DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.12.008
第26卷第12期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 12
2004年6月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jun. 2004

文章编号:1000-5404(2004)12-1049-03

论著

慢传输性便秘结肠 Cajal 间质细胞减少与细胞凋亡的关系

童卫东[1],李朝阳[2],刘宝华[1],熊仁平[3],刘 苇[3],张连阳[1],张胜本[1] (第三军医大学大坪医院野战外科研究所:[1]普通外科,[3]第七研究室,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400042;[2]陕西西安张家堡肛肠医院,西安 710040)

提 要:目的 探讨慢传输性便秘(slow transit constipation, STC)结肠 Cajal 间质细胞(interstitial cells of Cajal, ICC)减少是否与细胞凋亡有关。方法 收集12例STC患者和8例对照组乙状结肠标本,用免疫组化方法检测ICC分布情况,用原位末端标记法(TUNEL)检测结肠壁黏膜层、黏膜下层和肌层的原位细胞凋亡情况,记数凋亡指数,半定量分析。结果 ICC分布于结肠肌层,包括黏膜下环肌层表面、环肌层、肌间神经丛、纵肌层四个区域,STC乙状结肠上述四个区域ICC分布均明显减少。原位细胞凋亡检测发现黏膜层和黏膜下层细胞凋亡明显增多($P=0.002$),而肌层和肌间神经丛与对照组无显著差异。结论 STC患者乙状结肠ICC减少可能与凋亡无关。

关键词:慢传输性便秘;细胞凋亡;Cajal 间质细胞
中图法分类号:R322.45;R329.24;R574.62 文献标识码:A

Relationship between apoptosis and decrease in interstitial cells of Cajal in the colon of slow transit constipation

TONG Wei-dong[1], LI Zhao-yang[2], LIU Bao-hua[1], XIONG Ren-ping[3], LIU Ping[3], ZHANG Lian-yang[1], ZHANG Sheng-ben[1] ([1]Department of General Surgery, [3]Department 7, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042; [2]Zhangjiabao Anorectal Hospital, Xi'an 710040, Shaanxi Province, China)

Abstract: **Objective** To evaluate the relation between apoptosis and decrease in interstitial cells of Cajal (ICC) in the colon of patients with slow transit constipation (STC). **Methods** Sigmoid colon samples from 12 STC patients and 8 age-matched controls were studied. Distribution of ICC was detected with immunohistochemical method. The apoptosis of cells in the mucous membrane of colon wall, submucous membrane, and muscular layer was identified by TUNEL method. Immunostained sections were analyzed by semi-quantitative method. **Results** ICC was distributed within the external muscle layer including submucosal border region, circular muscle layer, myenteric plexus region, and longitudinal muscle layer. Compared with that of the controls, significantly decreased ICC was found in the external muscle layer of STC patients. However, significantly increased apoptosis was found in the mucosal and submucosal layers in the STC group ($P<0.01$), whereas no difference was found within the external muscle layer. **Conclusion** Decreased ICC in the colon of STC patients may not be associated with ICC apoptosis.

Key words: slow transit constipation; apoptosis; interstitial cells of Cajal

慢传输性便秘(slow transit constipation, STC)多发于育龄期妇女,病因和发病机制尚不完全明了。临床虽然不是很常见,但其症状之顽固,对患者生活影响之大不容忽视。我们先前的研究表明STC结肠壁内多种肠神经递质减少[1],但仍然无法解释STC的发病机制。近年来,Cajal 间质细胞(interstitial cells of Cajal, ICC)在结肠动力紊乱性疾病中的作用引起了人们的极大关注,本研究在检测结肠ICC数目的基础上,用原位末端标记法(TUNEL)检测慢传输性便秘乙状结肠壁内细胞凋亡情况,初步探讨结肠ICC减少是否与细胞凋亡有关。

1 材料与方法

1.1 研究对象

STC组:收集我院2002年11月至2003年9月手术的12例STC结肠标本,年龄26~72岁,中位年龄46.8岁,女11例,男1例。所有患者均有长期便秘病史,大便次数在5~15 d 1次。且长期服用大黄苏打片、番泻叶、果导片等泻剂。不透X线标

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30300156);重庆市科技基金资助项目(20027438)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30300156) and the Funds for Sci &Tech Research of Scientific Committee of Chongqing (20027438)
作者简介:童卫东(1969-),男,宁夏回族自治区石嘴山市人,博士研究生,主治医师,主要从事大肠肛门疾病方面的研究。电话:(023)68757248
收稿日期:2004-03-15;修回日期:2004-05-30

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

志物结肠传输试验显示肠道传输在96～240 h，较正常的72 h明显减慢。肠镜或钡灌肠检查排除大肠器质性病变，排粪造影检查排除严重的出口梗阻性便秘，特别是盆底痉挛综合征等。所有患者均行全结肠切除回肠直肠吻合术。对照组为同期手术的8例非梗阻性大肠癌患者(Dukes A期)，年龄在29～73岁，中位年龄53.1岁，女7例，男1例。所有患者均无便秘症状和病史，手术中取距肿瘤20 cm以上乙状结肠标本。标本取出后用生理盐水洗净，切成1 cm×1 cm大小，迅速置入液氮中保存待用。

1.2 HE染色

每例标本均作常规石蜡包埋切片，HE染色，观察黏膜和肌层有无细胞变性坏死。

1.3 免疫组织化学检测

取出液氮保存标本，适当修剪后OCT包埋，－20 ℃预冷30 min，恒冷冰冻切片机(莱卡，德国)切5 μm厚切片，粘于多聚赖氨酸处理的载玻片上，置冷丙酮中固定20 min。3% H_2O_2 室温孵育20～30 min封闭内源性的过氧化物酶，正常兔血清室温封闭20 min，一抗4 ℃冰箱过夜后(c-kit鼠抗人单抗，DAKO公司，1∶200)。生物素标记二抗37 ℃，20 min，滴加SABC工作液37 ℃，20 min，DAB显色，复染，脱水，透明，中性树脂封片观察。按照ICC分布的4个区域：纵肌层(longitudinal muscle，LM)ICC，肌间丛(myenteric plexus，MP)ICC，环肌层(circular muscle，CM)ICC，以及黏膜下沿环肌层表面分布(submucosal border，SMB)的ICC。在×200镜下，每个区域随机选取20个视野，对ICC阳性胞体和突起计数。

1.4 原位细胞凋亡检测

TUNEL凋亡检测试剂盒(PODⅠ)购自武汉博士德公司。切片用3%过氧化氢处理10 min，加标记液37 ℃孵育2 h，TBS漂洗后，加生物素化DIG抗体37 ℃孵育30 min，SABC孵育60 min，DAB显色，苏木素轻度复染观察。在×200镜下，每例选取5个视野计数阳性细胞百分数作为凋亡指数。

1.5 统计学分析

计量数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用SPSS 10.0进行 t 检验；Mann-whitney U 检验。

2 结果

2.1 常规HE染色

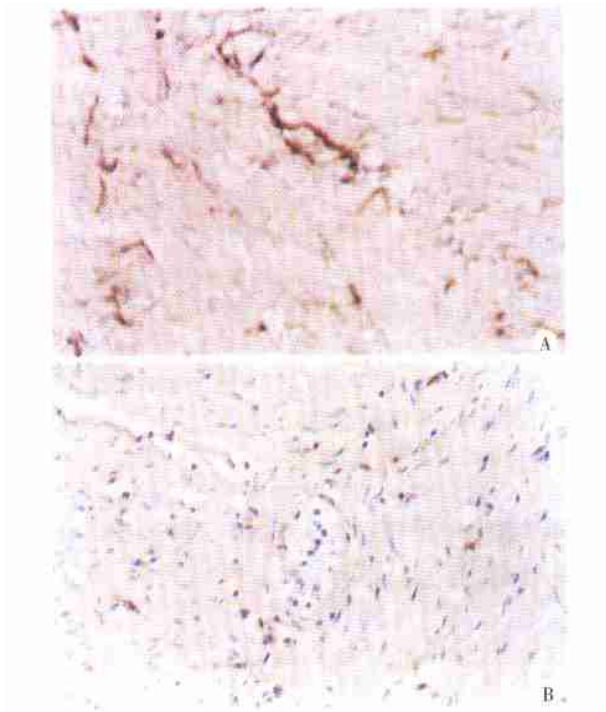
8例STC患者肌层有局部变薄，但肌细胞、肌间丛神经节细胞等未见明显异常，黏膜均呈轻度慢性炎改变，与对照组无明显差别。

2.2 ICC分布情况检测

对照组c-kit阳性面积的百分比在SMB为1.41%，CM为2.89%，MP为5.81%，LM为2.01%。STC组乙状结肠相应区域的ICC阳性面积分别为0.33%、0.24%、1.78%、0.50%，与对照组相比相差显著($Z=-3.363$，$P=0.001$)(图1)。

2.3 原位细胞凋亡检测

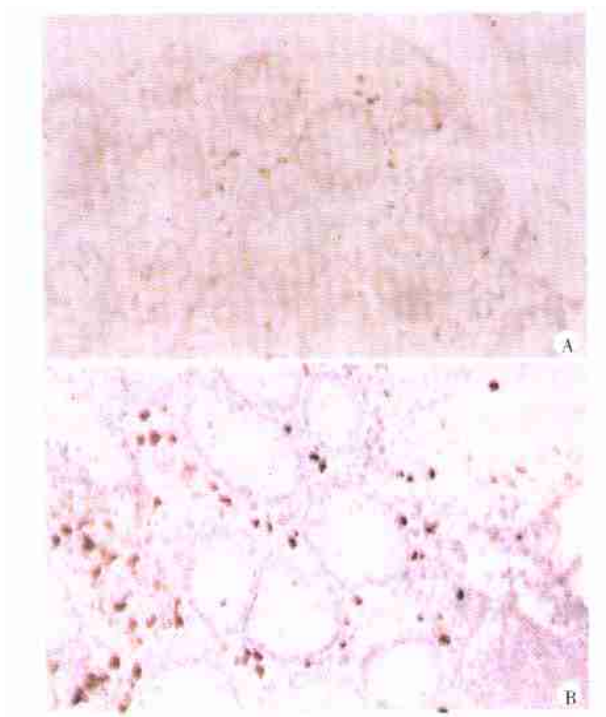
TUNEL标记的阳性细胞(凋亡细胞)主要表现为胞核棕黄色着色，肠壁不同层次均有阳性细胞分布。与对照组相比，STC组黏膜层和黏膜下层凋亡细胞明显增多(图2)，凋亡指数为5.062%($t=-4.499$，$P=0.000$)，而肌层和肌间神经丛区无显著差异($t=-1.796$，$P=0.089$)(表1)。



A：Controls；B：STC

图1 肌间丛区域ICC分布 (SABC×200)

Fig 1 Distribution of ICC in myenteric plexus region (SABC×200)



A：Controls；B：STC

图2 黏膜及黏膜下层原位细胞凋亡检测 (TUNEL×200)

Fig 2 *In situ* apoptosis in the mucosal layer (TUNEL×200)

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

表 1　乙状结肠细胞凋亡指数对比

Tab 1　Comparison of the apoptotic indexes in the sigmoid colon

Group	Mucosal and submucosal layer (%, $\bar{x}\pm s$)	Muscular layer (%, $\bar{x}\pm s$)
Control	1.518±0.120	2.601±0.322
STC	5.062±0.633 *	3.243±0.194

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

3　讨论

STC 是临床上比较棘手的一个疾病, 病程往往较长, 内科各种保守治疗措施效果非常有限, 大多数患者需要长期依赖各种刺激性泻剂排便, 但其结果是泻剂的服用量愈来愈大, 而效果愈来愈差, 部分患者最终需手术切除传输迟缓的结肠方能解除症状[3]。导致 STC 治疗困难的主要原因是其发病原因不明, 发病机制不清, 因此无法有效地预防和早期治疗。我们先前的研究发现 STC 结肠壁内血管活性肠肽、P 物质、胆碱能神经元等明显减少[1]。近年来国外少数研究发现 STC 结肠 ICC 数目明显减少[2], 国内尚少见类似报道, 且减少的机制不清。

c-kit 是 ICC 的特异性标志物, c-kit 免疫组化目前是显示和研究 ICC 分布的重要方法[4]。本研究表明 ICC 分布于结肠肌层, 大体分为 4 个区域, 即黏膜下环肌层表面、环肌层、肌间丛、纵肌层。与对照组相比, 各个区域的 ICC 均明显减少, 与国外报道一致。TUNEL 检测细胞凋亡虽然存在方法特异性差的问题, 但其优点是可以直观地判断原位细胞凋亡的情况。ICC 分布在结肠肌层, 本研究表明 STC 乙状结肠肌层细胞凋亡与对照组相差不显著, 因此可以初步推测 ICC 的减少可能与凋亡无关。常规 HE 染色仅发现部分肌层变薄、黏膜慢性炎症, 未发现肌层变性和坏死的细胞, 因此细胞死亡也不是 ICC 减少的原因。研究证明 c-kit 信号途径在 ICC 的发育、成熟和正常表型维持中起决定性的作用。用中和抗体封闭 c-kit 受体后, 可导致 ICC 表型再分化呈平滑肌细胞表型, ICC 的数目因此减少甚至消失, 肠慢波消失, 动力减弱[5]。本研究表明 STC 结肠肌层细胞凋亡不明显, 那么 ICC 减少的原因可能不是凋亡所致, 是否也是发生了表型转化呢? 有待进一步证实。黏膜层和黏膜下层凋亡细胞增多, 但这些区域的细胞至少不是 ICC, 是否包含有黏膜下神经丛细胞, 尚不能证实。

长期服用各种刺激性泻剂, 可导致上皮细胞变性、凋亡。大量的蒽醌类物质进入组织间隙, 可导致上皮细胞凋亡, 形成脂褐素颗粒、脂质体, 使得黏膜呈现棕褐色色素沉着, 形成所谓"大肠黑变病"[6]。STC 患者结肠黏膜和黏膜下层凋亡细胞增多是否与长期大剂量服用刺激性泻剂有关? 进一步的研究应当采用免疫荧光双标染色, 确定凋亡细胞的确切类型, 并深入研究 ICC 减少的机制。

(致谢: 感谢组织与胚胎学教研室周德山教授、于彬硕士提供 c-kit 单抗, 以及对实验的大力帮助。)

参考文献:

[1] 童卫东, 张胜本, 张连阳, 等. 一氧化氮合酶、P 物质在慢传输性便秘结肠壁内的异常表达[J]. 第三军医大学学报, 1999, 21(9): 645－647.

[2] Yu C S, Kim H C, Hong H K, *et al*. Evaluation of myenteric ganglion cells and interstitial cells of Cajal in patients with chronic idiopathic constipation[J]. Int J Colorectal Dis, 2002, 17(4): 253－258.

[3] 童卫东, 张胜本. 慢传输型便秘肠神经系统研究进展[J]. 国外医学外科学分册, 1999, 26(4): 212－214.

[4] Ward S M, Sanders K M. Physiology and pathophysiology of the interstitial cell of cajal: from bench to bedside I. Functional development and plasticity of interstitial cells of Cajal networks[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2001, 281(3): G602－G611.

[5] 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.

[6] 童卫东, 刘宝华, 张胜本, 等. 大肠黑变病 44 例回顾分析[J]. 中华消化内镜杂志, 2003, 20(6): 410－411.

(编辑　张　宁)

欢迎订阅《感染、炎症、修复》杂志

经国家新闻出版总署批准, 由解放军第 304 医院主办的《感染、炎症、修复》杂志 (CN11-5225/R), 将于 2004 年第 2 季度正式公开出版发行。该杂志为综合性高级医学学术刊物, 内容涉及各有关学科疾病所致的全身/局限性感染、炎症反应与组织修复再生的发病机制、诊断技术和临床防治经验。主要读者对象为各学科、各专业从事感染、炎症、修复与再生方面的临床、教学和科研人员。欢迎来稿, 稿件免收审稿费。征订者可直接汇款至《感染、炎症、修复》编辑部。10.0 元/期, 季刊。

地　址: 北京市阜成路 51 号解放军 304 医院《感染、炎症、修复》编辑部　　邮　编: 100037

电　话: (010)66867399　　传　真: (010)68480755　　E-mail: gryzxf@vip.sina.com

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