维普资讯 http://www.cqvip.com

缺血再灌注损伤对豚鼠小肠 Cajal 间质细胞的影响

黄 悦,胡 蓉,苏 敏,李 红 (贵阳医学院组织学与胚胎学教研室,贵州 贵阳 550004)

[摘 要] **目的** 探讨豚鼠缺血再灌注损伤模型中,小肠 Cajal 间质细胞(ICCs)网络的变化情况。**方法** 采用夹闭肠系膜血管 80 min 然后再恢复血流 12 h 或者 4 d 的方法建立缺血再灌注损伤模型,冰冻切片和全层铺片并结合 KIT 免疫细胞化学染色观察。**结果** 缺血 80 min 再灌注 12 h,在切片和铺片上均可见 ICCs 明显减少,其中 IC-MY 减少最显著,再灌注 4 d ICCs 的数量恢复正常。**结论** 小肠壁内 ICCs 在缺血再灌注模型中可明显减少,但随着时间延长,ICCs 逐渐恢复正常的细胞网络。

[关键词] Cajal 间质细胞;KIT 蛋白;缺血再灌注损伤;小肠;豚鼠
[中图分类号] R656.7; R361 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2007)05-0317-03

Effects of ischemia and reperfusion injury on interstitial cells of Cajal in intestinal wall of the guinea pigs

HUANG Yue, HU Rong, SU Min, LI Hong (Department of Histology and Embryology, Guiyang Medical College, Guiyang Guizhou 550004, China)

Abstract: Objective To investigate the changes of interstitial cells of Cajal networks in the guinea pigs model of ischemia and reperfusion injury. **Methods** Guinea pigs were subjected to 80 minutes intestinal ischemia by occluding the mesenteric vessels followed by reperfusion. Small intestinal segments were resected at 12 hours or 4 days, ICCs were observed on the frozen sections and whole-mount preparation with Kit immunohistochemistry. **Results** In the bowel segment with 80 minutes ischemia followed by 12 hours reperfusion, ICCs decreased obviously on both frozen sections and whole-mount preparation, especially for IC-MY, while the number and distribution of ICCs was recovered from 80 minutes ischemia followed by 4 days reperfusion. **Conclusion** Ischemia and reperfusion injury might lead to temporary loss of ICCs, and it would soon recovered.

Keywords: interstitial cells of Cajal; KIT protein; ischemia and reperfusion injury; intestine; guinea pigs

Cajal 间质细胞(interstitial cells of Cajal, ICCs)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 ICCs。在胃肠道根据其存在部位,一般分为四种亚型:IC-MY 位于环形和纵行平滑肌之间的肌间神经丛周围;IC-IM 位于环行和纵行平滑肌内;IC-DMP 位于靠近粘膜下层部位的环行平滑肌内的深部肌神经丛附近;IC-SM 位于结肠环行平滑肌层的内侧,紧靠粘膜下层的部位[1]。ICCs 是胃肠道自主节律性运动的起搏细胞和兴奋传导细胞[2],在调节消化管的运动功能方面具有重要作用[3]。因为小肠对缺血较为敏感,所以在小肠移植手术中,缺血再灌注损伤不可避免。有资料已证明在缺血再灌注损伤模型中粘膜的变化以及肌层在局部和全身免疫应答中的作用[4]。一些研究者也报道了胃肠蠕动的变化[5-6]。然而,作为胃肠道的起搏细胞 ICCs 在小肠缺血再灌注损伤的作用尚不完全清楚。因此,本研究采用夹闭肠系膜血管 80 min 然后再恢复血流 12 h 或者 4 d 的方法建立缺血再灌注损伤模型,并作 KIT 免疫细胞化学染色,以观察 Cajal 细胞的变化。

1 材料与方法

1.1 材料

45~60 d 龄豚鼠(第三军医大学实验动物中心提供),雌雄不限,共 15 只。

1.2 方法

1.2.1 缺血再灌注损伤模型建立 按照文献[7]中所用方法,夹闭肠系膜血管 80 min 后再灌注 12 h 或 4 d 建立缺血再灌注损伤模型。

1.2.2 免疫细胞化学染色 实验共分为 3 组,两组为实验组,一组正常对照组,每组 5 只动物,实验组分别在夹闭肠系膜血管 80 min 后再灌注 12 h 或 4 d 取小肠,经生理盐水冲洗后,OCT 包埋,恒冷箱冰冻切片机切片,片厚 7~10 μm,风干,100% 丙酮固定 30 min(25 ℃),同时制作小肠全层铺片。染色方法为间接酶标抗体法[8]。铺片经 0.01 mol/L PBS 充分漂洗后,0.03% H_2O_2/甲醇封闭内源性过氧化物酶 20 min(25 ℃),1% BSA 孵育 30 min 后加入第一抗体,KIT 单克隆抗体(1∶100,eBIOSCIENCE 公司) 4 ℃ 48 h,HRP 标记的兔抗大鼠 IgG 抗体(1∶100,DAKO 公司) 25 ℃,60 min,0.05% Tris2HCl/0.05%

[作者简介] 黄 悦(1973-),男,贵州省习水县人,讲师,硕士,主要从事胃肠道动力学方面的研究。电话:(0851)6908567

[收稿日期] 2007-06-28 [修回日期] 2007-08-20

维普资讯 http://www.cqvip.com

DAB/0.01% H_2O_2（pH7.5）显色，显微镜下观察，适时终止反应，终产物为棕褐色，水溶性封片剂封片。对照实验以正常豚鼠血清代替一抗，或兔血清代替二抗，结果均为阴性。各步骤间用PBS漂洗3次。选取正常对照组豚鼠小肠全层铺片作为正常对照组，染色方法同上。

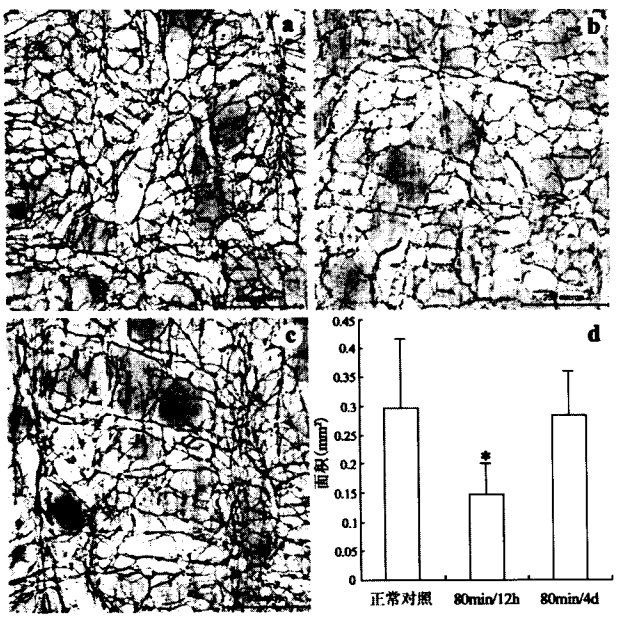
1.3 半定量分析及统计学处理

选取正常和各实验组铺片15张，进行KIT免疫细胞化学染色，应用Image-pro Plus 5.0图像分析系统，随机计数1 mm^2内的KIT阳性细胞面积，结果以平均值±标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，采用SPSS11.0统计分析软件进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 KIT免疫细胞化学染色

KIT免疫细胞化学染色显示，正常豚鼠空肠的ICCs主要分布在肠壁肌间神经丛周围、深肌丛附近及环行平滑肌内，肠壁切片及铺片均可见IC-MY呈网络状分布于肠壁肌间神经丛周围，细胞体呈梭形或卵圆形，核周胞质少，胞浆着色浅，可见2～4个细长的突起，每个突起有2～3级的分支（图1a）。缺血80 min再灌注12 h组铺片可见IC-MY明显减少，距离肌间神经丛越远的ICCs减少越明显，细胞网络被破坏（图1b）。缺血80 min再灌注4 d组ICCs基本恢复正常分布（图1c）。



a：正常豚鼠小肠铺片；b：80 min/12 h，I/R组；c：80 min/4 d，I/R组；d：各组KIT阳性细胞面积，*与正常对照比较，$P<0.05$

图1 KIT免疫细胞化学染色及阳性细胞面积变化

2.2 KIT阳性细胞面积的变化

通过图像分析计算每平方毫米内KIT阳性细胞面积的变化，结果显示正常小肠KIT阳性面积为（0.297±0.118）mm^2，而缺血80 min再灌注12 h和4 d分别为（0.146±0.054）mm^2和（0.283±0.077）mm^2。统计学分析显示，缺血80 min再灌注12 h（80 min/12 h，I/R组）与正常对照组间有显著性差异，$P<0.05$。而缺血80 min再灌注4 d（80 min/4 d，I/R组）与正常对照组间差异无显著性，$P>0.05$（图1d）。

3 讨论

c-kit为一种原癌基因，位于人染色体4q11-12，为白色斑点显性基因（dominant white spotting）的等位基因，编码干细胞因子（stem cell factor）的Ⅲ型酪氨酸激酶受体（Kit受体），该受体分为游离型和膜结合型两种。应用抗c-kit蛋白的抗体于胚胎晚期或出生前注射阻断Kit受体的功能，发现ICCs的正常发育受到严重的影响。自发性c-kit基因突变的小鼠研究表明，c-kit基因丢失的小鼠胃肠道呈扩张性肠麻痹[2]，肌间神经丛周围，c-kit mRNA表达的阳性细胞明显减少，细胞网络缺如，肌间神经丛附近的电慢波消失[9]。表明KIT蛋白可作为胃肠道ICCs的一种特异性标志物，为研究ICCs提供了有力的手段。

肠缺血再灌注损伤是严重创伤、烧伤、休克和外科大手术后常见的病理生理过程。创伤、烧伤、休克时由于应激反应，全身血流重新分布，以保证心、脑等生命器官的血供，肠道作为首要的牺牲器官，血流量减少较体循环更为显著，因此，可出现严重的缺血、缺氧及再灌注损伤，其中包括了胃肠道运动功能障碍。ICCs是胃肠道运动的起搏细胞。在缺血再灌注损伤病理过程中可能受到损害。在本实验中，可见ICCs尤其在肌间神经丛部位减少明显，可能是缺血再灌注损伤病理过程中，由于氧自由基损伤、炎性反应中一些炎性介质等损伤了ICCs，从而导致部分ICCs消失。随着时间延长，氧自由基被清除，炎性反应减轻，炎症介质也减少，ICCs逐渐恢复正常的分布。虽然ICCs在成年豚鼠可增殖[10]，但ICCs的这种变化可能是由于KIT表型在损伤因素存在情况下丢失所引起的，而不是ICCs增殖引起。ICCs作为胃肠道运动的起搏细胞，缺血再灌注初期时在氧自由基和炎症介质的影响下，可出现KIT表型丢失，但随着再灌注时间的延长，氧自由基被清除，炎症的消失，表型可恢复正常，可以推测缺血再灌注损伤对ICCs的影响是功能性和一过性的。

[参考文献]

[1] Komuro T, Tokui K, Zhou DS. Identification of the interstitial cells of Cajal[J]. Histol Histopathol, 1996, 11(3): 769-786.

[2] Huizinga JD, Thuneberg L, Kluppel M, et al. W/kit gene required for interstitial cells of Cajal and for intestinal pacemaker activity[J]. Nature, 1995, 373(6512): 347-349.

[3] 胡晔东，林 琳，张红杰，等. Cajal间质细胞与一氧化氮在吗啡诱导慢传输运动小鼠结肠中的改变[J]. 中国临床康复，2005，9(44)：

维普资讯 http://www.cqvip.com

134-136.
[4] Hierholzer C, Kalff JC, Audolfsson G, et al. Molecular and functional contractile sequelae of rat intestinal ischemia/reperfusion injury[J]. Transplantation, 1999,68(9):1244-1254.
[5] Ballabeni V, Barocelli E, Bertoni S, et al. Alterations of intestinal motor responsiveness in a model of mild mesenteric ischemia/reperfusion in rats[J]. Life Sci, 2002,71(17):2025-2035.
[6] Takahashi A, Tomomasa T, Kaneko H, et al. Intestinal motility in an in vivo rat model of intestinal ischemia-reperfusion with special reference to the effects of nitric oxide on the motility changes[J]. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2001,33(3):283-288.
[7] 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.
[8] Komuro T, Zhou DS. Anti-c-kit protein immunoreactive cells corresponding to the interstitial cells of Cajal in the guinea-pig small intestine[J]. J Auton Nerv Syst, 1996,61(2):169-174.
[9] Kito Y, Ward SM, Sanders KM. Pacemaker potentials generated by interstitial cells of Cajal in the murine intestine[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2005,288(3):C710-C720.
[10] 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.

(编辑:余汇洋)

骨内腱鞘囊肿1例报告

唐良华,郭庆山,贾 凡 (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所骨科,重庆 400042)

[关键词] 骨内腱鞘囊肿;股骨
[中图分类号] R686.1 [文献标识码] B [文章编号] 1672-5042(2007)05-0319-01

骨内腱鞘囊肿是邻关节软骨下的良性囊肿,为纤维组织构成的多房性病变伴广泛的粘液样变。我院2006年10月收治了1例骨内腱鞘囊肿病例,采用囊肿刮除术加植骨术治疗,取得了满意效果。现报告如下。

1 临床资料

患者男,51岁,因左膝关节间歇性隐痛2年余,复发加重伴胀痛3月入院。患者2年前无明显诱因出现左膝关节疼痛,为间歇性隐痛,无明显夜间疼痛加剧的表现,在当地医院诊断为"骨质疏松症",经抗骨质增生治疗,无明显好转,无畏寒、发热,无潮热、盗汗,无明显消瘦。3月前上述症状加重,疼痛间隔时间变短,疼痛性质转为胀痛,在受压、撞击、屈膝时疼痛明显,行走不受限。入院查体:全身浅表淋巴结无肿大,左股骨骨髁部压痛明显,无明显包块。X线正侧位片示:左膝关节轻度退行性变。左膝MRI示:左股骨内髁异常信号,有一个3.1 cm×3.5 cm的病灶,考虑良性骨病。

2 方法与结果

采用囊肿刮除术加植骨术治疗。常规消毒铺单,沿左股骨下端内侧作一弧形切口,长约12 cm,切开皮肤、皮下组织,显露左股骨内髁,见左股骨内髁的前内下方有一约2.8 cm×3.2 cm的青紫色凸起,用骨凿凿开包块部的左股骨内髁骨皮质,骨皮质凿破时有血液流出,凿开骨皮质见一约3.1 cm×3.5 cm的骨性囊腔,内有已萎缩组织约1.9 cm×1.2 cm,骨囊腔光滑,无组织浸润。取出囊腔组织送病理检验,结果报告为:左股骨内髁骨内腱鞘囊肿。本例病人经过囊肿刮除术加植骨术治疗,病愈出院,随访半年无并发症。

3 讨论

骨内腱鞘囊肿临床上比较少见,1972年世界卫生组织将其统一命名为邻关节骨囊肿,放射学上表现为边界清晰、边缘有骨硬化带的溶骨性病变[1]。该病的发病年龄为20~40岁,好发于髋、膝、踝、肘等关节,也可见于髂骨、股骨、跖骨、月骨、舟骨等处。病灶常发生于骨端关节面下,但不与关节面和关节腔相通。本病的主要症状是关节肿胀或钝痛,活动后加重,发病机理尚不明确,多认为是由骨膜腱鞘囊肿对骨压迫而渗透入骨内形成。Schajowiez等根据囊腔是否与关节腔相通而将其分为特发型(与关节腔不相通)和穿透型(与关节腔相通)。古贺三郎根据病变发生在骨内外和骨皮质的关系将其分为3型,Ⅰ型紧贴于骨皮质,Ⅱ型为Ⅰ型穿透骨皮质时入骨内,Ⅲ型发生于骨内。Ⅰ、Ⅱ型称为骨膜下腱鞘囊肿,Ⅲ型称为骨内腱鞘囊肿[2]。X线表现特点为:①病变邻近关节,位于长骨末端关节软骨下,呈偏心、圆形或椭圆形溶骨区。②溶骨区有轻度膨胀,邻近骨皮质变薄,其中可见粗细不均的条状间隔。③囊腔周围有轻度硬化改变。④有的病例可见有小裂隙与关节间隙相通[3]。本病以手术治疗为主,一般采用囊肿刮除术加植骨术。

[参考文献]

[1] 陈 憩,丁晓毅,杜联军,等. 邻关节骨囊肿的CT、MR表现特点[J]. 实用放射学杂志,2006,22(9):1091-1093.
[2] 魏新建,王晓飞,王晓鸽,等. 邻关节骨囊肿(骨内腱鞘囊肿)[J]. 中国矫形外科杂志,2002,10(11):1048-1050.
[3] 田泽高,马化锋. 邻关节骨囊肿的诊断与治疗[J]. 四川医学,2005,26(4):422-423.

(编辑:雷 艳)
[收稿日期] 2007-07-18 [修回日期] 2007-08-20