

甘肃鼯鼠胃肠道肌间神经丛一氧化氮合酶阳性神经元的分布

谢惠春 杨佐娟 李金钢 何建平*
(陕西师范大学生命科学院 西安 710062)

摘要: 用 NADPH 黄递酶组织化学法及整装铺片技术, 对甘肃鼯鼠 (*Myospalax cansus*) 胃肠道肌间神经丛 NOS 阳性神经元的分布进行研究。结果显示, 甘肃鼯鼠胃肠道肌间神经丛 NOS 阳性神经元分布广泛, 形态多样, 神经元大小不同, 阳性神经节与阳性神经纤维束形成网络; 胃肠道不同部位 NOS 阳性神经元密度有差异, 结肠最高, 直肠次之。从十二指肠至回肠段, NOS 阳性神经元密度整体呈上升趋势; 胃与空肠、十二指肠与盲肠间 NOS 阳性神经元密度无显著差异, 其他各段之间差异显著。甘肃鼯鼠胃肠道肌间神经丛 NOS 阳性神经元分布与其他已研究动物的分布模式基本一致。

关键词: 甘肃鼯鼠; 胃肠道; 肌间神经丛; 一氧化氮合酶

中图分类号: Q954 文献标识码: A 文章编号: 0250 3263(2008)03-50-06

Distribution of Nitric Oxide Synthetase positive Neurons in Gastrointestinal Myenteric Plexus of Gansu Zokor

XIE Hui-Chun YANG Zuor Juan LI Jirr Gang HE Jiar-Ping*
(College of Life Science, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China)

Abstract NADPH diaphorase histochemistry and whole mount preparation technique were used to investigate the distribution of NOS positive neurons in gastrointestinal myenteric plexus of Gansu Zokor (*Myospalax cansus*). The results showed that NOS positive neurons with different shapes and sizes were widely distributed in the Gansu Zokor's gastrointestinal myenteric plexus. The positive ganglion and positive nerve fibers formed a complex meshwork. There were significant differences in the density of NOS positive neurons among gastrointestinal tract segments except for Stomach Ileum and Duodenum Cecum. The density trend was: colon > small intestine > stomach > caecum. The NOS positive neurons increased from duodenum to ileum. The results suggest that the distribution of NOS positive neurons in gastrointestinal myenteric plexus of Gansu Zokor is in similar pattern with that of other animals.

Key words: Gansu Zokor (*Myospalax cansus*); Gastrointestinal tract; Myenteric plexus; Nitric oxide synthetase

动物消化道形态结构的适应性变化是动物适应环境的重要策略之一, 与其食性、食物质量及能量需求等密切相关。消化道适应性变化的调节有神经调节、体液调节及消化道的自身调节。动物消化道的神经支配非常丰富, 有自主神经及内在神经丛, 调节活动十分复杂。其中, 一氧化氮(NO)是消化道非肾上腺能非胆碱能神经的抑制性递质之一, 是由一氧化氮合酶

(NOS)催化 L-精氨酸, 还原型辅酶 II (NADPH)作电子供体生成, 在消化道活动调节中起广泛

基金项目 国家自然科学基金项目(No. 30670360), 陕西师范大学校级重点项目;

* 通讯作者, E-mail: hejianping@snnu.edu.cn;

第一作者介绍 谢惠春, 男, 硕士研究生; 研究方向: 神经生物学; E-mail: yezino.1@163.com.

收稿日期: 2007-11-12, 修回日期: 2008-03-06

的作用,可调节胃肠黏膜血流量及胃肠黏液分泌,引起消化道平滑肌舒张等^[1]。已有研究表明,在实验动物大鼠(*Rattus norvegicus*)及小鼠(*Mus musculus domesticus*)的消化道肌间神经丛分布有大量的NOS阳性神经元,其分布密度因部位不同而有较大差异^[2-7]。目前对野生动物这方面的研究较少,仅见对棕色田鼠(*Microtus mandarinus*)消化道NOS阳性神经元分布的研究,其研究表明,在棕色田鼠消化道的不同部位,NOS阳性神经元分布规律不同,并与其所处机能状态相关^[8-10]。

在不同生态条件下,动物的能量需求及食物的种类和质量会发生变化,引起动物消化道发生适应性变化,这种变化包括消化道生理机能性和形态结构性适应,并首先表现为生理机能上的,之后才可能发生结构上的适应^[10]。为进一步研究特殊环境下生存的动物其消化道适应性调节机制,应用NADPH黄递酶组织化学方法及整装铺片技术,对营严格地下生活的甘肃鼯鼠(*Myospalax cansus*)胃肠道肌间神经丛NOS的分布进行观察,了解甘肃鼯鼠胃肠道NOS阳性神经元的分布特点,以便于进一步研究地下鼠消化道的适应机制。

1 材料与方 法

1.1 铺片标本制备 健康成年非繁殖期甘肃鼯鼠8只,体重220~280g,雌雄兼有(捕自陕西延安)。乙醚麻醉,开胸暴露心,左心室灌注生理盐水快速冲洗血液,以4%多聚甲醛灌注。之后将消化道完全取出,分离胃、十二指肠、空肠、回肠、盲肠、结肠和直肠,将各部分小心剔除系膜及其他组织,用温热生理盐水冲洗管腔。结扎消化道两端,注入4%多聚甲醛(pH=7.3)适当扩管,再注入同样固定液固定6~7h(4℃),取出固定好的消化道并沿肠系膜处剪开,置于0.1mol/L PBS(pH=7.3)中漂洗3次,每次5min。4℃0.1mol/L PBS(pH=7.3)中过夜。

将胃肠各段剪成1cm小段,在解剖镜下用镊子小心剥离黏膜层、黏膜下层与肌层、浆膜

层。将所得肌层轻轻撕掉环肌层,即暴露出附有肌间神经丛的纵肌层,取附有肌间神经丛的纵肌层^[10]。将制得的肌间神经丛铺片标本置于0.1mol/L PBS(pH=7.3)中待染。

1.2 组织化学染色 参照Kiernan^[11]和刘梅等^[8]的NADPH黄递酶组织化学法。NADPH(Sigma公司),NBT(Amresco),Triton X-100购于华美生物工程公司。将肌间神经丛铺片放入孵育液(NADPH 1mg/ml; NBT 0.5mg/ml; 0.3% Triton X-100; 0.1mol/L PBS, pH=7.3) 37℃孵育1.5h, 0.1mol/L PBS终止反应,三蒸水漂洗3次,裱片,烘干,梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。ECLIPSE 80i型NIKON显微镜镜检, CCD显微摄影。对照组不加NADPH,其他步骤相同。

1.3 数据处理 采用目测半定量法,染为深蓝色者阳性,浅蓝色者弱阳性;胞体同背景颜色相同者为阴性(图版I:15)。在10×物镜下随机计数10个视野内的NOS阳性神经元胞体总数及神经节数;10×物镜下随机计数100个神经节内阳性神经元数。采用SPSS软件进行单因素方差分析,数据以平均值±标准误(Mean±SE)表示。

2 结 果

甘肃鼯鼠整个胃肠道广泛分布有NOS阳性神经元和神经纤维,阳性神经节与阳性神经纤维形成网络。神经节多为长梭形,大小不一,阳性神经元发出神经纤维形成阳性神经纤维,与纵肌走向一致,成束。神经纤维束不断分支,形成二级、三级网络(图版I:1)。NOS阳性神经元多分布在神经节中,胞核较大,不着色,胞质染色深浅不一,神经元胞体有圆形、卵圆形、三角形及不规则形。有些阳性神经元可见突起,与邻近神经元接触(图版I:2)。在神经纤维束和网络中也有单个阳性神经元分布(图版I:3)。甘肃鼯鼠胃肠不同部位和节段肌间神经丛NOS阳性神经元分布密度有明显变化,其中结肠最高,直肠次之,从十二指肠至回肠段,NOS阳性神经元密度呈整体上升趋势;胃与空

肠、十二指肠与盲肠间 NOS 阳性神经元密度无显著差异,其他各段之间差异显著(图 1~ 3)。

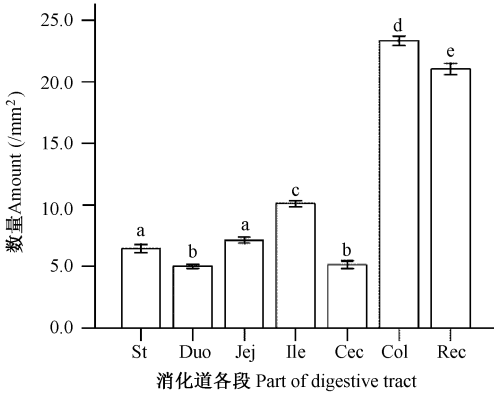


图 1 甘肃黾鼠胃肠道肌间神经丛 NOS 阳性神经节分布 (n = 8)

Fig. 1 NOS positive ganglia in gastrointestinal myenteric plexus

St. 胃; Duo. 十二指肠; Jej. 空肠; Ile. 回肠; Cec. 盲肠; Col. 结肠; Rec. 直肠; 柱状图中字母相同表示差异不显著, F 检验, P > 0.05; 后图同。

St: Stomach; Duo: Duodenum; Jej: Jejunum; Ile: Ileum; Cec: Cecum; Col: Colon; Rec: Rectum; Figure share the same marks in each column have no significant difference. F-test, P > 0.05 The same to fig. 1- 3

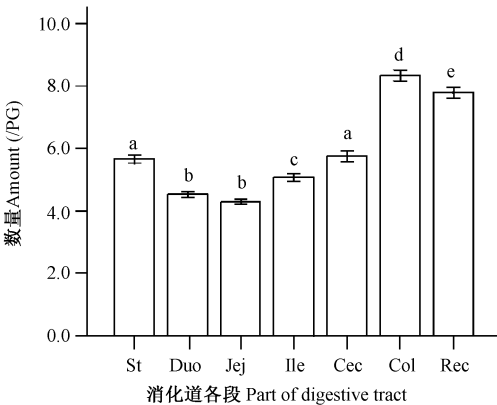


图 2 甘肃黾鼠胃肠道肌间神经丛单个神经节内阳性神经元数目 (n = 8)

Fig. 2 NOS positive neurons in positive ganglia PG: 单个阳性神经节。PG: positive ganglion.

2.1 胃 肌间神经丛形成的网格不规则。阳性神经元多分布于神经节中,较少散落在神经节外。阳性神经元胞体多呈卵圆形,部分不规

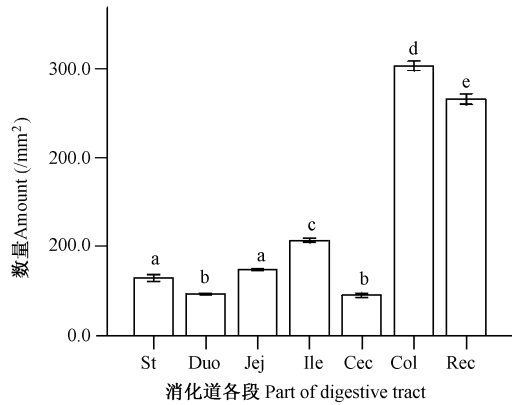


图 3 甘肃黾鼠胃肠道肌间神经丛阳性神经元总数 (n = 8)

Fig. 3 Total number of NOS positive neurons

则形,在神经节和神经纤维束中可见几个神经元胞体以突起顺次相接(图版 I: 4),神经纤维束较粗,直径约 22 μm。神经节中的阳性神经元有两种,一种平均直径约 21 μm,胞浆较多但颜色较浅,突起多,形状不规则。另一种平均直径约 16 μm,胞核小,胞浆少但染色较深(图版 I: 5)。胃肌间神经丛 NOS 阳性神经元分布密度不均匀,胃底分布较少,阳性神经元总数 (45.53 ± 2.02) 个/mm²,胃体分布较多,阳性神经元总数 (82.32 ± 5.21) 个/mm²(图版 I: 6, 7)。2.2 小肠 肌间神经丛形成典型的长方形网状结构,NOS 阳性神经元分布密度较均匀,从十二指肠到回肠神经元密度逐渐升高。

十二指肠肌间神经丛纤维束着色较深,神经节小,呈“长梭形”,阳性神经元数目较少且较分散,神经节外有较多的阳性神经元,阳性神经元多卵圆形或圆形,有不规则短突起,两个神经元突起常相接(图版 I: 8),胞质着色深浅不一,神经节大小基本一致,平均直径约 20 μm。神经纤维束直径约 21 μm。

空肠长方形网状面积较十二指肠小,网格密度大,纤维束着色浅,神经节数目较十二指肠增多,多为“长梭形”,偶有不规则形,神经节内阳性神经元数目略低于十二指肠(图版 I: 1)。神经节外有较多的阳性神经元,阳性神经元胞质着色较深(图版 I: 2)。神经元大小、形态与

十二指肠一致,但突起较十二指肠多。神经纤维束直径略小于十二指肠,约为 19 μm 。

回肠长方形网状面积进一步缩小,密度增大,纤维束着色深浅不一(图版 I: 9),神经节数目及阳性神经元数目是小肠中最多的,神经节多“长梭形”,阳性神经元较少散落于神经节外,胞质着色深,其大小、形态与十二指肠中的阳性神经元基本一致,平均直径约 22 μm 。神经纤维束较粗,平均直径约为 23 μm 。

2.3 盲肠 袢远端肌间神经丛 NOS 阳性神经元分布与回肠段相似。袢近端神经节与纤维束形成的网络结构多不规则,大小不一,神经节明显膨大,神经节中阳性神经元分布密度明显高于袢远端及小肠段,神经元胞质与神经纤维束均着色较深。阳性神经元突起较少且长短不一,神经元大小约 18 μm ,多卵圆形、圆形。神经纤维束粗大,是胃肠道中最粗的,着色很深,直径约 25 μm 。NOS 阳性神经元分布密度不均匀,盲肠袢近端分布密度较高,盲肠袢远端分布较少(图版 I: 10)

2.4 结肠与直肠 神经纤维束平行排列(图版 I: 11, 13),神经节较大。神经节中及神经节外的 NOS 阳性神经元数目多,神经纤维束粗细不均(图版 I: 12, 14),但着色较深。神经元胞体较小,着色较深,多卵圆形和圆形,部分不规则形,胞体突起短,阳性神经元直径约 20 μm 。神经纤维束直径约 21 μm 。结肠肌间神经丛 NOS 阳性神经节、神经节中 NOS 阳性神经元及阳性神经元总数的分布密度均高于直肠。

3 讨论

本研究表明,甘肃鼯鼠胃肠道肌间神经丛 NOS 阳性神经元分布与其他已研究动物的分布模式基本一致^[2~14]。在不同部位,其大小、形态及分布密度差异较大。胃肠道中 NOS 阳性神经元染色深浅不同可能与细胞处于不同的功能状态、合成或储存 NDP 的量不同有关^[4],也可能与神经细胞含不同的 NOS 同工酶有关^[13]。神经元形态大小不同可能是不同的神经元亚型。神经元突起多且相互连接表明神经元间广

泛有突触联系。不同肠段分布密度与胃肠道各段生理功能相关。

离体及在体实验证明,NO 可介导大鼠、豚鼠(*Cavia porcellus*)食物入胃后的容受性舒张反射^[14],甘肃鼯鼠胃 NOS 阳性神经元数量较低,在胃的不同部位分布密度不同,胃体部 NOS 阳性神经元密度较高,胃底部密度较低。这可能是胃底肌层较薄,少量的神经元分布即可发挥有效的作用。胃体神经元分布密度高,有利于平滑肌松弛,增加胃容受性舒张及血流量,调节胃液分泌,达到暂时储存食物的作用。

Barry 等认为,内源性 NO 进入消化道上皮细胞后,可迅速与鸟苷酸环化酶(cGMPase)结合,改变酶构象,提高酶活性,增加胞内 cGMP 生成,发挥生物效应,促进小肠上皮的吸收^[15]。内源性 NOS 还可抑制交感神经引起的血管收缩,减少肠道蠕动^[16]。甘肃鼯鼠 NOS 阳性神经节、单个神经节内 NOS 阳性神经元及 NOS 阳性神经元总数在小肠段由十二指肠到回肠分布丰富,总体呈上升趋势,回肠 NOS 阳性神经元密度最高(图 3)。推测甘肃鼯鼠小肠中 NOS 产生的 NO 可降低小肠对内容物的推动作用,增加食物滞留时间,促进营养物质吸收。甘肃鼯鼠终生营地下生活,取食范围受到限制,消化道内丰富的内源性 NOS 可使小肠充分地吸收营养物质,这可能是特殊生境下的一种消化适应策略。

对于后肠发酵的草食性野生啮齿动物,其盲肠在发酵消化过程中起主要作用,甘肃鼯鼠盲肠 NOS 阳性神经元分布不均匀,神经元分布从螺旋状皱襞两侧由稠密逐渐稀疏,可能是盲肠作为膨大的容纳器官,经常充满内容物,盲肠囊袋肠壁变薄,少量的神经元分布即可发挥有效的作用。而盲肠袢近端神经元较密集,可促使盲肠平滑肌舒张,提高盲肠囊袋容纳食物的作用。与其他啮齿动物一样,甘肃鼯鼠结肠 NOS 阳性神经元密度最高^[2,9,10,12]。有研究指出结肠中近 1/3 的神经元为 NOS 阳性,密集的李 NOS 神经元可引起结肠长时间舒张^[16]。在豚鼠结肠,NO 是一种神经内源性结肠松弛因子,

可引起结肠平滑肌舒张^[7], 延长粪便在结肠中的停留时间, 促进水分和离子的重吸收^[12]。甘肃鼯鼠终生营地下生活, 取食范围局限, 且从不饮水, 机体所需水分仅来自于食物, 结肠内丰富的内源性 NOS 可使甘肃鼯鼠最大程度地重吸收粪便中存留的水分和离子。

参 考 文 献

[1] 王吉村, 孙长凯. 消化系统中的一氧化氮机制. 国外医学内科学分册, 1996, 23(8): 326~ 329
 [2] 魏丽春, 郭鹂. 一氧化氮合酶在小鼠肠道壁分布. 第四军医大学学报, 1994, 15(6): 436~ 439
 [3] 范强, 吴瑞焯. 豚鼠小肠神经丛的 NADPH 黄递酶组织化学观察. 中国组织化学与细胞化学杂志, 1994, 3(1): 36~ 39.
 [4] 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~ 87.
 [5] 肖岚, 蔡文琴. NOS 在大鼠胃肠肌间神经丛的分布模式. 解剖科学进展, 1997, 3(3): 297.
 [6] 彭曦, 冯晋斌, 汪仕良. 一氧化氮合酶在大鼠胃壁的分布. 第三军医大学学报, 1998, 20(2): 124~ 127.
 [7] 彭曦, 冯晋斌, 汪仕良等. 大鼠胃肌间神经丛中 NOS 阳性神经元的组织化学研究. 中国组织化学与细胞化学杂志, 1999, 8(1): 83~ 86.
 [8] 刘梅, 徐金会, 安书成等. 棕色田鼠小肠肌间神经丛 NOS 的组织化学观察. 兽类学报, 2001, 21(3): 206~ 209.

[9] 安书成, 徐畅, 徐金会等. NOS 在棕色田鼠胃肠道各段肌间神经丛分布的比较. 中国神经科学杂志, 2003, 19(5): 313~ 317.
 [10] 乔卉, 安书成, 邵发道等. 不同能量需求的棕色田鼠胃肠道一氧化氮合酶和血管活性肠肽的分布. 动物学报, 2005, 51(5): 830~ 839
 [11] Kieman J A. *Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice* (2nd ed). Oxford: Oxford Prefemrent Press, 1990, 274~ 275.
 [12] 彭曦. 一氧化氮合酶在胃肠道的分布规律及意义. 国外医学: 生理病理科学与临床分册, 1997, 17(3): 258~ 261.
 [13] Cracco C, Filogamo G. Quantitative study of the NADPH - diaphorase positive myenteric neuron of the rat ileum. *Neuroscience*, 1994, 61(2): 351~ 359
 [14] Ward S M, Xue C, Sanders K M, *et al.* Localization of nitric oxide synthase in canine ileocolonic and pyloric sphincters. *Cell Tissue Res*, 1994, 275(3): 513~ 520.
 [15] Bany M K, Alosisi J G, Pickering S P, *et al.* Nitric oxide modulates water and electrolyte transport in the ileum. *Ann Surg*, 1994, 219: 382~ 385.
 [16] Nase G P, Boegehold M A. Endothelium derived nitric oxide limits sympathetic neurogenic constriction in intestinal microcirculation. *Am J Physiol*, 1997, 273(1): 426~ 433.
 [17] 余跃, 侯晓华. 一氧化氮对胃肠分泌机能的调节作用. 国外医学: 生理病理科学与临床分册, 1999, 19(2): 123 ~ 126

图 版 说 明

1. 空肠肌间神经丛 NOS 阳性神经元分布, × 40; 2. 空肠肌间神经丛 NOS 阳性神经节内神经元, 示神经元突触(箭头), × 400; 3. 胃底肌间神经丛神经纤维束和网络, 示单个神经元分布(箭头), × 100; 4. 胃肌间神经丛 NOS 阳性神经元以突起顺次相接, × 100; 5. 胃肌间神经丛 NOS 阳性神经元, 示两种神经元, 染色深浅不一, × 400; 6. 胃底肌间神经丛 NOS 阳性神经元分布, × 40; 7. 胃体肌间神经丛 NOS 阳性神经元分布, × 40; 8. 十二指肠肌间神经丛 NOS 阳性神经元, 示神经元的 irregular 短突起, 突起常相接, × 400; 9. 回肠肌间神经丛 NOS 阳性神经元分布, × 40; 10. 盲肠肌间神经丛 NOS 阳性神经元不均匀分布 (a 盲肠袢远端; b 盲肠袢近端), × 40; 11. 结肠肌间神经丛 NOS 阳性神经元分布, × 40; 12. 结肠肌间神经丛 NOS 阳性神经纤维束, 示粗细不均的阳性神经纤维束, × 200; 13. 直肠肌间神经丛 NOS 阳性神经元分布, × 40; 14. 直肠肌间神经丛 NOS 阳性神经元, × 400; 15. 阴性对照, × 100。

Explanation of Plate

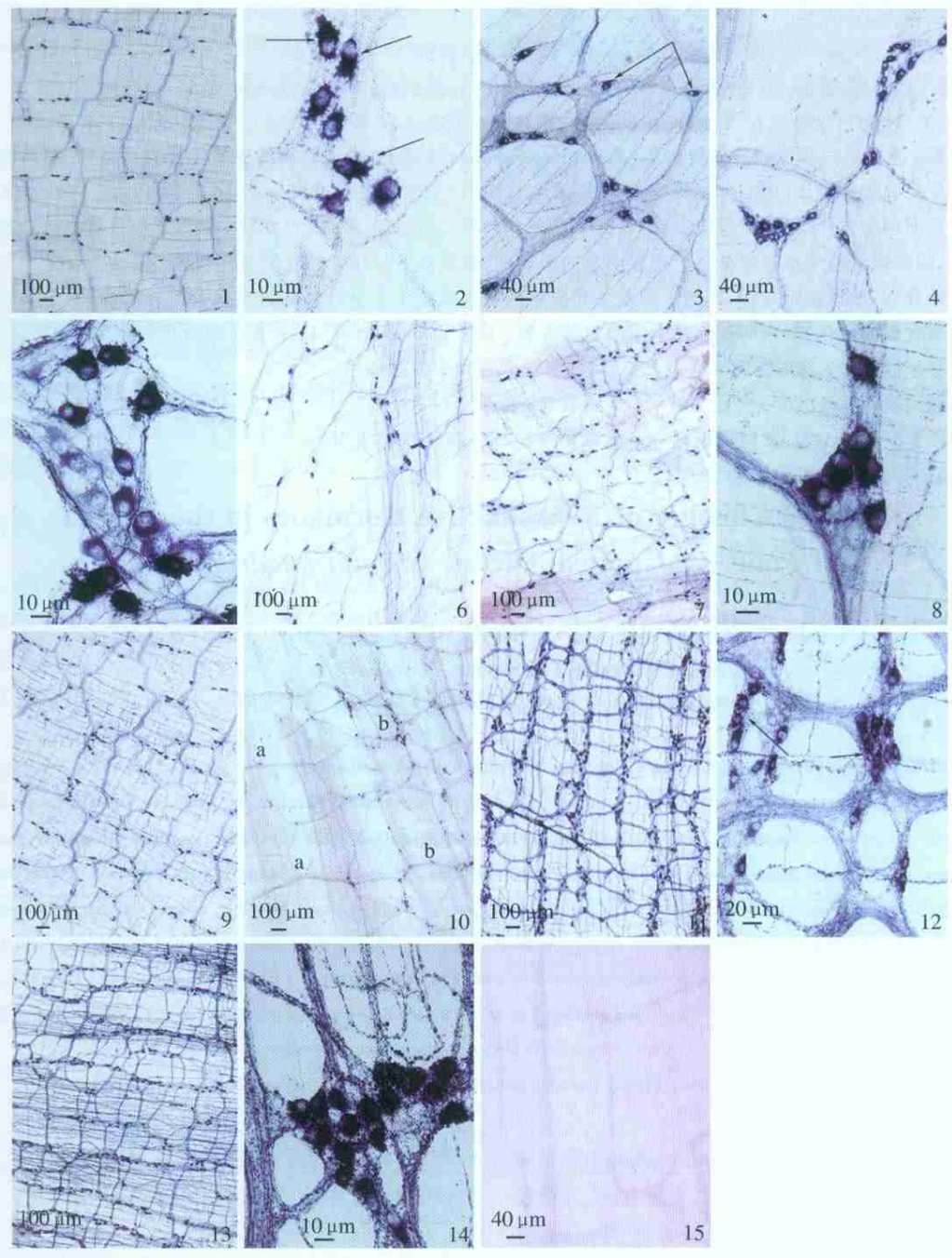
1. The distribution of NOS positive neurons in jejunum gastrointestinal myenteric plexus, × 40; 2. The NOS positive ganglion neurons and neuronal synapses in jejunum myenteric plexus (arrow), × 400; 3 The distribution of a single neuron in stomach fundus myenteric plexus nerve fibers and meshwork (arrow), × 100; 4 The NOS positive neurons linked to sequential processes as a 'bead like' arrangement in stomach myenteric plexus, × 100; 5 The NOS positive neurons in different sizes and staining density in stomach myenteric plexus, × 400; 6 The distribution of NOS positive neurons in fundus of stomach myenteric plexus, × 40; 7. The distribution of NOS positive neurons in gastric body myenteric plexus, × 40; 8 The NOS positive neurons exhibited irregular short processes, and the two neuronal processes often linked in duodenal myenteric plexus, × 400; 9. The distribution of NOS positive neurons in ileum myenteric plexus, × 40; 10. The uneven distribution of NOS positive neurons in cecal myenteric plexus. (a) Cecal nailfold distal; (b) Cecal proximal nailfold, × 40; 11. The distribution of NOS positive neurons in colon myenteric plexus, × 40; 12. The uneven thickness NOS positive nerve fibers in colon myenteric plexus, × 200; 13 The distribution of NOS positive neurons in rectum myenteric plexus, × 40; 14. The distribution of NOS positive neurons in rectum myenteric plexus, × 400; 15. Negative control, × 100.

谢惠春等: 甘肃鼯鼠胃肠道肌间神经丛一氧化氮合酶阳性神经元的分布

图版 I

XIE Hui Chun *et al.*: Distribution of Nitric Oxide Synthetase Positive Neurons
in Gastrointestinal Myenteric Plexus of Gansu Zokor

Plate I



图版说明见文后