

# 醋酸直肠刺激对大鼠肠道 P 物质 5-HT 免疫 阳性神经纤维的影响

陈锡强\*, 刘可春, 韩利文, 王思锋, 王 雪, 王希敏, 侯海荣  
(山东省科学院生物研究所/山东省科学院药物筛选研发平台, 山东 济南 250014)

[摘要] 目的: 观察醋酸肠道刺激对大鼠肠道高敏感性的影响及其可能影响因子。方法: 采用醋酸慢性刺激建立肠道高敏感性大鼠模型, 观察大鼠肠道敏感性以及结肠黏膜下 P 物质 5-羟色胺免疫反应阳性纤维的变化。结果: 醋酸注射直肠能够引起实验动物的腹壁撤离反射的阈值降低; 肠道内的 P 物质含量低于对照组 ( $P < 0.01$ ), 肠道黏膜下的 5-羟色胺免疫阳性神经元/神经纤维阳性指数 (IOD) 显著增加 ( $P < 0.01$ ); 结论: 醋酸直肠慢性刺激可导致肠道高敏感性, 其机制可能与引起 5-HT 免疫阳性神经纤维增加 P 物质分泌紊乱有关。

[关键词] 肠易激综合征; 内脏高敏感性大鼠; 5-羟色胺; P 物质

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2008)11-0071-03

## The Changes of Enteric Substance P and 5-HT Neurons in Rat Induced by Intrarectal Administration of Acetic Acid

CHEN Xi-qiang\*, LIU Ke-chun, HAN Li-wen, WANG Si-feng, WANG Xue, WANG Xi-min, HOU Hai-rong,  
(Biology Institute of Shandong Academy of Sciences, Jinan; Drug Screening Platform  
of Shandong Academy of Sciences, Jinan 250014, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect and the mechanism of visceral hypersensitivity model rats. **Methods:** The visceral hypersensitivity model in rat was established by intrarectal administration of acetic acid. The substance P in the colon sub-mucosa layer and 5-HT serotonergic neurons/fibers were observed. **Results:** The results suggested the acid decreased the threshold of abdominal withdrawal reflex (AWR) Model group's the substance P in the colon sub-mucosa layer decreased ( $P < 0.01$ ), and the positive index (IOD) of serotonergic neurons/fibers increased significantly ( $P < 0.01$ ). **Conclusions:** Visceral hypersensitivity may be related with the substance P and 5-HT serotonergic in the colon.

[Key words] irritable bowel syndrome; visceral hypersensitivity; 5-Serotonin; substance P

肠易激综合症 (Irritable Bowel Syndrome IBS) 是一种常见的慢性功能性肠道疾病, 目前 IBS 的发生呈增长趋势, 其病因和发病机制尚不明确, 可能是和精神因素、感染因素、饮食因素、肠菌群失调有关。已知的 IBS 病机包括肠道高敏感性和肠动力异常。本实验采用醋酸刺激乳大鼠致肠道高敏感性动物模

型, 以 P 物质 5-HT 为观察指标, 探讨 P 物质和 5-羟色胺 (5-HT) 的变化在肠道高敏感性中的作用。

### 1 材料

**1.1 动物:** 选用新生 (2~3) 天 SD 大鼠 30 只, 与母鼠共同饲养在同一笼内, 实验用鼠均购自四川省医学科学院实验动物研究所。

**1.2 主要试剂:** P (Substance P) 物质放免试剂盒 规格:  $^{125}$ I-S. P 1 024 pg/瓶, 购自北京海军放免技术中心; 5-羟色胺免疫组化试剂 (BA-0121) 规格: 0.2 mL ( $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), 购自博士德生物工程有限公司; 其

[收稿日期] 2008-03-24

[通讯作者] \* 陈锡强, Tel: (0531) 82605352; E-mail: cxqq@sina.

com

他实验用试剂均由四川大学华西医院病理科提供。

## 2 方法

**2.1 造模** 以 AL-Chaer 内脏高敏感动物模型<sup>[1]</sup>为基础改进: 出生(2~3) d 的乳鼠与母鼠一同饲养至 25 d 后, 分离饲养。随机取 10 只, 于出生后(8~21) d 内每日上午, 直肠注入 0.9% 生理盐水 0.2 mL, 作为对照组。其余乳鼠造模: 自出生后(8~21) d 每日上午将石蜡油润滑后的连续硬膜外麻醉导管(直径 1 mm) 经肛门插入 2 cm, 分别注入 0.5% 醋酸溶液 0.3 mL, 共灌肠 14 d。从第 21 天后的 2 周内, 不进行任何实验操作。于第 5 周末进行检测。

**2.2 大鼠的腹部回缩反射测定** 用乳胶套做成长约 1 cm 气囊, 后面连接连续硬膜外导管。在检测以前禁食 18 h, 待粪便排净后在大鼠清醒的状态下将石蜡油润滑后的气囊导管经肛门插入, 气囊末端距离肛门 2 cm。用胶布把导管和大鼠尾根部缠在一起, 固定气囊。将大鼠放在透明塑料笼内, 大鼠在此笼内只能前后运动, 不能转身。10 min 后待大鼠适应环境后, 逐渐注入空气扩张肠道, 分别观察记录引起行为变化的容量阈值。每次直肠扩张持续 20 s。为得到准确的评估结果, 对每一阈值都重复进行 2 次扩张, 数据取均值。每次扩张结束时, 将气体回抽, 检测球囊有无漏气。

**腹部回缩反射评分标准** 大鼠在接受直肠扩张时身体静止不动, 头部的运动减少, 记录此空气容积数为大鼠的初始感觉压力阈值; 如大鼠腹部肌肉收缩, 腹部抬离桌面, 记录此空气容积为疼痛时的压力阈值; 如骨盆抬起, 身体呈弓形, 记录此时空气容积为最大耐受感觉时的压力阈值。

**2.3 肠粘膜 P 物质免疫活性测定** 于取材前禁食 18 h 实验大鼠, 自由饮水。用戊巴比妥钠 80 mg·kg<sup>-1</sup> ip 麻醉, 取结肠末段(1.0~1.5) cm 长, 剖开后用生理盐水冲净, 随即放入冰箱内保存, 组织加工前, 称重后记录组织重量, 放入 100℃ 1 mL 的生理盐水试管内煮沸 3 min, 加 1 mol 冰醋酸 0.5 mL 于电动匀浆器中匀浆, 再加 1 mol NaOH 0.5 mL 中和后, 4℃ 3 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 30 min, 取上清液贮存于 -20℃ 冰箱内待测。

肠粘膜 P 物质的测定采用平衡放射免疫法。在每个测定管中依次加入不同稀释度的标准品、待测样品及抗体, 温育 24 h, 加入 <sup>125</sup>I 标记的 P 物质继续 4℃ 放置 24 h, 每试管加入 0.5 mL 活性炭悬液分离,

3 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 15 min, 弃上清, 沉淀部分用 γ 计数器计数。根据标准曲线所得的 P 物质浓度换算成 pg·mL<sup>-1</sup>, 此过程由成都中医药大学附院核医学科完成。

**2.4 组织学观察及 5-HT 免疫组化观察** 在制作肠粘膜标本同时, 迅速取出大鼠结肠在 4% 多聚甲醛液中固定(2~4) h。结肠标本常规石蜡包埋, 4 μm 连续切片。

**免疫组化染色** 石蜡切片常规脱蜡至水, 加 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 液 37℃ 孵育 30 min, 封闭内源性过氧化物酶。先用 0.01 mol PBS 漂洗 3 次, 98℃ 微波抗原修复 10 min, PBS 漂洗。冰冻切片加 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 液 37℃ 孵育 30 min, 封闭内源性过氧化物酶, PBS 漂洗。以下步骤相同: 滴加正常山羊血清, 室温封闭 30 min, 然后加 1:200 的免抗 5-HT 多克隆抗体, 4℃ 孵育 24 h, PBS 漂洗, 加 Envision(1:200) 室温下放置 20 min, PBS 清洗, 再加 0.05% DAB 显色(8~12) min。流水冲洗终止反应。苏木精衬染 10 min, 盐酸乙醇透明。封片。以上由四川大学华西医院病理科完成。

**免疫组化结果评定标准** 结肠 5-HT 阳性神经纤维均呈棕黄色, 其中深棕黄色为强阳性反应(+++); 黄色为中等阳性反应(++); 浅黄色为阳性反应(+); 着色与背景灰黄色相同为阴性反应(-)。在 Nikon 光学显微镜下用 IBAS 计算机图像分析系统, 在每张切片同一结构位置随机挑选 3 个视野(×200 倍), 测量同样面积内阳性反应面积及阳性强度值, 并按以下公式计算: 阳性指数(IOD) = 阳性反应面积 × 阳性强度值。计算 3 个视野均值。

**2.5 统计方法** 实验结果用  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用 *t* 检验。

## 3 结果

**3.1 肠道敏感性检测结果** 模型组大鼠容量阈值降低( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 提示模型组大鼠肠道敏感性增高, 结果见表 1。

表 1 大鼠腹部收缩反射(AWR)的检测结果( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

组别	AWR(mL)		
	头部运动减少	腹壁抬高	弓背抬高
生理组	0.63 ± 0.23	1.72 ± 0.541	2.63 ± 0.623
模型组	0.33 ± 0.14 <sup>2)</sup>	0.96 ± 0.10 <sup>2)</sup>	1.70 ± 0.128 <sup>2)</sup>

注: 与生理组比较 <sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ (下同)

**3.2 肠道黏膜 P 物质检测结果** 从表 2 可见, 模型

组动物在幼年期经过醋酸处理以后, 肠道内 P 物质显著下降 ( $P < 0.05$ )。

表 2 对肠道粘膜内 P 物质的检测结果( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	P( $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ )
生理组	375.1 ± 68.7
模型组	308.3 ± 33.1 <sup>1)</sup>

### 3.3 结肠内 5-HT 免疫阳性神经纤维图像分析结果

2 组大鼠结肠粘膜下层及肌层均有 5-HT 免疫阳性神经纤维分布, 肌间 5-HT 免疫阳性沿肌束的方向投射。在肌间可以看到数个被染色细胞, 其阳性细胞有以下特点: 细胞核较大色较淡, 胞浆内疏松但染色较重。与生理组比较, 模型组肠肌层的 5-HT 神经纤维走行较弥散。在各组大鼠的结肠粘膜边缘可以看到群集的多个神经内聚集多个神经元, 神经节范围内染色较重; 在模型组可以看到神经纤维的数量在增多, 单个 5-HT 免疫阳性神经的胞浆体积增大, 胞内的染色加重, 胞内染色物质增多, 肌间的神经纤维增多; 在阳性密度、阳性面积和阳性指数都与生理组比较出现显著差异 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。

表 3 结肠内 5-HT 免疫阳性神经纤维图像分析结果( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	阳性强度	阳性面积	阳性指数
生理组	0.196 ± 0.047	23.25 ± 3.78	6.69 ± 2.58
模型组	0.258 ± 0.071 <sup>1)</sup>	32.74 ± 12.68 <sup>1)</sup>	13.88 ± 4.73 <sup>2)</sup>

## 4 讨论

内脏高敏感性的形成因素中, 与感觉和传递形成相关的神经递质为研究的重点, 这也和临床研究的成果相符。本研究发现模型鼠肠道敏感性增高, 结肠部位黏膜下 P 物质减少, 5-HT 免疫反应阳性纤维表达增强, 提示本病的发生可能与早期炎症造成的 P 物质和 5-HT 异常分泌有关。在类似的研究中, 李兆申<sup>[2]</sup>采用鸡卵清白蛋白腹腔注射诱发免疫过程, 造成内脏高敏感性增加, 结肠 5-HT 免疫阳性神经纤维在黏膜下层阳性指数明显增加, 肌间神经丛内和脊髓后角 5-HT 免疫阳性神经纤维/神经元阳性指数显著增高。因此认为结肠与脊髓后角 5-HT 能

神经纤维/神经元功能异常可能是内脏高敏感形成机制之一。P 物质在机体中参与非常广泛的生理过程。在肠道内 P 物质可促进肠蠕动, 并且通过和平滑肌上 NK<sub>2</sub> 受体相结合, 协同作用, 促进肠蠕动; 还可激活 5-HT 神经元, 促使组胺释放而增加肌纤维的收缩幅度。Gates 等<sup>[3]</sup>发现乙酰胆碱是参与肠道蠕动的兴奋性递质, 但阻断乙酰胆碱 M 受体并不能完全抑制肠道的蠕动性活动, 而 P 物质正是完成这种非胆碱能兴奋性传递的递质。而在本试验中模型组大鼠肠道黏膜 P 物质减少。这与有些报道提示 P 物质免疫组化神经纤维增加有矛盾<sup>[4]</sup>, 因而慢性炎症导致这一模型还有很多病理反应与人体不同, 还需要进一步研究。

根据目前的研究, 我们知道内脏高敏感性的形成是多系统、多个因素共同作用的结果。动物模型的内脏高敏感性与 5-HT 免疫阳性神经纤维/神经元显著阳性指数增高有关; 同时肠道动力的问题也存在, P 物质等因子变化也是造成动物模型内脏高敏感性形成的重要因素。

### [参考文献]

- [1] Al-chaer ED, Kawasakt M, Pasricha PJ. A new model of chronic visceral hypersensitivity in adult rats induced by colon irritation during postnatal development[J]. *Gastroenterology*, 2000, 119: 1276-1285
- [2] 李兆申, 詹丽杏, 赵兴刚, 等. 腹腔注射卵清白蛋白致大鼠内脏高敏感的研究[J]. *第二军医大学学报*, 2003, 24(2): 127-130
- [3] Gates TS, Zimmermann RP, Mantyh F, et al. Vasocactive intestinal polypeptide receptor binding sites in the human gastrointestinal: localization by autoradiography [J]. *Peptides*, 1989, 9: 1207-1219.
- [4] 姚用刚, 余保平, 徐 龙, 等. 慢性内脏高敏性大鼠结肠内 P 物质及其 NK1 受体表达的改变[J]. *胃肠病学和肝病杂志*, 2004, 13(4): 363-367.