

## 肝硬化大鼠小肠 Cajal 间质细胞超微结构及平滑肌细胞线粒体膜电位的变化

朱金照 王艳丽 吕勇 黎环 刘晓燕

**【摘要】 目的** 研究肝硬化大鼠小肠 Cajal 间质细胞超微结构的改变及平滑肌细胞线粒体膜电位的变化,探讨肝硬化胃肠动力障碍的相关机制。**方法** 20 只 Wister 大鼠随机分为肝硬化模型组和对照组,每组 10 只,采用  $\text{CCl}_4$  溶剂大腿根部皮下注射法制作肝硬化模型,用葡聚糖蓝-2000 作为胃肠内标记物,观察大鼠肠道传输,透射电镜观察小肠 Cajal 间质细胞超微结构的改变,激光共聚焦显微镜检测小肠平滑肌细胞线粒体膜电位的改变。**结果** 与对照组比较,肝硬化组大鼠小肠动力明显减弱( $P < 0.01$ ),透射电镜观察显示空肠 Cajal 间质细胞的超微结构发生明显改变,线粒体等细胞器明显减少( $P < 0.01$ )。小肠平滑肌线粒体膜电位显著低于对照组( $P < 0.01$ )。**结论** 肝硬化大鼠肠道传输减弱与肠道 Cajal 间质细胞超微结构改变,细胞器减少及线粒体膜电位的降低有关。

**【关键词】** 肝硬化;肠道动力;Cajal 间质细胞;膜电位

**The changes of interstitial cells of Cajal and mitochondrial membrane potential in intestine of rats with cirrhosis** ZHU Jin-zhao, WANG Yan-li, LV Yong, LI Huan, LIU Xiao-yan. Department of Gastroenterology, Fuzhou Infectious Diseases Hospital, Affiliated Infectious Diseases Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350025, China

Corresponding author: ZHU Jin-zhao, Email: zhujianzhao@medmail.com.cn

**【Abstract】 Objective** To study the changes of interstitial cell of Cajal (ICC) and mitochondrial membrane potential in intestine of rats with liver cirrhosis. **Methods** Twenty Wistar rats were divided into control and model group randomly, model group rats were given  $\text{CCl}_4$  to induce liver cirrhosis, the ultrastructure of ICCs were observed by electronic microscope and mitochondrial membrane potential in intestinal smooth muscle cells were detected by laser scanning confocal microscope, while the intestinal motility of rats were observed through Dextran blue-2000 as a indicator. **Results** Compared with control group, the ultrastructure of ICCs had significantly changes ( $P < 0.01$ ) and mitochondrial membrane potential were significantly decreased in

model group ( $P < 0.01$ ), and the intestinal motility of rats were delayed ( $P < 0.01$ ). **Conclusions** The delaying intestinal motility of rats with liver cirrhosis may be associated with the changes of ICCs and the decrease of mitochondrial membrane potential.

**【Key words】** Liver cirrhosis; Intestinal motility; Interstitial cells of Cajal (ICCs); Membrane potential

研究发现,肝硬化胃肠动力障碍与胃肠激素、胃肠道神经分布异常等因素有关<sup>[1]</sup>,但肝硬化胃肠动力障碍的发生机制目前尚不十分明确。Cajal 间质细胞(interstitial cells of Cajal, ICCs)是胃肠道的起搏细胞,具有自发性电活动和产生、传播慢波的功能<sup>[2]</sup>,超微结构研究发现 ICCs 与胃肠平滑肌细胞间存在缝隙连接,并能够传导肠神经系统至平滑肌的信号,对胃肠运动具有非常重要的调节作用。平滑肌是胃肠运动的基本单位,线粒体膜电位的变化对平滑肌细胞的功能有重要影响。本实验通过建立肝硬化大鼠模型,观察大鼠小肠 Cajal 间质细胞超微结构及平滑肌细胞线粒体膜电位的变化,以进一步探索肝硬化胃肠动力障碍的发生机制。

## 材料与方法

### 一、动物建模与分组

实验动物选用清洁级 Wistar 大鼠(上海实验动物中心提供),雌雄不限,200~250 g。将 20 只 Wistar 大鼠随机分为正常组(10 只)和肝硬化模型组(以下简称模型组)(10 只)。模型组大鼠给予 50% 四氯化碳( $\text{CCl}_4$ )溶剂大腿根部皮下注射,每次 0.5 ml/100 g,每周 2 次,并根据体重变化调整剂量,共 12 周。同时给予含 30% 食用猪油、0.5% 胆固醇的饲料,自由饮水。造模过程中,模型组共死亡 3 只大鼠,其中注射四氯化碳溶剂时突然死亡 1 只,皮下感染死亡 2 只。

### 二、方法

1. 大鼠小肠动力测定<sup>[1]</sup>:大鼠禁食不禁水 12 h 后,在非麻醉状态下灌入 2% 葡聚糖蓝-2000(DB-2000)0.4 ml,20 min 后脱颈处死,大鼠处死后立即开腹,自幽门括约肌处取全胃肠,量取幽门括约肌至色素最前端及至盲肠的距离,以二者之比为小肠推进百分率,以此表示肠道传输速率。

2. 电镜组织标本制备及 ICCs 的电镜观察:空肠标本入 3% 戊二醛固定,2% PBS 冲洗,再用 1% 锇酸后固定 1 h,2% PBS 冲洗,酒精、丙酮梯度脱水,通过浸透,树脂聚合,精定位,70 nm 超薄切片,1% 醋酸铀、枸缘酸铅染色,然后在 Philips S-206 透射电镜 1500 倍下观察。

3. 平滑肌细胞线粒体膜电位检测:将分离的小肠平滑肌细胞接种于培养皿,待其贴壁,在培养皿中加入 Rhodamine123(R123),37℃ 避光孵育 30 min, PBS 冲洗 3 次,用激光共聚焦显微镜激发波长 529 nm,40 倍物镜观察细胞,随机选取 10 个活细胞,每个细胞连续扫描 30 s,记录 4 幅图像和 4 个荧光强度变化数值,取最

大和最小值之差进行分析。

4. 图像分析:采用 MAS-5 图像分析系统。选取同一条件下电镜图片,每张选取 5 个视野,观察 ICCs 细胞器的分布情况,将图像扫描入计算机,设定基础统计数据,通过计算机分析得到 ICCs 内细胞器的分布情况。

### 三、统计学处理

计量资料数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间差异采用  $t$  检验。采用 SAS 统计软件进行统计学分析。

## 结 果

### 一、肝硬化模型肝脏病理改变

肝硬化建模成功后,大鼠出现食欲、体重下降,毛色无光泽,超声下有腹水形成,肝脏包膜波浪状,肝脏实质回声不均匀。肉眼观察肝脏包膜欠光滑,部分表面呈结节状,肝切面可见较多类圆型岛状结节,大小不一,结节间见灰白色纤维组织分隔。光镜下肝实质内汇管区、肝叶间静脉或中央静脉之间有纤维间隔相连,汇管区胶原纤维向肝实质延伸,肝脏的实质被增生的纤维间隔分割、包绕,形成大小不等的假小叶,假小叶内肝细胞排列不整,有些肝细胞增大或萎缩,中央静脉不清,一些肝细胞内可见脂肪变性。

### 二、大鼠小肠动力的变化

实验结果显示,肝硬化模型组大鼠小肠推进比为  $(48.02 \pm 3.36)\%$ ,与对照组  $(57.45 \pm 5.72)\%$  比较,百分率明显下降,表明肝硬化模型组大鼠肠道传输速率显著延迟 ( $P < 0.01$ )。

### 三、大鼠空肠 ICCs 的超微结构观察及平滑肌细胞线粒体膜电位检测结果

透射电镜观察显示 ICCs 主要分布于肌层,与平滑肌细胞及神经纤维末梢有缝隙连接,核大,胞浆少,线粒体、内质网、核糖体丰富。模型组 ICCs 与神经细胞、平滑肌细胞的细胞间连接减少或连接结构破坏,内质网扩张、脱粒,线粒体肿胀、空泡变,细胞器明显减少,胞质溶解,胞质内空泡形成,ICCs 超微结构较模糊。模型组细胞器数量明显少于对照组 ( $P < 0.01$ ) (表 1,图 1~2)。

采用激光共聚焦显微镜观察显示,模型组平滑肌细胞线粒体膜荧光强度较对照组明显减弱,说明模型组大鼠小肠平滑肌细胞线粒体膜电位显著低于对照组 ( $P < 0.01$ ) (表 1)。

表 1 大鼠小肠 ICCs 超微结构细胞器与平滑肌细胞线粒体膜电位的变化 ( $\bar{x} \pm s$ )

组 别	例数(n)	ICCs 细胞器数量	平滑肌细胞线粒体膜电位(%)
对照组	10	$3.25 \pm 0.70$	$864.53 \pm 157.42$
模型组	7	$1.52 \pm 0.31^a$	$269.32 \pm 67.13^a$

注:与对照组比较,  $^a P < 0.01$



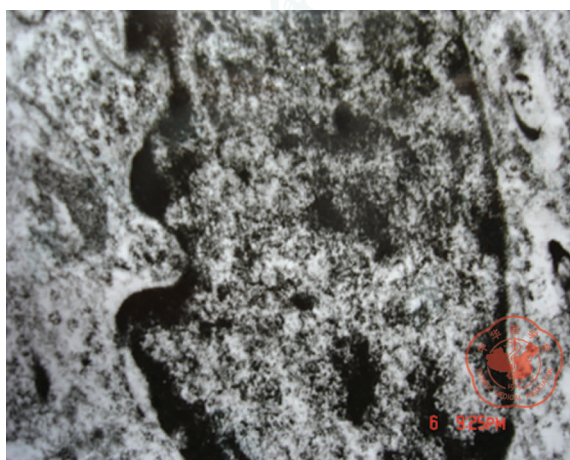


图1 对照组大鼠空肠 Cajal 间质细胞超微结构变化(透射电镜 × 1500)

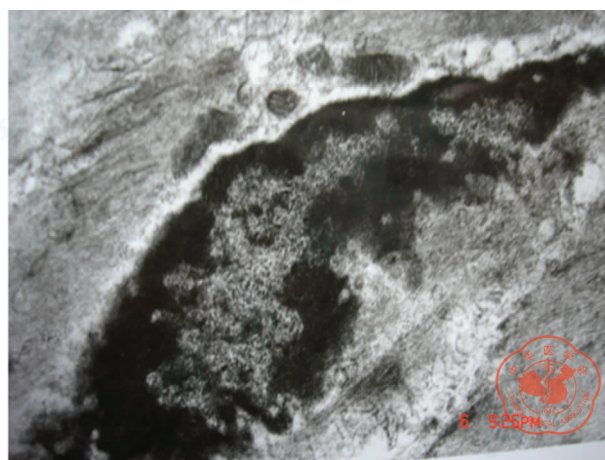


图2 模型组大鼠空肠 Cajal 间质细胞超微结构变化(透射电镜 × 1500)

## 讨 论

肝硬化患者临床上常出现食欲减退、恶心、上腹饱胀、便秘等胃肠道症状,研究证明上述症状与胃肠动力障碍有密切关系<sup>[3,4]</sup>。本研究也证实了肝硬化大鼠肠道动力明显减退,由于肝硬化胃肠动力障碍的发病机制较为复杂,给临床治疗带来一定干扰。

近年研究证明 ICCs 不仅是胃肠电活动的起搏者,也是基本电节律的主要传播者。目前认为 ICCs 主要有以下几个方面的功能<sup>[5]</sup>:(1)胃肠平滑肌慢波活动的起搏;(2)推进电活动的传播;(3)调节神经递质的功能等。目前研究认为多种胃肠动力疾病的发生与 ICCs 的变化有关。研究发现糖尿病大鼠胃肠道 ICCs 明显减少,其超微结构明显改变。肝硬化患者出现胃肠动力障碍较为多见,目前 ICCs 在肝硬化胃肠动力障碍发病中的作用机制研究较少。本研究通过透射电镜观察 ICCs 的超微结构表明,肝硬化模型组空肠 ICCs 与其他细胞间连接减少,内质网扩张、脱粒,线粒体肿胀、空泡变,细胞器减少,胞质内空泡形成。

线粒体膜电位是控制细胞能量供应的主要因素<sup>[6,7]</sup>,线粒体膜电位的变化也受线粒体内能量代谢的影响,正常情况下,线粒体膜内外电子交换,需要正常的能量供应维持,当细胞病变时能量供应障碍,线粒体膜电位降低,膜稳定性下降,导致线粒体的肿胀、裂解,最终导致细胞的死亡。目前检测细胞线粒体膜电位,主要采用 Rhodamine123 对离体细胞进行标记后,通过激光共聚焦显微镜观察线粒体膜荧光强度变化来反映其膜电位的改变。本实验结果显示,肝硬化大鼠小肠平滑肌细胞线粒体膜电位显著下降,可能对平滑肌细胞功能障碍产生进一步影响。

综上所述,肝硬化大鼠小肠动力减退可能与 ICCs 的超微结构改变及平滑肌细胞线粒体膜电位的下降有关。

## 参 考 文 献

- 1 朱金照, 许其增. 肝硬化大鼠肠道动力的变化及机制. 胃肠病学和肝病杂志, 2005, 14: 150-152.
- 2 唐飞, 吕洪敏, 向慧玲. 肝硬化大鼠胃肠动力与 Cajal 间质细胞关系的研究. 天津医科大学学报, 2008, 14: 498-500.
- 3 高洁. 肝硬化与胃肠动力关系的研究进展. 云南中医学院学报, 2008, 31: 63-64.
- 4 于海生, 李新静, 吴广利, 等. 肝硬化失代偿患者空腹胃十二指肠运动改变. 胃肠病学和肝病杂志, 2007, 16: 234-237.
- 5 朱金照. Cajal 间质细胞在胃肠动力疾病中的作用. 医学研究生学报, 2004, 17: 562-564.
- 6 Xiong J, Camello PJ, Verkhatsky A, et al. Mitochondrial polarisation status and  $[Ca^{2+}]_i$  signalling in rat cerebellar granule neurones aged in vitro. Neurobiol Aging, 2004, 25: 349-359.
- 7 孟晶, 丁小燕, 朱晓波, 等. 银杏内酯 B 对体外培养的视网膜神经细胞内钙离子浓度和线粒体功能的影响. 中国病理生理杂志, 2009, 25: 2192-2196.

(收稿日期: 2010-02-16)

(本文编辑: 孙荣华)

朱金照, 王艳丽, 吕勇, 等. 肝硬化大鼠小肠 Cajal 间质细胞超微结构及平滑肌细胞线粒体膜电位的变化 [J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2010, 4(3): 278-282.