

# 慢性束缚水浸应激对大鼠胃窦Cajal间质细胞超微结构的损伤

张丹, 夏志伟, 韩亚京

张丹, 夏志伟, 韩亚京, 北京大学第三医院消化科 北京市 100191

作者贡献分布: 此课题由夏志伟与张丹共同设计; 研究过程和数据分析由张丹完成; 实验技术选择和操作方法由韩亚京指导支持; 文章撰写由张丹和夏志伟共同完成。

通讯作者: 夏志伟, 副教授, 100191, 北京市, 北京大学第三医院消化科. xiazhiwei@medmail.com.cn

电话: 010-82266699-8768

收稿日期: 2009-09-20 修回日期: 2009-12-20

接受日期: 2009-12-29 在线出版日期: 2010-03-08

## Chronic water immersion-restraint stress-induced ultrastructural injury to interstitial cells of Cajal in the rat gastric antrum

Dan Zhang, Zhi-Wei Xia, Ya-Jing Han

Dan Zhang, Zhi-Wei Xia, Ya-Jing Han, Department of Digestive Diseases, Peking University Third Hospital, Beijing 100191, China

Correspondence to: Associated Professor Zhi-Wei Xia, Department of Digestive Diseases, Peking University Third Hospital, Beijing 100191, China. xiazhiwei@medmail.com.cn

Received: 2009-09-20 Revised: 2009-12-20

Accepted: 2009-12-29 Published online: 2010-03-08

## Abstract

**AIM:** To investigate the alterations in the ultrastructure of interstitial cells of Cajal (ICC) in the gastric antrum of rats undergoing chronic water immersion-restraint stress.

**METHODS:** Forty-eight male Sprague-Dawley rats were randomly and equally divided into six groups: three experimental groups and three matched control groups. The three experimental groups underwent water immersion-restraint stress for one hour daily for 3, 7 and 28 days, respectively, while the three control groups were allowed free access to food and water. On days 4, 8 and 29, the rats in both the experimental and control groups were sacrificed. Two pieces of antrum tissues were taken from each of three rats in each group and fixed in 3% glutaraldehyde for electron microscopic examination. The severity of injury was then scored.

**RESULTS:** Compared to the control groups, the ICC in the gastric antrum of rats in the experimental groups showed widened perinuclear space, discontinuous basement membrane, cytoplasmic dissolution and vacuolation, decreased number of gap junctions, mitochondrial swelling and vacuolation, dilated endoplasmic reticulum, decreased amount of rough endoplasmic reticulum, and nuclear abnormality. With the prolongation of stress duration, the ultrastructural injury to ICC was aggravated, particularly prominent in cytoplasmic dissolution and vacuolation and the decrease in the amount of rough endoplasmic reticulum.

**CONCLUSION:** Chronic water immersion-restraint stress can induce ultrastructural injury to ICC in the rat gastric antrum.

**Key Words:** Chronic water immersion-restraint stress; Interstitial cell of Cajal; Ultrastructure

Zhang D, Xia ZW, Han YJ. Chronic water immersion-restraint stress-induced ultrastructural injury to interstitial cells of Cajal in the rat gastric antrum. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(7): 703-706

## 摘要

**目的:** 研究不同时程慢性束缚水浸应激对大鼠胃窦Cajal间质细胞(ICC)超微结构的损伤, 量化分析细胞内不同超微结构的损伤程度。

**方法:** 48只雄性SD大鼠随机分为6组, 即实验3 d、7 d、28 d组和对照3 d、7 d、28 d组, 每组8只。实验组每日给予束缚水浸1 h, 对照组自由摄食饮水; 禁食12 h后分别于第4、8、29天晨脱颈处死, 每组中的3只大鼠被各取胃窦组织2块放入3%戊二醛中固定并送电镜室镜检。将损伤的严重程度分成0-3级并以此标准计分并计算。

**结果:** 不同应激时间组大鼠胃窦ICC的核周间隙、基膜、内质网的损伤严重程度无明显差别。缝隙连接和线粒体的损伤积分有明显差异, 胞质溶解、粗面内质网减少、核异常程度积分有极显著性差异; 量化分析显示: 随着应激时间的延长, 超微结构受损呈现逐渐加重的

## 背景资料

既往的研究表明, 急性高强度的应激刺激可以导致大鼠胃运动功能障碍和ICC超微结构损伤。而慢性长时间的应激刺激同样也可以导致大鼠胃运动功能受损, 一方面表现在胃ICC数量的变化, 同时也表现为明显的超微结构广泛受损。目前, 多数关于ICC超微结构的变化都局限于描述性的叙述, 而缺乏更加客观的量化研究资料。

## 同行评议者

任超世, 研究员, 中国医学科学院生物医学工程研究所; 高英堂, 研究员, 天津市第三中心医院, 天津市肝胆疾病研究所分子细胞室

### 研究前沿

当大鼠面临慢性应激时,其胃内ICC的超微结构明显受损,且这种损害随着时间的延长逐渐加重,这种损伤可能是其胃动力改变的病理生理机制之一,但不同细胞器受损的程度变化并不一致,机体在接受应激后自身的调节补偿机制的存在时其变化过程更为复杂。至于超微结构的损伤在应激刺激消失后是否可以恢复、损伤的严重性和可逆性与刺激的强度和时程是否相关等问题均需要进一步研究确认。

趋势,主要表现在缝隙连接、线粒体、胞质和粗面内质网等方面。

结论:慢性应激可以导致大鼠胃窦ICC超微结构的损伤,不同细胞超微结构的损伤随应激的延长有所差别;量化分析可以显示不同细胞器受损伤的程度。

关键词:束缚水浸;Cajal间质细胞;超微结构

张丹,夏志伟,韩亚京.慢性束缚水浸应激对大鼠胃窦Cajal间质细胞超微结构的损伤.世界华人消化杂志 2010; 18(7): 703-706

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/703.asp>

## 0 引言

既往的研究表明,急性高强度的应激刺激可以导致大鼠胃运动功能障碍<sup>[1-2]</sup>和ICC超微结构损伤<sup>[3]</sup>。而慢性长时间的应激刺激同样也可以导致大鼠胃运动功能受损<sup>[4]</sup>,一方面表现在胃ICC数量的变化,同时也表现为明显的超微结构广泛受损。目前,多数关于ICC超微结构的变化都局限于描述性的叙述,而缺乏更加客观的量化研究资料。基于此,本文拟通过尝试对细胞核、细胞器的变化进行分级评分的方法,旨在定量地评价损伤,更科学地探讨超微结构受损的严重程度。

## 1 材料和方法

1.1 材料 SPF级SD健康大鼠48只,♂,体质量150-160 g,购自北京大学医学部实验动物部。本研究得到北京大学医学部动物保护委员会认可。

### 1.2 方法

1.2.1 分组:48只♂SD大鼠随机分为6组,即实验3 d、7 d、28 d组和同期对照组,每组8只,对照组不接受任何刺激,自由摄食饮水;实验组大鼠23℃束缚水浸1 h/d,分别于第4天、8天、29天晨与禁食12 h后将实验组和对照组大鼠一并脱颈处死。

1.2.2 组织获得:全部大鼠游离全胃,沿胃大弯侧剪开,去离子水冲洗干净后迅速剪取其腺胃幽门旁0.5 cm前壁大弯侧组织各2块(每组中的3只大鼠)大小为2 mm×1 mm,立即放入3%戊二醛中固定,送北京大学医学部病理电镜室镜检。

1.2.3 标本制备:固定后的组织用0.2 mol/L蔗糖磷酸缓冲液漂洗,再用2%的四氧化锇后固定1 h,丙酮中梯度脱水,在1%醋酸双氧铀中停滞染色1 h,再通过环氧丙烷与环氧树脂。1 mm切片用亚甲蓝染色,在光镜下观察,确定黏膜层、环形肌层、纵行肌层,超薄切片用酒精醋酸双氧铀、

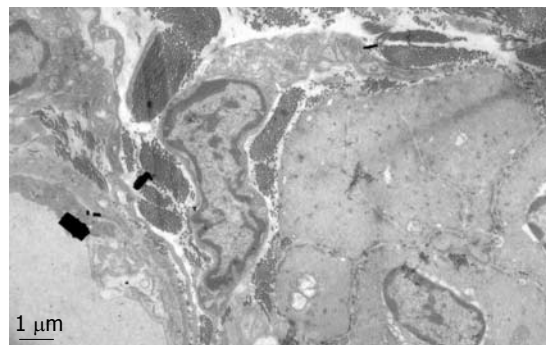


图1 对照组大鼠胃窦组织的透射电镜下表现(×12 000)。

再用柠檬酸盐后染色,保留纵行肌层、环形肌层、黏膜下层、部分黏膜层,用HITACHI H-600透射电镜观察、照相。

1.2.4 电镜观察:观察两组大鼠胃窦部ICC的超微结构改变并进行比较。在透射电镜下,每组大鼠胃窦标本内选取10个ICC细胞,其中5个环肌内ICC,5个环纵肌间ICC,观察ICC超微结构受损情况。观察项目包括:核周间隙增宽(A)、基膜不完整不连续(B)、胞质溶解空泡化(C)、缝隙连接减少(D)、线粒体肿胀空泡化(E)、内质网扩张(F)、粗面内质网减少(G)、核异常程度(H)。A-G损伤程度评分方法:0分:正常,无任何损害;1分:轻度受损,损害面积小于全部的1/4;2分:中度受损,损害面积为全部的1/4-1/2;3分:重度受损,损害面积大于全部的1/2。H损伤程度评分方法:0分:正常,无任何损害;1分:染色质边集;2分:核皱缩;3分:核碎裂、凋亡小体形成。

统计学处理 所得全部数据录入SPSS13.0,并采用 $t$ 检验、一般线性模型等方法进行统计学处理,设定 $P = \text{Sig}(2\text{-tailed}) < 0.05$ 为有统计学意义, $P = \text{Sig}(2\text{-tailed}) < 0.01$ 为有显著统计学意义。

## 2 结果

与相应对照组比较,不同时程的实验组大鼠胃窦ICC均出现核周间隙增宽、基膜不完整不连续、胞质溶解空泡化、缝隙连接减少、线粒体肿胀空泡化、内质网扩张、粗面内质网减少以及核异常,同期的实验组和对照组间上述项目积分程度几乎均有显著差异( $P < 0.05$ )。不同应激时间的核周间隙增宽、基膜不完整不连续、内质网扩张的损伤评分无差别( $P > 0.05$ ),而缝隙连接减少、线粒体肿胀空泡化的损伤评分存在差异( $P < 0.05$ ),胞质溶解空泡化、粗面内质网减少、核异常程度的损害差异则更为明显( $P < 0.01$ )。随着应激时间的延长,胞质溶解空泡化、缝隙连接减少、线粒体肿胀空

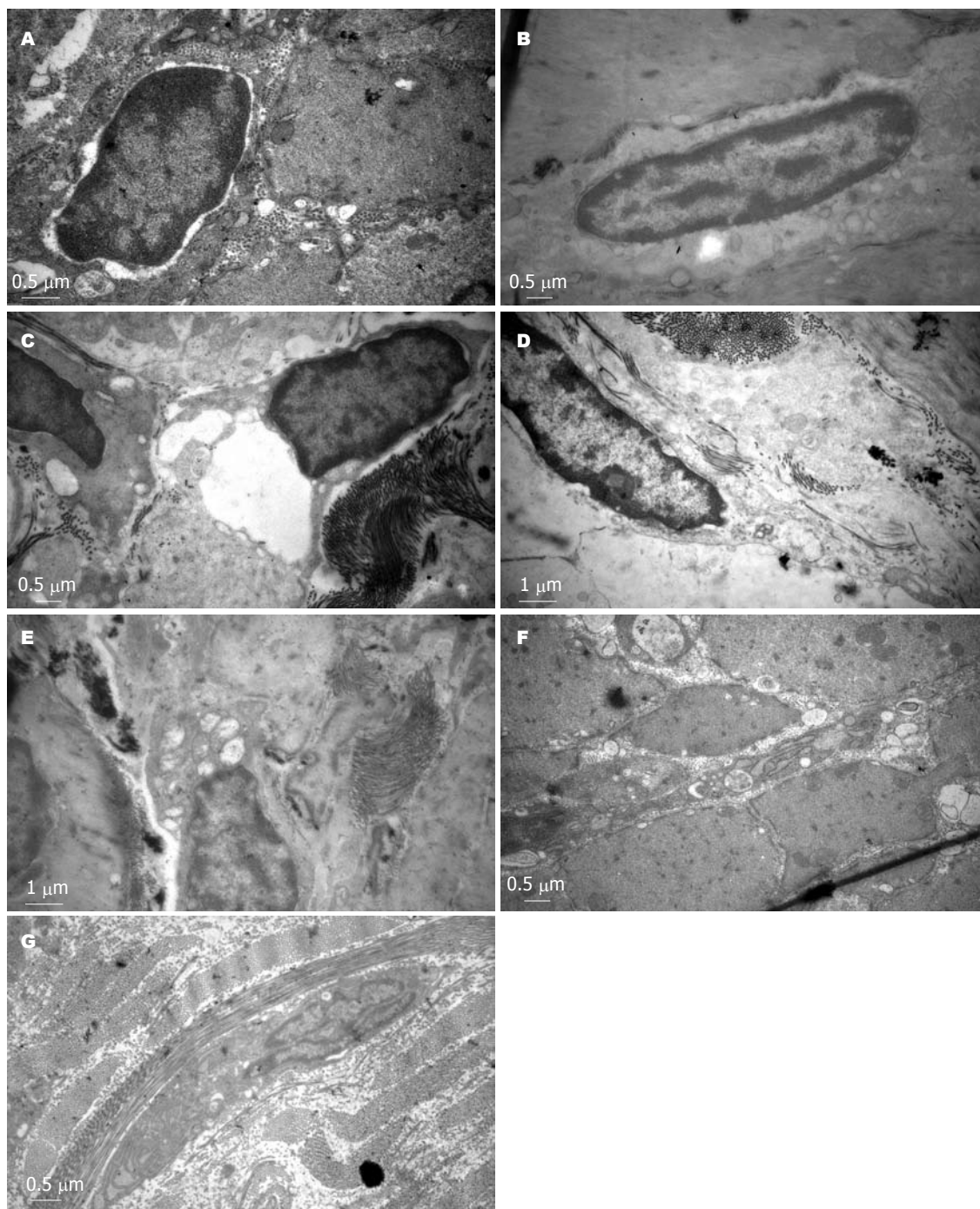


图 2 实验组大鼠胃窦组织的透射电镜下表现. A: 核周间隙增宽( $\times 30\,000$ ); B: 基膜不连续不完整( $\times 20\,000$ ); C: 胞质溶解空泡化( $\times 20\,000$ ); D: 缝隙连接减少( $\times 15\,000$ ); E: 线粒体肿胀空泡化、粗面内质网减少( $\times 15\,000$ ); F: 内质网扩张( $\times 20\,000$ ); G: 核异常( $\times 12\,000$ ).

泡化、粗面内质网减少、核异常程度几乎均呈现逐渐加重的趋势,其中以胞质溶解空泡化、粗面内质网减少最突出(表1,图1,2).

### 3 讨论

大鼠的整个胃肠道均有ICC-MY和ICC-IM, ICC-MY负责起搏,而ICC-IM则作为神经递质的中介者起到电传导的作用<sup>[5-8]</sup>. 正常大鼠胃内ICC超微结构的特点为核大、线粒体丰富、缝隙连接较

多等<sup>[9-10]</sup>,而其在消化系的主要功能为:胃肠道平滑肌活动的起搏;推进电活动的传播;调节神经递质. 功能是要靠结构来实现的, ICC有非常丰富的线粒体,这说明其功能活跃,适应其作为胃肠慢波起搏细胞的需要;该细胞互相之间、与神经末梢之间、与平滑肌细胞之间形成很多缝隙连接,这也说明了其作为神经系统控制胃肠平滑肌的中介功能;粗面内质网、滑面内质网和丰富的高尔基体,说明其具有活跃的合成功能以适应其

**创新盘点**  
本文拟通过尝试对细胞核、细胞器的变化进行分级评分的方法,旨在定量地评价损伤,更科学地探讨超微结构受损的严重程度.

## 同行评价

本文运用统计学分析方法,对本次系列研究得到的数据进行挖掘,有一定的学术价值。

表 1 慢性应激大鼠胃窦ICC超微结构损伤程度评分 (分, mean  $\pm$  SD)

分组	A		B		C		D		E		F		G		H	
	实验组	对照组	实验组	对照组	实验组	对照组	实验组	对照组	实验组	对照组	实验组	对照组	实验组	对照组	实验组	对照组
3 d	1.2 $\pm$ 0.7	0.8 $\pm$ 0.5	2.3 $\pm$ 0.5	0.7 $\pm$ 0.4	1.4 $\pm$ 0.6	0.2 $\pm$ 0.2	1.4 $\pm$ 0.6	0.1 $\pm$ 0.1	1.5 $\pm$ 0.6	0.6 $\pm$ 0.4	1.9 $\pm$ 0.8	0.3 $\pm$ 0.2	1.2 $\pm$ 0.5	0.1 $\pm$ 0.1	1.3 $\pm$ 0.8	0.3 $\pm$ 0.2
7 d	1.5 $\pm$ 0.8	0.7 $\pm$ 0.5	2.2 $\pm$ 0.7	0.5 $\pm$ 0.3	1.4 $\pm$ 0.5	0.3 $\pm$ 0.3	1.4 $\pm$ 0.6	0.3 $\pm$ 0.3	2.1 $\pm$ 0.7 <sup>c</sup>	0.6 $\pm$ 0.4	1.9 $\pm$ 0.9	0.2 $\pm$ 0.2	1.7 $\pm$ 0.7 <sup>c</sup>	0.1 $\pm$ 0.0	2.2 $\pm$ 0.6 <sup>c</sup>	0.4 $\pm$ 0.2
28 d	1.4 $\pm$ 0.5	0.6 $\pm$ 0.4	2.8 $\pm$ 0.8	0.6 $\pm$ 0.3	2.6 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>	0.2 $\pm$ 0.2	2.7 $\pm$ 0.7 <sup>a</sup>	0.1 $\pm$ 0.1	2.7 $\pm$ 0.9 <sup>a</sup>	0.5 $\pm$ 0.3	2.5 $\pm$ 0.6	0.2 $\pm$ 0.1	2.3 $\pm$ 0.8 <sup>a</sup>	0.3 $\pm$ 0.1	2.3 $\pm$ 0.9 <sup>a</sup>	0.4 $\pm$ 0.2

A: 核周间隙增宽; B: 基膜不完整不连续; C: 胞质溶解空泡化; D: 缝隙连接减少; E: 线粒体肿胀空泡化; F: 内质网扩张; G: 粗面内质网减少; H: 核异常程度。 <sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 同组3, 7 d, <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs 同组3 d。

通过合成神经递质NO、CO达到调节电传导的作用。因此,我们将应激后可能发生损害的微结构分别进行量化分析并结合与其功能的关系将其归类:影响起搏的结构:A、E、H;影响电传播的中介结构:D;影响调节功能的结构:B、C、G、F。

本实验结果显示:在大鼠接受低强度慢性应激刺激后,其胃窦ICC的超微结构受到广泛的破坏。因此可以认为,应激可以损伤大鼠胃窦ICC功能的各个方面。而ICC的起搏、传导及调节功能的改变可能是应激状态下胃肠功能改变的重要机制<sup>[11,12]</sup>。本研究得出:无论应激多长时间,核周间隙、基膜、内质网等遭受破坏的程度无差别;而在胞质溶解空泡化、缝隙连接减少、线粒体肿胀空泡化、粗面内质网减少、核异常的程度上则有着统计学意义的差别存在,其规律就是随着应激时间的延长,胞质溶解空泡化、缝隙连接减少、线粒体肿胀空泡化、粗面内质网减少、核异常几乎均呈现逐渐加重的趋势,其中以胞质溶解空泡化、粗面内质网减少最为突出。而胞质溶解空泡化、缝隙连接减少、线粒体肿胀空泡化、粗面内质网减少、核异常涵盖了ICC的主要功能,也就是说,应激时间越长,胃内ICC起搏、传导和调节神经递质的能力越差,尤其是调节功能。其实,ICC合成NO和CO等重要神经递质减少,仍然是使得ICC传导来自神经的冲动到肌细胞或其他ICC的功能大大减弱。

由此,我们可以看出,当大鼠面临慢性应激时,其胃内ICC的超微结构明显受损,且这种损害随着时间的延长逐渐加重,这种损伤可能是其胃动力改变的病理生理机制之一,但不同细胞器受损伤的程度变化并不一致,机体在接受应激后自身的调节补偿机制的存在时其变化过程更为复杂。至于超微结构的损伤在应激刺激消

失后是否可以恢复、损伤的严重性和可逆性与刺激的强度和时程是否相关等问题均需要进一步研究确认。

## 4 参考文献

- 1 姚泰, 罗自强. 生理学. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 490-491
- 2 刘劲松, 杨菊, 侯晓华. 寒冷浸水应激对大鼠胃排空及肠肌间神经递质的影响. 中华消化杂志 2004; 24: 492-493
- 3 Kaszuba-Zwońska J, Gil K, Ziomber A, Zaraska W, Pawlicki R, Królczyk G, Matyja A, Thor PJ. Loss of interstitial cells of Cajal after pulsating electromagnetic field (PEMF) in gastrointestinal tract of the rats. *J Physiol Pharmacol* 2005; 56: 421-432
- 4 张丹, 夏至伟, 韩亚京. 不同时程慢性束缚水浸应激对大鼠胃排空的影响. 中国实验动物学报 2009; 17: 11-14
- 5 Nakagawa T, Misawa H, Nakajima Y, Takaki M. Absence of peristalsis in the ileum of W/W(V) mutant mice that are selectively deficient in myenteric interstitial cells of Cajal. *J Smooth Muscle Res* 2005; 41: 141-151
- 6 Wang XY, Sanders KM, Ward SM. Intimate relationship between interstitial cells of cajal and enteric nerves in the guinea-pig small intestine. *Cell Tissue Res* 1999; 295: 247-256
- 7 Sanders KM, Ordög T, Koh SD, Torihashi S, Ward SM. Development and plasticity of interstitial cells of Cajal. *Neurogastroenterol Motil* 1999; 11: 311-338
- 8 Kito Y, Suzuki H. Electrophysiological properties of gastric pacemaker potentials. *J Smooth Muscle Res* 2003; 39: 163-173
- 9 张亚萍, 张宽学, 高革, 罗金燕. 大鼠胃肠道Cajal间质细胞的超微结构研究. 胃肠病学和肝病杂志 2002; 11: 112-114
- 10 Ishikawa K, Komuro T, Hirota S, Kitamura Y. Ultrastructural identification of the c-kit-expressing interstitial cells in the rat stomach: a comparison of control and Ws/Ws mutant rats. *Cell Tissue Res* 1997; 289: 137-143
- 11 张亚萍, 张宽学, 罗金燕, 石德红. 糖尿病大鼠胃部Cajal间质细胞超微结构变化的研究. 中华消化杂志 2003; 23: 116-117
- 12 钱秋海, 王志程, 魏建萍, 张桢. 糖胃安对糖尿病胃轻瘫模型大鼠超微结构的影响. 中国临床药理学杂志 2007; 23: 311-312