.71)min^{-1} *vs* (34.55±1.99)min^{-1}]、7 d[(30.34±4.56)min^{-1} *vs* (33.10±0.81)min^{-1}]显著低于假伤对照组($P<0.05$),2组3 d时差异无统计学意义[(31.46±4.64)min^{-1} *vs* (33.39±2.17)min^{-1}, $P>0.05$];肌条运动模式紊乱、不规律。②SHI后各时相点ICC细胞数量较假伤对照组显著减少[1 d:(189±41)/mm^2 *vs* (303±10)/mm^2;3 d:(156±39)/mm^2 *vs* (305±9)/mm^2;7 d:(215±28)/mm^2 *vs* (325±42)/mm^2;$P<0.05$],网络明显受损变稀薄。**结论** 小鼠SHI后存在严重的小肠ICC受损,平滑肌自主节律运动紊乱,从而导致胃肠动力障碍的发生。

【关键词】 重型颅脑损伤;自主节律运动;Cajal间质细胞
【中图法分类号】 R651.15;R333.3;R363.27 【文献标志码】 A

Influence of severe head injury on spontaneous rhythmic contraction of small intestinal smooth muscle and interstitial cells of Cajal in mice

Zhang Limei[1], Zhu Jingci[1], Mei Feng[2], Fang Huan[1] ([1]Department of Basic Nursing, School of Nursing, [2]Department of Histology and Embryology, College of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

【**Abstract**】 **Objective** To observe the spontaneous rhythmic contraction of *in vitro* small intestinal smooth muscle and the number and function change of interstitial cells of Cajal (ICCs) in mice after severe head injury (SHI), and to study the possible mechanism of intestinal motility disturbance (IMD) induced by SHI. **Methods** Thirty-six 6- to 8-week-old clean healthy male Kunming mice with body weight 35±5 g were randomly and evenly divided into an SHI group (which underwent an operation using the modified Feeney's method) and a control group (which underwent a sham operation, opening skull but avoiding brain injury). The movement pattern, amplitude, and frequency of *in vitro* terminal ileum smooth muscle strips, and the number of terminal ileum ICCs were detected at 1, 3, and 7 d after SHI. **Results** (1) Compared with the control group, the spontaneous rhythmic contraction amplitude of smooth muscle was significantly reduced at 1 d (0.16±0.04 g *vs* 0.31±0.05 g), 3 d (0.16±0.04 g *vs* 0.23±0.06 g), and 7 d (0.22±0.07 g *vs* 0.27±0.05 g) after SHI in the SHI group ($P<0.05$). The spontaneous rhythmic contraction frequency of smooth muscle was significantly reduced at 1 d (30.23±3.71 times/min *vs* 34.55±1.99 times/min) and 7 d (30.34±4.56 times/min *vs* 33.10±0.81 times/min) after SHI ($P<0.05$), but not at 3 d (31.46±4.64 times/min *vs* 33.39±2.17 times/min, $P>0.05$) after SHI. The muscle strip movement pattern became disordered and irregular. (2) Compared with the control group, the cell number of ICCs significantly decreased at 1 d (189±41 cells/mm^2 *vs* 303±10 cells/mm^2), 3 d (156±39 cells/mm^2 *vs* 305±9 cells/mm^2), and 7 d (215±28 cells/mm^2 *vs* 325±42 cells/mm^2) after SHI in the SHI group ($P<0.05$). The network of ICCs was obviously damaged and became thinner. **Conclusion** Severe damage of ICCs and spontaneous rhythmic contraction disorder of smooth muscle in small intestine emerge after SHI and result in IMD.

【基金项目】 军队"十一五"面上课题(09MA009)
【通信作者】 朱京慈,电话:(023)68771156,E-mail:zhujingci@163.com

【Key words】 severe head injury; contraction of small intestine; interstitial cells of Cajal; intestinal motility disturbance

Supported by the General Project of the "Eleventh Five-year Plan" of PLA (09MA009). Corresponding author: Zhu Jingci, Tel: 86-23-68771156, E-mail: zhujingci@163.com

肠动力障碍(intestinal motility disturbance, IMD)是重型颅脑损伤(severe head injury, SHI)的常见并发症。研究证实,肠动力障碍是导致SHI患者肠内营养不耐受,发生反流、呕吐、腹胀等不良反应,引发吸入性肺炎、严重营养不良、脓毒血症和多脏器功能衰竭等并发症的重要原因[1]。因此,探讨SHI后肠动力障碍机制,以针对性的采取措施改善其胃肠功能,对提高SHI等创伤性疾病的预后具有重要意义。胃肠道Cajal间质细胞(interstitial cells of cajal, ICC)是胃肠慢波活动的起搏器和传导者,也是肠神经作用的首要靶细胞,它们之间相互连接形成网络状结构,广泛分布于胃肠道各肌层[2]。ICC在肠神经向平滑肌的信号传导中起重要的中介作用,并参与胃肠动力的发生与调控。研究发现外科手术、缺血-再灌注等因素均可引起ICC的可逆性损伤,导致胃肠动力障碍[3-5]。但SHI后肠动力障碍是否与肠道ICC损伤有关尚少见研究报道。本研究拟观察SHI后平滑肌自主节律运动和小肠肠肌丛ICC数量的变化,探讨SHI后肠动力障碍的可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

36只6~8周龄清洁级健康雄性昆明小鼠(重庆医科大学实验动物中心提供),体质量(35±5)g。

1.2 试剂与仪器

动物立体定向仪(上海,江湾Ⅰ型),RM6280C型多道生理信号采集处理系统(成都仪器厂),肌肉张力换能器(高碑店市新航机电设备有限公司),SMZ-168解剖显微镜(德国Motic公司),分析纯试剂购自重庆市北碚化学试剂厂。

1.3 实验分组

按随机数字表法将36只昆明小鼠随机分为假伤对照组($n=18$)和SHI组($n=18$),分别于致伤后1、3、7 d取材进行指标检测(6只/时相点)。

1.4 SHI小鼠模型的复制

参照文献[6]方法并改进,建立小鼠实验性SHI模型。以1%戊巴比妥钠按照40 mg/kg进行腹腔麻醉,颅顶部脱毛、消毒;待小鼠出现夹尾反应后将其固定于立体定向仪上,正中切口开颅,以牙科钻在冠状缝后3 mm与矢状缝右侧3 mm交会处钻孔,扩大骨窗至2 mm×2 mm(前至冠状缝,左界为矢状缝右旁1.5 mm),保持硬膜完整;将18 g的圆柱状打击杆(打击端直径3 mm)沿垂直固定于立体定向仪上的套管内自10 cm高度释放,打击中心即为钻孔点;以明胶海绵局部止血,至无活动性出血后间断缝合头皮。假伤对照组只开骨窗不进行打击。

1.5 肌条实验

1.5.1 肌条制备 实验前小鼠禁食12 h,期间自由饮水,麻醉后开腹腔,在距回盲部3 cm处取回肠3 cm,平分成两段。分别置于盛有Krebs液的平皿中,用Krebs液洗净肠腔内容物备用。另取末端回肠(距离盲肠6 cm)8~10 cm,0.01 mol/L PBS充分洗净肠腔内容物。结扎小肠的一端,以丙酮注入肠腔内,维持充盈状态,再结扎另一端。置入相同固定液中固定6~8 h,以制作小肠分层铺片备用。

1.5.2 Krebs液的配置 Krebs液成分(mmol/L):NaCl 118.0、KCl 4.7、$CaCl_2$ 2.5、$MgSO_4$ 1.2、KH_2PO_4 1.2、$NaHCO_3$ 25、Glucose 11.1,pH=7.2~7.4。

1.5.3 小肠肌条运动 将标本一端固定在标本支持棒上,另一端与张力换能器相连,置入盛有10 ml的Krebs液的恒温浴槽中,水浴保持浴槽内温度为(36.5±0.5)℃,从槽底持续通入95% O_2和5% CO_2的混合气体,60~80个气泡/min[7]。给予标本0 g的基础负荷,张力信号通过张力换能器输入RM6280C型多道生理信号采集处理系统生理记录仪,选择通道模式为张力,灵敏度为1.5 g,扫描速度为2.5 s/div。待肌条在平滑肌槽内平衡30 min后,调节一维位移微调器,使肌条张力升至1.5 g,肌条出现自发性收缩并待基线稳定后,观察并记录肌条-张力收缩曲线10 min,分析肌条运动的模式和幅度。每只动物标本重复2次,取算术平均值。

1.6 免疫荧光染色

取用丙酮固定的小肠标本,在解剖显微镜下,沿肠系膜缘剪开肠管,用钟表镊依次剥离黏膜、黏膜下,将附有深肌丛的环行平滑肌层和附有肌间神经丛的纵行平滑肌留下,切成适当大小的标本块。PBS漂洗3次,每次5 min。1% BSA孵育30 min后加入第一抗体,Kit单克隆抗体(1∶100, Ebiosciences公司)4 ℃过夜;Cy3标记的兔抗大鼠IgG抗体(1∶100,DAKO公司)25 ℃,60 min;各步骤间用PBS漂洗3次,最后水溶性封片剂封片。激光共聚焦显微镜(Leica,TCS,SP5)观察照相,Cy3用528 nm光波激发。对照实验以正常鼠血清代替一抗,结果均为阴性。

1.7 统计学分析

肌条收缩的波幅和频率使用RM6280系列多道生理信号采集处理系统4.2测量,选取肌条收缩稳定的1 min的结果统计分析。免疫荧光染色铺片每组5张,荧光显微镜下随机选择10个视野,统计Kit阳性细胞数量。采用SPSS 11.5统计软件,数据以$\bar{x}\pm s$表示,两组比较进行独立样本t检验,多组比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 SHI小鼠肌条运动模式的变化

假伤对照组各时相点肌条收缩规律整齐;SHI后1、3、7 d肌条收缩幅度减弱,模式紊乱、不规律。

SHI伤后1、3 d,小鼠肌条运动的幅度均显著低于假伤对照组($P<0.05$);至伤后7 d其运动幅度虽有显著升高($P<0.05$),但仍低于假伤对照组($P<0.05$,表1)。

表1　小鼠小肠离体平滑肌肌条自主运动幅度（$n=6$，g，$\bar{x}\pm s$）

组别	1 d	3 d	7 d
SHI组	0.16 ± 0.04^{ab}	0.16 ± 0.04^{ab}	0.22 ± 0.07^{a}
假伤对照组	0.31 ± 0.05	0.23 ± 0.06	0.27 ± 0.05

a：$P<0.05$，与假伤对照组比较；b：$P<0.05$，与SHI组7 d比较

2.2　小鼠肌条运动频率

SHI后1 d小鼠肌条运动频率较假伤对照组显著减少（$P<0.05$），至伤后7 d频率并无增加（$P>0.05$），仍显著低于假伤对照组（$P<0.05$，表2）。

表2　小鼠小肠离体平滑肌肌条自主运动频率（$n=6$，min^{-1}，$\bar{x}\pm s$）

组别	1 d	3 d	7 d
SHI组	30.23 ± 3.71^{a}	31.46 ± 4.64	30.34 ± 4.56^{a}
假伤对照组	34.55 ± 1.99	33.39 ± 2.17	33.10 ± 0.81

a：$P<0.05$，与假伤对照组比较

2.3　ICC免疫荧光染色

Kit标记的红色阳性细胞显示假伤对照组ICC细胞相互连接成网且网络密集。而SHI组各个时相点网络结构明显受损，网络变稀薄（图1）。

2.4　ICC数量

与假伤对照组相比，SHI组ICC数量显著减少（$P<0.05$），显示在SHI 7 d内ICC一直处于受损状态，见表3。

表3　不同时相点小鼠肠道ICC免疫荧光计数（$n=6$，$/mm^2$，$\bar{x}\pm s$）

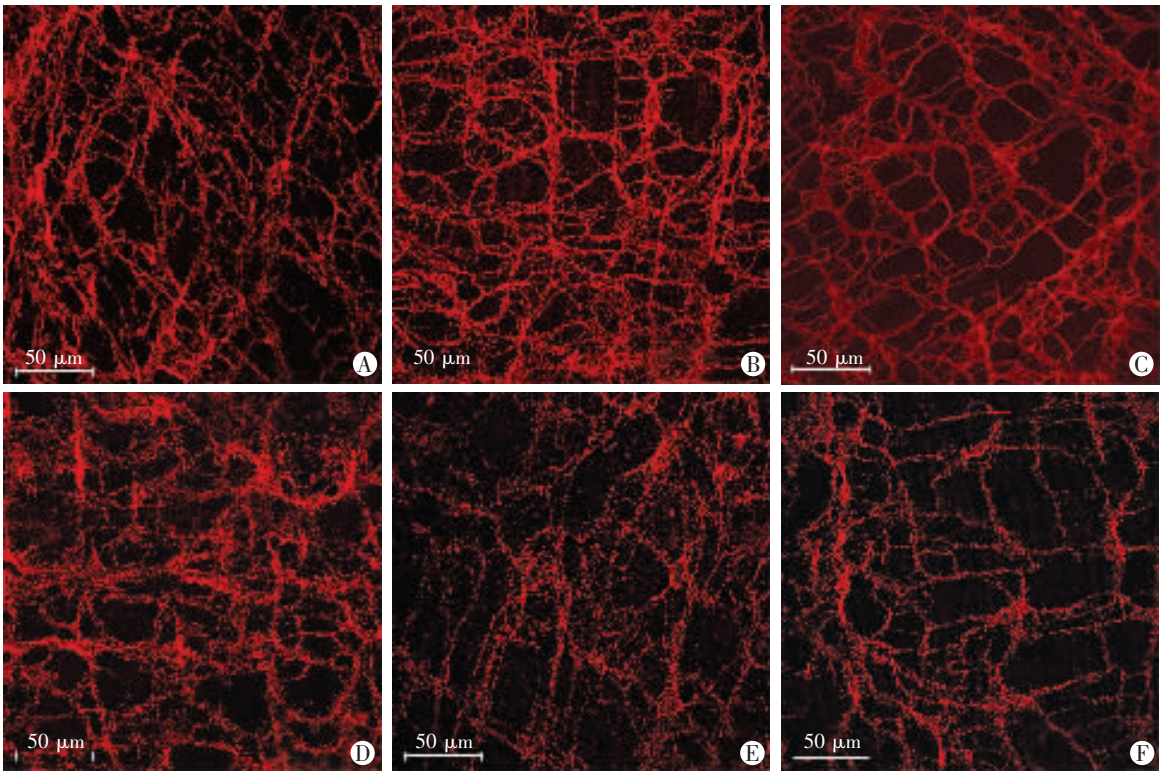
组别	1 d	3 d	7 d
SHI组	189 ± 41^{a}	156 ± 39^{a}	215 ± 28^{a}
假伤对照组	303 ± 10	305 ± 9	325 ± 42

a：$P<0.05$，与假伤对照组比较

3　讨论

3.1　SHI对小肠平滑肌自主节律运动的影响

颅脑损伤程度越重，肠动力障碍的发生率就越高。本课题组前期研究显示SHI后存在小肠推进率显著降低的现象，证实了SHI后14 d内胃肠动力障碍持续存在[8]。创伤后胃肠道动力障碍与多种影响因素综合作用相关，包括神经调节，激素、神经递质和炎症介质释放，胃肠道缺血缺氧，麻醉剂和镇痛药物等，但具体发病机制尚不完全清楚。平滑肌是胃肠道活动的最终效应器，它的形态异常和运动失调会直接影响到胃肠道的收缩[9]。有文献报道，肠道缺血再灌注、肠道高炎症状态都可以导致平滑肌细胞及周围组织结构损伤，引起肠道收缩模式改变[10-11]。SHI后是否也存在平滑肌组织和肠道收缩模式的改变，尚少见相关研究报道。本研究利用离体肌条模拟小肠平滑肌自主节律性运动以观察SHI后肠道收缩模式的变化，发现，SHI后1、3 d，小鼠平滑肌自主收缩运动的幅度显著低于假伤对照组，收缩模式紊乱不规律，SHI后7 d肌条收缩幅度虽有所提高，但仍低于假伤对照组（表1）。SHI后1 d小鼠平滑肌自主收缩运动的频率开始减少，虽然在伤后3 d与假伤对照组比较无统计学差异（可能与样本量小有关），但是至损伤后7 d其频率仍未升高，仍低于正常水平（表2）。提示SHI后早期即出现小肠



A、B、C：假伤对照组1、3、7 d；D、E、F：SHI组1、3、7 d

图1　免疫荧光Kit红色标记的各组小鼠不同时相点肠道ICC细胞

平滑肌自主节律运动异常，幅度降低，频率减少，收缩性减弱，且 1 周内仍未完全恢复，这可能与平滑肌细胞及周围组织结构受损有关；而平滑肌组织结构受损可能是 SHI 后出现胃肠动力障碍的重要原因。文献报道，由三硝基苯硫磺酸（trinitro-benzene-sulfonic acid，TNBs）诱发的肠道炎症可导致平滑肌收缩性减弱，其原因可能与 TNBs 诱导的 TH1 细胞因子如 IL-1β、肿瘤坏死因子-α（tumor necrosis factor-α，TNF-α）和 IL-12 有关[10]。同时 Schwarz 等[11]研究发现移植诱导的 TNF-α、环氧化酶-2（cyclo-oxygenase-2，COX-2）和诱生型一氧化氮合酶（inducible nitric oxide synthase，iNOs）也可导致胃和结肠平滑肌收缩性的减弱。而另一方面有文献报道，旋毛线虫感染引起的消化道炎症可以增强平滑肌收缩，可能与炎症 TH2 细胞因子如 IL-4、IL-13 的诱导下，前列腺素 E2 水平升高有关[12]。本课题组前期研究发现 SHI 后血清 TNF-α 升高，提示 SHI 后可能存在 TH1 细胞因子增多，从而引起平滑肌收缩性减弱及胃肠动力障碍。SHI 后平滑肌收缩性减弱的关键影响因子及其影响机制需要进一步实验验证。

3.2 SHI 对小肠 ICC 的影响

自从 1946 年 Ambache 等首次发现慢波电节律控制小肠收缩活动以来，大量研究证实慢波是依赖于 ICC 产生的，ICC 产生起搏电流是胃肠道肌肉活动的基础[13]。小肠 ICC 分为两类，肠肌丛 ICC 位于小肠环形肌和纵行肌之间，深肌层 ICC 位于小肠环肌内薄层与外厚层之间。研究[14]发现肠肌丛 ICC 是引起肠道自主节律运动的必需要素。为探讨 SHI 后平滑肌自主节律运动异常的机制，本研究观察了 SHI 后小肠肠肌丛 ICC 的变化，发现 SHI 后 1、3、7 d 肠肌丛 ICC 数量显著减少（表 3），网络结构显著破坏（图 1）。文献[15－16]报道，SHI 可导致肠黏膜缺血缺氧、再灌注损伤，可继发严重的肠道炎症反应，从而引起肠肌层大量中性粒细胞和巨噬细胞浸润，而大量的炎性因子聚集会导致平滑肌细胞及周围组织结构损伤，其中 ICC 的突起受影响最大[17]。上述研究提示，肠 ICC 受损可能是 SHI 后平滑肌自主节律运动异常的重要因素，而炎症因子聚集可能是导致肠肌丛 ICC 损伤的关键原因。

综上所述，肠 ICC 损伤可能是 SHI 后平滑肌收缩性减弱的原因之一，而平滑肌收缩性减弱将导致肠动力障碍，因此如何有效防止 ICC 损伤或促进 ICC 增殖和恢复将是治疗 SHI 肠动力障碍的重要思路。

志谢 感谢第三军医大学西南医院神经外科的李梅、李博博士在 SHI 模型制作过程中给予的无私帮助；感谢西南医院泌尿外科的吴康棋、陈玮博士在肌条运动实验过程中给予的悉心指导；感谢组织学与胚胎学教研室王洪凯硕士在免疫荧光实验中给予的大力帮助

参考文献：

[1] Herbert M K, Holzer P. Standardized concept for the treatment of gastrointestinal dysmotility in critically ill patients-current status and future options[J]. Clin Nutr, 2008, 27(1): 25－41.
[2] Yin J, Chen J D. Roles of interstitial cells of Cajal in regulating gastrointestinal motility: *in vitro* versus *in vivo* studies[J]. J Cell Mol Med, 2008, 12(4): 1118－1129.
[3] 楼征，黎介寿. 大鼠小肠 Cajal 细胞网络结构及超微结构分析[J]. 肠外与肠内营养，2008，15(1)：4－6.
[4] Mei F, Guo S, He Y T, *et al*. Apoptosis of interstitial cells of Cajal, smooth muscle cells, and enteric neurons induced by intestinal ischemia and reperfusion injury in adult guinea pigs[J]. Virchows Arch, 2009, 454(4): 401－409.
[5] Shimojima N, Nakaki T, Morikawa Y, *et al*. Interstitial cells of Cajal in dysmotility in intestinal ischemia and reperfusion injury in rats[J]. J Surg Res, 2006, 135(2): 255－261.
[6] 李梅，吴国才，李飞，等. 脾脏切除对实验性脑损伤大鼠生存率及血液、脑组织中 IL-1β 含量的影响[J]. 创伤外科杂志，2009，11(4)：302－305.
[7] 吴康棋，邓建平，方强，等. β 肾上腺素受体在豚鼠输尿管 ICC 细胞上的表达及功能研究[J]. 第三军医大学学报，2010，32(19)：2101－2104.
[8] Yu X Y, Yin H H, Zhu J C. Increased gut absorptive capacity in rats with severe head injury after feeding with probiotics[J]. Nutrition, 2011, 27(1): 100－107.
[9] 徐爱忠，彭洪云. 慢传输型便秘病因研究进展[J]. 结直肠肛门外科，2006，12(2)：125－128.
[10] Kiyosue M, Fujisawa M, Kinoshita K, *et al*. Different susceptibilities of spontaneous rhythmicity and myogenic contractility to intestinal muscularis inflammation in the hapten-induced colitis[J]. Neurogastroenterol Motil, 2006, 18(11): 1019－1030.
[11] Schwarz N T, Kalff J C, Turler A, *et al*. Selective jejunal manipulation causes postoperative pan-enteric inflammation and dysmotility[J]. Gastroenterology, 2004, 126(1): 159－169.
[12] Akiho H, Deng Y, Blennerhassett P, *et al*. Mechanisms underlying the maintenance of muscle hypercontractility in a model of postinfective gut dysfunction[J]. Gastroenterology, 2005, 129(1): 131－141.
[13] 王佐妤，许文燮. 胃肠平滑肌起搏功能研究的最新动态[J]. 世界华人消化杂志，2010，18(4)：319－323.
[14] Nakagawa T, Misawa H, Nakajima Y, *et al*. Absence of peristalsis in the ileum of W/W(V) mutant mice that are selectively deficient in myenteric interstitial cells of Cajal[J]. J Smooth Muscle Res, 2005, 41(3): 141－151.
[15] 李睿明，易燕锋，张蓓，等. 基于 Cajal 间质细胞异常的胃肠道动力障碍动物模型研究进展评述[J]. 现代中西医结合杂志，2008，17(16)：2576－2577.
[16] Verdu E F, Bercik P, Bergonzelli G E, *et al*. Lactobacillus paracasei normalizes muscle hypercontractility in a murine model of postinfective gut dysfunction[J]. Gastroenterology, 2004, 127(3): 826－837.
[17] Kinoshita K, Horiguchi K, Fujisawa M, *et al*. Possible involvement of muscularis resident macrophages in impairment of interstitial cells of Cajal and myenteric nerve systems in rat models of TNBS-induced colitis[J]. Histochem Cell Biol, 2007, 127(1): 41－53.

（收稿 2010-11-09 修回 2010-12-23）
（编辑 栾 嘉）