

伪狂犬病毒法示踪成年大鼠排便反射神经通路的研究

王琦 向波 李亚楠 赵一洋

【摘要】 目的 通过伪狂犬病毒示踪技术,探索成年大鼠排便反射相关的神经通路。**方法** 选择正常成年 SD 大鼠(体重 230 ~ 250 g)14 只,随机分为实验组和对照组,实验组(10 只)于末端直肠壁内注射伪狂犬病毒(Bartha 株)10 ~ 20 μL ;对照组 A(2 只)经肛门向直肠腔内注射伪狂犬病毒(Bartha 株)20 μL ,对照组 B(2 只)于腹腔内注射伪狂犬病毒(Bartha 株)20 μL 。两组大鼠均于注射病毒 96 h 后处死,取出脑干及脊髓,进行免疫组化染色分析。**结果** 实验组大鼠的脊髓各节段中均出现伪狂犬病毒阳性的神经元细胞,其中 T13 ~ L1、L6 ~ S1 节段中病毒阳性的神经元数量较多(T13:47.5 \pm 2.9; L1: 64.5 \pm 2.5; L6:30 \pm 2.1; S1:68.5 \pm 3.5),脑干 Barrington 氏神经核团处亦出现伪狂犬病毒阳性的神经元细胞(143.5 \pm 8.1)。对照组大鼠的脊髓及脑干内均未检测出伪狂犬病毒阳性细胞。**结论** 实验组的伪狂犬病毒示踪结果具有较高的特异性;成年大鼠的排便反射神经通路在脊髓内与 L6 至 S1 以及 T13 至 L1 节段关系密切,在脑干内则与 Barrington 氏神经核团关系密切。

【关键词】 狂犬病病毒;大鼠;排便;反射;神经通路;脊髓

A study of defecation neural pathway of inoculating pseudorabies virus into rectum in adult rats. Wang Qi, Xiang Bo, Li Yanan, Zhao Yiyang. Department of Pediatric Surgery, West China Hospital of Sichuan University, Chengdu 610041, China, Corresponding author: Xiang Bo, E-mail: xbljx@hotmail.com

【Abstract】 Objective To explore the defecation neural pathway in spine and brainstem by inoculating pseudorabies virus (PRV, Bartha strain) into rectum in adult rats. **Methods** A total of 14 normal adult SD rats (male or female, weight: 230 ~ 250 g) were randomly divided into two groups. The experimental group ($n = 10$) received an inoculation of 10 ~ 20 μL PRV into rectal wall. The control group A had an injection of 20 μL PRV into peritoneal cavity ($n = 2$) while the control group B 20 μL PRV into rectal cavity ($n = 2$). At 96 h post-injection, the rats were sacrificed for harvesting spine and brainstem for immunohistochemical staining and analysis. **Results** PRV-immunoreactive (IR) cells were localized into almost every spinal cord in experimental rats, especially spinal segments of T13 ~ L1 and L6 ~ S1 (T13: 47.5 \pm 2.9; L1: 64.5 \pm 2.5; L6: 30 \pm 2.1; S1: 68.5 \pm 3.5). And PRV-IR cells were also detected in Barrington's nucleus (143.5 \pm 8.1) in brainstem of experimental rats. And PRV-IR cells were not detected in control rats. **Conclusion** PRV trans-neuronal tracing has a high specificity in experimental rats. And the defecation neural pathway is closely associated with spinal segments of T13-L1 and L6-S1 and Barrington's nucleus in adult rats.

【Key words】 Rabies virus; Rats; Defecation; Reflex; Neural Pathways; Spinal Cord

排便反射通常是在大脑的高级中枢以及脊髓低级中枢共同调节下完成,当直肠壁内的感受器受到刺激时,感觉冲动传导至位于脊髓的低级排便中枢,同时也传导至位于大脑的高级中枢。当环境允许时,大脑内的高级中枢一方面发出冲动调节脊髓低级排便中枢加强其活动,另一方面则下传冲动至肛

门外括约肌,使其松弛,完成排便过程^[1-2]。本实验使用具有逆向跨突触传播、自我复制和特异性传导三大特点的伪狂犬病毒(pseudorabies virus, PRV)作为神经示踪剂,以直肠末端为靶器官,逆向示踪调节末端直肠活动的相关神经元位于脊髓及脑干中的位置,从而了解大鼠排便反射神经通路概况^[3-7]。

doi:10.3969/j.issn.1671-6353.2017.02.019

基金项目:四川省科技厅应用基础研究项目(2014JY0211)

作者单位:四川大学华西医院小儿外科(四川省成都市,610041)

通信作者:向波, E-mail: xbljx@hotmail.com

材料与方法

一、实验材料

SPF 级正常成年 SD 大鼠 14 只,体重 230 ~ 250

g,雌雄不限,随机分为实验组(10只)和对照组(4只),伪狂犬病毒(PRV)Bartha株, 10^8 /mL,由四川农业大学提供,病毒液分为50~100 μ L每等份,-80 $^{\circ}$ C保存,每次注射前仅取出1等份溶解备用,注射后剩余的病毒做灭菌处理并废弃^[6-8]。

二、病毒注射及取材

实验组大鼠使用10%水合氯醛,按照0.03 mL/kg的剂量行腹腔注射麻醉后固定,并适当扩肛,再用25 μ L微量注射器将10~20 μ L左右的伪狂犬病毒液,分4~5处注射于距肛门1 cm范围内的直肠壁黏膜下层或肌层内,每处注射病毒液3~5 μ L,注射后针头均在注射位点停留15 s左右,再缓慢出针,以防病毒液外渗。对照组A中2只大鼠直接于腹腔内注射伪狂犬病毒液20 μ L,对照组B中2只大鼠直接于直肠肠腔内注射伪狂犬病毒液20 μ L^[6-7]。

注射病毒液96 h后,两组大鼠均在10%水合氯醛麻醉下,用4%多聚甲醛经心脏灌注处死,并取出脊髓及脑干。再在显微镜下按照脊神经根的分布,将脊髓分离为各个节段。最后上述标本均经过固定、脱水、浸蜡、包埋为石蜡标本块,切片后进行免疫组化染色。

三、免疫组化染色及分析方法

1. 主要仪器及试剂:兔抗伪狂犬病毒多克隆抗体(Abcam)、PV-9001超敏二步法免疫组化检测试剂及DAB显色剂(北京中杉金桥生物技术公司)、LEICA RM2235型石蜡切片机(德国LEICA公司)、LEICA-DM750光学显微镜(德国LEICA公

司)。

2. 免疫组化染色及分析方法:免疫组化染色步骤均按照试剂盒说明书进行^[9]。对染色结果采集图像后,使用IPP 6.0图形分析软件对染色结果中的阳性细胞进行计数。

结果

两组大鼠于注射病毒后均存活至96 h。实验组大鼠的脊髓各节段中均出现伪狂犬病毒阳性的神经元细胞,胞核为棕黄色着色者即为阳性细胞。其中T13至L1,L6至S1节段中病毒阳性的神经元数量较多(T13: 47.5 ± 2.9 ;L1: 64.5 ± 2.5 ;L6: 30 ± 2.1 ;S1: 68.5 ± 3.5);T13至S1节段脊髓前角(anterior horn,AH)处病毒阳性神经元较多,形态多为较大的多角形细胞以及少量较小的椭圆形细胞,其余脊髓节段前角处病毒阳性神经元较少;中间带(intermediate zone,IMZ)处病毒阳性神经元多为椭圆形或纺锤形;脊髓后角(posterior horn,PH)处病毒阳性神经元多为个体较小的椭圆形或卵圆形(图1A-D)。

脑干Barrington氏神经核团处亦出现较多伪狂犬病毒阳性神经元(143.5 ± 8.1),形态多为卵圆形或椭圆形;其中三叉神经中脑核(Me5)处病毒阳性神经元则呈较大的卵圆形(图1E)。

对照组大鼠的脊髓及脑干内免疫组化染色结果均为阴性,未发现细胞核黄染的伪狂犬病毒阳性神经元(图1F)。

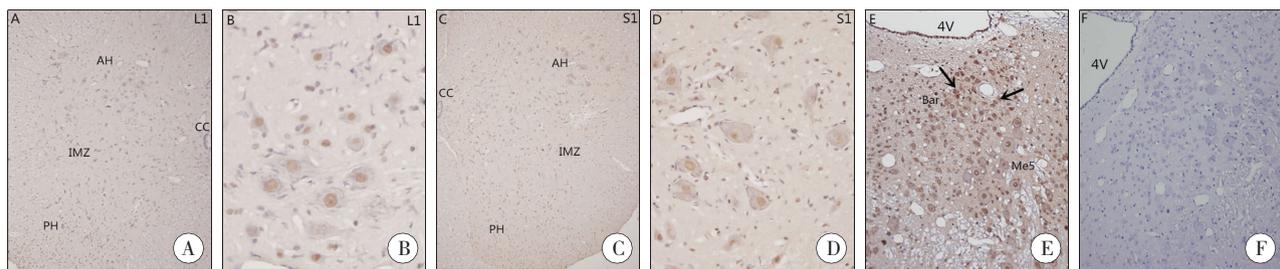


图1 免疫组化染色结果,A:实验组L1节段脊髓免疫组化染色结果($\times 100$);B:实验组L1节段脊髓中PRV阳性的神经元($\times 400$);C:实验组S1节段脊髓免疫组化染色结果($\times 100$);D:实验组S1节段脊髓中PRV阳性的神经元($\times 400$);E:实验组脑干Barrington氏核团染色结果,箭头所指即为Barrington氏核团($\times 400$);F:对照组脑干Barrington氏核团部位染色结果(均为蓝色阴性, $\times 400$)注:AH(anterior horn):前角;IMZ(intermediate zone):中间带;PH(posterior horn):后角;CC(central canal):中央管;4V:第四脑室;Bar:Barrington氏神经核团;Me5:三叉神经中脑核

Fig. 1 Immunohistochemical results of PRV

讨论

排便是由中枢神经、周围神经以及结肠平滑

肌和肛门括约肌等共同参与的一个复杂过程,其中枢神经包括脊髓内的低级中枢以及颅脑内的高级中枢^[1-2]。此外,排便与排尿过程也有着紧密的联系,与二者相关的组织器官不仅在解剖位置上紧密相

邻,而且在神经反射通路方面也较为相似。这就要求在示踪排便反射神经通路时,所选择的神经示踪剂以及示踪方法既要保证示踪过程的特异性,避免示踪剂局部扩散出现假阳性的结果,又要保证示踪剂能够跨越多级神经元最终到达颅脑内的高级中枢,从而完整反映出整个神经通路的概况。而一般的神经示踪剂如辣根过氧化物酶,荧光染料等均无法满足以上要求^[10],故本次实验选用了伪狂犬病毒的减毒株(Bartha株)作为神经示踪剂。它作为一种嗜神经病毒,能够在神经元细胞内自我复制,从而保证了示踪过程中有足够浓度的报告蛋白以显示整个神经通路而不会出现信号衰减的现象;此外,它还能够跨越突触传播至与其有突触连接的神经细胞,而不会扩散到周围无突触连接的神经元,从而保证了其示踪过程的特异性;最后该病毒的减毒株,在大大削弱了病毒毒力的同时又保留了其逆向跨突触传播的能力,从而延长了被感染动物的存活时间,使病毒有足够的时间来逆向感染示踪整个与靶器官相关的神经通路。该病毒不仅能够较为完全的显示与排便反射相关的整个神经通路,而且能够保证示踪结果的特异性,是一种较为理想的神经示踪剂^[3-4]。但其最后示踪结果的检测仍然需要免疫组化染色,而影响免疫组化染色结果的各种因素势必也会对示踪结果产生较大的影响,这也是本次实验的不足之处。近期一些伪狂犬病毒的基因重组体如 PRV-152 和 PRV-614,分别标记了 GFP(绿色荧光蛋白)基因和 RFP(红色荧光蛋白)基因的出现,使得病毒的示踪结果可以在荧光显微镜下直接观察而无需进一步染色处理,从而增加了神经传导检测的可靠性,以后将会得到广泛的应用^[11]。

目前,普遍认为控制排便的低级中枢位于脊髓的腰骶段,且包括本次实验在内的多项研究均证实该反射通路与脊髓 L6 至 S1 节段关系密切。更有学者认为与 L6 节段相比,排便反射的传入与传出神经更多的起源于 S1 节段,这也为骶副交感神经核团控制盆腔脏器功能的学说提供了依据。在本次大鼠实验中不仅在腰骶段,同时在胸腰段脊髓的 T13 至 L1 节段发现了大量伪狂犬病毒阳性的神经元,这可能与胸腰段的交感神经节及内脏神经向盆腔内所投射的交感神经纤维有关^[7]。而控制排尿、排便以及生殖功能的交感/副交感神经通路在功能与解剖上紧密相连,仍需要进一步的研究以明确区分。

在本次试验中我们在大鼠脑干的 Barrington 氏神经核团内发现了大量伪狂犬病毒阳性的神经元,

说明这之前被认为是脑干排尿中枢的神经核团在排便的控制方面也起着重要的作用^[5,7-8]。也有学者使用在膀胱和结肠进行双标记的方法进一步证实在该核团内至少存在三块区域,即分别控制排尿与排便的相对独立的区域,以及共同调控二者功能的区域^[8]。而这一功能区域划分的详细情况仍需要进一步研究。此外,由于动物和人类排便控制条件的不同,本次实验并未涉及伪狂犬病毒向大脑皮层内的示踪结果,而排便反射神经通路在高级中枢神经系统内的部分,对研究某些与排便相关的先天性畸形如先天性巨结肠、先天性肛直肠畸形等疾病的发病原因、诊疗方法以及预后情况等方面具有至关重要的作用,这也是今后需要努力研究的方向^[12-13]。

参考文献

- 1 Brading AF, Ramalingam T. Mechanisms controlling normal defecation and the potential effects of spinal cord injury[J]. *Prog Brain Res*, 2006, 152:345-358. DOI: 10.1016/S0079-6123(05)52023-5.
- 2 Lynch AC, Fizzle FA. Colorectal motility and defecation after spinal cord injury in humans[J]. *Prog Brain Res*, 2006, 152:335-343. DOI: 10.1016/S0079-6123(05)52022-3.
- 3 李碧,朱玲,周远成,等.伪狂犬病毒神经传导研究[J].*病毒学报*, 2014, 30(3):333-336. DOI:10.13242/j.cnki.bingduxuebao.002486.
Li B, Zhu L, Zhou YC, et al. Studies on Neuronal Tracing with Pseudorabies Virus[J]. *Chin J Virol*, 2014, 30(3):333-336. DOI:10.13242/j.cnki.bingduxuebao.002486.
- 4 张翼,王雄伟,田春雷,等.伪狂犬病毒跨突触示踪视觉系统神经网络的研究进展[J].*现代生物医学进展*, 2013, (22):4395-4397. DOI:10.13241/j.cnki.pmb.2013.22.001.
Zhang Y, Wang XW, Tian CL, et al. Pseudorabies Virus Trans-synaptic Tracing Visual System Neural Network Research Progress [J]. *Progress in Modern Biomedicine*. 2013, (22):4395-4397. DOI:10.13241/j.cnki.pmb.2013.22.001.
- 5 Pavcovich LA, Yang M, Miselis RR, et al. Novel role for the pontine micturition center, Barrington's nucleus: evidence for coordination of colonic and forebrain activity[J]. *Brain Res*, 1998, 784(1-2):355-361. DOI:10.1016/S0006-8993(97)01178-5.
- 6 Valentino RJ, Kosboth M, Colflesh M, et al. Transneuronal labeling from the rat distal colon: anatomic evidence for regulation of distal colon function by a pontine corticotropin-releasing factor system[J]. *J Comp Neurol*, 2000, 417(4):

- 399-414. DOI: 10. 1002/(SICI) 1096-9861 (20000221) 417:4 <399>; AID-CNE2 >3.0.CO;2-W.
- 7 Vizzard MA, Brisson M, de Groat WC. Transneuronal labeling of neurons in the adult rat central nervous system following inoculation of pseudorabies virus into the colon[J]. Cell Tissue Res, 2000, 299 (1): 9-26. DOI: 10. 1007/s004419900128.
- 8 Rouzade-Dominguez ML, Miselis R, Valentino RJ. Central representation of bladder and colon revealed by dual trans-synaptic tracing in the rat: substrates for pelvic visceral coordination[J]. Eur J Neurosci, 2003, 18 (12): 3311-3324. DOI: 10. 1111/j. 1460-9568. 2003. 03071. x.
- 9 蒋洁, 罗志飞, 蓝永洪, 等. 免疫组化染色中核抗原暴露的优化[J]. 海南医学院学报, 2013, (06): 728-730. DOI: 10. 13210/j. cnki. jhmu. 2013. 06. 003.
- Jiang J, Luo ZF, Lan YH, et al. Effect of different heating methods and PH buffer on immunohistochemical staining [J]. Journal of Hainan Medical University. 2013, (06): 728-730. DOI: 10. 13210/j. cnki. jhmu. 2013. 06. 003.
- 10 朱贺, 李丽, 赵磊, 等. 常用神经示踪剂及其示踪特点 [J]. 四川生理科学杂志, 2009, 31 (3): 119-122. DOI: 10. 3969/j. issn. 1671-3885. 2009. 03. 012.
- Zhu H, Li L, Zhao L, et al. Common characteristics of the neural tracers [J]. Sichuan Journal of Physiological Sciences, 2009, 31 (3): 119-122. DOI: 10. 3969/j. issn. 1671-3885. 2009. 03. 012.
- 11 Smith BN, Banfield BW, Smeraski CA, et al. Pseudorabies virus expressing enhanced green fluorescent protein: A tool for in vitro electrophysiological analysis of transsynaptically labeled neurons in identified central nervous system circuits [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97 (16): 9264-9269. DOI: 10. 1073/pnas. 97. 16. 9264.
- 12 杨晓锋, 李索林, 徐伟立, 等. Cajal 间质细胞凋亡在先天性巨结肠症及其同源病发病中的作用[J]. 临床小儿外科杂志, 2016, 15 (01): 49-52. DOI: 10. 3969/j. issn. 1671-6353. 2016. 01. 014.
- Yang XF, Li SL, Xu WL, et al. Role of apoptosis of interstitial cells of Cajal in the pathogenesis of Hirschsprung's disease and its allied disorders [J]. J Clin Ped Sur, 2016, 15 (01): 49-52. DOI: 10. 3969/j. issn. 1671-6353. 2016. 01. 014.
- 13 刘洪江, 朱进, 向丽, 等. 54 例先天性巨结肠同源病临床分析[J]. 临床小儿外科杂志, 2015, 14 (02): 88-91. DOI: 10. 3969/j. issn. 1671-6353. 2015. 02. 003.
- Liu HJ, Zhu J, Xiang L, et al. The clinical analysis of 54 cases with allied Hirschsprung's disease [J]. J Clin Ped Sur, 2015, 14 (02): 88-91. DOI: 10. 3969/j. issn. 1671-6353. 2015. 02. 003.

(收稿日期: 2016-04-16)

(本文编辑: 仇 君)

本刊引文格式: 王琦, 向波, 李亚楠, 等. 伪狂犬病毒法示踪成年大鼠排便反射神经通路的研究 [J]. 临床小儿外科杂志, 2017, 16 (2): 185-188. DOI: 10. 3969/j. issn. 1671-6353. 2017. 02. 019.

Citing this article as: Wang Q, Xiang B, Li YN, et al. Study of defecation neural pathway by inoculating pseudorabies virus into rectum in adult rats [J]. J Clin Ped Sur, 2017, 16 (2): 185-188. DOI: 10. 3969/j. issn. 1671-6353. 2017. 02. 019.

(上接第 163 页)

- 4 (6): 735-740. DOI: 10. 1097/01241398-198411000-00015.
- 19 Morin C, Harche HT, MacEwen GD. The infant Hip: real-time US assessment of acetabular development [J]. Radiology, 1985, 153 (3): 673-677. DOI: 10. 1148/radiology. 157. 3. 3903854.
- 20 何丽莉, 钱蕾英, 孙颖华, 等. 超声筛查婴儿发育性髋关节异常的临床价值 [J]. 临床小儿外科杂志, 2010, 9 (1): 64-66. DOI: 10. 3969/j. issn. 1671-6353. 2010. 01. 027.
- He LL, Qian QY, Sun YH, et al. The clinical value of ultrasound screening infants developmental dysplasia of hip [J]. J Clin Ped Sur, 2010, 9 (1): 64-66. DOI: 10. 3969/j. issn. 1671-6353. 2010. 01. 027.

(本文编辑: 王爱莲 仇 君)

本刊引文格式: 蒋飞, 乔飞, 孙磊娇, 等. 大连地区婴幼儿发育性髋关节发育不良初步筛查及高危因素分析 [J]. 临床小儿外科杂志, 2017, 16 (2): 159-163. DOI: 10. 3969/j. issn. 1671-6353. 2017. 02. 013.

Citing this article as: Jiang F, Qiao F, Sun LJ, et al. Preliminary screening of infants with developmental dysplasia of the hip and analysis of risk factors in Dalian [J]. J Clin Ped Sur, 2017, 16 (2): 159-163. DOI: 10. 3969/j. issn. 1671-6353. 2017. 02. 013.

(收稿日期: 2016-11-06)