

论著 · 临床研究

C-kit 和 Cx43 在新生儿自发性胃穿孔中的表达

夏丽娜¹ 王志强² 王宗敏¹ 张普¹

(1. 温州医学院附属育英儿童医院病理科, 浙江 温州 325000; 2. 池州市人民医院病理科, 安徽 池州 247000)

[摘要] 目的 分析 c-kit 和缝隙连接蛋白 43 (Cx43) 在新生儿自发性胃穿孔 (spontaneous neonatal gastric perforation, SNGP) 中的表达情况, 探讨 Cajal 间质细胞 (interstitial cell of Cajal, ICC) 在新生儿 SNGP 中的意义。**方法** 收集 2001 ~ 2010 年手术治疗的 19 例 SNGP 胃组织标本, 以 8 例无消化道畸形新生儿尸检胃组织作为对照, 采用免疫组织化学 SP 法进行 c-kit 和 Cx43 检测。**结果** SNGP 患儿胃壁穿孔处肌层缺失, 穿孔周围肌束明显变薄。与对照组比较, SNGP 患儿胃组织中 c-kit 阳性细胞以及 Cx43 阳性细胞表达明显减少 ($P < 0.01$)。**结论** 新生儿 SNGP 与胃壁 ICC 数量减少、缝隙连接结构破坏有关。 [中国当代儿科杂志, 2011, 13 (10): 787 - 789]

[关键词] 自发性胃穿孔; Cajal 间质细胞; C-kit; 缝隙连接蛋白 43; 新生儿

[中图分类号] R722.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008 - 8830 (2011) 10 - 0787 - 03

Expression of c-kit and Cx43 in neonates with spontaneous gastric perforation

XIA Li-Na, WANG Zhi-Qiang, WANG Zong-Min, ZHANG Pu. Department of Pathology, Yuying Children's Hospital, Wenzhou Medical College, Wenzhou, Zhejiang 325000, China (Wang Z-M, Email: wangzm50@sohu.com)

Abstract: Objective To study the clinical significance of interstitial cell of Cajal (ICC) in spontaneous neonatal gastric perforation by examining the expression of c-kit and Cx43 in neonates with this disorder. **Methods** The gastric specimens of 19 cases of neonatal gastric perforation from 2001 to 2010 and 8 cases of accidental death without digestive tract malformations (control) were collected. Immunohistochemical staining was employed to examine the expression of c-kit and Cx43 (immunomarkers of ICCs) in gastric tissues. **Results** The muscular layer of the stomach wall became thinner or deficient in the gastric perforation group. C-kit and Cx43 positive cells in gastric tissues decreased significantly in the gastric perforation group compared with those in the control group ($P < 0.01$). **Conclusions** The development of spontaneous neonatal gastric perforation is associated with the decreased quantity of ICCs and damaged gap junction structure of the stomach wall. [Chin J Contemp Pediatr, 2011, 13 (10): 787 - 789]

Key words: Spontaneous gastric perforation; Interstitial cell of Cajal; C-kit; Cx43; Neonate

新生儿自发性胃穿孔 (spontaneous neonatal gastric perforation, SNGP) 虽然罕见却有较高的病死率^[1]。近年来研究发现 Cajal 间质细胞 (ICC) 数量、功能、分布异常在胃肠动力障碍性疾病的发生、发展过程中可能起非常重要的作用^[2]。ICC 和平滑肌可能来源于相同的 c-kit 阳性间叶组织前体细胞, 提示胚胎发育期胃壁平滑肌发育异常甚至缺失可能与 ICC 异常存在某种联系^[3]。但是 ICC 异常与 SNGP 的发生是否有关, 目前国内尚无相关报道。本研究采用 c-kit、缝隙连接蛋白 43 (Cx43) 免疫标记检测 SNGP 患儿胃壁组织中的 ICC 表达情况, 以期 SNGP 发病机制的研究提供依据。

1 资料与方法

1.1 研究对象

收集我院 2001 ~ 2010 年经手术治疗的 SNGP 患儿 19 例 (SNGP 组), 另选取我院近年无消化道畸形的尸检新生儿 8 例为对照组。SNGP 组患儿中, 男 16 例, 女 3 例; 胎龄 32 ~ 39 周, 平均 37 ± 2.3 周, 其中早产儿 7 例。对照组患儿中, 男 5 例, 女 3 例; 胎龄 31 ~ 39 周, 平均 34.5 ± 2.9 周, 其中早产儿 5 例。该研究经医院医学伦理委员会批准, 并得到家长的书面知情同意。

[收稿日期] 2011 - 05 - 11; [修回日期] 2011 - 06 - 01
[作者简介] 夏丽娜, 女, 硕士研究生。
[通信作者] 王宗敏, 教授。

1.2 试剂与方法

切除的胃组织经4%中性甲醛固定,常规石蜡切片。采用SP免疫组织化学法检测胃组织c-kit、Cx43蛋白,一抗为鼠抗人c-kit单克隆抗体(福州迈新生物技术开发有限公司);兔抗人Cx43多克隆抗体(北京中杉金桥生物技术有限公司)。用磷酸盐缓冲液代替一抗,作为阴性对照。实验步骤按说明书进行。

1.3 结果判定

光镜下c-kit标记胞浆中出现棕黄色颗粒,胞质有突起的梭形细胞即ICC。Cx43标记胞浆中出现棕黄色颗粒即阳性细胞。每张切片随机取10个高倍视野下行阳性细胞计数,取其平均值计算均数及标准差。

1.4 统计学分析

采用SPSS 13.0软件进行统计学处理,数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。组间比较采用t检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

19例SNGP组患儿穿孔均发生于出生后3d内。穿孔部位:17例发生在胃大弯,2例发生在胃小弯。出生时有明确窒息史1例,机械通气4例。病死率53%(10/19)。镜下观察:胃壁穿孔处肌层缺损,黏膜下层薄壁血管呈鹿角状、裂隙状并相互沟通。穿孔周围肌束明显变薄且排列紊乱,解剖层次分辨不清,其间ICC数量稀少,分布稀疏,相互之间缺乏联系(图1)。对照组胃壁组织结构正常,层次清晰,ICC存在于肌间及神经丛,数量明显增多。肌间ICC与肌纤维平行分布,相互之间胞质突起部连接并形成网络样结构(图1)。Cx43阳性细胞主要位于神经丛,肌间也有散在分布,与对照组比较,SNGP组中阳性细胞数明显减少($P < 0.01$),见图2、表1。

表1 c-kit和Cx43在新生儿胃壁肌层中的表达 ($\bar{x} \pm s$)			
分组	标本例数	Cx43 阳性细胞数	C-kit 阳性细胞数
对照组	8	20.1 ± 2.0	27.3 ± 3.2
SNGP组	19	5.7 ± 1.2	4.2 ± 1.2
t值		10.694	20.054
P值		<0.01	<0.01

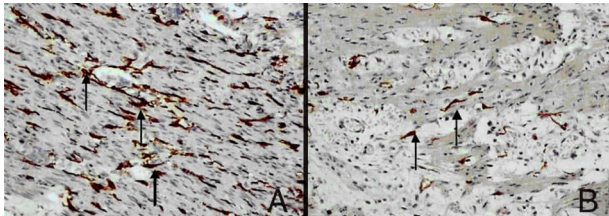


图1 胃壁组织c-kit的表达(SP法,×200) A:对照组胃壁组织,箭头所指为c-kit阳性ICC,相互之间存在大量网络连接,与肌纤维平行分布。B:SNGP组胃壁组织,箭头所指棕色细胞为c-kit阳性ICC,数量较对照组明显减少。

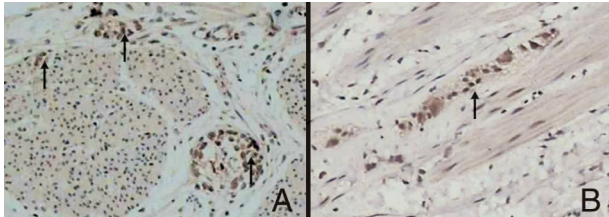


图2 胃壁组织Cx43的表达(SP法,×200) A:对照组胃壁组织,肌间神经丛中见较多Cx43阳性细胞(箭头所指)。B:SNGP组胃壁组织,穿孔周围肌纤维中Cx43阳性细胞稀少(箭头所指)。

3 讨论

SNGP是一种罕见的高度致命性疾病,目前尚无明确文献记载其发病率。96%的患儿在出生后1周内突然发病,穿孔部位85%~95%发生在胃大弯侧附近,病死率27%~83%^[1]。本组资料与文献报道一致。SNGP病因和发病机制目前尚不清楚,有学者认为该病与胚胎发育不全(胃壁肌层缺损)、过度机械通气、围产期窒息以及继发性缺血损伤及新生儿早期长时间激素治疗等因素有关^[1,4]。近年来研究发现ICC与儿科多种先天性消化系统疾病相关^[2],ICC作为一种特殊的间质细胞广泛分布于消化道,具有产生电慢波、参与调节胃肠道平滑肌运动的功能,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,是神经系统与平滑肌之间的中介^[5]。ICC特异性表达c-kit基因,c-kit蛋白对ICC的发育和维持表型十分重要,在维持ICC功能中起重要的作用^[6]。先天性巨结肠、肥厚性幽门狭窄、巨膀胱-小肠肠-肠蠕动不良综合征等与ICC网络缺失和减少有关^[2]。Ohshiro等^[7]报道7例SNGP中ICC明显减少4例,ICC缺失3例。本研究中19例SNGP患儿穿孔周围肌纤维中ICC均明显减少,与文献相符。

缝隙连接蛋白在人体广泛分布,其中 Cx43 是组成细胞间缝隙连接的主要成分,其表达异常与多种疾病的发生有关。Nemeth 等^[8]研究发现先天性巨结肠患儿无神经节细胞节段肌间 Cx43 表达缺失,在移行肠段表达减少,由此推断先天性巨结肠细胞间的联系障碍可能阻止 ICC 与平滑肌细胞之间的激素、神经递质及其他兴奋剂和拮抗剂的交换,导致动作电位传播能力的降低,从而引起肠动力障碍。杨焯等^[9]推测 Cx43 表达缺失或减少、缝隙结构破坏及 ICC 结构、分布异常,导致细胞间物质、电信号的传递障碍,可能是先天性巨结肠的发病原因之一。本研究发现 Cx43 在 SNGP 患儿穿孔周围肌纤维中表达明显减少,也提示 SNGP 与 Cx43 表达缺失有关。

近年大量研究表明,胃肠运动受肠神经系统和 ICC 共同调控,胃和小肠的肌间神经丛周围 Cajal 细胞以及结肠的黏膜下 Cajal 细胞作为胃肠电活动的起搏细胞,具有产生并传播电慢波的特性^[10]。ICC 连接平滑肌与神经细胞,三者之间广泛存在缝隙连接并形成网络样结构^[11]。ICC 通过缝隙连接将慢波传递至平滑肌,平滑肌细胞膜去极化,产生动作电位并收缩,所以 ICC 是胃肠道平滑肌收缩的重要结构^[5]。此外,ICC 亦受肠神经系统的支配,将兴奋性或抑制性神经信号传递至平滑肌,参与调节平滑肌的收缩和舒张^[12]。通过缝隙连接,ICC 为神经细胞和平滑肌细胞之间提供了一条重要的中介通道,从而更有效地传递电、神经信号来刺激平滑肌细胞,实现其起搏、舒缩功能。

综上所述,本研究证实:发育正常胃壁组织中 ICC 广泛存在于肌间及神经丛中,通过缝隙连接形成网络样结构。SNGP 患儿穿孔处肌层缺失,穿孔周围血管、肌纤维发育不完善, c-kit、Cx43 蛋白表达均明显减少,推测 ICC 数量减少、缝隙连接结构破坏可能是 SNGP 的致病因素之一。

[参 考 文 献]

[1] Jawad AJ, Al-Rabie A, Hadi A, Al-Sowailem A, Al-Rawaf A,

Abu-Touk B, et al. Spontaneous neonatal gastric perforation[J]. *Pediatr Surg Int*, 2002, 18(5-6): 396-399.

[2] Rolle U, Piaseczna-Piotrowska A, Puri P. Interstitial cells of Cajal in the normal gut and in interstitial motility disorders of childhood [J]. *Pediatr Surg Int*, 2007, 23(12): 1139-1152.

[3] Wallace AS, Burns AJ. Development of the enteric nervous system, smooth muscle and interstitial cells of Cajal in the human gastrointestinal tract[J]. *Cell Tissue Res*, 2005, 319(3): 367-382.

[4] Leone R, Krasna IH. Spontaneous neonatal gastric perforation: is it really spontaneous? [J]. *Pediatr Surg*, 2000, 35(7): 1066-1069.

[5] Sanders KM, Koh SD, Ward SM. Interstitial cells of cajal as pacemakers in the gastrointestinal tract[J]. *Annu Rev Physiol*, 2006, 68: 307-343.

[6] Tong W, Jia H, Zhang L, Li C, Ridolfi TJ, Liu B. Exogenous stem cell factor improves interstitial cells of Cajal restoration after blockade of c-kit signaling pathway[J]. *Scand J Gastroenterol*, 2010, 45(7-8): 844-851.

[7] Ohshiro K, Yamataka A, Kobayashi H, Hirai S, Miyahara K, Sueyoshi N, et al. Idiopathic gastric perforation in neonates and abnormal distribution of intestinal pacemaker cells[J]. *J Pediatr Surg*, 2000, 35(5): 673-676.

[8] Nemeth L, Maddur S, Puri P. Immunolocalization of the gap junction protein connexin43 in the interstitial cells of cajal in the normal and Hirschsprung's disease bowel[J]. *J Pediatr Surg*, 2000, 35(6): 823-828.

[9] 杨焯,侯豫,赵新,张薇,王宝新. 先天性巨结肠壁 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.

[10] Timmermans JP. Interstitial cells of Cajal: is their role in gastrointestinal function in view of therapeutic perspectives underestimated or exaggerated? [J]. *Folia Morphol*, 2001, 60(1): 1-9.

[11] Burns AJ. Disorders of interstitial cells of Cajal[J]. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2007, 45 (Suppl 2): S103-S106.

[12] Daniel EE. Physiology and pathophysiology of the interstitial cell of Cajal: from bench to bedside. Ⅲ. Interaction of interstitial cells of Cajal with neuromediators: an interim assessment[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2001, 281(6): G1329-G1332.

(本文编辑:王庆红)