

新生儿母婴分离对大鼠成年后结直肠扩张后 5-羟色胺表达的影响

任天华¹, 胡品津¹, 胡志远², 沈祖尧²

(1. 中山大学附属第一医院消化内科, 广东 广州 510080; 2. 香港中文大学威尔斯亲王医院内科及药物治疗学系, 香港)

摘要:【目的】观察新生儿母婴分离对大鼠成年后结直肠扩张后结肠中 5-羟色胺(5-HT)阳性细胞数目的影响, 探索肠易激综合征发病的神经机理。【方法】雄性新生 SD 大鼠随机分为母婴分离组; 出生后第 2~21 天给予每天母婴分离 3 h; 对照组: 出生后第 2~21 天不给予任何处理。成年后给予结直肠扩张, 取远端结肠进行 5-HT 免疫组化检测并定量分析。【结果】基础水平时, 母婴分离组结肠粘膜 5-HT 阳性细胞数目和对照组没有统计学差别 (288.1 ± 26.8 vs 286.9 ± 87.4 , $P = 0.966$); 结直肠扩张后, 母婴分离组 5-HT 阳性细胞数目显著增加, 对照组没有改变, 两组比较有统计学差别 (386.8 ± 38.0 vs 291.0 ± 62.4 , $P = 0.001$)。【结论】新生儿母婴分离使成年大鼠结直肠扩张时结肠粘膜 5-HT 阳性细胞数目显著增加, 提示早期负性生活事件可增强成年后对内脏伤害性刺激的神经反应, 这可能在 IBS 结肠运动和感觉异常的机制中起作用。

关键词: 母婴分离; 5-羟色胺; 肠易激综合征

中图分类号: R37

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2004)03-0234-03

Effect of Neonatal Maternal Separation on Serotonin Positive Cell Number in Colonic Mucosa After Colonic Distension in Adult Rats

REN Tian-hua¹, HU Pin-jin¹, HU Zhi-yuan², SHEN Zu-yao²

(1. Department of Gastroenterology, The First Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China; 2. Department of Medicine and Therapeutics, Prince of Wales Hospital, The Chinese University of Hong Kong, Hong Kong, China)

Abstract:【Objective】To study the effect of neonatal maternal separation on the number of colonic serotonin positive cells in adult rats treated with colonic distension and explore the neurochemical mechanisms in the pathogenesis of irritable bowel syndrome(IBS). 【Methods】Male neonatal SD rats were randomly divided into 2 groups: Maternal separation (MS) group exposed to a 3-hour daily maternal separation or Non-handling (NH) control group exposed to no handling on postnatal day 2-21. Balloon distension of colorectum was conducted in these rats in adulthood. Distal colons were then harvested for immunohistochemical and quantitative analysis of serotonin positive cells in colon mucosa. 【Results】Before colorectal distension, there was no significant difference in baseline serotonin positive cells number between the adult rats of MS and NH groups (288.1 ± 26.8 vs 286.9 ± 87.4 , $P = 0.966$); After colonic distension, serotonin positive cells number significantly increased in MS group but not in NH group (386.8 ± 38.0 vs 291.0 ± 62.4 , $P = 0.000$). 【Conclusions】Prior neonatal maternal separation leads to increase in serotonin positive cells in response to colonic distension in adulthood. This observation supports the notion that childhood adversity may heighten the neurochemical response to visceral nocio-

收稿日期: 2003-11-13

基金项目: Planning Grant for International Centers for Research on Complementary and Alternative Medicine (PICRC)(R21 AT001943), funded by National Institute of Health(NIH)

作者简介: 任天华(1975-), 男, 湖北荆门人, 博士生, 医师, E-mail: rentianhua@yahoo.com.cn

ceptive stimulus in adulthood, and thereby contribute to colonic dysmotility and hypersensitivity in IBS.

Key words: maternal separation; serotonin; irritable bowel syndrome

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2004, 25(3): 234 - 236]

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)是一种常见多发病,特征为缺乏病理学改变的慢性腹痛/不适伴排便习惯改变。IBS发病机理不甚清楚,近来其神经机理越来越受到重视^[1]。神经递质5-羟色胺(5-HT)在IBS发病机理中的作用越来越引人注目^[2-4]。本实验以新生儿母婴分离大鼠模型^[5,6]为研究对象,检测该模型远端结肠中5-HT阳性细胞的数目,探索IBS发病的神经机理。

1 材料和方法

1.1 研究对象及分组

雄性新生SD大鼠来自香港中文大学实验动物中心,每笼饲养10只新生大鼠和1只哺乳期母鼠,按随机数字表随机分为母婴分离组:出生后第2~21天(以出生当日为出生后第1天)给予每天母婴分离3h;对照组:出生后第2~21天不给予任何处理。

1.2 实验方法

1.2.1 母婴分离^[2] 将母鼠拎出放入一笼中,然后将新生大鼠放入另一笼中,移至另一邻近房间,放入温育箱中,保持温度在 $32.0\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。3h后将新生大鼠返回最初笼中与母鼠团聚。出生后第22天断奶,第30天分笼饲养。饲养环境为:每12h进行1次亮暗循环,自由饮水饮食。

1.2.2 结直肠扩张 大鼠成年后(出生后60d),给予异氟醚吸入麻醉,立即将带有气囊(乳胶手套制成,直径2.5cm,长6cm)的导管(Rigiflex Dilator,直径4mm)经肛门插入近端结肠,使气囊尾端距离肛门1cm,用胶带纸固定导管于鼠尾,导管经三通管连接注射器和血压计。待大鼠醒来适应环境30min后,经注射器给予气压快速球囊扩张,压力为80mmHg,共扩张10次,每次扩张维持20s,间隔2min。这代表一种伤害性内脏刺激。

1.2.3 免疫组化检测 成年大鼠在结直肠扩张后,立即经腹腔注射体积分数为7%的水合氯醛麻醉后,收获远端结肠(离肛门6-7cm),固定于40g/L多聚甲醛磷酸缓冲液中,4℃过夜,然后将组

织浸入体积分数为25%蔗糖磷酸缓冲液中24h,再冷冻包埋于OCT复合物中,贮存于-80℃冰箱中。需要时取出,在-20℃冷冻切片机中切片,每片厚10μm。切片用亲和素-生物素-辣根过氧化物酶复合物(ABC)方法进行免疫组化染色。一抗为兔抗大鼠5-羟色胺抗体1:4000,购自ALPHA DIAGNOSTIC,二抗和ABC复合物均来自Vectastain ABC试剂盒。阴性对照(用PBS代替一抗)结果为阴性。显微镜下取切片图像后,用Metamorph4.0软件参考文献^[7]计算单位面积结肠黏膜中5-HT阳性细胞数,即在显微镜5倍视野下摄取切片图像,选定摄取图像的黏膜层,计数黏膜层中的5-HT阳性细胞,结果表示为:黏膜层中5-HT阳性细胞数目/黏膜层面积($10^6/\mu\text{m}^2$ 黏膜)。图像分析者对各个组别的处理情况不知情,整个分析过程由一个分析者完成。

1.3 统计学处理

各组数据结果用均数±标准差表示,用SPSS10.0软件对多组样本均数进行方差分析。

2 结果

2.1 5-HT阳性细胞在结肠黏膜中的分布

正常大鼠结肠中5-HT阳性细胞呈棕黄色(图1),形态呈多形性,主要在结肠黏膜中成群分布。母婴分离组(16只)和对照组(16只)的5-HT阳性细胞分布部位没有明显差别。

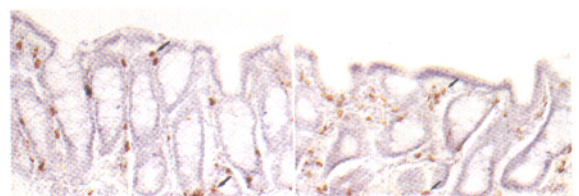


图1 5-HT阳性细胞在结肠黏膜中的分布

Fig. 1 The distribution of 5-HT positive cells in colon mucosa (20×)

2.2 5-HT阳性细胞在结肠黏膜中的数目

方差分析发现4组(各组n=8)均数有统计学

差别, $F = 8.71$, $P = 0.000$ 。基础水平时, 母婴分离组结肠黏膜 5-HT 阳性细胞数目和对照组没有统计学差别, 288.1 ± 26.8 vs 286.9 ± 87.4 , $P = 0.966$; 结直肠扩张后, 母婴分离组 5-HT 阳性细胞数目显著增加(图 1), 对照组没有改变, 两组比较有统计学差别, 386.8 ± 38.0 vs 291.0 ± 62.4 , $P = 0.001$ 。

3 讨 论

早期生活事件如童年忽视、失去父母和受虐待等可致成年后 IBS 发生的危险性增加^[5, 6, 8]。在动物, 新生儿母婴分离是一种早期负性生活事件, 近来报道^[5, 6], 采用新生儿母婴分离方法, 在大鼠模拟出 IBS 的主要特征: 结直肠扩张时内脏痛觉过敏和应激时结肠运动加强。

5-HT^[2], 95% 分布于胃肠道嗜铬细胞(90%)和肠神经元(5%), 对胃肠运动和感觉有广泛作用。肠嗜铬细胞释放 5-HT, 后者作用于肠神经元上的各种受体, 作用于运动神经元引起肠肌舒缩; 还可作用于肠内在感觉神经和外在初级感觉神经, 前者起始蠕虫反射, 后者参与内脏感觉的传入。近来有报道^[3], 腹泻为主型 IBS 女患者, 餐后血浆 5-HT 浓度升高, 可能与餐后症状有关; 5-HT 阳性细胞数目在感染后 IBS 患者结肠黏膜中增加^[9]。这些都提示肠嗜铬细胞异常释放 5-HT, 参与 IBS 发病机理。5-HT 受体调节剂对 IBS 患者的治疗作用已有较多报道^[2, 4], 5-HT₃ 受体拮抗剂改善腹泻为主型 IBS 患者的腹泻和内脏感觉过敏。

在本实验中, 新生儿母婴分离对结肠 5-HT 阳性细胞数目没有直接影响, 但是在结直肠扩张时, 引起 5-HT 阳性细胞数目显著增加, 鉴于母婴分离这种早期负性生活事件, 可引起中枢神经长期改变^[5, 6], 提示母婴分离可能致敏了脑-肠轴上其他神经化学通路, 从而导致内脏伤害性刺激时的肠 5-HT 反应异常, 支持早期负性生活事件可增强成年后对内脏伤害性刺激的神经反应的观点^[6]。母婴分离可能引起结肠扩张时结肠粘膜过量释放 5-HT, 导致 5-HT 阳性细胞代偿性增加, 过量的 5-HT 作用于肠内在、外在神经上的受体, 可能在

IBS 结肠运动和感觉异常的病理生理机制中起重要作用。

本实验仅检测了结肠中 5-HT 阳性细胞表达和分布, 而 5-HT 的代谢和作用机理很复杂, 并且在脑-肠轴上有多种神经递质参与胃肠运动和感觉的调节, 因此对于这些结果的解释也较为有限^[10]。有必要从脑-肠互动的高度去研究认识 IBS 的发病机理^[1]。

参考文献:

- [1] 胡品津. 从脑-肠互动的高度认识肠易激综合征[J]. 中华消化杂志, 2003, 23(5): 261-2.
- [2] Kim D Y, Camilleri M. Serotonin: a mediator of the brain-gut connection [J]. *Am J Gastroenterol*, 2000, 95(10): 2698-709.
- [3] Houghton L A, Atkinson W, Whitaker R P, et al. Increased platelet depleted plasma 5-hydroxytryptamine concentration following meal ingestion in symptomatic female subjects with diarrhoea predominant irritable bowel syndrome [J]. *Gut*, 2003, 52(5): 663-70.
- [4] Camilleri M. Serotonergic modulation of visceral sensation: lower gut [J]. *Gut*, 2002, 51, Suppl 1: 181-6.
- [5] Mayer E A, Collins S M. Evolving pathophysiologic models of functional gastrointestinal disorders [J]. *Gastroenterology*, 2002, 122(7): 2032-48.
- [6] Coutinho S V, Plotsky P M, Sablad M, et al. Neonatal maternal separation alters stress-induced responses to viscerosomatic nociceptive stimuli in rat [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2002, 282(2): G307-16.
- [7] Swatek J, Chibowski D. Endocrine cells in colorectal carcinomas. Immunohistochemical study [J]. *Pol J Pathol*, 2000, 51(3): 127-36.
- [8] Mayer E A, Naliboff B D, Chang L, et al. Stress and irritable bowel syndrome [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2001, 280(4): G519-24.
- [9] Spiller R C. Postinfectious irritable bowel syndrome [J]. *Gastroenterology*, 2003, 124(6): 1662-71.
- [10] Cremonini F, Camilleri M. Of actors, bolting horses, and drops in oceans! [J]. *Gut*, 2003, 52(5): 619-21.

(编辑 黄小延)