论著

文章编号:1000-5404(2010)03-0274-04

伴有胃肠动力障碍的重症急性胰腺炎大鼠结肠肠肌间神经丛一氧化氮合成酶神经元的变化

刘 颖,林 中,胡琼花,郑清华 (541001 广西壮族自治区 桂林,桂林医学院附属医院消化科)

[摘要] 目的 观察伴有胃肠动力障碍的重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis,SAP)大鼠结肠肠神经系统(enteric nervous system,ENS)肌间神经丛一氧化氮合成酶(nitric oxide synthase,NOS)神经元的变化,以探讨SAP胃肠动力障碍的神经机制。**方法** 20只SD大鼠随机均分为假手术组和SAP组,逆行胰胆管穿刺逆行注射5%牛磺胆酸钠制作SAP模型。检测腹部X线、小肠推进比,胰腺病理评分。制作肌间神经丛全层标本,应用双重免疫荧光染色法观察NOS神经元的形态及占总神经元的百分比。**结果** 与假手术组相比,SAP组大鼠肠管明显扩张,SAP组小肠推进比显著降低($P<0.01$),胰腺病理评分明显增高($P<0.01$),NOS神经元胞体大而染色深,结间束NOS神经纤维粗大,NOS神经元比例为(40.74±5.15)%明显高于假手术组($P<0.01$)。**结论** 结肠肌间丛NOS神经元表达增多可能是大鼠SAP胃肠动力障碍神经机制之一。

[关键词] 重症急性胰腺炎;胃肠动力障碍;肠神经系统;肌间神经丛;一氧化氮合成酶神经元
[中图法分类号] R322.85; R329.24; R576.02 **[文献标志码]** A

Change of nitric oxide synthase neurons in colonic myenteric plexus of rats with severe acute pancreatitis complicated by gastrointestinal dysmotility

Liu Ying, Lin Zhong, Hu Qionghua, Zheng Qinghua (Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Guilin Medical University, Guilin, Guangxi Zhuang Autonomous Region, 541001, China)

[Abstract] Objective To study the nervous mechanism underlying gastrointestinal dysmotility by observing the change of nitric oxide synthase(NOS) neurons in colonic myenteric plexus of the enteric nervous system (ENS) in rats with severe acute pancreatitis (SAP) complicated by gastrointestinal dysmotility. **Methods** Twenty Sprague Dawley rats were randomly divided into sham operation group and SAP group. A SAP model was induced by retrograde cholangiopancreatography-guided injection of 5% sodium taurocholate. Abdominal X-ray findings and small intestinal impelling ratio were detected. Pancreatic lesion was scored. Whole mount samples of myenteric plexus were prepared and stained with double immunofluorescence to observe the morphology of NOS neurons. The percentage of NOS neurons in the total neurons was calculated. **Results** The intestine was much more expanded, the small intestinal impelling ratio was significantly lower ($P<0.01$), the score of pancreatic lesion was remarkably higher ($P<0.01$), the NOS neurons were bigger and more deeply stained, and the nerve fibers between ganglions of the NOS were thicker in SAP group than in sham operation group. The percentage of NOS neurons was (40.74±5.15)% in SAP group, which was significantly higher than that in sham operation group ($P<0.01$). **Conclusion** A high expression level of NOS neurons in colonic myenteric plexus may be one of the nervous mechanisms underlying gastrointestinal dysmotility in SAP rats.

[Key words] severe acute pancreatitis; gastrointestinal dysmotility; enteric nervous system; myenteric plexus; nitric oxide synthase neuron

Corresponding author: Lin Zhong, Tel: 86-773-2823740, E-mail: Lin1955cn@163.com

胃肠动力障碍是重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis,SAP)早期病程中可出现的并发症,主要表现为肠道运动的抑制如肠麻痹或麻痹性肠梗阻等,对SAP的病程有重要影响[1]。目前认为SAP胃肠动力障碍发生与神经递质、胃肠激素、炎症介质、细胞因子、内毒素、血液循环障碍等因素直接作用于平滑肌细胞,或间接地影响支配胃肠运动的神经环路有关,但具体机制尚未明[2]。本实验利用SAP大鼠模型并证实存

[通信作者] 林 中,电话:(0773)2823740,E-mail: Lin1955cn@163.com

在胃肠动力障碍的基础上,采用双重免疫荧光染色技术,观察结肠肠神经系统(enteric nervous system, ENS)肌间神经丛一氧化氮合成酶(nitric oxide synthase, NOS)神经元的重塑,以探讨SAP胃肠动力障碍的神经机制。

1 材料与方法

1.1 实验及仪器

健康成年雄性SD大鼠,SPF级,体质量180~220 g(桂林医学院实验动物中心提供);牛磺胆酸钠(美国Sigma公司),小鼠抗大鼠Hu(HuC/HuD)单克隆抗体(美国invitrogen公司),兔抗大鼠nNOS多克隆抗体、羊抗小鼠FITC抗体、羊抗兔TRITC抗体(北京中山生物技术有限公司),解剖显微镜(Zeiss),荧光显微镜(Olympus)。

1.2 实验方法

1.2.1 分组 大鼠随机分为假手术组($n=10$)和SAP组($n=10$),实验前禁食24 h,自由饮水。参照Aho等[3]方法制备大鼠SAP模型:用25%乌拉坦溶液(4 ml/kg)腹腔注射麻醉后,固定四肢,无菌条件下取腹部正中切口约2cm,显露胰胆管,用4号半头皮针于十二指肠乳头对侧经十二指肠肠壁逆行穿入胰胆管,分别以无损伤动脉夹阻断近肝门处及近十二指肠乳头处胰胆管,将新鲜溶于生理盐水的5%牛磺胆酸钠用微量注射泵恒速注入胰胆管(1 ml/kg、0.1 ml/min),2~3 min后即可见胰腺充血,水肿,胰胆管,扩张保持压力10 min后,松开动脉夹,拔针,分层关腹。假手术组大鼠仅翻动十二指肠及胰腺后关腹.所有实验大鼠术后皮下补液(生理盐水10 ml),苏醒后禁食禁水。

1.2.2 腹部X线检查与小肠推进比测定 24 h后两组大鼠行腹部X线检查,之后灌服1%台盼蓝(1.5 ml/只),30 min后麻醉大鼠,打开腹腔取出全部胃肠道,无张力状态下量取幽门至色素最前端及至盲肠的距离,以两者百分比为小肠推进比。

1.2.3 胰腺病理组织学检查 取大鼠胰腺组织在10%中性缓冲甲醛中固定24 h,常规石蜡包埋,切片,HE染色,显微镜下观察,胰腺组织病理评分参照Spormann等[4]及Schmidt等[5]的评分标准。

1.2.4 NOS阳性神经元的检测 大鼠麻醉后,迅速剖腹取距盲肠2 cm的一段长约1.5 cm的结肠置于冰Kreb液中,沿着肠系膜侧剪开,洗净肠内容物,适当伸展后放入4 ℃ Stefanini液固定24 h,解剖显微镜下用显微镊将浆膜、纵行肌连同肌间神经丛一同剥下,剔除附着的环行肌,充分暴露肌间丛神经节,制成肌间神经丛全层标本(whole-mount)。利用具有高度特异性的神经元抗原Hu蛋白作为神经元标志物显示全部肠神经元[6]。采用双重免疫荧光法对whole-mount进行染色:标本用含0.5% Triton X-100、10%正常山羊封闭血清的PBS 22 ℃孵育30~60 min,为避免互相干扰,两种一抗即小鼠抗大鼠Hu蛋白单克隆抗体(10 μg/ml)、兔抗大鼠nNOS多克隆抗体(1∶100稀释)分开孵育,先后各自在湿合中4 ℃孵育24 h;再先后加入二抗即羊抗小鼠FITC抗体(1∶100稀释)、羊抗兔TRITC抗体(1∶200稀释)22 ℃孵育45 min,每一道程序后均用由PBS洗涤3次,每次10 min。将标本平铺于载玻片上,5%缓冲甘油封片。荧光显微镜下观察各组NOS神经元的胞体大小及染色强弱;每个标本随机选择5个不同视野摄片。计算每200个肠神经元中NOS神经元数目,统计NOS神经元占ENS神经元的百分比,取均值。

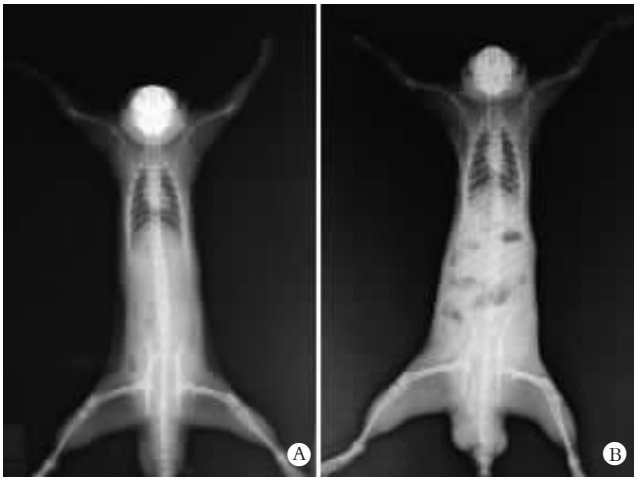
1.3 统计学处理

数据用$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 13.0统计软件行方差齐性检验,各组数据之间的比较采用t检验。

2 结果

2.1 腹部X线检查与小肠推进比测定

腹部X线检查发现SAP组较假手术组大鼠肠管明显扩张(图1),SAP组小肠推进比较假手术组显著降低(表1)。



A:假手术组;B:SAP组

图1 2组大鼠腹部X线表现

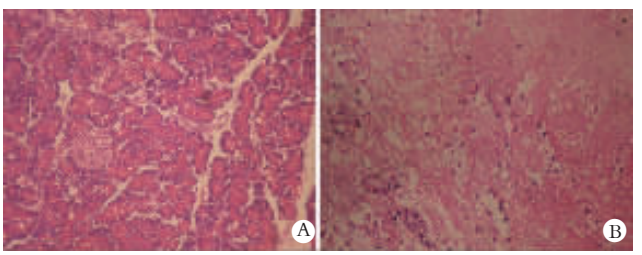
表1 2组大鼠小肠推进比、胰腺病理评分、NOS神经元比例($\bar{x}\pm s$)

组别	n	小肠推进比(%)	胰腺病理评分(分)	NOS神经元比例(%)
假手术组	10	52.48±6.76	3.06±0.16	30.79±7.71
SAP组	10	29.21±3.68[a]	13.37±0.89[a]	40.74±5.15[a]

a: $P<0.01$,与假手术组比较

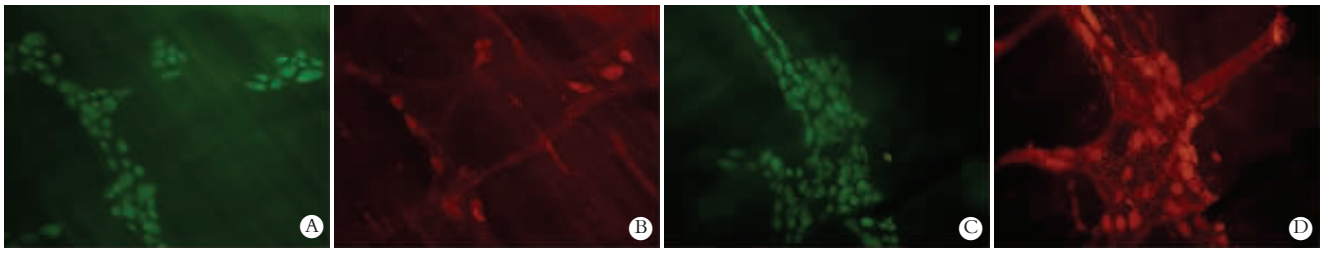
2.2 胰腺肉眼观及病理学改变

SAP组大鼠开腹见淡红色或淡黄色腹水,量多,胃肠扩张明显;胰腺大片出血坏死,呈暗红色,表面及周围腹膜、系膜见皂化斑;假手术组无腹水,腹内器官未见异常改变。光镜下SAP组胰腺小叶间质明显水肿、出血,部分小叶轮廓不清,炎症细胞浸润、腺细胞坏死;假手术组胰腺正常(图2)。胰腺组织病理评分SAP组与假手术组相比有显著差异($P<0.01$)(表1)。



A:假手术组;B:SAP组

图2 2组大鼠胰腺病理学观察 (HE ×200)



A:假手术组肌间丛神经节;B:假手术组肌间丛NOS神经元;C:SAP组肌间丛神经节;D:SAP组肌间丛NOS神经元

图3 大鼠结肠肌间丛双重免疫荧光观察 (×200)

2.3 NOS神经元的变化

结肠whole-mount上神经节多为星形、长带形或不规则形,大小不等,神经节中的每一个神经元胞体都清晰可见,细胞质和细胞核都染为绿色,神经纤维不被染色;NOS神经元的胞体大小不等,形态多样,有卵圆形、梭形或不规则形,细胞质染呈红色,细胞核不着色,神经纤维着色呈"树根状"分布。SAP组大鼠结肠肌间神经丛中NOS神经元胞体大而染色深,节间束的NOS神经纤维粗大,假手术组NOS神经元胞体较小,节间束的NOS神经纤维纤细染色较浅;SAP组NOS神经元比例较假手术组明显增加(表1,图3)。

3 讨论

ENS是消化道具有独立的反射通路的内在神经丛,胃肠平滑肌的舒缩受ENS运动神经元的控制和协调[7]。神经-肌肉支配关系的生理特点决定了抑制性和兴奋性运动神经元或神经递质比例失调可出现胃肠动力紊乱。特定环境中如肠神经元或靶器官任何一方受到损害,或体内内环境发生改变时,肠神经元可重塑与靶器官的关系,主要表现为神经元数目的增减或神经递质的改变既重新获得合成某些递质的功能,或某些神经递质表达上调或下调[8,9]。正是由于神经元具有重塑性这一特点,揭示了诸多胃肠动力障碍性疾病如贲门失弛缓症[10]、先天性巨结肠症[11]的神经源性机制。NOS神经元是ENS重要的抑制性运动神经元,主要分布于肌间丛,人类的结肠亦有NOS神经元分布,其释放的神经递质一氧化氮(nitric oxide,NO)具有多种生物学活性包括介导胃肠道平滑肌松弛[11]。

本实验采用逆行胰胆管穿刺这一经典的方法制作SAP大鼠模型,24 h后通过X线及小肠推进比等检测证实模型存在肠动力减退,采用双重免疫荧光染色观察whole-mount NOS神经元的形态及比例改变,结果显示:SAP组大鼠结肠肌间丛NOS神经元胞体大而染色深,节间束的NOS神经纤维粗大;SAP组NOS神经元比例较假手术组明显增加,说明SAP时NOS神经元活性增强,神经递质NO合成增加,抑制肠道动力增强。Mascolo等[12]曾报道胰腺炎麻痹性肠梗阻时,胆碱能神经元和(或)P物质(SP)阳性神经元CB1受体被激活,导致兴奋性神经递质Ach和(或)SP释放减少;刘殿刚等[13]发现急性胰腺炎腹水组大鼠的空肠肌间丛和黏膜下丛的nNOS阳性产物明显增多,应用NOS抑制剂氮硝基左旋精氨酸可增加空肠运动频率,并可抑制胰腺炎相关腹水对肠管运动和电活动的影响。本研究发现结肠肌间丛NOS神经元的比例紊乱、抑制性与兴奋性神经递质失衡等重塑性改变为阐明SAP肠动力障碍时神经机制提供新的证据。

近年来的研究发现,ENS的感觉神经元介导的神经源性炎症[14]以及ENS与胃肠激素、免疫系统构成局部网络在SAP胃肠动力的发生上起着重要的作用[15,16],但ENS的运动神经元是将中间神经元环路的控制信息传输至肌肉的终极通路,目前已有将ENS运动神经元作为某些胃肠动力疾病防治的靶点,如用量为0.15~0.3 μg/kg的Cerulein能激活肠神经元上的CCK受体,引起兴奋性神经递质Ach、SP的释放从而用来治疗危重病人的肠动力减退[17];某些中药如大黄可使结肠肌间丛AchE阳性神经细胞数目减少,NOS免疫反应性增强,在临床治疗顽固性便秘时应避免长期应用[18]。调控ENS运动神经元相关神经递质基因表达可成为临床防治SAP胃肠衰竭新的方向。

参考文献:

[1] Sawa H, Ueda T, Takeyama Y, *et al*. Treatment outcome of selective digestive decontamination and enteral nutrition in patients with severe acute pancreatitis[J]. J Hepatobiliary Pancreat Surg, 2007, 14(5): 503-508.

[2] Seerden T C, De-Man J G, Holzer P, *et al*. Experimental pancreatitis disturbs gastrointestinal and colonic motility in mice: effect of the prokinetic agent tegaserod[J]. Neurogastroenterol Motil, 2007, 19(10): 856-864.

[3] Aho H J, Koskensalo S M, Nevalainen T J. Experimental pancreatitis in the rat. Sodium taurocholate-induced acute haemorrhagic pancreatitis [J]. Scand J Gastroenterol, 1980, 15(4): 411-416.

[4] Spormann H, Sokolowski A, Letko G. Effect of temporary ischemia upon development and histological patterns of acute pancreatitis in the rat [J]. Pathol Res Pract, 1989, 184(5): 507-513.

[5] Schmidt J, Rattner D W, Lewandrowski K, *et al*. A better model of acute pancreatitis for evaluating therapy[J]. Ann Surg, 1992, 215(1): 44-56.

[6] 林中, 胡宏镇, Wood J D. Hu蛋白作为豚鼠小肠肌间丛神经元标

志物的研究[J]. 基础医学与临床, 2002, 22(3): 257-260.
[7] Hansen M B. The enteric nervous system II: gastrointestinal functions [J]. Pharmacol Toxicol, 2003, 92(6): 249-257.
[8] Lin Z, Sandgren K, Ekblad E. Increased expression of nitric oxide synthase in cultured neurons from adult rat colonic submucous ganglia [J]. Auton Neurosci, 2004, 114(1-2): 29-38.
[9] 林中, 张剑波, 赵永忠, 等. 小肠肌间神经丛神经元体外培养抑制肠平滑肌细胞的增殖[J]. 世界华人消化杂志, 2008, 16(14): 1577-1580.
[10] Bruley-des-Varannes S, Chevalier J, Pimont S, *et al*. Serum from achalasia patients alters neurochemical coding in the myenteric plexus and nitric oxide mediated motor response in normal human fundus [J]. Gut, 2006, 55(3): 319-326.
[11] Toda N, Herman A G. Gastrointestinal function regulation by nitrergic efferent nerves[J]. Pharmacol Rev, 2005, 57(3): 315-338.
[12] Mascolo N, Izzo A A, Ligresti A, *et al*. The endocannabinoid system and the molecular basis of paralytic ileus in mice[J]. FASEB J, 2002, 16(14): 1973-1975.
[13] 刘殿刚, 孙家邦, 张淑文, 等. 胰腺炎相关腹水对空肠运动和肠组织含nNOS神经的影响[J]. 首都医科大学学报, 2005, 26(4): 482-485.
[14] Noble M D, Romac J, Wang Y, *et al*. Local disruption of the celiac ganglion inhibits substance P release and ameliorates caerulein-induced pancreatitis in rats[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2006, 291(1): G128-G134.
[15] Vona-Davis L C, McFadden D W. NPY family of hormones: clinical relevance and potential use in gastrointestinal disease[J]. Curr Top Med Chem, 2007, 7(17): 1710-1720.
[16] Wang X, Gong Z, Wu K, *et al*. Gastrointestinal dysmotility in patients with acute pancreatitis[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2003, 18(1): 57-62.
[17] Fruhwald S, Holzer P, Metzler H. Intestinal motility disturbances in intensive care patients pathogenesis and clinical impact[J]. Intensive Care Med, 2007, 33(1): 36-44.
[18] 童卫东, 张胜本, 刘宝华, 等. 大黄对大鼠结肠动力及肠神经系统的影响[J]. 世界华人消化杂志, 2003, 11(5): 665-667.

(**收稿**:2009-07-13;**修回**:2009-09-01)
(编辑 龙 亮)

文章编号:1000-5404(2010)03-0277-01

个案与短篇

闭合穿针复位改良 Ishiguro 法治疗骨性锤状指

张艳茂,李国华,曹 磊,王立新,于占勇,刘志旺,侯金玲,王 岩,王国强,吴学强 (063000 河北 唐山,唐山市第二医院手外科)

[关键词] 骨关节病,继发肥大性;骨折固定术,内;改良 Ishiguro 法
[中图法分类号] R684.105 **[文献标志码]** B

外伤致手指末节指骨基底背侧骨折锤状指畸形在手外科比较常见,临床表现为手指远指间关节屈曲,不能伸指的一种畸形,X线片见末节指骨基底背侧撕脱骨块向近背侧移位。锤状指骨折较早见于 Smillie(1937)报道。Webbe[1]在其报道的160例锤状指中骨性锤状指占44例。因其影响外观及功能,常需手术治疗。2004年5月至2009年5月我科采用闭合复位穿针改良 Ishiguro 法治疗骨性锤状指患者43例,取得了较好效果,现报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

本组共43例,男性37例,女性6例;年龄15~66岁,平均37岁。均系指伸肌腱Ⅰ区撕脱骨折。左手16例,右手27例。伤指:示指7例,中指12例,环指19例,小指5例。受伤原因:43例均为闭合性损伤;其中戳伤27例,掰伤9例,绞伤7例。受伤至手术时间1 h至12 d,平均6 d。按 Wehbe 法:Ⅰ型:骨折无脱位;Ⅱ型:骨折并半脱位;Ⅲ型:干骨后端损伤。各型又分成3个亚型:a:骨片小于关节面1/3;b:骨片为关节面1/3~2/3;c:骨片大于关节面2/3。本组以Ⅱ型多见,Ⅰa型1例,Ⅰb型8例,Ⅱa型18例,Ⅱb型13例,Ⅲb型3例。

1.2 手术方法

指根神经阻滞麻醉下,自指端顺向纵形钻入1.0 mm克氏针1枚将远指间关节过伸5~10°位固定,将另一枚1.0 mm克氏针在远指间关节背侧中节指骨头处由远背侧斜向掌近端与中节指骨背侧骨面呈35~45°角钻入至对侧骨皮质将2枚克氏针尾用血管钳加紧靠拢,拍手指正侧位片,观察骨折复位及固定情况,若骨折复位固定满意,则在指端远侧将斜向穿针折弯成90°,针端制成钩状与纵向穿针挂钩锁牢固;否则需再次操作。术后前臂石膏托功能位固定。6周后拍片见骨折愈合,去除克氏针,先行主动练习1周,然后开始被动功能练习,逐渐加大力度为疼痛能够耐受,练习程度以伤指轻度肿胀,第2天肿胀基本消退,不影响练习为原则。

2 结果

术后口服抗炎治疗1周。针道无感染、克氏针无松动、皮缘及甲床无压迫坏死,甲板无畸形。随访5~30个月,平均17.5个月。X线片显示43指解剖复位,骨折愈合良好,关节间隙正常。根据 TAM 评定标准评定疗效,即以伤指 MP、PIP、DIP 关节活动度的总和与健侧比较;优:正常,良:TAM > 健侧的75%,中:TAM > 健侧的50%,差:TAM < 健侧的50%,劣:TAM 比术前差。本组 TAM 达200°~260°,优26例,良14例,中3例,优良率达93%。

(下转281页)

[通信作者] 张艳茂,E-mail: ssmys@163.com