

· 论 著 ·

肠易激综合征大鼠内脏高敏感性与脑肠互动的研究

唐庆林¹, 宫秀群², 冯根宝², 李雪飞³, 汪芳裕¹

[摘要] **目的** 研究腹泻型肠易激综合征大鼠模型内脏敏感性的改变与 c-fos 在结肠及中枢神经系统异常表达的关系。**方法** 采用乙酸灌肠法造成腹泻型肠易激综合征动物模型(A组, $n=12$)和对照组(B组, $n=12$),造模后通过腹部回撤反应评分评价内脏敏感性;用印度墨汁肠道染色法观察小肠蠕动,以墨汁在小肠中移行的距离占整段小肠长度的百分比来观察小肠推进蠕动的变化;应用免疫组织化学染色及计算机图像分析系统半定量分析结肠及中枢神经系统 c-fos 表达。**结果** 该模型符合腹泻型肠易激综合征特征,A组腹部回撤反应评分、结肠及中枢神经系统 c-fos 表达高于 B 组,两组差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 乙酸灌肠法造成腹泻型肠易激综合征大鼠模型内脏高敏感性,c-fos 的高表达参与大鼠内脏高敏感的异常调节。

[关键词] 肠易激综合征;内脏敏感性;c-fos

[中图分类号] R574 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1672-271X(2012)01-0001-04

The investigation of the relation between visceral hypersensitivity and brain-gut interaction in the rat model with irritable bowel syndrome

TANG Qing-lin¹, GONG Xiu-qun², FENG Gen-bao², LI Xue-fei³, WANG Fang-yu¹. 1. Department of Gastroenterology, 2. Department of Neurology, 3. Department of Anesthesiology, Nanjing School of Clinical Medicine, the Second Military Medical University/Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command, PLA, Nanjing, Jiangsu 210002, China

[Abstract] **Objective** To study the interaction of the visceral hypersensitivity and the abnormal expression of c-fos in the colon and central nervous system in the rat model of diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. **Methods** The rat model of diarrhea-predominant irritable bowel syndrome was induced by the intracolonic administration of acetic acid. The visceral sensitivity was evaluated by the score of abdominal withdrawal reflexes in the model group (group A, $n=12$) and the control group (group B, $n=12$). A colored marker (indian ink) was employed for the measurement of small intestinal transit. The expression of c-fos in the colon and central nervous system was detected by an immunohistochemical staining and was analyzed semi-quantitatively by computerized color image analyzer. **Results** The character of this model matched the character of diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. The score of abdominal withdrawal reflexes in group A was significantly higher than that of group B ($P<0.05$). Also, the expression of c-fos in the colon and central nervous system in group A was greater than that of group B ($P<0.05$). **Conclusion** The rat model of diarrhea-predominant irritable bowel syndrome which was established the intracolonic administration of acetic acid shows the character of visceral hypersensitivity. And the hyperexpression of c-fos in the colon and central nervous system is probably involved in the pathophysiology of visceral hypersensitivity.

[Key words] irritable bowel syndrome; visceral sensitivity; c-fos

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)是一种以腹痛或腹部不适伴排便习惯改变和(或)粪

便性状改变的功能性肠病,缺乏可解释症状的形态学和生化学异常^[1-2]。IBS 的病因和发病机制尚不明确,内脏高敏感性(visceral hypersensitivity, VH)和脑肠互动(brain-gut interaction, BGI)是当前的研究热点^[3-4]。本研究通过建立腹泻型肠易激综合征(diarrhea-predominant irritable bowel syndrome, D-IBS)大鼠模型,探讨 VH 与 BGI 在 IBS 发病和病理生理学中的可能的机制。

基金项目: 国家自然科学基金(81070289);南京军区南京总医院科研基金(Z208019)

作者简介: 唐庆林(1979-),男,江苏南京人,硕士,主治医师,从事消化内科专业

作者单位: 210002 江苏南京,第二军医大学南京临床医学院(南京军区南京总医院),1. 消化内科,2. 神经内科,3. 麻醉科

通讯作者: 汪芳裕, E-mail: wangfangyu65@yahoo. com. cn

1 材料与方法

1.1 材料 清洁级雄性 Sprague-Dawley 大鼠 24 只,体重 270 ~ 310 g,南京军区南京总医院比较医学科提供,许可证号:SCXK(军)2007-012。

1.2 动物模型及指标检测

1.2.1 模型建立 大鼠 24 只,随机分为模型组(A 组)和对照组(B 组),每组各 12 只,按参考文献^[5]方法建立模型,实验方案得到南京军区南京总医院实验动物伦理委员会的批准。实验前,大鼠正常饮水,禁食 12 h 后将其置于固定器(苏州苏杭公司,5 cm × 5 cm × 20 cm)内,以头低尾高位固定,经肛门插入自制大鼠灌肠管至距肛门 8 cm,缓慢灌入 4% 乙酸(成都科龙试剂厂)1 ml,用浸湿生理盐水的棉签压迫肛门口约 30 s(防止液体溢出),再予 1 ml 磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗肠道后缓慢拔出灌肠管,后正常饲养 6 d。B 组用生理盐水代替乙酸灌肠。第 7 天评价模型并取材。

1.2.2 直结肠扩张实验(colorectal distension, CRD) 实验第 6 天禁食 24 h,禁水 12 h;第 7 天,两组大鼠分别于清醒状态下放入大鼠固定器中,参考文献方法^[5],将 8F 导尿管(Euromedical 公司,导管直径 2.7 mm,球囊最大容量 3 ml)经肛门缓慢插入,气囊末端距肛门约 2 cm 并固定。待 30 min 后大鼠适应,经外口气囊内先后注入 37℃ 生理盐水(0.1、0.2、0.3、0.4、0.6、0.8 和 1.0 ml)扩张,按腹部回撤反应(abdominal withdrawal reflex, AWR)标准^[5]评分,每 4 分钟一次,每次约 30 s,每一个评分重复 3 次,取平均值。

1.2.3 Bristol 粪便性状评分 实验第 7 天观察大鼠粪便情况并按文献标准^[2]评分,其中 4、5 级为正常,其余为异常。

1.2.4 小肠推进实验 实验第 7 天,每只大鼠予印度墨汁 0.3 ml 灌胃,20 min 后,腹腔注射 3% 戊巴比妥(40 mg/kg)麻醉,剖腹游离出小肠(十二指肠始端至回盲部)平铺于白纸上,记录印度墨汁在小肠中移行距离及整段小肠长度,以印度墨水在小肠中移行距离占整段小肠长度的百分比值,作为小肠推进百分率来评价小肠推进运动情况。

1.2.5 标本采集、病理切片及免疫组化染色 实验第 2 天,随机取 A 组及 B 组大鼠各 2 只,麻醉后取大鼠结肠(距肛门约 10 cm 处)1 cm 肠段,常规 HE 染色。其余大鼠第 7 天麻醉后予心脏穿刺插管至主动脉根部,剪破右心耳,以生理盐水 200ml 快速灌注冲洗,待冲洗液清亮后,予多聚甲醛缓冲液(40 g/L)

250 ml 固定。取出完整大脑、脊髓(L_{4~6})、结肠(距肛门约 10 cm 处)1 cm 肠段,以 10% 甲醛固定后常规石蜡包埋,结肠及脊髓连续切片,脑组织按前凶后方 1.5 mm 至 5.0 mm 连续冠状切片,自大脑正中至左 2.0 mm 连续矢状切片,片厚 4 μm,隔 5 张取 1 张。每例每部位取 2 张,置于防脱载玻片上,烤箱 60℃ 30 min 使切片紧密黏附。使用浓度为 1:100 稀释的 c-fos 抗体(北京博奥森生物公司),按 SP 法免疫组化法进行标记,按说明书操作。染色结果分析:在光学显微镜下,每张切片在 400 倍镜下随机取 3 个视野,用 Image Pro Plus 5.0.2 图像分析软件测定各组切片中抗体呈阳性反应的细胞数、累计光密度(integrated optical density, IOD)进行半定量分析,IOD 值代表组织染色强度,IOD 值越大,代表染色越强。所有大鼠结肠免疫组化操作前行常规 HE 染色。

1.3 统计学处理 实验数据用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,应用 SPSS 13.0 统计软件进行统计分析,两组间 AWR 评分的比较采用两因素方差分析,组内比较采用 LSD 法;Bristol 分级、小肠推进运动、c-fos 表达比较采用独立样本 *t* 检验,*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CRD 结果 当容量扩张 ≥ 0.3 ml 时, A 组 AWR 评分明显高于 B 组(*P* < 0.05, 表 1)。A 组内比较,容量扩张分别为 0.1 ml、0.2 ml、0.3 ml、0.4 ml 时,组内对应 AWR 值比较,差异有统计学意义(*P* < 0.05),容量扩张分别为 0.6 ml、0.8 ml、1.0 ml 时,组内对应的 AWR 值比较,差异无统计学意义(*P* > 0.05),说明容量扩张达 0.6 ml 时,肠道致敏达一定阈值,但与 B 组比较,两组差异有统计学意义(*P* < 0.05)。

表 1 两组大鼠 AWR 评分比较($\bar{x} \pm s$)

容量(/ml)	A 组	B 组
0.1	0.20 ± 0.42 *	0.00 ± 0.00
0.2	0.80 ± 0.63 *	0.20 ± 0.42
0.3	1.70 ± 0.48 *△	0.40 ± 0.52
0.4	2.60 ± 0.52 *△	1.20 ± 0.42
0.6	3.30 ± 0.48 △	2.00 ± 0.00
0.8	3.30 ± 0.48 △	2.00 ± 0.00
1.0	3.60 ± 0.52 △	2.60 ± 0.52

注:组内比较,**P* < 0.05;与 B 组同期比较,△*P* < 0.05

2.2 Bristol 评分 A 组大鼠粪便多为稀便或糊便状,其 Bristol 评分为(5.80 ± 0.42),而 B 组大鼠粪便多为团块状或腊肠样,其 Bristol 评分为(4.00 ± 0.82),两组差异有统计学意义($P < 0.05$),且 A 组符合 D-IBS。

2.3 小肠推进试验结果 A 组小肠推进百分率为(70.58 ± 5.11)%,B 组为(54.92 ± 4.38)%,两组差异有统计学意义($P < 0.05$),A 组小肠推进较 B 组显著要快。

2.4 结肠外观变化及 HE 结果 造模后第 2 天,与 B 组相比,A 组大鼠结肠外观管腔增大,管壁增厚,伴充血及出血,镜下可见黏膜层、黏膜下层水肿明显,出现片状出血点。实验第 7 天,两组肠黏膜外观及 HE 染色均无异常。

2.5 免疫组化结肠、脊髓背角、海马、下丘脑 c-fos 表达 与 B 组相比,A 组结肠可见较多细胞胞浆呈棕褐色的 c-fos 阳性细胞,主要分布于黏膜层(图 1);脊髓背角可见大量胞浆棕色的 c-fos 阳性神经元细胞;下丘脑、海马可见多个胞浆褐色的 c-fos 阳性神经元细胞,与 B 组相比,细胞数目及 IOD 值明显增高($P < 0.05$,表 2)。

3 讨 论

IBS 是临床常见的一组消化系统症候群,其病因及发病机制尚无定论。VH 是指内脏组织器官对刺激的感受性增强的现象,越来越多的研究表明,VH 是 IBS 主要的病理生理特征^[6]。由于 IBS 是一种功能性胃肠病,取得患者的脑和脊髓等组织进行研究相对困难,利用动物模型则可为研究提供良好的基础和条件。应用较广泛的模型主要是通过化学或机械刺激造模,目前常用的大鼠模型有成年大鼠直肠化学刺激^[5]、幼鼠肠道化学刺激^[7]等。本实验选用成年大鼠乙酸灌肠造模模拟人类 D-IBS,当 CRD 容量扩展 $\geq 0.4\text{ml}$ 时,A 组 AWR 评分 ≥ 2 分,达到伤害感受疼痛阈值时^[5],符合 VH,与 B 组相比,实验数据的差异有统计学意义($P < 0.05$)。

高级神经中枢与肠道的相互作用称为“脑肠互动(BGI)”,BGI 概念的提出有助于我们进一步理解 IBS 的发病机制^[8]。c-fos 是一种存在于神经细胞内的即刻早期基因,在感觉通路中表达。当机体受到刺激时,其表达会有所改变,目前其在 BGI 研究中成为关注热点^[9]。本研究利用 c-fos 在活体受到

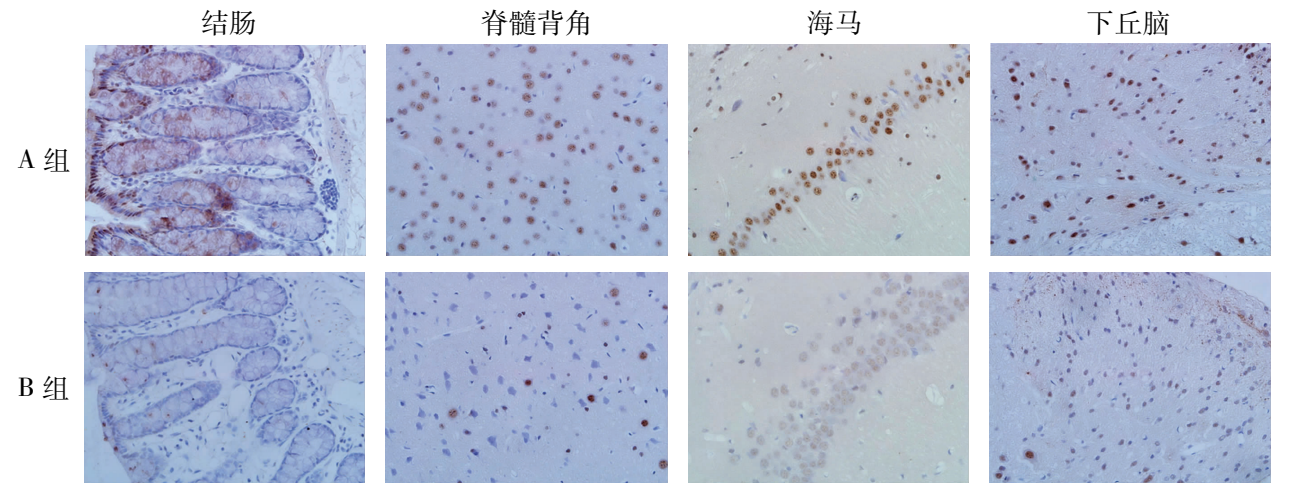


图 1 免疫组化结肠、脊髓背角、海马、下丘脑 c-fos 表达 (SP × 400)
与 B 组比较,A 组结肠、脊髓背角、海马、下丘脑可见较多呈棕褐色的 c-fos 阳性细胞

表 2 两组大鼠 c-fos 表达比较($\bar{x} \pm s$)

部位	细胞数目		IOD 值	
	A 组	B 组	A 组	B 组
结肠	$63.80 \pm 7.71^*$	53.20 ± 6.03	$4630.76 \pm 920.99^*$	3003.67 ± 949.19
脊髓背角	$13.20 \pm 1.93^*$	9.20 ± 1.55	$6675.18 \pm 2.08^*$	1963.77 ± 1.84
下丘脑	$61.70 \pm 5.03^*$	51.40 ± 5.36	$2595.18 \pm 773.86^*$	1461.58 ± 420.18
海马	$164.80 \pm 9.13^*$	151.80 ± 7.41	$614.94 \pm 144.33^*$	319.28 ± 121.05

注:与 B 组同部位比较,* $P < 0.05$

外界伤害刺激后,其表达产物可作为伤害性感受神经元兴奋的标志物的原理^[10],利用免疫组化的方法检测脑、脊髓背角、结肠各层面 c-fos 的表达和分布,以初步探讨 VH 与 BGI 的关系。IBS 内脏高敏感的形成是一个复杂的过程,脑肠轴多个层面均参与其中,肠道刺激作用外周感受器后,经神经元传递至中枢。脊髓背角是内脏感觉传入纤维的汇聚之所,是肠道与中枢信号传递的“中继站”,在脑-脊髓-结肠互动中起重要作用。本研究中,模型组大鼠呈现内脏高敏感,各层面 c-fos 表达均升高,推测可能是化学刺激导致肠道炎症,内脏感受器激活,中枢神经系统对外周信号放大、致敏,肠道传入脊髓伤害性信号增多,导致脊髓背角神经元兴奋性升高,经神经传递至脑。虽然肠道有炎症自我修复功能,但中枢自我恢复能力不如肠道,仍通过下行通路作用于脊髓背角,影响内脏感觉。另外,本研究结果表明,模型组内脏高敏感,下丘脑、海马、脊髓背角、结肠的 c-fos 阳性细胞表达升高,与对照组比较差异有统计学意义。海马和下丘脑 c-fos 表达量明显升高,提示这两个部位可能在高级中枢致敏中起重要作用,这可能与这两个部位的功能有关。

综上所述,我们的初步研究表明,BGI 与 VH 有一定关系,c-fos 参与 VH 的调节,这为深入研究 IBS 发病机制乃至治疗提供了新的思路。

【参考文献】

- [1] Drossman DA. The functional gastrointestinal disorders and the Rome III process [J]. *Gastroenterology*, 2006, 130 (5): 1377-

1390.

- [2] 中华医学会消化病学分会胃肠动力学组. 肠易激综合征诊断和治疗的共识意见(2007,长沙)[J]. *中华消化杂志*, 2008, 28 (1): 38-40.
- [3] Mertz H. Review article: visceral hypersensitivity [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2003, 17 (5): 623-633.
- [4] 胡品津. 从脑-肠互动的高度认识肠易激综合征[J]. *中华消化杂志*, 2003, 23 (5): 261-262.
- [5] La JH, Kim TW, Sung TS, et al. Visceral hypersensitivity and altered colonic motility after subsidence of inflammation in a rat model of colitis [J]. *World J Gastroenterol*, 2003, 9 (12): 2791-2795.
- [6] Kanazawa M, Hongo M, Fukudo S. Visceral hypersensitivity in irritable bowel syndrome [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2011, 26 (Suppl 3): 119-121.
- [7] Al-Chaer ED, Kawasaki M, Pasricha PJ. A new model of chronic visceral hypersensitivity in adult rats induced by colon irritation during postnatal development [J]. *Gastroenterology*, 2000, 119 (5): 1276-1285.
- [8] Tanaka Y, Kanazawa M, Fukudo S, et al. Biopsychosocial model of irritable bowel syndrome [J]. *J Neurogastroenterol Motil*, 2011, 17 (2): 131-139.
- [9] Ait-Belgnaoui A, Eutamene H, Houdeau E, et al. Lactobacillus farciminis treatment attenuates stress-induced overexpression of fos protein in spinal and supraspinal sites after colorectal distension in rats [J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2009, 21 (5): 567-573.
- [10] Nakagawa T, Katsuya A, Tanimoto S, et al. Differential patterns of c-fos mRNA expression in the amygdaloid nuclei induced by chemical somatic and visceral noxious stimuli in rats [J]. *Neurosci Lett*, 2003, 344 (3): 197-200.

(收稿日期:2011-09-14;修回日期:2011-10-31)

(本文编辑:张仲书; 英文编辑:王建东)