DOI: 10.16016/j.1000-5404.1998.02.014

一氧化氮合酶在大鼠胃壁的分布*

彭 曦** 冯晋斌 汪仕良 (第三军医大学附属西南医院烧伤研究所) 重庆, 400038

提 要 目的: 了解一氧化氮合酶(NOS)在大鼠胃壁的分布规律。方法: 采用 NADPH-黄递酶(NDP)组化法和整装铺片技术对 NOS在大鼠胃壁的分布进行定量和定位研究。结果: NOS广泛分布于大鼠胃壁内, 主要定位于肌间神经丛, 在粘膜下丛、胃粘膜表面、胃腺及血管壁等处亦有分布。胃肌丛中 NOS阳性神经元形态基本类似, 以圆形和卵圆形为主, 但在胃不同区域神经元的分布密度、胞体大小和染色强度存在较大差异。密度分别为胃窦部: 62.1± 37.7个 /mm^2; 胃体部: 43.4± 31.7个 /mm^2; 胃底部: 31.6± 27.8个 /mm^2; 胃底部神经元胞体较大, 染色较深; 胃窦部神经元大小不等, 染色深浅不一; 胃体部的则介于二者之间, 呈过渡态。一些神经纤维的膨体呈 NOS阳性反应, 它们串在一起形成"串珠"样结构, 且多与血管和肌纤维伴行。结论: ① 一氧化氮(NO)可能参与对胃的运动、分泌和血液循环的调节。② NOS阳性神经元在胃各部肌间神经丛中的分布差异可能与胃的生理功能密切相关。

关键词 一氧化氮合酶; NADPH-黄递酶; 胃; 酶组织化学; 大鼠
中图法分类号 R322.44

一氧化氮(Nitric oxide, NO)是由一氧化氮合酶(Nitric oxide synthase, NOS)催化生成的一种小分子化合物, 兼有神经递质和效应分子的双重作用。早在1990年, Bult等[1]就证实 NO是胃肠道中非肾上腺素能非胆碱能神经的抑制性递质, 参与调节胃肠道多种生理功能。近来研究表明许多胃肠疾病都与消化道壁内神经丛中 NOS的活性和分布异常有关[2]。因此对消化道壁内神经丛中 NOS阳性神经元的研究可能会给治疗上述疾病提供新的线索。由于胃形态不规则且胃壁肌层较厚, 制作胃铺片标本十分困难, 目前对胃壁内神经丛的形态学研究主要以切片染色为主, 难以显示其全貌, 使胃壁内神经丛的形态学研究受到限制。本实验对常规铺片技术进行适当改进, 制成胃纵肌层铺片标本, 采用 NADPH-黄递酶(NADPH-diaphorase, NDP)组织化学法较全面地观察了 NOS在胃壁的分布, 并对其生理意义进行初步探讨。

1 材料与方法

1.1 取材及标本制作

健康成年 Wistar大鼠6只, 雄性, 体重210~250 g, 1%戊巴比妥钠腹腔麻醉下开腹取胃, 在胃底剪一小口, 用生理盐水冲净胃内容物, 向胃腔灌注 4%多聚甲醛(至正常容积的3~4倍), 结扎后放入该固定液中4~6 h(4℃), 再移入30%蔗糖液中24 h(4℃)。将胃取出剪断结扎线, 排净固定液, 用0.01 mol/L PBS(pH7.4)冲净后, 用纱布包裹, 轻揉2~3 min, 将胃腔用棉花塞紧, 用一极薄的竹片沿胃大弯纵行划痕; 向胃小弯处轻轻剥离, 将剥离的纵肌层修剪整齐放入 PBS液中待染。另外, 在胃的不同部位各取一块组织, 作全层垂直冰冻切片, 片厚20μm, 切片直接裱于经铬矾明胶处理的载片上。制作胃纵肌层铺片标本中应注意以下几点: ① 向胃腔注入固定液时速度不要太快, 以免胃壁破裂, 揉搓时要轻柔、均匀, 不可用暴力。② 不能采用灌注固定, 否则胃将收缩变硬, 无法撕片。③ 由于胃壁较厚, 固定和脱水的时间都应适当延长。

1.2 组化染色

将制备好的胃各部纵肌层标本用 PBS冲洗3次, 移入由0.1 mol/L PB(pH8.0)配制的新鲜的孵育液中(0.5 g/L β-NADPH, 0.2 g/L NBT, 2.0 g/L L-苹果酸, 0.3% Triton X-100) 37℃下孵育45 min(冰冻切片的染色时间为30 min)。PBS冲洗3次, 贴片、铺平(牵拉率小于1:1.1), 凉干后逐级酒精脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片, 光镜观察、照像。

对照实验: ① 孵育液中不加β-NADPH; ② 孵育液中不加NBT; ③ 将铺片加热至80℃, 5 min, 以破坏 NOS活性。

1.3 结果判定

神经元密度用网式目镜测微器测定, 随机计数100个视野, 以 $\bar{x}\pm s$ 表示; 神经元和胃粘膜着色深浅采用目测半定量法, 按阴性(-)、浅蓝色(+)、蓝色(++)、深蓝色(+++)分4级。

2 结果

NDP阳性物质(以下称 NOS阳性)呈蓝色均质沉淀, 分布于整个胃壁, 主要存在于肌间神经丛, 在粘膜下丛、胃腺、胃粘膜表面及血管壁亦有分布。

* 全军"九五"攻关项目
** 彭 曦, 男, 29岁, 主治医师, 硕士

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

2.1　肌间神经丛

该处有大量的神经元和神经纤维呈 NOS阳性,神经胞体多为圆形和卵圆形,个别的为三角形或不规则形,见图 1.在胃不同区域神经元的分布密度、胞体大小和染色强度存在较大差异。密度分别为胃窦部: 62.1± 37.7个 /mm²、胃体部: 43.4± 31.7个 /mm²、胃底部: 31.6± 27.8个 /mm²。胃底部神经元胞体较大,染色较深,见图 2.胃窦部神经元大小不等,染色深浅不一,见图 3;胃体部的则介于二者之间,呈过渡态。神经节和节间束不典型,未形成类似肠肌丛中的方型网格结构,见图 1.铺片标本中可见一些神经纤维的膨体呈 NOS阳性反应,并形成“串珠”样结构,且多与血管和肌纤维伴行,见图 4.

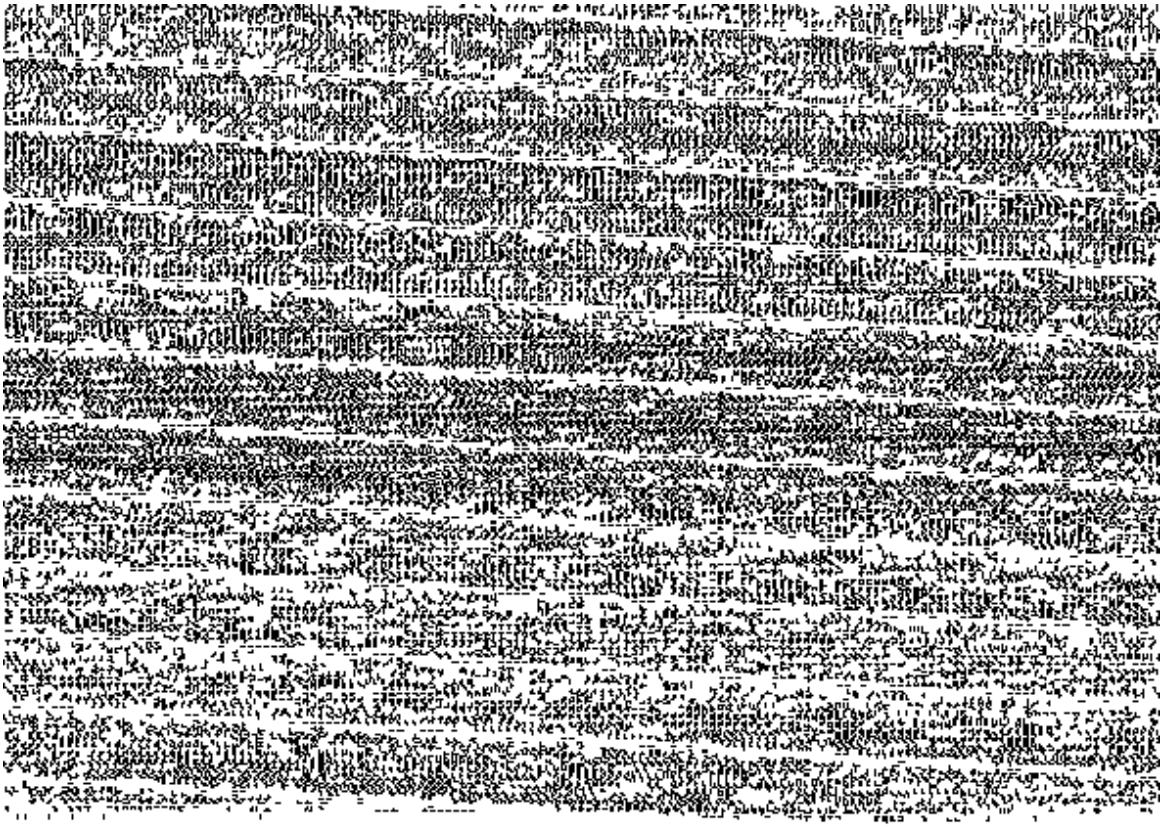


图 1　大鼠胃肌间神经丛中 NOS阳性神经元和神经纤维 (胃窦)　(NDP× 40)

Fig 1　The NOS positive neurons and nerve fibers in the myenteric plexus of the rat (antrum)　(NDP× 40)

图 2　NOS阳性神经在胃底部肌间神经丛中的分布,(▲)示突起　(NDP× 400)

Fig 2　The distribution of NOS positive nerves in the myenteric plexus of the rat fundus, processes (▲)　(NDP× 400)

图 3　NOS阳性神经在胃窦部肌间神经丛中的分布,(↑)示深染的 NOS阳性神经元,(▲)示浅染的神经元　(NDP× 400)

Fig 3　NOS positive neurons with dark stain(↑) and light stain(▲) in rat antrum　(NDP× 400)

图 4　与血管伴行的神经纤维,内含 NOS阳性膨体 (↑)　(NDP× 400)

Fig 4　NOS positive varicosities (↑) in nerve fibers closely associated with blood vessels　(NDP× 400)

2.2　胃粘膜

整个胃粘膜表面都有 NOS阳性物质分布,以胃底部含量最多 (卅),胃体次之 (廾~卅),幽门部最少 (+ ~廾)。

2.3　其它部位

在胃纵肌层铺片标本中可见许多血管网,管壁有点状分布的 NOS阳性物质,尤以小动脉最明显,小静脉和毛细血管壁也有 NOS阳性物质,但分布稀疏、着色浅。在冰冻切片中发现环肌层周围和胃腺腔内亦有少量 NOS阳性物质。

2.4　对照实验

所有对照实验均为 NOS阴性反应。

3　讨论

本结果表明,NOS广泛分布于大鼠胃壁,主要定位于胃肌间神经丛与 NOS在肠道中的分布类似,与 NOS阳性神经元的形态也与肠道中的类似[3],但大小及染色强度不一,推测可能与神经元处于不同的状态

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

以及胞体内 NOS活性强弱有关[4]。NOS阳性神经元在胃各部的分布密度和染色强度的差异可能与胃的生理功能有关,胃底处 NOS阳性神经元较稀疏,有利于使近端胃保持紧张性收缩,维持胃的基础张力,但该处神经元中 NOS活性较强,则利于食物进入胃腔后引起胃的舒张和长时间容储食物。Deasi 等[5]研究表明,食物引起胃容受性舒张是由 NO介导的,并认为胃底处的 NOS阳性神经元释放的 NO在调节胃腔体积和胃内压的过程中起主要作用。本研究发现胃窦部有较密集的 NOS神经元,这可能与胃的蠕动功能有关,该处不仅存在较密集的 NOS神经元,而且其它类型的神经元特别是胆碱能神经元的密度亦较高[6],它们释放的递质相互协调,使胃壁平滑肌收缩与舒张交替进行,从而产生蠕动,碾磨食物并将其推向十二指肠,起到机械泵的作用。同时发现胃窦部 NOS神经元染色强度各异,即神经元内 NOS活性强弱不一,推测部分 NOS神经元可能处于备用状态,一旦需要 NOS将被激活,合成 NO以调节胃的运动状态及幽门括约肌的张力,但其详细的调控机制有待进一步研究。

本实验发现许多 NOS阳性神经元之间有突起相连,形成网络,Barbiers等[7]在猪大肠肌间神经丛中亦观察到类似的结果,说明在胃壁内不仅存在由胆碱能、肾上腺素能神经元构成的神经回路,还可能存在另一类神经元回路。有学者将这一回路称为氮能神经元回路[8,9],该回路可能在调节胃的运动状态中起重要作用,因为 NO可使胃肠平滑肌细胞产生抑制性接点电位(IJP),从而抑制平滑肌收缩,其电生理基础是钾通道的短暂开放,导致平滑肌细胞膜超激化[10]。

本研究还发现一些神经纤维的膨体呈 NOS阳性反应,它们串连在一起形成"串珠"样结构,并且多与血管和肌纤维伴行,说明 NOS不仅存在于植物神经的胞体中亦存在其膨体中,这就使 NO的合成部位与效应部位非常接近,利于 NO的扩散,以便在最短的时间内发挥其生理功能。这一发现为 NO调节消化道平滑肌运动和血液循环提供了形态学依据。在胃纵肌层铺片中发现有许多呈 NOS阳性反应的血管网,小动脉壁上点状分布的 NOS阳性物质最明显,可能为 NOS阳性神经的神经末梢,亦可能为血管内皮细胞中的 NOS;整个胃粘膜表面均有 NOS阳性物质,提示 NO可能参与调节胃的分泌功能。

(本实验承蒙校组织学与胚胎学教研室蔡文琴教授、肖岚讲师的指导,特此致谢!)

参考文献

1 Bult H, Boeckxstaens G, Pelckmans P *et al*. Nitric oxide as an inhibitory non-adrenergic non-cholinergic neurotransmitter. Nature, 1990; 345(4): 346

2 Vanderwinden J M. Role of nitric oxide in gastrointestinal function and disease. Acta Gastroenterol Belg, 1994; 57(3): 224

3 肖 岚,蔡文琴,孙 榆.大鼠空肠肌间神经丛 NADPH-黄递酶的光镜及电镜观察.解剖学报,1996; 27(1): 85

4 Furness J B, Li Z S, Young H M *et al*. Nitric oxide synthase in the enteric nervous system of the guinea-pig: a quantitative description. Cell Tissue Res, 1994; 277(1): 139

5 Deasi K M, Sessa W C, Vane J R. Involvement of nitric oxide in the reflex relaxation of the stomach to accommodate food or fluid. Nature, 1991; 351(5): 477

6 彭 虹,王 彦,李质馨.胎儿胃肌间神经节胆碱能神经元的研究.中国组织化学与细胞化学杂志,1996; 5(1): 45

7 Barbiers M, Timmermans J P. Nitric oxide synthase containing neurons in the pig large intestine: topography, morphology, and viscerofugal projections. Microsc Res Tech, 1994; 29(2): 72

8 Ganumnitz E, Sweet A, Singaram C. Nitrinergic and peptidergic innervations and their inter-ralationships in human colon. Neuropeptides, 1995; 29(1): 1

9 Noboru T, Toshio K, Tomio O. Nitroxidergic nerve stimulation relaxes human uterine vein. J Auto Nerv Sys, 1995; 55: 189

10 Konturek S K, Konturek P C. Role of nitric oxide in the digestive system. Digestion, 1995; 56(1): 1

(收稿: 1997-10-23;修回: 1998-03-18)

(编辑 仇玉福)

Distribution of nitric oxide synthase in the gastric wall in rats

Peng Xi, Feng Jinbin, Wang Shiliang (Research Institute of Burns, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract **Objective**: To investigate the regularity of distribution of nitric oxide synthase (NOS) in the gastric wall in rats. **Methods**: The distribution of NOS in the gastric wall was quantitatively and localization-

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

ally determined with NADPH-diaphorase (NDP) histochemical staining and whole-mount preparation. **Results**: NOS was widely distributed in the gastric wall and most of it was localized in the myenteric plexus. The shape of NOS positive neurons was basically similar (round or oval) while their density, size and staining intensity varied greatly in different parts of the stomach. The density was 62.1± 37.7 cells/mm², 43.4± 31.7 cells/mm² and 31.6± 27.8 cells/mm² respectively in the antrum, body and fundus. The size and staining intensity of NOS positive neurons in the fundus were resemble. However, they were different in the antrum. In the body, the characteristics of NOS positive neurons were at an intermediate state from the fundus to antrum. Bead-like structures were strung together by NOS positive varicosities in nerve fibers, some of which were closely adherent to the outer wall of blood vessels and smooth muscle fibers. **Conclusion**: ① Nitric oxide might be involved in the modulation of motility, secretion and blood circulation of the stomach; ② The significant difference of the distribution of NOS positive neurons among the myenteric plexus in different parts of the stomach may be related to the physiological function of the stomach.

Key words　nitric oxide synthase (NOS); NADPH-diaphorase (NDP); stomach; enzyme histochemistry; rat

(上接 123页)

式套扎器,在肛门直肠镜的直视下,让病人深呼气,使该部位粘膜松弛,距肛门 6~ 8 cm处,将套扎器口径对准 1 5 9点处,平面稍错开不超过 0.5 cm,扣动板机产生负压使该处粘膜吸入枪筒内,然后推出胶圈套住,直径不超过 1 cm,1周后该处被套扎粘膜自行缺血坏死脱落,局部创面逐渐愈合,两星期后第 2次套扎,距离肛管 4~ 6 cm处,套扎 6 12点,第 3次以间歇两周后进行单个补套,每次不超过 3点,每次套扎后为防止局部炎症,可口服甲硝唑、氟哌酸肠道抗菌素等,适当选用缓泻剂、痔疮宁栓便于排便。

2　结果

本组病人经第 1次套扎治疗后就有便意,不用泻剂,次数增加,1周 2~ 3次不定,第 2次套扎后,症状较以上明显好转,不但排便顺利,而且有一定的规律,有 4例病人进行了第 3次补套,2例欠佳,根据以上治疗效果判定:不用泻剂,间歇 2~ 3 d,排便通畅,有规律为治愈,间隔 3~ 4 d,虽无规律,但能顺利解出为好转,无明显改善者为无效,本组 18例病人症状明显好转,随防 6~ 12月,有 2例病人半年后症状复发外,其余未见复发,治愈率达 90%。

3　讨论

直肠粘膜内脱垂的病因目前尚不清楚,男:女 = 1:6,本组病例也证实女性发病率高,且均是经产妇。可能是妊娠后期盆腔血管受压,直肠粘膜血循回流不畅,局部瘀血,减弱了肠管粘膜的张力所致,加之大便干燥无规律以及慢性咳嗽也可能有一定的关系。长期腹压增高,当肛门括约肌功能无障碍时,下垂之直肠难以脱出肛门外,其粘膜可产生自身的套叠,本组有 2例支气管肺气肿病人半年后复发可能与此有关。诊断本病的依据是排便不全,排便困难,便秘,排粪造影是主要诊断手段。

以往对这种出口梗阻病人的治疗只是采取一些保守治疗,给予缓泻剂,高纤维食物以及肠动力药物,常常效果欠佳或无效,手术移除冗长的直肠粘膜较复杂,疗效也不十分理想。在 Berman用多个胶圈套扎治疗 5例成功后,国内鲁明良等[1]采用平面三点套扎治疗 84例直肠内套叠的启发下,我们采用了自制的枪式痔疮套扎器(获得国家四等发明奖)[2]借助套扎内痔和息肉的经验治疗 20例收到较好的效果。对此观察到,被套扎松弛下垂过多的粘膜缺血坏死脱落后,减少了局部重叠的机会,提高了直肠的张力,这样消除了用力排便时粘膜下垂套叠所致的梗阻。因此改善了排便。此方法简便易掌握,不需更多的设备。病人痛苦小,并发症少,是直肠粘膜内脱垂一种比较理想的治疗方法。

关键词　套扎器;胶圈;内脱垂;出口梗阻

中图法分类号　R657.19

参考文献

1 鲁明良,高春芳,魏　东.粘膜套扎术治疗直肠粘膜内套叠.中国肛肠杂志,1992;12(1):23

2 罗跃辉,吴国庆.胶圈套扎器治疗内痔和结直肠息肉 2 200例经验.第三军医大学学报,1995;17(4):370

(收稿:1997-11-17;修回:1998-02-19)

(编辑　张大春)

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