

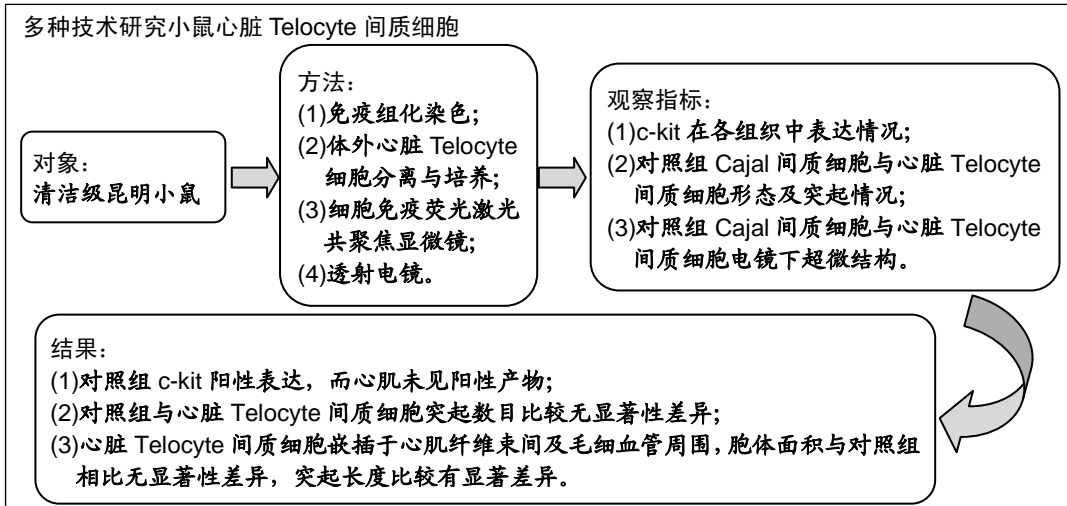
小鼠心脏Telocyte间质细胞的存在与特点

邓丽珠, 黄倩文, Noman Qureshi, 李菊香, 段少银(厦门大学附属中山医院, 福建省厦门市 361004)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.1586

ORCID: 0000-0002-8206-0853(段少银)

文章快速阅读:



邓丽珠, 女, 1989年生, 福建省明溪县人, 汉族, 2016年福建医科大学毕业, 硕士, 医师, 主要从事心血管疾病影像研究。

通讯作者: 段少银, 博士, 教授, 主任医师, 厦门大学附属中山医院, 福建省厦门市 361004

文献标识码: B

稿件接受: 2018-10-12



文题释义:

Cajal 间质细胞: 西班牙神经解剖学家 Cajal 利用亚甲基蓝和嗜银染色法在研究胃肠道神经系统过程中观察到一种特殊类型细胞, 因其外形与神经细胞十分相似, 并可与神经细胞同样染色, 且该细胞存在于神经末梢与平滑肌细胞间的小间隙中, 故将其命名为“Cajal 间质细胞”。

Telocyte 间质细胞: 与胃肠道 Cajal 间质细胞形态相似, 存在于全身多个系统及部位, 胞体发出细长突起为其最重要特征。有研究证明其与冠心病、急性心肌梗死、心肌淀粉样变性等心血管疾病具有相关性。Popescu 教授团队曾提出鉴别 Telocyte 间质细胞 10 条超微结构“金标准”, 其中最重要的特征就是胞体发出的细长的“念珠状”突起。

摘要

背景: 有研究发现 Telocyte 间质细胞可能在急性心肌梗死、房颤、心脏瓣膜病及心肌淀粉样变性等心脏疾病发挥作用, 但其机制尚不清楚, 相关心脏 Telocyte 间质细胞的基础研究具有重要的临床价值。

目的: 多种技术探讨小鼠心脏 Telocyte 间质细胞的存在与特点。

方法: 选择 10 d-10 周龄昆明小鼠 59 只(由福州吴氏实验动物中心提供), 以胃肠道 Cajal 间质细胞及膀胱 Telocyte 间质细胞为对照组进行对比研究。ACK2(c-kit 单克隆抗体)作为指标, 进行心肌组织免疫组化染色($n=13$); 体外心脏 Telocyte 间质细胞分离与培养($n=41$), 之后进行细胞免疫荧光激光共聚焦显微镜以观察细胞形态及突起情况; 透射电镜($n=5$)观察细胞超微结构。

结果与结论: ①免疫组化染色显示在小鼠胃肠道、膀胱组织发现 c-kit 阳性表达产物, 心脏组织未发现 c-kit 阳性表达, 体外原代培养发现 c-kit 阳性表达; ②免疫荧光激光共聚焦显微镜和透射电镜观察均发现心脏 Telocyte 间质细胞, 镜下心脏 Telocyte 间质细胞嵌插于心肌纤维束间及毛细血管周围, 胞体呈梭形或不规则形, 心室 Telocyte 间质细胞突起与毛细血管间发现长条形“致密物质”。与对照组比较胞体大小、突起数量无显著性差异($P > 0.05$), 但细胞突起长度有显著性差异($P < 0.05$); ③结果提示, 利用原代培养、免疫荧光及透射电镜技术确定小鼠心脏存在 c-kit 阳性表达的 Telocyte 间质细胞, 其胞体大小、突起数量与胃肠道 Cajal 间质细胞或膀胱 Telocyte 间质细胞类似; 心室 Telocyte 间质细胞突起最长, 心房 Telocyte 间质细胞突起最短, 心室 Telocyte 间质细胞突起与毛细血管间存在紧密连接。

关键词:

小鼠心脏; 心脏 Telocyte 间质细胞; c-kit; Cajal 间质细胞; 心肌纤维束; 细长突起

主题词:

间质细胞; 小鼠; 显微镜检查, 荧光; 组织工程

中图分类号: R459.9; R392-33

Deng Lizhu, Master, Physician, Zhongshan Hospital of Xiamen University, Xiamen 361004, Fujian Province, China

Corresponding author: Duan Shaoyin, MD, Professor, Chief physician, Zhongshan Hospital of Xiamen University, Xiamen 361004, Fujian Province, China

Existence and features of Telocyte cells in the mouse heart

Deng Lizhu, Huang Qianwen, Noman Qureshi, Li Juxiang, Duan Shaoyin (Zhongshan Hospital of Xiamen University, Xiamen 361004, Fujian Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Studies have found that Telocyte interstitial cells may play a role in heart diseases, such as acute myocardial infarction, atrial fibrillation, valvular heart disease and myocardial amyloidosis, but the mechanism is unclear. The basic research of cardiac Telocyte interstitial cells is of important clinical value.

OBJECTIVE: To explore the existence and characteristics of Telocyte interstitial cells in the mouse heart.

METHODS: Fifty-nine Kunming mice aged from 10 days to 10 weeks (provided by Fuzhou Wu's Experimental Animal Center in China) were chosen. The gastrointestinal tract Cajal interstitial cells and bladder Telocyte interstitial cells were used as controls. ACK2 (c-kit monoclonal antibody) was used as an indicator for the immunohistochemical staining of myocardial tissue in 13 mice. Cardiac Telocyte cells from another 41 mice were isolated, cultured *in vitro* and observed for cell morphology and protrusion under immunofluorescence laser confocal microscope. Ultrastructure of Cajal and Telocyte interstitial cells from the remaining five mice was observed by transmission electron microscopy.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) Positive expression of c-kit was found in the gastrointestinal and bladder tissues by immunohistochemical staining, but not in the cardiac tissues. However, *in vitro* cultured cells were positive for c-kit. (2) Under the immunofluorescence laser confocal microscope and transmission electron microscope, the cardiac Telocyte cells with spindle or irregular bodies were discovered in myocardial fibers or around the capillaries, and dense strips were found between cell protrusions from cardiac Telocyte cells and the capillaries. There was no difference in the shape of cell body and the number of cell protrusion compared with the control group, but a significant difference in the length of cell protrusions was found ($P < 0.05$). In conclusion, the presence of Telocyte cells with positive expression of c-kit in the mouse heart is confirmed by primary culture, immunofluorescence staining and transmission electron microscopy. The body size and number of cell protrusions are similar to those of gastrointestinal tract Cajal interstitial cells or bladder Telocyte interstitial cells. Ventricular Telocyte interstitial cell protrusion is the longest, atrial Telocyte interstitial cell protrusion is the shortest, and ventricular Telocyte interstitial cell protrusion is tightly connected with the capillaries.

Subject headings: Stromal Cells; Mice; Microscopy, Fluorescence; Tissue Engineering

0 引言 Introduction

西班牙神经解剖学家Cajal利用亚甲基蓝和嗜银染色法在研究胃肠道神经系统过程中观察到一种特殊类型细胞,因其外形与神经细胞十分相似,并可同神经细胞同样染色,且该细胞存在于神经末梢与平滑肌细胞间的小间隙中,故将其命名为“Cajal间质细胞”^[1]。而后,罗马尼亚教授Popescu在胃肠道外器官发现了一类同上述Cajal间质细胞形态学相似的细胞,将其命名为Cajal间质样间质细胞^[2]。随着研究进展,人们发现这类细胞与Cajal间质细胞在超微结构和免疫表型上均有所不同,为避免混淆,Popescu教授于2010年将其更名为“Telocyte”^[3-4]。目前Cajal间质细胞或Telocyte间质细胞存在于全身多个系统及部位,在心血管系统中:Popescu教授^[5]首次在人类心室肌中发现Telocyte间质细胞的存在,其超微结构特征完全符合Telocyte间质细胞诊断的10条“金标准”,然而他并未进一步阐明其在心脏中的功能;后来Formey等^[6]用不同的分离方法也在大鼠肠系膜动脉中发现了Telocyte间质细胞,并观察到它不同于平滑肌细胞的特点,即Telocyte间质细胞对外源性ATP和精氨酸-加压素无应答;同年,Faussone-Pellegrini等^[7]提出Telocyte间质细胞可能是器官再生和修复的关键参与者。此外,还有研究提出Telocyte间质细胞在急性心肌梗死、房颤、心脏瓣膜病及心肌淀粉样变性等心脏疾病中可能具有重要作用,但是几乎所有研究还仅仅停留在观察及推断上,确切机制尚未完全阐明及证实^[8-12]。Hostiuce等^[13-14]通过对既往具有代表性的几篇文章进行细致深入分析后认为,以上研究由于均存在实验设计、结果解读及分析不严谨等问题,尚不能证明Telocyte间质细胞与上述常见心脏疾病间存在必然联系。近几年国内外关于心血管系统Telocyte间质细胞的研究已成为热点,但是国内仍未见小鼠心脏Telocyte间质细胞相关报道。当前研究利用多种技术来观察小鼠心脏Telocyte间质细胞的存在及其形态特点,为相关研究提供基础。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 动物观察实验。

1.2 时间及地点 于2015年1月至2016年3月在厦门大学附属中山医院中心实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 59只10 d-10周龄清洁级昆明小鼠,体质量15-35 g,雌雄不限,由福州吴氏实验动物中心提供,批号scxk(沪)2015-0002。

1.3.2 试剂 大鼠抗小鼠CD117(c-kit)单克隆抗体ACK2 (eBioscience, inc, 美国);大鼠二步法免疫组化检测试剂盒PV-6004(中杉金桥生物技术有限公司,北京);生物素标记的大鼠IG HRP检测试剂盒(BD, inc, 美国);浓缩DAB显色试剂盒(中杉金桥生物技术有限公司,北京);封闭用正常山羊血清、II型胶原酶、胰酶、鼠尾胶原(Vector Laboratories, Inc, Burlingame, CA 94010);干细胞因子(Peprotech, inc, 美国);FITC标记山羊抗大鼠IgG抗体(北京中杉金桥生物公司,北京)。

1.3.3 仪器及设备 组织冷冻切片机(HS-3 090A, 金华);透射电子显微镜(JEM2100HC, 日本);激光共聚焦显微镜(LeicaTsSpZ, 德国);超净工作台(BCM-1000, 苏州);高速冷冻离心机(Beekman, 美国);二氧化碳培养箱(Shellab, 美国);BX51显微镜(OLYMPUS, 日本), Image-proplus6.0 计算机图像采集系统(Media Cybernetics, 美国)。

1.4 方法

1.4.1 免疫组化染色观察c-kit在各组织中表达情况 以胃肠道Cajal间质及膀胱Telocyte间质细胞为对照组进行对比研究。严格按照免疫组化二步法染色:昆明小鼠($n=13$)术前禁食不禁水24 h。取新鲜昆明小鼠心脏、膀胱及小肠、结肠、胃组织,立即恒冷冷冻切片机内切片厚5 μm ;冷丙酮4 $^{\circ}\text{C}$ 固定15 min;PBS冲洗5 min \times 2次;体积分数3%过氧化氢灭活内源性过氧化物酶,20 min,室温,避光;PBS冲洗5 min \times 2次;封闭用山羊血清(1:10),37 $^{\circ}\text{C}$,15-

20 min; 加入不同浓度大鼠抗小鼠 c-kit单克隆抗体ACK2 (1 : 200, 1 : 100, 1 : 50), 4 °C冰箱过夜; PBS快速冲洗3次, 再浸洗5 min×3次; 加入兔抗鼠二抗, 37 °C, 40 min; PBS快速冲洗3次, 再浸洗5 min×3次; DAB显色镜下控制反应时间, 适时终止; 苏木精复染约10 s; 自来水冲洗; 碳酸锂约1 s; 自来水冲洗; 梯度乙醇干燥; 中性树胶封固; 显微镜下观察并拍照。

1.4.2 心脏Telocyte间质细胞分离与体外培养 以胃肠道Cajal间质及膀胱Telocyte间质细胞为对照组进行对比研究。昆明小鼠($n=41$)术前禁食水24 h; 颈椎脱臼处死小鼠后置于体积分数75%乙醇中浸泡约10 min; 于超净台内剖开小鼠胸、腹腔, 分别取出心脏、膀胱及小肠(跳跃式剪取多段小肠)立即放入含体积分数20%双抗的D-Hank's液中, 修剪多余组织, 去除心腔内血凝块、膀胱内尿液, 纵行剖开小肠, 轻轻刮除黏膜层; D-Hank's反复冲洗组织2-4次后将组织放入含20%双抗的D-Hank's中浸泡约10 min(小肠组织约20 min); 将组织剪碎至匀浆状态(约1 mm³); 加入II型胶原酶约15 mL(1.3 g/L, pH 7.0)于37 °C培养箱中消化; 镜下控制反应时间, 当可见多量单个分散细胞时即加入M199培养基终止消化; 1 500 r/min离心4 min, 弃上清, 加入D-Hank's重悬细胞, 移液枪反复轻柔吹打约5 min; 1 500 r/min离心4 min; 重复上述过程一次后加入M199(含体积分数10%胎牛血清+体积分数1%双抗)重悬; 细胞悬液过200目筛网去除大块组织后分别均匀铺至放置盖玻片(预先包被50 mg/L鼠尾胶原)的6孔板中并加入SCF(终质量浓度约5 μg/L)于37 °C、体积分数5%CO₂培养箱中培养。细胞培养24 h后换液, 冲去未贴壁细胞, 加入培养基继续培养; 每两三天换一次液, 期间在显微镜下观察其形态学特征并拍照。

1.4.3 细胞免疫荧光激光共聚焦显微镜观察Cajal间质细胞与Telocyte间质细胞形态 细胞稳定培养四五天后, 进行免疫荧光检测: 吸去6孔板内培养基, PBS快速冲洗3次, 浸洗5 min×3次; 40 g/L多聚甲醛室温固定20 min, PBS快速冲洗3次, 浸洗5 min×3次; 0.2%Triton X-100室温透膜10 min, PBS快速冲洗3次, 浸洗5 min×3次; 5%BSA室温封闭1 h后加入不同浓度一抗ACK2(1 : 200, 1 : 100, 1 : 50), 37 °C反应3 h; PBS快速冲洗5次, 浸洗5 min×3次; FITC标记山羊抗大鼠IgG抗体(1 : 50)室温反应1 h; PBS快速冲洗3次, 浸洗5 min×3次; 在洁净载玻片上滴加一滴封固剂, 将盖玻片取出晾干后倒扣于载玻片上, 用透明指甲油封固; 激光共聚焦显微镜下观察并拍照。

1.4.4 透射电镜观察Cajal间质细胞与Telocyte间质细胞超微结构 以胃肠道Cajal间质及膀胱Telocyte间质细胞为对照组进行对比研究。取材、固定: 昆明小鼠($n=5$)颈椎脱臼处死后立即取材, 在预冷的戊二醛固定液内, 用刀片“拉锯式”将组织切成小块后移至盛有戊二醛的EP管中, 放入4 °C冰箱冷藏4 h以上。脱水: 组织块用PBS冲洗15 min×3次后以丙酮梯度脱水。浸透和包埋: 环氧树脂浸透后将组织块包埋多孔橡胶包埋模板中, 然后置烤箱烘干, 在45 °C(12 h)、60 °C(36 h)烤箱内加温聚合硬化, 形成包埋

块。超薄切片: 利用超薄切片机切厚度为1 μm的切片, 重金属盐(乙酸铀酰及柠檬酸盐)染色后进行电镜观察并拍照。

1.5 主要观察指标 ①免疫组化染色下c-kit在各组织中表达情况; ②对照组Cajal间质细胞与心脏Telocyte间质细胞形态及突起情况; ③对照组Cajal间质细胞与心脏Telocyte间质细胞透射电镜下超微结构。

1.6 统计学分析 所有数据采用SPSS 21.0进行处理。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 组间数据采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 心肌组织免疫组化染色结果 小鼠胃肠道及膀胱组织光镜下见明显CD117(c-kit)阳性表达, 见图1A-D。心肌组织连续切片均未见任何c-kit阳性表达产物, 见图1E。

2.2 细胞免疫荧光激光共聚焦显微镜观察结果 光镜显示小鼠小肠Cajal间质细胞、膀胱及心脏Telocyte间质细胞体外分离及培养: 细胞胞体为梭形或不规则形, 圆形或椭圆形细胞核, 核大, 核周胞质少, 核内可见斑点状不均质染色质, 细胞体周围发出1-3支长短不一的细胞突起, 相邻细胞突起间可见紧密接触, 见图2A, B, C。分别进行ACK2抗体免疫荧光染色观察, 显示细胞形态表现为胞体呈长梭形或不规则形, 大而圆的胞核位于胞体中央, 核/质比高, 核周胞质少, 胞核外周胞浆、细胞膜及突起均呈清晰的绿色荧光, 见图2D, E, F。通过观察小肠Cajal间质细胞、膀胱与心脏Telocyte间质细胞单个切面上胞体周围细胞突起计数, 统计学比较显示3种细胞突起数差异无显著性意义, 见表1。

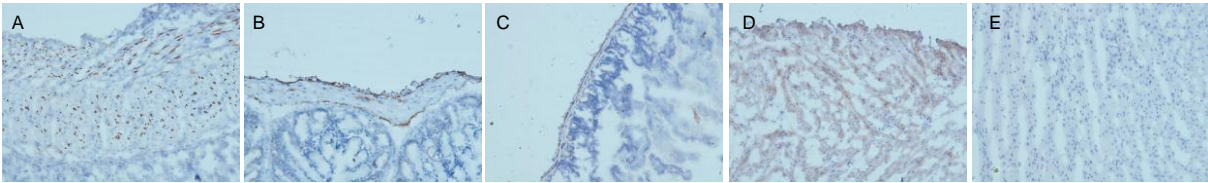
表1 小肠Cajal间质细胞、膀胱及心脏Telocyte间质细胞突起数的比较

Table 1 The number of cell protrusions of gastrointestinal tract Cajal interstitial cells and bladder and cardiac Telocyte interstitial cells

细胞(突起)	小肠($n=143$)	膀胱($n=66$)	心脏($n=54$)
1支	31(21.68%)	12(18.18%)	9(16.67%)
2支	47(32.87%)	23(34.85%)	21(38.89%)
3支	65(45.45%)	31(46.97%)	24(44.44%)

表注: 3种细胞突起数比较, 差异均无显著性意义($P > 0.05$)。

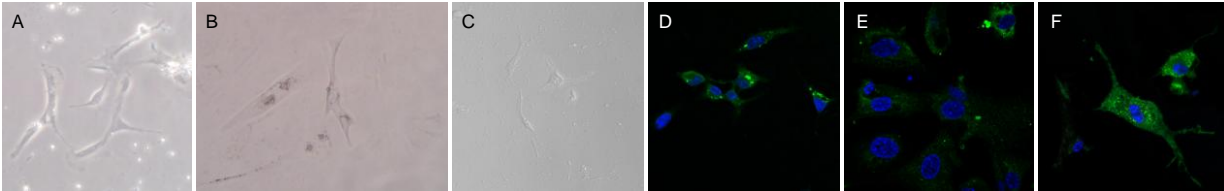
2.3 透射电镜技术观察结果 观察小鼠心房、心室原位组织及心脏原代细胞培养Telocyte间质细胞, 见图3; 小肠Cajal间质细胞、结肠Cajal间质细胞及膀胱Telocyte间质细胞, 见图4。镜下发现心脏原位组织Telocyte主要嵌插于心肌纤维束间及毛细血管周围, 单个切面Telocyte间质细胞胞体表现为梭形或不规则形, 胞体周围发出1-3支细长突起, 相邻细胞突起间紧密联系或相互交错、缠绕。心脏特络间质细胞核大, 核/质比高, 核膜清晰, 核周胞质少, 核周胞质及细胞突起内见多量切面圆形或椭圆形的线粒体及少量内质网、溶酶体等细胞器, 突起粗细不均, 表面凹陷与膨大交替。电镜下呈现颇具特征性“念珠样”外观, 并且在心室Telocyte间质细胞突起与毛细血管间观察到一种



图注：图中 A 为小鼠胃组织，阳性表达主要分布在斜行肌及环行肌内；B 为于结肠组织，阳性表达主要分布在环、纵行肌层间及黏膜下层；C 为于膀胱组织，阳性表达分布于环、纵行肌层间及环、纵行肌内；D 为于小肠组织，阳性表达分布同结肠组织，即主要分布于环、纵行肌层间及黏膜下层；E 为小鼠心脏组织连续切片均未见 c-kit 阳性表达产物。

图 1 普通光镜下免疫组化染色 c-kit 阳性表达(x200)

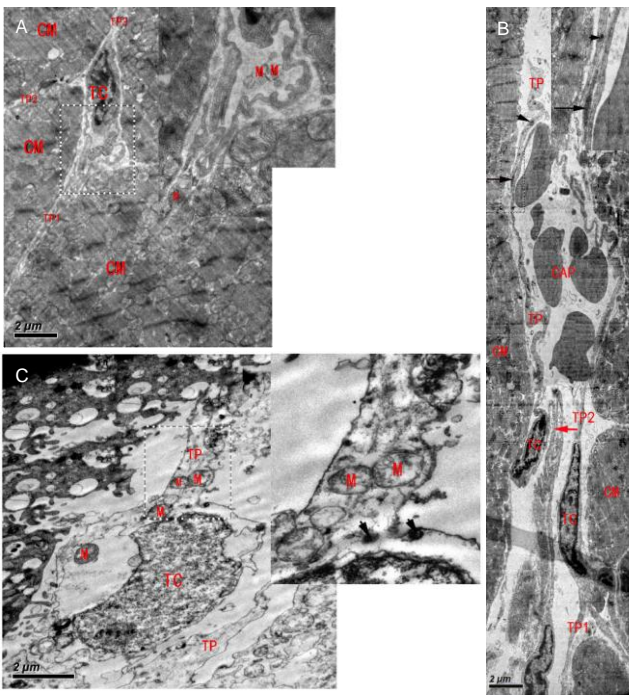
Figure 1 Positive expression of c-kit for immunohistochemical staining under light microscope (x200)



图注：图中 A, B 为小肠及膀胱原代培养细胞在体外培养 48 h 后于普通光学显微镜下见到贴壁的 Cajal 间质细胞；C 为心脏原代培养细胞在体外培养 36 h 后于镜下见到贴壁的 Telocyte 间质细胞。D, E, F 为 ACK2 抗体免疫荧光染色技术显示小肠 Cajal 间质细胞、膀胱 Telocyte 间质细胞、心脏 Telocyte 间质细胞。

图 2 细胞免疫荧光激光共聚焦显微镜技术观察小鼠小肠 Cajal 间质细胞、膀胱及心脏 Telocyte 间质细胞(x200)

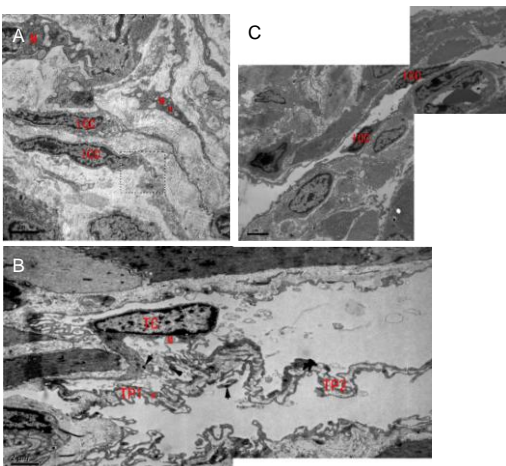
Figure 2 Observation of gastrointestinal tract Cajal interstitial cells and bladder and cardiac Telocyte interstitial cells using immunofluorescence laser confocal microscope (x200)



图注：图中 A 为小鼠心房原位组织，可见 Telocyte 间质细胞嵌插于心肌纤维束间。胞体略呈梭形，胞体周围发出 3 支细长突起，胞核周围胞质及细胞突起内见多量切面圆形或椭圆形的线粒体；B 为小鼠心室原位组织可见 Telocyte 间质细胞位于心肌纤维束间及毛细血管周围，Telocyte 间质细胞与毛细血管间见长条形致密结构(长黑箭)。Telocyte 间质细胞胞体梭形，胞体周围发出 1 或 2 支细长突起，相邻 Telocyte 间质细胞间紧密联系(红箭头)。胞核周围胞质及细胞突起内见多量切面圆形或椭圆形的线粒体及少量内质网、溶酶体(短黑箭头)等细胞器；突起直径粗细不均，表面凹陷与膨大交替，呈现颇具特征性“念珠样”外观；C 为所观察到的心脏原代培养 Telocyte 间质细胞同心房及心室原位组织 Telocyte 间质细胞有所差别，表现为：前者数量较少，并且前者在细胞形态上有较大变化：细胞膜不完整，细胞核稍变形，细胞周围突起部分中断，但是细胞质内及突起内仍可见多量切面圆形或椭圆形的线粒体及少量溶酶体(短黑箭头)。CM：心肌纤维束；M：线粒体；TC：Telocyte 间质细胞；TP：突起；CAP：毛细血管。标尺：2 μm。

图 3 小鼠心房、心室原位组织及心脏原代细胞培养 Telocyte 间质细胞透射电镜结果

Figure 3 Atrial, ventricular and cardiac Telocyte interstitial cells under transmission electronic microscope



图注：图中 A 为结肠原位组织切片，Cajal 间质细胞的胞体呈长椭圆形，单个切面胞体周围突起 1 或 2 支，细长且粗细不均；B 为膀胱原位组织切片 Cajal 间质细胞胞体呈长椭圆形，单个切面胞体周围见 1 或 2 支细长且粗细不均的细胞突起，胞质及突起内见多量椭圆形线粒体；C 为小肠原位组织切片 Telocyte 间质细胞；胞体亦呈长椭圆形，单个切面胞体周围见 2 支细长弯曲突起，胞质及突起内见多量线粒体及溶酶体(短黑箭头)。ICC：Cajal 间质细胞；M：线粒体；TC：Telocyte 间质细胞；TP：突起。标尺：2 μm。

图 4 小鼠小肠及结肠 Cajal 间质细胞、膀胱 Telocyte 间质细胞透射电镜结果

Figure 4 Gastrointestinal tract Cajal interstitial cells and bladder Telocyte interstitial cells under transmission electronic microscope

长条形“致密结构”。原代培养心脏特络间质细胞数量较少, 细胞形态上表现为细胞膜不完整, 细胞核稍显变形, 细胞周围突起部分中断, 但细胞质内及突起内仍可见多量切面圆形或椭圆形的线粒体及少量溶酶体。电镜下原位组织心脏Telocyte、肠道Cajal间质细胞胞体面积、突起长度及其比较结果, 见表2。胞体面积统计学比较差异无显著性意义($P > 0.05$), 突起长度比较差异有显著性意义($P < 0.05$)。

表2 透射电镜下肠道组织Cajal间质细胞、心脏及膀胱Telocyte间质细胞的胞体面积及突起长度测量结果 ($\bar{x} \pm s$)

部位	细胞数	面积(μm^2)	突起数	长度(μm)
心房	11	9.18 \pm 3.67	8	10.25 \pm 2.87
心室	7	9.17 \pm 3.28	6	17.65 \pm 5.86
小肠	8	9.47 \pm 5.16	5	12.66 \pm 4.09
结肠	9	12.12 \pm 3.84	6	12.91 \pm 3.94
膀胱	8	12.30 \pm 2.61	5	13.11 \pm 6.27
F值	-	1.54	-	5.11
P值	-	0.21	-	0.00

3 讨论 Discussion

3.1 实验技术与方法 该研究以小鼠胃肠道Cajal间质细胞及膀胱Telocyte为阳性对照, 运用免疫组化染色、原代培养、免疫荧光及透射电镜几种方法结合观察, 以保证观察的准确性。其中免疫组化染色未发现c-kit阳性表达产物, 可能是因为Telocyte在小鼠心肌中含量较少, 其次免疫组化法灵敏度不够造成假阴性。这种综合技术的应用优点在于观察细胞更全面, 几种方法互相取长补短。国内首次报道了小鼠心脏Telocyte的存在, 并将小鼠心脏Telocyte与胃肠道Cajal间质及膀胱Telocyte进行形态学上的比较, 有利于观察小鼠心脏Telocyte同对照组的胞体大小, 突起长度间的差别, 从而更客观且直观地呈现了小鼠心脏Telocyte的形态特点及其在小鼠心脏中的位置结构关系, 为后续深入研究该细胞在心血管中的生理功能提供了细胞模型。

3.2 Telocyte间质细胞研究与鉴别 Telocyte间质细胞在形态学上最需要同巨噬细胞及成纤维细胞鉴别, 前者细胞内含有大量高尔基体及溶酶体等细胞器, 胞体周围突起短而不规则; 成纤维细胞外形较大, 形态多样, 细胞内高度发达的粗面内质网及高尔基复合体, 细胞突起短、少而粗, 其次, Telocyte间质细胞和成纤维细胞的miRNA具有miR-193表达有着显著的不同^[7-8]。Telocyte间质细胞最显著的特点是胞体发出的细长突起, 突起表面凹凸不平, 呈现特征性“念珠状”外观, 其凹陷部分被认为是Ca²⁺储存及释放单位^[15]。该研究进行了小鼠心脏Telocyte间质细胞分离与培养, 显示细胞形态、突起等证明了上述的论述。

3.3 小鼠心脏Telocyte间质细胞的存在 目前心脏Telocyte间质细胞被发现存在于人心外膜、心肌及心内膜^[6, 16]。当前研究国内首次报道了小鼠心脏Telocyte细胞的存在, 其分布于心肌纤维束、毛细血管周围, 相邻Telocyte之间存

在紧密联系, 但未发现Telocyte细胞与神经终末之间存在直接关联, 电镜下未观察到Telocyte与心肌细胞乃至其他类型细胞存在直接的膜与膜的连接。同时, 国内有关于大鼠心脏Telocyte间质细胞的存在, 并描述了其分布与特征^[17]。国外有关于小鼠心脏Telocyte的相关研究报道, 描述的细胞分布、形态与该研究相符, 并证实了其存在复杂的三维网络结构, 并提出Telocyte与心肌细胞存在一种“非经典”连接, 或许在心脏发育、更新、修复过程中扮演着重要角色^[19-21]。

3.4 小鼠心脏Telocyte间质细胞特点 当前研究观察小鼠心脏Telocyte间质细胞胞体为梭形或不规则形, 其内可见境界分明的圆形或椭圆形细胞核, 核大, 核质比高, 细胞核周围细胞质较少, 核内特别是细胞核周缘可见斑点状不均质染色质。测量Telocyte胞体大小及突起长度同Zhang等^[22]在小鼠主动脉中发现的Telocyte间质细胞相近。进行统计单个切面上胞体周围突起的数量, 发现含3支突起细胞比例最大, 相邻细胞突起间互相接触或是交错、缠绕, 未见相关统计报道。曾有研究团队通过离子束扫描电镜合成Telocyte间质细胞的空间三维结构, 直观地呈现了Telocyte间质细胞的超微结构, 其突起细长似“彩带”, 膨大部分在镜下呈“驼峰”样^[23]。当前研究发现小鼠心脏原位组织Telocyte间质细胞主要嵌插于心肌纤维束、毛细血管间, 突起沿心肌纤维束延伸。但所有切面均未观察到Telocyte间质细胞胞体与心肌细胞有直接接触, 而是通过细长的突起结构同心肌细胞联系。另外, 发现心室原位组织Telocyte间质细胞突起与毛细血管管壁紧密相贴, 其间观察到一类长条形致密结构, 未见相关文献报道。初步推断是Telocyte间质细胞与毛细血管相互作用的中间物质, 两者之间可能存在紧密连接。

3.5 研究前景与不足 文献已推测出Telocyte间质细胞的几个功能, 但是大部分都未经证实^[24-25]。其中具有代表性的几个推论如下: ①Telocyte间质细胞可能指引其他细胞的迁移, 形成器官最终的结构, 参与损伤修复或者更新^[26]; ②Telocyte间质细胞被认为有滋养功能, 其通过释放囊泡和外质体并旁分泌白细胞介素6, 血管内皮生长因子和NO等物质营养邻近细胞^[27]; ③Telocyte间质细胞对急性梗死心肌可能具有重要修复作用, 研究发现Telocyte间质细胞对心肌缺血比其他细胞更敏感, 心肌缺血发生时, Telocyte间质细胞数量急剧减少, 而在缺血中心及边缘区同步移植Telocyte间质细胞后心肌梗死范围缩小且受损心功能有所恢复^[9, 28]; ④传递信号: Cantarero等^[29]在大鼠的十二指肠动脉Telocyte间质细胞内存在一种非运动性纤毛—初级纤毛, 这种由9+0轴丝模式组成的纤毛由于缺少正常9+2模式运动纤毛中包含的中心微管, 并且不含基因丝动力蛋白, 因此十二指肠动脉特络间质细胞的初级纤毛不能运动, 并推测这种初级纤毛可能在血管微环境中信号传递中具有重要作用; ⑤Telocyte间质细胞在心肌淀粉样变过程中可能具有重要作用, 文献报道长期房颤患者手术标本中, 发现心肌常常可以看到淀粉样变, 细长的突起围绕在淀粉样沉积物的周围或是插入其中形成蜂巢样结构^[11]; ⑥Telocyte

间质细胞与房颤可能具有密切关联, Vandecasteele等^[30]在猪的肺静脉壁内发现由特络间质细胞与神经节组成的网络, 这种复杂的结构可能参与了异位起搏点的形成。当前研究不足之处在于免疫组化及细胞免疫荧光所用抗体指标较少, 结果不够丰富; 心脏原代培养Telocyte间质细胞形态不佳, 特别是在收集细胞及制作电镜标本过程中细胞有损伤, 导致细胞形态变形、结构不完整。此外, 该研究主要研究心肌Telocyte间质细胞形态特点, 而没有报道相关生理功能。

3.6 结论 当前研究结合免疫组化、免疫荧光激光显微镜共聚焦、原代细胞培养及透射电镜多种方式, 发现小鼠心脏原位组织及心脏原代培养细胞存在c-kit阳性表达的Telocyte间质细胞, 并成功分离出小鼠心脏Telocyte间质细胞。心脏Telocyte胞体大小与胃肠道及膀胱Telocyte间质细胞相近, 心室Telocyte间质细胞突起最长, 心房Telocyte间质细胞突起最短。心脏原位组织中Telocyte间质细胞嵌插于心肌纤维束间及毛细血管周围, 胞体周围突起细长, 与毛细血管管壁紧密相贴, 其间有长条形致密结构。该结构的存在, 提示心脏突起与毛细血管壁存在紧密连接。

作者贡献: 邓丽珠、段少银进行实验设计; 实验实施与资料收集为段少银、邓丽珠、黄倩文、Noman Qureshi, 李菊香; 实验评估为段少银、邓丽珠成文; 段少银审核并对文章负责。

经费支持: 该文章没有接受任何经费支持。

利益冲突: 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

机构伦理问题: 实验方案经厦门大学医学院动物实验伦理委员会批准, 批准号为XMULAC20170140。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。

写作指南: 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

文章查重: 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

文章外审: 文章经国内小同行外审专家双盲外审, 符合本刊发稿宗旨。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] Cajal SR. El plexo de Auerbach de los batracios. Nota sobre el plexo de Auerbach de la rana. *Trab Lab Histol Fac Med. (Barc)*. 1892;23-28.
- [2] Gherghiceanu M, Popescu LM. Interstitial Cajal - like cells (ICLC) in human resting mammary gland stroma. *Transmission electron microscope (TEM) identification*. *J Cell Mol Med*. 2005;9(4):893-910.
- [3] Pieri L, Vannucchi MG, Faussonepellegrini MS. Histochemical and ultrastructural characteristics of an interstitial cell type different from ICC and resident in the muscle coat of human gut. *J Cell Mol Med*. 2008;12(5b):1944-1955.
- [4] Popescu LM, Faussone-Pellegrini MS. TELOCYTES-a case of serendipity: the winding way from Interstitial Cells of Cajal (ICC), via Interstitial Cajal-Like Cells (ICLC) to TELOCYTES. *J Cell Mol Med*. 2010;14(4):729-740.
- [5] Hinescu ME, Popescu LM. Interstitial Cajal - like cells (ICLC) in human atrial myocardium. *J Cell Mol Med*. 2005;9(4):972-975.
- [6] Formey A, Buscemi L, Boittin FX, et al. Identification and functional response of interstitial Cajal-like cells from rat mesenteric artery. *Cell Tissue Res*. 2011;343(3):509.
- [7] Faussone-Pellegrini MS, Popescu LM. Telocytes. *Biomol Concepts*. 2011;2(6):481.
- [8] Cismasiu VB, Radu E, Popescu LM. miR-193 expression differentiates Telocytes from other stromal cells. *J Cell Mol Med*. 2011;15(5):1071-1074.
- [9] Zhao B, Chen S, Liu J, et al. Cardiac Telocytes were decreased during myocardial infarction and their therapeutic effects for ischaemic heart in rat. *J Cell Mol Med*. 2013;17(1):123-133.
- [10] Shim W. Myocardial Telocytes: A new player in electric circuitry of the heart. *Adv Exp Med Biol*. 2016;913:241-251.
- [11] Mandache E, Gherghiceanu M, Macarie C, et al. Telocytes in human isolated atrial amyloidosis: ultrastructural remodelling. *J Cell Mol Med*. 2010;14(12):2739-2747.
- [12] Kucybalá I, Janas P, Ciuk S, et al. A comprehensive guide to Telocytes and their great potential in cardiovascular system. *Bratisl Lek Listy*. 2017;118(5):302.
- [13] Hostiuc S, Marinescu M, Costescu M, et al. Cardiac Telocytes. From basic science to cardiac diseases. II. Acute myocardial infarction. *Ann Anat*. 2018;2018:18-27.
- [14] Hostiuc S, Negoi I, Dogaroiu C, et al. Cardiac Telocytes. From basic science to cardiac diseases. I. Atrial fibrillation. *Ann Anat*. 2018;218:83-87.
- [15] Gherghiceanu M, Popescu LM. Electron microscope tomography: further demonstration of nanocontacts between caveolae and smooth muscle sarcoplasmic reticulum. *J Cell Mol Med*. 2007;11(6):1416-1418.
- [16] Popescu LM, Manole CG, Gherghiceanu M, et al. Telocytes in human epicardium. *J Cell Mol Med*. 2010;14(8):2085-2093.
- [17] 徐莎莎, 廖肇福, 蔡冬青. 心脏Telocytes在年老大鼠心脏的分布[J]. *解剖学报*, 2016, 47(6):802-806.
- [18] Gherghiceanu M, Manole CG, Popescu LM. TELOCYTES in endocardium: electron microscope evidence. *J Cell Mol Med*. 2010;14(9):2330-2334.
- [19] Wang J, Jin M, Ma W H, et al. The History of Telocyte Discovery and Understanding. *Adv Exp Med Biol*. 2016;913:1-21.
- [20] Aleksandrovych V, Pasternak A, Basta P, et al. Telocytes: facts, speculations and myths. *Folia Med Cracov*. 2017;57(1):5-22.
- [21] Mihaela G, Popescu L M. Heterocellular communication in the heart. Electron tomography of Telocyte-myocyte junctions. *J Cell Mol Med*. 2011;15(4):1005-1011.
- [22] Zhang HQ, Lu SS, Xu T, et al. Morphological evidence of Telocytes in mice aorta. *Chin Med J (Engl)*. 2015;128(3):348-352.
- [23] Cretoiu D, Hummel E, Zimmermann H, et al. Human cardiac Telocytes: 3D imaging by FIB-SEM tomography. *J Cell Mol Med*. 2014;18(11):2157-2164.
- [24] Varga I, Kyselovič J, Galfiova P, et al. The non-cardiomyocyte cells of the heart. Their possible roles in exercise-induced cardiac regeneration and remodeling. *Adv Exp Med Biol*. 2017;999:117-136.
- [25] Xiao J, Chen P, Qu Y, et al. Telocytes in exercise-induced cardiac growth. *J Cell Mol Med*. 2016;20(5):973-979.
- [26] Gherghiceanu M, Popescu LM. Cardiomyocyte precursors and Telocytes in epicardial stem cell niche: electron microscope images. *J Cell Mol Med*. 2010;14(4):871-877.
- [27] Mandache E, Popescu L M, Gherghiceanu M. Myocardial interstitial Cajal-like cells (ICLC) and their nanostructural relationships with intercalated discs: shed vesicles as intermediates. *J Cell Mol Med*. 2007;11(5):1175-1184.
- [28] Kostin S. Cardiac Telocytes in normal and diseased hearts. *Semin Cell Dev Biol*. 2016;55:22-30.
- [29] Cantarero I, Luesma M J, Junquera C. The primary cilium of Telocytes in the vasculature: electron microscope imaging. *J Cell Mol Med*. 2011;15(12):2594-2600.
- [30] Vandecasteele T, Cornillie P, Vandeveldel K, et al. Presence of ganglia and Telocytes in proximity to myocardial sleeve tissue in the porcine pulmonary veins wall. *Anat Histol Embryol*. 2017;46(4):325-333.