

非酒精性脂肪肝大鼠胃窦 Cajal 间质细胞的研究

和海玉, 路明亮, 黄 华, 赵公芳, 李未华, 常 江
(昆明医学院第二附属医院消化内科, 云南 昆明 650101)

[摘要] **目的** 观察非酒精性脂肪肝大鼠胃窦 Cajal 间质细胞数量的变化, 探讨非酒精性脂肪肝大鼠胃肠动力障碍的相关机制. **方法** 30 只 SD 大鼠随机分为模型组和对照组, 模型组 20 只, 对照组 10 只, 对照组给予普通饲料, 模型组采用高脂饲料喂养, 葡聚糖蓝-2000 作为标记物, 观察大鼠胃肠道传输速度, 免疫组化染色观察胃窦 Cajal 间质细胞的变化. **结果** 复制模型成功, 模型组胃肠道传输速度明显减弱 ($P < 0.05$), 胃窦 C-kit 阳性 Cajal 间质细胞也明显减少 ($P < 0.01$). **结论** 非酒精性脂肪肝大鼠胃肠道传输速度减弱与胃窦 Cajal 间质细胞的减少可能有关.

[关键词] 非酒精性脂肪肝; Cajal 间质细胞; 免疫组化

[中图分类号] R575.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003 - 4706 (2012) 04 - 0022 - 04

Study of Cajal Interstitial Cells in Antrum of Rats with Nonalcoholic Fatty Liver

HE Hai - yu, LU Ming - liang, HUANG Hua, ZHAO Gong - fang, LI Wei - hua, CHANG Jiang
(Dept. of Gastroenterology, The 2nd Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650101, China)

[Abstract] **Objective** To observe the number of Cajal interstitial cells in antrum of rats with nonalcoholic fatty liver, and to study the gastrointestinal dyskinesia related mechanism. **Methods** 30 SD rats were divided into 2 groups: nonalcoholic fatty liver ($n = 20$) and normal control group ($n = 10$). Nonalcoholic fatty liver model was duplicated by high-fat diet feeding. The gastrointestinal motility changes were assayed using Dextran blue-2000 as an indicator. Immunohistochemical method was used to investigate the interstitial cells of Cajal in antrum of rat. **Results** The nonalcoholic fatty liver model was successfully duplicated. Compared with the control group, the gastrointestinal transmission rate of rats with nonalcoholic fatty liver was significantly reduced ($P < 0.05$), the number of C-kit positive Cajal interstitial cells in antrum of rat was reduced ($P < 0.01$). **Conclusion** Gastrointestinal motility of rats with nonalcoholic fatty liver is significantly weakened, which may be associated with the decrease of the number of Cajal interstitial cells.

[Key words] Nonalcoholic fatty liver; Cajal interstitial cells; Immunohistochemistry

非酒精性脂肪性肝病 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 是指除外过量饮酒和其他明确的肝损因素所致的, 以弥漫性肝细胞大泡性脂肪变为主要特征的临床病理综合征. NAFLD 已成为了一种呈现全球化趋势的常见慢性肝病. 大量研究^[1]证实 Cajal 间质细胞在胃肠电生理和动力发生及动

力障碍机制上具有重要作用. Cajal 间质细胞 (interstitial cells of cajal, ICC) 是胃肠道的基本起搏细胞, 与胃肠平滑肌自发节律性收缩有关. 除此之外还有免疫调节、生长、修复和纤维化, 促进胰腺腺体的分泌^[2-7]等. 以前对贲门失弛缓症、慢性假性肠梗阻、先天性巨结肠、慢传输型便秘等疾病的

[基金项目] 云南省科技厅—昆明医学院应用基础研究联合专项基金资助项目 (2007C0019R)

[作者简介] 和海玉 (1979~), 女, 云南丽江市人, 医学学士, 主治医师, 主要从事消化内科临床工作.

[通讯作者] 路明亮. E-mail: lml19910@163.com

研究发现 Cajal 间质细胞与这些疾病有关, 而非酒精性脂肪性肝病时胃肠道动力与 Cajal 间质细胞关系的研究还少有报道. 本研究就 Cajal 间质细胞在非酒精性脂肪肝时与胃肠动力的关系作一探讨, 以期今后胃肠道动力障碍性疾病的研究提供一定的实验基础.

1 材料与方法

1.1 动物建模和分组

雄性 SD 大鼠 (购自昆明医学院动物实验中心) 30 只, 6~8 周, 体重 160~210 g. 将大鼠随机分为非酒精性脂肪肝模型组和对照组, 模型组 20 只, 对照组 10 只. 模型组喂养高脂饲料^[8-10] (普通饲料 +20 g/kg 胆固醇 +100 g/kg 猪油), 2 次/d, 共计 12 周. 对照组普通饲料饮食, 2 组均自由饮水.

1.2 大鼠胃肠道传输速度测定

造模成功后 (12 周), 禁食禁饮 12h, 葡聚糖蓝 -2000 0.4 mL 灌胃, 20 min 后乙醚吸入麻醉并开腹. 取出整个胃肠道, 小心剪除系膜, 将胃肠道平铺于实验台, 量取幽门括约肌至色素最前端 (用 A 表示) 及幽门括约肌至盲肠的距离 (用 B 表示), 胃肠传输速度 = $A/B \times 100\%$.

1.3 HE 染色

取出肝脏组织, 4% 甲醛固定, 石蜡包埋切片, 行 HE 染色.

1.4 免疫组化染色结果判断

细胞免疫组化 SP 法染色, 细胞膜呈棕色为 C-kit 阳性 Cajal 间质细胞. 测定 C-kit 阳性细胞数和所观察的标本面积, 以二者之比作为阳性率.

1.5 统计学处理

实验数据均采用 SPSS 统计软件包进行统计学分析, 实验数据均采用 $(\bar{x} \pm s)$, 组间比较采用 t 检验.

2 结果

2.1 对照组肝脏组织 HE 染色

肝细胞形态、大小正常, 汇管区无变性坏死及炎症细胞浸润 (见图 1).

2.2 大鼠胃肠道传输速率

模型组和对照组胃肠道传输速率 (见图 2、表 1).

2.3 肝脏组织病理学观察

模型组肝脏组织 HE 染色示: 肝细胞肿胀, 胞质疏松成网状, 局部可见肝细胞气球样变, 小叶内

和门管区混合性炎症细胞浸润.

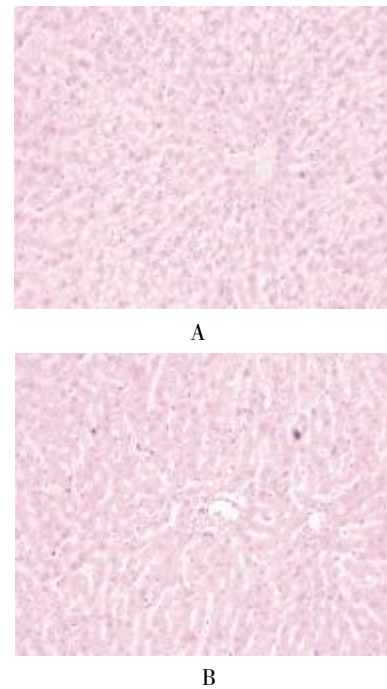


图 1 两组肝脏 HE 染色 ($\times 200$)

Fig. 1 HE staining of liver tissues in two groups

A: 模型组; B: 对照组.



图 2 葡聚糖蓝 -2000 灌胃色素推进情况

Fig. 2 The delivery of dextran blue-2000 in gastrointestinal tract of a rat

表 1 造模成功后 2 组大鼠胃肠道传输速率均数比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Comparison of gastrointestinal tract delivery rate of rats between two groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	胃肠道传输速率均数
对照组	10	59.27 ± 8.72
模型组	20	$46.52 \pm 9.93^*$

与对照组比较, $*P < 0.05$.

2.4 Cajal 间质细胞免疫组化染色结果

C-kit 阳性 Cajal 间质细胞呈棕色, 定位于细胞膜. 在模型组、正常组 Cajal 间质细胞阳性细胞在

胃窦主要位于粘膜下内环肌层表面 (见图 3). 与对照组比较, 模型组大鼠胃窦阳性 Cajal 间质细胞显著减少 (见表 2).

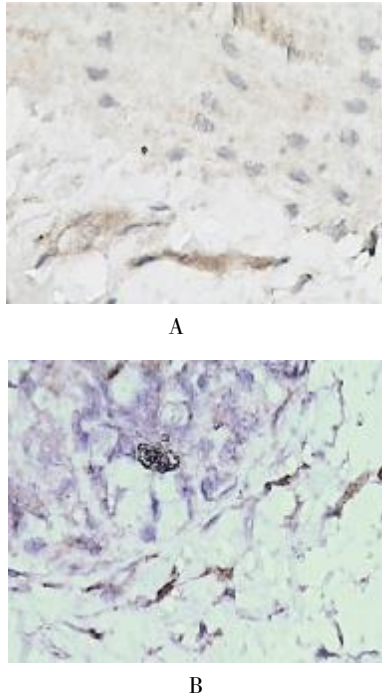


图 3 Cajal 间质细胞在两组中的阳性表达 (免疫组化 SP 法, $\times 400$)

Fig. 3 The positive expression of Cajal interstitial cells in two groups (Immunohistochemistry SP method, $\times 400$)

A:模型组; B:对照组.

表 2 造模成功后两组大鼠胃窦 Cajal 间质细胞阳性细胞均数比较 [$(\bar{x} \pm s)$, 个/ mm^2]

Tab. 2 Comparison of positive Caial interstitial cells in gastric antrum of rats between two groups [$(\bar{x} \pm s)$, 个/ mm^2]

组别	n	阳性细胞均数
对照组	10	7.45 ± 3.23
模型组	20	$4.76 \pm 2.97^{**}$

与对照组比较, $^{**}P < 0.01$.

3 讨论

近年来随着社会经济的发展及人们生活水平的大幅提高, 肥胖已成为当今社会不容忽视的问题. 非酒精性脂肪性肝病已经成为我国严重的慢性肝病之一^[1], 而目前对其并发症的研究较少, 所以对非酒精性脂肪肝时胃肠传输速度的变化与 Cajal 间质细胞的关系的研究显得尤为重要.

本实验的非酒精性脂肪肝模型, 高脂饮食中的

游离脂肪酸输入肝脏增多, 脂肪酸在肝线粒体 β 氧化减少, 导致肝脏的脂肪代谢障碍, 加重肝脏脂肪蓄积, 与人类的高脂饮食、肥胖等导致的非酒精性脂肪肝在病理学上极其相似. 同时, 实验过程中严格遵守实验流程及保证操作的一致性, 为本实验奠定了良好的实验基础和提供了可靠的实验数据.

本实验结果证实, 非酒精性脂肪肝组胃肠道传输速度及胃窦 Cajal 间质细胞数量与对照组比较统计学具有显著差异, 而 Cajal 间质细胞是胃肠道的基本起搏细胞, 与胃肠平滑肌自发节律性收缩有关, 提示非酒精性脂肪肝时胃肠传输速度的变化和 Cajal 间质细胞可能存在一定的关系. 其可能的机制如下: (1) 在非酒精性脂肪肝时血液中及肝细胞中游离脂肪酸浓度升高, 游离脂肪酸具有细胞毒性, 同时与肿瘤坏死因子等具有协同作用, 可能加重了对 Cajal 间质细胞的损伤, 影响了 Cajal 间质细胞功能的发挥; (2) 在非酒精性脂肪肝时, 反应性氧 (ROS) 产生增加, 其可以直接氧化生物大分子物质, 可能破坏 Cajal 间质细胞功能和完整性.

综上所述, 非酒精性脂肪肝时胃肠道传输速度的减慢可能和胃窦 Cajal 间质细胞的减少有一定的关系, 但 ICC 数量的变化并不是唯一因素, 是否存在超微结构的改变, 仍需深入研究进一步证实两者之间的关系, 以期为胃肠道动力障碍性疾病的药物研发提供一定的理论基础.

[参考文献]

- [1] DANIEL E E. Communication between interstitial cells of Cajal and gas-trointestinal muscle[J]. Neurogastroenterol Motil, 2004, 16(1): 118 - 122.
- [2] HONJIN R. The innervation of the pancreas of the mouse, with special reference to the structure of the peripheral extension of the vegetative nervous system [J]. J Comp Neurol, 1956, 104(3): 331 - 371.
- [3] COUPLAND R E. The innervation of pancreas of the rat, cat, and rabbit as revealed by the cholinesterase technique [J]. J Anat, 1958, 92(3): 143 - 149.
- [4] WATARI N. Fine structure of nervous elements in the pancreas of some vertebrates [J]. Z Zellforsch, 1968, 85: 291 - 314.
- [5] USHIKI T I D E. Autonomic nerve networks in the rat exocrine pancreas as revealed by scanning and transmission electron microscopy[J]. Arch Histol Cytol, 1988, 51(1):

(下转第 38 页)

显示 OSAHS 患者下颌骨及颞颌关节的三维空间结构和形态, 又能模拟下颌前移式口腔矫治器治疗 OSAHS, 为进一步研究此类方法治疗 OSAHS 从颞颌关节方面提供参考依据。

[参考文献]

- [1] 何权瀛, 陈宝元. 睡眠呼吸病学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2009: 90, 360.
- [2] 高雪梅, 曾祥龙, 傅民魁, 等. 口腔矫治器治疗阻塞性睡眠呼吸暂停综合症的下颌定位 [J]. 口腔正畸学, 2000, 7(1): 20 - 22.
- [3] 黄敏方, 周嫣, 陈世稳, 等. 有效治疗 OSAHS 的口腔矫治器戴入后髁状突位置的变化 [J]. 实用口腔医学杂志, 2009, 25(2): 285 - 288.
- [4] HART P T, HENNEBELVV, THONGPREDAN. Modeling the biomechanics of the mandible: a three-dimensional finite element study [J]. J Biomech, 1992, 25: 261.
- [5] TANAKA E, TANNE K, SAKUDAM. A three-dimensional finite element model of the mandible including the TMJ and its application to stress analysis in the TMJ during clenching [J]. Med Eng Phys, 1994, 16: 316.
- [6] 胡敏, 田晓玲, 杨勇琪, 等. 颞下颌关节的三维有限元法研究 [J]. 军医进修学院学报, 1995, 16(3): 181 - 183.
- [7] 周学军, 赵志河, 赵美英, 等. 下颌骨三维有限元模型的边界约束设计 [J]. 华西口腔医学杂志, 1999, 17(1): 29 - 32.
- [8] 周学军, 赵志河, 赵美英, 等. 包括下颌骨的颞下颌关节三维有限元模型的建立 [J]. 实用口腔医学杂志, 2000, 16(1): 17 - 19.
- [9] 杨辉, 刘洪臣, 荣起国, 等. 磁共振影像颞下颌关节三维有限元模型的建立 [J]. 口腔颌面修复学杂志, 2000, 1(1): 20 - 22.
- [10] HSU J T, HUANG H L, TU M G, et al. Effect of bone quality on the artificial temporomandibular joint condylar prosthesis [J]. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2010, 109(6): 1 - 5.
- [11] PEREZ DEL PALOMAR A, DOLARE M. Finite element analysis of the temporomandibular joint during lateral excursions of the mandible [J]. Biomech, 2006, 39(12): 2153 - 2163.

(2012 - 02 - 10 收稿)

(上接第 24 页)

- 71 - 81.
- [6] USHIKI T, WATANABE S. Distribution and ultrastructure of the autonomic nerves in the mouse pancreas [J]. Microsc Res Tech, 1997, 37(5-6): 399 - 406.
- [7] POPESCU L M, HIESCU M E, IONESCU N, et al. Intersitial cells of Cajal in pancreas [J]. J Cell Mol Med, 2005, 9(1): 169 - 190.
- [8] 钟岚, 范建高, 王国良. 肥胖、高脂血症性脂肪性肝炎模型的建立 [J]. 实验动物科学与管理, 2000, 17(2): 16 - 20.
- [9] FAN J G, ZHONG L, WANG G L, et al. The role of kupffer cells in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis of rats chrobicauy feb with high-fat diet [J]. Zhonghua Ganzangbing Zazhi, 2001, 9(1): 16 - 18.
- [10] 许正婕, 范建高, 王国良. 高脂饮食致大鼠非酒精性脂肪性肝炎肝纤维化模型 [J]. 世界华人消化杂志, 2002, 10(2): 392 - 396.
- [11] 中华医学会肝脏病学分会脂肪肝和酒精性肝病学组. 非酒精性脂肪性肝病诊疗指南(2010年1月修订) [J]. 胃肠病学, 2010, 15(11): 676 - 680.

(2012 - 02 - 02 收稿)