

·实验研究·

无神经节细胞动物模型的建立及鉴定

金 祝¹ 尚 卿² 刘远梅¹

【摘要】 目的 建立一种简单、有效的无神经节细胞大鼠模型,为肠神经干细胞移植治疗先天性巨结肠提供可用的动物模型。**方法** 取新生 1 周龄乳鼠 16 窝,每窝中随机取 4 只肛门灌注生理盐水为对照组,4 只肛门灌注 1% 的苯扎氯铵(BAC)作为实验组,灌注后 2、4、6、8 周观察两组灌注后表现(饮食、活动、腹部及排便等情况)以及直肠形态;HE 染色、HuD 免疫荧光(IF)染色观察肠神经节形态,并计算各组大鼠肠肌间神经节数量;qRT-PCR 检测胶质细胞源性神经营养因子(GDNF)以及神经型一氧化氮合酶(nNOS)的表达情况。**结果** 灌注后 2、4 周,两组大鼠无明显异常,6 周后实验组出现轻微腹胀,排便减少,至 8 周时腹胀明显,不排大便,伴精神萎靡,对照组大鼠无异常表现。2 周、4 周时两组直肠形态无异常,6 周时实验组出现轻度狭窄,8 周时明显狭窄,对照组未见异常改变。HE 染色:术后 2、4 周两组直肠神经节细胞大小、形状以及数量上无明显异常($P > 0.05$),6 周时两组神经节细胞数量的中位数分别为 3.0 和 6.0,两组比较差异有统计学意义($z = -5.82, P < 0.001$),至 8 周时实验组未见肌间神经节细胞,对照组无变化。免疫荧光染色:HuD 在两组大鼠肠肌间神经节中均有表达,2、4 周两组无明显区别;6 周时,实验组神经节细胞较对照组体积小、形态异常,至 8 周时,实验组已无荧光表达,对照组无改变。qRT-PCR:2、4 周时两组 GDNF mRNA、nNOS mRNA 均无明显差异($P > 0.05$),6、8 周时实验组 GDNF mRNA 比对照组明显降低(0.06 ± 0.03 vs 1.05 ± 0.32 ; 0.39 ± 0.24 vs 1.02 ± 0.22),经统计学分析差异有意义($P < 0.001$),8 周时 GDNF mRNA 的表达量较 6 周时明显升高,经统计学分析差异有意义($P < 0.001$);6、8 周时实验组 nNOS mRNA 比对照明显降低(0.54 ± 0.33 vs 1.14 ± 0.50 ; 0.40 ± 0.24 vs 1.03 ± 0.26),经统计学分析差异有意义($P < 0.001$)。**结论** 直肠灌注 BAC 可以导致大鼠直肠神经节细胞完全缺如,GDNF 以及 nNOS 异常表达可能与 HD 发生有关。

【关键词】 Hirschsprung 病;动物模型;大鼠;苯扎铵化合物

Establishment and identification of experimental rat model for aganglionosis. Jin Zhu¹, Shang Qing², Liu Yuanmei¹. 1. Department of Pediatric Surgery, Affiliated Hospital, Zunyi Medical College, Zunyi 563003, China. 2. Department of Pediatric surgery Xinxiang Central Hospital, Xinxiang 453000, China. Corresponding author: Liu Yuanmei, Email: yuanmei116@aliyun.com

【Abstract】 Objective To establish a simple and valid rat model of aganglionosis. **Methods** Among 128 neonatal rats aged 1 week in 16 litters, 8 rats per litter were randomly divided into control and treatment groups ($n = 4$ each). Saline and benzalkonium chloride (BAC) were injected respectively into rectum. Such clinical manifestations as abdominal distention and defecation and rectal morphology were observed at Weeks 2, 4, 6, 8 post-injection. The stains of hematoxylin-eosin (HE) and HuD protein immunofluorescence (IF) were used for counting the number of ganglion cells in mesenteric nervous plexus of rectum. And quantitative real time-polymerase chain reaction (qRT-PCR) was employed for detecting the expressions of glial fibrillary acidic protein (GFAP) and neuronal nitric oxide synthase (nNOS) in rectum. **Results** Survival status and rectal morphology: Varying degrees of diarrhea in two groups disappeared at Week 1. Treatment group showed mild abdominal distention and decreased defecation at Week 6. Abdominal distention worsened and defecation further

DOI:10.3969/j.issn.1671-6353.2018.01.014

基金项目:贵州省科学技术基金项目(黔科合 J 字[2012]2364 号);遵义市“15851”人才项目;遵义医学院附属医院硕士科研启动基金(院字(2011)01 号)

作者单位:1. 遵义医学院附属医院小儿普胸泌科(贵州省遵义市, 563003); 2. 新乡市中心医院小儿外科(河南省新乡市, 453000)

通信作者:刘远梅, Email: yuanmei116@aliyun.com

improved at Week 8. There was an onset of mental depression. And control group had no obvious abnormalities. There were no obvious abnormal changes in neither groups at Weeks 2 & 4. In treatment group, mild rectal stricture occurred at Week 6, worsened at Week 8 and proximal intestine had obvious dilation with an accumulation of intestinal contents. Control group showed no change. HE staining: The mean numbers of ganglion cells of treatment and control groups were 6 vs 6 and 6 vs 6 at Weeks 2 & 4 and size or shape showed no difference ($P > 0.05$). The mean numbers of ganglion cells of two groups were 3 to 6 at Week 6 ($P < 0.05$). And mesenteric nervous plexus became smaller and more distorted in treatment group. At 8 weeks post-injection, mesenteric nervous plexus was absent and control group had no abnormalities. Immunofluorescence (IF) stain: mesenteric nervous plexus was positive for yellow green fluorescence. Nucleus was obvious while cytoplasm remained obscured. Nerve fiber was non-stained and the boundary of staining was distinct. No inter-group difference existed in mesenteric nervous plexus at Weeks 2 & 4. Smaller size and more irregular shape existed in treatment group versus control group at Week 6 and yellow green fluorescence disappeared at Week 8 post-injection. Control group had no abnormalities. Quantitative real time-polymerase chain reaction (qRT-PCR): The expressions of GDNF mRNA and nNOS mRNA showed no significant inter-group difference at Weeks 2 & 4 ($P > 0.05$). At Weeks 6 & 8, the expressions of GDNF mRNA and nNOS mRNA were obviously lower in treatment group than those in control group (GDNF: 0.06 ± 0.03 vs 1.05 ± 0.32 , 0.39 ± 0.24 vs 1.02 ± 0.22 ; nNOS: 0.54 ± 0.33 vs 1.14 ± 0.50 , 0.40 ± 0.24 vs 1.03 ± 0.26). In treatment group, it was obviously higher at Week 8 than that at Week 6.

Conclusion Absence of ganglion cells in rectum may be successfully induced by an injection of BAC into rectum. And abnormal expressions of GDNF and nNOS are probably correlated with an occurrence of aganglionosis.

【Key words】 Hirschsprung Disease; Models, Animal; Rats; Benzalkonium Compounds

先天性巨结肠 (Hirschsprung disease, HD), 亦称肠无神经节细胞症 (aganglionosis), 是小儿较为常见的一种先天性消化道畸形, 其发病机制为病变肠管神经节的完全缺如或减少, 可能与肠神经嵴干细胞 (enteric neural crest stem cells, ENCSCs) 迁移、增殖、分化的异常有关。目前国内外学者已从鼠、人体成功分离并培育出 ENCSCs^[1-5], 但这种细胞是否适合移植治疗 HD 尚处于实验阶段, 这就需要我们寻找一种操作简单、移植后容易观察和研究的动物模型。所以, 本实验通过苯扎氯胺 (BAC) 处理新生大鼠直肠, 建立无神经节细胞性巨结肠动物模型, 为 ENCSCs 移植治疗巨结肠病建立可用的动物模型。

材料与方法

一、无神经节细胞动物模型的建立

选用第三军医大学大坪医院医学实验动物中心提供的产后 1 周龄 SD 大鼠乳鼠 16 窝, 每窝按体重排序编号, 用随机数字表法将每窝乳鼠分为两组: BAC 直肠灌注组, 生理盐水灌注组, 每组各 64 只。产后 1 周后, 采用自制的灌注针头连接微量注射器, 插入乳鼠直肠内, 每 5 min 推注 1% 的 BAC (德国 Sigma-Aldrich 公司) 0.05 mL, 持续 30 min, 对照组更换 1% 的 BAC 为等量的生理盐水。

二、观察实验大鼠的生活习性改变及直肠大体

形态的改变

取处理后的 16 窝乳鼠分别于 2、4、6、8 周随机取 4 窝, 分别记录各组大鼠的饮食、活动、腹部情况及排便情况, 采用颈椎脱臼法处死后解剖取材, 拍照记录直肠的大体形态变化。

三、HE 观察并计数神经节细胞数量

将实验大鼠直肠完整取出后, 4% 甲醛固定一夜, 行石蜡包埋、切片, 行苏木素/伊红 (HE) 染色, 之后每张切片随即挑取 6 个视野计数神经节细胞数量并记录。

四、HuD 蛋白免疫荧光 (IF) 观察肠神经节细胞

石蜡切片进行脱蜡、梯度酒精处理后, 行微波抗原修复, 10% 正常山羊血清封闭, 滴加小鼠抗鼠 HuD 一抗 1:50 (美国 Santa Cruz 公司), 4℃ 冰箱孵育过夜、复温, 滴加 FITC 标记的山羊抗小鼠二抗 1:25 (美国 Proteintech Group 公司), 37℃ 下避光孵育 1 h, 滴加 0.1% 的 DAPI 溶液, 室温孵育 2 ~ 3 min, 每步之间用 PBS 冲洗 3 min, 重复 3 次, 最后用抗荧光淬灭封片剂 (上海碧云天生物技术有限公司) 封片, 待自然干燥后用荧光显微镜观察并拍照。

五、qRT-PCR 检测直肠 GDNF、nNOS mRNA 的表达

参照试剂盒说明书进行操作 (TaKaRa 公司 RNAiso Reagent), 提取总 RNA, 用 NanodroP1000 核酸蛋白测量仪检测 RNA 的纯度, 确保提取的 RNA

在 A260/A280 吸光度比值在 1.8 ~ 2.1 之间,之后参照试剂盒说明书 (TaKaRa 公司 Prime Script RT reagent Kit) 进行逆转录反应,取逆转录得到的 cDNA 行 qRT-PCR,反应体系为 25 μ L,反应条件为预变性 95 $^{\circ}$ C 30 s,PCR 反应 95 $^{\circ}$ C 5 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,循环 40 次,测溶解曲线 50 $^{\circ}$ C ~ 95 $^{\circ}$ C 30 s,循环 81 次,得到的数据采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行统计学分析。

六、统计学处理

运用 SPSS19.0 统计软件进行统计学分析,服从正态分布的计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用两独立样本资料 *t* 检验;不服从正态分布的计量资料以中位数 (M) 和四分间距 (IQR) 表示,采用两独立样本秩和检验。检验水准为 $\alpha = 0.05$,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、术后大鼠的存活情况及直肠形态学变化

共处理 16 窝乳鼠 128 只,BAC 实验组与生理盐水对照组分别 64 只,其中 BAC 实验组中 1 只因术中麻醉过量死亡,余均存活,生理盐水对照组无死亡。术后实验组与对照组大鼠均有不同程度的腹泻,以术后 48 h 内最明显,1 周后,腹泻逐渐消失,至 2 周时,已无腹泻症状;术后 6 周时,实验组大鼠出现轻微腹胀,排便减少;术后 8 周,实验组大鼠腹胀加重,食欲下降,排便进一步减少,出现精神萎靡,对照组无上述表现。术后 2 周、4 周实验组大鼠直肠无明显狭窄,肠管无明显扩张,与对照组无明显变化;术后 6 周实验组大鼠可见直肠较对照组

稍狭窄,粪便通过障碍,而近端肠管尚无扩张改变;术后 8 周可见实验组大鼠结肠较对照组明显积气扩张,直肠狭窄明显,粪便通过狭窄段困难,近端肠管明显积气扩张,对照组无明显异常变化,见图 1。

二、HE 染色观察神经节细胞

术后 2 周、4 周,实验组与对照组直肠均可见肌间及黏膜下神经丛,神经节细胞体积较大,胞核色浅呈圆形,核仁明显,大小、形状无明显区别,2 周、4 周实验组与对照组神经节数量比较无明显差别 ($P > 0.05$);术后 6 周,实验组可见肌间神经节稀疏变细,神经节细胞体积变小,核固缩,神经节数量为 3,而对照组为 6,差异有统计学意义 ($z = -5.82, P < 0.01$);至术后 8 周,实验组肌间、黏膜下神经丛完全消失,镜下未见明显神经节结构,见图 2。

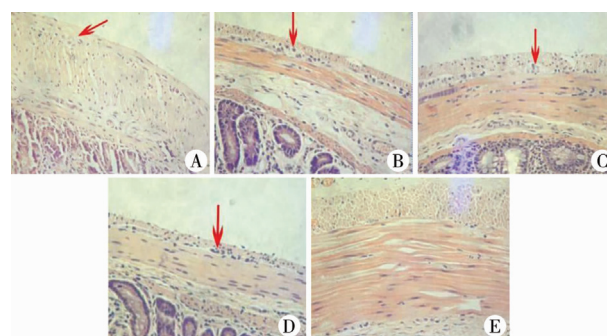


图 2 术后 2、4、6、8 周实验组及对照组 HE 染色结果 (HE $\times 200$)。A 为对照组;B 为术后 2 周实验组;C 为术后 4 周实验组;D 为术后 6 周实验组;E 为术后 8 周实验组

Fig. 2 HE stain of rectums in control and experimental group at Weeks 2, 4, 6 & 8 post-operation (HE, $\times 200$)

三、HuD 蛋白免疫荧光 (IF) 染色观察肠神经节细胞

对照组 2、4、6、8 周及实验组 2、4 周,荧光显微镜下均可见肌间神经丛表达明亮的黄绿色荧光,神经节细胞胞核染色明显,胞质染色较淡或无着色,神经纤维未着色,黏膜下神经节区域染色不清,无法辨别,各组间神经丛染色无明显区别;实验组在 6 周后,神经丛体积变小,形态变差,神经节细胞数目减少;8 周后,实验组未见到阳性黄绿色荧光表达,见图 3。

四、qRT-PCR 检测 GDNF、nNOS 的表达

2、4、6、8 周实验组与对照组 GDNF mRNA 和 nNOS mRNA 的表达量见表 1。术后第 6 周和第 8 周实验组 GDNF mRNA 的表达与对照组存在差异,经统计学分析差异有意义 ($P < 0.001$);术后第 6 周和第 8 周 nNOS mRNA 的表达实验组与对照组存在差异,经统计学分析差异有意义 ($P < 0.001$)。

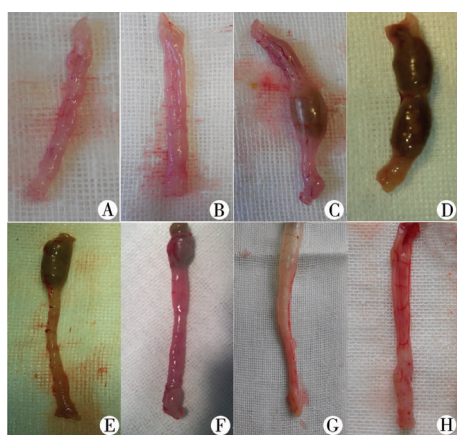


图 1 术后 2、4、6、8 周对照组与实验组处理段直肠。A 为 2 周实验组;B 为 2 周对照组;C 为 4 周实验组;D 为 4 周对照组;E 为 6 周对照组;F 为 6 周实验组;G 为 8 周对照组;H 为 8 周实验组。

Fig. 1 Rectums of control and experimental groups at Weeks 2, 4, 6 & 8 post-operation

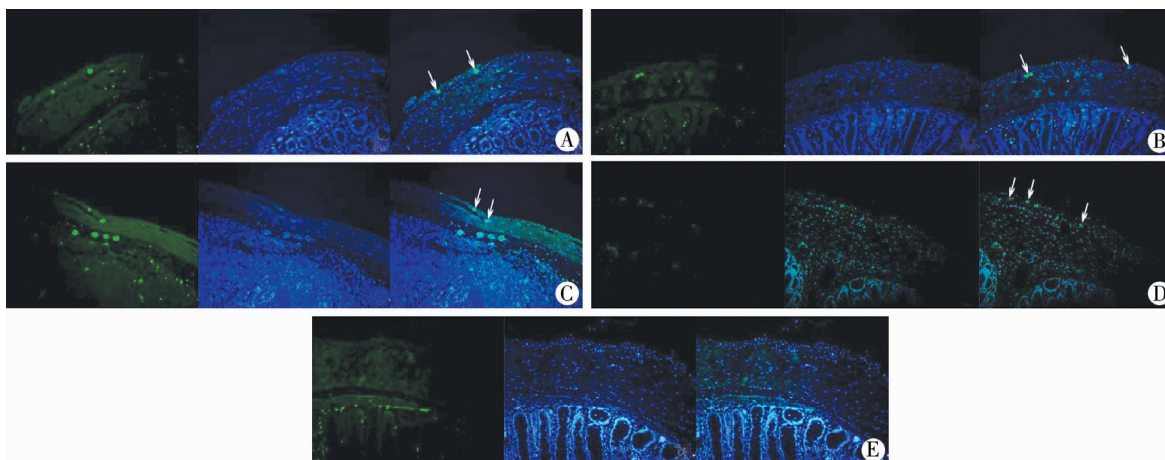


图3 灌注后实验组及对照组 HuD 免疫荧光化学染色结果 (IF ×200)。A 为对照组;B 为术后 2 周实验组;C 为术后 4 周实验组;D 为术后 6 周实验组;E 为术后 8 周实验组

Fig.3 Immunofluorescent stain of HuD protein in rectums of control and experimental groups post-injection (IF, ×200)

表1 实验组和对对照组 GDNF 和 nNOS mRNA 的表达 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Expressions of GDNF and nNOS mRNA in experimental and control groups ($\bar{x} \pm s$)

变量	实验组	对照组	t 值	P 值
GDNF				
第 2 周	0.99 ± 0.48	1.09 ± 0.47	-0.446	0.663
第 4 周	0.69 ± 0.43	1.08 ± 0.43	-1.748	0.104
第 6 周	0.06 ± 0.03	1.05 ± 0.32	-8.644	<0.001
第 8 周	0.39 ± 0.24	1.02 ± 0.22	-5.443	<0.001
nNOS				
第 2 周	0.69 ± 0.31	1.02 ± 0.46	-1.729	0.106
第 4 周	1.40 ± 0.93	1.08 ± 0.44	0.847	0.421
第 6 周	0.54 ± 0.33	1.14 ± 0.50	-2.845	0.013
第 8 周	0.3 ± 0.24	1.03 ± 0.26	-4.928	<0.001

讨论

近年来,国内外学者已从胚胎和成体组织成功提取出肠神经嵴干细胞(ENCSCs),并在体外培育成神经球(NLBs),且该 NLBs 可分化为神经元和神经胶质细胞,这为移植替代治疗 HD 提供了可靠的供体^[1-5]。但早期的 HD 移植模型多为体外培育的肠管组织和基因修饰的动物模型^[6],体外培养组织移植存在局限性,而基因修饰模型虽然能造成肠道神经节的缺如,但实验动物大多因基因的缺陷出生不久后死亡,二者均较难观察成体肠管内移植后的情况^[7]。1978 年 Sato A^[8]第一次报道使用 BAC 破坏肠道神经元,成功建立 HD 大鼠模型。此后,国内外学者也成功建立了空肠、回肠、结肠无神经节细胞症的动物模型^[9,10]。但以上几种模型均需行开腹关腹手术,如需行移植实验,还需要二次手术,模型

死亡率高,故本实验通过直肠灌注 BAC 法,避免了开腹关腹的风险,明显提高了术后存活率,且采用乳鼠作为实验对象,更加符合小儿 HD 的特点,这便成为了一种更加合适的移植模型。

HuD 蛋白是一种 RNA 结合蛋白,可以清晰的显示出肠道肌间神经丛的神经节细胞,它与其他标记物不同,HuD 多在核内表达,胞质基本无表达,神经纤维基本不着色,因此在行免疫荧光染色时,可以有效地分辨出神经元的数量、大小,排除了神经纤维的干扰^[11]。本研究显示 6 周时实验组 HuD 的肌间神经丛变小、形态各异,至 8 周时已无法看到 HuD 表达。可以看出,直肠灌注 BAC 可以导致大鼠直肠神经节细胞完全缺如,达到与临床上 HD 相似的效果。

GDNF 是一种分泌蛋白,属于转化生长因子 β 超家族,通过与 GDNF 家族受体 $\alpha 1$ 结合形成复合物,可以结合并激活跨膜受体酪氨酸激酶(RET),促进胚胎期肠 ENCSCs 的迁移、增殖、分化、存活而形成正常的 ENS,胚胎期 GDNF 的缺乏将导致 ENS 发育缺陷,引起 HD 的发病^[12,13]。目前国内外学者在对 HD 患儿病变肠管 GDNF 表达的研究中发现患儿病变肠管的表达量较正常组均降低,这与我们的动物实验结果一致^[14,15]。值得注意的是,GDNF 在 8 周实验组较 6 周实验组明显增高,原因不明,查阅相关文献认为是 GDNF 在成体神经元的轴突生长、细胞存活及神经损伤再修复上起到重要的作用,BAC 处理后的肠管在一段时间后,肠神经系统存在自我修复情况,但这种自我修复的机制目前尚不清楚^[16-20]。

nNOS 是肠道合成释放抑制性神经递质 NO 的

关键酶,当缺乏这种关键酶时,NO的合成释放将会减少,可导致在平滑肌水平缺乏一个抑制性松弛信号,使NO缺乏段肠管紧张度增加。肠道内NO由肌间神经节通过激活的nNOS合成后释放,肠管肌间神经节可以检测到nNOS的表达,先天性巨结肠患者病变段的nNOS mRNA表达是减少的甚至不表达,我们的结果也显示了nNOS mRNA在实验组的表达降低,这也进一步表明BAC处理后的肠管能够建立与临床HD类似的无神经节细胞动物模型^[21,22]。但是我们所制作的这种无神经节细胞大鼠模型,尚不能完全代替临床上的HD,相对而言,基因敲除动物模型可以达到相对完善的HD模型,但其制作难度及成本高、实验条件苛刻,不能普及,而我们所建立的HD模型存活率高,存活时间长,饲养方便,更适合研究无神经节细胞性巨结肠病的病理过程、发病机制和治理措施。

参考文献

- 李仲荣,朱利斌,刘征,等.大鼠肠神经干细胞同种消化道移植的实验研究[J].中华小儿外科杂志,2007,28(7):366-369. DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-3006.2007.07.009.
- Li ZR,Zhu LB,Liu Z,et al. A primary study of homotransplantation of enteric neural stem cells into the alimentary tract in rat[J]. Chin J Pediatr Surg,2007,28(7):366-369. DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-3006.2007.07.009.
- 肖莉,刘勇,高亚.小鼠胚胎肠神经嵴干细胞的分离培养及鉴定[J].西安交通大学学报(医学版),2007,28(5):595-597. DOI:10.3969/j.issn.1671-8259.2007.05.034.
- Xiao L,Liu Y,Gao Y. Isolation and culture of neural crest stem cells of embryonic mice in vitro[J]. Journal of Xi'an Jiaotong University (Medical Sciences),2007,28(5):595-597. DOI:10.3969/j.issn.1671-8259.2007.05.034.
- Metzger M,Bareiss PM,Danker T,et al. Expansion and differentiation of neural progenitors derived from the human adult enteric nervous system[J]. Gastroenterology,2009,137(6):2063-2073. DOI:10.1053/j.gastro.2009.06.038.
- Azan G,Low WC,Wendelschafer-Crabb G,et al. Evidence for neural progenitor cells in the human adult enteric nervous system[J]. Cell Tissue Res,2011,344(2):217-225. DOI:10.1007/s00441-011-1130-9.
- 张建军,郑百俊,高亚,等.先天性巨结肠患儿切除肠管肠黏膜ENS干细胞的初步鉴定[J].中华小儿外科杂志,2011,32(8):558-572. DOI:10.3760/cmaj.j.issn.0253-3006.2011.08.003.
- Zhang JJ,Zheng BJ,Gao Y,et al. Preliminary identification of enteric nervous system stem cells in intestinal mucosa of the patients with Hirschsprung's disease[J]. Chin J Pediatr Surg,2011,32(8):558-572. DOI:10.3760/cmaj.j.issn.0253-3006.2011.08.003.
- Heanue TA,Pachnis V. Enteric nervous system development and Hirschsprung's disease: advances in genetic and stem cell studies[J]. Nat Rev Neurosci,2007,8(6):466-479. DOI:10.1038/nrn2137.
- Won KJ,Torihashi S,Mitsui-Saito M,et al. Increased smooth muscle contractility of intestine in the genetic null of the endothelin ETB receptor: a rat model for long segment Hirschsprung's disease[J]. Gut,2002,50:355. DOI:10.1136/gut.50.3.355.
- Sato A,Yamamoto M,Imamura K,et al. Pathophysiology of aganglionic colon and anorectum: an experimental study on aganglionosis produced by a new method in the rat[J]. J Pediatr Surg,1978,13(4):399.
- Geisbauer C,Wu BM,Dunn JC. Transplantation of enteric cells into the aganglionic rodent small intestines[J]. J Surg Res,2012,176(1):20-28. DOI:10.1016/j.jss.2011.05.014.
- 刘伟,吴荣德,董云玲,等.无神经节细胞性巨结肠病动物模型的建立[J].中华小儿外科杂志,2007,28(4):208-210. DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-3006.2007.04.012.
- Liu W,Wu RD,Dong YL,et al. An animal model of aganglionic megacolon[J]. Chin J Pediatr Surg,2007,28(4):208-210. DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-3006.2007.04.012.
- 林中,胡宏镇,Jackie D Wood. Hu. 蛋白作为豚鼠小肠肌间丛神经元标志物的研究[J].基础医学与临床,2002,22(3):257-260. DOI:10.3969/j.issn.1001-6325.2002.03.013.
- Lin Z,Hu HZ,Jackie D Wood. The assessment of Hu proteins as a neuronal marker for the total myenteric neurons in the whole-mount and the ganglion culture of guinea-pig small intestine[J]. Basic Medical Sciences and Clinics,2002,22(3):257-260. DOI:10.3969/j.issn.1001-6325.2002.03.013.
- Natarajan D,Marcos-Gutierrez C,Pachnis V,et al. Requirement of signalling by receptor tyrosine kinase RET for the directed migration of enteric nervous system progenitor cells during mammalian embryogenesis[J]. Development,2002,129(3):5151-5160.
- Nishiyama C,Uesaka T,Manabe T,et al. Trans-mesenteric neural crest cells are the principal source of the colonic enteric nervous system[J]. Nat Neurosci,2012,15(9):1211-1218. DOI:10.1038/nn.3184.
- Eketjäll S,Ibáñez CF. Functional characterization of mutations in the GDNF gene of patients with Hirschsprung disease[J]. Hum Mol Genetics,2002,11(3):325-329. DOI:

10. 1038/nn. 3184.
- 15 侯豫,杨烨,赵新,等. 胶质细胞源性神经营养因子在先天性巨结肠中的表达[J]. 实用儿科临床杂志,2008,23(7):507-509. DOI:10. 3969/j. issn. 1003-515X. 2008. 07. 010.
- Hou Y, Yang Y, Zhao X, et al. Expression of glial cell derived neurotrophic factor in Hirschsprung's disease [J]. J Appl Clin Pediatr, 2008, 23(7):507-509. DOI:10. 3969/j. issn. 1003-515X. 2008. 07. 010.
- 16 Hanani M, Ledder O, Yutkin V, et al. Regeneration of myenteric plexus in the mouse colon after experimental denervation with benzalkonium chloride [J]. J Comp Neurol, 2003, 462(3):315-327. DOI:10. 1002/cne. 10721.
- 17 Hetz S, Acikgoez A, Voss U, et al. *In vivo* transplantation of neurosphere-like bodies derived from the human postnatal and adult enteric nervous system: a pilot study [J]. PLoS One, 2014, 9(4):e93605. DOI:10. 1371/journal. pone. 0093605.
- 18 N Kholodilov, SR Kim, O Yarygina, et al. Glial cell line-derived neurotrophic factor receptor-alpha 1 expressed in striatum in trans regulates development and injury response of dopamine neurons of the substantia nigra [J]. J Neurochem, 2011, 116(4):486-498. DOI: 10. 1111/j. 1471-4159. 2010. 07128. x.
- 19 于丽丽,田德蕾,陈晓红,等. 胶质细胞源性神经营养因子与帕金森病的相关性研究进展[J]. 实用临床医药杂志,2014,18(13):182-185. DOI:10. 7619/jcmp. 2014 3065.
- Yu LL, Tian DQ, Chen XH, et al. Research progress of glial cell lined-derived neurotrophic factor and Parkinson's disease [J]. Journal of Clinical Medicine in Practice, 2014, 18(13):182-185. DOI:10. 7619/jcmp. 20143065.
- 20 蒋朝勇,王静成,杨建东. 胶质细胞源性神经营养因子与脊髓损伤治疗[J]. 国际骨科学杂志,2011,32(5):302-303. DOI:10. 3969/j. issn. 1673-7083. 2011. 05. 009.
- Jiang CY, Wang JC, Yang JD. Glial cell lined derived neurotrophic factor and the treatment of spinal cord injury [J]. Int J Orthop, 2011, 32(5):302-303. DOI:10. 3969/j. issn. 1673-7083. 2011. 05. 009.
- 21 Takahashi T. Pathophysiological significance of neuronal nitric oxide synthase in the gastrointestinal tract [J]. J Gastroenterol, 2003, 38(5):421-430. DOI:10. 1007/s00535-003-1094-y.
- 22 魏明发,李俊,王果,等. 一氧化氮合酶基因在先天性巨结肠中的表达[J]. 华中科技大学学报(医学版),2003,32(2):191-193.
- Wei MF, Li J, Wang G, et al. Nitric oxide synthase gene expression in different colonic segments of Hirschsprung's disease [J]. J Huazhong Univ Sci Tech (Health Sci), 2003, 32(2):191-193.

(收稿日期:2016-12-23)

本文引用格式:金祝,尚卿,刘远梅. 无神经节细胞动物模型的建立及鉴定[J]. 临床小儿外科杂志,2018,17(1):54-59. DOI:10. 3969/j. issn. 1671-6353. 2018. 01. 014.

Citing this article as: Jin Z, Shang Q, Liu YM. Establishment and identification of experimental rat model for aganglionosis [J]. J Clin Ped Sur, 2018, 17(1):54-59. DOI:10. 3969/j. issn. 1671-6353. 2018. 01. 014.

· 三言两语 ·

医师应当把握的人文知识

一、现代医学的特征

循证医学指诊断治疗以及预后均依客观根据而定。透明医学指诊断治疗以及预后的客观根据要展示于病人。人文医学观点指考虑到病人“人格特点”的医学观点。

1. 4P 医学是 Predictive(预测医学) Preventive(预防医学) Personalization(个体医学) 与 Participatory(参与医学)
2. 4R 外科是 Resection(切除外科) Repair(修复外科) Replantation(再植外科) 与 Regeneration(再生外科)
3. 生命第三态(或称三态):健康为第一态,疾病为第二态,自觉不适查而无病为第三态。
4. 生物医学观点指依据实验动物与人相当的规律,忽视病人“人格特点”的医学观点。

二、儿科医师要有人文意识

在儿科医学场合,妈妈是服务对象,不是第三者陪同。妈妈陪伴,对术后重病患儿恢复有特效。培训妈妈参与患儿诊疗的全过程,是医护的任务。既是医疗也是科普。小儿腹部手术后,多头腹带绑紧,减少疼痛、促进恢复。

儿科医生修养:品德包括爱(孩子)、敬(家长)、谦(待人)、诚(对事);行为包括言(必信)、行(必果)、风(要稳)、貌(要善)。

(张金哲)