DOI: 10.16016/j.1000-5404.1999.09.011
第 21卷第 9期 第 三 军 医 大 学 学 报 Vol. 21, No. 9
1999年 9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 1999

一氧化氮合酶、P物质在慢传输型便秘结肠壁内的异常表达*

童 卫东** 张胜本 张连阳 高 峰 杜文华 牟江洪 (第三军医大学附属大坪医院普通外科) 重庆, 400042

提 要 目的: 研究一氧化氮(NO)和 P物质(SP)在慢传输型便秘(STC)发病中的作用。方法: 应用一氧化氮合酶(NOS)和 SP的兔多克隆抗体,对 15例 STC患者和 11例对照组乙状结肠标本进行免疫组织化学染色和半定量分析。结果: 肌间神经丛 NOS免疫组化反应阳性增强($P < 0.01$),而 SP明显降低($P < 0.01$);粘膜下神经丛 NOS及 SP免疫反应阳性与对照组无显著差异。结论: STC患者结肠壁内 NO含量增多, SP含量下降,可能是其结肠传输减慢的神经病理基础之一。

关键词 便秘;肠神经系统;一氧化氮; P物质
中图法分类号 R345.44; R547.62; R977.6

慢传输型便秘(Slow transit constipation, STC)以结肠传输功能障碍为主要特点。病因不清,症状顽固,治疗困难。近年的研究表明肠神经系统(Enteric nervous system, ENS)异常在该病的发病中有重要作用。本文应用免疫组织化学方法研究 STC患者结肠壁内神经丛一氧化氮合酶(Nitric oxide synthase, NOS)和 P物质(Substance P, SP)的免疫反应阳性分布情况,探讨这两种肠神经递质在 STC发病中的作用。

1 材料和方法

1.1 临床资料

STC组: 收集我院 1991~1996年间外科手术治疗的 15例慢传输型便秘患者乙状结肠标本,其中男 2例,女 13例,年龄 26~68岁,平均 44.5岁,病程 1~30年,平均 7.9年。主要表现为排便困难、便意消失、便次减少,起初 3~4 d 1次,逐渐发展为 7~14 d 1次,依赖刺激性泻剂(大黄、番泻叶、果导片等)排便。结肠传输试验: 应用口服标志物法,测定 80%的标志物排出时间在 4~11 d之间,平均 6.5 d。钡灌肠或纤维结肠镜检查排除器质性病变。排粪造影示 14例同时伴有出口梗阻性便秘。14例行全或次全结肠切除术,1例行乙状结肠切除术。

对照组: 鉴于正常人结肠标本来源的困难性,按照 Cortesini[1]方法,选择同期手术的 11例非梗阻性直肠高分化腺癌患者(Dukes A期,男 7例,女 4例,年龄 47~78岁,平均 65岁,无便秘及泻剂服用史),术中取距肿瘤 20 cm以上的乙状结肠作为对照组标本。

1.2 标本处理

标本以 10%甲醛溶液固定 12 h以上,石蜡包埋。切 6μm厚石蜡切片,常规脱蜡至水,待染色。

1.3 主要试剂

兔抗 NOS兔抗 SP多克隆抗体及 SPtm试剂盒均为北京中山生物技术有限公司提供的美国 ZYMED公司产品,工作浓度为 1∶100。

1.4 免疫组化染色

采用过氧化酶标记的链酶卵白素(Streptavidinperoxidase)法进行染色,具体操作按试剂盒说明书进行。主要观察肌间神经丛和粘膜下神经丛内 NOS及 SP的免疫反应性。判断标准如下: -所有视野均未见阳性反应; + 个别视野有较弱的阳性反应; ++阳性细胞较多见,呈较明显的黄褐色反应; +++阳性细胞多见,着色深,呈棕褐色。

1.5 数据处理

采用 2×K表 χ^2检验, $P < 0.05$表示差异显著, $P < 0.01$表示差异非常显著。

2 结果

2.1 HE染色

与对照组比较, STC组肌层、肌间神经丛及粘膜下神经丛无明显改变。

2.2 免疫组化染色

2.2.1 NOS免疫组化染色 STC组肌间神经丛内 NOS免疫反应性明显高于对照组($P < 0.01$),而粘膜下神经丛无显著差异,见表 1,图 1,2。

2.2.2 SP免疫组化染色 STC组肌间神经丛 SP免疫反应性较对照组明显减低($P < 0.01$),而粘膜下神经丛两组间相差不显著,见表 2,图 3,4。

表 1 肠神经系统 NOS免疫反应性半定量分析
Tab 1 Semiquantitative analysis of immunoreactivity of NOS in ENS

Group	n	Myenteric plexus				Submucosa plexus			
		-	+	++	+++	-	+	++	+++
Control	11	3	6	2	0	4	3	3	1
STC	15	0	2	4	9*	3	5	4	3

*: $P < 0.01$ *vs* control

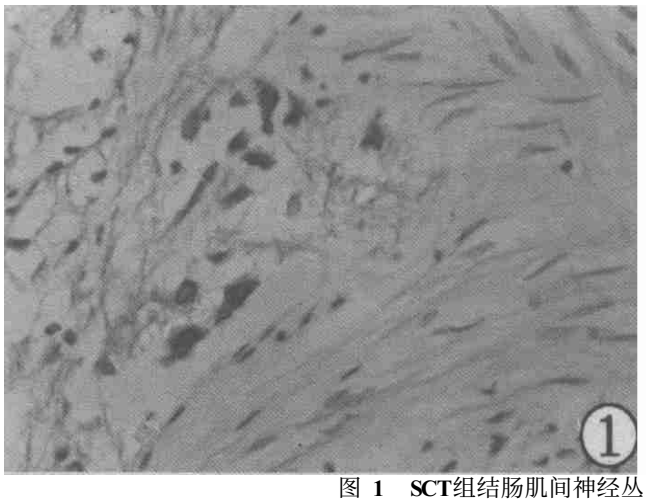
表 2 肠神经系统 SP免疫反应性半定量分析
Tab 2 Semiquantitative analysis of immunoreactivity of SP in ENS

Group	n	Myenteric plexus				Submucosa plexus			
		-	+	++	+++	-	+	++	+++
Control	11	0	3	2	6	0	5	6	0
STC	15	2	13	0	0*	0	4	7	4

*: $P < 0.01$ *vs* control

* 重庆市中青年科技专家基金资助项目
** 童卫东,男,29岁,住院医师,硕士

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net



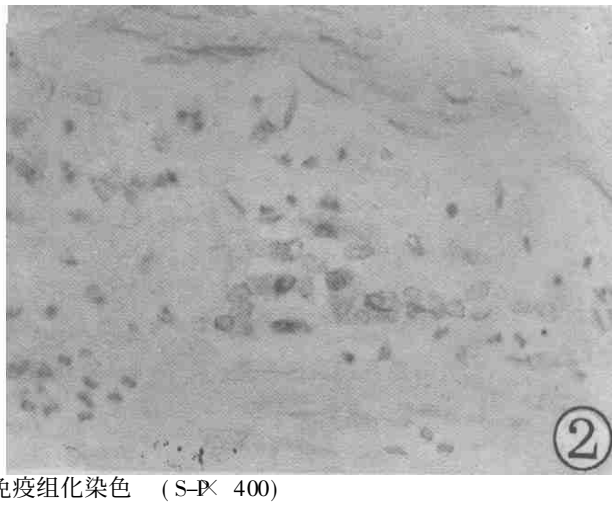
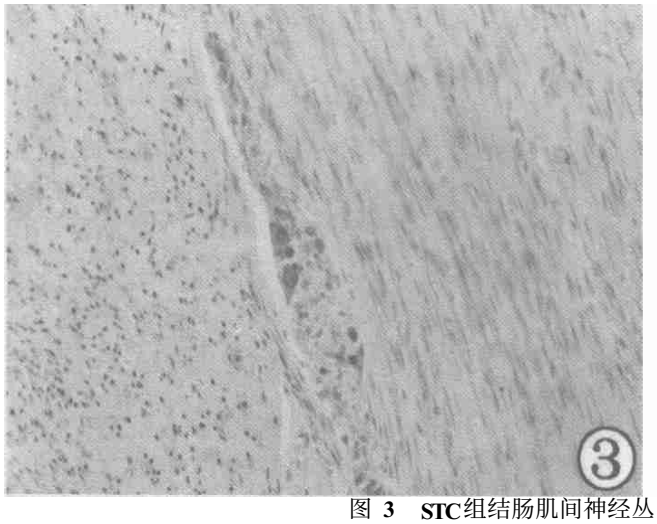


图 1 SCT组结肠肌间神经丛 NOS免疫组化染色 (S-P× 400)

Fig 1 Immunohistochemical staining of NOS in the colonic myenteric plexus of STC (S-P× 400)

图 2 对照组结肠肌间神经丛 NOS免疫组化染色 (S-P× 400)

Fig 2 Immunohistochemical staining of NOS in the colonic myenteric plexus of control (S-P× 400)



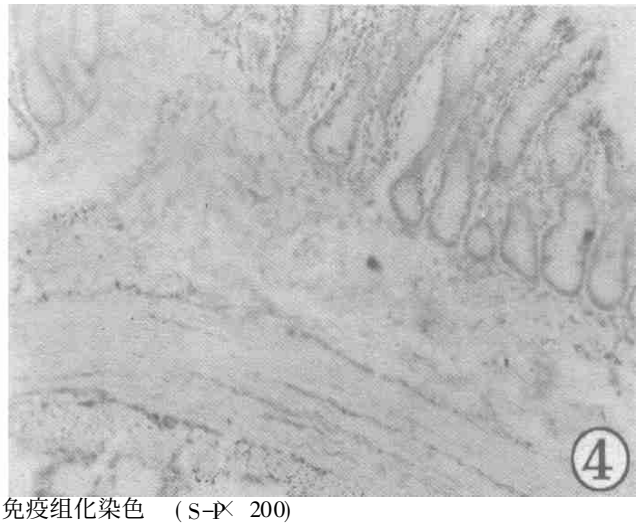


图 3 STC组结肠肌间神经丛 SP免疫组化染色 (S-P× 200)

Fig 3 Immunohistochemical staining of SP in the colonic myenteric plexus of STC (S-P× 200)

图 4 对照组结肠肌间神经丛 SP免疫组化染色 (S-P× 200)

Fig 4 Immunohistochemical staining of SP in the colonic myenteric plexus of control (S-P× 400)

3 讨论

文献报道 STC患者结肠壁内 VIP SP含量下降, 5羟色胺含量升高[2],提示肠神经递质变化在其发病中有重要作用。九十年代以来,NO在肠神经系统的作用引起了人们的广泛关注,产生 NO的神经元的密度改变或平滑肌对内源性 NO敏感性的改变,可能在某些神经肌肉疾病中起着重要作用。研究表明 NO VIP ATP可能是肠神经系统内三种主要的抑制性神经递质,SP和乙酰胆碱则是主要的兴奋性神经递质。我们选择 NO和 SP这两种具有代表性的递质进行研究,进一步探讨 STC肠神经递质的变化情况。

结果表明,在常规光镜下 STC组与对照组无明显差异,而免疫组化染色显示肌间神经丛 NOS阳性反应成分明显增加,粘膜下神经丛无明显差异。Cortesini[1]对 5例 STC患者结肠壁内神经丛 NOS分布的研究发现粘膜下神经丛和肌间神经丛内 NOS分布均明显增多,粘膜下丛与本研究不同,这可能与其病例数目过少有关,有待证实。我们认为 NOS免疫反应阳性增强,NO的产生增多,对平滑肌产生抑制作用,从而使结肠的推进性收缩减弱甚至消失,可能是结肠传输功能减弱的原因之一。有研究表明在中枢神经系统中,NO的过量产生与神经变性疾病有密切关系,在体内或离体条件下,外源性 NO供体能引起神经元损伤。STC肠壁内 NO的过量产生是否会损伤肠壁内神经元还有待进一步研究。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

SP是兴奋性肽能神经递质,能抑制胃肠道粘膜分泌,刺激肠道运动。我们的结果表明 STC结肠肌间丛 SP免疫反应性明显减低,与文献报道不同[3],可能与病程长短、肌间丛受损程度以及是否应用刺激性泻剂有关,有待进一步研究。我们认为,STC肌间丛 SP能神经元减少、SP合成减少或分解过快可能是其肠道蠕动减弱的原因之一。

15例 STC患者都有长期服用泻剂的病史,有关泻剂对肠神经肽的影响目前尚有争议。Kiernan和 Heinie[4]报道长期饲以番泻叶或 1,8二羟基蒽醌致大鼠结肠壁内神经元损害,而 Tzavella[5]报道大鼠饲以番泻叶或蒽醌 6个月可致粘膜层 VIP和生长抑素(SOM)下降,粘膜下层 SOM下降,肌层 VIP下降,P物质无变化。我们先前的研究表明长期饲以大黄和酚酞可致大鼠结肠肌间丛 NOS阳性神经元密度增加[6],提示长期服用泻剂对肠神经系统的正常功能有影响。14例患者伴有不同类型的出口梗阻型便秘,这是 STC产生的原因亦或其发展的结果? 从临床资料和实验结果分析,我们推测以下过程可能与 STC的发生发展有密切关系:症状性或出口梗阻性便秘→长期滥用刺激性泻剂→肠壁内 NO增多及神经递质紊乱→肠动力紊乱和结肠传输减慢→出现 STC。对 STC病理机制的进一步了解,有赖对泻剂与 STC出口梗阻型便秘与 STC关系的深入研究。

(本课题得到基础医学部组织学与胚胎学教研室蔡文琴教授的指导和无私帮助,在此致谢!)

参考文献

1 Cortesini C, Cianchi F, Infantino A, *et al*. Nitric oxide synthase and VIP distribution in enteric nervous system in idiopathic chronic constipation. Dig Dis Sci, 1995, 40(11): 2450

2 Milner P, Lincoln J, Growe R, *et al*. Serotonin is increased and VIP decreased in the sigmoid colon in idiopathic costipation(Abstr). Gut, 1989, 30(9): A715

3 Goldin E, Karmeli F, Selinger I, *et al*. Colonic substance P levels are increased in ulcerative colitis and decreased in chronic severe constpation. Dig Dis Sci, 1989, 34(4): 754

4 Kiernan J A, Heinicke E A. Sennosides do not kill myenteric neurons in the colon of the rat or mouse. Neuroscience, 1989, 30(3): 837

5 Tzavella K, Schenkirsch G, Repl-R L, *et al*. Effects of long-term treatment with anthranoids and sodium picosulplate on the contents of vasoactive intestinal polypeptide, somatostatin and substance P in the rat colon. Eur J Gastroenterol Hepatol, 1995, 7(1): 13

6 童卫东,张胜本,张连阳,等.大黄致大鼠结肠壁内一氧化氮异常及其意义.中药药理与临床, 1997, 13(6): 29

(收稿: 1998-01-20;修回: 1999-06-23)

(编辑　张大春)

Abnormal expression of NOS and substance P in sigmoid colon wall of slow transit constipation

Tong Weidong, Zhang Shengben, Zhang Lianyang, Gao Feng, Du Wenhua, Mou Jianghong (Department of General Surgery, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042)

Abstract **Objective**: To investigate the role of NO and substance P (SP) in occurrence of slow transit constipation (STC). **Methods**: Using immunohistochemistry and semiquantitative analysis, the distribution of NOS and SP positive neurons in the sigmoid colon wall of 15 patients with STC and 11 controls were determined. **Results**: The immunoreactivity of NOS was increased ($P < 0.01$) while that of SP was decreased significantly ($P < 0.01$) at the myenteric plexus. At the submucous plexus, no significant changes in immunoreactivity of both NOS and SP were found. **Conclusion**: The immunoreactivity of NOS is increased and that of SP decreased in enteric nervous system of STC, which might one of the neuropathological bases of STC.

Key words constipation; enteric nervous system; nitric oxide; substance P

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net