DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.12.009
第26卷第12期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 12
1052 2004年6月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jun. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)12-1052-03

慢传输性便秘乙状结肠 c-kit 蛋白和 mRNA 表达

童 卫东[1],刘宝华[1],熊仁平[2],刘 苹[2],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,[2]第七研究室,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400042)

提 要:目的 探讨 c-kit 蛋白和 mRNA 在慢传输性便秘结肠的表达。方法 乙状结肠标本取自 12 例慢传输性便秘患者和 8 例年龄相匹配的非梗阻性结直肠癌患者。用 Western blot 方法检测 c-kit 蛋白表达,用 RT-PCR 方法检测 mRNA 表达情况。结果 聚丙烯凝胶电泳结果显示 c-kit 蛋白质一 145×10^3 的条带,与对照组相比,慢传输性便秘结肠 c-kit 蛋白表达明显下降($P=0.021$);RT-PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳显示 *c-kit* 基因和β-actin(内参照)两条带,经半定量分析发现 *c-kit* mRNA 表达降低($P=0.029$)。结论 慢传输性便秘乙状结肠 c-kit 蛋白和 mRNA 表达均明显降低,提示 c-kit 基因表达下调与慢传输性便秘 Cajal 间质细胞减少有关。

关键词:便秘;Cajal 间质细胞;c-kit
中图法分类号:R322.45;R329.23;R574.62 文献标识码:A

Expressions of c-kit protein and mRNA in sigmoid colon of patients with slow transit constipation

TONG Wei-dong[1], LIU Bao-hua[1], XIONG Ren-ping[2], LIU Ping[2], ZHANG Lian-yang[1], ZHANG Sheng-ben[1]([1]Department of General Surgery, [2]State Key Laboratory Trauma, Burns and Combined Injury, Department 7, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To examine the expressions of *c-kit* mRNA and c-kit protein in the colon of patients with slow transit constipation (STC). Methods The sigmoid colon samples from 12 STC patients and 8 age-matched patients with nonobstructed colorectal cancer were used in this study. Expression of c-kit protein was detected by Western blot analysis, and expression of *c-kit* mRNA was detected by RT-PCR. Results Compared with those of controls, the *c-kit* mRNA and protein expressions were significantly declined in the colon of slow transit constipation ($P<0.05$). Conclusion Significant downregulation of *c-kit* gene and protein expressions may play an important role in the decreases in interstitial cells of Cajal in slow transit constipation.

Key words: constipation; interstitial cells of Cajal; c-kit

Cajal 间质细胞(interstitial cells of Cajal, ICC)是肠道慢波的起搏细胞并在肠神经信号传递中起重要作用。胃肠道原癌基因 *c-kit* 是 ICC 的特异性标志物,利用 *c-kit* 免疫组化技术可以很好地观察 ICC 在胃肠道的分布。研究表明众多胃肠动力紊乱性疾病,如慢传输性便秘(slow transit constipation, STC)[1]、假性肠梗阻[2]、Hirschsprung's 病[3]、糖尿病性胃轻瘫[4]等都存在 ICC 数目减少和网络异常,但机制不清。*c-kit* 基因异常表达是否与 ICC 减少有关,迄今少见报道。本研究用 Western blot 和 RT-PCT 方法检测 STC 乙状结肠 c-kit 蛋白和 mRNA 表达,探索 STC 结肠 ICC 减少的可能机制。

1 材料和方法

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,并长期服用大黄苏打片、番泻叶、果导片等泻剂。不透 X 光标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

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

病人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, 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 以上乙状结肠全层标本。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 Western Blotting

剔去黏膜层, 提取肌层组织膜蛋白, 测定蛋白含量(Bradford 法测定)。制备 SDS-PAGE 胶(11% 分离胶和 4% 积层胶), 根据蛋白定量结果, 上样量为 50 μg/泳道。电泳 3~4 h。半干电转, 25 V 转移 60 min。取下电转移后的硝酸纤维素膜(Millipore Co., Bedford, MA), 作好标记, PBS 漂洗 3 次, 膜固定液 15 min, PBS 漂洗 10 min×2, 置于 1% BSA/PBS 中 4 ℃封闭过夜, 加入 1∶500稀释的一抗(sc168, Santa Cruz), 置于摇床上室温孵育 2 h, 用 PBS 漂洗 15 min×1 次, 5 min×4 次, 加入相应的二抗中(1∶5 000), 室温孵育 1 h, PBS 漂洗 15 min×1 次, 5 min×4 次。暗室中化学发光法检测(ECL, Amersham, Arlington Heights, IL), 曝光。将获得的 X 光片结果扫描入计算机, 用 Quantity one 4.4 (Bio-Rad, USA)软件对目标条带进行光密度分析。

1.3 RT-PCR 分析

1.3.1 总 RNA 的提取　组织用 PBS 冲洗两次, 然后分别加 Tripure 1 ml (4 ℃), 消化 5 min 后, 收集在 Eppendof 管中, 冰浴下超声破碎细胞 5 s×3, 每管加 100 μl 氯仿振荡 15 s, 静置 10 min, 12 000 r/min 4 ℃离心 15 min。收集透明的水相于新离心管中。每管加等体积异丙醇(−20 ℃预冷), 混匀, 12 000 r/min 4 ℃离心 10 min, 弃上清, 加 80% 乙醇 0.5 ml, 混悬 5 s, 洗涤沉淀, 7 500 r/min 4 ℃离心 5 min, 小心去除上清, 沉淀置于干燥器中, 抽真空 5 min。用 DEPC 处理的超纯水 10 μl 溶解沉淀。

1.3.2 RT-PCR　RT 反应体系 25 μl, 按照 Promega 公司试剂盒说明书进行。PCR 反应: *c-kit* 引物: 上游: 5′-ATCATGGAGGATGACGAGTT-3′ (2287-2306); 下游: 5′-GCCATCCACTTCACAGGTAG-3′(2531-2512), 产生 245 bp 的产物。β-actin 引物为: 上游: 5′-CATCTCTTGCTCGAAGTCCA-3′; 下游: 5′-ATCATGTTTG AGACCTT CAACA-3′(300 bp)。50 μl 反应体系, 反应条件为94 ℃ 5 min, 94 ℃ 45 s, 60 ℃ 55 s, 72 ℃ 1 min, 72 ℃ 10 min, 共 36 个循环。

1.3.3 电泳　取 PCR 产物 10 μl, 加载样缓冲液 2 μl, 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳, 分子量标准为 DL2000(Takara, 大连)。采用 UVP 凝胶分析系统进行采集。结果分析同 western blot。

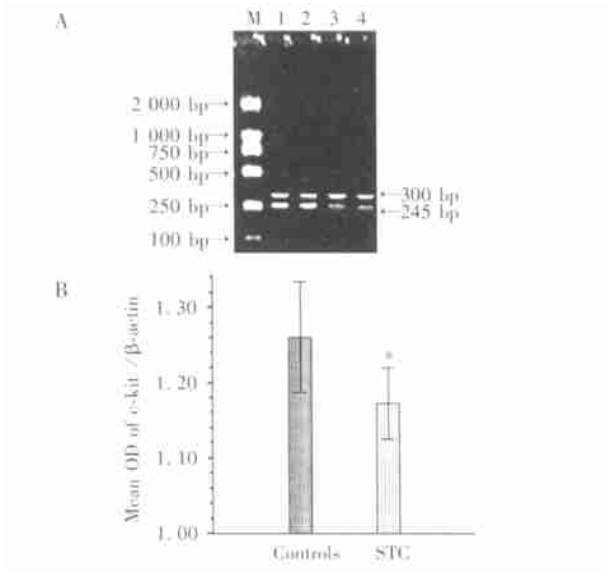
1.4 统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 统计分析采用 SPSS 10.0 进行非参数检验(Mann-Whitney U test)。

2 结果

2.1 乙状结肠 *c-kit* mRNA 表达

RT-PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳显示出 300 bp 和 245 bp 两条带, 300 bp 的条带为内参照β-actin, 245 bp 条带为 c-kit 条带。计算 c-kit 与β-actin 的吸光度比值: 对照组为 1.26, STC 组为 1.17。与对照组相比, STC 组 *c-kit* mRNA 表达明显降低(U=0.500, $P=0.029$)(图 1)。



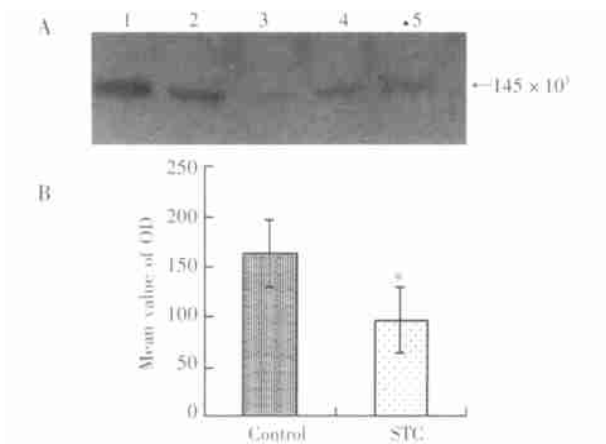
1, 2: Control; 3, 4: STC patients; β-actin: 300 bp; *c-kit*: 245 bp; *: $P=0.029$

图 1　***c-kit* mRNA 表达电泳结果(RT-PCR)(A)和相对光密度值分析(B)**

Fig 1　RT-PCR analysis of *c-kit* mRNA expression (A) and mean value of the optical density (B)

2.2 乙状结肠 c-kit 蛋白表达

经聚丙烯酰胺凝胶电泳和硝酸纤维素膜蛋白质印迹显示出一条 145×10^3 的条带, 符合 c-kit 蛋白的分子量大小。与 RT-PCR 结果一致, STC 组 c-kit 蛋白表达明显降低(U=0.000, $P=0.021$)(图 2)。



1: Control; 2—5: STC patients; *: $P=0.021$

图 2　**c-kit 蛋白质表达 Western blot 结果(A)和光密度值分析(B)**

Fig 2　Western blot analysis of the c-kit protein expression in colonic tissues from controls and STC patients (A) and mean value of the optical density (B)

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

3 讨论

有关STC的发病机制，许多研究认为与肠神经病变、肌病以及异常的肠神经肽含量有关[5]。近年来，随着对ICC形态和功能研究的深入，ICC对胃肠动力的关键性调控作用引起了研究者们极大的关注。编码*c-kit*基因的小鼠W位点突变体W/WV及编码其配体干细胞因子（stem cell factor，SCF）的sl位点突变体sl/sld均表现为肠道ICC缺失，肠慢波消失[6]。有人用c-kit免疫荧光技术结合激光共聚焦显微镜分析技术研究ICC在STC结肠的分布和数量变化，结果显示ICC数量明显减少。ICC减少在STC患者结肠动力减慢的发生机制中有重要的作用。但STC结肠ICC减少的机制不清。

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[7]。用中和抗体封闭c-kit受体后，可导致ICC再分化呈平滑肌细胞样表型[8]。STC结肠ICC减少是否也是因为c-kit信号途径异常，导致ICC表型转化的结果呢？本研究表明乙状结肠c-kit蛋白表达明显降低，初步用RT-PCR方法检测其mRNA表达，结果也是明显降低。提示STC患者存在*c-kit*基因表达的下调，这种异常低表达是否与基因突变或者基因调控失常有关有待研究。

动物实验表明回肠不全性梗阻可造成梗阻近段回肠ICC数目减少，肠慢波消失，其减少的原因主要是ICC发生了平滑肌细胞表型转化，失去了正常ICC的形态和功能[9]。但该研究没有进一步检测c-kit蛋白和mRNA表达的变化情况。STC患者大便次数往往在5 d以上，与不全性肠梗阻有某种相似之处，因此ICC减少也可能是STC的一种继发结果，ICC的减少会进一步加重结肠动力迟缓。推测任何因素（如药物、不良的饮食习惯等）导致的便秘，只要持续一定的时间，达到足以使结肠ICC发生表型转化的程度，可能会成为STC发病的初始动因，因此，ICC表型的转化可能是STC的发病机制中的重要因素。本研究表明c-kit信号途径在ICC表型转化过程中具有重要作用，进一步明确c-kit途径在ICC表型可塑性变化中的具体机制，探索使得发生了表型转化的ICC逆转至正常表型的方法，可能为STC等胃肠动力减弱性疾病的治疗开拓全新的治疗理念。

参考文献：

[1] 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.

[2] 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.

[3] Taguchi T, Suita S, Masumoto K, *et al*. Universal distribution of c-kit-positive cells in different types of Hirschsprung's disease[J]. Pediatr Surg Int, 2003, 19(4): 273－279.

[4] Nakahara M, Isozaki K, Hirota S, *et al*. Deficiency of KIT-positive cells in the colon of patients with diabetes mellitus[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2002, 17(6): 666－670.

[5] Pehl C, Schmidt T, Schepp W. Slow transit constipation: more than one disease[J]? Gut, 2002, 51(4): 610.

[6] Huizinga J D, 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.

[7] Rich A, Miller S M, Gibbons S J, *et al*. Local presentation of Steel factor increases expression of c-kit immunoreactive interstitial cells of Cajal in culture[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2003, 284(2): G313－G320.

[8] 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.

[9] Chang I Y, Glasgow N J, Takayama I, *et al*. Loss of interstitial cells of Cajal and development of electrical dysfunction in murine small bowel obstruction[J]. J Physiol, 2001, 536(Pt 2): 555－568.

（编辑 张大春）

参考文献中英文作者名的著录方法

医学期刊的论文中，引用英文文献的比例很高，但有不少作者将英、美人的姓名搞错，以至用光盘核对时出现错姓、错名或姓名全错。英、美人姓名的习惯写法是：名-名-姓，“名”可以有1个、2个或3个，但“姓”只有1个。因此，从书籍或期刊中的姓名转录到文献时，要将次序调整为姓-名-名。姓是不可以简写的；“名”可以缩写，用第一个字母大写，不用缩写点。数据库在著录作者姓名时，已经调整为姓-名-名，可照录。

例如：John Quincy Public写为Public J Q。

本刊编辑部

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