文章编号:1000-5404(2008)10-0973-03

论著

大鼠膀胱与直肠神经的解剖学观察

周 强,熊恩庆,宋 波,李 新 (第三军医大学西南医院全军泌尿外科研究所,重庆 400038)

摘 要:目的 探讨膀胱与直肠之间的神经联系。**方法** 用荧光素逆行双标法进行研究。健康成年雄性SD大鼠15只,完全随机分为实验组(10只)和对照组(5只)。实验组将荧光素碘化丙啶(Propidium Iodide, PI)注入直肠右侧壁肌层,双苯甲亚胺(Bisbenzimide, Bb)注入膀胱右侧壁肌层内,对脊髓L_1~S_3节段进行追踪。**结果** 在实验组右侧L_6~S_3和L_1~L_3的背根神经节(dorsal root ganglia, DRG)中发现荧光素双标细胞,对照组无双标细胞。**结论** 腰、骶部的DRG细胞周围突有分支同时投射到直肠和膀胱,说明慢性便秘引起的排尿异常的发生机制可能与发生在DRG水平的轴突反射有关。

关键词: 神经机制;膀胱;直肠
中图法分类号: R322.45;R322.62;R322.85 **文献标识码:** A

The same DRG cells innervate bladder and rectum simultaneouly in rats

ZHOU Qiang, XIONG En-qing, SONG Bo, LI Xin (Urinary Surgery Research Center, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the innervation between baldder and rectum. Methods The retrograde fluorescent double labeling method was used. Propidium Iodide (PI) was injected into the right wall of the rectum of male SD rats and Bisbenzimide (Bb) into their right wall of urinary bladder. Results The fluorescent double labeled neurons were found in the right L_6-S_3 and L_1-L_3 dorsal root ganglia (DRG). Conclusion DRG cells at L_6-S_3 and L_1-L_3 simultaneously innervate the rectum and the urinary bladder, explaining that the abnormal micturition due to chronic constipation may be caused by axis reflex at the level of the peripheral process of DRG cells.

Key words: innervation; bladder; rectum

便秘是一种很常见的消化道症状,在欧美国家人群中的发病率为2%~27%。在美国每年大约有2 500万人因便秘就诊[1]。长期严重的便秘不仅引起消化系统功能紊乱,而且引起很多的并发症如心脑血管及泌尿系统功能异常[2]。据统计,便秘患者中有30%~80%伴有膀胱功能异常。通常认为给予通便治疗能够降低其并发症的危害性,但是在泌尿系统,部分患者给予通便后其膀胱功能仍无明显改善[3]。目前有关便秘引起膀胱功能改变的神经机制研究较少。本研究拟通过荧光双标技术证实背根神经节中有神经元发出轴突投射到膀胱与直肠,揭示直肠与膀胱间的病理反射机制,为后续的研究打下基础。

作者简介:周 强,男,安徽省临泉县人,硕士研究生,医师,主要从事排尿功能障碍方面的研究。电话:(023)65399045,E-mail:zhouq_0301@sohu.com

收稿日期:2007-09-13;修回日期:2008-01-25

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

碘化丙啶(Propidium Iodide, PI)和双苯甲亚胺(Bisbenzimide, Bb)购自Sigma公司,Olympus荧光显微镜(日本)。

1.2 实验动物分组及处理

健康成年雄性SD大鼠15只,体质量220~320 g,由第三军医大学实验动物中心提供。完全随机分为实验组和对照组。

实验组10只大鼠,1%戊巴比妥钠(35 mg/kg)腹腔注射麻醉后,置于恒温工作台上,保持肛温37 ℃,固定四肢;剃净腹部毛发,碘伏消毒腹部,取下腹部正中切口,显露直肠;微量进样器吸取5% PI 10 μl注入直肠右侧壁;逐层缝合切口,再次碘伏消毒切口,肌注青霉素钠2 000 U抗感染。24 h后同法麻醉固定,碘伏消毒;再次取下腹部正中切口显露膀胱,微量进样器吸取1% Bb 10 μl注入膀胱右侧壁肌层;逐层缝合切口,再次消毒切口,肌注青霉素钠2 000 U;24 h后行4%多聚甲醛灌注固定。

对照组5只大鼠,麻醉及直肠、膀胱显露同实验组。5% PI

10 μl 注入直肠右侧壁,大鼠存活 6 h 后再次麻醉,1% Bb 10 μl 注入膀胱右侧壁肌层;大鼠存活 3 h 后多聚甲醛灌注固定。取实验组(5 只)胸段神经节作对照,以排除荧光素经血液循环进入脊神经节神经元。

1.3 灌注固定及取材

各组大鼠麻醉后固定四肢,手术打开胸腔;灌注针头自左心室插入升主动脉使液体自此而入,右心耳剪一小口,灌入液体自此而出;0.9% 生理盐水 200 ml 快速灌入冲洗,直至右心耳流出液体清亮;用 4 ℃含 4% 多聚甲醛的 0.1 mol/L 磷酸缓冲液灌注固定 1 ~ 2 h(约 400 ml),直至肝脏发白变硬,头颈四肢僵硬;灌注满意后解剖获取右侧 T_{13} ~ S_4 背根神经节(dorsal root ganglia, DRG)。

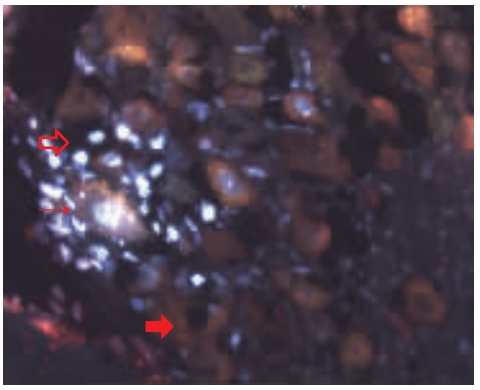
将所取的 DRG 分节段分别浸入 4 ℃含 4% 多聚甲醛的 0.1 mol/L 磷酸缓冲液中固定 2 ~ 4 h,取出 DRG 浸入含有 30% 蔗糖的 0.1 mol/L 磷酸缓冲液中过夜,待 DRG 下沉后行冰冻连续切片,片厚 20 μm,隔 2 片取 1 片。每个神经节取 2 ~ 4 片裱于玻片上,风干后待检。

1.4 DRG 神经元荧光标记细胞的观察

风干后立即用荧光显微镜观察、拍照及记录。用紫外光(UV,360 nm)激发,530 阻挡滤片进行观察。PI 的激发波长 600 ~ 610 nm,标记细胞质,呈桔红色荧光;Bb 的发射波长 500 nm,标记细胞核,呈蓝色荧光。其中,只见 PI 标记的呈桔红色荧光的细胞质,而细胞核未被标记的为 PI 单标细胞;只见 Bb 标记的呈蓝色荧光的细胞核,而细胞质未被标记的为 Bb 单标细胞;既可见到桔红色荧光的细胞质又可见到蓝色荧光的细胞核的细胞为 PI/Bb 双标细胞[4]。因两种波长的光相互干涉,有时可见细胞质为黄橙色或暗红色,细胞核为黄绿色。未被荧光素标记的细胞在荧光显微镜下不显示。

2 结果

在实验组的右侧 DRG 中发现 3 种细胞:标记细胞质的 PI 单标细胞,标记细胞核的 Bb 单标细胞和细胞核细胞质均标记的 PI/Bb 双标细胞。双标细胞主要集中在 L_1 ~ L_3、L_6 ~ S_3 节段的 DRG 中(图 1)。实验组各标记细胞数为:PI 单标细胞(23.0 ± 4.9),Bb 单标细胞(10.3 ± 3.3),PI/Bb 双标细胞数(6.9 ± 1.5),双标细胞百分比为(15.2 ± 2.2)%,对照组 DRG 中未发现双标细胞。



⇧:Bb 单标细胞;↑:PI/Bb 双标细胞;⬆:PI 单标细胞

图 1 腰、骶段 DRG 中可见 3 种荧光标记细胞 (×400)

3 讨论

荧光素逆向双标示踪法是研究神经通路的传统方法之一,其原理是将两种不同的荧光素分别注入两种不同的组织或者器官,经传入神经吸收后进入神经元。如果在同一个神经元中发现该两种荧光素,则说明该神经元发出带分权的轴突同时支配这两种组织或者器官。这种方法主要是研究外周神经在脊神经节或者中枢神经的汇聚。在不同的器官之间已有报道:如在膀胱与结肠之间[5],但是在膀胱与直肠之间是否有神经联系目前尚少见报道。

在本实验中,实验组将 PI 和 Bb 分别注入大鼠直肠壁和膀胱壁中,通过直肠和膀胱传入神经吸收后,逆向转运至 DRG 中,因 PI 标记细胞质,在荧光激发下发出桔红色荧光,而 Bb 标记细胞核,在荧光激发下发出蓝色荧光,结果在腰骶部的 DRG 中发现 PI/Bb 双标细胞;对照组 DRG 中未发现双标细胞。这不但证明不存在荧光素局部溢漏、扩散至周围组织或经血液循环标记的问题;而且还证明双标神经元只能是通过该神经元至直肠和膀胱的两个分支,将两种荧光素逆行运至胞体来分别标记细胞质和细胞核,说明本实验是可靠的。提示腰、骶部的 DRG 细胞周围突有分支同时投射到膀胱和直肠,这为探讨便秘导致排尿异常提供了神经解剖学基础。既往的观点认为主要是长期的便秘后大便干燥结块,壅塞肠道,肠腔扩张,造成粪块机械性压迫膀胱后壁和后尿道,使得膀胱容量变小,膀胱移位,膀胱颈抬高和后尿道延长[6],因此排尿时需要更高的膀胱压力以克服尿道阻力,导致膀胱排空受到影响。这种患者的治疗,在改善膀胱功能的同时给予通便药物或者给予生物反馈疗法,其症状往往能够得到迅速改善[7],因此并没有人注意到膀胱与直肠之间的神经联系。本实验证实了膀胱 - 直肠反射的神经解剖学基础,为临床上便秘导致排尿异常的患者给予通便治疗后症状不能够缓解[3]提供了一个合理的解释。

Malykhina 等[8]用右旋糖酐硫酸酯钠诱导大鼠结肠炎 7 ~ 9 d 后,发现肠炎能够显著提高膀胱伤害性传入神经元对辣椒素的敏感性,增强膀胱细胞膜上 Na^+ 电流的峰值电位。Qin 等[9]同时扩张化学性肠炎大鼠的膀胱和直肠时能够在腰骶部脊髓神经元内记录到明显增强的电活动,认为这种内脏之间功能上的相互影响是需要神经参与的。Pinter 等[10]在大鼠实验中观察到逆向刺激腰骶部神经后根可在其支配的相应的盆腔器官和皮肤同时出现神经性的浆液性渗出,认为是通过神经分叉逆向激活来实现的。

本实验通过向直肠和膀胱注入两种不同的荧光素,在 DRG 中找到双标细胞,提示腰、骶部的 DRG 细胞周围突有分支同时投射到直肠和膀胱,即 DRG 中的同一神经元的轴突通过分叉一支投射至直肠,一支投射至膀胱。而初级感觉传入纤维可通过轴突反射和背根反射实现传出功能[10],因此我们认为慢性便秘患者膀胱功能改变引起排尿异常发生的神经机制很可能是腰、骶部 DRG 细胞周围突分支中的"轴突反射"引起的;即来自直肠的兴奋冲动,其中一部分上传至脊髓背根节,再向上传至上位中枢;另一部分在腰、骶部 DRG 细胞周围突的分叉处沿另一分支向外周传递到达膀胱,并在其神经末梢释放某些神经介质,直接引起膀胱功能异常或诱发膀胱自身兴奋冲动的产生,这些冲动再沿局部的感觉神经末梢传向中枢,改变膀胱功能,导致排尿异常。

通过对直肠与膀胱间神经支配联系的实验研究,不仅能够对肠道疾病(如便秘)的并发症有一个更深入的了解,而且能够丰富对膀胱排尿功能异常的病因的认识,为临床上不明原因的排尿功能障碍的患者提供新的治疗方法。但有关便秘引起膀胱功能异常的神经机制仍需进一步研究。

参考文献:

[1] Lembo A, Camilleri M. Chronic Constipation[J]. N Engl J Med, 2003, 349(14): 1360 - 1368.

[2] 王　毅, 龚水根, 张伟国, 等. 女性正常盆底与盆底脱垂性疾病 MRI 初步研究[J]. 第三军医大学学报, 2004, 26(12): 1055 - 1057.

[3] Lucanto C, Bauer S B, Hyman P E, *et al*. Function of hollow viscera in children with constipation and voiding difficulties[J]. Dig Dis Sci, 2000, 45(7): 1274 - 1280.

[4] 景向红, 李瑞午, 晋志高, 等. 大鼠臂旁核向脊髓、孤束核的分支投射——体表内脏相关理论的研究[J]. 针刺研究, 2000, 25(4): 254 - 257.

[5] Malykhina A P, Qin C, Greenwood-van-Meerveld B, *et al*. Hyperexcitability of convergent colon and bladder dorsal root ganglion neurons after colonic inflammation: mechanism for pelvic organ cross-talk[J]. Neurogastroenterol Motil, 2006, 18(10): 936 - 948.

[6] Blethyn A J, Jenkins H R, Roberts R, *et al*. Radiological evidence of constipation in urinary tract infection[J]. Arch Dis Child, 1995, 73(6): 534 - 535.

[7] Robson W L, Leung A K, Van-Howe R. Primary and secondary nocturnal enuresis: similarities in presentation[J]. Pediatrics, 2005, 115(4): 956 - 959.

[8] Malykhina A P, Qin C, Foreman R D, *et al*. Colonic inflammation increases Na^+ currents in bladder sensory neurons[J]. Neuroreport, 2004, 15(17): 2601 - 2605.

[9] Qin C, Malykhina A P, Akbarali H I, *et al*. Cross-organ sensitization of lumbosacral spinal neurons receiving urinary bladder input in rats with inflamed colon[J]. Gastroenterology, 2005, 129(6): 1967 - 1978.

[10] Pinter E, Szolcsanyi J. Plasma extravasation in the skin and pelvic organs evoked by antidromic stimulation of the lumbosacral dorsal roots of the rat[J]. Neuroscience, 1995, 68(2): 603 - 614.

(编辑　邓强庭)

关于计量单位的使用

在医学领域中几乎时时处处都离不开计量单位。国务院于 1984-02-27 公布了《关于在我国统一实行法定计量单位的命令》和《中华人民共和国法定计量单位》。1993-12-27 国家技术监督局发布了《量和单位》国家强制标准,全国必须统一采用计量单位。

我国的法定计量单位包括:①国际单位制的基本单位,如长度(m)、质量(kg)、时间(s)等;②国际单位制的辅助单位;③国际单位制中具有专门名称的导出单位,如频率(Hz)、压力(Pa)、能量(J);④国家选定的非国际单位制单位,如时间(min、h、d)、转速(r/min);⑤由以上单位构成的组合形式单位,如速度(m/s)、浓度(mol/L);⑥由词头和以上单位所构成的倍数和分数单位,如 μm、kPa、ml 等。在医学写作时必须严格执行国务院的命令和有关的国家标准。

各种单位除在无数值的叙述性文字中和科普读物中可使用中文名称或中文符号外,均应使用符号。单位符号都是正体拉丁和希腊字母,无复数形式,符号后不附加圆点(正常语法名字尾标点符号除外)。来源于人名的单位,例如:Pa、Gy、W 等和 10^6 以上的词头,例如:M、G、T 等的首字母大写以外均为小写,容积"升"的符号可用大写(L)也可用小写(l),一般在单独使用不加词头时用大写。数值与单位符号之间、单位符号与相邻的其他符号(例如:化学元素符号)之间应留半个阿伯数字空隙,词头与其所组合的单位符号之间不需空隙。词头不能单独使用,也不能重叠使用(例如:"mμm"应为"nm")。

本刊编辑部