维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253 - 3626(2005)04 - 0594 - 04

实验性巨结肠大鼠模型的建立及其生物学特性

徐纪荣[1],金先庆[1],陈小章[2]

(1.重庆医科大学附属儿童医院外科,重庆 400014;2.香港中文大学上皮细胞生物学研究中心,香港 沙田)

【摘 要】目的:建立一种适合骨髓间充质干细胞移植的实验性巨结肠大鼠模型并观察其生物学特性。方法:8~9 周龄 SD 大鼠 90 只,随机分为两组。氯胺酮麻醉下开腹,实验组用 0.1% 苯扎氯铵(BAC)处理大鼠降结肠浆膜 40min,温盐水冲洗后关腹,对照组用生理盐水代替 BAC。分别于术后 1、2、3、4、8 周进行大体观察、钡灌肠,结肠测压、取处理段结肠行病理学检查,循环水浴药理学测定平滑肌收缩功能变化,RT - PCR 检测 AchE、nestin、Chrm3 的表达。结果:BAC 处理后 1 周,实验组大鼠出现腹胀,处理段结肠狭窄,反射性收缩消失,对乙酰胆碱敏感性增强,近端结肠扩张有大便堆积,且随着时间延长症状加重。病理学检查发现 BAC 处理后 1 周结肠神经节细胞明显减少、空泡变,3 周后完全消失。结论:采用 0.1% BAC 处理降结肠浆膜成功建立了实验性巨结肠模型,此模型与先天性巨结肠动物模型相似,为进一步结肠内骨髓间充质干细胞移植移植分化为神经细胞的研究奠定了基础。

【关键词】无神经节细胞症;动物模型;苯扎氯铵;大鼠

【中国图书分类法分类号】R656.9 【文献标识码】A 【收稿日期】2004 - 06 - 25

Establishment of experimental aganglionosis model and observation of its biological features in rat

XU Jirong, et al

(*Department of General Surgery, the Children's Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To establish a rat model of experimental aganglionosis for MSCs transplantation, and to observe its biological features in rat. *Methods*: Ninety Sprague Dawley rats, 8~9 weeks old, were randomly divided into two groups: treatment group(n = 45) and control group(n = 45). All animals were operated upon under Ketamine anesthesia. In treatment group, 0.1% benzalkonium chloride (BAC) was applied onto the serosa for 40 minutes, and then the colon was washed well with 0.9% normal saline. For the control group, 0.9% saline was applied using the same method in treatment group. Macroscopic and microscopic observations, contrast roentgenogrphy of colon, colon manometry, pharmacologic examinations for contraction of colonic smooth muscle and the expression of AchE, nestin, Chrm3 by RT - PCR were performed at an interval of 1week, 2weeks, 3weeks, 4weeks and 8weeks after operation. *Results*: 1 week after BAC treatment, the rats had abdominal distention. Roentgenographic examination and autopsy revealed a narrowed segment accompanied by distended proximal colon filled with massive feces, and the longer the duration after treatment, the more serious the distention. Manometry showed the abolition of reflex contraction in colonic smooth muscle, and pharmacologic examinations indicated supersensitivity to acetylcholine. Histologic examinations revealed transparent reduction and vacuolation of ganglion cells 1 week after BAC treatment with complete disappearence of 3 weeks after BAC treatment. *Conclusion*: The animal model for experimental aganglionosis is successfully established by applying 0.1% BAC onto the serosa of descending colon, which provides an experimental basis for the future MSCs transplantation and differentiation into neuronal cells in rat colon.

【Key words】Aganglionosis; Animal model; Benzalkonium chloride; Rat

先天性巨结肠症是严重影响儿童健康的先天性疾病,是小儿外科常见病,发病率高达 1/2000~1/5000。该病的发生是由于多种原因引起结肠壁肌间神经节细胞缺如,目前治疗方法主要是手术切除病变肠段,但各种手术均有相应的缺陷和并发症[1]。骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)可在体内体外诱导分化为神经细胞,并且

作者介绍:徐纪荣(1967-),男,主治医师,博士,主要研究方向:干细胞的定向分化与应用,先天性巨结肠治疗。

基金项目:国家自然科学基金项目(NO.30100198),香港创新科技基金(2001 - 2004)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

MSCs 移植在替代、改善并修复受损神经系统功能方面的研究,近年来取得了巨大的进展。能否通过 MSCs 移植分化为神经细胞并修复先天性巨结肠症病变肠段的异常神经支配,从而治疗先天性巨结肠症?这是一个值得探索的课题。因此,首先需要建立一种适合于 MSCs 移植的巨结肠模型,这种模型结肠内有诱导 MSCs 向神经细胞分化的微环境。

1 材料与方法

1.1 实验试剂及仪器

50% 苯扎氯铵购自 Sigma(Fluka, Switzerland),纸纱布(Kimberly－Clark, Canada),单克隆小鼠抗鼠 nestin IgG 抗体(BD, USA),单克隆小鼠抗鼠 NF IgG 抗体(Zymed, Canada),压力传感仪、记录仪(ADI Instruments, Australia)。

1.2 实验动物

成年雌性 SD 大鼠 90 只,8～9 周龄,由香港中文大学实验动物中心提供。随机分为 2 组,实验组(n = 45)用 0.1% BAC 处理结肠 40min,对照组(n = 45)用生理盐水代替 BAC。

1.3 实验性巨结肠模型建立

术前大鼠禁食 24h,自由进水,排空粪便。氯胺酮麻醉下开腹,1.5 降结肠用纸纱布围住,每隔 5min 在纸纱布上滴 0.1% 苯扎氯铵 20μl,保持纸纱布湿润,40min 后移去纸纱布,温生理盐水冲洗结肠和腹腔,关腹。

1.4 巨结肠模型的鉴定

分别于术后 1、2、3、4、8 周进行鉴定。

大体观察:观察大鼠排便、腹胀,处死 4 只动物观察处理段及近端结肠的变化。

钡灌肠:每组随机取 2 只动物,氯胺酮麻醉下,经肛门注入 30% 硫酸钡混悬溶液 5ml,摄 X 片。病理学检查:每组随机取 2 只动物,取 BAC 处理段结肠,4% 多聚甲醛固定,石蜡包埋切片 6μm 厚,行 Nissle 染色。

免疫组织化学检测 NF、nestin 的表达:标本取材同病理学检查,SP 法 DAB 染色,阳性为位于肌间神经节细胞胞浆中出现棕黄色颗粒。

结肠测压:每组随机取 1 只动物,氯胺酮麻醉下开腹,经肛门置血流监测心导管气囊于处理段结肠腔内,连接压力传感仪;置另一根血流监测心导管气囊于处理段结肠近端 5cm 做为刺激气囊。记录气囊内注入 0.05ml 生理盐水,刺激气囊内快速注入 0.5ml 空气,记录结肠压力的变化。

结肠循环水浴药理学检测平滑肌收缩变化:每组随机取 1 只动物,取 BAC 处理段结肠中部约 0.3cm 结肠环,置于 37℃ 预先通入体积分数为 95% 氧和 5% 的二氧化碳混合气体 K－HS 液的浴槽中。将结肠环连于张力换能器,预置前张力负荷为 1g,调节张力直到无明显下降,稳定 1h 后开始实验。先加入 40μM 的氯化钾,然后洗去氯化钾,再按顺序加入 1、3、10、30、100、300μM 乙酰胆碱,收缩曲线通过 Powderlab/400 ADI Instruments 压力记录仪记录。

1.5 RT－PCR 检测 AchE、nestin、Chrm3 的表达

分别于术后 1、2、3、4、8 周每组随机处死 2 只动物,取 BAC 处理段结肠,冲洗粪便及血液,放入冻存管,置液氮中快速冷冻,－80℃ 冰箱保存。提取 RNA 参照文献进行。反应条件:变性 94℃ 45s,退火 58℃ 60s,延伸 72℃ 60s,30 次循环。引物序列如下:

磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH):

Forward:5'－GACCACAGTCCATGCCATCACTGC－3'

Reverse:5'－GCTGTTGAAGTCGCAGGAGACAAC－3'

乙酰胆碱 M3 受体(Chrm3):

Forward:5'－ACTCTGCTTCCTCCGATG－3'

Reverse:5'－TAGCACACAGGGTTCACG－3'

巢蛋白(nestin):

Forward:5'－GGAATGAGCAGATGGCAG－3'

Reverse:5'－CCCACCGCTGTTGATTTC－3'

乙酰胆碱酯酶(AchE):

Forward:5'－GACTGCCTTTATCTTAATGTG－3'

Reverse:5'－CGGCTGATGAGAGATTCATTG－3'

2 结 果

2.1 大体观察

对照组大鼠各时间点未发现腹胀、腹泻、便秘、消瘦、穿孔、死亡。实验组大鼠于 BAC 处理后 1 周出现便秘及腹胀,解剖发现处理段狭窄,近端有大便堆积;4～8 周部分大鼠出现严重腹胀、肠梗阻、停止排便、污粪、消瘦、精神萎靡,有 1 例穿孔,严重腹胀梗阻的动物一般 1 周内死亡。

2.2 钡灌肠

与大体观察相一致,对照组大鼠各时间点钡灌肠 X 线片未见异常。BAC 处理后 1 周,钡灌肠显示降结肠狭窄,近端扩张,4～8 周部分大鼠狭窄段近端扩张明显,有粪便完全堵塞肠腔,钡剂不易通过。

2.3 组织学检查

对照组大鼠各时间点处理段结肠神经节细胞未见损伤,平滑肌及粘膜无损伤。实验组 1 周后处理段结肠神经节细胞明显减少、空泡变,3 周后神经节细胞完全消失,粘膜上皮及平滑肌未见损伤,粘膜、平滑肌较对照组增厚。图 1。

2.4 免疫组织化学

各时间点 NF 免疫组化染色实验组阴性,对照

维普资讯 http://www.cqvip.com

组阳性，Nestin 免疫组化染色两组均为阴性(图 2)，提示实验组神经节细胞受损消失。

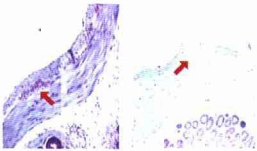


图 1 结肠神经节细胞对照组正常，实验组消失 4 周 Nissle×100

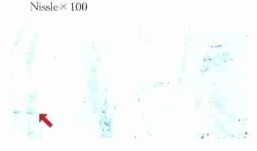


图 2 结肠神经节细胞 NF 对照组阳性，实验组阴性 4 周 SP×100

2.5 结肠测压

对照组大鼠各时间点处理段结肠在近端气囊快速充气扩张时出现反射性收缩，而实验组 1 周后处理段结肠反射性收缩消失(图 3)，表明 BAC 处理段结肠失去神经反射的调节。

2.6 结肠水浴药理学检测

实验组大鼠结肠加入 1μmol/L 乙酰胆碱引起的收缩比(乙酰胆碱引起的收缩张力/氯化钾引起的收缩张力)较对照组高(图 4)，说明去神经的处理段结肠对乙酰胆碱敏感性增强。

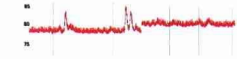


图 3 对照组、实验组结肠压力变化(1 周)

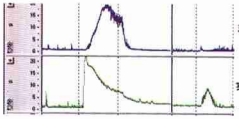


图 4 乙酰胆碱引起的结肠收缩反应(4 周)

2.7 AchE、nestin、Chrm3 的表达

与对照组相比较，AchE 表达下调，表明神经细胞受损后乙酰胆碱酯酶合成减少；M_3 受体表达下调，M_3 受体数量可能下降，与循环水浴结果不相符，可能与蛋白质表达水平不一致；nestin 表达上调，与神经受损后神经细胞的再生有关(图 5)。

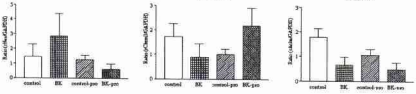


图 5 Nestin、Chm3 和 AchE 基因的表达(8 周){control：对照组，BK：实验组，pro：处理段近端结肠}

3 讨 论

花斑鼠和致死性斑点突变小鼠模型及基因突变鼠模型与先天性巨结肠症患儿病理改变非常相似，远端结肠、直肠神经节细胞缺如，但是模型鼠培育困难，早期常死于严重的小肠结肠炎[2]，模型动物出生后结肠的微环境并不适合于细胞的移植和诱导分化。目前，在中枢神经系统和外周神经系统进行 MSCs 移植分化为神经细胞的研究多用后天实验造成的神经损伤动物模型，这种动物模型可提供 MSCs 分化的适宜微环境，将 MSCs 通过直接或间接途径植入受损神经细胞部位，在损伤部位提供的自由解剖龛位，以及损伤部位神经细胞产生的多种细胞因子微环境下，诱导 MSCs 向神经细胞方向分化[3]。因此，我们选择利用苯扎氯铵(Benzalkonium Chloride，BAC)制作实验性巨结肠模型进行 MSCs 移植的研究，该动物模型神经节细胞死亡及神经再生过程中释放的细胞因子适于 MSCs 分化为神经细胞。利用阳离子表面活性剂 BAC 处理结肠浆膜面，选择性地损伤肌间神经丛而不损伤平滑肌和粘膜上皮，术后处理段结肠狭窄，近端扩张，造成实验性巨结肠动物模型[4,5]。该模型制作容易，动物存活时间长，有利于观察巨结肠疾病的长期变化。

维普资讯 http://www.cqvip.com

Sato 等[4]1978 年首先报道利用 BAC 成功建立大鼠无神经节细胞症模型，之后该模型广泛用于去神经方面的研究。Yoneda 等[5]2002 年应用 BAC 建立了小鼠无神经节细胞症模型。BAC 引起肠神经损伤的机制可能是阳离子表面活性剂 BAC 长分子链与神经轴突膜活性集团多个位点结合并注入膜内，引起膜肿胀，离子自由进入膜内，进而引起膜的去极化，导致动作电位和静息电位快速、不可逆的减小。当结肠壁应用 BAC 时，膜电位比平滑肌细胞低的神经细胞易受到损伤，从而选择性地损伤神经细胞，而不损伤其它细胞组织[6]，有人认为实际上是平滑肌和粘膜上皮的损伤是可修复的，而神经损伤是不可逆的[7]。

用不同浓度的 BAC、不同处理时间制作动物模型(资料未显示)，成功地用 0.1% 和 1% 浓度的 BAC 处理结肠 40min 制作了实验性巨结肠模型，与先天性巨结肠症相似，呈现无神经节细胞狭窄段和正常神经节细胞的扩张近端。1% 浓度 BAC 制作巨结肠模型，在 2～8 周内部分动物出现严重的肠梗阻，严重腹胀，停止排便，伴有污粪，消瘦，精神萎靡，甚至穿孔，一般 1 周内死亡，可用于急性实验研究。引起动物死亡的可能机理是，高浓度导致神经细胞受损程度严重，神经节细胞完全消失所需时间短。而 0.1% 浓度 BAC 出现上述严重症状较晚，多数可存活 8 周以后，可用于慢性实验研究。用 BAC 处理结肠 40min，较文献报道处理时间稍长[4~5]，与纸沙布较薄、吸附 BAC 少有关。Sato 等[4]处理方法操作复杂，手术操作时间长，与 Yoneda 等[5]处理方法相似，将结肠提出腹腔外，用注射器针头固定处理段两端，从而减少 BAC 对结肠其它部位和腹腔的污染。

RT－PCR 结果显示乙酰胆碱酯酶在实验组结肠表达下调，与 Sato[4]和 Yoneda[5]报道免疫组化乙酰胆碱酯酶活性下降消失一致。循环水浴实验观察到 BAC 处理段结肠平滑肌收缩对乙酰胆碱敏感性增加，但未见胆碱能神经增生、增粗、紊乱，在没有肾上腺素能和胆碱能神经增生等外来神经参与调节的情况下，可造成处理段狭窄、蠕动停止[4,5]，这可能与损伤结肠内非肾上腺能非胆碱能神经有关。结肠蠕动抑制性反射需要神经丛的参与调节[4]，这与观察到的结肠测压 BAC 处理段在刺激近端时失去反射性收缩、近端扩张和大便潴留结果一致。

组织化学和免疫组化结果显示，对照组神经节细胞未受损伤，RT－PCR 结果显示实验组 nestin 表达上调，说明处理段结肠可能存在神经细胞的再生，Hanni 等[8]报道用 0.05% BAC 处理后结肠正常与 BAC 处理段移行处肌间神经丛有神经细胞再生，神经纤维进入 BAC 处理段，但没有神经节细胞形成，这说明 BAC 处理段可能有促进神经再生的细胞因子存在。

实验发现 BAC 处理段结肠平滑肌增厚、粘膜增生，尤其是结肠梗阻严重的动物，Zucoloto[7]和 Oliveira[9]等认为平滑肌增厚以及陷窝细胞增生不是 BAC 的直接作用，而是与结肠失神经有关，但机理未明，尚有待进一步研究。我们推测粘膜上皮陷窝细胞增生与结肠离子转运功能代偿有关，BAC 处理段结肠因离子转运减少而表现为代偿性增生。

实验性巨结肠动物模型的成功建立为深入研究先天性巨结肠症疾病的病理、发生发展和长期变化等疾病特征提供了可能，为下一步进行结肠内 MSCs 移植分化为神经细胞的研究奠定了基础。

参 考 文 献

[1] Swenson O. Hirschsprung's Disease: A Review[J]. Pediatrics, 2002; 109(5): 914－918.

[2] Fujimoto T. Natural history and pathophysiology of enterocolitis in the piebald lethal mouse model of Hirschsprung's disease[J]. J Pediatr Surg, 1988; 23: 237－242.

[3] Prockop DJ, Gregory CA, Spees JL. One strategy for cell and gene therapy: harnessing the power of adult stem cells to repair tissues[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003; 100(1): 11917－11923.

[4] Sato A, Yamamoto M, Imamura K, et al. Pathohysiology of aganglionic colon and anorectum: an experimental study on aganglionosis produced by a new method in the rat[J]. J Pediatr Surg, 1978; 13: 399－435.

[5] Yoneda A, Shima H, Nemeth L, et al. Selective chemical ablation of the enteric plexus in mice[J]. Pediatr Surg Int, 2002; 18: 234－237.

[6] Levin RJ. Actions of spermicidal and virucidal agents on electrogenic ion transfer across human vaginal epithelium in vitro[J]. Pharmacol Toxicol, 1997; 81(5): 219－225.

[7] Zucoloto S, Almeida DD. The relationship between myenteric neuronal denervation, smooth muscle thickening and epithelial cell proliferation in the rat colon[J]. Res Exp Med, 1997; 197: 117－124.

[8] Hanani M, Ledder O. Regeneration of myenteric Plexus in the mouse colon after experinental denervation with benzalkonium chloride[J]. J of comparative neuroology, 2003; 462: 315－327.

[9] Oliveira JS, Llorach－Velludo MA, Sales－Neto VN. Megacolon in rats[J]. Digestion, 1990; 45(3): 166－171.