

重症急性胰腺炎伴胃肠动力障碍大鼠结肠黏膜下血管活性肠肽神经元的变化

程晓雯, 林 中*, 郑清华, 李小玲

(桂林医学院附属医院消化内科, 广西 桂林 541001)

[摘要] **目的:**探讨结肠黏膜下神经丛血管活性肠肽(vasoactive intestinal peptide, VIP)神经元对重症急性胰腺炎伴胃肠动力障碍疾病的影响。**方法:**用逆行胰胆管注射牛磺胆酸钠的方法建立重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)大鼠模型,检测胰腺病理评分以及小肠推进比。利用全层铺片方法制作结肠黏膜下神经丛标本,双重免疫荧光法计数 VIP 阳性神经元占总神经元的百分比。**结果:**与正常大鼠比较,SAP 组大鼠开腹后见大量腹水及腹壁、胰周皂化斑点,肠管扩张明显,胰腺病理评分明显增高($P < 0.01$),小肠推进比明显下降($P < 0.01$),VIP 阳性神经元与总神经元百分比明显增高($P < 0.01$)。**结论:**重症急性胰腺炎大鼠胃肠动力障碍可能与结肠黏膜下神经丛 VIP 神经元增多有关。

[关键词] 重症急性胰腺炎;胃肠动力;功能障碍;血管活性肠肽

[中图分类号] R322.85, R576

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)02-183-05

Changes of vasoactive intestinal peptide neurons in colonic submucous plexus of mice with severe acute pancreatitis complicated by gastrointestinal dysmotility

CHENG Xiao-wen, LIN Zhong*, ZHENG Qing-hua, LI Xiao-ling

(Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Guilin Medical University, Guilin 541001, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate potential effects of vasoactive intestinal peptide (VIP) in colonic submucous plexus of mice with severe acute pancreatitis (SAP) complicated by gastrointestinal dysmotility. **Methods:** Twenty Sprague Dawley rats weighing 200~250 g were distributed into two groups: induced acute pancreatitis and control group. Acute pancreatitis was induced by intra-ductal infusion of 5% sodium taurodeoxycholate, and small intestinal impelling ratio were detected. Pancreatic lesion was scored. Whole mount samples of submucous plexus were prepared and stained with double immunofluorescence to observe the morphology of VIP neurons. The percentage of VIP neurons in the total neurons was calculated. **Results:** Compared with the control group, the small intestinal impelling ratio in the SAP group was significantly lower ($P < 0.01$), the score of pancreatic lesion was remarkably higher ($P < 0.01$), the VIP neurons were bigger and more deeply stained, and the nerve fibers between ganglions of the VIP were thicker, and the percentage of VIP neurons was significantly higher ($P < 0.01$). **Conclusion:** A high expression level of VIP neurons in colonic submucous plexus may be one of the nervous mechanisms underlying gastrointestinal dysmotility in SAP rats.

[Key words] acute pancreatitis; gastrointestinal motility; dysfunction; vasoactive intestinal peptide

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(2): 183-187]

目前认为,胃肠功能障碍是急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)并发感染及多脏器功能衰竭(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)的促发因子和诱使 AP 向重症急性胰腺炎(severe acute pancre-

atits, SAP)转化的重要因素,胃肠动力的恢复亦被视为 SAP 胃肠功能衰竭缓解的关键环节^[1-2]。近年研究发现^[2],肠神经系统(enteric nervous system, ENS)可通过神经元重塑以及改变神经肽的表达来调控胃肠道运动。Wang 等^[3]以往的研究已发现,SAP 患者胃排空和胃肠蠕动减慢,同时伴有血清血管活性肠肽(vasoactive intestinal peptide, VIP)水平升高,胃动素(MTL)、缩胆囊素(CCK)下降。徐敏等^[4]认为,

[基金项目] 广西壮族自治区卫生厅中医药科技专项基金资助(GZKZ10-125)

*通讯作者, E-mail: lin1955cn@163.com

SAP 患者血清中 VIP、MTL、CCK 激素变化的综合效应,导致 AP 时全结肠转运过程减慢,最终发生胃肠动力紊乱。但 SAP 伴胃肠动力障碍时结肠黏膜下 VIP 神经元的变化迄今尚缺乏结论。本实验利用全层铺片法制作结肠黏膜下神经丛标本,通过观察 SAP 伴胃肠动力障碍大鼠模型胰腺病理评分及小肠推进比和结肠黏膜下神经丛标本中的 VIP 阳性神经元的表达变化,进而对 SAP 大鼠胃肠动力障碍的可能成因加以探讨,希冀对临床认识与治疗 SAP 伴胃肠功能障碍有所裨益。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 20 只,重量为 200~250 g,购自桂林医学院动物中心,用抽签法将其随机分为 SAP 组及对照组各 10 只。

1.1.2 药物与试剂

实验用牛磺胆酸钠(sodium taurocholate)购自美国 Sigma 公司,使用时用生理盐水配成 5%牛磺胆酸钠溶液;anti-human neuronal protein HuC/HuD(anti-HuC/HuD)购自美国 Molecular Probes 公司;兔抗大鼠 VIP 抗体(H-95)购自美国 Santa Cruz 公司;TRITC 标记山羊抗兔 IgG(H+L)、FITC 标记山羊抗小鼠 IgG(H+L)购自北京中杉金桥生物技术有限公司;台盼蓝购自美国 Sigma 公司。

1.1.3 实验仪器

解剖显微镜 stemi 2000-CS, SIP NO.MIC 00945 [蔡司光学仪器(上海)国际贸易有限公司];OLYMPUS 正置荧光显微镜(日本奥林巴斯仪器公司)。

1.2 方法

1.2.1 SAP 建模

实验前大鼠禁食 24 h,自由饮水,术前 4 h 禁水,采用低浓度乙醚吸入式麻醉,于腹壁正中沿腹白线开腹,辨认胰胆管及十二指肠乳头开口,在开口对侧肠壁上选一无血管区,用磨钝的 4 号半头皮针刺入,经十二指肠乳头开口处滑行探入胰胆管,顺其走向推进 2~3 mm 后,用动脉夹固定胰胆管开口处针头并夹闭近肝门部胆管,接微量输液泵以 3 ml/h,1 ml/kg 的速度加压逆行泵入 5%牛磺胆酸钠,3~5 min 注射完,停止泵入牛磺胆酸钠,维持 5 min 后,松开动脉夹,拔针。此时观察可见胰腺充血、水肿、胰胆管扩张。将肠管复位,分层关腹;术后皮下补充生理盐水 10 ml。对照组大鼠仅在开腹

后翻动十二指肠,其余步骤同上。

1.2.2 测定胃肠传递时间

大鼠术后 24 h 灌服质量浓度 10 g/L 台盼蓝 1.5 ml,30 min 后开腹,测定台盼蓝被推进的长度(从幽门计起)与小肠全长之比,用传递指数(TI)表示^[5]。

1.2.3 胰腺组织病理学检查

大鼠于造模 24 h 后处死,开腹观察腹腔内腹水情况、皂化情况及胰腺的大体改变,取胰尾部胰腺放入 4%甲醛中固定,常规石蜡包埋、切片,HE 染色,光镜下观察病理变化,胰腺病理评分(pathological scores of pancreas, PSP)参照 Schmidt 评分方法^[6],水肿:正常 0 分,小叶间隔局灶性扩张 1 分,小叶间隔广泛扩张 2 分,腺泡间隔扩张 3 分,细胞间隔扩张 4 分。炎性细胞(炎性细胞数/高倍视野):无 0 分,1~10 个 1 分,11~20 个 2 分,21~30 个 3 分,>30 个或小脓肿形成 4 分。腺细胞坏死(坏死细胞数/高倍视野):无 0 分,1~4 个 1 分,5~10 个 2 分,11~16 个 3 分,>16 个 4 分。出血:无出血 0 分,有出血 1 分。由同一病理医师单盲检查评分。

1.2.4 结肠黏膜下神经丛标本的制作

大鼠处死开腹后,取近幽门端结肠组织约 4 cm,沿肠系膜剪开。提前备好一透明硅胶板,放入盛有冰 Krebs 液的平皿中,将结肠组织平铺在硅胶板上,大头针固定边缘,在解剖显微镜下先从标本边缘开始,将黏膜下层与肌层完整剥离开,再将所得黏膜下层组织的黏膜面朝上,大头针固定于硅胶板上,显微镜下可见肠黏膜与黏膜下层结合疏松,用眼科镊小心剔除肠黏膜,从而获得结肠黏膜下神经丛的全层铺片标本,此制作过程中应及时更换 Krebs 液,保证其低温,Krebs 液必须浸没组织。将制成的标本平铺,四角用大头针固定后立即放入 Stefanini 液中,4℃固定 24 h 后,用 0.1 mol/L 磷酸缓冲液(PBS)仔细漂洗,保存-20℃冰箱中,准备进行双重免疫荧光染色。

1.2.5 双重免疫荧光染色

将制备好的结肠膜下神经丛标本用含 0.5% TritonX-100、10%正常山羊封闭血清的 PBS 于室温(22℃)下孵育 30~60 min;用兔源的 VIP 抗体(1:100)4℃孵育 24 h;用小鼠来源的 anti-HuC/HuD(10 μg/ml)4℃孵育 24 h;将标本置于 TRITC 标记的山羊抗兔 IgG(1:350)以及 FITC 标记的山羊抗小鼠 IgG(1:100)于室温(22℃)下分别孵育 45 min;甘油封片。孵育时,液面必须盖过标本,每道程序后均用

PBS 洗涤 3 次,每次 10 min。

1.2.6 染色结果判断

用神经元标志物 Hu 蛋白的抗体标记所有神经元,用 VIP 抗体标记 VIP 阳性神经元;用 TRITC (红)、FITC(绿)标记的二抗显示不同的一抗;用荧光显微镜观察并计数各自阳性细胞数,计算每 200 个神经元细胞中 VIP 阳性神经元细胞所占百分比。

1.3 统计学方法

采用 SPSS17.0 进行数据分析。分别进行正态分布检验,然后进行 *t* 检验,数据用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠一般情况

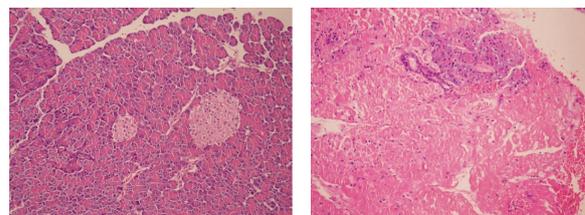
对照组大鼠一般情况良好,术后无死亡发生;SAP 组大鼠 24 h 内死亡 2 只,其余大鼠一般状况均较差,出现精神萎靡、反应迟钝、懒动、呼吸急促等表现。

2.2 胰腺组织大体改变

SAP 组大鼠诱导 10 min 后胰腺呈现广泛被膜下出血水肿,24 h 开腹见胰腺组织广泛出血坏死,范围扩大,胰腺周围大网膜及腹膜有较多皂化斑点,腹腔内大量腹水。对照组 24 h 后胰腺肉眼观呈淡粉红色,颜色均匀一致。

2.3 组织病理学观察

光镜下可见 SAP 组小叶排列紊乱,其间大量炎症渗出;胰腺腺泡细胞肿胀及灶性坏死,腺泡细胞间有大量炎症细胞浸润;坏死区内腺泡结构消失,胞核溶解;叶间隙增宽,间质微血管破裂,大量红细胞溢出;对照组胰腺结构正常(图 1)。SAP 组与对照组胰腺病理评分有显著差异($P < 0.05$,表 1)。



对照组 SAP 组
图 1 胰腺组织病理改变(HE,× 200)

Figure 1 Pathologic changes of pancreatic lesion(HE,× 200)

2.4 大鼠结肠黏膜下神经丛标本的染色情况

荧光显微镜下,大鼠结肠黏膜下神经丛主要由神经节和神经纤维构成。经 anti-HuC/HuD 染色后神经细胞清晰可见,胞质与胞核均呈绿色,形态多样,呈卵圆形、三角形及不规则形,簇状分布,神经纤维不着色。经 VIP 染色后可见神经细胞胞质呈红色,胞体大小不等,形态多样,胞核不着色,神经细胞簇状分布,神经细胞簇之间有条索状神经纤维相连。SAP 组与对照组相比,VIP 神经元所占比例明显增加(图 2,表 1)。

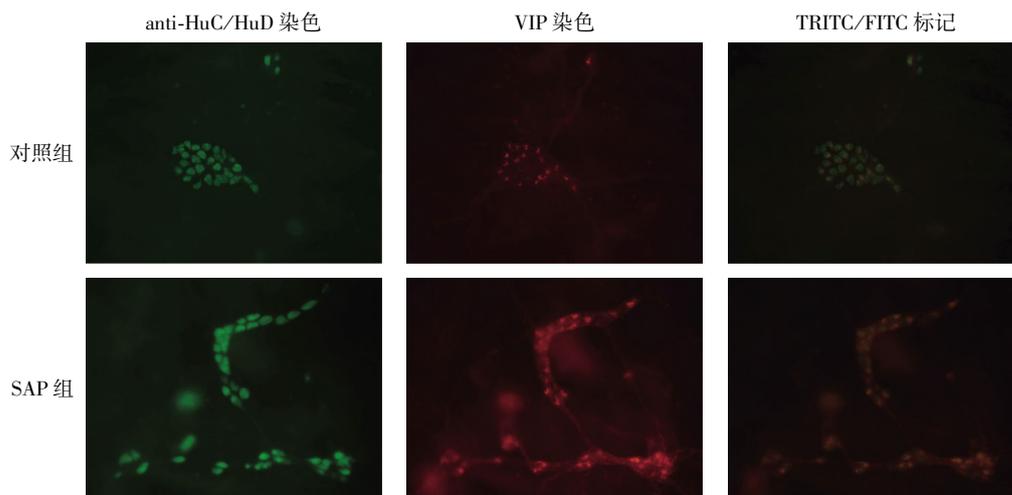


图 2 大鼠结肠黏膜下丛神经节双重免疫荧光观察(× 200)

Figure 2 Double immunofluorescence stain of submucous plexus(× 200)

2.5 大鼠胃肠运动情况

本组造模 24 h 后通过台盼蓝灌胃测定小肠推进比,结果 SAP 组 TI(28.89 ± 4.61)远慢于对照组大鼠(63.17 ± 4.11 , $P < 0.05$,表 1),表明 SAP 组大

鼠肠功能减退,肠动力受抑明显。

3 讨论

VIP 是迄今 ENS 中最具代表和研究最为深入

表 1 大鼠小肠推进比、胰腺病理评分、VIP 阳性神经元比例

Table 1 The small intestinal impelling ratio, the score of pancreatic lesion and the percentage of VIP neurons between two

groups		$(\bar{x} \pm s)$		
组别	n	胰腺病理评分(分)	VIP 阳性神经元表达(%)	TI
对照组	10	1.7 ± 0.7	55.69 ± 2.20	63.18 ± 4.11
SAP 组	8	15.6 ± 1.2*	73.48 ± 2.58*	28.89 ± 4.61*

与对照组相比, * $P < 0.05$ 。

的一种直链小分子神经多肽,因其在人体各器官和系统中分布广泛、功能多样,与许多临床疾病的发生发展尤其是胃肠动力紊乱方面关系密切,日益为国内外学者所重视^[7-9]。在消化系统,作为来自 ENS 的抑制性神经元^[9],VIP 主要由胰腺和肠道非肾上腺素非胆碱能(NANC)神经元释放,且在整个消化道全层均有表达,以结肠黏膜下神经丛中表达最多。VIP 既作为一种胃肠道激素调节胃肠功能,同时又是 NANC 神经的主要递质,通过 cAMP 依赖的蛋白激酶途径和一氧化氮(NO)相关性途径来介导胃肠平滑肌的运动,引起胃排空减慢、参与结肠的节段非推进性运动和维持胃肠道规律的蠕动调节等作用^[10],且具血管舒张、抗炎、免疫调节、激素分泌等多种重要功能^[8],还在损伤诱导的神经可塑性方面发挥作用。本研究组曾利用大鼠小肠肌间神经丛神经元和结肠平滑肌细胞体外共同培养发现^[11],VIP 阳性神经元在体外培养中发生了重塑,其分泌的 VIP 可抑制肠平滑肌增殖。ENS 是控制胃肠运动的一个重要的整合系统,包括胃肠道的肌神经丛和黏膜下神经丛的神经节细胞。人体应激时,ENS 神经元可发生数目的增减和神经递质的改变,从而重新获得合成某些递质的功能或者诱使某些神经递质上调或下调,即 ENS 的重塑,以此调控着胃肠运动^[12]。如 ENS 重塑致使 VIP 神经递质分泌过度时,肠运动受到抑制,平滑肌舒张且增殖减少,即可引起胃肠动力紊乱。

SAP 是临床常见的急腹症之一,在早期即可引起胃肠功能衰竭,进而发展为 MODS 或全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS),胃肠功能紊乱导致肠的正常菌群易位和肠源性内毒素血症引起的“二次打击”是导致 MODS 与 SIRS 的始动及促发因素^[13]。其中,ENS 作为控制胃肠运动的重要整合系统,ENS 的重塑以及由此引起的神经递质分泌紊乱在此过程中发挥了重要作用,已引起国内外研究者的高度重视。本研究组业已报道^[14],SAP 大鼠回肠肌间神经丛存在 ENS 重塑,抑制性神经元——一氧化氮合酶(NOS)阳性神

经元表达增高。本组实验采用经典的逆行胰胆管注射牛磺胆酸钠方法建立 SAP 大鼠模型^[15],24 h 处死大鼠后进行胰腺病理学检测,证明造模成功,后通过测定小肠推进比来确立大鼠肠功能存在减退。选用染色特异性强,重复性好的 Hu 蛋白作为神经元标志物显示结肠黏膜下全部肠神经元,选用双重免疫荧光法测定 VIP 神经元的阳性率,结果进一步显示 SAP 大鼠肠黏膜下 VIP 神经元阳性率增高,提示结肠黏膜下 ENS 亦存在神经元重塑现象,增多的 VIP 神经元释放更多的 VIP,从而舒张肠道平滑肌,引起肠运动紊乱。台盼蓝灌胃测定小肠推进比,结果显示 SAP 组远慢于对照组,表明 SAP 组大鼠肠功能减退,肠动力受抑明显。以上实验虽观察的仅为血清 VIP 水平,鉴于血清 VIP 部分来源于 ENS,故可推定 SAP 患者血清 VIP 升高与 ENS 重塑相关。本实验观察到,ENS 重塑引起增多的 VIP 阳性神经元释放更多的抑制性神经递质 VIP,从而舒张肠道平滑肌,引起肠运动紊乱。

目前关于 VIP 的研究仍有许多悬而未决的问题,首先,VIP 神经元表达增加的神经细胞来源尚不清楚;关于 VIP 的作用机制,有学者认为 NOS 与 VIP 共存于 ENS 中,但也有人认为 VIP 对肠动力的抑制作用与 NO 无关;VIP 与 NOS 神经元之间及其与不同神经元之间的相互作用关系,目前尚未达成共识。在临床用药方面,不少学者希望利用 ENS 作为靶点来调控相关基因如 VIP 的表达,从而治疗 ENS 重塑引起的兴奋性和抑制性神经元失衡有关的疾病。这一想法虽为临床治疗提供了新的思路,但在实践方面仍然存在着 VIP 代谢稳定性差、对作用位点的穿透力弱等一系列相关问题^[16],有待进一步深加探讨。

[参考文献]

- [1] Fu CY, Yeh CN, Hsu JT, et al. Timing of mortality in severe acute pancreatitis: Experience from 643 patients[J]. World J Gastroenterol, 2007, 13(13): 1966-1969
- [2] 刘颖,林中,胡琼花. 肠神经系统与重症急性胰腺炎胃肠动力紊乱机制的研究进展[J]. 临床消化病杂志, 2009, 21(3): 190-191

- [3] Wang X, Gong Z, Wu K, et al. Gastrointestinal dysmotility in patients with acute pancreatitis [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2003, 18(1): 57-62
- [4] 徐敏, 王兴鹏, 袁耀宗. 急性胰腺炎患者胃肠动力的变化及其机制研究 [J]. *中华急诊医学杂志*, 2002, 15(11): 327-330
- [5] Yasuda T, Takeyama Y, Ueda T, et al. Breakdown of intestinal mucosa via accelerated apoptosis increases intestinal permeability in experimental severe acute pancreatitis [J]. *J Surg Res*, 2006, 135(1): 18-26
- [6] Yasuda T, Ueda T, Takeyama Y, et al. Long-term outcome of severe acute pancreatitis [J]. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*, 2008, 15(4): 397-402
- [7] Shi XZ, Sarna SK. Homeostatic and therapeutic roles of VIP in smooth muscle function; myo-neuroimmune interactions [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2009, 297(4): G716-725
- [8] Fahrenkrug J. VIP and PACAP [J]. *Results Probl Cell Differ*, 2010, 50(2): 221-234
- [9] Rudholm T, Wallin B, Theodorsson E, et al. Release of regulatory gut peptides somatostatin, neurotensin and vasoactive intestinal peptide by acid and hyperosmolar solutions in the intestine in conscious rats [J]. *Regul Pept*, 2009, 152(1-3): 8-12
- [10] Lu Y, Owyang C. Secretin-induced gastric relaxation is mediated by vasoactive intestinal polypeptide and prostaglandin pathways [J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2009, 21(7): e754-747
- [11] 林中, 张剑波, 赵永忠, 等. 小肠肌间神经丛神经元体外培养抑制肠平滑肌细胞的增殖 [J]. *世界华人消化杂志*, 2008, 16(14): 1577-1580
- [12] di GA, Vitari F, Bosi G, et al. The chemical code of porcine enteric neurons and the number of enteric glial cells are altered by dietary probiotics [J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2010, 22(9): e271-e278
- [13] Moore FA. Presidential address: imagination trumps knowledge [J]. *Am J Surg*, 2010, 200(6): 671-677
- [14] 刘颖, 林中, 胡琼花, 等. 伴有胃肠动力障碍的重症急性胰腺炎大鼠结肠肌间神经丛一氧化氮合成酶神经元的变化 [J]. *第三军医大学学报*, 2010, 32(3): 274-277
- [15] 张明钧, 姚玮艳, 乔敏敏, 等. 肠壁穿刺逆行胰胆管注射牛黄胆酸钠重症急性胰腺炎造模 [J]. *上海交通大学学报(医学版)*, 2006, 26(5): 488-490
- [16] Onoue S, Misaka S, Yamada S. Structure-activity relationship of vasoactive intestinal peptide (VIP): potent agonists and potential clinical applications [J]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2008, 377(4-6): 579-590

[收稿日期] 2011-07-31

欢迎投稿 欢迎订阅