

· 论 著 ·

重型颅脑损伤对小鼠小肠 Cajal 间质细胞与缝隙
连接蛋白 43 影响的实验研究*

方 欢,朱京慈[△]

(第三军医大学护理学院基础护理教研室,重庆 400038)

摘 要:目的 通过观察重型颅脑损伤(SHI)后小鼠末端回肠离体肌条运动,肠肌丛 Cajal 间质细胞(ICC)数量和小肠组织缝隙连接蛋白 43(Cx43)表达的变化,探讨 SHI 后肠动力障碍的可能机制。方法 将 36 只 8 周龄清洁级健康雄性 C57BL/6 小鼠,按随机数字表法分为创伤组(参照 Feeney 自由落体法建立小鼠 SHI 模型)和对照组(仅开骨窗不打击),每组 18 只。于伤后 3、7、14 d 取末端回肠,多通道生物信号采集与处理系统 RM6280 监测离体肌条自主收缩运动、激光共聚焦和 Western blot 检测 ICC 细胞数量及 Cx43 蛋白表达。结果 创伤组伤后 3 d 平滑肌收缩模式与对照组比较,差异有统计学意义($P<0.05$),且收缩节律紊乱;7 d 时张力下降($P<0.05$);14 d 时张力、频率与对照组比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。创伤组各时相点 ICC 细胞数量显著低于对照组($P<0.01$),ICC 分支变少且网络稀疏。创伤组 Cx43 表达量显著低于对照组($P<0.01$)。结论 小鼠 SHI 后肠道平滑肌自主收缩运动紊乱,ICC 数量和 Cx43 表达的减少或缺失,可能是造成肠神经-ICC-平滑肌网络结构电信号传递障碍,引起肠道收缩模式紊乱,导致肠动力障碍发生的机制之一。

关键词:颅脑损伤;连接蛋白 43;Cajal 间质细胞;自主节律运动;肠动力障碍

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.13.004

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)13-1450-04

Experiment study on effects of severe head injury on interstitial cells of Cajal and protein Cx43 in mice small intestine*

Fang Huan, Zhu Jingci[△]

(Department of Basic Nursing, School of Nursing, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the change of isolated muscle movement, and interstitial cells of Cajal(ICC) and protein Cx43 in the small intestine after severe head injury(SHI), and to study the possible mechanism of intestinal motility disturbance induced by SHI. **Methods** The model of SHI was built in 36 healthy adult C57BL/6 mice by the improved Feeney's weight-dropping method. The mice were randomly divided into the control group(opening skull but avoiding brain injury) and the trauma group, 18 mice in each group. The in vitro terminal ileum smooth muscle strips were taken at the time points 3, 7, 14 d after SHI, and the spontaneous contraction movement, number of terminal ileum ICC and protein Cx43 expression were observed by the RM6280 system, the laser confocal microscopy and Western blot. **Results** Compared with the control group, the smooth muscle contraction amplitude was diminished, the contraction rhythm was irregular at 3d after SHI in the trauma group($P<0.05$), the average tension was reduced at 7 d($P<0.05$), the average tension and the contraction frequency were reduced significantly at 14 d($P<0.05$). Compared with the control group, the number of ICC was significantly decreased at 3, 7, 14 d after SHI in the trauma group($P<0.01$), and ICC showed fewer branches and sparse network. Compared with the control group, the protein expression of Cx43 after SHI in the trauma group was reduced significantly($P<0.01$). **Conclusion** Spontaneous rhythmic contraction movement disorder of smooth muscle in small intestine emerges after SHI, the number of ICC and the expression of Cx43 are decreased or missed, which is one of the factors leading to electrical signals passing obstacles in network of enteric nerve-ICC-smooth muscle, causing intestinal contraction pattern disorder and resulting in intestinal motility disorder after SHI.

Key words: craniocerebral trauma; connexin 43; interstitial cells of Cajal; contraction of small intestine; gastrointestinal motility disturbance

肠动力障碍作为重型颅脑损伤(severe head injury, SHI)的常见并发症,可加重肠道内环境紊乱,引发吸入性肺炎、脓毒症等^[1],直接影响救治效果和临床预后,但其具体发生机制尚不明确。因此,探讨其机制有助于采取针对性的措施,尽快恢复 SHI 患者的胃肠功能、减少感染并发症。Cajal 间质细胞(interstitial cells of cajal, ICC)是胃肠慢波节律的起搏者及肠神经(ENS)作用于平滑肌的中介。它借助缝隙连接(gap junction, GJ)与平滑肌细胞相连^[2]。GJ 是相邻两细胞间电、化学信号传递的桥梁,介导着缝隙连接细胞通讯(gap junction inter-

cellular communication, GJIC)。缝隙连接蛋白(connexin, Cx)是 GJIC 的结构基础。有研究报道,在糖尿病性胃轻瘫、先天性巨结肠等内科疾病中,ICC 和 GJ 的损伤可能是导致这些疾病发病的重要原因之一^[3-4]。因而 SHI 后肠动力障碍是否与 ICC 及 GJ 破坏有关已成为各学者的研究热点。本研究拟观察 SHI 后离体末端回肠肌条运动、肠肌丛 ICC 数量和 Cx43 表达的变化,以探讨 SHI 伤后肠动力障碍的可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料 清洁级雄性 C57BL/6 小鼠 36 只,8 周龄,体质量

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81272079)。 作者简介:方欢(1983~),在读硕士研究生,主要从事创伤护理研究。 [△] 通讯作者, Tel: (023)68752361; E-mail: zhujingci@163.com。

表 1 两组小鼠离体末端回肠平滑肌肌条幅度和张力比较($\bar{x}\pm s,n=6$)

组别	幅度(mg)			张力(g)		
	3 d	7 d	14 d	3 d	7 d	14 d
对照组	0.114±0.021	0.098±0.016	0.103±0.023	0.327±0.03	0.459±0.038	0.522±0.044
创伤组	0.075±0.006	0.076±0.010	0.096±0.024	0.222±0.173	0.196±0.076	0.330±0.153
<i>t</i>	4.321	2.817	0.515	1.448	7.573	2.941
<i>P</i>	0.048	0.149	0.990	0.007	0.027	0.010

(20±2)g,由第三军医大学大坪医院实验动物中心提供。大鼠抗小鼠 c-Kit 单克隆抗体(ACK2),购自美国 BD Biosciences 公司;小鼠抗大鼠 connexin-43 抗体,购自美国 BD Biosciences 公司;FITC 标记的驴抗大鼠抗体,购自美国 Invitrogen 公司;Krebs 液,用前现制。动物立体定向仪(江湾 I 型),购自上海江湾化工机械厂;MICRO-NX 型牙科钻,购自韩国 TAEGU 公司;SMZ2168 立体显微镜,购自德国 Motic 公司;TCS-SP5 激光共聚焦扫描显微镜,购自德国 Leica 公司。

1.2 方法

1.2.1 动物分组 采用随机数字表法将 36 只小鼠随机分为对照组和创伤组,每组 18 只。于致伤后 3、7、14 d 取材进行指标检测,每时相点 6 只。

1.2.2 模型制备 参考文献[5]建立 SHI 模型。造模前小鼠均禁食 12 h,自由饮水。以 1%戊巴比妥钠按照 40 mg/kg 进行腹腔注射麻醉,将出现夹尾反应的小鼠固定于立体定向仪上,不固定头部,待颅顶部脱毛、消毒后正中切开头皮,以牙科钻在冠状缝后 3 mm 与矢状缝右侧 3 mm 交会处钻孔,扩大骨窗至 2 mm×2 mm(前至冠状缝,左界为矢状缝右旁 1.5 mm),保持硬膜完整;将 18 g 圆柱状打击杆的打击端(直径 3 mm)向下,在固定于支架上的套管内 16 cm 处垂直释放,以钻孔处为打击中心,建立小鼠 SHI 模型。致伤后吸收性明胶海绵局部止血,至无活动性出血后缝合头皮。待其自然苏醒后可进水。对照组只开骨窗不打击。造模成功后,所有存活小鼠均于无特定病原体(SPF)环境中分笼饲养,期间自由饮食。

1.2.3 离体末端回肠肌条运动测定 麻醉后距回盲部 3 cm 处取回肠 1 cm,悬挂于盛有新鲜 Krebs-Ringers 缓冲液(科氏液)并有混合气体的恒温灌流槽中孵育 1 h,给予张力换能器 1 g 的负荷。张力换能器输入 RM6280C 型生理记录仪,灵敏度为 0.75 g,扫描速度为 800 s/div。平衡 30 min 后调节微调器使张力升至 0.75 g,待肌条出现自发性收缩并基线稳定后开始记录张力收缩曲线 15 min,分析肌条运动的模式。

1.2.4 全层小肠铺片与 ICC 检测 麻醉后距回盲部 6 cm 取末端回肠 8~10 cm,0.01 mol/L 磷酸缓冲液(PBS)洗净肠腔内容物后置入丙酮固定 6~8 h,用钟表镊将环形平滑肌层和纵行平滑肌留下。PBS 漂洗 3 次,每次 5 min。1%牛血清蛋白(BSA)孵育 30 min 后加入第一抗体,酪氨酸激酶受体蛋白(Kit)单克隆抗体(1:100)4℃冰箱过夜;异硫氰酸荧光素(FITC)标记的驴抗大鼠 IgG 抗体(1:100)25℃,避光孵育 60 min;蓝色荧光染料(DAPI)复染细胞核后,水溶性封片剂封片。用适合 FITC(488 nm)的激发波长观察标本,扫描采集 Kit 阳性反应图像,用于图像采集的显微镜为×63 油镜,数值孔径为 1.4,Kit 阳性表现为绿色荧光。阴性对照实验以正常鼠血清代替一抗,其余操作步骤同上。

1.2.5 Western blot 法检测 Cx43 蛋白表达 取末端回肠 1~

2 cm,蛋白裂解液提取各组蛋白,Bicinchoninic acid(BCA)法测定蛋白浓度。按每泳道 50 μg 蛋白加样,恒流 40 mA 电泳,恒压 120 V 转膜 2 h,室温摇床封闭 2 h。加入一抗 Cx43 抗体(1:500),37℃孵育 1 h,4℃过夜,洗膜 3 次,加入二抗(1:4 000),37℃孵育 2 h,曝光、显影。凝胶图像分析系统采集图像,软件 Image-Pro Plus 5.1 分析光密度(OD)值。β-Actin 为内参进行蛋白半定量分析。

1.2.6 肌条收缩的幅度、频率和张力检测 使用 RM6280 系列多通道生理信号采集处理系统 4.2 测量,选取肌条收缩稳定的 1 min 结果进行统计分析。免疫荧光染色铺片每组 6 张,在荧光显微镜下随机选择 12 个视野,用 Leica confocal software 图像分析软件进行图像三维重建,并用 Image-Pro Plus 5.1 软件统计 Kit 阳性细胞数量。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组比较进行独立样本 *t* 检验,以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小肠离体末端回肠平滑肌肌条运动模式 对照组各时相点肌条收缩规律整齐;创伤组肌条收缩幅度减弱(*P*<0.05),且模式紊乱不规律,张力与频率与对照组比较,差异有统计学意义(*P*<0.05),见表 1、2。

表 2 两组小鼠离体末端回肠平滑肌肌条频率比较($\bar{x}\pm s,次/分,n=6$)

组别	3 d	7 d	14 d
对照组	23.095±0.138	23.153±0.234	23.556±0.259
创伤组	22.053±0.354	21.724±0.813	22.331±1.119
<i>t</i>	6.716	4.135	2.612
<i>P</i>	0.022	0.127	0.029

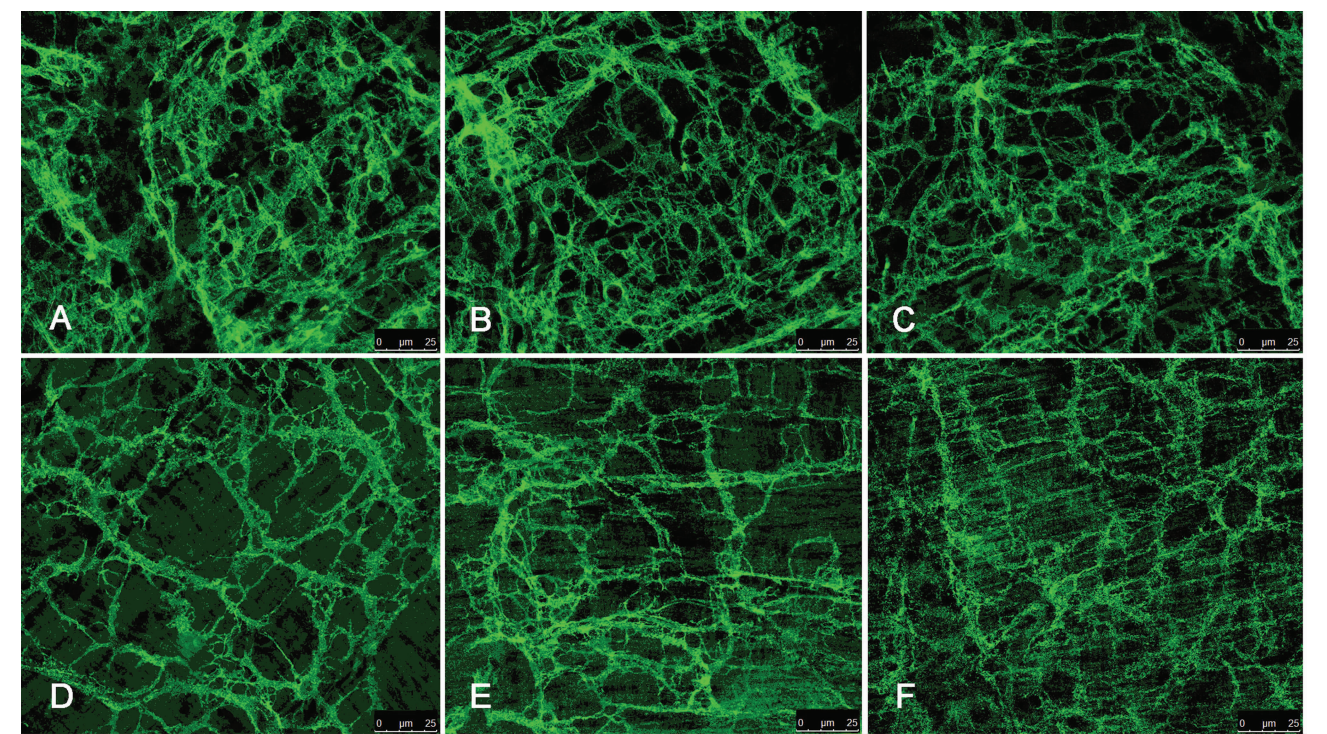
2.2 ICC 细胞形态 对照组小鼠肠肌丛 ICC 细胞形态饱满,呈长梭形或星状,细胞核大且 DAPI 染色清晰,有 2~3 个长分支,并与肌纤维或神经纤维平行走行,相互间形成完整网络样结构,网络密集。而创伤组各时相点小肠 ICC 网络结构明显受损,相互间以及与平滑肌间出现较大的细胞间隙,网络变稀薄,见图 1。阴性对照实验结果均为阴性。

表 3 两组不同时间点 ICC Kit 阳性细胞比较($\bar{x}\pm s,个/mm^2,n=6$)

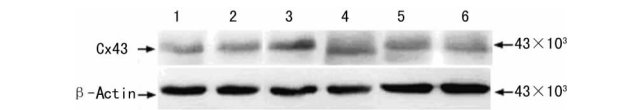
组别	3 d	7 d	14 d
对照组	555±44.63	614±34.79	655±41.18
创伤组	336±37.60	411±29.07	472±17.56
<i>t</i>	5.904	3.721	3.253
<i>P</i>	0.000	0.004	0.009

2.3 ICC 数量变化 创伤组各时相点的末端回肠 ICC Kit 阳性细胞数量减少,与对照组比较,差异有统计学意义($P<0.01$),见表 3。

2.4 Cx43 的蛋白表达情况 创伤组各时相点与对照组比较, Cx43 蛋白表达量下降,差异均有统计学意义($P<0.01$),见图 2、表 4。



A、B、C 分别为对照组 3、7、14 d 小鼠肠道 ICC；D、E、F 分别为创伤组 3、7、14 d 小鼠肠道 ICC。
图 1 免疫荧光标记的小鼠肠道 ICC 网络结构(放大 25 μm 倍)



1、3、5 分别为对照组 3、7、14 d；2、4、6 分别为创伤组 3、7、14 d。
图 2 两组小鼠小肠组织 Cx43 蛋白 Western blot 检测结果

表 4	两组小鼠末端回肠 Cx43 相对表达量比较($\bar{x}\pm s, n=6$)		
组别	3 d	7 d	14 d
对照组	0.485±0.090	0.548±0.119	0.577±0.117
创伤组	0.216±0.066	0.340±0.068	0.398±0.066
<i>t</i>	3.738	3.974	3.716
<i>P</i>	0.001	0.001	0.001

3 讨 论

形态学研究证实小肠 ICC 分为肌间丛 ICC(ICC-MY)和深肌丛 ICC(ICC-DMP)。它们通过 GJ 和紧密连接与平滑肌细胞、神经末梢连成网络^[2]。胃肠道自主节律运动的正常,除依赖平滑肌的结构与舒缩功能及神经-胃肠激素的调节外,ICC 和 GJ 也发挥了重要作用。近年研究表明,在 ICC 形成网络结构的区域大都存在 Cx43^[6],其在 ICC 细胞体和突起上均有表达。ICC-DMP 和平滑肌细胞之间的 GJ 可让肌细胞直接接受来自 ICC-DMP 的电信号和化学信号,从而受到肠神经的间接调控引起肌细胞的收缩。在 ICC-MY 之间也发现了类似的结果。SHI 后由于全身血液再分布,肠道血流量减少较体循环更显著,可出现严重的缺血、缺氧及再灌注损伤。据报道,肠道平滑肌在高炎症时发生细胞及周围组织结构损伤,可致运动模式

异常;在豚鼠缺血再灌注损伤模型中发现小肠 ICC 凋亡,网络结构破坏;在(MODS)大鼠的胃肠道中存在 Cx43 的损伤^[7-9]。那么由中枢损伤引发的肠动力障碍,是否与小肠 ICC 及 Cx43 的损伤而引起平滑肌舒缩模式改变有关,有待于进一步的研究证实。

本实验采用小肠离体肌条及全肌层组织标本,从器官水平及细胞、分子水平观察了小鼠 SHI 后肠动力和 ICC 网络及其 Cx43 的变化。结果发现,创伤组伤后 3 d 离体平滑肌条收缩幅度和频率较对照组明显减少,14 d 内仍然低于对照组水平。表明 SHI 小鼠的肠收缩运动减弱,提示 SHI 后早期即出现小肠平滑肌自主节律运动异常,符合临床患者腹胀、便秘等肠运动减慢的现象。分析原因可能与创伤应激致中枢、肠壁神经介质释放异常有关。这与课题组前期研究发现 SHI 后小肠推进率显著降低,且 14 d 内胃肠动力障碍持续存在的结果相一致^[10]。而形态学结果显示,对照组小肠 ICC 为完整的立体三维网络样结构;创伤组小肠 ICC 网络结构不连续,相互间出现裂隙,14 d 仍未完全恢复。表明 SHI 后肠 ICC 损伤,且损伤后修复需要较长过程,此结果进一步解释了为什么临床上伤后肠动力障碍发生率高且恢复时间较长。分析原因可能为:(1) SHI 后中性粒细胞和巨噬细胞等炎症细胞大量浸润^[11],损伤 Kit 受体表达及妨碍 Kit 抗原结合,致阳性 ICC 表达减少;(2) 由于 ICC 对缺氧敏感,SHI 后肠道缺血、缺氧及再灌注损伤等病理因素启动凋亡程序,使 ICC 网络平衡向增殖减少、坏死和凋亡增多的方向发展致细胞数量减少;(3) ICC 生存和修复来源于肥大细胞、肠神经元、平滑肌的维持^[12]。本课题组前期电镜发现 SHI 后肠平滑肌细胞和神经细胞严重损伤^[10],故无法正常维持 ICC 的生存与修复,导致 ICC 细胞数量减少,修复时

间变长,最终影响肠道功能。

GJ 由相邻胞膜上的连接子衔接形成,每个连接子又包含 6 个 Cx,其中 Cx43 的表达最广泛^[13],具有生化耦联和保证肌细胞间电兴奋快速扩散、协调细胞间活动一致性的功能,并受细胞内 pH 值、Ca²⁺ 浓度、跨通道电压、Cx 的磷酸化状态等因素影响。有文献报道,在糖尿病大鼠胃体和胃窦 Cx43 表达明显减少,导致胃运动功能障碍^[14]。本实验结果显示,SHI 后肠肌层中的 Cx43 表达量减少,提示细胞间 GJ 破坏,ICC 之间及与平滑肌之间激素、神经介质和一些激动剂或拮抗剂等物质交换不畅,导致该部位动作电位传递受阻,这与国外学者的研究结果一致^[15-16]。说明 SHI 后自由基增加、代谢产物蓄积、pH 值改变以及肠道内菌群失调、黏膜屏障破坏等可能因素造成的细胞连接损伤,GJ 功能丧失,最终影响了肠道收缩活动。

综上所述,肠肌丛 ICC 数量减少和网络受损,以及 Cx43 的表达缺失或减少,是造成肠神经-ICC-平滑肌网络结构电信号传递障碍,引起肠道收缩模式紊乱,导致脑损伤后动力障碍的可能机制之一。该研究结果提示,以预防或减轻 ICC 的损伤,促进受损 ICC 的修复,增加 Cx43 蛋白的表达可能是 SHI 后肠动力障碍治疗的新思路。

参考文献:

[1] Herbert MK, Holzer P. Standardized concept for the treatment of gastrointestinal dysmotility in critically ill patients—current status and future options[J]. Clin Nutr, 2008, 27(1): 25-41.

[2] Huizinga JD, Zarate N, Farrugia G. Physiology, injury, and recovery of interstitial cells of Cajal: basic and clinical science[J]. Gastroenterology, 2009, 137(5): 1548-1556.

[3] Kashyap P, Farrugia G. Diabetic gastroparesis: what we have learned and had to unlearn in the past 5 years[J]. Gut, 2010, 59(12): 1716-1726.

[4] 杨焯,侯豫,赵新,等. 先天性巨结肠肠壁 Cx43 蛋白和 Cajal 间质细胞的分布[J]. 中国当代儿科杂志, 2009, 11(3): 213-216.

[5] Li M, Li F, Luo C, et al. Immediate splenectomy decreases mortality and improves cognitive function of rats after severe traumatic brain injury[J]. J Trauma, 2011, 71(1): 141-147.

[6] 代从新,齐清会. 连接蛋白 43 与胃肠运动[J]. 国际消化病杂志, 2009, 29(5): 334-336.

[7] Kiyosue M, Fujisawa M, Kinoshita K, et al. Different susceptibilities of spontaneous rhythmicity and myogenic contractility to intestinal muscularis inflammation in the hapten-induced colitis[J]. Neurogastroenterol Motil, 2006, 18(11): 1019-1030.

[8] 韩鹏,何扬涛,梅峰. 小肠缺血再灌注损伤导致 Cajal 间质细胞凋亡的实验研究[J]. 局解手术学杂志, 2010, 19(2): 80-82.

[9] 李毅,齐清会,张栋梁,等. 大承气汤对 MODS 大鼠小肠深部肌间 Cajal 间质细胞损伤的作用[J]. 中国中西医结合外科杂志, 2008, 14(3): 230-234.

[10] Yu XY, Yin HH, Zhu JC. Increased gut absorptive capacity in rats with severe head injury after feeding with probiotics[J]. Nutrition, 2011, 27(1): 100-107.

[11] 李睿明,易燕锋,张蓓,等. 基于 Cajal 间质细胞异常的胃肠道动力障碍动物模型研究进展评述[J]. 现代中西医结合杂志, 2008, 17(16): 2576-2577.

[12] Matsuura T, Masumoto K, Ieiri S, et al. Morphological and physiological changes of interstitial cells of Cajal after small bowel transplantation in rats[J]. Transpl Int, 2007, 20(7): 616-624.

[13] 王琪. 缝隙连接蛋白 43 研究进展[J]. 中西医结合研究, 2010, 2(6): 312-316.

[13] 吴汉妮,田晗,张喜婷,等. Cajal 间质细胞和间隙连接蛋白 43 参与糖尿病胃轻瘫机制的实验研究[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2007, 23(6): 555-556.

[14] Cai ZX, Li Y, Qi QH. Morphological changes in interstitial cells of Cajal in the deep muscular plexus and enteric motor neurons of the intestine in rats with multiple organ dysfunction syndrome[J]. Nutrition, 2010, 5(8): 635-636.

[16] Segnani C, Battolla B, Ippolito C, et al. Cx43, RhoA and c-kit in diverticular disease[J]. J Anat, 2011, 116(1): 169-170.

(收稿日期:2012-12-06 修回日期:2013-01-25)

(上接第 1449 页)

[8] Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions[J]. Cell, 2009, 136(2): 215-233.

[9] Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs[J]. Cell, 2009, 136(4): 642-655.

[10] Krol J, Loedige I, Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay[J]. Nat Rev Genet, 2010, 11(9): 597-610.

[11] Gregory RI, Chendrimada TP, Cooch N, et al. Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing[J]. Cell, 2005, 123(4): 631-640.

[12] Wang MM. Notch signaling and Notch signaling modifiers[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2011, 43(11): 1550-1562.

[13] Gude NA, Emmanuel G, Wu W, et al. Activation of notch-mediated protective signaling in the myocardium[J]. Circ Res, 2008, 102(9): 1025-1035.

[14] 杨阳,段维勋,周京军,等. γ -分泌酶抑制剂对正常小鼠心肌细胞的影响[J]. 中国体外循环杂志, 2011, 9(2): 89-92.

[15] Li Y, Hiroi Y, Ngoy S, et al. Notch1 in bone marrow-derived cells mediates cardiac repair after myocardial infarction[J]. Circulation, 2011, 123(8): 866-876.

(收稿日期:2012-09-08 修回日期:2012-12-22)