

论著·临床研究

先天性巨结肠肠壁 Cx43 蛋白和 Cajal 间质细胞的分布

杨烨,侯豫,赵新,张薇,王宝西

(第四军医大学唐都医院儿科,陕西 西安 710038)

[摘要] 目的 观察缝隙连接蛋白 43 (Cx43) 及 Cajal 间质细胞 (ICC) 在先天性巨结肠 (HD) 肠壁中的分布,探讨 Cx43 和 ICC 与 HD 发病的关系。方法 运用免疫组织化学方法观察 42 例经病理诊断为 HD 的肠壁标本内各层之间 Cx43 蛋白和 ICC 的分布情况,其中男 33 例,女 9 例(年龄 2 个月至 10 岁),实验标本均为散发病例,全部取材经组织病理学检测符合 HD 诊断,包括常见型 30 例,短段型 12 例,并取 5 例肠套叠患儿(30 d 至 8 岁,男 4 例,女 1 例)作为对照组。结果 HD 狭窄段(无神经节细胞肠段)肠壁肌层内 Cx43 和 ICC 表达缺失,各层中几乎未见 Cx43 表达和 ICC 分布,与 HD 扩张段(有神经节细胞肠段)及正常对照组之间的差异有显著性意义 ($P<0.01$)。HD 移行段肠壁 Cx43 和 ICC 有中等强度表达,与扩张段、狭窄段之间差异有显著性 ($P<0.01$)。HD 扩张段肠壁 Cx43 和 ICC 呈强阳性分布,黏膜下层和纵肌层未见或少见 Cx43 表达。HD 扩张段和正常对照组肠壁内 Cx43 和 ICC 表达差异无显著性。结论 Cx43 表达缺失或减少、缝隙连接结构的破坏及 ICC 结构、分布异常,导致细胞间物质、电信号的传递障碍,可能是 HD 发病的原因之一。 [中国当代儿科杂志,2009,11(3):213-216]

[关键词] 先天性巨结肠;缝隙连接蛋白;Cajal 间质细胞;免疫组织化学;儿童

[中图分类号] R574.62 [文献标识码] A [文章编号] 1008-8830(2009)03-0213-04

Distribution of connexin 43 and interstitial cells of Cajal in bowels of children with Hirschsprung's disease

YANG Ye, HOU Yu, ZHAO Xin, ZHANG Wei, WANG Bao-Xi. Department of Pediatrics, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, China (Wang B-X, Email: erkewbx@fmmu.edu.cn)

Abstract: Objective To investigate the distribution of connexin 43 (Cx43) and interstitial cells of Cajal (ICC) in bowels of children with Hirschsprung's disease (HD) and explore their roles in the pathogenesis of HD. **Methods** Forty-two children with HD diagnosed by histopathology (33 males and 9 females) aged from 2 months to 10 years were enrolled. Expression of Cx43 and ICC in the bowels was detected using immunohistochemistry. These cases were all sporadic, including 30 cases of common type and 12 cases of short segment type. Five samples from the children with intussusception (aged from 1 month to 8 years) were used as controls. **Results** Cx43 and ICC were not expressed in the muscle layers of the aganglionic segment in children with HD, which was significantly different from the Cx43 and ICC expression in the ganglionic segment of HD patients and the control bowels. Moderate expression of Cx43 and ICC were observed in the migratory segment, which was significantly different from that in the ganglionic and aganglionic segments in patients with HD. Moderate or strong expression of Cx43 and ICC was observed in the circular muscle and the region between the circular and longitudinal layer in the ganglionic segment from patients with HD. There were no significant differences in the Cx43 and ICC expression between the ganglionic segment of HD patients and control bowels. **Conclusions** The absence of Cx43 and ICC expression in the aganglionic bowel and the destruction of the gap junction may induce the dysfunctions of intercellular substance exchange and communication transmission, which might partly be responsible for the pathogenesis of HD. [Chin J Contemp Pediatr, 2009, 11 (3):213-216]

Key words: Hirschsprung's disease; Connexin 43; Interstitial cell of Cajal; Immunohistochemistry; Child

先天性巨结肠 (Hirschsprung's disease, HD) 是以结肠远端或直肠内缺失神经节细胞为特征的胃肠动力性疾病,其病变肠段缺乏推进式运动,从而引起梗阻症状,是新生儿期低位肠梗阻常见原因之一。

病因尚未阐明,目前大多认为系遗传及环境多种因素综合作用、共同调控的结果^[1]。

Cajal 间质细胞(interstitial cells of Cajal, ICC)广泛分布于消化道,是胃肠慢波活动的起搏细胞及其

[收稿日期]2008-06-30;[修回日期]2008-08-23
[基金项目]陕西省自然科学基金资助项目(编号:2003C2022)
[作者简介]杨烨,女,硕士研究生,医师。主攻方向:小儿胃肠动力病学。
[通讯作者]王宝西,男,教授,第四军医大学唐都医院儿科,邮编:710038。

基本电节律的主要传播细胞,并参与胃肠道神经信息的传递^[2]。近年研究表明,ICC 与众多胃肠道疾病关系密切,其分布异常、数目减少可能是这些疾病发病的重要病理生理机制之一。ICC 的基因表达产物 c-kit (一种编码酪氨酸激酶膜受体的原癌基因)对于 ICC 表型的发育与维持是必须的,是胃肠道 ICC 的特异性标志物,采用抗 c-kit 抗体可选择性标识 ICC,有较高的特异性。

缝隙连接(gap junction, GJ)是相邻两个细胞之间的连接通道排列而成的一种特殊膜结构,相邻细胞通过缝隙连接进行信息、能量和物质交换,参与细胞间物质、电信号的传递。其中连接蛋白 43 (connexin 43, Cx43)是人类主要细胞缝隙连接蛋白,其表达异常与多种疾病发生有关^[3]。

本研究采用免疫组化法检测 ICC 及 Cx43 在 HD 患儿正常及病变肠段肠壁内的分布,探讨 ICC 和 Cx43 与 HD 发病机制的关系,为先天性巨结肠病因的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 临床资料

标本取自 2006 年 8 月至 2007 年 9 月西安市儿童医院、唐都医院收治的 HD 患儿手术切除标本共 42 例,其中男 33 例,女 9 例(年龄 2 个月至 10 岁),西安市儿童医院收治的肠套叠手术病人 5 例为对照组(30 d 至 8 岁,男 4 例,女 1 例,经病理证实为正常节段标本)。本实验收集患儿全部为散发病例,包括常见型 30 例,短段型 12 例,合并回肠闭锁 1 例,合并先天性肠扭转不良 2 例。取材经 S-100 蛋白组织病理学检测符合 HD 诊断^[4]。

1.2 试剂

一抗为兔抗人 Cx43 多克隆抗体(1:50, Zymed 公司)和鼠抗人 c-kit 单克隆抗体(1:50, Santacruz 公司),二抗由北京中杉试剂公司提供,用磷酸盐缓冲液代替一抗做阴性对照。

1.3 免疫组化方法步骤

标本经 8% 多聚甲醛固定,石蜡包埋、连续切片,每例行 c-kit 及 Cx43 染色。苏木精-伊红染色按常规法进行,确认标本取材准确、完整;免疫组化染色按常规进行。

1.4 统计学分析

每张切片取 10 个高倍镜视野下的阳性细胞计数,取其平均值计算均数及标准差,采用 SPSS 11.5 软件进行统计学处理,多样本均数之间比较采用单

因素方差分析,多重比较采用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 认为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 Cx43 的分布

2.1.1 正常结肠肠壁内 Cx43 的分布情况

Cx43 在正常结肠肠壁内分布主要位于环肌层与纵肌层交界部(环肌层最外层),黏膜下层及纵肌层偶见阳性细胞分布,与 HD 扩张段肠壁分布相似(图 1A)。正常对照组及扩张段肠壁肌间层、环肌层 Cx43 的表达明显强于黏膜下层。

2.1.2 HD 肠壁内 Cx43 的分布情况 HD 狭窄段肠壁各层中几乎未见 Cx43 的表达(图 1B);HD 扩张段肠壁环肌层与纵肌层交界部位 Cx43 呈强阳性分布(图 1C);移行段肠壁环肌层与纵肌层交界部位可见 Cx43 中等强度阳性分部(图 1D);黏膜下层和纵肌层未见或少见 Cx43 表达。

2.1.3 肠肌层内 Cx43 的半定量分析 正常结肠及 HD 结肠肠壁内 Cx43 的半定量分析,显示 HD 狭窄段肠壁肌层内 Cx43 的表达与正常对照组之间的差异有显著性($t = 6.457, P < 0.01$),与扩张段之间的差异有显著性($t = 5.357, P < 0.01$);对照组与 HD 扩张组比较差异无显著性。扩张组与移行组比较差异有显著性($t = 3.580, P < 0.01$);移行组与狭窄组比较差异有显著性($t = 4.371, P < 0.01$;表 1)。

表 1 Cx43 蛋白和 ICC 在 HD 肠壁环、纵肌层交界部的表达

		$(\bar{x} \pm s)$	
分组	标本例数	Cx43 蛋白阳性	ICC 阳性细胞数
对照组	5	58.32 ± 6.17	10.24 ± 0.83
扩张段组	42	53.85 ± 5.30	8.37 ± 0.73
移行段组	42	16.26 ± 3.69	3.49 ± 0.48
狭窄段组	42	1.40 ± 1.17	0.84 ± 0.36

2.2 ICC 的分布

2.2.1 正常结肠肠壁内 ICC 的分布情况 ICC 在正常结肠肠壁内分布主要位于环肌层与纵肌层及其交界部,黏膜下层偶见阳性细胞分布,与 HD 扩张段肠壁分布相似(图 2A)。

2.2.2 HD 肠壁内 ICC 分布情况 HD 狭窄段肠壁各层中几乎未见 ICC 的表达(图 2B);HD 移行段肠壁环肌层与纵肌层部位 ICC 逐渐增多(图 2C);扩张段肠壁环肌层与纵肌层部位 ICC 呈强阳性分布(图 2D)。

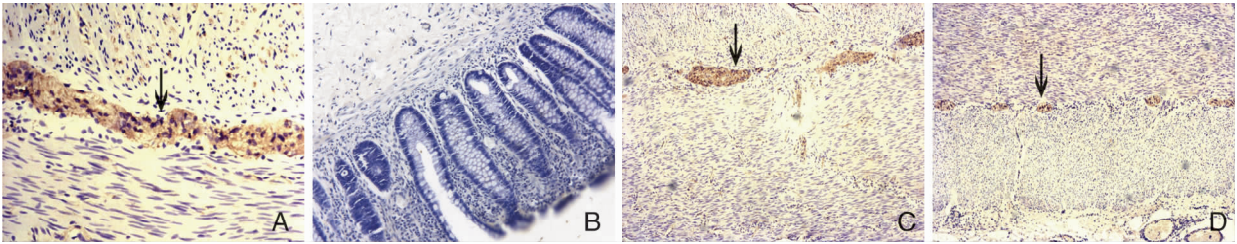


图1 各组肠壁 Cx43 分布情况(×100,箭头所指为 Cx43 染色阳性细胞) A:对照组肌间层可见 Cx43 表达; B:HD 狭窄段肠壁,无神经节细胞段未见 Cx43 表达; C:HD 有神经节细胞段可见 Cx43 呈强阳性分布; D:HD 移行段细胞可见 Cx43 中等强度分布。

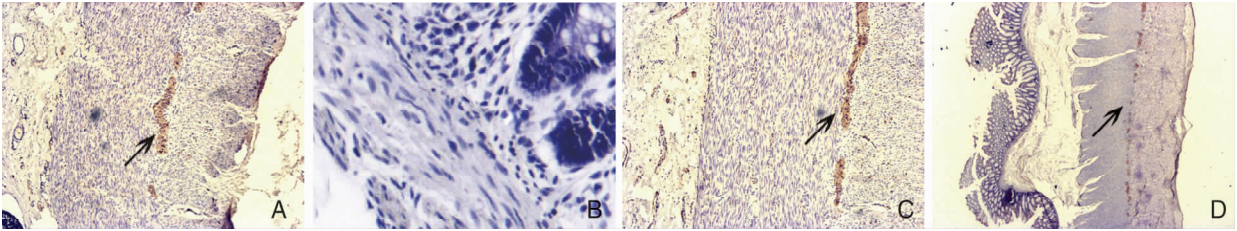


图2 各组肠壁 ICC 分布情况(×100,箭头所指为 ICC 染色阳性细胞) A:对照组环肌层,偶见 ICC 阳性细胞分布; B:HD 无神经节细胞段可见 ICC 的表达; C:HD 有神经节细胞段可见 ICC 表达; D:HD 移行段细胞 ICC 呈强阳性表达。

2.2.3 肠肌层内 ICC 的半定量分析 正常结肠及 HD 结肠肠壁内 ICC 的半定量分析,显示 HD 狭窄段肠壁肌层内 ICC 的表达与正常对照组之间的差异有显著性($t=6.457, P<0.01$),与扩张段之间的差异有显著性($t=5.357, P<0.01$);对照组与 HD 扩张组比较差异无显著性;扩张组与移行组比较差异有显著性($t=3.580, P<0.01$);移行组与狭窄组比较差异有显著性($t=4.371, P<0.01$,表1)。

3 讨论

HD 病因目前尚不完全清楚,对该病病因和发病机制的研究仍然是国内外学者的热门话题。近年来,人们对 HD 的发病机制有了更深入的认识,大多数学者认为 HD 是具有多基因遗传特性的先天性发育畸形,胚胎早期阶段微环境改变及遗传学因素在巨结肠发病中起重要作用,既往研究发现,HD 肠动力障碍与多种因素相关,如遗传因素:RET、EDN3、NOS 等基因的改变^[5];早期胚胎阶段微环境改变:细胞外基质蛋白、细胞黏附分子、神经生长因子等减少,可能导致病变肠段神经元的发育和成熟障碍^[6];肠壁内抑制性神经递质 NO 含量异常;胆碱能纤维增生、肾上腺素能神经纤维功能减弱;非肾上腺素性抑制性肽类递质含量改变;神经细胞黏附分子表达异常致神经肌肉接头减少^[7];以及与胃肠动力有关的 Cajal 间质细胞分布异常或减少有关等^[8]。

ICC 广泛分布于消化道,是胃肠慢波活动的起

搏细胞及基本电节律的主要传播细胞,是肠神经系统与肠道平滑肌之间的桥梁和纽带^[2]。ICC 的基因表达产物 c-kit 对于 ICC 表型的发育与维持是必须的,是胃肠道 ICC 的特异性标志物^[9]。ICC 的主要功能有:作为胃肠道平滑肌的起搏细胞,产生生理慢波,并促进电活动的扩布,从而控制胃肠道平滑肌的收缩和蠕动^[2];它们是胃肠道非肾上腺能、非胆碱能抑制性神经传递的介质;还与某些胃肠激素的运动调节功能有关。近年研究表明,ICC 作为消化道一种特殊的间质细胞,与众多胃肠道疾病关系密切,如胃食管反流^[10]、胃轻瘫^[11]、溃疡性结肠炎^[12]、慢传输性便秘^[13]等,其数量及结构的变化可能是 HD 发病过程中的重要病理生理机制之一。

缝隙连接是细胞间信息传导的主要通道,缝隙连接蛋白在动物体内分布很广。其中 Cx43 是一种主要的细胞间隙连接蛋白,由总长度为 2 768 碱基对(bp)的 3 条互补脱氧核糖核酸(cDNA)所编码。Cx43 蛋白与机体许多病理生理过程有密切的联系,其表达异常与多种疾病的发生有关^[3]。有研究显示,心脏 Cx43 蛋白表达缺失,心律失常和心肌梗塞的发生率明显增加^[14];多种癌细胞中都有 Cx43 表达下降^[15]。膀胱平滑肌 Cx43 表达上调,膀胱的收缩排空能力增加^[16]。Cx43 蛋白的表达高低与分娩过程中子宫平滑肌的收缩强度也密切相关^[17]。高红等^[18]的研究发现,HD 组织中 Pax3 和 Cx43 基因突变及表达异常可能与 HD 的发生密切相关,Pax3 和 Cx43 突变可能造成信息传递缺陷,扰乱了神经嵂

细胞的迁移,从而导致 HD 的发生。由此推测,各种先天性或后天性因素引起缝隙连接结构破坏,导致细胞间信息和物质传递障碍,可能是 HD 肠动力障碍的多种致病因素之一。

ICC 的研究发现,ICC 与 ICC 之间,ICC 与平滑肌之间,ICC 与神经细胞之间形成网络和很多缝隙连接^[2]。由此推测,缝隙连接作为细胞间物质、信息传导的主要通道,可能影响 ICC 与平滑肌间信号传递,从而影响 ICC 胃肠慢波起搏的功能,参与 HD 发病的病理生理过程。

本实验采用免疫组织化学方法,在石蜡切片上显示并利用普通光学显微镜观察,分别对 Cx43 和 ICC 进行定位、定性和半定量分析,所需仪器设备简单,经济实用,为先天性巨结肠发病机制的研究奠定了实验基础,并为 ICC 结构和功能的研究提供了新思路。本实验收集 42 例 HD 患儿肠壁标本,运用免疫组织化学方法观察正常及病变肠段内 Cx43 和 ICC 的表达情况,结果发现在正常对照组及 HD 扩张段肠壁的环肌层、肌间层,尤其是环肌层的最外层,有阳性至强阳性的 Cx43 和 ICC 表达;HD 移行段 Cx43 和 ICC 的表达减弱;在狭窄段肠壁内 Cx43 和 ICC 表达明显减少或消失。Cx43 和 ICC 在 HD 有神经节细胞肠段肠壁内均呈阳性表达,且表达部位相似,此肠段肠壁的蠕动功能正常;在 HD 移行段细胞肠壁,Cx43 和 ICC 表达均减少;在 HD 无神经节细胞肠段,Cx43 和 ICC 表达均为阴性,肠蠕动功能减弱或消失。由此推测,HD 发病可能与 Cx43 和 ICC 的表达缺失有关;Cx43 和 ICC 在正常及病变肠段内的分布基本一致,提示二者之间可能存在联系,即 ICC 之间可能存在缝隙连接,HD 肠壁内缝隙连接结构缺失或结构破坏,可能妨碍细胞之间物质信号的传递,从而引起肠蠕动功能异常^[19]。

然而 Cx43 与 ICC 的确定定位关系,及 Cx43 对 ICC 和胃肠功能的作用机制,有待更先进技术的研究,如免疫双染法等将二者同时定位于同一张切片;究竟是 Cx43 和 ICC 缺失引起 HD 的肠功能障碍,还是肠功能障碍导致 Cx43 和 ICC 表达缺失,是否为原发始动因素,亦或是继发改变,尚待于进一步研究。

[参 考 文 献]

[1] de Lorijn F, Boeckxstaens GE, Benninga MA. Symptomatology,

pathophysiology, diagnostic work-up, and treatment of Hirschsprung disease in infancy and childhood [J]. *Curr Gastroenterol Rep*, 2007, 9(3):245-253.

[2] Burns AJ. Disorders of interstitial cells of Cajal [J]. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2007, 45(Suppl 2):S103-106.

[3] 乔颜春,孙青. 连接蛋白 Connexin43 的研究进展 [J]. *国际病理科学与临床杂志*, 2005, 25(4):345-347.

[4] 张华,李仲荣,朱利斌,陈聪德,谢小志,谢丽微. 先天性巨结肠肠壁 S-100 蛋白的表达和神经元型一氧化氮合酶阳性神经的异常分布 [J]. *实用儿科临床杂志*, 2006, 21(12):793-794.

[5] Amiel J, Sproat-Emison E, Garcia-Barcelo M, Lantieri F, Burzynski G, Borrego S. Hirschsprung disease, associated syndromes and genetics: a review [J]. *J Med Genet*, 2008, 45(1):1-14.

[6] Heanue TA, Pachnis V. Enteric nervous system development and Hirschsprung's disease: advances in genetic and stem cell studies [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2007, 8(6):466-479.

[7] Kessmann J. Hirschsprung's disease: Diagnosis and management [J]. *Am Fam Physician*, 2006, 74(8):1319-1322.

[8] Cottrell GT, Burt JM. Functional consequences of heterogeneous gap junction channel formation and its influence in health and disease [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2005, 1711(2):126-141.

[9] Kitamura Y, Hirota S, Nishida T. A loss-of-function mutation of c-kit results in depletion of mast cells and interstitial cells of Cajal, while its gain-of-function mutation results in their oncogenesis [J]. *Mut Res*, 2001, 477(4):165-171.

[10] Lorincz A, Redelman D, Horváth VJ, Bardsley MR, Chen H, Ordög T. Progenitors of interstitial cells of Cajal in the postnatal murine stomach [J]. *Gastroenterology*, 2008, 134(4):1083-1093.

[11] Horváth VJ, Vittal H, Lorincz A, Chen H, Almeida-Porada G, Redelman D, et al. Reduced stem cell factor links smooth myopathy and loss of interstitial cells of Cajal in murine diabetic gastroparesis [J]. *Gastroenterology*, 2006, 130(3):759-770.

[12] 孙金山,江逊,全海霞,张薇,兰莉,王宝西. BALB/c 小鼠溃疡性结肠炎远段结肠 Cajal 间质细胞分布变化研究 [J]. *实用儿科临床杂志*, 2007, 22(12):925-927.

[13] Lee JI, Park H, Kamm MA, Talbot IC. Decreased density of interstitial cells of Cajal and neuronal cells in patients with slow-transit constipation and acquired megacolon [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2005, 20(8):1292-1298.

[14] Kostin S. Zonula occludens-1 and connexin 43 expression in the failing human heart [J]. *J Cell Mol Med*, 2007, 11(4):892-895.

[15] Francis RJ, Lo CW. Primordial germ cell deficiency in the connexin 43 knockout mouse arises from apoptosis associated with abnormal p53 activation [J]. *Development*, 2006, 133(17):3451-3460.

[16] Ikeda Y, Fry C, Hayashi F, Stolz D, Griffiths D, Kanai A. Role of gap junctions in spontaneous activity of the rat bladder [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2007, 293(4):F1018-1025.

[17] Khanam T, Burnstock G. Changes in expression of P2X1 receptors and connexin 43 in the rat myometrium during pregnancy [J]. *Fertil Steril*, 2007, 88(4 Suppl):1174-1179.

[18] 高红,张志波,王维林,黄英. 先天性巨结肠 Pax3 和 Cx43 基因突变及表达 [J]. *世界华人消化杂志*, 2004, 12(9):2254-2256.

[19] 刘远梅,胡月光,方勇,杨晓红. 经肛门 I 期根治巨结肠及应用解剖研究 [J]. *中国当代儿科杂志*, 2003, 5(2):135-136.

(本文编辑:吉耕中)