维普资讯 http://www.cqvip.com

·论 著·

食管内脏高敏感性动物模型的建立和评价

杨 敏[1],陈东风[1],房殿春[2] (第三军医大学附属:1. 大坪医院野战外科研究所消化内科,重庆 400042;2. 西南医院消化内科,重庆 400038)

[摘 要] **目的** 建立食管内脏高敏感性动物模型。**方法** 采用腹腔注射鸡卵清蛋白(OVA)基础致敏联合食管酸灌注的方法处理SD大鼠,并采用免疫组织化学方法和显微图像分析技术评价内脏高敏感性-食管化学刺激大鼠模型的可靠性。**结果** OVA基础致敏联合食管酸灌注组大鼠被激活了一个复杂而广泛的大脑网络,其在额顶皮质、岛叶、扣带皮质、中央杏仁核、Kölliker-Fuse核、疑核、臂旁核、下丘脑室旁核、丘脑室旁核、三叉旁核、孤束核、最后区、延髓网状核等Fos样免疫活性(FLI)神经元的数目均显著高于其余各组($P<0.05$)。模型组大鼠在中央杏仁核、臂旁核、室旁核、三叉旁核、孤束核的FLI阳性产物的平均光密度(OD)值亦较其余各组明显增高($P<0.05$)。**结论** 预先腹腔注射鸡卵清蛋白基础致敏联合食管酸灌注可成功建立食管内脏高敏感性动物模型。

[关键词] 内脏高敏感性;c-fos;免疫组织化学;食管酸灌注;卵清蛋白
[中图分类号] R571;R338;R-332 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2008)02-0077-03

Establish and evaluation of the rat model of esophageal visceral hypersensitivity

YANG Min, CHEN Dong-feng, FANG Dian-chun (Department of Gastroenterology, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To establish a reliable rat model of esophageal visceral hypersensitivity. **Methods** Healthy Sprague-Dawley (SD) rats received basal ovalbumin-sensitized combined with intra-esophageal mucosal acid exposure. The neuronal expressions of c-fos proto-oncogene were detected with immunohistochemical counter-staining and computerized color image analyzer. **Results** The basic ovalbumin-sensitized plus esophageal acid perfusion in model group initiated a high density expression of c-fos-immunoreactive (Fos-IR) neurons in multineuronal networks. A significantly higher number of Fos positive neurons was found in the model group than those in the corresponding regions of other groups ($P<0.05$) in the following brain areas: frontal and parietal cortex, insular cortex, cingulated cortex, central amygdaloid nucleus, the Kölliker-Fuse nucleus, the nucleus ambiguus, parabrachial nucleus, hypothalamic paraventricular nucleus, paraventricular thalamic nucleus, paratrigeminal nucleus, the nucleus of solitary tract, area postrema, reticular nucleus of medulla, The OD values of Fos-IR neurons were also increased in the central amygdala , parabrachial nucleus, paraventricular nucleus, the paratrigeminal nucleus and NTS in the model group than that in the corresponding regions of other groups ($P<0.05$). **Conclusion** The reliable rat model of esophageal visceral hypersensitivity has been established.

Keywords: visceral hypersensitivity; c-fos; immunohistochemistry; esophageal acid perfusion; ovalbumin

慢性食管内脏高敏感性可能是某一亚类的非糜烂性反流病(NERD)发生的最重要病理生理特征,是这类患者症状产生的基础和症状多样化的原因[1-2]。目前,尚不清楚中枢神经系统(CNS)中哪些核团及环路参与了食管内脏高敏感性的应答和调节,亦不明了在内脏高敏感状态下哪些结构对食管化学刺激反应敏锐,且在人体开展CNS内形态学-功能的定位研究非常困难。因此,采用有效的动物模型来研究内脏敏感性改变的中枢敏化机制有着十分重要的意义。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

成年健康SD大鼠29只,雌雄不限,体质量225~285 g,由本校实验动物中心提供。将SD大鼠随机分为4组,A组:空白对照组6只;B组:食管酸灌注组8只;C组:OVA致敏组7只;D组:OVA及食管酸灌注组8只。

1.2 方法

1.2.1 食管酸灌注的方法 在实验的第14天,对C组、D组动物进行食管酸灌注。麻醉动物平卧位固定,头部抬高20°~30°,切开腹壁和胃壁,将一引流管放置在贲门处以收集从食

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30700362)
[作者简介] 杨 敏(1974-),女,重庆市人,讲师,主治医生,博士,主要从事胃肠动力与内脏高敏感性的研究。电话:(023)68757740,E-mail: cocomai22222a@yahoo.com.cn
[收稿日期] 2007-12-08 [修回日期] 2008-01-15

维普资讯 http://www.cqvip.com

管滴注的液体。把一单腔灌流管经口放置于食管内,导管开口位于食管和胃交界处上2~3 cm,固定导管,另一端与持续灌注泵相连。使用0.1 mol/L盐酸滴注,滴注液温度保持37 ℃,速度10 mL/h,共50 min。

1.2.2 脑组织切片的制备 食管酸灌注后30 min深度麻醉动物后立即开胸,经左心室至升主动脉插管并加压灌注200 mL生理盐水冲洗全身血液,随后用预冷的4 ℃含4%多聚甲醛的0.1 mol/L磷酸盐缓冲液(PB,pH7.4)500 mL加压灌注固定1 h。然后取脊髓和全脑组织置于相同固定液中,在4 ℃条件下固定18~20 h,再移至含20%蔗糖的0.1 mol/L PB溶液中浸泡过夜至下沉(4 ℃)。用恒冷箱冰冻切片机-20 ℃行连续冠状切片,片厚40 μm,隔5取2,切片贴于经APES处理的载玻片上备用。

1.2.3 Fos表达的免疫组织化学染色 用含0.01 mol/L正常小牛血清、0.5% Triton X的PBS液室温下孵育2 h;滴加兔多克隆抗c-fos抗体稀释液(1∶2 000,Oncogen公司),4 ℃孵育48 h;滴加二抗,SuperPicTure即用型二步法检测试剂盒(由上海蓝创生物公司提供)在37 ℃孵育10~15 min;DAB/H_2O_2法呈色;最后进行常规脱水、透明、中性树胶封片、光镜观察。

1.2.4 Fos阳性细胞计数方法 用日本Olympus BX-50光学显微镜观察,然后用江苏捷达科技提供的显微图像分析系统处理并计算出各脑区及神经核团内Fos蛋白阳性细胞数量的总和。

1.2.5 数据处理 应用SPSS11.0统计软件,采用方差分析比较各组间数值差异显著性,$P<0.05$有显著性差异。

2 结果

各组CNS内FLI神经元计数,从表1可看出:①B组大鼠的中央杏仁核、KF核群、下丘脑室旁核、下丘脑视上核、丘脑室旁核、臂旁核、疑核、三叉旁核、孤束核中央亚核和最后区等核团阳性细胞数量与对照组相比较有统计学意义(见表1,$P<0.05$),而额顶叶皮质则仅有少数FLI颗粒。②C组在额叶皮质Ⅰ、Ⅱ区、扣带回皮质Ⅰ、Ⅱ区,及中央杏仁核、下丘脑室旁核、中脑导水管周围灰质、中尾段延髓的孤束核内侧亚核背侧和最后区内有中等密度的Fos阳性神经元表达,且与空白对照组相比有统计学意义。③D组大鼠额顶叶皮质(图1)、岛叶、扣带回、中央杏仁核、KF核群、疑核、臂旁核、下丘脑室旁核、丘脑室旁核、三叉旁核、孤束核、最后区、延髓网状核等核团(图2)FLI神经元的数目较单纯的食管酸灌注组和OVA致敏组显著增加($P<0.05$)。

表1 四组大鼠不同脑区和核团Fos阳性神经元的数量比较($\bar{x}\pm s$, n)

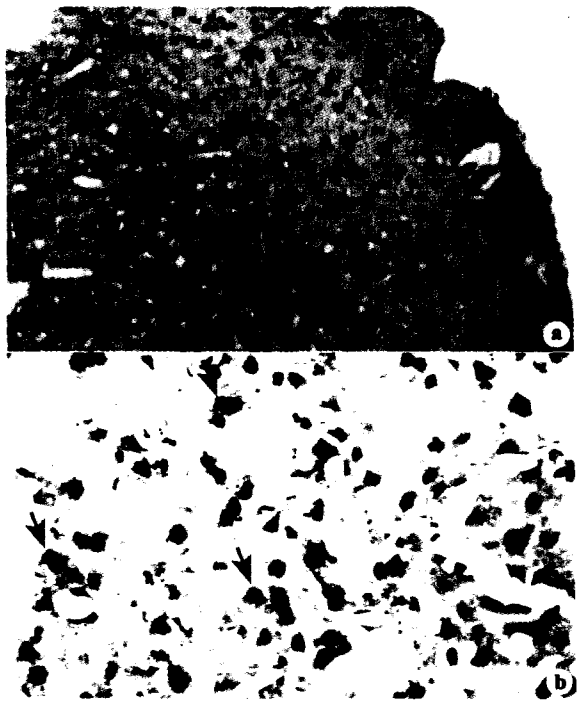
部 位	Fos阳性细胞数			
	A组	B组	C组	D组
顶额皮质(PFC)	0±0	6.2±1.3*	14.0±1.2*	60.3±6.4*#△
岛叶(Ins)	0±0	35.4±6.3*	5.1±0.9*	88.9±15.0*#△
扣带回(ACC)	1.5±0.9	110.3±16.3*	46.4±13.1	172.7±45.7*#△
中央杏仁核(CeC)	4.2±1.0	101.7±11.9*	16.2±7.2*	160.7±18.2*#△
Kolliker Fuse(KF)核群	0±0	11.1±4.1*	0.9±0.3	17.3±4.4*#△
臂旁核(PBN)	1.9±0.5	101.40±14.2*	1.0±2.4	180.8±12.5*#△
疑核(NA)	0±0	7.6±2.3*	1.8±0.4*	14.3±2.9*#△
室旁核(PVN)	2.3±1.1	141.6±19.8*	48.4±14.5	217.8±15.2*#△
视上核(SON)	0±0	73.2±17.7*	65.4±13.6	75.7±11.6*
三叉旁核(PTN)	0±0	61.6±19.2*	0±0	99.2±8.8*#△
中脑导水管周围灰质(PAG)	1.4±1.2	42.3±4.3*	24.0±3.4*	45.9±2.2*
孤束核(NTS)	29.3±3.3	89.3±17.3*	63.9±2.7*	198.4±21.1*#△
最后区(AP)	45.2±3.0	98.5±34.2*	70.1±8.2*	134.1±9.2*#△
迷走神经背核(DMN)	0±0	8.0±1.1*	1.1±0.2*	8.4±1.8△
延髓网状核(VLM)	0.8±0.2	57.4±9.0*	25.3±7.3	88.7±12.3*#△
腹外侧眶皮层	0±0	13.0±2.6*	2.9±3.5*	13.6±3.3*△

*:与A组比较,$P<0.05$;#:与A组比较,$P<0.05$;△:B组和C组比较,$P<0.01$

3 讨论

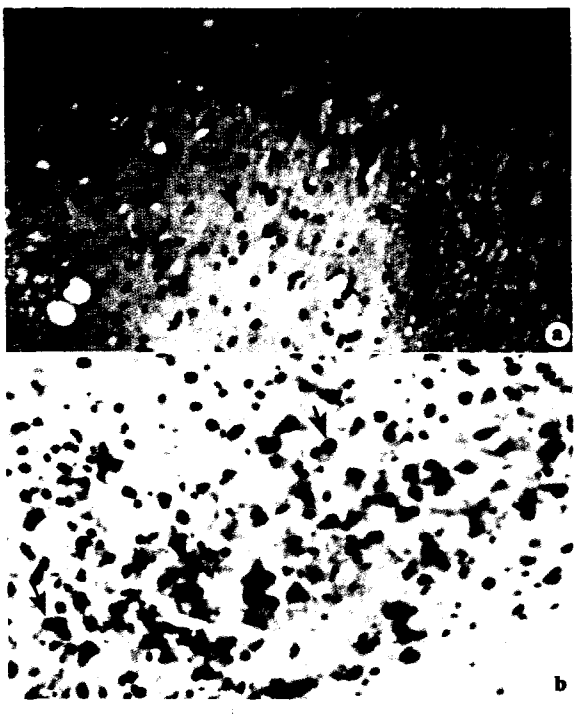
本研究采用预先腹腔注射卵清蛋白基础致敏后再进行食管酸灌注的方法来制备食管内脏高敏感性大鼠模型,并采用免疫组织化学方法评估模型可靠性。c-fos原癌基因及其编码的相关蛋白可作为研究神经传导通路或脑的功能活动的一个有意义的标志物,亦可作为中枢神经对伤害性刺激反应的疼痛标志物,可用来判断、追踪伤害性刺激信号的传导通路,其表达部位常常是与伤害性信息传递、中继或整合有关的区域。c-fos还可以作为第三信使接受细胞外刺激的短程信息,

维普资讯 http://www.cqvip.com



a:×40; b:×200; →:棕褐色颗粒为核染色阳性细胞

图1 OVA致敏联合食管酸灌注大鼠前额叶皮质Fos表达



a:×40; b:×100; →:棕褐色颗粒为核染色阳性细胞

图2 OVA致敏联合食管酸灌注大鼠在延髓内脏带内有Fos密集分布

进而导致细胞功能变化,因而c-fos在神经系统可塑性方面扮演着重要的角色[3-4]。近年来在神经系统形态定位和功能活动相结合的研究中得到了广泛应用,已在内脏痛觉过敏的神经机制的研究中得到应用[5-7]。Fos蛋白形态学显示方法的建立也为研究感觉刺激信息的传导通路提供了一个快捷、敏感和方便的研究手段。虽然结果是通过形态学方法显示,但在某种程度上反映了一定的功能意义,是一种形态学和功能学相结合的指标。

作者发现,预先腹腔注射卵清蛋白基础致敏后再进行食管酸灌注激活了一个复杂而广泛的大脑网络,CNS内从皮质至延髓有广泛的Fos蛋白表达,且在多个部位Fos阳性细胞数目比单纯的食管酸灌注组或卵清蛋白致敏组明显增多并集中分布,且所激活的脑区更多,多数为深染。这表明卵清蛋白基础致敏对食管酸灌注诱发的CNS内Fos表达有活化作用,增加了多个脑区的FLI神经元细胞数和增强c-fos基因表达的强度。此项结果表明慢性的内脏高敏感状态可能易化了某种痛觉传递过程并促进了食管内脏的痛觉过敏形成,并由此导致CNS疼痛"标志物"Fos蛋白表达的增强,也提示采用腹腔注射鸡卵清蛋白致敏联合食管酸灌注来制备内脏高敏感性大鼠模型是可行和成功的。

[参考文献]

[1] Hong SJ,Ko BM,Jung IS,et al. Relevance of ineffective esophageal motility and hyperactive acid sensitization in patients with gastroesophageal reflux[J]. J Gastroenterol Hepatol,2007,22(10):1662-1665.

[2] Ringel Y. New directions in brain imaging research in functional gastrointestinal disorders[J]. Dig Dis,2006,24(3-4):278-285.

[3] Song GH,Venkatraman V,Ho KY,et al. Cortical effects of anticipation and endogenous modulation of visceral pain assessed by functional brain MRI in irritable bowel syndrome patients and healthy controls[J]. Pain,2006,126(1-3):79-90.

[4] Hobson AR,Furlong PL,Worthen SF,et al. Real-time imaging of human cortical activity evoked by painful esophageal stimulation[J]. Gastroenterology,2005,128(3):610-619.

[5] Sabbatini M,Molinari C,Grossini E,et al. The pattern of c-Fos immunoreactivity in the hindbrain of the rat following stomach distension[J]. Exp Brain Res,2004,157(3):315-323.

[6] Shuai XW, Xie PY. Expression and localization of c-Fos and NOS in the central nerve system following esophageal acid stimulation in rats[J]. World J Gastroenterol,2004,10(15):2287-2291.

[7] Sabbatini M,Molinari C,Grossini E,et al. The pattern of c-Fos immunoreactivity in the hindbrain of the rat following stomach distension[J]. Exp Brain Res,2004,157(3):315-323.

(编辑:郭光金)