

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.12.001

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2017.12.001>

· 论著 ·

## HCN1, HCN2 在功能性便秘大鼠结肠的分布及其与 Cajal 间质细胞的共存关系

肖秋平<sup>1</sup>, 贾玉龙<sup>2</sup>, 陈云艳<sup>1</sup>, 耿学斯<sup>1</sup>

(1. 厦门市中医院肛肠科, 福建 厦门 361009; 2. 厦门市医药研究所, 厦门市天然药物研究与开发重点实验室, 福建 厦门 361008)

**[摘要]** 目的: 观察HCN1, HCN2在功能性便秘(function constipation, FC)大鼠模型结肠上的表达及其与结肠Cajal间质细胞(interstitial cells of Cajal, ICCs)细胞之间的关系, 探讨HCN1, HCN2对FC发病的影响。方法: 用复方地芬诺酯制造FC大鼠模型, 利用免疫组织化学分别对模型组( $n=12$ )、空白组( $n=12$ )大鼠升结肠、横结肠、降结肠黏膜HCN1, HCN2及ICC的表达情况进行检测。结果: 模型组和空白组升结肠、横结肠及降结肠均见HCN1, HCN2, c-Kit表达, 模型组中HCN1, HCN2, c-Kit表达量明显低于空白组( $P<0.05$ ); HCN1表达在FC大鼠结肠中主要分布在结肠环形肌和纵行肌之间的肌ICC-MY, 与c-Kit表达分布基本一致; HCN2在FC大鼠升结肠、横结肠及降结肠均有分布与c-Kit荧光度变化趋势基本一致。HCN2阳性神经元与ICCs的突起距离较近, 二者未见细胞共存现象。结论: HCN通道作为一种与自主起搏活动密切相关的离子通道, 可能参与结肠ICCs的自主起搏活动。HCN1, HCN2可能参与结肠运动调控, 其数量、功能及分布异常可能与FC发病机制有关。

**[关键词]** 功能性便秘; HCN1; HCN2; 结肠Cajal间质细胞

## Distribution of HCN1, HCN2 in colon of functional constipation rats and its co-localization with interstitial cells of Cajal

XIAO Qiuping<sup>1</sup>, JIA Yulong<sup>2</sup>, CHEN Yunyan<sup>1</sup>, GENG Xuesi<sup>1</sup>

(1. Anorectal Surgery, Xiamen Hospital of Traditional Chinese Medicine, Xiamen Fujian 361009; 2. Xiamen Institute of Medicine, Xiamen Natural Drug Research and Development Key Laboratory, Xiamen Fujian 361008, China)

**Abstract** **Objective:** To investigate the distribution of HCN1, HCN2 in colon of functional constipation rats and its co-localization with interstitial cells of Cajal (ICCs) for study on HCN1, HCN2 which play the role of the onset of action in functional constipation. **Methods:** Twenty-four SD female rats in 12-week were randomized into a

收稿日期 (Date of reception): 2017-09-11

通信作者 (Corresponding author): 耿学斯, Email: xmgck@sina.com

基金项目 (Foundation item): 2012 年厦门市科技局指导性项目 (201209); 2016 年福建省卫生和计划生育委员会青年科研项目 (2016-2-73)。

This work was supported by the Plan from Xiamen Science and Technology Program (201209) and the Project from Youth Foundation of Health Department of Fujian Province (2016-2-73), China.

normal group ( $n=12$ ) and a model group ( $n=12$ ). The immunofluorescence double-labeling stain was used to detect the distribution of HCN1, HCN2, ICC in mucosa of ascending colon, transverse colon and descending colon in functional constipation rats triggered by compound diphenoxylate. **Results:** HCN1, HCN2 and ICC expressed in mucosa of ascending colon, transverse colon and descending colon tend to be positive after double labeling with c-Kit both in normal and model group. HCN1 expression mainly distributed in ICC-MY between Ring muscle and Longitudinal muscle which was the same with c-Kit expression. HCN2 positive neurons was close to ICCs, which had no co-localization. **Conclusion:** HCN channel which is closely related with independent blogging activity may participate in colon ICCs independent blogging activity. HCN1, HCN2 may take part in regulation of colon motility. The number, function and the distribution may be related to pathogenesis of functional constipation.

**Keywords** functional constipation; HCN1; HCN2; the colon Cajal mesenchymal cells

功能性便秘(function constipation, FC)是指缺乏器质性病因, 没有结构异常或代谢障碍, 又除外肠易激综合征的慢性便秘。FC病因及病理机制尚不清楚, 有资料<sup>[1]</sup>显示: 相当一部分患者伴有结肠动力障碍。目前研究<sup>[2-5]</sup>表明结肠平滑肌收缩减弱、电慢波异常, 结肠Cajal间质细胞(interstitial cells of Cajal, ICCs)数目、形态和功能异常, 是导致FC的主要发病机制。超极化激活环核苷酸门控的阳离子通道(hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channel, HCN), 即HCN通道, 有1~4个亚型, 在心脏和神经元中引发搏动电流, 调节心脏和神经元的节律<sup>[6]</sup>。既往国内外研究<sup>[7-10]</sup>表明HCN亦存在于结肠中, 并参与激活结肠ICCs起搏活动, HCN通道在结肠运动中很可能担任兴奋起搏的角色。本研究旨在探索HCN1, HCN2在FC大鼠模型结肠上的表达及其与结肠ICC细胞之间的关系, 探讨HCN1, HCN2对FC发病的影响, 为临床治疗肠道动力异常导致FC提供新的理论依据及治疗靶点。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

复方地芬诺酯(批号: 1203010)由哈药集团三精制药股份有限公司提供; Anti-HCN1抗体、Anti-HCN2抗体购自以色列Alomone Labs公司; Anti-c-Kit抗体购自中国Abcam抗体公司。

### 1.2 实验动物

健康SD大鼠24只, 雌雄各半, 体重156~223 g, 由厦门大学实验动物中心采购提供, 饲料、垫料来源同上, 饲养室温度20~25℃, 湿度45%~55%。

### 1.3 动物分组

24只健康SD大鼠正常喂养和观察1周, 称重后采用SPSS软件完全随机分为空白组、模型组, 每组分为12只, 自由摄食, 自然光照, 并定时清洁、消毒。

### 1.4 造模方法<sup>[11]</sup>

空白组每日灌胃给予生理盐水0.2 mL/10 g, 模型组每日灌胃给予复方地芬诺酯10 mg/kg, 连续灌胃, 7 d为1疗程, 疗程间停药1 d, 2个疗程后于末次给药后30 min空白组和模型组大鼠分别以0.2 mL/20 g的墨汁灌胃, 从给墨汁开始记录两组大鼠的首粒黑便的排出时间、6 h内的排便粒数和大便性状, 记录结果, 用SPSS 22.0统计软件进行分析, 确保大鼠便秘模型的可重复性。

### 1.5 标本采集

在对大鼠造模达到模型指定指标后, 颈椎脱臼处死动物, 打开大鼠腹腔截取升结肠、横结肠及降结肠肠管各3~4 cm, 0.01 mol/L PBS充分洗净肠腔内容物。结扎肠段的一端, 以丙酮注入肠腔内, 维持充盈状态, 再结扎另一端。置入4%多聚甲醛中固定6~8 h。实验前去除结扎部分, 在解剖显微镜下, 沿肠系膜缘剪开肠管, 用钟表镊依次剥离黏膜、黏膜下层, 将附有深肌丛的环行平滑肌层和肌间神经丛的纵行块, 置于4℃的0.01 mol/L PBS中备用。恒冷箱切片机切制连续冠状切片, 片厚30 μm, 切片分套, 置于0.01 mol/L PBS中存放。

### 1.6 双重荧光免疫组织化学标记(间接法)

将标本置于0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-甲醇中浸泡30 min封闭内源性过氧化物酶, 0.1% Triton浸泡30 min, PBS

漂洗。1)同时加入一抗,即加入兔抗大鼠HCN1抗体、Cajal间质细胞标志物——小鼠抗大鼠c-Kit抗体,4℃孵育过夜(约14h);2)第2天将切片和铺片置于室温下复温1h,经PBS漂洗后,加入稀释的四甲基异硫氰酸罗丹明(TMRITC)标记的抗兔IgG二抗及异硫氰酸荧光素(FITC)标记的抗鼠IgG二抗,室温孵育3h,PBS漂洗后,将铺片平置于载玻片上,与切片标本同时用Mounting60(含10mg/L的DAPI)封片,以上过程均需避光操作。

按以上操作步骤,用小鼠抗大鼠c-Kit抗体与兔抗大鼠HCN2抗体进行双免疫荧光组织化学标记。

### 1.7 荧光倒置显微镜采图分析

每张切片取4~6个视野,将数字化图像储存于LSCM系统的计算机,待实验结束后进行图像分析,通过上述实验,旨在观察HCN1,HCN2与ICCs标志物c-Kit表达情况。

### 1.8 统计学处理

采用SPSS 22.0软件对数据进行统计学分析,计量资料数据以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,两组间数据比较采用独立样本t检验,相关性分析采用Pearson分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 复方地芬诺脂诱导建立便秘模型

每天复方地芬诺脂10mg/kg连续灌胃模型组大鼠的首粒黑便的排出时间、6h内的排便粒数和大便性状与生理盐水0.2mL/10g连续灌胃对照组相比差异有统计学意义( $P < 0.05$ ,表1),提示FC大鼠模型成功复制。

### 2.2 HCN1与c-Kit免疫荧光双标结果

2组大鼠升结肠、横结肠及降结肠均见HCN1,c-Kit表达,模型组中HCN1,c-Kit表达量明显低于空白组( $P < 0.05$ );HCN1表达在FC大鼠结肠中主要分布在结肠环形肌和纵行肌之间的肌ICC-MY,与c-Kit表达分布基本一致;与空白组比较,HCN1,c-Kit荧光值表达量变化一致,二者成正相关( $P < 0.05$ ;图1,2)。

### 2.3 HCN2与c-Kit免疫荧光双标结果

在模型组和空白组升结肠、横结肠及降结肠均见HCN2,c-Kit表达,模型组中HCN2,c-Kit表达量明显低于空白组( $P < 0.05$ );HCN2在FC大鼠升结肠、横结肠及降结肠黏膜间神经末梢均有分布,与ICCs突起距离很近,未见细胞共存现象,二者各自形成完整的细胞网络;与空白组比较,HCN2,c-Kit荧光值表达量变化一致,二者成正相关( $P < 0.05$ ;图3,4)。

表1 复方地芬诺脂对大鼠排便情况的影响( $n=12$ )

Table 1 Effects of compound diphenoxylate on the defecation of rats ( $n=12$ )

组别	首粒黑便排出时间/min	6h内排便粒数	6h内排便重量/g
对照组	65.1 ± 14.6	39.0 ± 3.1	0.50 ± 0.10
便秘模型组	178.6 ± 13.2	17.8 ± 6.8	0.32 ± 0.13
P	<0.05	<0.05	<0.05

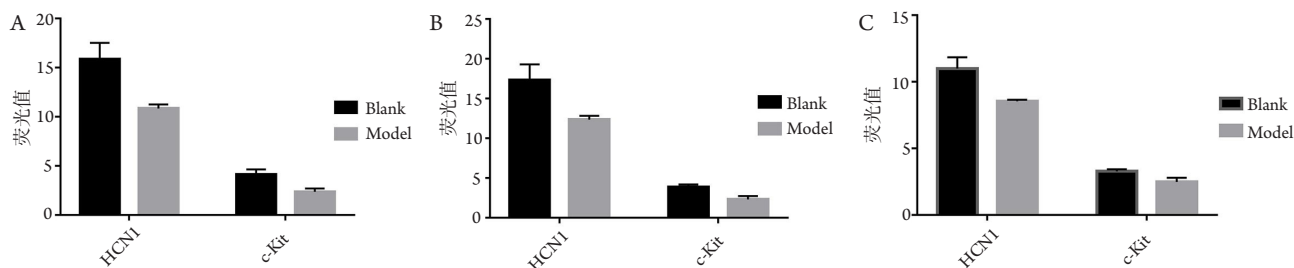


图1 免疫组织化学检测大鼠升结肠(A)、横结肠(B)、降结肠(C)中HCN1,c-Kit的平均荧光值

Figure 1 Average fluorescence value of HCN1 and c-Kit for ascending colon (A), transverse colon (B) and descending colon (C) of rats on IHC assay

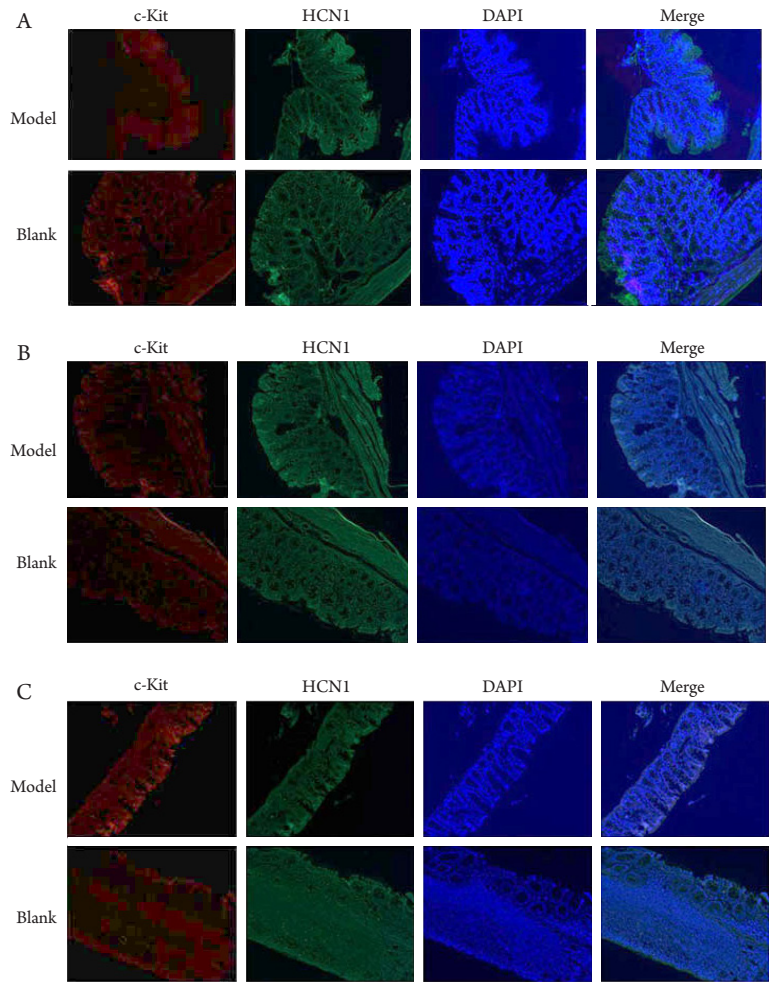


图2 免疫组织化学检测大鼠升结肠(A)、横结肠(B)、降结肠(C)中的HCN1, c-Kit分布及表达(× 400)

Figure 2 Expression and distribution of HCN1 and c-Kit for ascending colon (A), transverse colon (B) and descending colon (C) of rats on IHC assay (× 400)

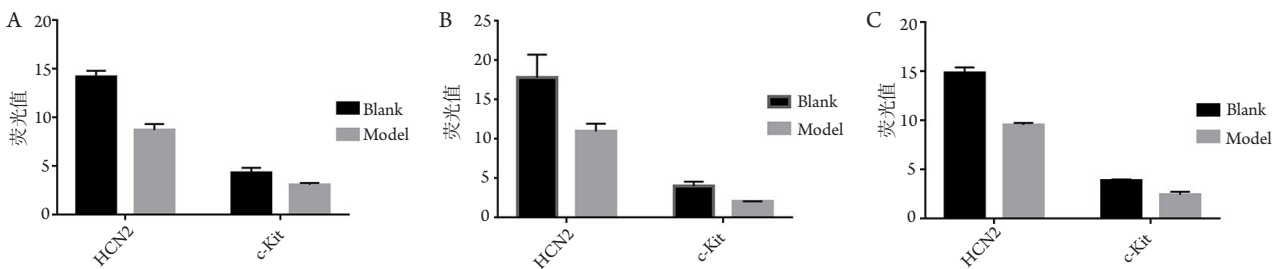


图3 免疫组织化学检测大鼠升结肠(A)、横结肠(B)、降结肠(C)中的HCN1, c-Kit的平均荧光值

Figure 3 Average fluorescence values of HCN1 and c-Kit for ascending colon (A), transverse colon (B) and descending colon (C) of rats on IHC assay



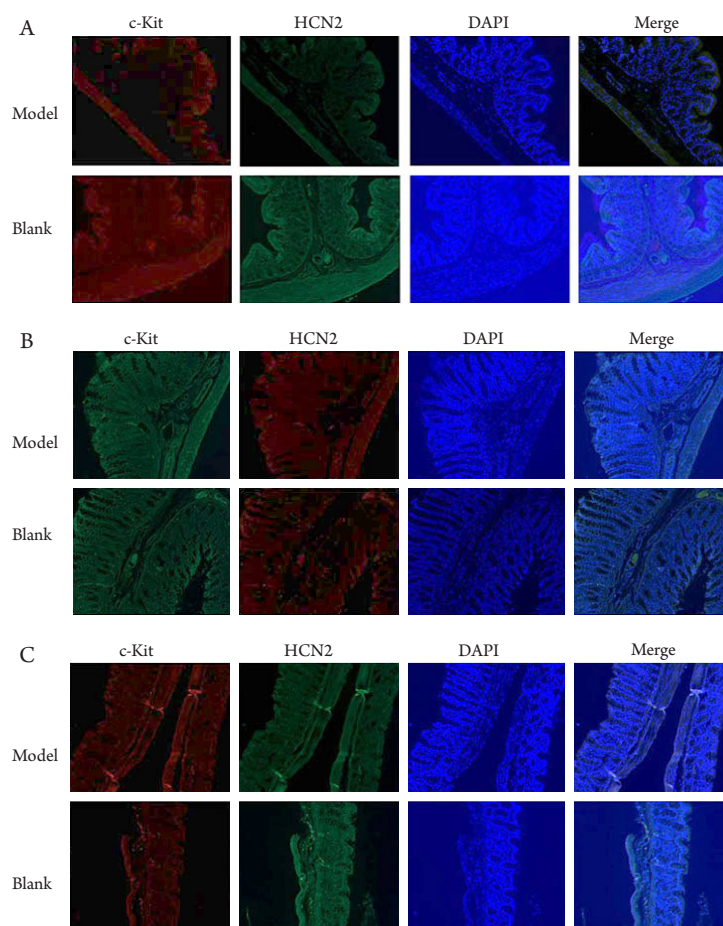


图4 免疫组织化学检测大鼠升结肠(A)、横结肠(B)、降结肠(C)中的HCN2, c-Kit分布及表达( $\times 400$ )

Figure 4 Expression and distribution of HCN1 and c-Kit for ascending colon (A), transverse colon (B) and descending colon (C) of rats on IHC assay ( $\times 400$ )

### 3 讨论

胃肠道平滑肌细胞存在跨膜电位的周期性变化,这一电活动被称为慢波活动、电控制活动、起搏电位或基础电节律。胃肠道的运动取决于胃肠道的肌电活动,慢波是胃肠道肌电活动的起步电位,决定胃肠道平滑肌收缩的节律,是胃肠动力的基础。ICCs是一种具有独立功能的间质细胞,广泛存在于各系统平滑肌组织中,在消化道中起着起搏胃肠道慢波、传递信号、介导肠神经与平滑肌之间调节信号的作用,并与病理状态下的多种胃肠动力紊乱疾病密切相关,是胃肠道平滑肌节律性收缩功能调节的重要因素<sup>[12-14]</sup>。相关研究<sup>[2-5]</sup>表明FC形成与ICCs密切相关,结肠ICCs数目、结构、功能异常可导致不规则的慢波,诱发的电位使平滑肌产生不规则的或无效的收缩运动,最终导致结肠运动迟缓。

ICCs产生慢波的机制目前尚不明确,可能与ICCs膜离子电流密切相关。其产生慢波的机制目前主要有两种学说,即钙激活氯通道学说、非选择性阳离子通道学说<sup>[15-17]</sup>。离子通道是介导自律兴奋细胞周期性电活动的内向离子流的载体,具有自身周期性通道开放-关闭的特点。HCN最初是由Di Francesco于20世纪80年代初研究兔窦房结起搏活动时发现并记录到一种If电流,称之为起搏电流。该电流被证明参与心脏的起搏活动,对于心脏正常自律性的维持发挥重要作用<sup>[6]</sup>,是ICCs自发产生膜电位波动或触发动作电位产生的生物基础。HCN具有内在的If活性,可自动除极,是Pacemaker细胞的电生理结构基础,表达增加或者减少都会直接引起起搏细胞兴奋性的改变<sup>[18]</sup>,有可能是ICCs作为起搏细胞的核心<sup>[6]</sup>。

结肠ICCs上存在多种离子通道和受体对调控其兴奋性,其中HCN通道的发现,为ICCs作为兴

奋起搏细胞的理论提供了可能的结构基础, HCN参与激活调节结肠ICC起搏活动<sup>[19]</sup>。本实验通过HCN1与c-Kit免疫荧光双标结果显示: FC大鼠结肠HCN1和c-Kit二者表达分布基本一致, 结果表明HCN1特异分布在结肠ICCs上, 二者具有细胞共存现象; HCN2分布在FC大鼠升结肠、横结肠及降结肠黏膜间神经末梢, 与ICCs各自形成细胞网络, 二者无共存现象, 但可能存在某种关联, 调控结肠运动及神经信号传递, 与国内外研究结论一致。本研究结果同时提示FC大鼠各部位结肠中HCN1, HCN2的表达较空白大鼠显著减低, 可能与FC大鼠结肠起搏细胞的兴奋性减低有关, 是FC发病的可能原因之一, 为探索FC的发病机制及治疗新靶点提供了一个新思路。进一步统计发现FC大鼠与空白大鼠各结肠相应部位HCN, c-Kit免疫荧光值变化量呈正相关, 提示HCN通道作为一种与自主起搏活动密切相关的离子通道, 可能参与结肠ICCs的自主起搏活动, 其数量、功能及分布异常可能与FC发病机制有关。

## 参考文献

- Bassotti G, Chiarioni G, Vantini I, et al. Anorectal manometric abnormalities and colonic propulsive impairment in patients with severe chronic idiopathic constipation[J]. *Dig Dis Sci*, 1994, 39(7): 1558-1564.
- 谭至柔, 谭丽, 黄雪, 等. 慢传输型便秘大鼠结肠内Cajal间质细胞的变化[J]. *实用医学杂志*, 2011, 37(18): 3290-3292.  
TAN Zhirou, TAN Li, HUANG Xue, et al. Alteration of interstitial cells of Cajal in the colon of slow transit constipation rats[J]. *The Journal of Practical Medicine*, 2011, 37(18): 3290-3292.
- 刘先桂, 黄乐, 赵建, 等. CD117、Smoothelin在慢传输型便秘患者病变结肠中的表达及意义[J]. *医学新知杂志*, 2013, 13(5): 331-332.  
LIU Xiangui, HUANG Le, ZHAO Jian, et al. Expressions of CD117, smoothelin and the significances in the colon of patients with slow transit constipation[J]. *Journal of New Medicine*, 2013, 13(5): 331-332.
- 李震, 郑豪, 李国宾, 等. Cajal间质细胞在大鼠慢传输便秘模型结肠中的变化[J]. *中华胃肠外科杂志*, 2013, 8(16): 777-779.  
LI Zhen, ZHENG Hao, LI Guobin, et al. Alterations of Cajal cells in the colon of slow transit constipation rats[J]. *Chinese Journal of Gastrointestinal Surgery*, 2013, 8(16): 777-779.
- 吕福东, 关丽珍, 刘仍海, 等. 慢传输型便秘大鼠结肠壁内神经形态学和Cajal间质细胞的改变[J]. *中国医药导报*, 2007, 4(21): 122-123.  
LÜ Fudong, GUAN Lizhen, LIU Renghai, et al. Changes of neural morphology and interstitial cells of Cajal in the colonic wall of rats with slow-transit constipation[J]. *Chinese Medicine Guides*, 2007, 4(21): 122-123.
- Herrmann S, Schnorr S, Ludwig A. HCN channels-modulators of cardiac and neuronal excitability[J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(1): 1429-1447.
- Xiao J, Nguyen TV, Ngui K, et al. Molecular and functional analysis of hyperpolarisation-activated nucleotide-gated (HCN) channels in the enteric nervous system[J]. *Neuroscience*, 2004, 129(3): 603-614.
- Shahi PK, Choi S, Zuo DC, et al. The possible roles of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide channels in regulating pacemaker activity in colonic interstitial cells of Cajal[J]. *J Gastroenterol*, 2014, 49(6): 1001-1010.
- 徐纯, 张超, 秦明, 等. HCN1在胃肠道的分布及特点[J]. *山西医科大学学报*, 2012, 43(8): 564-566.  
XU Chun, ZHANG Chao, QIN Ming, et al. Distribution and characteristics of HCN1 in gastrointestinal tract[J]. *Journal of Shanxi Medical University*, 2012, 43(8): 564-566.
- 严慧, 王景杰, 李强, 等. HCN 2在胃的分布及与递质共存的关系[J]. *山西医科大学学报*, 2009, 40(11): 961-963.  
YAN Hui, WANG Jingjie, LI Qiang, et al. Experimental study on distribution of HCN2 in stomach and its co-localization with some neurotransmitters[J]. *Journal of Shanxi Medical University*, 2009, 40(11): 961-963.
- 耿学斯, 罗春华, 肖秋平, 等. 肠润方对功能性便秘大鼠结肠黏膜AQP3、AQP9表达的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2016, 31(11): 4699-4703.  
GENG Xuesi, LUO Chunhua, XIAO Qiuping, et al. Experimental study on effect of Changrun Formula in regulating expression of AQP3 and AQP9 in colon mucosa of functional constipation rats[J]. *China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy*, 2016, 31(11): 4699-4703.
- Sanders KM, Koh SD, Ro S, et al. Regulation of gastrointestinal motility-insights from smooth muscle biology[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2012, 9(11): 633-645.
- Sanders KM, Ward SM, Koh SD. Interstitial cells: regulators of smooth muscle function[J]. *Physiol Rev*, 2014, 94(3): 859-907.
- Farrugia G. Interstitial cells of Cajal in health and disease[J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2008, 20(Suppl 1): 54-63.
- Tokutomi N, Maeda H, Tokutomi Y, et al. Rhythmic CL- current and physiological roles of the intestinal c-kit positive cells[J]. *Pfluegers Arch*, 1995, 431(2): 169-177.
- Perrino BA. Regulation of gastrointestinal motility by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-stimulated protein kinase II[J]. *Arch Biochem Biophys*,

- 2011, 510(2): 174-181.
17. Zhu Y, Golden CM, Ye J, et al. ERG K+ currents regulate pacemaker activity in ICC[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2003, 285(6): 1249-1258.
18. Lang RJ, Klemm MF. Interstitial cells of Cajal like cells in the upper urinary tract[J]. *J Cell Mol Med*, 2005, 9(3): 543-556.
19. Shin DH, Kim MW, Choi S, et al. Regulation of the pacemaker activity of colonic interstitial cells of Cajal by protease-activated receptors: involvement of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide channels[J]. *Pharmacology*, 2016, 98(3): 171-182.

**本文引用:** 肖秋平, 贾玉龙, 陈云艳, 耿学斯. HCN1, HCN2在功能性便秘大鼠结肠的分布及其与Cajal间质细胞的共存关系[J]. *临床与病理杂志*, 2017, 37(12): 2517-2523. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.12.001

**Cite this article as:** XIAO Qiuping, JIA Yulong, CHEN Yunyan, GENG Xuesi. Distribution of HCN1, HCN2 in colon of functional constipation rats and its co-localization with interstitial cells of Cajal[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2017, 37(12): 2517-2523. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.12.001