·论 著·

新生小鼠小肠 Cajal 间质细胞增殖的实验研究

于 彬,韩 鹃,梅 峰 (第三军医大学基础部组织学与胚胎学教研室,重庆 400038)

[摘 要] **目的** 探讨在新生小鼠小肠 Cajal 间质细胞(interstitial cells of Cajal,ICC)的发育过程中是否出现增殖。**方法** 采用新生 2 d(P2d)、14 d(P14d)和 24 d(P24d)的小鼠小肠,应用 BrdU 腹腔注射,24 h 后取材,Kit 和 BrdU 免疫荧光染色。**结果** P2d 小鼠小肠,可见大量 Kit/BrdU 双重标记阳性细胞,这些细胞的形态与成熟 ICC 基本相似,这些细胞在 P14d 时减少,而在 P24d 消失。统计学分析发现,不同时间点之间 Kit/BrdU 双标阳性细胞数量存在显著差别($P<0.05$)。**结论** 在小肠生后发育过程中,出现了 ICC 增殖,而这种增殖在发育过程中逐渐减弱,最后在成年前消失。

[关键词] Cajal 间质细胞;增殖;Kit 蛋白;BrdU

[中图分类号] Q253 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2009)03-0149-04

A study on interstitial cells of Cajal proliferation in murine small intestine during postnatal peroid

YU Bin, HAN Juan, MEI Feng (Department of Histology and Embryology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the appearance of interstitial cells of Cajal proliferation during postnatal development. **Methods** Postnatal mice aged 2 days (P2d), 14 days (P14d) and 24 days (P24d) were used, and intraperitoneally injection of BrdU was carried out 24 hours before sacrifice. Immunohistochemcal staining with either Kit or BrdU antibody was performed to reveal the proliferative ICC. **Results** Kit/BrdU double labeling cells were found out in the small intestine of 2-days old mice, and these cells were similar with mature ones in features. And those cells reduced at P14d and vanished at P24d. **Conclusion** Our result indicated that ICC proliferate during the postnatal development, and the proliferation gradually reduced and vanished before adulthood.

Keywords: interstitial cells of Cajal; proliferation; Kit; BrdU

Cajal 细胞(interstitial cells of Cajal,ICC)是 100 多年前 Cajal 应用镀银技术和甲基蓝染色,在豚鼠和家兔小肠描述的一种特殊的间质细胞,现通常称为 Cajal 细胞或 ICC。在小肠内环行平滑肌和纵行平滑肌之间,肌间神经丛周围分布着 ICC,这些细胞呈网络状分布,是小肠自主节律性运动的起搏细胞和兴奋传导细胞[1-3]。近年研究表明 ICC 与一些胃肠运动功能障碍性疾病,如贲门失迟缓症、糖尿病性胃轻瘫以及慢性便秘等密切相关[4]。尽管这些疾病发生机制尚不清楚,但均可见 ICC 数量存在不同程度减少,细胞网络完整性被破坏等病理改变。研究发现新生儿先天性巨结肠、假性肠梗阻等疾病中[5],都存在 ICC 细胞的丢失,或缺失,提示生后 ICC 的变化可能与胃肠道运动功能障碍性疾病的发生有关。

目前对动物生后 ICC 的发育研究发现,ICC 在小鼠出生时出现,而且这些细胞在大约 48 h 内发育成熟成为具有自主节律性的起搏细胞[6]。在生后发育过程中,小肠的直径和长度都发生了巨大的变化,成年小鼠小肠的直径和长度是新生小鼠的数十倍。我们在前期的研究过程中观察到,成年动物 ICC 没有增殖现象,而 ICC 在生后发育过程中,是否出现细胞增殖,尚未见报道。因此,本研究采用 BrdU 腹腔注射,观察 24 h 后,通过标记 ICC 的特异性标志物 Kit 蛋白,同时观察 BrdU 是否掺入 Kit 阳性细胞,期望了解动物生后 ICC 是否出现了增殖。

1 材料与方法

1.1 材料

新生 2、14、24 d 小鼠(第三军医大学实验动物中心提供),雌雄不限,分为三组,新生 2 d 为 P2d 组,14 d 为 P14d 组,24 d 为 P24d 组,每组 3 只动物,共 9 只小鼠。Kit 单克隆抗体购自 eBIOSCIENCE 公司,Cy3 标记的兔抗大鼠 IgG 抗体、BrdU 单克隆抗体和 FITC 标记的羊抗小鼠 IgG 抗体均购自 DAKO 公司。

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30800982);重庆市自然科学基金资助项目(2008BB5280)

[作者简介] 于 彬(1976-),湖南省祈阳县人,讲师,博士,主要从事胃肠道运动功能调控方面的研究。电话:(023)68752229

[通讯作者] 梅 峰,电话:(023)68752229,e-mail:meifeng.mail@163.com

[收稿日期] 2009-03-07 [修回日期] 2009-04-05

1.2 方法

1.2.1 BrdU 注射 三组小鼠在取材前 24 h 给予 BrdU 腹腔注射(0.3 mg/g)。

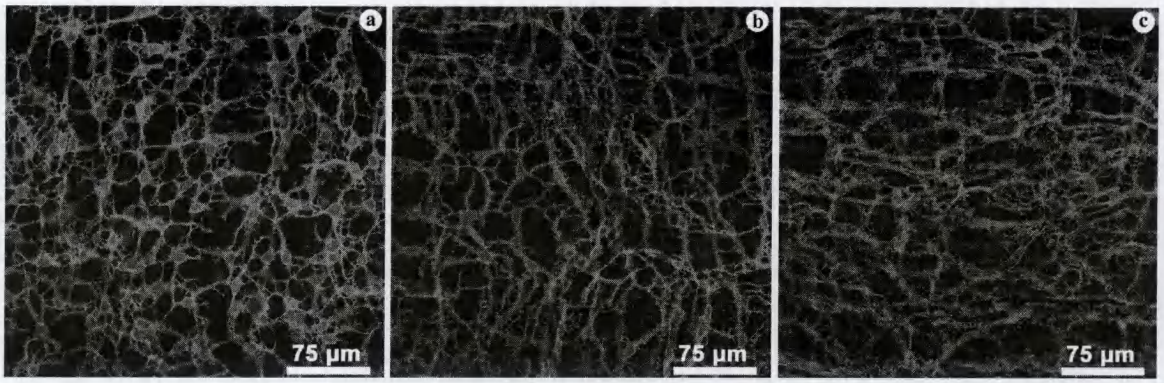
1.2.2 免疫细胞化学染色 BrdU 注射 24 h 后取各组小鼠小肠,0.01 mol/L PBS 冲洗小肠,100% 丙酮固定小肠 20 min,解剖显微镜下,用镊子撕去小肠的粘膜层和粘膜下层,获得小肠平滑肌层铺片。PBS 漂洗 3 次,每次 5 min。1% BSA 孵育 30 min 后加入第一抗体,Kit 单克隆抗体(1∶100)4 ℃ 48 h,Cy3 标记的兔抗大鼠 IgG 抗体(1∶100)25 ℃ 60 min。随后 4% 多聚甲醛固定 10 min,2 mol/L HCl 处理标本 30 min(室温),PBS 漂洗 3 次,每次 5 min,加入第二个一抗,BrdU 单克隆抗体(1∶100)4 ℃ 48 h,FITC 标记的羊抗小鼠 IgG 抗体(1∶100)25 ℃ 60 min。水溶性封片剂封片。激光共聚焦显微镜(Leica TCS SP5)或者荧光显微镜观察照相,Cy3 和 FITC 分别用 528 nm 和 488 nm 光波激发。对照实验以正常鼠血清代替一抗,或兔血清代替二抗,各步骤间用 PBS 漂洗 3 次。

1.3 半定量分析及统计学处理

选各组铺片 5 张,荧光显微镜下随机选择 10 个视野,统计 Kit 阳性和 Kit/BrdU 双标记阳性的细胞数量,统计结果用 SPSS11.0 软件进行单因素方差分析,$P<0.05$ 具有显著性差异。

2 结果

Kit 免疫荧光显示,Kit 阳性的 ICC 在肌间神经丛周围呈网络状分布,P2d 组 ICC 网络基本形成,但是细胞数量较少,而且细胞的突起较少(图 1a),说明此时的 ICC 多为幼稚细胞。P14d 组小鼠小肠 ICC 细胞密度较高,形成较完整的细胞网络(图 1b)。P24d 组小肠 ICC 具有粗大的初级突起和多个次级突起,这些突起相互之间连接成细胞网络(图 1c)。统计结果显示生后不同时期 ICC 的细胞密度存在明显差别($P<0.05$)。



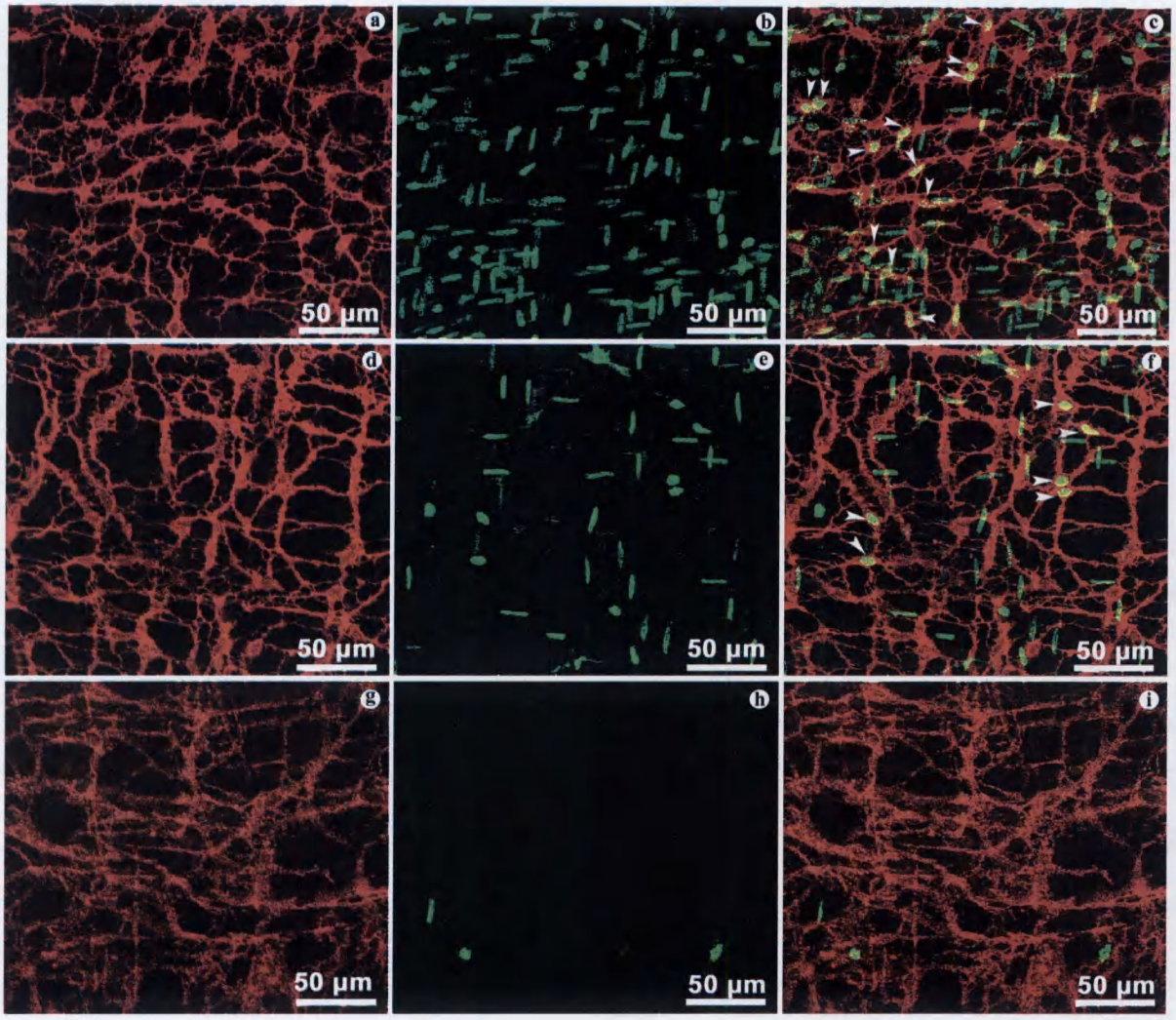
a:生后 2 d,ICC 细胞数量较少,细胞突起较细而稀疏;b:生后 14 d 可见 ICC 的突起较粗大并有多级分支,形成细胞网络;c:生后 24 d,ICC 细胞网络完整,可见细胞突起相互连接

图 1 Kit 免疫荧光染色显示生后不同时期小鼠小肠 ICC 的变化

BrdU 染色标记在细胞核,Kit/BrdU 双重免疫荧光染色显示,在 P2d 组小肠存在较多双标记阳性细胞,这些细胞的外形与成熟 ICC 略有不同,细胞的突起较细而稀少(图 2a ~ c),计数显示双标记阳性细胞密度约为 178 个/mm^2。P14d 组双标记阳性细胞减少,大约为 100 个/mm^2,此时双标记阳性细胞的形态与成熟 ICC 基本相似(图 2d ~ f)。而在 P24d 组未见双标记阳性细胞出现(图 2g ~ i),说明接近成年时 ICC 增殖已停止。统计学分析,各组 Kit/BrdU 双标记阳性细胞数量存在显著差异($P<0.05$)。对照实验结果均为阴性。

3 讨论

本研究组最近研究发现,胎儿小肠壁内 ICC 在妊娠 9 ~ 12 周出现后,数量随胎龄增加而增多,突起逐渐延长,至胚胎中晚期 ICC 彼此间形成完整的细胞网络。Kluppel 等报道在小鼠胚胎期 12 ~ 14 d 可见 ICC 出现[7],随后 ICC 逐渐增多,构成肌间神经丛周围的 ICC 细胞群,出生后数日内 ICC 的数量可迅速增加到出生时的 3 倍以上。体外培养研究也表明,在干细胞因子(stem cell factor,SCF)存在下,小鼠胚胎期 18 d 和出生后 2 d 的 ICC 具有增殖能力[8],且在一定范围内与 SCF 的浓度呈正相关。以上结果提示在胚胎发育阶段,ICC 具有一定的增殖能力,细胞突起亦能生长延长。成年动物注射 BrdU,标记分裂、增殖的细胞,但未能发现 ICC 呈 BrdU 阳性,推测可能与 ICC 的存活时间较长、更替慢、正常情况下难以捕捉有关[9]。出生后 ICC 是否仍然具有增殖能力尚未见报道。本研究通过在小鼠生后的不同时期给予注射 BrdU,证明新生小鼠 ICC 具有增殖能力,并随着年龄增长逐渐降低,成年后消失。



a～c：生后 2 d，可见较多 Kit/BrdU 双重免疫荧光染色阳性细胞，细胞突起细长而稀少；d～f：生后 14 d，可见双标记阳性细胞数量减少，细胞的突起较长而粗大；g～i：生后 24 d，未见双标记阳性细胞；箭头所指为 ICC

图 2 Kit/BrdU 双重免疫荧光染色显示生后不同时期小鼠小肠 ICC 的增殖情况，红色为 Kit 染色，绿色为 BrdU 染色

本实验观察到在生后 2 d，Kit/BrdU 双标记阳性细胞较多，这些细胞突起短而细，胞浆丰富，形态上属于幼稚型细胞，推测这部分增加的 ICC 可能来源于未分化的间充质细胞。有报道 ICC 与平滑肌细胞可能源于同一前体细胞（progenitor cells）[10]，因而这些 ICC 的来源可能是间充质干细胞或者前体细胞。从本研究 ICC 增殖的过程看，ICC 的数量在新生 2 d 最多，随后逐渐减少，最后成年前消失。证明 ICC 的增殖是依赖于年龄的。

已证明 Kit 蛋白在 ICC 持续大量表达，对维持 ICC 的正常结构和细胞网络的完整性及功能具有重要作用。据报道用 Kit 蛋白的中和性抗体（ACK2）注射 0～5 d 新生小鼠[11]，可见其肠壁内 ICC 发育受阻，生后 ICC 的数量仍保持在出生前的水平，不足以形成完整的细胞网络。Kit 蛋白的生理作用发挥需要与其配体-SCF 结合，当小鼠编码 SCF 的 steel 基因突变后，肌间神经丛的 ICC 明显减少，甚至缺如。体外培养也显示胚胎期 18 d 和出生后 2 d 的小鼠 ICC，在 SCF 存在的条件下具有一定的增殖能力，上述研究均表明 Kit/SCF 信号通路对 ICC 的分裂增殖和正常发育具有重要的调节作用[12]。因此，本文认为本实验 ICC 增殖过程中 Kit/SCF 信号通路有重要作用。

综上所述，本研究采用 BrdU 注射的方法检测新生小鼠小肠 ICC 的增殖，证明新生小鼠小肠 ICC 具有增殖能力，而且这种增殖能力随着年龄增长逐渐降低，成年前消失。如果在小肠发育过程中，ICC 增殖受阻就可能导致 ICC 细胞数量不足，从而导致胃肠道运动功能障碍。这对研制以 ICC 为靶点治疗胃肠运动功能障碍性疾病的药物提供了新的理论依据。

[参考文献]

[1] Lee HT, Hennig GW, Fleming NW, et al. The mechanism and spread of pacemaker activity through myenteric interstitial cells of Cajal in human small intestine[J]. Gastroenterology, 2007, 132(5): 1852-1865. [2] 龚 斌,梅龙村. 急性细菌性腹膜炎对豚鼠小肠 Cajal 间质细胞的影响[J]. 局解手术学杂志,2007,16(1):19-21.

[3] 黄 悦,胡 蓉,苏 敏,等. 缺血再灌注损伤对豚鼠小肠 Cajal 间质细胞的影响[J]. 局解手术学杂志,2007,16(5):317-319.

[4] Horvath VJ, Vittal H, Ordog T. Reduced insulin and IGF-I signaling, not hyperglycemia, underlies the diabetes-associated depletion of interstitial cells of Cajal in the murine stomach[J]. Diabetes, 2005, 54(5):1528-1533.

[5] Kenny SE, Vanderwinden JM, Rintala RJ, 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.

[6] Lu X, Zhao J, Gregersen H. Small intestinal morphometric and biomechanical changes during physiological growth in rats[J]. J Biomech, 2005, 38(3):417-426.

[7] Kluppel M, Huizinga JD, Malysz J, et al. Developmental origin and Kit-dependent development of the interstitial cells of Cajal in the mammalian small intestine[J]. Dev Dyn, 1998, 211(1):60-71.

[8] Nakahara M, Isozaki K, Vanderwinden JM, et al. Dose-dependent and time-limited proliferation of cultured murine interstitial cells of Cajal in response to stem cell factor[J]. Life Sci, 2002, 70(20):2367-2376.

[9] Mei F, Yu B, Ma H, et al. Interstitial cells of Cajal could regenerate and restore their normal distribution after disrupted by intestinal transection and anastomosis in the adult guinea pigs[J]. Virchows Arch, 2006, 449(3):348-357.

[10] Mei F, Zhu J, Guo S, et al. An age-dependent proliferation is involved in the postnatal development of interstitial cells of Cajal in the small intestine of mice[J]. Histochem Cell Biol, 2009, 131(1):43-53.

[11] Torihashi S, Nishi K, Tokutomi Y, et al. Blockade of kit signaling induces transdifferentiation of interstitial cells of Cajal to a smooth muscle phenotype[J]. Gastroenterology, 1999, 117(1):140-148.

[12] Beckett EA, 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.

(编辑:余汇洋)

外科手术学基础教学方法探讨

刘洪彬[1],文 灿[2] (第三军医大学:1. 学员旅二队;2. 基础部外科应用解剖与手术学教研室,重庆 400038)

[关键词] 外科手术学;教学
[中图分类号] R61;G421 [文献标识码] B [文章编号] 1672-5042(2009)03-0152-01

外科手术学是联系基础医学与临床医学的重要桥梁课,是一门实践性和操作性很强的学科。提高手术学的教学质量,更好地适应新形式下培养高素质人才的要求,对教与学提出了更高的要求,对提高教与学的时效性、实用性,具有积极意义。

1 增强学生对外科实验动物的认识

医学动物实验是外科学教学中不可缺少的重要环节,而由于手术实验课的时间长、次数多、学生技能不熟练等因素,常导致学生在动物身上的劣性行为。因此将人文理念融入教学之中,让学生充分认识到实验动物的伟大,手术过程动作要轻柔细心,避免造成不必要的损伤。对于科学严谨的工作态度的树立,良好的职业行为和习惯的培养大有裨益[1]。

2 强调无菌技术和手术基本操作技术

2.1 无菌观念的培养

在无菌技术的教学过程中,要求要非常严格,并贯穿整个教学过程中,以便培养学生养成良好的习惯。我们注重强调以下几点:①老师必须以身作则,比如:必须戴口罩、帽子才能进手术室,亲自示范外科洗手法,穿手术衣,戴手套,无菌器械或用品的取用与传递等,并指出常见的错误;②发现学生的错误必须立即指出和纠正,督促学生养成良好的习惯,且在每节课完后进行相应的总结;③将无菌技术纳入操作考试内容,并向学生指出每一项的得失分要点。

2.2 基本操作能力的培养

切开、止血、结扎、缝合四项是最主要的基本操作技术,也是手术学基础教学中学生能力培养的重点。手术基本操作的熟练程度主要体现在"稳、准、轻、快"四个方面:①稳,即平稳,包括术者情绪上的稳和操作上的稳,使每一个手术步骤扎扎实实,整个手术过程有条不紊;②准,即准确,每一个操作步骤都要准确无误,特别是解剖血管神经不能有半点差错;③轻,指轻柔和灵巧,是在稳的基础上的轻,要与灵巧密切配合,避免手术中用力猛、动作粗暴而引起严重的组织损伤;④快,即反应灵敏和手术进程快。反应灵敏指手术中出现意外情况时,必须当机立断、迅速做出决策。手术进程快指手术操作中每一个具体动

[收稿日期] 2009-02-24 [修回日期] 2009-03-25

(下转第159页)