

脊髓损伤后大鼠结肠血管活性肠肽能神经元表达的变化*

龙志华¹ 徐青^{1,2} 王磊¹ 刘文国¹

摘要

目的:分析大鼠脊髓损伤(SCI)后结肠壁病理结构及结肠肌间神经丛内血管活性肠肽能(VIP)神经元表达变化,探讨脊髓损伤所致神经源性肠道功能障碍(NBD)的病理机制。

方法:实验动物分为假手术组、非NBD(对照组)和NBD(模型组);大鼠氯胺酮(60mg/kg)腹腔注射麻醉,利用N YU脊髓打击器,以75gcm致伤力制作第10胸椎节段(T10)SCI模型,手术切除大鼠结肠组织制作标本,采用HE染色法观察结肠壁病理结构,实时逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)和Western blot法检测VIP在mRNA和蛋白水平的表达变化。

结果:大鼠SCI后结肠黏膜充血、水肿、糜烂,绒毛减少、倒伏、脱落,结肠组织中VIP的mRNA及蛋白表达水平显著下调,与假手术组、对照组相比差异具有显著性($P<0.05$)。

结论:结肠VIP能神经元表达变化可能是导致大鼠SCI后NBD的病理机制之一。

关键词 脊髓损伤;血管活性肠肽;神经源性肠道功能障碍

中图分类号:R651.2,R493 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2012)-02-0103-04

Study on the change of vasoactive intestinal peptidergic neurons expression in rat's colon following spinal cord injury/LONG Zhihua, XU Qing, Wang Lei, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2012, 27(2): 103—106

Abstract

Objective: To analysis the pathological structure of colon wall and the change of myenteric plexus' vasoactive intestinal peptidergic(VIP) neurons expression, and to explore the pathological mechanism of neurogenic bowel dysfunction(NBD) after spinal cord injury (SCI) in rats.

Method: Experimental rats were divided into sham group, non-NBD control group and NBD model group. Weight-drop SCI model was made at T10 segment of rat with N YU impactor device. Colon tissues of rats were resected and the tissue's pathological structure change by HE dyeing were observed. Colon tissue was examined by real-time RT-PCR and Western blot to analyze the expression of VIP.

Result: In model group, the colon intestinal transmission function decreased, and the colonic mucosal hyperemia, edema, erosion, villi reducing, lodging and falling-off were observed, and the colon tissue's VIP mRNA and protein expression level declined significantly. Compared with sham group and control group, there was significant difference ($P<0.05$).

Conclusion: SCI may result in the change of myenteric plexus' VIP neurons expression. It is probably one of the pathological mechanisms of NBD after SCI in rats.

Author's address Department of General Surgery, Beijing Boai Hospital, Capital Medical University School of Rehabilitation Medicine, Beijing, 100068

Key word spinal cord injury; vasoactive intestinal peptide; neurogenic bowel dysfunction

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2012.02.002

*基金项目:中国康复研究中心青年基金项目(2009-Q4)

1 首都医科大学康复医学院,中国康复研究中心北京博爱医院,100068; 2 通讯作者

作者简介:龙志华,男,硕士,主治医师; 收稿日期:2011-08-16

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)后所导致的神经源性肠道功能障碍(neurogenic bowel dysfunction, NBD)对患者生理和心理的影响日益明显,是影响脊髓损伤患者生存质量的主要原因之一^[1-3]。NBD的发病机制目前尚不完全明确,可能与肠神经系统病变有关。血管活性肠肽能(vasoactive intestinal peptidergic, VIP)神经元是肠道内一种重要的肽能神经元,对胃肠的运动功能起着重要的调节作用。为明确SCI后是否导致结肠神经丛内VIP能神经元的改变,我们通过建立SCI大鼠模型,从结构(组织学、蛋白、分子水平)与功能两方面,探讨NBD的发生机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 动物:健康SD雄性大鼠(编号:RD008)30只,体重220g左右,SPF级,购于军事医学科学院实验动物部。饲养条件:室温16—25℃,相对湿度50%—70%,分笼饲养,环境清洁安静。

1.1.2 主要试剂:粉末活性炭(分析纯)购于台山市;BCA Protein Assay Kit购自Pierce公司(美国);SYBR Green PCR Master Mix购自ABI公司(美国);抗VIP抗体、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG、化学发光试剂盒购至Santa Cruz公司(美国);辣根过氧化物酶标记的抗GAPDH抗体购自中国康成公司;M-MLV逆转录试剂盒购自Invitrogen公司(美国);RNeasy Mini Kit购自Qiagen公司(德国)。苏木素伊红(HE)染色试剂盒购于碧云天生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 动物分组:假手术组10只、非NBD对照组10只、NBD模型组10只,各组间大鼠体重质量差异无显著性意义($P>0.05$),具有可比性。饲养1周后开始建立脊髓损伤模型。

1.2.2 脊髓损伤动物模型制作:大鼠氯胺酮(60mg/kg体重)腹腔注射麻醉,利用N YU脊髓打击器(美国,纽约大学),以75gcm致伤力制作第10胸椎节段(T10)脊髓损伤模型^[4]。脊髓损伤模型成功的标志为:在打击器撞击脊髓的瞬间,动物身体抖动,双下肢迅速回缩并出现弹动动作,尾巴翘起并迅速倒下,打

击局部脊髓表面迅速呈瘀紫色,术后双下肢出现完全瘫痪。假手术组大鼠同法暴露T10段脊髓,但不造成脊髓打击伤。

1.2.3 取材:手术后大鼠用普通饲料饲养3周,禁食24h后,经口灌入活性炭悬液10ml/kg体重(悬液浓度100g/L),30min后氯胺酮(60mg/kg体重)腹腔注射麻醉,立即剖腹取出幽门到直肠末端的全部肠管并测量。迅速切取结肠中段肠管,用生理盐水冲去肠内容物以及黏膜表面黏附的粪便、分泌物及血液后,将结肠壁组织切成1.5mm³的小块,一部分样本浸入10%福尔马林液固定。同时将剩余样本迅速置于-80℃冰箱内保存,用于提取结肠组织总RNA和蛋白。

1.2.4 肠道传输功能测定:采用活性炭悬液推进法,在无张力状况下用直尺测量肠道全长及活性炭混悬液在肠道内推进长度,并计算活性炭悬液推进长度占肠道全长的百分比(黑染肠管长度/肠道总长度×100%),最后计算每组的平均值^[5]。

1.2.5 实时荧光定量逆转录-聚合酶链反应(real time RT-PCR):①组织总RNA的提取:按照QIA-GEN® RNeasy Mini Kit说明书的操作方法提取结肠组织总RNA,并用紫外分光光度计检测RNA的浓度及纯度。②逆转录方法制备cDNA:将稀释后的总RNA(2μg)、Oligo(dT)15(0.5μl)、10mM dNTP(1μl)、超纯水(6.5μl),依次加入PCR反应管中,65℃反应5 min,立即转入冰浴中,短暂离心后,加入5×第一链缓冲液(4μl),0.1 mM DTT(二硫苏糖醇2μl)、M-MLV(200units)(1μl)、超纯水(1μl),轻轻混匀,短暂离心,37℃,50min;70℃,15min终止反应,冰浴冷却,并以不加逆转录酶的反应体系作为阴性对照。③绘制引物标准曲线:根据VIP的cDNA序列,通过Primer Express 3.0软件设计引物。以某一个样本的4个不同量的cDNA为模板(100ng、50ng、25ng、10ng)做实时荧光定量聚合酶链反应(ABI 7300),反应条件:95℃,10min后;95℃,15s;60℃,1min,共50个循环。将所获得的PCR产物进行熔解曲线分析。将每个反应的Ct值与其cDNA加入量(ng)的Lg值进行线性相关分析,计算其斜率,当斜率在-3.6—-3.0范围内时,认为该反应的Ct值与相对应的模板量呈对应关系。故选取斜率位

于-3.6—-3.0的引物序列待用。④样本测定:使用选定的引物对样本做实时 PCR 反应,将检测的临界点设定在PCR扩增过程中,荧光信号由本底进入指数增长阶段的拐点所对应的循环数(Ct)作为模板初始浓度的间接指标,熔解曲线分析采用默认条件。结果用 18S RNA 进行校正。用 DCt 法计算相对基因表达,确定 VIP mRNA 的相对浓度。在实时定量分析中所得的荧光值可以反映目的产物的含量,各组所测得 VIP 的 Ct 值与 18S RNA 的 Ct 值的差值为 DCt。各实验组的 DCt 与对照组 DCt 值的差值为 DDCt。⑤Western blot 检测:在 4℃条件下,加入裂解液提取结肠组织中的蛋白,用 BCA Protein Assay Kit 测定样品蛋白含量。每个样本取 50μg 蛋白进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳并转至 PVDF 膜上,用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 溶液封闭 4h,加入 1:500VIP 兔多克隆抗体于 4℃孵育过夜,TBST 漂洗 2 次,每次 5min,加入 1:10000 辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG,室温孵育 1h,TBST 漂洗 6 次,每次 5min,将膜用化学发光试剂孵育 1min,于 X 胶片上曝光,常规显影、定影。洗膜后孵育 GAPDH 单克隆抗体作为内参,将结果用 Genetools 软件(PerkinElmer)进行密度分析。⑥大鼠结肠组织病理学评估:取结肠组织,10%福尔马林液固定 24h,脱水、透明、浸蜡后包埋组织,切片后进行 HE 染色,镜下观察。

1.3 统计学分析

用 SPSS11.5 统计软件进行统计分析,计量资料用均数 ± 标准差表示,两组间比较采用 t 检验;P<0.05 被认为有显著性差异。

2 结果

2.1 肠道传输功能测定

模型组术后有 1 例无肠道功能障碍(便秘及腹胀),1 例因术后感染死亡,其余 8 例动物(NBD)与假手术组(sham)动物结肠长度差异无显著性,对照组(non-NBD)与假手术组动物结肠长度差异也无显著性;而肠道传输功能与假手术组相比明显减慢,对照组与假手术组相比差异无显著性(P>0.05)。因此,出现 NBD 的脊髓损伤动物模型造成结肠肠道传输功能减慢。见表 1。

2.2 脊髓损伤后大鼠结肠组织中 VIP 基因 mRNA

表 1 两组结肠传输功能的比较 (x±s)

组别	数量	肠管长度(cm)	肠道传输功能(%)
假手术组	10	155.42 ± 6.55	58.56 ± 4.22
对照组	10	154.88 ± 6.59	58.03 ± 4.02
模型组	8	150.98 ± 10.51	36.21 ± 1.22

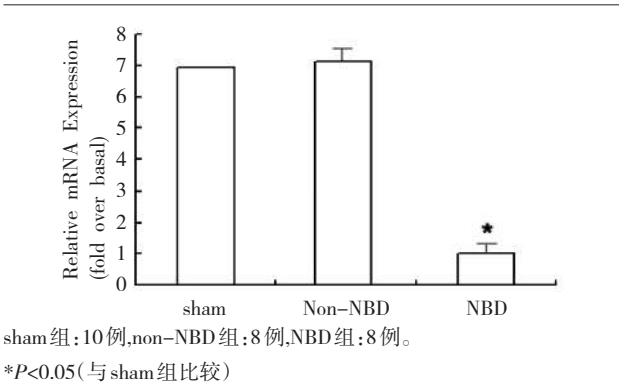
表达水平变化

选用表 2 所示的 VIP 引物序列测定大鼠结肠组织中 VIP 在 mRNA 水平的表达情况,结果显示,大鼠在脊髓损伤造模后,假手术组 VIP 的表达是肠道功能障碍组(NBD)的 6.92 ± 0.35 倍(P<0.05),而对照组与假手术组相比无显著性差异(P>0.05),见图 1。以上结果表明,脊髓损伤造成的肠道功能障碍导致结肠组织中 VIP 的 mRNA 表达水平显著下调。

表 2 VIP 引物序列

Gene Type	Sequence(5' - 3')
VIP	F:AAGAATCTCTGATCTTCAG
	R:GCTGCAGTTCGAAGGACGAC

图 1 VIP 基因 mRNA 在各组结肠组织中的表达



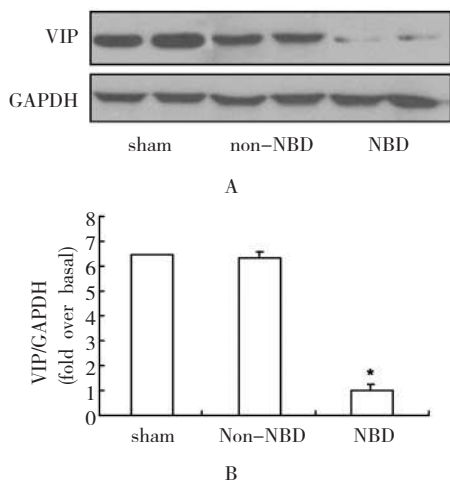
2.3 脊髓损伤后大鼠结肠组织中 VIP 蛋白表达水平变化

结果显示,大鼠在脊髓损伤造模后,假手术组(sham) VIP 的表达是 NBD 组的 6.48 ± 0.51 倍(P<0.05),见图 2,而对照组(non-NBD)与假手术组相比无显著性差异(P>0.05)。以上结果表明,SCI 造成的肠道功能障碍组中,结肠组织中 VIP 的蛋白水平出现显著下调。这些结果与 mRNA 水平测定情况基本吻合。

2.4 大鼠结肠组织病理学改变

见图 3。肉眼观察 sham 组与 non-NBD 组和 NBD 组的大鼠结肠壁外观没有明显区别。HE 染色

图2 VIP蛋白在各组大鼠结肠中的表达



sham组:10例,non-NBD组:8例,NBD组:8例,
* $P<0.05$ (与sham组比较)

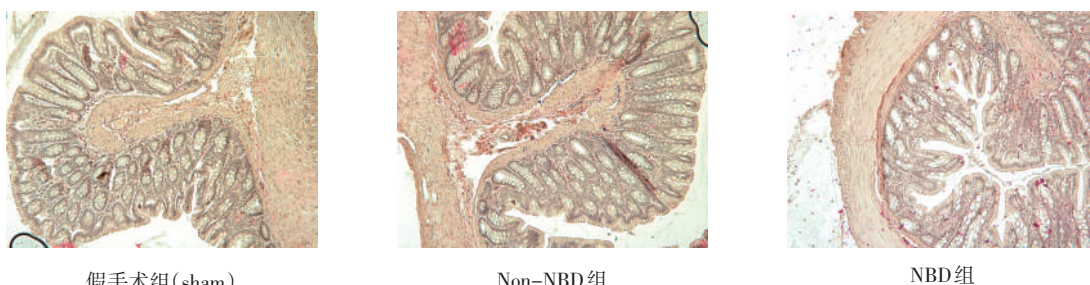
发现,Sham组与non-NBD组肠绒毛排列整齐,微绒毛形态均一整齐;NBD组肠黏膜出现充血、水肿及糜烂,绒毛减少、倒伏、脱落。

3 讨论

NBD是SCI后重要并发症之一。研究表明在SCI患者中高达1/3的人出现肠道功能障碍,主要表现为便秘、腹胀以及大便失禁^[6],而且41%的SCI患者认为肠道功能障碍严重影响他们的生存质量。由于其发病机制并不明确,临床治疗效果并不理想。为研究NBD的发病机制,本实验首先制备了大鼠SCI模型,与SCI患者相似,在成功建立的9例模型中有8例大鼠出现了不同程度的便秘及腹胀,患有NBD的比例高达89%,这为下一步实验奠定了良好的基础。

图3 大鼠结肠壁组织结构

(HE, $\times 10$)



假手术组(sham)

Non-NBD组

NBD组

进一步研究发现SCI后大鼠结肠肠黏膜充血、水肿、糜烂;绒毛出现减少、倒伏和脱落,而且传输功能明显减慢,提示结肠运动功能出现障碍。近年来研究发现肠神经系统和肠神经递质参与了肠道运动功能的调节,脊髓损伤后结肠运动功能障碍可能与之相关。肠神经系统(enteric nervous system,ENS)有“肠道的大脑”之称,能不需中枢神经系统的支配独立行使其功能,例如控制肠道的运动、内分泌和外分泌、胃肠道的微循环等,也参与胃肠道的免疫及炎症反应等^[7-8]。ENS具有复杂多样的神经成分,这些神经成分的增多或减少均会引起结肠正常的运动功能发生改变。其中VIP是ENS中重要的肽类神经递质之一,广泛分布于肠道和神经系统,并以结肠中含量最高,主要由肠道VIP能神经元释放,对胃肠的运动功能起着重要的调节作用,与多种胃肠道疾病(例如便秘)密切相关。有人运用免疫荧光染色方法及

免疫组化技术对比了4例SCI患者和7例非SCI患者的手术后结肠标本肌间神经丛VIP能神经元和SP能神经元的分布与形态学变化,通过初步的定性观察认为两组无明显差别^[9]。但由于此实验只是一个初步的定性观测,而且研究的标本量也非常有限。因此,我们利用实时PCR和Western blot方法检测脊髓损伤后大鼠结肠组织中VIP的表达情况,结果显示结肠组织中VIP的mRNA和蛋白表达均明显下调。

研究已证明,VIP在胃肠运动调节中主要起抑制效应,可通过直接作用于胃肠平滑肌上的VIP受体发挥作用。VIP作为一种抑制性神经递质,主要支配结肠的下行性抑制反射,与结肠的节段非推进性运动有关,它的减少会导致结肠节段非推进性运动的增多,使结肠出现过度的节段性蠕动,这些肠段

(下转第119页)