

· 基础研究 ·

嗜酸乳杆菌对重型颅脑损伤后小鼠小肠神经递质 AchE 和 NOS 的影响*

张索飞¹,高英丽²,方欢¹,朱京慈^{1△}(1. 第三军医大学护理学院基础护理教研室,重庆 400038;2. 泰山医学院
护理学院护理学基础教研室,山东泰安 271016)

摘要:目的 研究嗜酸乳杆菌(LA)对重型颅脑损伤(SHI)小鼠小肠肠神经系统(ENS)内乙酰胆碱酯酶(AchE)和一氧化氮合酶(NOS)的影响。方法 用改良 Feeney 自由落体法建立 C57 小鼠 SHI 模型 72 只,分为创伤组和假伤组,创伤组和假伤组均分别灌胃 LA 和 MRS 培养基,每组每种灌胃剂 18 只。于 1、3、7 d 3 个时相点取小鼠回肠末端,制作肌间神经丛铺片标本,采用 AchE 免疫荧光和 NADPH-d 组化染色观察 AchE 和 NOS 阳性神经元分布密度和染色情况。结果 创伤组灌胃不同药品成分 1 d 后其 AchE 数量差异有统计学意义($P=0.000$),其余时相点差异无统计学意义($P>0.05$)。在 LA 灌胃中,创伤与假伤组在伤后 3 d AchE 阳性细胞数目差异有统计学意义($P=0.040$),7 d 后创伤组灌胃 LA 后细胞恢复到稳定水平,与相同时相点假伤组差异无统计学意义($P=0.543$)。结论 小鼠 SHI 后存在肠神经递质 AchE 和 NOS 的改变,LA 对 SHI 后受损的 AchE 和 NOS 阳性细胞有显著的保护和修复作用,能有效改善 SHI 后肠动力不足。

关键词:嗜酸乳杆菌;颅脑损伤;乙酰胆碱酯酶;一氧化氮合酶

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.13.016

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)13-1486-04

Effect of *Lactobacillus acidophilus* on mice small intestinal neurotransmitter AchE and NOS in severe head injury*Zhang Suofei¹,Gao Yingli²,Fang Huan¹,Zhu Jingci^{1△}

(1. Department of Basic Nursing, School of Nursing, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China;

2. Department of Basic Nursing, School of Nursing, Taishan Medical University, Taian, Shandong 271016, China)

Abstract: Objective To observe effect of *Lactobacillus acidophilus*(LA) on AchE and NOS of small intestinal enteric nervous system(ENS) in mice severe head injury(SHI). **Methods** 72 C57 mice of SHI model were built by the improved Feeney's weight-dropping method and divided into the sham trauma group and the trauma group. The two groups were lavaged with LA and MRS culture medium, 18 mice in each lavage agent and each group. The terminal ileum was taken at the time points of 1, 3, 7d for observing the distribution density and staining situation of AchE and NOS positive cells by AchE immunofluorescence and NOS enzyme histochemistry. **Results** The number of AchE positive cells after 1 d of lavage with different compositions in the trauma group showed statistical difference, which after other time points showed no statistical difference($P=0.000$, $P<0.01$). While in LA lavage, the number of AchE positive cells after post-trauma 3 d in the trauma group and the sham trauma group had statistical difference($P=0.040$). The number of AchE positive cells after 7d of LA lavage in the trauma group recovered to the steady level, the difference with that at same time points in the sham group showed no statistical significance($P=0.543$). **Conclusion** The intestinal neurotransmitter AchE and NOS is changed after SHI. LA has a significant effect on protecting and repairing the damaged cells with positive AchE and NOS, which can effectively improve the intestinal dysmotility after SHI.

Key words: *Lactobacillus acidophilus*; craniocerebral trauma; acetylcholinesterase; nitric oxide synthase

重型颅脑损伤(severe head injury, SHI)后可使神经-内分泌免疫网络发生紊乱,胃肠动力障碍的发生率极高,临床上以肠动力不足更为常见,缺血再灌注的打击可使肠黏膜缺血缺氧,肠屏障破坏导致肠功能受损;同时,颅内压升高也可加重胃肠动力紊乱,最终导致肠衰竭和全身器官功能衰竭,严重影响预后^[1]。肠神经系统(enteric nervous system, ENS)受损是 SHI 后肠动力不足的重要原因之一。ENS 由肌间神经丛和黏膜下神经丛组成^[2],在各种调节胃肠蠕动功能的机制中起重要作用,主要分泌兴奋性神经递质乙酰胆碱(Ach)和抑制性递质一氧化氮(NO)^[3]。本课题组前期已观察到益生菌能有效改善 SHI 后胃肠动力障碍,本实验拟观察 SHI 小鼠小肠 ENS 内乙

酰胆碱酯酶(AchE)和一氧化氮合酶(NOS)的表达变化及嗜酸乳杆菌(LA)对 AchE 和 NOS 表达的影响,以进一步探讨益生菌改善 SHI 后肠动力障碍的机制。

1 材料与方法

1.1 材料 (1)实验动物:C57 雄性小鼠 100 只,体质量 18~22 g,由第三军医大学大坪医院实验动物中心提供。(2)试剂:乳酸杆菌选择性培养基 MRS 培养基(oxid CM0359 M. R. S broth),AchE 免疫荧光抗体为兔抗小鼠乙酰胆碱转移酶抗体(rabbit anti-choline acetyltransferase),SABC-Cy3 试剂盒山羊抗兔生物素化二抗及驴抗山羊 AchE 荧光三抗,均购自武汉博士德公司;NOS 组织化学染色 NADPH-d 购自 Sigma 公司;

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81272079)。 作者介绍:张索飞(1989~),在读硕士研究生,主要从事颅脑创伤及肠内营养研究。 △ 通讯作者, Tel: (023)68771156; E-mail: zhujingci@163.com。

NBT 显色试剂盒购自武汉博士德公司;水合氯醛由第三军医大学试剂中心提供。(3)设备:动物立体定向仪(上海,江湾 I 型)购自第三军医大学教保处;MICRO-NX 型牙科钻购自韩国 TAEGU 公司;SMZ2168 立体显微镜购自德国 Motic 公司;TCS-SP5 激光共聚焦扫描显微镜购自德国 Leica 公司;普通光学显微镜(OLYMPUS BX60)购自日本奥林巴斯公司;高速冷冻离心机(Hitachi Centerifuge)购自日本 HITACHI 公司;恒温摇床购自上海智城分析仪器有限公司。(4)菌种:LA YIT2004 株,白色冻干粉,由上海信谊药厂有限公司提供。

1.2 方法

1.2.1 菌种培养 将嗜酸乳杆菌冻干粉接种至乳酸杆菌选择性培养基中,37℃恒温摇床中在 200 r/min 条件下厌氧培养 35~40 h,培养后混悬液即为所得菌悬液,菌悬液中活菌数量达到 1×10^{11} CFU/mL,置于 -20℃冰箱保存备用。

1.2.2 动物分组及模型制作 (1)动物分组:随机数字表法将 100 只 C57 雄性小鼠进行制模,制模成功共 72 只,(制模正常死亡率为 30%左右),分为创伤组和假伤组,每组各 36 只,创伤组和假伤组均分别灌胃 LA 和 MRS 培养基,每组每种灌胃剂 18 只,每组每时相点各 6 只小鼠。(2)动物模型制作:参照文献[4-5] feeney 自由落体法方法并改进,建立小鼠 SHI 模型。以 10%水合氯醛按照 40 mg/kg 进行腹腔麻醉,颅顶脱毛、消毒;待小鼠出现夹尾反应、反应减弱后将其固定于立体定向仪上,正中切口开颅,以牙科钻在冠状缝后 3 mm 与矢状缝 3 mm 交汇处钻孔,扩大骨窗至 2 mm×2 mm,保持硬膜完整。将 18 g 的圆柱状实心打击杆(打击端直径 3 mm)沿垂直固定于立体定向仪上的套管内自 16 cm 的高度释放,打击中心即为钻孔点;以吸收性明胶海绵局部止血,待活动性出血停止后间断缝合头皮。假伤对照组只开窗不进行打击致伤。模型建立成功后,存活小鼠置于 SPF 环境中分笼喂养,除灌胃外其余时间自由饮食。制模后 4 h,待动物苏醒后方可灌胃,每天每次灌胃 1 次,每次 0.5 mL,观察记录小鼠一般情况及大便秘性状改变情况,于致伤后 1、3、7 d 取全肠段丙酮固定,待指标检测。

1.2.3 全层小肠铺片与 AchE 免疫荧光染色 小鼠分别于伤后 1、3、7 d 取材。麻醉后开腹,取末端回肠用 0.01 mol/L PBS 洗净。结扎小肠一端,以丙酮注入肠腔内,置入丙酮中固定 6~8 h 后。实验前沿肠系膜缘剪开肠管将附有深肌丛的环形平滑肌层和肌间神经丛的纵行平滑肌剥下,用含 0.5% triton X100 的 PBS 充分洗净。1%牛血清蛋白(BSA) 37℃温箱孵育然后加入一抗体,AchE 单克隆抗体(1:200)4℃冰箱过夜;生物素化抗体山羊抗兔 IgG 抗体(1:400)室温;Cy3 标记的驴抗山羊荧光三抗(1:200)室温孵育。DAPI 复染细胞核后,水溶性封片剂封片,行激光共聚焦显微镜观察。阴性对照实验以正常牛血清代替一抗,其余操作步骤同上,结果均为阴性。用激光共聚焦采集 AchE 阳性细胞图像,阳性细胞表现为红色荧光,在荧光显微镜下随机选择 12 个视野,用 Image-Pro Plus 5.1 软件进行计数。

1.2.4 NOS 免疫组织化学染色 将上述标本用 0.01 mol/L TBS 漂洗后,移入新鲜配制工作液中:1 mg/mL NADPH-d, 0.5 mg/mL NBT, 0.3% triton X100, 0.1 mol/L PB(pH = 7.6), 37℃温箱中孵育 15~30 min,用 0.01 mol/L TBS 终止反应,在普通光学显微镜下观察,终产物为蓝色。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件进行统计学分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组比较进行独立样本 *t* 检验,多组比较采用方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 AchE 阳性细胞数量变化 创伤组在相同致伤条件下,LA 和 MRS 灌胃 1 d 后 AchE 数量差异有统计学意义($P = 0.000$),3、7 d 差异无统计学意义($P = > 0.05$),见表 1。假伤组 LA 和 MRS 灌胃,在 3 个时相点,AchE 阳性细胞差异均无统计学意义($P > 0.05$),见表 2。在相同受试药品 LA 灌胃中,创伤组与假伤组在伤后 3 d 时差异有统计学意义($P = 0.040$),7 d 后创伤组细胞数目恢复到稳定水平,与相同时相点假伤组差异无统计学意义($P = 0.543$),见表 3。

2.2 小肠肌间神经丛 AchE 免疫荧光染色结果 ChAT 标记的红色细胞为胆碱能阳性细胞,图中胆碱能神经元广泛分布于整个消化道的肌间神经丛内,构成神经节、节间束及神经纤维纵横交织成网。胆碱能神经元轮廓较为清晰,形状为圆形或者卵圆形,轴突细长,树突不明显;细胞质着色,细胞核呈卵圆形,数十个至数百个胆碱能阳性神经元成簇分布延神经纤维网络走行分布于较大的神经节中,数个胆碱能神经元散在分布在节间束上。创伤组 LA 灌胃 1 d 后细胞形态良好整齐排列于较大的神经节内,细胞形态良好,浑圆饱满,排列整齐;假伤组 MRS 灌胃小鼠肠肌丛 ChAT 阳性染色细胞排列紊乱无序,细胞间隙较大,形态不一,大小不匀,见图 1。

表 1 创伤组各时相点 AchE 阳性细胞比较 ($\bar{x} \pm s$, 个/mm², $n = 6$)

灌胃剂	1 d	3 d	7 d
LA	47.33±5.50	21.33±6.43	30.00±18.00
MRS	9.33±3.21	25.00±8.00	30.33±5.03
<i>t</i>	-10.321	0.619	0.031
<i>P</i>	0.000	0.570	0.977

表 2 假伤组各时相点 AchE 阳性细胞比较 ($\bar{x} \pm s$, 个/mm², $n = 6$)

灌胃剂	1 d	3 d	7 d
LA	52.67±10.02	9.33±2.51	37.00±3.00
MRS	41.25±7.32	11.00±1.63	21.25±13.12
<i>t</i>	-1.758	1.073	-1.994
<i>P</i>	0.139	0.332	0.103

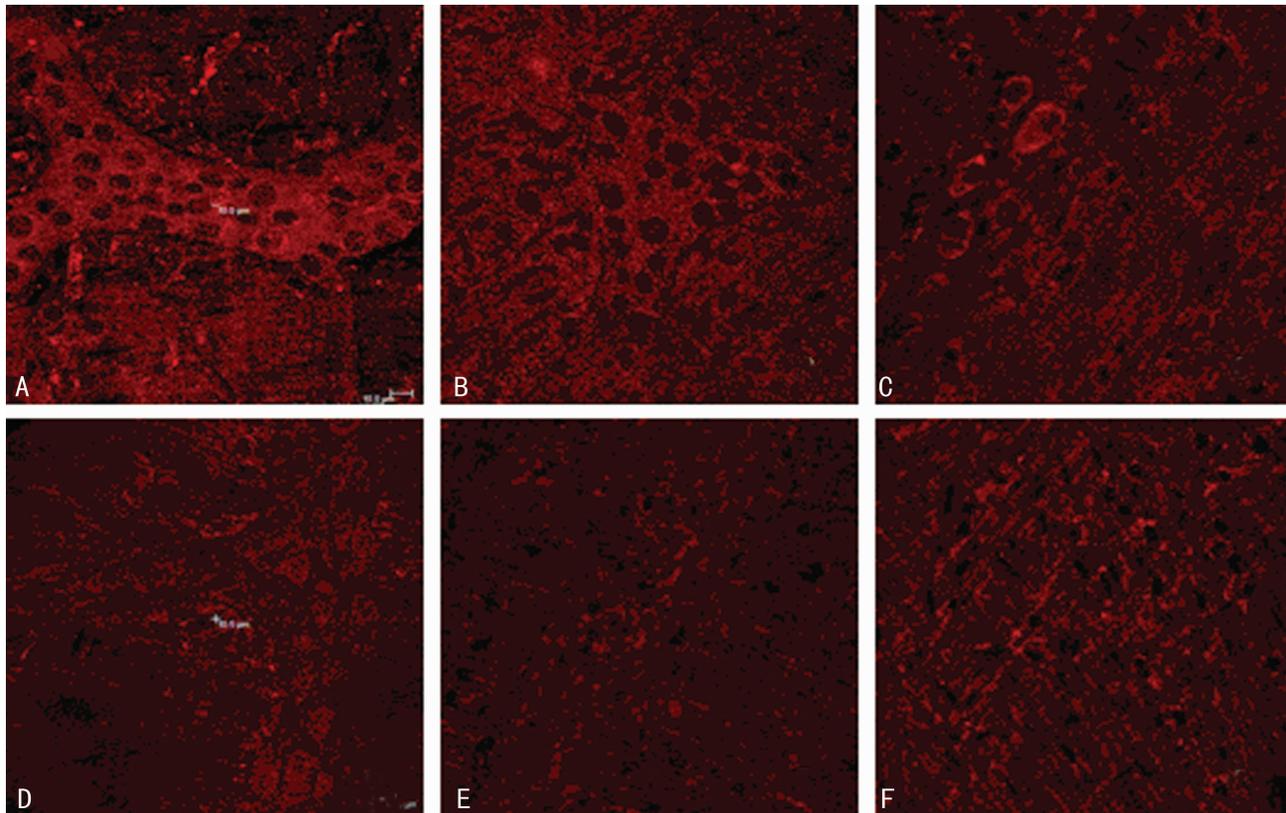
表 3 两组小鼠灌胃 LA 各时相点 AchE 阳性细胞比较 ($\bar{x} \pm s$, 个/mm², $n = 6$)

组别	1 d	3 d	7 d
假伤组	52.66±10.02	9.33±2.52	37.00±3.00
创伤组	47.33±5.50	21.33±6.43	30.00±18.00
<i>t</i>	0.808	-3.010	0.664
<i>P</i>	0.464	0.040	0.543

2.3 小鼠小肠壁内 NO 神经分布 NADPH-d 组化染色终产

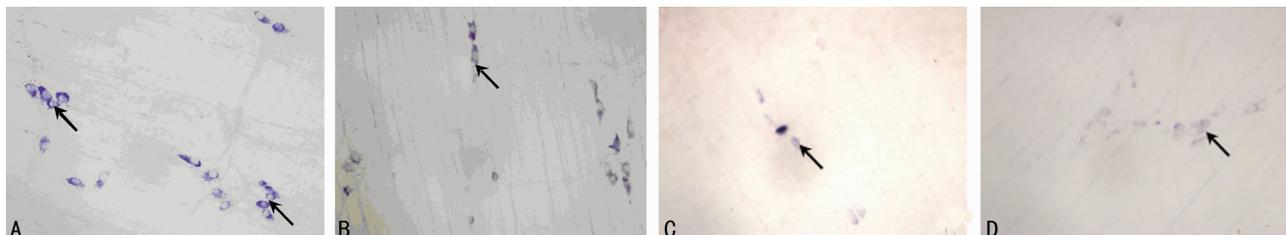
物为蓝色、蓝紫色或深蓝色。铺片可见 NO 阳性神经广泛分布于小肠肌间神经丛和肌内,其中肌间神经丛分布最为广泛丰富,构成神经节、节间束最终形成神经网络。NOS 阳性细胞神经元轮廓较清晰,细胞体呈卵圆形,细胞质呈深浅不一的蓝色

或蓝紫色,细胞核未着色,每个神经节内含有数个或数十个 NOS 阳性神经元。创伤后,NOS 阳性细胞表达减弱,细胞着色浅,数量减少,细胞排列散乱,见图 2。



A、B、C:创伤组 LA 灌胃 1、3、7 d 时 AchE 阳性细胞;D、E、F:假伤组 LA 灌胃 1、3、7 d 时 AchE 阳性细胞。

图 1 免疫红色荧光 ChAT 标记 AchE 阳性细胞形态



A:假伤组 MRS 灌胃 1 d;B:假伤组 LA 灌胃 1 d ;C:创伤组 MRS 灌胃 1 d ;D:创伤组 LA 灌胃 1 d。

图 2 免疫组织化学 NADPH-d 标记 NOS 阳性细胞(→: NOS 阳性细胞)

3 讨 论

胃肠运动由交感、副交感神经系统、ENS 和 Cajal 间质细胞组成的网络控制,产生兴奋或抑制效应^[6-7]。运动神经释放的递质与相应受体结合,通过与邻近的平滑肌细胞之间的缝隙连接传导兴奋性或抑制性突触后电位,引起去极化或超极化,从而引起兴奋性或抑制性反应^[8]。其中,主要的兴奋性递质和抑制性递质分别为 AchE 和 NO^[9]。AchE 和 NO 之间在调节胃肠功能时存在着精细的平衡,当失去平衡则引起线粒体跨膜电位和 ATP 的变化,导致胃肠运动功能障碍^[10]。本研究所采用的嗜酸乳杆菌在微生态制剂中是常用菌种之一,嗜酸乳杆菌是人和动物肠道内的乳酸菌家族中一种重要的有益菌,能有效地改善各种原因引起的胃肠动力障碍。

滑肌的兴奋性收缩起重要作用,常作为研究胃肠运动变化的重要指标,目前,公认 AchE 活性增强则代表 Ach 释放增加,胆碱能神经兴奋性增高。研究表明,肠道淤血导致回肠壁内的 AchE 阳性神经元数量减少,AchE 阳性表达下降,说明肠道淤血可造成 ENS 胆碱能神经功能损害^[11]。重型颅脑损伤后胃肠动力障碍与肠道缺血缺氧相关^[12],本研究结果显示,重型颅脑损伤 1 d 后即出现 AchE 阳性细胞数量减少,表达下降,阳性细胞形态严重受损,MRS 培养基灌胃 7 d 后有一定程度恢复。这说明重型颅脑损伤后因肠道缺血缺氧会造成 ENS 胆碱能神经功能的损害,使肠道蠕动兴奋性减弱,神经传导受到抑制,从而导致以肠动力不足的胃肠动力障碍发生。重型颅脑损伤可能导致 ENS 的主要兴奋性神经递质 AchE 阳性细胞的损坏,使肠动力降低,嗜酸乳杆菌干预后,在一定程度上能对 AchE

乙酰胆碱是胆碱能神经释放的兴奋性神经递质,对胃肠平

神经元起到修复和保护作用,从而发挥对 ENS 和肠动力的积极效应。

NOS 神经元是 ENS 重要的抑制性运动神经元,主要分布于肌间丛,人类的结肠亦有 NOS 神经元分布,其释放的神经递质 NO 具有多种生物学活性包括介导胃肠道平滑肌松弛^[13]。有文献表明,在 MODS 大鼠模型中观察到肌间神经丛内氮能神经阳性神经元减少,导致兴奋与抑制失衡,小肠运动障碍^[14]。本研究结果显示,重型颅脑损伤后,NOS 阳性神经元数目增多,阳性细胞着色深,细胞分布散在,细胞体变大(图 2)。因 NOS 能抑制胃肠运动,使肠道平滑肌处于舒张状态,NOS 的增多能引起肠动力失衡。本研究显示 SHI 后对照组 AchE 阳性细胞减少,NOS 阳性细胞增多,兴奋性传导减少,抑制性传导增多,可能是 SHI 后胃肠动力障碍以肠动力不足的主要原因。有文献报道,脑缺血后,神经末梢释放大量的谷氨酸,刺激 N-甲基 D-天门冬氨酸受体,使胞内 Ca^{2+} 浓度升高,激活 NOS 活性,促进 NO 的生成;再次,脑缺血后,ATP 大量消耗,使能量代谢障碍及 cAMP 依赖性蛋白激酶活性下降,使 NOS 脱磷酸化,NOS 的活性增强^[15]。因 SHI 后机体代谢处于代偿状态,机体耗能 ATP 供不应求,肠道作为机体耗氧耗能的重要器官,在 SHI 后机体处于应激状态,能量代谢障碍,ATP 供应不足,NOS 活性增强,故 NOS 表达增强。嗜酸乳杆菌干预后,对肠道的微环境起到一定的维护作用,增加小肠绒毛高度和表面积,使营养物质更容易被吸收,维持改善了肠腔的氧供和血供,进而满足了微观结构的能量供应,使 NOS 磷酸化增强,NOS 活性减弱,表达降低。这说明嗜酸乳杆菌可能通过这条途径,来调节抑制性神经递质的活性,通过降低主要抑制性神经递质 NOS 的活性,从而实现促进胃肠动力的作用。

综上所述,在导致 SHI 肠动力不足的诸多原因中,由于缺血缺氧所导致的 ENS 的损伤是不容忽视的,ENS 作为神经上级调控系统,是一个瓶颈环节。ENS 主要的兴奋性神经递质 AchE 和抑制性神经递质 NOS 的改变,以及它们比例的失衡,可能是导致 SHI 后肠动力障碍的重要原因之一。嗜酸乳杆菌是益生菌里活性益生菌,现已被广泛应用于胃肠道动力障碍类疾病,因其属于活性微生态制剂,能很好在胃肠道内发挥其优势功能而备受推崇。重型颅脑损伤后给予嗜酸乳杆菌能显著改善 AchE 和 NOS 的数量,维持其比例,在 ENS 这一上级调控层面起到一定的修复及维持作用,从而改善 SHI 后肠动力障碍的情况。

参考文献:

[1] Suzuki S, Suzuki H, Horiguchi K, et al. Delayed gastric emptying and disruption of the interstitial cells of Cajal network after gastric ischaemia and reperfusion[J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2010, 22(5): 585-593.

[2] Garipey CE. Developmental disorders of the enteric nervous system: genetic and molecular bases [J]. *J Pediatr*

Gastroenterol Nutr, 2004, 39(1): 5-11.

- [3] Schemann M. Control of gastrointestinal motility by the "gut brain"—the enteric nervous system[J]. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2005, 41 Suppl 1: S4-6.
- [4] Morales DM, Marklund N, Lebold D, et al. Experimental models of traumatic brain injury: do we really need to build a better Mousetrap[J]. *Neuroscience*, 2005, 136(4): 971-989.
- [5] 李梅, 吴国材, 李飞, 等. 脾脏切除对实验性脑损伤大鼠生存率及血液、脑组织中 IL-1 β 含量的影响[J]. *创伤外科杂志*, 2009, 11(4): 302-305.
- [6] Iino S, Horiguchi K. Interstitial cells of cajal are involved in neurotransmission in the gastrointestinal tract[J]. *Acta Histochem Cytochem*, 2006, 39(6): 145-153.
- [7] Ward SM, McLaren GJ, Sanders KM. Interstitial cells of Cajal in the deep muscular plexus mediate enteric motor neurotransmission in the mouse small intestine [J]. *J Physiol*, 2006, 573(Pt 1): 147-159.
- [8] Ward SM, Sanders KM, Hirst GD. Role of interstitial cells of Cajal in neural control of gastrointestinal smooth muscles[J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2004, 16 Suppl 1: 112-117.
- [9] 陈兰, 刘诗. 肠神经系统与慢传输型便秘[J]. *国际消化病杂志*, 2007, 27(3): 178-179, 185.
- [10] Fagundes DS, Grasa L, Arruebo MP, et al. Ca^{2+} -activated K^{+} channels involved in duodenal dysmotility induced by ethanol[J]. *Alcohol*, 2007, 42(4): 291-295.
- [11] 张军明, 刘芬, 任艳华, 等. 肠淤血大鼠肠神经系统内胆碱能和氮能神经的改变[J]. *解放军医学杂志*, 2006, 31(8): 798-801.
- [12] 张红艳, 李龙腾. 重型颅脑损伤合并多器官功能障碍的机制研究[J]. *中外健康文摘*, 2011, 8(27): 421-423.
- [13] Toda N, Herman AG. Gastrointestinal function regulation by nitrenergic efferent nerves[J]. *Pharmacol Rev*, 2005, 57(3): 315-338.
- [14] Qi QH, Li Y, Yao CH, et al. Morphological changes in network of enteric nerve-interstitial cells of Cajal-smooth muscle cells in rats with multiple organ dysfunction syndrome and therapeutic effects of Dachengqi decoction[J]. *Chin J Integr Med*, 2010, 16(5): 422-429.
- [15] 陈世新, 丁茂超, 戴开宇, 等. 电针对脑缺血再灌注损伤大鼠氧化亚氮合酶的影响[J]. *中国中西医结合杂志*, 2011, 31(6): 784-788.

(收稿日期: 2012-09-08 修回日期: 2013-01-06)