小肠缺血再灌注损伤导致 Cajal 间质细胞凋亡的实验研究

韩 鹃,何扬涛,梅 峰 (第三军医大学基础医学部组织学与胚胎学教研室,重庆 400038)

[摘 要] **目的** 探讨小肠缺血再灌注损伤对 Cajal 间质细胞(interstitial cells of Cajal,ICC)的影响。**方法** 采用缺血 60 min 再灌注 6 h(I_{60}/R_{6h})、12 h(I_{60}/R_{12h})和 14 d(I_{60}/R_{14d})的豚鼠小肠,通过免疫细胞化学和 TUNEL 法检测 ICC 的凋亡。**结果** I_{60}/R_{6h} 豚鼠小肠可见少量 TUNEL 阳性 ICC。I_{60}/R_{12h} 可见较多的凋亡 ICC,同时 ICC 细胞数量明显减少,细胞网络不完整。I_{60}/R_{14d} 的 ICC 恢复正常数量和分布。不同时间点之间 Kit/TUNEL 双标阳性细胞数量存在显著差别($P<0.05$)。**结论** 小肠缺血再灌注损伤导致 ICC 凋亡,一段时间后 ICC 能够恢复正常。

[关键词] Cajal 间质细胞;凋亡;Kit 蛋白;TUNEL

[中图分类号] R656.7;Q255 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2010)02-0080-03

A study on apoptosis of interstitial cells of Cajal induced by intestinal ischemia and reperfusion injury

HAN Juan, HE Yang-tao, MEI Feng (Department of Histology and Embryology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objectives To investigate the apoptosis of interstitial cells of Cajal induced by intestinal ischemia and reperfusion injury. **Methods** The small intestine were resected at 6 hours (I_{60}/R_{6h}), 12 hours (I_{60}/R_{12h}) or 14 days (I_{60}/R_{14d}) after 60 min intestinal isechemia and reperfusion in adult guinea pigs and studied by immunohistochemistry and TUNEL method. **Results** Kit/TUNEL double labeling cells were found out in the small intestine at I_{60}/R_{6h} and I_{60}/R_{12h}, and those ICC also decreased in cell number. ICC recovered to normal in amount and morphology at I_{60}/R_{14d}. **Conclusion** Our result indicate that ICC apoptosis after intestinal isechemia and reperfusion and recovered to normal after about 2 weeks.

Keywords: interstitial cells of Cajal; apoptosis; Kit; TUNEL

Cajal 细胞(interstitial cells of Cajal,ICC)是分布在小肠内环形平滑肌和纵行平滑肌之间、肌间神经丛周围的一种特殊的间质细胞[1-4]。近年研究表明 ICC 与贲门失迟缓症、糖尿病性胃轻瘫以及慢性便秘等胃肠运动功能障碍性疾病密切相关[1-3,5]。临床研究发现在缺血性休克和小肠移植患者,常常出现胃肠道运动功能障碍,那么这些运动功能障碍是否与 ICC 有关尚不清楚。小肠对缺血再灌注损伤十分敏感,常常导致小肠内细胞凋亡。目前的研究发现,在大鼠的小肠缺血再灌注损伤中,ICC 出现细胞数量的减少和细胞网络的破坏[3],但作者认为这可能与 ICC 表型改变有关。那么这种 ICC 的减少是否与凋亡有关尚无相关报道。因此,本研究采用免疫细胞化学法和 TUNEL 法检测小肠缺血再灌注损伤过程中 ICC 的凋亡。

1 材料与方法

1.1 材料

6 周龄豚鼠,雌雄不限(第三军医大学实验动物中心提供),共 15 只。豚鼠小肠缺血 60 min 再灌注,按再灌注时间分为再灌注 6 h(I_{60}/R_{6h})、12 h(I_{60}/R_{12h})和 14 d (I_{60}/R_{14d})组。分别取小肠标本备用。

1.2 方法

1.2.1 免疫细胞化学染色 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,eBIOSCIENCE 公司)4 ℃,48 h;Cy3 标记的兔抗大鼠 IgG 抗体(1:100,DAKO 公司)25 ℃,60 min。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。各步骤间用 PBS 漂洗 3 次。

1.2.2 TUNEL 法检测凋亡 采用 TUNEL 检测试剂盒(Roche 公司),按照前述方法铺片,4% 多聚甲醛固定(20 min,室温),0.1% Triton X-100、0.01 mol/L PBS 处理 20 min,TUNEL 液由 45 μl 标记液和 5 μl 酶溶液组成,37 ℃避光孵育 1 h,0.01 mol/L PBS 漂洗 3 次,封片后观察。

[基金项目] 国家自然基金资助项目(30900465);重庆市自然科学基金资助项目(2009BB5157)

[作者简介] 韩 鹃(1982-),女,重庆市人,助教,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

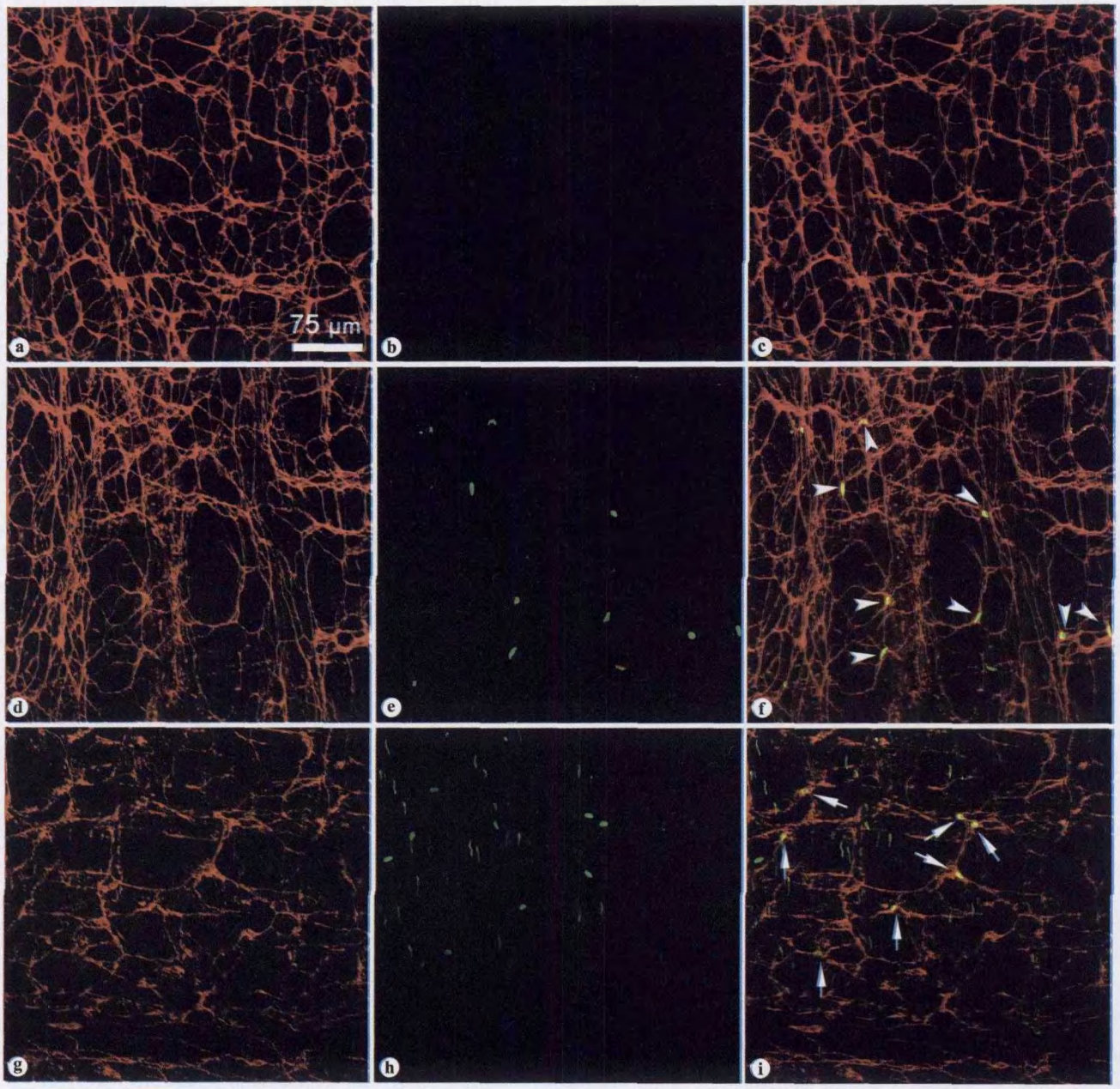
[收稿日期] 2010-01-21 [修回日期] 2010-02-09

1.3 半定量分析及统计学处理

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/TUNEL 双标阳性的细胞数量，统计结果用 SPSS 11.0 软件进行单因素方差分析，$P<0.05$ 具有显著性差异。

2 结果

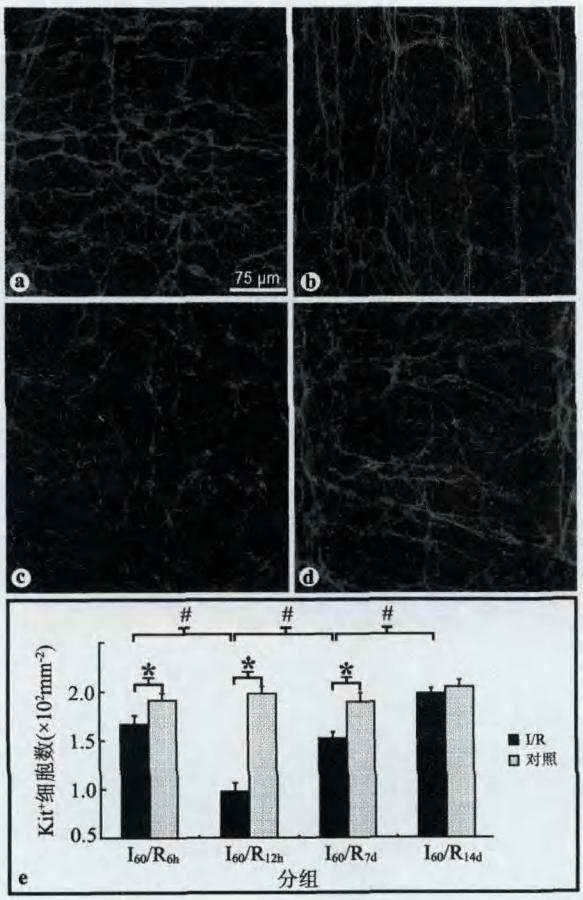
TUNEL 染色标记在细胞核，Kit/TUNEL 双重免疫荧光染色显示，在正常豚鼠小肠未见双标阳性细胞（图 1a、b、c），I_{60}/R_{6h} 可见较多双标阳性细胞，这些细胞的形态与正常的 ICC 无明显差别（图 1d、e、f），提示缺血再灌注损伤导致 ICC 细胞凋亡。在 I_{60}/R_{12h}，仍可见较多 TUNEL/Kit 双标阳性细胞，同时细胞突起变短变少，细胞网络不完整（图 1g、h、i），提示 ICC 功能可能受到损害。统计结果显示双标阳性细胞数量在 I_{60}/R_{6h} 和 I_{60}/R_{12h} 分别为（16.7 ± 3.4）/mm² 和（17.4 ± 4.2）/mm²，而对照组未见双标阳性细胞。



a、b、c：对照未见凋亡细胞；d、e、f：I_{60}/R_{6h} 可见较多的双标阳性细胞；g、h、i：I_{60}/R_{12h} 凋亡细胞增多，同时 ICC 细胞网络不完整；a、d、g：Kit 免疫荧光染色（红色）；b、e、h：TUNEL 染色（绿色）；c、f、i：Kit/TUNEL 双重染色

图 1 Kit/TUNEL 双重免疫荧光染色显示生后不同时期小肠 ICC 的凋亡

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(图2a)。I_{60}/R_{6h}小肠ICC细胞形态和密度变化不明显,细胞网络仍较完整(图2b),到I_{60}/R_{12h}小肠ICC细胞数量明显减少,同时细胞网络不完整,说明缺血再灌注损伤导致ICC减少(图2c),14 d后(I_{60}/R_{14d})小肠ICC细胞数量和形态恢复正常,同时细胞网络完整,说明ICC恢复正常(图2d)。不同时期ICC的细胞密度存在明显差别,$P<0.05$(图2e)。



a:对照;b:I_{60}/R_{6h};c:I_{60}/R_{12h};d:I_{60}/R_{14d};e:ICC细胞数量的变化;*:与对照比较,$P<0.05$;#:组间比较,$P<0.05$

图2 Kit免疫荧光染色显示缺血60 min后再灌注不同时间小肠ICC的变化

3 讨论

小肠缺血再灌注损伤常见于缺血性休克和小肠移植,常常导致细胞凋亡及小肠的运动功能障碍,包括小肠蠕动功能减弱、平滑肌收缩无力、对神经递质反应较弱等。同时也发现大鼠小肠缺血再灌注损伤可以导致ICC细胞数量的减少及小肠的运动功能减弱[6]。与之相似,在我们的实验中,也发现ICC在缺血再灌注损伤后12 h,Kit阳性的ICC细胞数量明显减少。ICC细胞数量的减少是由于ICC表型改变的原因,也就是说有一部分的ICC不表达Kit蛋白[7]。

小肠缺血再灌注损伤常常导致细胞凋亡,如小肠平滑肌细胞、上皮细胞和固有层内的细胞,但是ICC是否发生凋亡并未见报道。在本研究中采用TUNEL法检测细胞凋亡,TUNEL法所检测的凋亡细胞是早期凋亡细胞,在凋亡早期出现DNA断裂,而TUNEL法能够标记这些细胞[8]。TUNEL/Kit双标染色显示,在小肠缺血再灌注损伤后6 h和12 h均可见双标阳性细胞,提示ICC出现了细胞凋亡,而且通过统计发现,凋亡的ICC细胞大约占总细胞数的10%,说明缺血再灌注可导致ICC凋亡。在不同的时期可见ICC凋亡细胞在6 h与正常ICC形态相似,但是12 h后,凋亡的ICC突起明显减少,提示这些细胞可能出现在凋亡的不同时期。我们也注意到ICC细胞网络在再灌注12 h后,Kit阳性细胞数量明显减少,同时细胞网络不完整,提示这些改变可能与小肠缺血再灌注损伤导致的运动功能障碍有关。本研究采用TUNEL法检测成年豚鼠小肠ICC的凋亡,证明缺血再灌注损伤可导致小肠ICC凋亡,细胞数量减少以及细胞突起减少,缺血再灌注14 d后,ICC基本恢复正常。本研究将为缺血性休克等原因导致小肠缺血再灌注损伤后胃肠道运动功能障碍机制提供新的理论依据。

[参考文献]

[1] 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.

[2] 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.

[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] 于 彬,韩 鹃,梅 峰.新生小鼠小肠Cajal间质细胞增殖的实验研究[J].局解手术学杂志,2009,18(3):149-152.

[5] 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.

[6] 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.

[7] Mei F, Han J, Huang Y, et al. Plasticity of interstitial cells of Cajal: a study in the small intestine of adult guinea pigs[J]. Anat Rec (Hoboken), 2009,292(7):985-993.

[8] Mei F, Guo S, He YT, 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.

(编辑:余汇洋)