DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.19.020
第26卷第19期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 19
2004年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2004

文章编号:1000-5404(2004)19-1745-03

论著

糖尿病大鼠小肠 Cajal 间质细胞超微结构的改变

龙庆林,房殿春,史洪涛,罗元辉 (第三军医大学西南医院全军消化内科中心,重庆 400038)

提 要:目的 明确糖尿病大鼠小肠Cajal间质细胞(interstitial cells of Cajal, ICC)超微结构的变化,探讨糖尿病小肠运动功能改变原因。方法 用链尿佐菌素建立大鼠糖尿病模型,3个月后测定小肠传输速度,对小肠组织进行透射电镜观察。结果 糖尿病大鼠小肠传输速度明显延迟,Cajal间质细胞与其他细胞间的缝隙连接显著减少、结构破坏、连接松散;细胞器变性、减少;胞质广泛溶解;核周间隙增宽。结论 糖尿病Cajal间质细胞变性可能是导致小肠运动功能低下的一个重要原因。

关键词:小肠;Cajal间质细胞;超微结构
中图法分类号:R322.45;R329.27;R587.102 文献标识码:A

Changes of ultrastructure of interstitial cells of Cajal in the small intestine of diabetic rats

LONG Qing-lin, FANG Dian-chun, SHI Hong-tao, LUO Yuan-hui (Gastroenterology Research Center, Southwest Hospital, Third Military Medicine University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To clarify the changes of ultrastructure of interstitial cells of Cajal in the small intestine of diabetic rats. **Methods** Rats were randomly divided into diabetic group and control group. The rate of the small intestinal transit was measured and the tissues of the small intestine were observed by transmission electron microscopy at 3 months after the establishment of rat model of diabetics. **Results** In the diabetic rats, the rate of small intestinal transit was delayed as compared with that in the control group. The number of the gap junction of interstitial cells of Cajal in the small intestine of diabetic rats decreased significantly, and the rest structures were damaged. Damaged organelles and formation of vacuoles were also found. **Conclusion** The changes of ultrastructure of interstitial cells of Cajal in the small intestine may be one of the mechanisms resulting in slow rate of the small intestinal transit in diabetic rats.

Key words: small intestine; interstitial cells of Cajal; ultrastructure

我国糖尿病患病率较高,1996年全国流行病学调查结果为3.21%,并有急剧增加趋势。糖尿病并发胃肠道病变较多见:消化间期移行性复合运动(MMC)明显异常,小肠周期性压力活动不协调,小肠传递时间延长。但到目前为止,糖尿病并发胃肠道病变机制尚不清楚,目前认为与糖尿病植物神经病变、高血糖以及平滑肌变性等有关。

Cajal间质细胞是分布在消化道自主神经末梢与平滑肌细胞之间一类特殊细胞。目前认为小肠Cajal间质细胞(interstitial cells of Cajal, ICC)是胃肠道运动的起博细胞,它不仅能产生节律性慢波电活动,ICC细胞膜上还存在多种神经递质受体,这些受体使ICC能调节神经递质传递,并作为神经输出与平滑肌之间的中介。近来还发现许多胃肠道运动疾病与ICC的异常密切相关。本实验主要观察糖尿病大鼠小肠Cajal间质细胞超微结构变化,探讨糖尿病小肠运动功能改变原因。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康2月龄Wistar大鼠50只(第三军医大学实验动物中心提供),体质量100~160 g,雌雄各半,分为实验组和对照组。实验组Wistar大鼠30只,用于建立大鼠糖尿病模型;正常对照组20只。

1.2 糖尿病模型的建立

实验组大鼠禁食12 h后,腹腔内注射链尿佐菌素(streptozotocin, STZ) 60 mg/kg;正常对照组腹腔内只注射等量的生理盐水。两组大鼠每2周采用快速血糖测定仪测定血糖1次,同测时体重,并观察大鼠的食量、尿量、饮水情况等;糖尿病组大鼠以血糖≥16.9 mmol/L者为糖尿病模型建立成功,血糖<16.9

作者简介:龙庆林(1970-),男,湖南省茶陵县人,博士,主治医师,主要从事胃肠动力学方面的研究,发表论文10余篇。电话:(023)68754124,E-mail:qinglinlong@yahoo.com.cn
通信作者:房殿春,电话:(023)68754124
收稿日期:2003-09-16;修回日期:2003-12-11

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

mmol/ L 者剔除实验。

1.3 小肠传输速率的测定

造模 3 个月后记录正常大鼠及糖尿病大鼠小肠传输速率。

大鼠禁食、水 12 h 后, 抽取 1 mg/ ml 美蓝液 0.4 ml 胃内灌注, 30 min 后脱臼处死大鼠, 立即剪开腹腔, 游离小肠, 置于冰上, 迅速测定小肠总长度(回盲瓣至幽门的距离)以及小肠内蓝色末端距幽门的距离, 计算小肠传输速率。小肠传输速率= 蓝色末端距幽门的距离/小肠总长度。

1.4 电镜观察

测定小肠传输速率后, 立即取 1 块长度约为 0.5 cm 的小肠组织(距幽门约 10 cm), 并置于冰凉的 Kreb-Ringer 液中, 沿纵轴剪开肠管, 清洗干净肠腔内容物。Kreb-Ringer 液组份(g/ L): NaCl 7.67、NaH_2PO_4 0.15、$MgCl_2$ 0.2、$CaCl_2$ 0.2、$NaHCO_3$ 2.11、KCl 0.42、葡萄糖 0.9、牛血清白蛋白 1。清洗干净的小肠组织立即放入 3%戊二醛中固定, 0.2 mol/ L 蔗糖磷酸缓冲液漂洗 2 次, 1%四氧化锇固定 2 h, 丙酮递度脱水, 环氧树脂 618 包埋, 半薄切片定位, 超薄切片, 醋酸铀-柠檬酸铅双重电子染色, 在 JEOL-2000EX 型透射电镜下观察、照像。

1.5 统计学处理

数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用 t 检验。

2 结果

2.1 一般情况

糖尿病模型建立后, 糖尿病组大鼠血糖明显升高, 出现了明显的多饮、多尿、多食。注射 STZ 3 个月后, 糖尿病组大鼠皮肤溃疡、白内障发生率明显高于正常对照大鼠, 血糖显著高于正常大鼠(22.3 mmol/ L *vs* 4.2 mmol/ L, $P<0.01$), 体重明显低于正常大鼠(197.9 g *vs* 264.7 g, $P<0.01$), 小肠传输速率明显延迟(0.19 *vs* 0.63, $P<0.01$), 见表 1。

表 1 小肠传输速率的变化

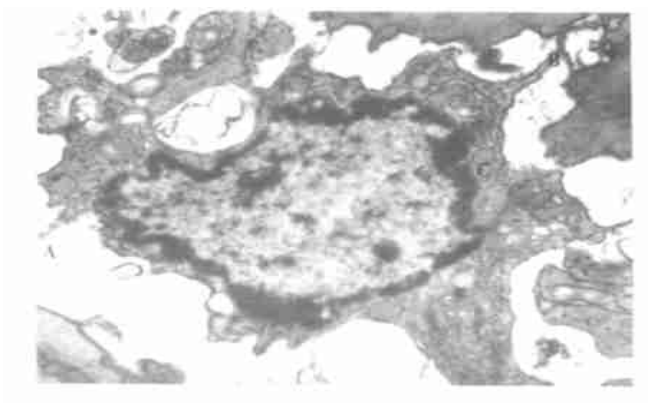
Tab 1 Changes of the rate of the small intestinal transit

Group	Total length (cm)	Propulsive length (cm)	Propulsive ratio (%, $\bar{x}\pm s$)
Control	121.4±9.1	76.1±15.3	62.5±9.9
Diabetic	131.6±11.7	25.1±13.1 **	18.7±9.3 **
t	−1.758	8.307	9.833

**: $P<0.01$, *vs* control

2.2 小肠 Cajal 间质细胞超微结构

正常大鼠小肠 Cajal 间质细胞(图 1)特点: 在小肠环行平滑肌较厚的外层与较薄的内层之间以及环行肌层与纵行肌层之间的肌间神经丛周围可见到较多的 Cajal 间质细胞, 往往与神经纤维末梢及神经束伴随存在, 并由许多的缝隙连接紧密连接在一起, 肌间神经丛周围与环肌层内 Cajal 间质细胞共同超微结构特点为: ①Cajal 间质细胞相互之间、与平滑肌细胞间可见较多的缝隙连接; ②细胞核大而不规则, 胞质相对较少; ③细胞质和胞突内线粒体丰富, 核糖体多见, 可见到粗面内质网、滑面内质网、高尔基体等; ④有较多中间丝, 无粗肌丝; ⑤有许多胞膜小凹沿细胞膜分布。但不同部位 Cajal 间质细胞的超微结构特点又不完全相同: 位于小肠环行平滑肌较厚的外层与较薄的内层之间的 Cajal 间质细胞(ICC-DMP)为长形细胞, 其走向与环肌细胞的细胞轴一致, 胞质内高密度电子较少, 基底层与许多胞膜小凹沿细胞膜分布, 发育良好的高尔基体和粗面内质网主要位于核周区域, 许多线粒体遍布胞浆, 细胞骨架成分如微管、微丝、中间丝在胞质突起中含量丰富, ICC-DMP 最显著特点就是相互之间的连接以及与平滑肌之间的连接常为巨大的裂隙连接; 位于肌间神经丛周围的 Cajal 间质细胞(ICC-AP)滑面内质网的池很少膨胀, 胞质突起内中间丝丰富, 可见到胞膜小凹, 但基底层极少见到。

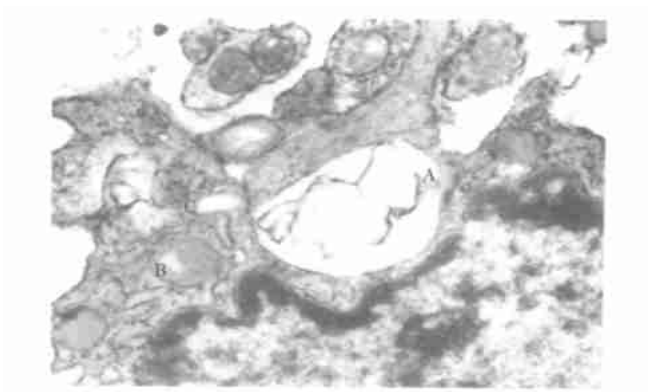


A: Processe; B: Gap junction; C: Mitochodrion

图 1 正常大鼠小肠 **Cajal** 间质细胞超微结构 (TEM×6 000)

Fig 1 Interstitial cells of Cajal of the small intestine of the normal rats (TEM×6 000)

糖尿病大鼠小肠 Cajal 间质细胞明显减少, 其超微结构也发生了显著变化(图 2): Cajal 间质细胞与平滑肌和神经末梢之间以及 Cajal 间质细胞相互之间的缝隙连接显著减少, 尚存的细胞间连接的结构也有破坏, 结构不清, 连接松散; 细胞的基膜结构不完整, 缺乏连续性, 有的基膜与细胞膜分离, 形成空洞; 细胞内的胞质广泛溶解, 有大量的胞质内空泡形成, 空泡大多沿质膜分布; 细胞内的细胞器数量明显减少, 如线粒体、核糖体等均显著减少; 线粒体肿胀、空泡样变、髓鞘样改变甚至溶解, 内质网扩张; 核周间隙明显增宽。



A: Broadened gap junction; B: Mitochondrion; C: Vacuole

图 2 糖尿病大鼠小肠 **Cajal** 间质细胞超微结构 (TEM×10 000)

Fig 2 Interstitial cells of Cajal of the small intestine of the diabetic rats (TEM×10 000)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

3　讨论

1893 年, 西班牙神经解剖学家 Cajal 用甲基蓝及嗜银染色法在胃肠道观察到一类特殊的间质细胞称为 Cajal 细胞。这类细胞分布在自主神经末梢与平滑肌细胞之间, 呈纺锤型或星状, 发出细长的分支形成细胞突起, 突起与平滑肌细胞关系密切, 其胞核大但胞浆少。Cajal 间质细胞广泛分布于消化道, 根据其不同部位可分为 5 类[1]: ICC-AP (Auerbach's myenteric plexus): 位于环肌、纵肌之间; ICC-DMP (deep muscular plexus): 位于小肠环行平滑肌较厚的外层与较薄的内层之间; ICC-SMP (submuscular plexus): 位于环肌粘膜面; ICC-CM: 位于环肌较厚的外层内; ICC-IM: 位于纵肌内。

Cajal 间质细胞分布于整个消化道, 但在不同组织、不同器官分布又有所差异, 如胃的 Cajal 间质细胞主要分布于环肌层和肌间神经丛区域; 而结肠 Cajal 间质细胞位于粘膜下神经丛、Auerbach 肌间神经丛以及环肌内小神经束周围。我们观察到大鼠小肠 Cajal 间质细胞分布于小肠环行平滑肌较厚的外层与较薄的内层之间以及环行肌层与纵行肌层之间的肌间神经丛周围, 也有人在环肌外层和纵肌内见到 Cajal 间质细胞, 但在本实验中, 我们在环肌外层和纵肌内并没有发现有 Cajal 间质细胞存在。

尽管目前有检测 Cajal 间质细胞方法很多, 如 C-kit 免疫组化染色, 碘化锌-锇酸染色等, 但金标准仍然是透射电镜检查多种超微形态学特征。尽管不同部位的 Cajal 间质细胞一些结构存在可变性, 但 Cajal 间质细胞公认的超微特征为: ①胞质和突起内含丰富的线粒体; ②胞质内有成束中间丝; ③胞质内无粗肌丝; ④有胞膜小凹; ⑤形态不一的基底层; ⑥Cajal 间质细胞与三级神经束之间存在突触样连接; ⑦发育良好的滑面内质网, 粗面内质网可见; ⑧Cajal 间质细胞相互之间、与平滑肌细胞间可见缝隙连接。在本实验中电镜下所见的 ICC 均具有上述特点: 如胞膜小凹、丰富的线粒体等, 并可见到 ICC 细胞与其它细胞之间的缝隙连接。在本实验中所见的 Cajal 间质细胞基本具有上述特征: 丰富的线粒体、基底层、胞膜小凹、内质网以及缝隙连接, 而且无粗肌丝。

以前, 由于 Cajal 间质细胞拥有多种细胞的特征, 有人将其描述为"杂种"细胞, 随着研究的深入, 逐渐认为其是一种特殊类型的细胞。电镜下, Cajal 间质细胞需与平滑肌细胞和成纤维细胞相鉴别。Cajal 间质细胞或多或少与平滑肌细胞拥有部分相同的超微结构特点, 如基底层、胞膜小凹以及裂隙连接, 尤其是环肌内的 Cajal 间质细胞可见少量的粗肌丝, 但无肌细胞拥有的发育良好的肌丝; 一些 Cajal 间质细胞虽然表面上与成纤维细胞类似, 且缺乏明显的肌细胞特征, 但即使这些 Cajal 间质细胞, 也存在与成纤维细胞明显的区别, 即胞浆内高密度电子、大的裂隙连接、丰富的中间丝、大量线粒体、滑面内质网的膨胀池、发育良好的滑面内质网, 而且成纤维细胞外常分布有大量胶原纤维。

胃肠道 Cajal 间质细胞有着重要的功能[2~4], 许多胃肠运动障碍性疾病存在着 Cajal 间质细胞质与量的改变[5~9]。在本实验中, 我们用 STZ 成功建立大鼠糖尿病模型, 3 个月后测定小肠传输速率, 发现小肠运动功能低下, 传输速率明显减慢; 同时小肠 Cajal 间质细胞超微结构发生了明显的变化: 糖尿病大鼠小肠 Cajal 间质细胞数目明显减少, Cajal 间质细胞的缝隙连接显著减少, 尚存的细胞间连接的结构也有破坏, 结构不清, 连接松散。而且细胞内的细胞器数量明显少于正常 Cajal 间质细胞, 如线粒体、核糖体等均显著减少, 线粒体肿胀、空泡样变、髓鞘样改变甚至溶解, 内质网扩张, 粗面内质网脱颗粒。细胞内的胞质广泛溶解, 有大量的胞质内空泡形成, 空泡大多沿质膜分布, 核周间隙增宽等。由此可见, 糖尿病 Cajal 间质细胞变性可能是其发生糖尿病小肠运动功能低下的一个重要原因。

参考文献:

[1] 张亚萍, 张宽学, 罗金燕, 等. 糖尿病大鼠肠道 Cajal 间质细胞结构变化的研究[J]. 中华内科杂志, 2002, 41(5): 310－312.

[2] Ward S M, Gershon M D, Keef K, *et al*. Interstitial cells of Cajal and electrical activity in ganglionic and aganglionic colons of mice[J]. Am J Physiol, 2002, 283(2): G445－456.

[3] Kim T W, Koh S D, Ordog T, *et al*. Muscarinic regulation of pacemaker frequency in murine gastric interstitial cells of Cajal[J]. J Physil, 2003, 546(Pt 2): 415－425.

[4] Huizinga J D, Berezin I, Sircar K, *et al*. Development of interstitial cells of Cajal in a full-term infant without an enteric nervous system[J]. Gastroenterology, 2001, 120(2): 561－567.

[5] Boeckxstaens G E, Rumessen J J, de Wit L, *et al*. Abnormal distribution of the interstitial cells of Cajal in an adult patient with pseudo-obstruction and megaduodenum[J]. Am J Gastroenterol, 2002, 97(8): 2120－2126.

[6] Jain D, Moussa K, Tandon M, *et al*. Role of interstitial cells of Cajal in motility disorders of the bowel[J]. Am J Gastroenterol, 2003, 98(3): 618－624.

[7] Ordog T, Baldo M, Danko R, *et al*. Remodeling of networks of interstitial cells of Cajal in a murine model of diabetic gastroparesis[J]. Diabetes, 2000, 49(10): 1731－1739.

[8] Ordog T, Baldo M, Danko R, *et al*. Plasticity of electrical pacemaking by interstitial cells of Cajal and gastric dysrhythmias in W/W mutant mice[J]. Gastroenterology, 2002, 123(6): 2028－2040.

[9] 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.

(编辑　汪勤俭)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net