

doi:10.3969/j.issn.1006-5709.2019.04.009

功能性胃肠病
论著

肠易激综合征模型大鼠结肠肌间神经丛钙视网膜蛋白阳性神经元增加

李 珊^{1,2}, 杨希林¹, 费贵军¹, 刘晓红¹, 方秀才¹

1. 中国医学科学院 北京协和医学院 北京协和医院消化内科, 北京 100730; 2. 首都医科大学附属北京安贞医院消化内科

【摘要】 目的 检测肠易激综合征腹泻型(IBS-D)和便秘型(IBS-C)两种模型大鼠远端回肠、结肠黏膜下神经丛(SMP)和肌间神经丛(MP)钙视网膜蛋白(CALR)阳性神经元的变化,探讨其在 IBS 发病中的作用。**方法** 分别采用慢性联合应激、冰水灌胃法建立 IBS-D 和 IBS-C 大鼠模型,制作回肠和结肠 SMP、MP 全层铺片标本,免疫组织荧光双染法检测 CALR 阳性神经元的改变。**结果** 与对照组相比,IBS-D 和 IBS-C 模型大鼠回肠 SMP、MP 和结肠 SMP 中 CALR 阳性神经元比例的差异无统计学意义($P>0.05$),结肠 MP 中 CALR 阳性神经元的比例显著增加,分别为(17.2 ± 3.2)% vs (13.4 ± 2.9)%、(19.1 ± 5.9)% vs (14.9 ± 3.4)% ,差异均有统计学意义($P<0.05$)。**结论** IBS-D、IBS-C 模型大鼠结肠 MP 中 CALR 阳性神经元增加可能参与 IBS 肠道敏感性增高。

【关键词】 肠易激综合征;黏膜下神经丛;肌间神经丛;神经元;钙视网膜蛋白

中图分类号: R574.4

文献标识码: A

文章编号: 1006-5709(2019)04-0395-05

收稿日期: 2019-02-10

Increase of calretinin-immunoreactive enteric neurons in rat models of irritable bowel syndrome with diarrhea and constipation

LI Shan^{1,2}, YANG Xilin¹, FEI Guijun¹, LIU Xiaohong¹, FANG Xiucui¹

1. Department of Gastroenterology, Peking Union Medical College Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100730; 2. Department of Gastroenterology, Beijing Anzhen Hospital, Capital Medical University, China

【Abstract】 Objective To investigate the changes of calretinin-immunoreactive (CALR-IR) enteric neurons of submucosal plexus (SMP) and myenteric plexus (MP) in distal ileum and colon in rat models of irritable bowel syndrome with predominant diarrhea (IBS-D) and with predominant constipation (IBS-C). **Methods** Rat models of IBS-D were established with unpredictable mild stress and acute wrap restrain stress (CAS) and IBS-C were induced by administering cold water. Double immunohistochemical fluorescence staining with whole-mount preparations of SMP and MP was used to detect the changes in neurons with positive CALR-IR and their co-localization with the pan neuronal marker, anti-Hu. **Results** There was no statistically difference in the proportions of CALR-IR neurons in ileal SMP and MP in IBS-D and IBS-C model rats compared with corresponding control group ($P>0.05$). The similar results were found in colonic SMP in both IBS groups. While in colonic MP, the proportions of CALR-IR positive neurons in IBS-D model rats and IBS-C model rats were significantly increased compared with corresponding control group [(17.2 ± 3.2)% vs (13.4 ± 2.9)% , (19.1 ± 5.9)% vs (14.9 ± 3.4)% , $P<0.05$]. **Conclusion** The increases of CALR-IR sensory neurons in MP of the IBS modeling rats may be involved in the visceral hypersensitivity of the IBS.

【Key words】 Irritable bowel syndrome; Submucosal plexus; Myenteric plexus; Neurons; Calretinin

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)是临床常见的功能性肠病,以腹痛或腹部不适伴排便异常为特征,罗马 IV 将其分为腹泻型 IBS(IBS with predominant diarrhea, IBS-D)、便秘型 IBS(IBS with predomi-

nant constipation, IBS-C)、混合型 IBS(IBS with mixed bowel habits, IBS-M)等亚型。IBS 的病因尚不清楚,肠神经系统(enteric nervous system, ENS)作为“胃肠道的大脑”(brain-in-the-gut)直接调控胃肠道的运动、分泌及与之相适应的血管舒缩活动等,其异常改变参与 IBS 的发病^[1-3]。钙视网膜蛋白(Calretinin, CALR)是一种钙结合蛋白,在 ENS 肌间神经丛(myenteric plexus, MP)和黏膜下神经丛(submucosal plexus, SMP)主要位于感觉神经元内,与 IBS 的关系尚不明确^[4]。

基金项目: 十一五”国家科技支撑计划课题(2007BAI04B01)

第一作者简介: 李珊, 硕士, 主治医师, 研究方向: 功能性胃肠病。

E-mail: lishan_0407@163.com

通讯作者: 方秀才, 主任医师, 教授, 研究方向: 功能性胃肠病、胃肠动力性疾病与肠神经系统。E-mail: fangxiucui2@aliyun.com

本研究采用 IBS-D 和 IBS-C 模型大鼠远段回肠和远端结肠的肠神经丛全层铺片标本(whole mount preparations)观察 SMP 和 MP 中表达 CALR 的神经元的变化,探讨其在 IBS 发病中的可能作用。

本实验中所应用的慢急性联合应激大鼠模型和冰水灌胃模型可分别模拟 IBS-D 和 IBS-C 患者肠道运动、内脏敏感性和心理行为等方面异常^[5-6]。我们在此前的研究表明,IBS-D 大鼠有腹泻、内脏高敏感,IBS-C 大鼠有便秘、内脏高敏感的表现^[1,3,7]。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物:雄性 Wister 大鼠,体质量 160 ~ 180 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,于北京协和医院 SPF 级动物房单笼饲养,室温 20 ~ 24 ℃,12 h/12 h 昼夜交替,自由进食进水。

1.1.2 主要试剂:实验中所使用的抗体及稀释比例如表 1 所示。

表 1 研究中使用的抗体
Tab 1 Antibodies used in the study

抗原	来源	编码	稀释比例	生产厂家
Anti-Hu	小鼠	A-21271	1:50	Mol Probes
CALR	兔	AB5054	1:1 000	Chemicon
小鼠 IgG	驴 FITC	715-095-150	1:100	Jackson
小鼠 IgG	驴 Cy3	715-165-150	1:1 000	Jackson
兔 IgG	山羊 FITC	ZF-0311	1:100	中杉金桥
兔 IgG	山羊 TRITC	ZF-0316	1:200	中杉金桥

注:Anti-Hu:抗神经核抗体;FITC:异硫氰酸荧光素;Cy3:叫喋菁染料;TRITC:四甲基异氰酸罗丹明。

1.2 方法

1.2.1 实验动物分组:大鼠按照体质量进行匹配,分成 IBS-D 组及其对照组、IBS-C 组及其对照组,每组 7 只。

1.2.2 动物模型建立:(1)IBS-D 组及其对照组:参照吕红等^[5]方法建立慢急性联合应激 IBS-D 大鼠模型,慢性应激期每天给予以下应激中的 1 种:①禁水 24 h;②禁食 24 h;③夹尾 1 min;④ 45 ℃加热 5 min;⑤ 4 ℃冰水游泳 3 min;⑥ 12 h/12 h 昼夜颠倒;⑦ 水平震荡(160 次/min)45 min。上述应激 7 d 为 1 个周期,顺序随机,连续 2 d 内所给予应激种类不同,共持续 21 d。慢性应激结束后第 7 天(即实验第 28 天)给予急性束缚应激 1 h:将大鼠乙醚麻醉至昏迷,束缚双侧肩部、双前肢及胸部限制其上部搔抓头面部,不限制其活动;对照组大鼠同期饲养,自由进食进水,不进行刺激。(2)IBS-C 组及其对照组:采用冰水灌胃方法建立 IBS-C 模型^[6],即每日予 0 ~ 4 ℃生理盐水 2 ml 灌胃,共 14 d。对照组大鼠同期饲养,自由进食进水,不

进行灌胃。造模过程中无大鼠死亡。

1.2.3 解剖制备回肠和结肠的肠神经丛铺片标本:IBS-D 及其对照组大鼠于第 28 天、IBS-C 及其对照组大鼠于第 15 天进行以下实验。30 ~ 50 mg/kg 戊巴比妥钠腹腔麻醉后剪断双侧颈部血管放血,处死大鼠,剖腹,取距回盲部 20 cm 处远端回肠 6 cm、距肛门 3 ~ 9 cm 段远端结肠 6 cm,沿肠系膜侧剪开肠管,于 4 ℃含氧 Krebs' s 溶液冲洗干净,展开置于质量浓度为 20 g/L 的甲醛固定液固定 24 h。将固定后的标本冲洗后显微镜下剥去黏膜层,然后将标本翻转依次解剖分离去除纵行肌和环形肌肌束,得到完整的 SMP 铺片标本。将标本浆膜面向上固定,在显微镜下将肠壁的纵行肌和环形肌一同从黏膜下层剥离下来,然后将分离开的肌肉层环形肌面向上,将环形肌的肌束剥离,即可得到 MP 铺片标本。制作好的铺片标本浸于固定液中,室温保存备用。

1.2.4 Anti-Hu 抗体免疫组织荧光检测方法:将制备好的 SMP 和 MP 铺片标本室温下 PBS 漂洗 10 min × 3 次。二甲亚砜(DMSO)浸泡 10 min × 3 次后 PBS 漂洗。质量浓度为 1 g/L 硼氰化钠(NaBH₄)溶液浸泡 10 min × 3 次后 PBS 漂洗。质量浓度为 100 g/L NDS(封闭血清)室温孵育 2 h。加 Anti-Hu 一抗室温过夜。PBS 再次漂洗后加入驴抗小鼠 IgG 二抗 1 h,室温避光。PBS 漂洗后将标本完全展开平铺于载玻片上,甘油封片后应用荧光显微镜(Nikon eclipse 80i)观察。

1.2.5 Anti-Hu 抗体和 CARL 抗体免疫组织荧光双染法:按以上所述操作后,荧光显微镜观察到标本中神经元 Anti-Hu 抗体免疫反应呈阳性后,即进行 CALR 抗体染色。其步骤如下:PBS 漂洗后加 CALR 抗体,4 ℃避光过夜。PBS 漂洗后加山羊抗兔二抗 1 h,室温避光。PBS 漂洗,铺片、封片后观察并计数。

1.2.6 SMP 神经元计数:每只大鼠取 2 张 SMP 铺片标本,每张标本随机选取 5 个不重合低倍视野(10 × 20 倍),单盲法分别计数视野内神经节数目、神经元总数(anti-Hu 免疫反应阳性)以及双染中 CALR 抗体免疫反应阳性神经元数目。每只大鼠取 2 张 MP 铺片标本,每张标本随机选取 7 ~ 8 个(共 15 个)不重合低倍视野(10 × 20 倍),单盲法分别计数视野内神经元总数(Anti-Hu 免疫反应阳性)以及双染中 CALR 抗体染色阳性神经元数目。

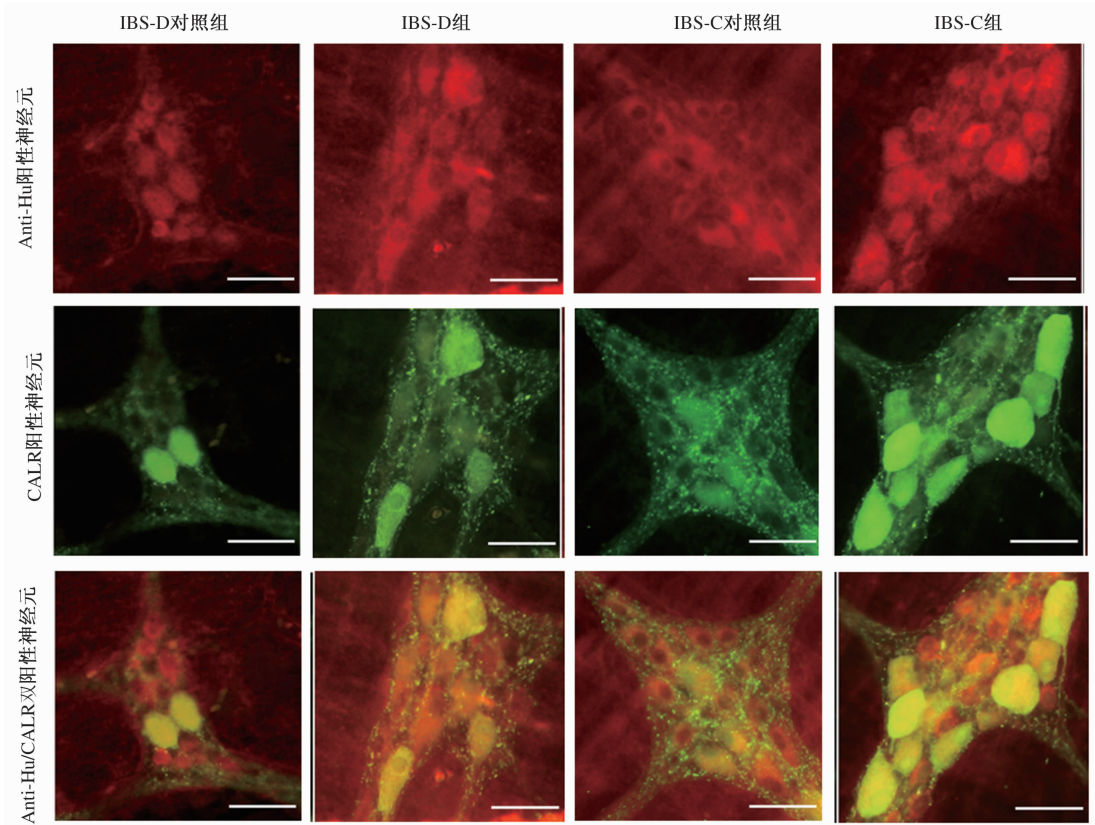
1.3 统计学处理 采用 SPSS 11.0 统计软件进行数据处理。两组间数据比较采用两独立样本 *t* 检验,*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠肠道 CALR 阳性神经元荧光染色特点 采

用免疫组织荧光双染法分别检测 IBS-D 及其对照组, IBS-C 及其对照组大鼠远端回肠、远端结肠 SMP 和 MP 中 CALR 阳性神经元,发现 CALR 阳性染色在 SMP 和

MP 神经元的胞浆、胞核、神经纤维均有表达,阳性神经元均为卵圆形,不同神经元胞体免疫反应 (immuno-reactive, IR) 强度有一定差异 (见图 1)。



注:标尺 = 50 μm。

图 1 IBS-D、IBS-C 大鼠结肠肌间神经丛中 Anti-Hu 阳性和 CALR 阳性神经元的免疫荧光双染

Fig 1 Enteric nervous ganglia and neurons in whole mount preparations of colonic MP in IBS-D and IBS-C modelrats

2.2 IBS-D 模型大鼠肠神经丛 CALR 阳性神经元的改变 与对照组相比,IBS-D 大鼠回肠 SMP、结肠 SMP 和回肠 MP 中 CARL 阳性的神经元数目及比例差异无统计学意义($P>0.05$),结肠 MP 神经元中 CALR 阳性

神经元数目差异无统计学意义($P>0.05$),但结肠 MP 神经元中 CALR 阳性神经元所占比例较对照组高 [$(17.2\pm3.2)\%$ vs $(13.4\pm2.9)\%$],差异有统计学意义($P=0.040$) (见表 2)。

表 2 IBS-D 模型大鼠回肠、结肠 SMP、MP 中 CALR 阳性神经元数目及比例 ($\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Calretinin-immunoreactive neurons of ileal and colonic SMP and MP in IBS-D model rats ($\bar{x}\pm s$)

部位	神经丛	阳性神经元数目		P 值	阳性神经元比例/%		P 值
		对照组	IBS-D 组		对照组	IBS-D 组	
回肠	SMP	26.3±6.8	31.9±5.4	0.111	39.5±10.4	44.0±9.5	0.417
	MP	17.3±2.5	17.0±2.0	0.800	38.7±4.1	36.9±6.9	0.566
结肠	SMP	24.9±5.7	20.6±6.9	0.231	60.7±15.0	53.8±10.7	0.340
	MP	8.1±1.7	9.8±1.9	0.108	13.4±2.9	17.2±3.2	0.040

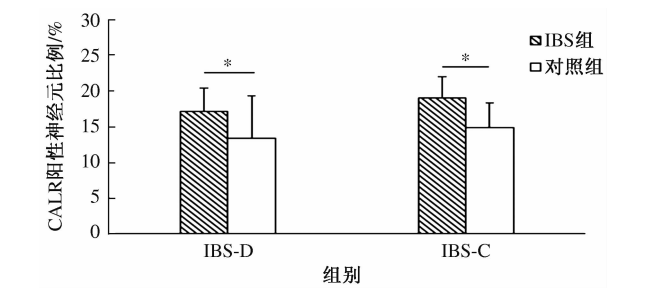
2.3 IBS-C 模型大鼠肠神经丛 CALR 阳性神经元的改变 与对照组相比,IBS-C 大鼠回肠 SMP、结肠 SMP 和回肠 MP 中 CARL 阳性的神经元数目及比例差异无统计学意义($P>0.05$),结肠 MP 神经元中 CALR 阳性神经元数目差异无统计学意义($P>0.05$),但结肠 MP

神经元中 CALR 阳性神经元所占比例较对照组高 [$(19.1\pm5.9)\%$ vs $(14.9\pm3.4)\%$],差异有统计学意义($P=0.018$) (见表 3)。IBS-D 模型大鼠、IBS-C 模型大鼠结肠 MP 中 CALR 阳性神经元所占比例均较对照组高 (见图 2)。

表 3 IBS-C 模型大鼠回肠、结肠 SMP 和 MP 中 CALR 阳性神经元数目及比例 ($\bar{x} \pm s$)

Tab 3 Calretinin-immunoreactive neurons of ileal and colonic SMP and MP in IBS-C model rats ($\bar{x} \pm s$)

部位	神经丛	阳性神经元数目		P 值	阳性神经元比例/%		P 值
		对照组	IBS-C 组		对照组	IBS-C 组	
回肠	SMP	24.3 ± 4.5	23.7 ± 9.4	0.873	48.2 ± 6.1	48.8 ± 11.2	0.873
	MP	16.3 ± 3.3	16.9 ± 3.3	0.731	36.8 ± 5.8	38.7 ± 5.2	0.541
结肠	SMP	24.9 ± 4.2	21.6 ± 5.9	0.258	55.9 ± 6.2	51.8 ± 7.0	0.278
	MP	9.0 ± 2.3	10.4 ± 1.9	0.231	14.9 ± 3.4	19.1 ± 5.9	0.018



注：与对照组相比，* $P < 0.05$ 。

图 2 IBS-D 及 IBS-C 模型大鼠结肠 MP 中 CALR 阳性神经元比例改变

Fig 2 Changes of CALR-IR neurons in MP of colon in IBS-D and IBS-C rats

3 讨论

IBS 的发病机制复杂,动物模型是对其进行研究的重要手段,稳定性高、可重复性好,评价指标客观的动物模型对认识疾病的机制、病理生理特点、药物治疗等具有重要意义^[8]。本研究采用的慢性联合应激大鼠模型能模拟 IBS-D 患者肠道运动、感觉和心理行为等方面异常^[1,3,5],冰水灌胃大鼠模型能模拟 IBS-C 患者相关异常^[6-7]。

CALR 是钙结合蛋白 (calcium-binding protein) 家族成员,最早从鸡的视网膜基因谱中克隆而得名。该蛋白相对分子量为 30 ~ 31 kD,是由 16q22 ~ q23 基因编码含有 269 ~ 273 个氨基酸,其组成在许多物种间高度保守^[9]。CALR 包含 6 个“EF-hand”样结构域,其中 5 个为功能性的 Ca^{2+} 结合位点;在中枢和外周神经系统均有广泛表达,同时也在肾上腺、胰岛、睾丸等组织有表达,参与机体生殖和内分泌功能调节^[9]。CALR 主要功能是作为快速或慢速 Ca^{2+} 缓冲剂,维持细胞中 Ca^{2+} 稳态,对兴奋性神经毒性起保护作用^[9];还可作为感受器 (sensor) 监测细胞中 Ca^{2+} 浓度,并与钙通道蛋白 $\text{CaV}2.1$ 结合以双向调节突触连接的可塑性,从而影响神经元的兴奋性^[8]。

CALR 在肠神经系统的 SMP 和 MP 中均有广泛表达。虽然存在一定的种属差异,但与研究最广泛的豚鼠相比,大鼠 ENS 中 CALR 的分布与人类更为接近^[10]。既往研究发现,大鼠回肠 MP 中 40% ~ 50% 的神经元为 CALR 阳性,且 95% 以上同时为胆碱乙酰转

移酶 (choline acetyltransferase, ChAT) 阳性,其中表达 NK_1 受体⁺/ NK_3 受体⁺/CALR⁺/Calbindin⁺ 的神经元为 Dogiel II 型内在感觉神经元。近年研究发现,除了上述感觉神经元之外,CALR 阳性神经元中约 18% 同时表达 Ca^{2+} /钙调蛋白依赖的蛋白激酶 II (CMK II),这些神经元为 Dogiel I 型中间神经元^[11]。在大鼠 SMP,CALR⁺/SP⁺ 神经元也主要为感觉神经元,参与肠道的分泌运动反射^[12]。在人的 SMP 大多数神经元同时表达 CALR⁺/VIP⁺/ChAT⁺,形态上具有多树突的结构并主要支配黏膜层,在结肠约占 SMP 神经元总数 75%,小肠比例略低于结肠^[13]。在人的 MP 中,约 10% 神经元同时表达 CALR 和生长抑素,这可以作为 Dogiel II 型内在感觉神经元的标记^[14];也有部分 Dogiel I 型中间神经元也为 CALR 阳性。目前,尚无针对 IBS 患者神经丛中 CALR 神经元方面的研究。

本研究发现,在 IBS-D 和 IBS-C 模型大鼠中,CALR 阳性神经元的比例在回肠 SMP、MP 和结肠 SMP 中与对照组相比,差异均无统计学意义,而结肠 MP 中明显升高。提示结肠 MP 中 CALR 阳性神经元的增多可能参与 IBS-D 和 IBS-C 共同发病机制 (即内脏高敏感),但与 IBS 亚型无关。在大鼠 MP 中,CALR 阳性的感觉神经元可发出轴突至黏膜层,对腔内化学物质改变等刺激产生反应,其增加可能参与 IBS 肠道敏感性增高,而与结肠动力无关;部分同时表达 CMK II 的神经元在调节肠道运动中有重要作用^[11],从而影响 IBS 的动力功能。

一直以来,IBS 被认为是功能性疾病而缺乏解剖学和生化异常,但近年研究发现,与健康人群相比,IBS 患者存在一定程度的形态学改变,如炎症细胞浸润、肠道通透性增高及神经内分泌改变^[15]。我们既往研究也发现,在 IBS-D 模型大鼠肠道中 SMP 的血管活性肠肽 (vasoactive intestinal peptide, VIP) 阳性神经元比例增高,MP 中一氧化氮合酶 (nitric oxide synthase, NOS) 阳性神经比例降低,它们可能分别通过影响肠道的分泌和动力参与其腹泻症状的产生^[1,3]。由于难以获得 IBS 患者全层活检 (full-thickness) 标本,目前仍不清楚 IBS 患者 ENS 是否存在类似异常。但部分 IBS 患者血清中检测出多种抗肠神经元的自身抗体^[2,16],且抗肠神经元阳性的 IBS 患者血清在体外可引起豚鼠肌间神

经元和传代培养的人神经母细胞瘤细胞 SH-Sy5Y 的凋亡,推测自身免疫反应可能参与 ENS 改变引起的肠道功能异常^[17]。近年国外有报道一种新的内镜下全层活检技术(FTRD System,德国)使肠道全层活检取材成为可能,用于研究 IBS 患者 ENS 神经病变,以指导并选择针对性治疗方案,但与腹腔镜下活检的传统方法相比,其安全性和有效性仍需进一步评估^[18-19]。

本研究存在一定缺点,由于检测肠道传输功能使用的是活性炭标记技术^[1,5],未能在同一只大鼠同时检测肠道动力和内脏敏感性变化,无法将 ENS 改变与动力异常进行相关性分析。

综上所述,本研究发现,IBS-D 和 IBS-C 大鼠均有结肠 MP 中 CALR 阳性神经元比例增高,推测其可能在 IBS 的内脏高敏感机制中起一定作用,需要将来进一步深入研究加以证实。

参考文献

[1] LI S, FEI G, FANG X, et al. Changes in enteric neurons of small intestine in a rat model of irritable bowel syndrome with diarrhea [J]. J Neurogastroenterol Motil, 2016, 22 (2): 310-320. DOI: 10.5056/jnm15082.

[2] 陈玲玲, 文平, 费贵军, 等. 腹泻型肠易激综合征患者血清抗肠神经元抗体免疫反应特点及其临床意义[J]. 基础医学与临床, 2017, 37(2): 156-161. DOI: 10.3969/j.issn.1001-6325.2017.02.007.

CHEN L L, WEN P, FEI G J, et al. Characteristics and clinical significance of sera anti-enteric neuronal antibodies in patients with irritable bowel syndrome with diarrhea [J]. Basic & Clinical Medicine, 2017, 37(2): 156-161. DOI: 10.3969/j.issn.1001-6325.2017.02.007.

[3] 李珊, 费贵军, 方秀才, 等. 腹泻型肠易激综合征模型大鼠结肠黏膜下神经丛神经元的改变[J]. 中华消化杂志, 2010, 30(4): 250-253. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1432.2010.04.008.

LI S, FEI G J, FANG X C, et al. The morphological changes of colonic submucosal plexus in rats of irritable bowel syndrome with diarrhea [J]. Chin J Dig, 2010, 30(4): 250-253. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1432.2010.04.008.

[4] MANN P T, SOUTHWELL B R, DING Y Q, et al. Localisation of neurokinin 3 (NK3) receptor immunoreactivity in the rat gastrointestinal tract [J]. Cell Tissue Res, 1997, 289(1): 1-9.

[5] 吕红, 钱家鸣, 金光亮, 等. 肠易激综合征慢性联合应激动物模型的建立及其感觉、动力和心理行为的评价[J]. 中华内科杂志, 2009, 48(12): 1035-1039. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0578-1426.2009.12.015.

LYU H, QIAN J M, JIN G L, et al. The establishment of an animal model of gut-brain interaction in irritable bowel syndrome for the evaluation of visceral sensation, motility and psychological behavior [J]. Chin J Intern Med, 2009, 48(12): 1035-1039. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0578-1426.2009.12.015.

[6] 彭丽华, 杨云生, 孙刚, 等. 便秘型肠易激综合征新概念模型的建立[J]. 世界华人消化杂志, 2004, 12(1): 112-116. DOI: 10.3969/j.issn.1009-3079.2004.01.029.

PENG L H, YANG Y S, SUN G, et al. A new model of constipation-predominant irritable bowel syndrome in rats [J]. World Chin J Digestol,

2004, 12(1): 112-116. DOI: 10.3969/j.issn.1009-3079.2004.01.029.

[7] 杨希林, 方秀才, 刘晓红, 等. 便秘型肠易激综合征大鼠胃排空及胃内肌间神经丛神经元的变化[J]. 基础医学与临床, 2011, 31(12): 1301-1304.

YANG X L, FANG X C, LIU X H, et al. The changes of gastric emptying and gastric myenteric neurons in rats with IBS complicated with constipation [J]. Basic & Clinical Medicine, 2011, 31(12): 1301-1304.

[8] 孙巧丽, 袁建业, 谢建群. 肠易激综合征动物模型的研究现状和展望[J]. 中华消化杂志, 2012, 32(2): 140-142. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1432.2012.02.020.

[9] SCHWALLER B. Calretinin: from a “simple” Ca(2+) buffer to a multifunctional protein implicated in many biological processes [J]. Front Neuroanat, 2014, 8: 3. DOI: 10.3389/fnana.2014.00003.

[10] ORDÓÑEZ N G. Value of calretinin immunostaining in diagnostic pathology: a review and update [J]. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2014, 22(6): 401-415. DOI: 10.1097/PAI.0b013e31829b6fbd.

[11] GAO N, LUO J, URAY K, et al. CaMK II is essential for the function of the enteric nervous system [J]. PLoS One, 2012, 7(8): e44426. DOI: 10.1371/journal.pone.0044426.

[12] MITSUI R. Immunohistochemical characteristics of submucosal Dogiel type II neurons in rat colon [J]. Cell Tissue Res, 2010, 340(2): 257-265. DOI: 10.1007/s00441-010-0954-z.

[13] BEUSCHER N, JABARI S, STREHL J, et al. What neurons hide behind calretinin immunoreactivity in the human gut? [J]. Histochem Cell Biol, 2014, 141(4): 393-405. DOI: 10.1007/s00418-013-1163-0.

[14] ZETZMANN K, STREHL J, GEPPERT C, et al. Calbindin D28k-immunoreactivity in human enteric neurons [J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(1): pii: E194. DOI: 10.3390/ijms19010194.

[15] JAHNG J, KIM Y S. Irritable bowel syndrome: is it really a functional disorder? A new perspective on alteration of enteric nervous system [J]. J Neurogastroenterol Motil, 2016, 22(2): 163-165. DOI: 10.5056/jnm16043.

[16] LÜTT A, MICHEL K, KRÜGER D, et al. High prevalence and functional effects of serum antineuronal antibodies in patients with gastrointestinal disorders [J]. Neurogastroenterol Motil, 2018, 30(6): e13292. DOI: 10.1111/nmo.13292.

[17] FAN W, FEI G, LI X, et al. Sera with anti-enteric neuronal antibodies from patients with irritable bowel syndrome promote apoptosis in myenteric neurons of guinea pigs and human SH-Sy5Y cells [J]. Neurogastroenterol Motil, 2018, 30(12): e13457. DOI: 10.1111/nmo.13457.

[18] OHLSSON B, GUSTAFSSON R, SWAHN F, et al. Endoscopic full-thickness biopsy, a novel method in the work up of complicated abdominal symptoms [J]. Therap Adv Gastroenterol, 2017, 11: 1756283X17730747. DOI: 10.1177/1756283X17730747.

[19] OHLSSON B, GUSTAFSSON R J, TOTTH E, et al. Endoscopic versus laparoscopic full-thickness biopsy in the pathological evaluation of the enteric nervous system [J]. Case Rep Gastroenterol, 2018, 12(1): 32-40. DOI: 10.1159/000486390.