DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.18.004
第26卷第18期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 18
1618 2004年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)18-1618-04

双重染色显示 Cajal 细胞和 NOS 神经在胎儿小肠肌间神经丛的分布

于 彬,周德山,梅 峰,马 华 (第三军医大学基础医学部组织学与胚胎学教研室,重庆市神经科学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 研究 Cajal 细胞与 NOS 神经在胎儿小肠肌间神经丛的分布模式。方法 采用 18~26 周龄胎儿小肠全层铺片和冰冻切片的 NADPH-黄递酶(NADPH-d)组织化学法和 c-kit 免疫细胞化学双重染色。结果 胎儿肌间神经丛周围 Cajal 细胞体为梭形或卵圆形,核周胞质较少,常见 2~3 个细长的突起,彼此间形成完整的独立细胞网络。NOS 阳性神经广泛分布于小肠的肌间神经丛和环肌内,其中,以肌间神经丛最为丰富,构成神经节、节间束及三级神经纤维网的主要神经成分。肌间神经节内的 NOS 阳性神经元轮廓较清晰,多数为 Dogiel Ⅰ型神经元,成簇密集分布,每个神经节内含有数个至数 10 个 NOS 阳性神经元。NADPH-d 和 c-kit 免疫细胞化学双重染色未发现 NOS 阳性神经和 Cajal 细胞有共存现象,但 NOS 阳性神经纤维的走行与 Cajal 细胞及突起间的距离较近。结论 本研究结果提示在胚胎发育中晚期,肌间神经丛的抑制性神经递质 NO 可能已具备对 Cajal 细胞及胃肠平滑肌调控的结构基础。

关键词:Cajal 细胞;酪氨酸激酶受体;一氧化氮合酶;小肠;胎儿
中图法分类号:R322.8;R329.1 文献标识码:A

Distribution of NOS nerves and interstitial cells of Cajal in myenteric plexus of human fetal intestine

YU Bin, ZHOU De-shan, MEI Feng, MA Hua (Department of Histology and Embryology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To investigate the distribution modes of NOS nerves and interstitial cells of Cajal (ICCs) in myenteric plexus of human fetal intestine. **Methods** Small intestine samples from 12 fetuses were collected for the preparation of whole-mount preparations and cryo-sections examined by immunocytochemistry for c-kit receptor tyrosine kinase and histochemistry for NADPH-diaphorase. **Results** ICCs associated with the myenteric plexus in the fetal small intestine were observed in the shape of spindle or ovoid with two to three slender processes forming an independent and complete cellular network. While NOS positive nerves, which constitute the main neuronal component of ganglia, connecting strands, and nerve fibers, were found within the circular muscle layer and myenteric plexus of the small intestine and the latter was especially rich of this kind of nerves. Most of these positive neurons were Dogiel I type-neurons and they often gathered in cluster in the ganglia. Each ganglion contained several to dozens of NOS positive neurons. Although no colocalization of ICCs and NOS positive nerves was found by double-staining of whole mount preparations and cryo-sections, they were closely distributed. **Conclusion** Our results indicate that NO released by myenteric plexus, an inhibitory neurotransmitter, may possess the function of regulating ICCs and smooth muscle in late stage of the fetus.

Key words: interstitial cells of Cajal; c-kit; nitric oxide synthase; small intestine; fetus

Cajal 细胞(interstitial cells of Cajal, ICCs)广泛存在于哺乳动物和人的消化管壁内,作为胃肠自主节律性运动的起搏细胞,具有产生电慢波、参与调节胃肠道蠕动运动的功能[1]。近年的研究表明,ICCs 的上述生理功能受胃肠壁内固有神经的调控,兴奋性及抑制性神经均具有重要调节作用[2,3]。一氧化氮(nitric oxide, NO)是胃肠神经系统中非常重要的非胆碱能、非肾上腺素能(NANC)抑制性神经递质之一,它以左旋精氨酸(L-arginine)为底物,由 NO 合成酶(nitric oxide synthase, NOS)催化合成,通过靶细胞中 cGMP 信号通路发挥其生物学效应[4]。国内外研究表明 NOS 神经元广泛存在于小的哺乳动物胃肠壁内神经丛,参与胃肠运动功能的调节,特别是在抑制 ICCs 的兴奋传递方面具有重要调控作用,但有关 NOS 神经和 ICCs 在胎儿小肠壁内的分布及相互关系的研究仅有少数报道。阐明人的胚胎小肠壁内 ICCs 及 NOS 神经的分布规律,对于理解胃

基金项目:全军杰出中青年人才基金资助项目(01J013)
Supported by the Foundation for Distinguished Young Scholars of PLA (01J013)
作者简介:于 彬(1976—),女,湖南省祁阳县人,讲师,主要从事胃肠运动调控机制方面的研究。电话:(023)68752229
通信作者:周德山,电话:(023)68752230
收稿日期:2004-07-07;修回日期:2004-09-02

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

肠 ICCs 的调控机制具有重要意义。因此, 本研究采用全层铺片和冰冻切片的 NADPH-黄递酶组织化学技术, 结合 ICCs 的特异标志物: c-kit 单克隆抗体的免疫细胞化学双重染色等方法, 对胚胎中期小肠壁内 ICCs 及 NOS 神经的分布规律进行了较详细的观察, 为深入研究抑制性神经递质 NO 对 ICCs 及胃肠平滑肌调控机制提供形态学基础。

1　材料与方法

1.1　材料及标本制备

18～26 周龄流产胚胎 12 例, 取空肠标本经预冷的生理盐水反复冲洗后, 部分肠段 OCT 包埋, 液氮冷冻, 恒冷箱切片机冰冻切片(厚 5～8 μm), 贴片, 风干, 100% 丙酮固定 30 min(25 ℃)用于免疫染色, 或 4% 多聚甲醛固定标本用于 NADPH-d 组织化学染色。部分肠段直接 100% 丙酮或 4% 多聚甲醛固定 6 h, 解剖显微镜下制作全层铺片。

1.2　试剂

β-NADPH(ORIENTAL YEAST)、氯化硝基四氮唑蓝(上海化学试剂公司)、鼠抗人 c-kit 单克隆抗体(1∶200; DAKO)、羊抗鼠 IgG-HRP 酶标抗体(1∶100; DAKO)。

1.3　NADPH-d 组织化学染色

上述切片及铺片经 0.01 mol/L PBS 充分漂洗后, 移入新鲜配制的作用液中, 含 1 mg/ml β-NADPH, 0.5 mg/ml 硝基四氮唑蓝(NBT), 0.3% Triton X-100, 0.1 mol/L PB(pH 7.6), 37 ℃ 孵育 15～30 min, 0.01 mol/L PBS 终止反应, 终产物为蓝色。

1.4　免疫细胞化学染色

所用方法为间接酶标抗体法, 具体步骤参照文献[5]。简述如下: 切片和铺片经 0.01 mol/L PBS 充分漂洗后, 0.3% H_2O_2/甲醇封闭内源性过氧化物酶 20 min(25 ℃), 1% BSA 孵育 30 min, 一抗(c-kit 单克隆抗体)4 ℃ 48 h, 二抗(羊抗鼠 IgG-HRP 酶标抗体)45 min(25 ℃), 0.05% DAB/0.01% H_2O_2/0.05 mol/L TBS pH 7.5 显色, 镜下观察, 适时终止反应, 终产物为棕黄色。对照实验以正常鼠血清代替一抗或羊血清代替二抗, 结果均为阴性。各步骤间 PBS 充分漂洗。

1.5　NADPH-d 组织化学与 c-kit 免疫细胞化学双重染色

先行 NADPH-d 组织化学染色, 经充分漂洗后再进行 c-kit 免疫细胞化学染色。双重染色后的标本经水溶性封片剂封片, Olympus 显微镜观察、照相记录。

2　结果

2.1　Cajal 细胞在胎儿小肠壁内的分布规律

c-kit 单克隆抗体的间接免疫酶标细胞化学染色反应产物为棕黄色。全层铺片可见 c-kit 阳性的 ICCs 胞体为梭形或卵圆形, 核周胞质较少, 胞浆着色浅, 常见 2～3 个细长的突起, 并有分支, 突起彼此间形成较完整的独立细胞网络(图 1、2)。冰冻切片和铺片可见胚胎中期的小肠肌间神经丛周围的 ICCs 与成人相似, 分为两层, 细胞长轴彼此垂直, 分别平行于环行肌和纵行肌; c-kit 蛋白免疫反应阳性的 ICCs 亦存在环行肌层内(图 3)。所有对照标本均为阴性。

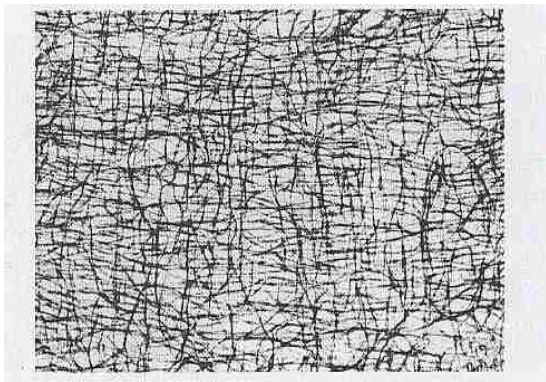
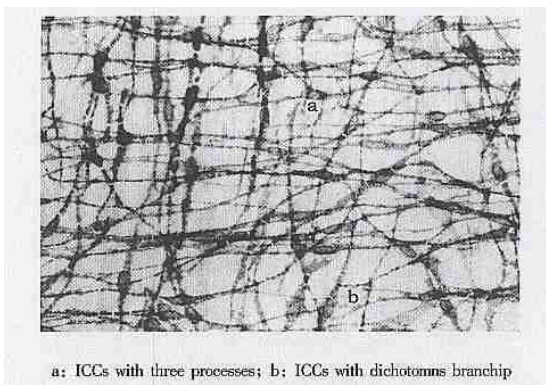


图 1　26 周龄胎儿小肠全层铺片显示肌间神经丛周围 c-kit 阳性的 ICCs 彼此形成较完整的细胞网络 (Immunohistochemistry×70)

Fig 1　At 26 weeks of gestation, c-kit immunoreactive ICCs forming a relative complete network surrounding the myenteric plexus were found in the whole-mount preparation (Immunohistochemistry×70)

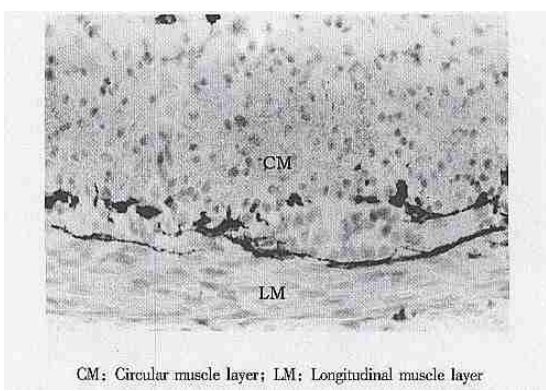


a: ICCs with three processes; b: ICCs with dichotomns branchip

a: ICCs with three processes; b: ICCs with dichotomns branchip

图 2　高倍镜显示 26 周龄胎儿小肠肌间神经丛周围 (Immunohistochemistry×250)

Fig 2　High power microscopy showing ICCs associated with the myenteric plexus at 26 weeks of gestation (Immunohistochemistry×250)



CM: Circular muscle layer; LM: Longitudinal muscle layer

CM: Circular muscle layer; LM: Longitudinal muscle layer

图 3　24 周龄胎儿小肠冰冻切片显示肌间神经丛周围彼此垂直分布的两层 ICCs (Immunohistochemistry×200)

Fig 3　Many c-kit positive cells formed two layers associated with myenteric plexus and they ran parallel to the circular and longitudinal muscle layers respectively at 24 weeks of gestation (Immunohistochemistry×200)

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

2.2 胎儿小肠壁内NO神经的分布模式

NADPH-d组化产物为蓝色或深蓝色。铺片和切片可见NO阳性神经广泛分布于小肠肌间神经丛和肌内，其中，以肌间神经丛最为丰富，构成神经节、节间束及终末神经纤维的主要神经成分(图4)。NOS阳性神经元轮廓较清晰，多数为Dogiel I型神经元，胞体卵圆形，胞浆呈深浅不等的蓝色，胞核不着色，成簇分布在神经节和节间束中，每个神经节内含有数个至数十个NOS阳性神经元(图5)。环肌内亦可见平行于平滑肌长轴的阳性神经纤维(图6)。

2.3 NADPH-d组织化学与c-kit免疫细胞化学的双重染色

NADPH-d组化和c-kit免疫细胞化学双重染色的铺片和切片结果表明：棕黄色的ICCs与深蓝色的NOS神经纤维在小肠肌间神经丛各自形成独立的细胞网络，其中，NOS阳性神经纤维多带有膨体，呈串珠状，交织成网，可见NOS阳性神经纤维分布在ICCs及突起的周围，部分膨体样终末与ICCs间的距离非常近，但未见二者有明显的共存现象(图7、8)。

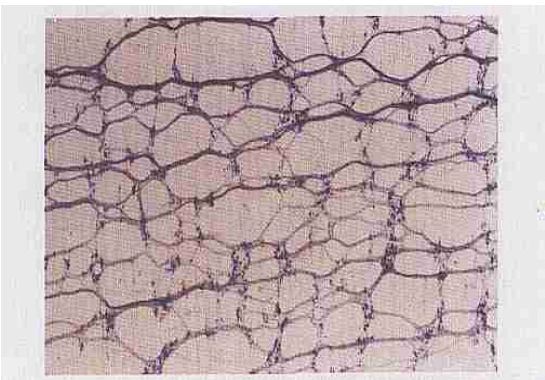


图4 全层铺片显示20周龄胎儿小肠肌间神经丛内NOS阳性神经网络的分布模式 (NADPH-d×20)

Fig 4 At 20 weeks of gestation, distribution of NOS positive nerves in myenteric plexus was observed in whole-mount preparations (NADPH-d×20)

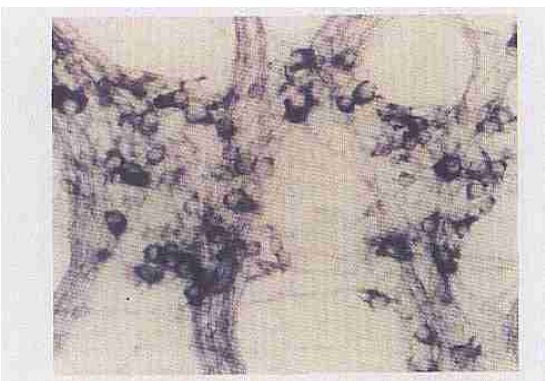
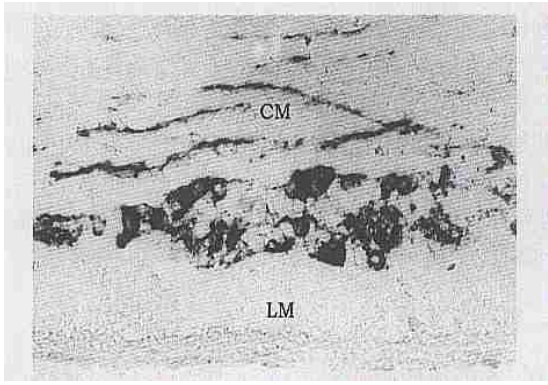


图5 全层铺片高倍镜下可见NOS阳性细胞体为卵圆形，数个至数10个NOS阳性神经元成簇分布于肌间神经节内，胎龄20周 (NADPH-d×250)

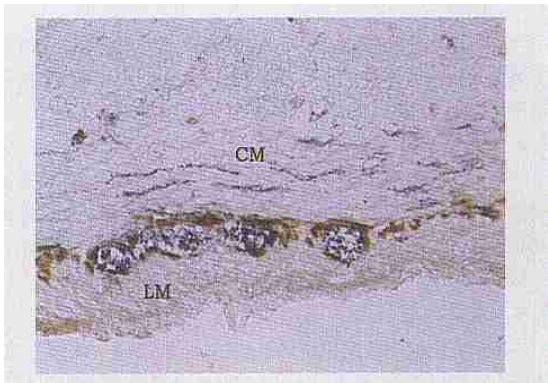
Fig 5 Ovoid NOS positive cells gathering in clusters were found in ganglia of myenteric plexus in whole-mount preparations at 20 weeks of gestation (NADPH-d×250)



CM: Circular muscle layer; LM: Longitudinal muscle layer

图6 胎龄20周，冰冻切片显示NOS阳性神经在肌间神经丛及环肌内的分布模式 (NADPH-d×200)

Fig 6 At 20 weeks of gestation, NOS positive nerves were found in myenteric nerve plexus and circular muscle layer in cryo-sections (NADPH-d×200)



CM: Circular muscle layer; LM: Longitudinal muscle layer

图7 冰冻切片双重染色显示ICCs及NOS阳性神经在22周龄胎儿小肠肌间神经丛的共同分布 (NADPH-d+Immunohistochemistry×100)

Fig 7 Double staining showed distribution of ICCs and NOS positive nerves in cryo-sections at 22 weeks of gestation (NADPH-d+Immunohistochemistry×100)

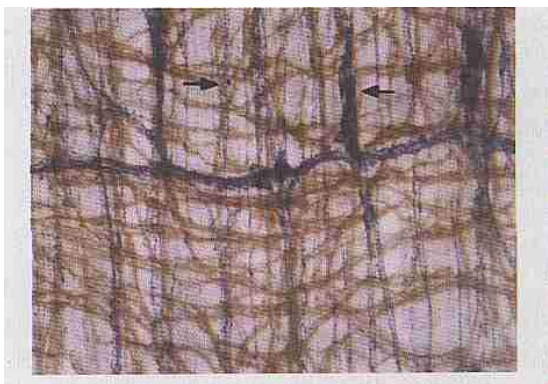


图8 胎龄22周，全层铺片双重染色可见ICCs与NO神经终末膨体间距离非常近，二者紧密相伴 (NADPH-d+Immunohistochemistry×220)

Fig 8 At 22 weeks of gestation, close contact of ICCs with NO nerves were seen by double staining of whole-mount preparations (NADPH-d+Immunohistochemistry×220)

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

3　讨论

肠神经系统(enteric nervous syste, ENS) 属于消化管壁内固有神经系统, 包括肌间神经丛、深肌间神经丛及粘膜下神经丛等。ENS 通过释放各种兴奋性和抑制性神经递质, 如乙酰胆碱、P 物质、血管活性肠肽以及 NO 等调控胃肠运动功能。NO 是 ENS 中一种非常重要的 NANC 抑制性神经递质, 它为无色脂溶性气体, 由 NOS 催化左旋精氨酸生成, 通过弥散作用于靶细胞, 能够激活鸟嘌呤环化酶, 将 GTP 转化为 cGMP, 进而激活肌酸磷酸激酶, 调节靶细胞的生理功能[4,6,7]。分子生物学研究表明 NADPH-黄递酶为神经组织中的 NOS, 所以, 可以利用组织化学方法显示该酶检测体内 NOS 神经元的分布情况。本研究应用 NADPH-黄递酶组织化学方法发现胎儿小肠肌间神经丛含有大量的 NO 能神经元及神经纤维束, 构成肌间神经丛的一部分, 肌内亦有部分 NOS 阳性神经纤维平行于平滑肌分布, 提示胚胎中期 NOS 神经已具备调控胃肠运动的结构基础。

ICCs 作为胃肠道自主节律运动的起搏细胞, 在调控胃肠运动中具有重要作用, 成为胃肠动力学研究领域中的热点之一。c-kit 原癌基因, 位于人染色体 4q11－12, 编码干细胞因子的 II型酪氨酸激酶受体(KIT 受体), 是胃肠道 ICCs 的一种特异性标志物。近年, 随着对胃肠壁内 ICCs 研究的逐步深入, 它与 NOS 神经元之间的关系也日益受到关注[8,9]。尽管有报道, 在鼠类和猫的胃及结肠壁内的 ICCs 呈 NOS 阳性, 但本研究利用铺片和切片的双重标记等方法, 未发现人的胎儿小肠 ICCs 呈 NADPH-黄递酶组织化学着色, 也未见二者有共存现象, 推测可能存在种属差异, 也可能系胚胎发育不同阶段的表达差异所致[10,11]。有趣的是我们发现 ICCs 细胞网与 NOS 阳性神经纤维网间距离非常近, 部分膨体样终末分布在 ICCs 胞体和突起周围, 提示在胚胎发育中晚期, ENS 的 NOS 抑制性神经已经具备调节其邻近的 ICCs 功能的结构基础。Wang 等[12] 采用免疫组织化学染色和电镜研究也观察到, NOS 阳性神经元和 P 物质阳性神经元轴突膨体与 ICCs 的距离较与平滑肌细胞近, 仅为 20～25 nm, 形成紧密联系, 说明 NO 神经递质对 ICCs 可能具有一定的调控作用。此外, Sanders 等[13] 研究发现, W/WV 小鼠胃肠壁内 NOS 阳性神经元和神经纤维分布虽然正常。但由于 ICCs 的缺乏, 胃、食管下括约肌、幽门括约肌等对外源性 NO 刺激的反应消失, 提示 NO 对胃肠运动功能的调节可能通过 ICCs 发挥抑制平滑肌细胞的效应, 此问题有待于今后进一步研究。

参考文献:

[1] Huizinga J D, Thuneberg L, Vanderwinden J M, *et al*. Interstitial cells of Cajal as targets for pharmacological intervention in gastrointestinal motor disorders[J]. Trends Pharmacol Sci, 1997, 18(10): 393－403.

[2] Hirst G D, Ward S M. Interstitial cells: involvement in rhythmicity and neural control of gut smooth muscle[J]. J Physiol, 2003, 550(Pt2): 337－346.

[3] Ward S M, Beckett E A, Wang X, *et al*. Interstitial cells of Cajal mediate cholinergic neurotransmission from enteric motor neurons[J]. J Neurosc, 2000, 20(4): 1393－1403.

[4] 余贤恩. 一氧化氮对胃肠运动的抑制性调节[A]. 见: 周　吕, 柯美云 主编. 胃肠动力学——基础与临床[M]. 北京: 科学出版社, 1999. 227－244.

[5] Komuro T, Zhou D S. 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.

[6] Wright J W, Schwinof K M, Snyder M A, *et al*. A delayed role for nitric oxide-sensitive guanylate cyclases in a migratory population of embryonic neurons[J]. Dev Biol, 1998, 204(1): 15－33.

[7] Altdorfer K, Bagameri G, Donath T, *et al*. Nitric oxide synthase immunoreactivity of interstitial cells of Cajal in experimental colitis[J]. Inflamm Res, 2002, 51(12): 569－571.

[8] Wang X Y, Sanders K M, Ward S M. Relationship between interstitial cells of Cajal and enteric motor neurons in the murine proximal colon[J]. Cell Tissue Res, 2000, 302(3): 331－342.

[9] Hanani M, Freund H R. Interstitial cells of Cajal—their role in pacing and signal transmission in the digestive system[J]. Acta Physiol Scand, 2000, 170(3): 177－190.

[10] Vannucchi M G, Corsani L, Bani D, *et al*. Myenteric neurons and interstitial cells of Cajal of mouse colon express several nitric oxide synthase isoforms[J]. Neurosci Lett, 2002, 326(3): 191－195.

[11] 侯晓华, 陈建德. Cajal 间质细胞在胃运动中的作用[J]. 中华消化杂志, 2001, 21(6): 360－362.

[12] Wang X Y, Sanders K M, Ward S M. Intimate relationship between interstitial cells of Cajal and enteric nerves in the guinea-pig small intestine [J]. Cell Tissue Res, 1999, 295(2): 247－256.

[13] Sanders K M, Ordog T, Koh S D, *et al*. Development and plasticity of interstitial cells of Cajal[J]. Neurogastroenterol Motil, 1999, 11(5): 311－338.

(编辑　王　红)

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