



Cajal 间质细胞凋亡在先天性巨结肠症及其同源病发病中的作用

杨晓锋 李索林 徐伟立 李英超 孙 驰

【摘要】 目的 探讨 Cajal 间质细胞(interstitial cells of Cajal, ICCs)凋亡在先天性巨结肠症(Hirschsprung's disease, HD)及其同源病(Hirschsprung's allied disease, HAD)结肠肌层中的表达及作用。**方法** 2014 年 2 月至 2015 年 2 月我们采取腹腔镜手术治疗 15 例 HD 和 13 例 HAD, 切取 HD 痉挛段、移行段及扩张段和 HAD 近端与远端全层肠壁作检验组。另选取 10 例正常儿结肠标本作对照组。应用免疫荧光双标记技术检测不同病变肠管肌层中 ICCs 分布密度以及 caspase-3、bcl-2 表达情况。应用透射电镜观察不同病变肠管肌层中 ICCs 超微结构改变。**结果** 结肠肌层中 ICCs 分布密度(个/视野)在 HD 组痉挛段(5.8 ± 1.1)、移行段(10.0 ± 1.8)及扩张段(13.1 ± 2.1)和 HAD 组近端(16.5 ± 2.4)与远端肠段(8.6 ± 1.6),除 HAD 组近端与对照组(17.8 ± 1.5)相比差异无统计学意义($P > 0.05$)外,其余各组两两比较均存在明显差异($P < 0.05$);各组中 caspase-3 阳性 ICCs 表达率分别为(77.6 ± 13.8)%、(53.6 ± 10.2)%、(31.9 ± 8.0)%、(23.6 ± 6.8)%、(57.2 ± 12.1)%,均明显高于对照组的(6.3 ± 4.3)% ($P < 0.05$);同时各组中 bcl-2 阳性 ICCs 表达率分别为(18.3 ± 9.3)%、(31.5 ± 7.3)%、(42.3 ± 7.9)%、(48.7 ± 6.5)%、(38.5 ± 6.7)%,与对照组的(60.3 ± 5.4)% 相比均明显降低($P < 0.05$)。ICCs 分布密度与 caspase-3 表达呈负相关($r = -0.915, P < 0.01$)、与 bcl-2 表达呈正相关($r = 0.754, P < 0.01$)。电镜观察 HD 组、HAD 组病变肠管均发现 ICCs 凋亡样改变。**结论** HD、HAD 病变结肠肌层 ICCs 分布密度及 caspase-3、bcl-2 表达异常,表明 ICCs 细胞凋亡可能在 HD、HAD 的发病中发挥重要作用。

【关键词】 Hirschsprung 病; 间质细胞; 细胞凋亡

The role of the apoptosis of interstitial cells of cajal in the pathogenesis of hirschsprung's disease and its allied disorders. YANG Xiao-feng, LI Suo-lin, XU Wei-li, et al. The Second Hospital, Hebei Medical University, Shijiazhuang 05000, China

【Abstract】 Objective To explore the expression and role of apoptosis of ICCs in the colon of Hirschsprung's Disease(HD) and its allied disorders(HAD). **Methods** From Feb. 2014 to Feb. 2015, 15 cases with HD and 13 cases with HAD underwent laparoscopic surgery were enrolled in this study. The aganglionic, transitional and dilated gut of HD, and the proximal and distal bowel of HAD were collected in the operation as the experimental group; Another normal colon(10 cases) were also collected as control group. The distribution of ICCs and its expression of caspase-3、bcl-2 in the colon were identified and counted in double labeled tissue sections. While the ultrastructural morphologies in the ICCs were observed by electron microscopy. **Results** The pairwise comparisons of ICCs distribution in the aganglionic (5.8 ± 1.1), transitional (10.0 ± 1.8) and dilated (13.1 ± 2.1) gut of HD, and the proximal (16.5 ± 2.4) bowel of HAD respectively compared with the control group (17.8 ± 1.5) were different ($P < 0.05$), in addition to the proximal bowl of HAD (8.6 ± 1.6) was no significant difference ($P > 0.05$). The expression rates of caspase-3-positive ICCs($77.6 \pm 13.8\%$, $53.6 \pm 10.2\%$, $31.9 \pm 8.0\%$, $23.6 \pm 6.8\%$, $57.2 \pm 12.1\%$ respectively) compared with the control group($6.3 \pm 4.3\%$) were significantly increased ($P < 0.05$). The expression rates of bcl-2-positive ICCs

doi:10.3969/j.issn.1671-6353.2016.01.014
基金项目: 国家卫生和计划生育委员会公益性行业科研专项(编号:201402007)
作者单位: 河北医科大学第二医院小儿外科(河北省石家庄市, 050000), E-mail: yangxiaofeng145@163.com, 通讯作者: 李索林, E-mail: lisuolin@263.net

in control group ($60.3 \pm 5.4\%$) was higher than ($P < 0.05$) in experimental group ($18.3 \pm 9.3\%$, $31.5 \pm 7.3\%$, $42.3 \pm 7.9\%$, $48.7 \pm 6.5\%$, $38.5 \pm 6.7\%$ respectively). The correlation between the ICCs and caspase-3 was negative ($r = -0.915, P < 0.01$); while it was positive between the ICCs and bcl-2 ($r = 0.754, P < 0.01$). The ultrastructural changes of apoptosis of ICCs were found under the electron microscope.

Conclusions Pathological distribution of ICCs and abnormal expression of caspase-3, bcl-2 in the colon indicates that the apoptosis ICCs may play a role in the pathogenesis of HD and HAD.

【Key words】 Hirschsprung Disease; Stromal Cells; Apoptosis

先天性巨结肠症(Hirschsprung’s disease, HD)及其同源病(Hirschsprung’s allied disease, HAD)是临床常见的胃肠动力障碍性疾病。研究证实,胃肠运动的协调有赖于Cajal间质细胞(interstitial cells of Cajal, ICCs)的正常作用,而ICCs异常可能与HD和HAD发病有关^[1,2]。但其具体机制尚不十分明确。研究显示ICCs细胞凋亡与许多胃肠道疾病相关^[3]。本文通过检测ICCs在HD和HAD结肠中的分布及其caspase-3、bcl-2的表达,以探讨ICCs细胞凋亡在HD和HAD中的作用。

材料与方法

一、临床资料

选取河北医科大学第二医院2014年2月至2015年2月经腹腔镜手术治疗的HD和HAD患儿。所有患儿均为散发型,并经钡剂灌肠、直肠肛管测压、乙酰胆碱酯酶检测及术后病理组织学检查确诊。均于术中切取标本,4%甲醛固定;另取2 mm × 2 mm × 2 mm组织以4%戊二醛固定(4℃)。各组患儿在性别和年龄组成上比较无统计学意义。

表1 患儿一般资料(例)

分组	n	性别		年龄(岁)
		男	女	
对照组	10	6	4	1~13
肿瘤	2			
回结型肠套叠	3			
外伤	5			
HD组	15	12	3	0.5~12
HAD组	13	8	5	1~13
神经节细胞减少症	7			
神经节细胞发育不良症	4			
神经节细胞未成熟症	2			

二、实验方法

1. 主要仪器及试剂:c-kit 兔抗人多克隆抗体(Bioworld technology)、caspase-3 鼠抗人多克隆抗体、bcl-2 鼠抗人多克隆抗体、Alexa Fluor488 标记羊

抗兔荧光二抗、Alexa Fluor594 标记羊抗鼠荧光二抗(北京中杉金桥生物技术公司)、LEICA RM2235 型石蜡切片机(德国LEICA公司)、Axio-Series Upright Mircroscope(Carl Zeiss Microscopy GmPH)、透射电子显微镜(日本日立公司)。

2. ICCs、caspase-3、bcl-2 的免疫荧光检测:将固定良好的组织经石蜡包埋后切片(4 μm),采用免疫荧光双标记方法进行染色,实验操作均按照试剂盒说明书进行,荧光显微镜下(200 ×)随机选取视野,观察每组标本中随机10个视野并计数。

3. ICCs 电镜检测:按照电镜取材标准取材后以4%戊二醛固定切片后行锇酸染色,透射电镜观察ICCs细胞凋亡。

三、统计学处理

数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用SPSS13.0统计软件进行统计学分析。不同组间ICCs分布密度应用单因素方差分析进行比较;不同组间阳性细胞百分率应用多个样本比较Kruskal-Wallis H检验、Nemenyi法或单因素方差分析进行比较;ICCs分布密度与阳性细胞百分率相关性采用直线相关分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、ICCs在各组病变肠管肌层内分布密度比较
荧光显微镜下ICCs呈绿色(图1),分别计数各组病变肠管肌层内ICCs分布密度(个/视野):HD组痉挛段 5.8 ± 1.1 、移行段 10.0 ± 1.8 及扩张段 13.1 ± 2.1 ;HAD组近端 16.5 ± 2.4 、远端 8.6 ± 1.6 ;正常对照组 17.8 ± 1.5 。结果显示除HAD近端与对照组相比无差异($P = 0.079, > 0.05$)外,其余各组较对照组均明显降低,尤以痉挛段为著($P < 0.01$)。同时,HD组中痉挛段、移行段、扩张段两两比较也均有差异($P < 0.05$);HAD组远端也较近端明显减少($P = 0.0002, < 0.01$)。

二、各组间caspase-3阳性ICCs百分率比较
caspase-3阳性ICCs呈黄色(图2),计数各病变

肠管肌层内 caspase-3 阳性 ICCs 百分率, HD 组痉挛段(77.6 ± 13.8)%、移行段(53.6 ± 10.2)%、扩张段(31.9 ± 8.0)%, HAD 组近端(23.6 ± 6.8)%、远端(57.2 ± 12.1)%, 正常对照组(6.3 ± 4.3)%。HD 组与 HAD 组较对照组均升高, 尤以痉挛段为著($P < 0.05$); HD 组各段两两比较也有差异($P < 0.05$); HAD 组近端与远端比较同样存在差异($P < 0.05$)。caspase-3 阳性 ICCs 百分率与 ICCs 分布密度呈负相关($r = -0.915, P < 0.01$)。

三、各组间 bcl-2 阳性 ICCs 百分率比较

bcl-2 阳性 ICCs 也呈黄色(图 3), 分别计数各病变肠管肌层内 bcl-2 阳性 ICCs 百分率, HD 组痉挛段(18.3 ± 9.3)%、移行段(31.5 ± 7.3)% 和扩张

段(42.3 ± 7.9)%, HAD 组近端(48.7 ± 6.5)% 和远端(38.5 ± 6.7)%, 对照组(60.3 ± 5.4)%。结果显示 HD 组和 HAD 组较对照组均明显降低, 以痉挛段为著($P < 0.05$); HD 组中各段两两比较有差异($P < 0.05$); HAD 组近端与远端比较也存在差异($P < 0.05$)。bcl-2 阳性 ICCs 百分率与 ICCs 分布密度呈正相关($r = 0.754, P < 0.01$)。

四、电镜观察

透射电镜显示, 对照组、HD 组及 HAD 组均可见 ICCs 凋亡现象, 呈现核染色质浓缩, 边集于核膜下, 细胞器数量变少, 细胞质出现空泡变性, 内含肿胀的线粒体、内质网或溶酶体(图 4)。

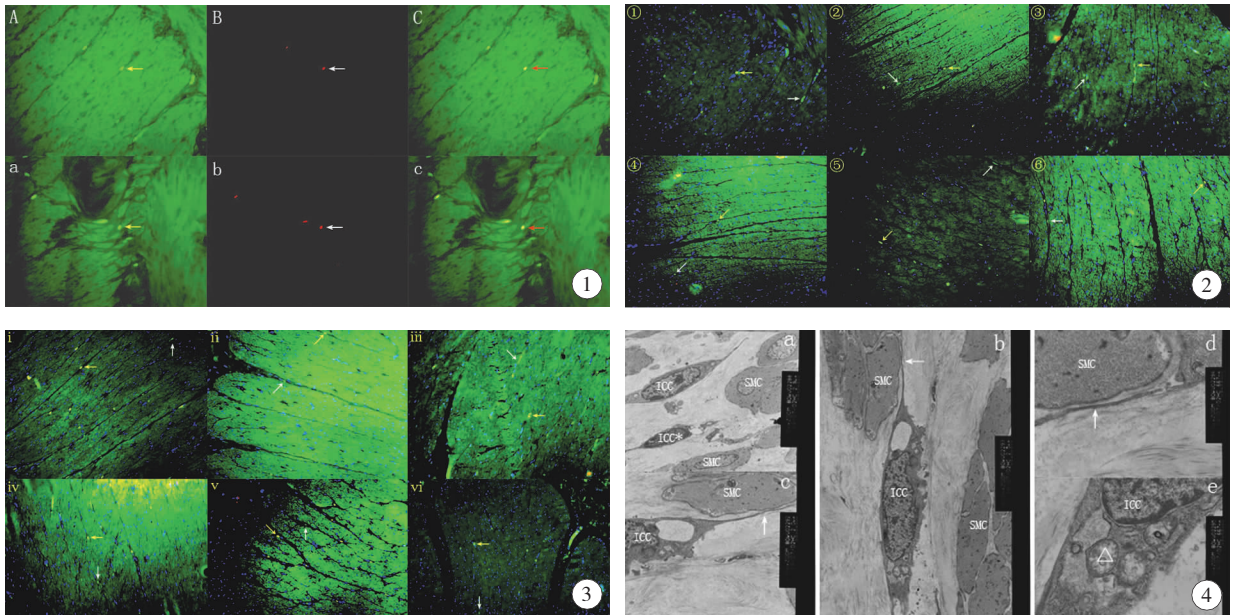


图 1 免疫荧光双标记($\times 400$) A 和 a 中黄色箭头指示为 c-kit 标记的 ICCs, B 和 b 中白色箭头指示分别为 caspase-3 阳性细胞和 bcl-2 阳性细胞, C 和 c 为合成图, 其中红色箭头指示分别为 caspase-3 阳性和 bcl-2 阳性 ICCs; 图 2 caspase-3 阳性 ICCs 在各组中分布($\times 200$), a 对照组, b 痉挛段, c 移行段, d 扩张段, e 近端, f 远端, 图中黄色箭头指示为 caspase-3 阳性 ICCs, 白色箭头指示为 ICCs; 图 3 bcl-2 阳性 ICCs 在各组中分布($\times 200$), i, 对照组; ii, 痉挛段; iii, 移行段; iv, 扩张段; v, 近端; vi, 远端, 图中黄色箭头指示为 bcl-2 阳性 ICCs, 白色箭头指示为 ICCs; 图 4 a 中所示 ICCs * 可见明显核染色质浓缩、边聚($\times 3500$), b、c、d 可见不同倍数下 ICCs 与 SMC 间关系(箭头), e 中可见胞浆空泡化, 并可见肿胀的线粒体、溶酶体($\times 15000$)。

讨论

HD 和 HAD 是一类以结直肠动力障碍为主的疾病。结直肠运动功能的产生与调节是多种细胞包括肠神经节细胞、ICCs、平滑肌细胞共同参与、协作的过程, 三者共同构成一个完整的功能元件^[4]。ICCs 作为其重要构成, 主要功能包括产生和传播慢波、传递神经递质和电活动^[5]。因此, ICCs 功能异常或缺失可导致相关胃肠道疾病的发生与发展。已

有研究证实, HD 病变肠管内 ICCs 数目较正常肠管减少, 但其机制尚不明确^[2]。

细胞凋亡是由外来因素诱发、基因调控的细胞自主且有序的程序性死亡过程, 是机体自我保护的重要措施, 细胞凋亡过程的增强还是减弱都会导致相关疾病的发生^[6]。细胞凋亡外来诱发因素包括感染、炎症、高温、中毒等, 而 HD 或 HAD 患儿常因梗阻而继发结肠炎、感染、局部缺血或坏死、甚至中毒性休克等并发症^[7], 因此这些并发症可成为肠管相关细胞凋亡的诱发因素。但是, ICCs 细胞凋亡在

HD 和 HAD 中的作用目前国内外尚未见相关报道,而 caspase-3 和 bcl-2 分别是细胞凋亡的 executor 与保护者^[8]。

本研究免疫荧光双标记结果显示,HD、HAD 及对照组患儿结肠肌层 ICCs 内均可见 caspase-3 蛋白的表达,但 HD 和 HAD 较对照组 caspase-3 阳性细胞百分率明显升高,以 HD 组痉挛段为著,表明各病变组肠管内肌层 ICCs 死亡程序激活程度有所差异。另外,HD、HAD 与对照组 bcl-2 阳性细胞百分率亦均有差异,HD 与 HAD 较对照组均明显降低,尤以 HD 组中痉挛段为著,表明各病变肠管内肌层 ICCs 保护性机制较正常组均有所减弱。细胞凋亡是人体的自我保护机制,保护和死亡程序的自我平衡是维持正常功能的基础,若二者失衡便可导致相关疾病的发生^[9]。本研究结果也证实细胞凋亡可能导致 ICCs 异常,从而在 HD、HAD 发病中发挥作用。

已有研究证实细胞转型异常及细胞凋亡是 ICCs 异常的两种方式^[3]。ICCs 是一类来源于间叶细胞的间质细胞,其产生和维持依赖于 kit 的表达,表达 kit 阳性的 ICCs 前体细胞与 kit 结合后可转型活化为 ICCs^[10]。当 kit 信号途径受损或 kit 表达降低时,ICCs 转型即会减少或向平滑肌细胞样表型转换。HD 和 HAD 的基本病理改变为病变肠管神经节细胞发育异常或缺如,而部分 kit 来源于神经节细胞的分泌,因此神经节细胞异常可导致 ICCs 异常。本研究显示,除 HAD 近端肠管肌层内 ICCs 分布密度与正常肠管无明显差异外,其余各病变肠管较对照组均有不同程度减少,这与既往文献报道一致^[2]。且其减少趋势与神经节细胞变化趋势基本一致。然而,本研究及既往研究均显示不同病变肠管肌层内 ICCs 仅表现为数目的减少,在 HD 组痉挛段中未因神经节细胞的完全缺如而零表达。Taniguchi 等^[10]在 ls/ls 小鼠无神经节细胞的动物模型中亦观察到 ICCs 的表达,但数量及分布较正常肠管不同。同时,解除 kit 信号通路干扰因素后 kit 表达阳性的 ICCs 表型可逐渐恢复^[11]。但手术成功的巨结肠症虽切除全部神经节细胞异常肠管后仍有部分患儿表现有肠功能障碍,可能与 ICCs 异常相关^[2]。同时,本研究中电镜下亦观察到 ICCs 发生细胞凋亡。因此,HD 和 HAD 中 ICCs 异常不是单纯表型转换机制异常所致,ICCs 自身的改变(细胞凋亡)亦可能导致 ICCs 异常。

同时,有学者指出 HD 或 HAD 的发生继发了 ICCs 改变,从而引起肠管的运动障碍,而 ICCs 的异

常进一步加重或促进了 HD 或 HAD 的发展^[12]。本研究结果显示 HAD 组中远端肠管肌层内 ICCs 的分布密度低于近端结肠,与 HD 中移行段及扩张段形成原因类似,由于远端运动功能障碍导致大便蓄积引起近端肠管病变,而远端肠管较近端肠管病变时间较长所致,细胞凋亡可能是其机制之一,但其具体机制尚待进一步研究证实。

参考文献

- 1 Al-Shboul OA. The importance of interstitial cells of Cajal in the gastrointestinal tract[J]. Saudi J Gastroenterol, 2013, 19(1): 3-15.
- 2 Gfroerer S, Rolle U. Interstitial cells of Cajal in the normal human gut and in Hirschsprung disease[J]. Pediatr Surg Int, 2013, 29(9): 889-897.
- 3 Farrugia G. Interstitial cells of Cajal in health and disease[J]. Neurogastroenterol Motil, 2008, 20(1): 54-63.
- 4 Rumessen JJ, Vanderwinden JM. Interstitial cells in the musculature of the gastrointestinal tract: Cajal and beyond[J]. Int Rev Cytol, 2003, 229: 115-208.
- 5 Blair PJ, Rhee PL, Sanders KM, et al. The significance of interstitial cells in neurogastroenterology[J]. J Neurogastroenterol Motil, 2014, 20(3): 294-317.
- 6 Sukhotnik I, Bernshteyn A, Mogilner JG. The basic biology of apoptosis and its implications for pediatric surgery[J]. Eur J Pediatr Surg, 2005, 15(4): 229-235.
- 7 Austin KM. The pathogenesis of Hirschsprung's disease-associated enterocolitis[J]. Semin Pediatr Surg, 2012, 21(4): 319-327.
- 8 Liu G, Wang T, Wang T, et al. Effects of apoptosis-related proteins caspase-3, Bax and Bcl-2 on cerebral ischemia rats[J]. Biomed Rep, 2013, 1(6): 861-867.
- 9 Bursch W, Oberhammer F, Schulte-Hermann R. Cell death by apoptosis and its protective role against disease[J]. Trends Pharmacol Sci, 1992, 13(6): 245-251.
- 10 Taniguchi K, Matsuura K, Matsuoka T, et al. A morphological study of the pacemaker cells of the aganglionic intestine in Hirschsprung's disease utilizing ls/ls model mice[J]. Med Mol Morphol, 2005, 38(2): 123-129.
- 11 Beckett EA, Ro S, Bayguinov Y, et al. Kit signaling is essential for development and maintenance of interstitial cells of Cajal and electrical rhythmicity in the embryonic gastrointestinal tract[J]. Dev Dyn, 2007, 236(1): 60-72.
- 12 Gudsoorkar VS, Quigley EM. Colorectal sensation and motility[J]. Curr Opin Gastroenterol, 2014, 30(1): 75-83.

(收稿日期: 2015-3-23)