论著

文章编号:1000-5404(2014)15-1592-04

Cajal 间质细胞介导急性胰腺炎引起的胃肠道动力障碍

张 磊[1,2],朱 骏[3],朱晓亮[1,2],宋晓静[1,2],岳 平[1,2],朱克祥[1,2],周文策[1,2],李 汛[1,2] (730000 兰州,兰州大学第一医院:普外二科[1],病理科[2],甘肃省肝胆胰外科研究所[3])

[摘要] **目的** 探讨 Oddi 括约肌 Cajal 间质细胞(interstitial cells of Cajal, ICC)在家兔实验性重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)中的变化。**方法** 共有 16 只新西兰雌性白兔随机分为两组($n=8$):假手术组和 SAP 组;逆行注射 5% 牛磺胆酸钠(1.0 mL/kg)进入胰管建立 SAP 家兔模型。建模 8 h 后处死动物。胰腺和 Oddi 括约肌切除,并进行常规病理检查。免疫组化染色,用于检测 Oddi 括约肌的 c-kit 阳性细胞。通过实时聚合酶链反应检测 c-kit 的 mRNA 的表达,Western 印迹法对 c-kit 和 nNOS 蛋白的表达进行了评估。用透射电子显微镜观察 ICC 的超微结构。**结果** SAP 组胰腺组织中有出血、坏死和大量的炎性细胞浸润。SAP 组 Oddi 括约肌中 c-kit 阳性细胞密度(56.11±7.09)明显低于假手术组(88.47±10.49,$P<0.01$)。SAP 组 c-kit 的蛋白和 mRNA 水平分别为假手术组的 54.7% 和 47.1%($P<0.01$),均明显低于假手术组。SAP 组的 ICC 表现出相同的变化趋势,如线粒体空泡化,不规则的空泡和松动的桥粒样连接。**结论** c-kit 阳性细胞的减少和 ICC 超微结构的变化导致的 c-kit 信号通路阻断与 SAP 引起的肠道运动功能障碍密切相关。

[关键词] Oddi 括约肌;Cajal 间质细胞;急性胰腺炎;c-kit; nNOS

[中图法分类号] R329.25; R574.4; R576 [文献标志码] A

Interstitial cells of Cajal mediate acute pancreatitis-caused gastrointestinal dysmotility

Zhang Lei[1,2], Zhu Jun[3], Zhu Xiaoliang[1,2], Song Xiaojing[1,2], Yue Ping[1,2], Zhu Kexiang[1,2], Zhou Wence[1,2], Li Xun[1,2] ([1]Second Department of General Surgery, [2]Department of Pathology, [3]Gansu Provincial Institute of Hepatobiliary and Pancreatic Surgery, First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou, Gansu Province, 730000, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the changes of the interstitial cells of Cajal (ICC) of sphincter of Oddi in rabbits with severe acute pancreatitis (SAP). **Methods** A total of 16 New Zealand white rabbits were randomly divided into 2 groups ($n=8$), a sham operation group (S group) and a SAP group. Rabbit SAP model was established by retrograde injection of 5% sodium taurocholate (1.0 mL/kg) into the pancreatic duct. Eight hours after the operation, animals were sacrificed. The pancreas and sphincter of Oddi were harvested and undergone routine pathological examination. Immunohistochemical staining was used to detect the c-kit-positive cells in the sphincter of Oddi. The expression levels of c-kit and nNOS were analyzed by real-time polymerase chain reaction and Western blotting. ICC ultrastructure was observed by transmission electron microscopy. **Results** The pancreatic tissues of the SAP group had hemorrhage, necrosis, and a large number of inflammatory cell infiltration. The c-kit-positive cell density in the sphincter of Oddi in the SAP group was significantly lower than that in the S group. The average c-kit-positive cell density in the S group was 88.47±10.49 and that of the SAP group 56.11±7.09. Protein and mRNA levels of c-kit in the SAP group were 54.7% and 47.1% of those of the S group. ICC in the SAP group showed mitochondria vacuolization, irregular vacuoles and loosen desmosomes like connection. **Conclusion** The blockage of c-kit signaling pathway caused by ICC ultrastructural changes and the reduction of c-kit-positive cells is closely related to the intestinal dysmotility triggered by SAP.

[**Key words**] interstitial cells of Cajal; sphincter of Oddi; acute pancreatitis; c-kit; nNOS

Corresponding author: Li Xun, E-mail: lxdr21@sohu.com

[通信作者] 李 汛,E-mail: lxdr21@sohu.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140502.1125.002.html(2014-05-02)

自从西班牙神经组织学家卡哈尔在 1893 年发现胃肠壁内 Cajal 间质细胞(inter-stitial cells of Cajal, ICC),大量研究已经建立了 ICC 在胃肠壁正常功能中发挥作用的 4 个主要群体:亚肌神经丛 ICC、环形和纵肌肉层 ICC、肌间神经丛 ICC(ICC-MY,也称为 ICC-MP)和深肌层神经丛 ICC。这些细胞作为胃肠壁的起搏细胞生成缓波,从 ICC 传播到平滑肌细胞触发钙离子的进入,达到去极化和收缩而作为蠕动和分割的基础。它们在胃肠道维持正常的神经传递和调节肌肉运动[1-4]。由于 c-kit 及其内源性配体干细胞因子(SCF)的发现而导致了 ICC 研究领域的极大进展[5]。添加 SCF 增加体外培养 ICC 细胞 c-kit 的免疫反应,而功能缺失突变 c-kit 基因导致 ICC 不足;这些都表明 SCF/c-kit 信号通路是维持 ICC 所必不可少的[6-7]。伊马替尼,一种 c-kit 的强效抑制剂,完全消除了在小鼠小肠圆形肌肉的自发运动[8],表明 ICC 的 c-kit 信号对小肠自发的机械活动起着至关重要的作用。ICC 失调可能会导致肠胃蠕动功能障碍,从而导致一些胃肠道疾病,包括重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis,SAP)。此外,研究发现实验性急性胰腺炎引起小肠肌层 ICC 发生损伤[9]。

许多胆道疾病会引起 Oddi 括约肌活动功能的变化[10-13],而且胆胰疾病显著提高 Oddi 括约肌功能障碍的发病率[14]。Oddi 括约肌功能障碍在 SAP 的详细机制尚未阐明。我们推测,ICC 可能在 SAP 诱发 Oddi 括约肌功能障碍中发挥重要的作用。在本研究中,我们在家兔 SAP 模型中检测这一假设。

1 材料与方法

1.1 重症急性胰腺炎兔模型的建立

16 只 3~4 月龄新西兰雌性白兔分为假手术组和重症急性胰腺炎(SAP)组,体质量约 2.5 kg。肌注 10 min 内配制的乙酰丙嗪 10 mg/kg。兔子用10 mg/kg 赛拉嗪和 50 mg/kg 氯胺酮肌肉注射麻醉。在手术过程中静脉内滴注半剂量赛拉嗪和氯胺酮维持麻醉并用氧气面罩自主呼吸。消毒后,兔正中切开了 8.0 cm 的开口。幽门后约 20 cm 处找到胰管,打开小肠后,用一个连接 24 号针头的导管做成一个逆行插管。在 1 min 内用手动压力注入共 1 mL/kg 5 % 的牛磺胆盐水液。缝合肠管并关闭腹壁被。假手术组为只进行同样的手术处理但无牛磺胆灌注。术后 8 h 分别处理假手术组和 SAP 组,采集血液样品,胰腺和 Oddi 括约肌组织。

1.2 免疫组化染色

切片常规脱蜡后用酶消化处理,然后水化,3% 甲醇双氧水阻断室温 10 min,0.01 mol/L(pH=7.2)磷酸盐缓冲液洗 5 min 3 次;加入 0.01 mol/L(pH=6.0)柠檬酸缓冲液置微波炉中修复抗原,自然冷却后洗,进行抗原封闭,然后滴加配制好的一抗 4 ℃过夜,洗 5 min 3 次;滴加生物素标记的第二抗体,室温孵育 10 min;洗 5 min 3 次;滴加链亲和素-过氧化物酶,室温 10 min;洗 5 min 3 次;新鲜配制的 DAB 溶液显色 3~10 min;自来水洗,苏木精浅染细胞核。自来水冲洗,梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封固。

1.3 实时聚合酶链反应

从刚收集的组织用 TRIzol® 试剂提取总 RNA。使用 PrimeScript RT 试剂盒(宝生物工程有限公司,日本大津市),在 20 μL 反应混合物含有 1 μg 总 RNA,按照制造商的方法进行反转录(RT)。使用 SYBR 预混物实施例的 *Taq*(宝生物工程有限公司,日本大津市)和 ABI 7300 实时 PCR 系统扩增 RT 反应产物。c-kit 上游引物:5′-GAGTGCCATGGACACAGAGGAG-3′,下游引物:5′- CCGGGTCGATGCACTCCAG-3′,PCR 产物的预测大小为 149 bp。nNOS 上游引物:5′-GAGG-AACAAGTTC-CGCCTCA-3′,下游引物:5′-CTCTGGAGGTTTTGAC-GGCT-3′,PCR 产物的预测大小为 120 bp。甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)上游引物为:5′-CAGTTTCCATCCCAGACCCC-3′,下游引物:5′-TGCTGTCGAGACTTTATTGATGG-3′,PCR 产物的预测大小为 87 bp。平均数倍的变化通过使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 。

1.4 免疫印迹检测

Oddi 括约肌组织在提取缓冲液(50 mmol/L Tris -氯液,pH=7.5,150 mmol/L NaCl , 1% 的 Triton X-100 , 1 mmol/L 苯甲基磺酰氟)中匀浆,收集溶胞产物被并于 4 ℃ 10 000 r/min 离心 15 min 以除去不溶性物质。使用 BCA 蛋白测定法(Pierce 公司, Rockford,伊利诺伊州,美国),测定上清液的蛋白质浓度。样品在 10% SDS -聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳,并转印至 PVDF 膜(Millipore 公司, MA,美国)。然后将膜用 5% 脱脂牛奶室温孵育 1 h 阻断非特异性结合位点,然后一抗在 4 ℃孵育过夜。洗涤后,过氧化物酶结合的二抗在室温下温育 1 h。特定的蛋白条带,用 X 线胶片,用化学发光检测试剂盒(密理博公司,美国)。条带的光密度扫描后用 Image J 软件分析。

1.5 电子显微镜观察

切除后,立即切断 Oddi 括约肌,浸入含 5% 戊二醛的固定液,并在 20 ℃下放置至少 2 h。固定后,组织切成小块(1 mm × 2 mm),并进一步在 5% 的戊二醛固定过夜,然后 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH=7.3)漂洗 60 min,并在含 2% OsO_4 的 0.1 mol/L 的磷酸缓冲液中固定 2 h。组织标本随后脱水和镶嵌。薄切片 1 μm 的厚度并甲苯胺蓝染色,光镜选择适合超薄切片的区域。超薄切片 70~80 nm 并安装在铜网格上,柠檬酸铅染色后用飞利浦莫干 261 型电子显微镜观察。

1.6 统计学处理

实验至少独立进行 3 次,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。不同处理间差异采用 Prism 软件(GRAPHPAD)进行方差分析和 Bonferroni 测试后分析。

2 结果

2.1 Oddi 括约肌神经细胞 NOS 和 VIP 免疫组化结果

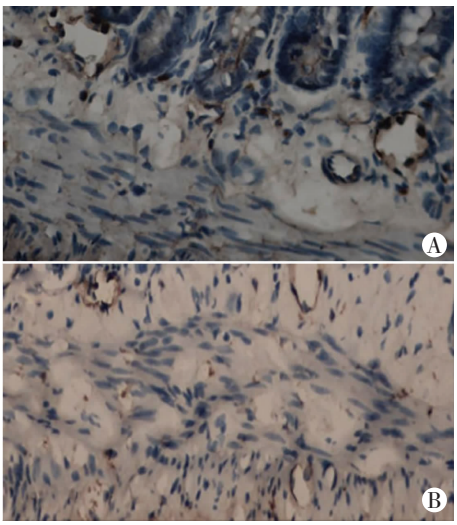
假手术组 Oddi 括约肌有(45.83 ± 2.17)% (38.67% ~ 54.38%)的神经细胞为 NOS 免疫阳性,而(52.46 ± 2.47)%

(43.72% ~65.59%)为VIP免疫阳性。SAP组肌间神经丛神经细胞的(11.26±0.93)%(6.33% ~18.52%)为NOS阳性,(28.62±2.83)%(19.44% ~46.87%)为VIP阳性(图1)。SAP组的NOS阳性神经细胞和VIP阳性神经细胞的比例明显低于假手术组($P<0.01$)。

2.2 Oddi括约肌内的ICC细胞c-kit的免疫组化结果

Oddi括约肌内的ICC有椭圆形细胞核,细胞质稀疏和分支,这些细胞分布在亚肌神经丛(图1A)和肌间隔(图1B)。在SAP组的c-kit阳性细胞密度明显低于假手术组,假手术组平均密度为(88.47±10.49),而SAP组为(56.11±7.09)。

在假手术组c-kit阳性ICC密集网络(图1A),存在于整个肌间神经丛及深肌层神经丛。与此相反,SAP组c-kit阳性ICC网络出现中断或阳性显著降低(图1B)。

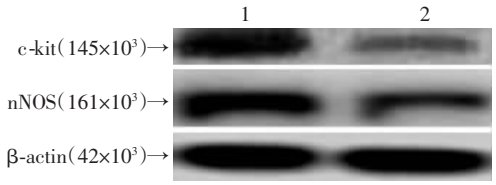


A:假手术组;B:重症急性胰腺炎组

图1 两组兔Oddi括约肌组织中c-kit的表达水平 (免疫组化 ×200)

2.3 Oddi括约肌组织的c-kit抗体免疫印迹分析结果

用c-kit抗体进行免疫印迹分析Oddi括约肌组织检测到约为145×10^3的蛋白条带,对应于c-kit蛋白的分子量。SAP组的c-kit条带密度(0.29±0.04)相比假手术组(0.53±0.06)显著降低($P<0.05$)。相应地c-kit mRNA水平在SAP组的Oddi括约肌也比假手术组明显减少($P<0.05$)。相似的情况也在nNOS的表达水平上观察到。见图2。

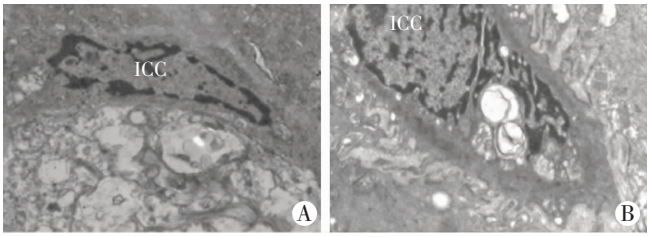


1:假手术组;2:重症急性胰腺炎组

图2 免疫印迹分析两组兔Oddi括约肌组织中c-kit和nNOS基因的表达

2.4 ICC细胞的超微结构

假手术组的ICC为三角形或梭形形状。ICC细胞核很大由一个小的核周胞质包围。这些细胞的细胞质具有比周围的肌肉细胞的细胞质更高的电子密度。ICC与平滑肌密切相联并通常与其他ICC形成网络。一些ICC嵌入神经细胞和平滑肌细胞之间(图3A)。相比之下,SAP组ICC经常出现合流空泡(图3B)。



A:假手术组;B:重症急性胰腺炎组

图3 两组兔Oddi括约肌组织中ICC的超微结构变化
(透射电镜 ×500)

3 讨论

最常见的胆道和胰腺功能失常与Oddi括约肌蠕动紊乱相关[15]。Oddi括约肌是位于十二指肠的胆汁导管和胰腺的交界处的一种神经肌肉结构。其主要功能是调节传递胆汁和胰液进入十二指肠,防止十二指肠内容物反流进入胆道和胰腺系统。Oddi括约肌蠕动紊乱导致临床Oddi括约肌功能障碍和急性胰腺炎相同痛苦的状况。

到目前为止,胰腺炎引起的肠道运动障碍的致病机制在很大程度上是未知的。ICC被认为控制肠胃蠕动已有大量的记载。例如,ICC数量减少或网络被中断和一些人体肠胃蠕动障碍,包括慢传输型便秘[16-17],假性肠梗阻[18-20]和糖尿病性肠病[21]有关。ICC在SAP引起的胃肠运动功能障碍的发病机制上的潜在作用已引起人们的重视。根据他们的位置,ICC可以分为若干亚型。ICC在肌间神经丛水平产生慢波,研究已经证实,损坏肌间神经丛ICC的网络导致各种人类疾病的进程中肠道自发机械收缩的变化[22-23]。除了产生慢波,其他的亚型的ICC则有传递肠道平滑肌的神经信号和作为动力感应器的功能。本研究中通过免疫组化染色观察总ICC。免疫组化染色显示围绕亚肌神经丛和肌间隔区域c-kit阳性细胞在SAP组减少。SAP组c-kit的蛋白和mRNA水平显著降低。

ICC在SAP最先出现形态变化,如线粒体空泡,不规则的空泡和松动的桥粒样连接等,而假手术组ICC超微结构是正常的。然而还没有足够的证据支持ICC向平滑肌细胞表型转分化的理论。可以推测ICC减少或其超微结构的变化影响了ICC的功能,最终导致胃肠道动力障碍。

本研究进一步表明,SAP组c-kit和nNOS的mRNA的表达显着下调。这一结果与先前报道的c-kit在慢

传输型便秘患者的乙状结肠[24]和高胆固醇饮食的豚鼠胆囊[25]中下调是一致的。在胃肠道,分化和维持 ICC 表型与细胞内的 c-kit 信号相联系。Beckett 等[26]研究发现在妊娠后期阻断 c-kit 信号导致小鼠小肠 ICC 网络和起搏器功能不能形成。c-kit 的信号阻断造成成熟的 ICC 再向平滑肌细胞表型分化[23]。本研究中我们提供了进一步的证据表明, c-kit 信号通路可能负责 ICC 的分化与维持。然而,需要进一步的研究来探索这些变化是否及何时可以恢复到正常。

总之,本研究揭示 SAP 家兔中 c-kit 阳性 ICC 细胞减少和 ICC 退行性超微结构变化,所有这些变化导致 c-kit 信号通路的封锁。

参考文献:

[1] Shi L L, Liu M D, Chen M, *et al*. Involvement of interstitial cells of Cajal in experimental severe acute pancreatitis in rats[J]. World J Gastroenterol, 2013, 19(14): 2179 - 2186.

[2] 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.

[3] 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.

[4] Hirst G D, Ward S M. Interstitial cells: involvement in rhythmicity and neural control of gut smooth muscle[J]. J Physiol, 2003, 550(Pt 2): 337 - 346.

[5] Burns A J, Herbert T M, Ward S M, *et al*. Interstitial cells of Cajal in the guinea-pig gastrointestinal tract as revealed by c-kit immunohistochemistry[J]. Cell Tissue Res, 1997, 290(1): 11 - 20.

[6] Kitamura Y, Hirota S, Nishida T. A loss-of-function mutation of c-kit results in depletion of mast cells and interstitial cells of Cajal, while its gain-of-function mutation results in their oncogenesis[J]. Mutat Res, 2001, 477(1/2): 165 - 171.

[7] Rich A, Miller S M, Gibbons S J, *et al*. Local presentation of Steel factor increases expression of c-kit immunoreactive interstitial cells of Cajal in culture[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2003, 284(2): G313 - G320.

[8] Zhou H, Liu L, Bai Y, *et al*. Damage of the interstitial cells of Cajal and myenteric neurons causing ileus in acute necrotizing pancreatitis rats[J]. Surgery, 2011, 149(2): 262 - 275.

[9] Shimojima N, Nakaki T, Morikawa Y, *et al*. Imatinib blocks spontaneous mechanical activities in the adult mouse small intestine: possible inhibition of c-Kit signaling[J]. Pharmacology, 2005, 74(2): 95 - 99.

[10] Sharma B C, Agarwal D K, Baijal S S, *et al*. Effect of endoscopic sphincterotomy on gall bladder bile lithogenicity and motility[J]. Gut, 1998, 42(2): 288 - 292.

[11] Sonoda Y, Takahata S, Jabar F, *et al*. Electrical activation of common bile duct nerves modulates sphincter of Oddi motility in the Australian possum[J]. HPB (Oxford), 2005, 7(4): 303 - 312.

[12] Hui C K, Lai K C, Yuen M F, *et al*. Role of cholecystectomy in preventing recurrent cholangitis[J]. Gastrointest Endosc, 2002, 56(1): 55 - 60.

[13] Shafik A. Choledochosphincter inhibitory reflex: identification of the reflex in dogs and its significance[J]. J Surg Res, 1998, 78(1): 7 - 10.

[14] Della-Libera E, Rodrigues R A, Guimaraes A P, *et al*. Prevalence of sphincter of Oddi dysfunction in patients referred to endoscopic retrograde cholangiopancreatography[J]. Arq Gastroenterol, 2007, 44(1): 18 - 21.

[15] Woods C M, Mawe G M, Toouli J, *et al*. The sphincter of Oddi: understanding its control and function[J]. Neurogastroenterol Motil, 2005, 17(Suppl 1): 31 - 40.

[16] 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.

[17] 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.

[18] Kenny S E, Vanderwinden J M, Rintala R J, *et al*. Delayed maturation of the interstitial cells of Cajal: a new diagnosis for transient neonatal pseudoobstruction. Report of two cases[J]. J Pediatr Surg, 1998, 33(1): 94 - 98.

[19] Vanderwinden J M, Rumessen J J. Interstitial cells of Cajal in human gut and gastrointestinal disease[J]. Microsc Res Tech, 1999, 47(5): 344 - 360.

[20] Feldstein A E, Miller S M, El-Youssef M, *et al*. Chronic intestinal pseudoobstruction associated with altered interstitial cells of cajal networks[J]. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2003, 36(4): 492 - 497.

[21] He C L, Soffer E E, Ferris C D, *et al*. Loss of interstitial cells of cajal and inhibitory innervation in insulin-dependent diabetes[J]. Gastroenterology, 2001, 121(2): 427 - 434.

[22] 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.

[23] Yanagida H, Yanase H, Sanders K M, *et al*. Intestinal surgical resection disrupts electrical rhythmicity, neural responses, and interstitial cell networks[J]. Gastroenterology, 2004, 127(6): 1748 - 1759.

[24] Tong W D, Liu B H, Zhang L Y, *et al*. Expression of c-kit messenger ribonucleic acid and c-kit protein in sigmoid colon of patients with slow transit constipation[J]. Int J Colorectal Dis, 2005, 20(4): 363 - 367.

[25] Hu W M, Luo H S, Ding X W, *et al*. Expression of c-kit messenger ribonucleic acid and c-kit protein in the gallbladders in guinea pigs of high cholesterol diet[J]. Dig Dis Sci, 2009, 54(8): 1651 - 1655.

[26] Beckett E A, Ro S, Bayguinov Y, *et al*. Kit signaling is essential for development and maintenance of interstitial cells of Cajal and electrical rhythmicity in the embryonic gastrointestinal tract[J]. Dev Dyn, 2007, 236(1): 60 - 72.

(**收稿**:2013-11-25;**修回**:2014-01-29)

(编辑 邓强庭)