

肠道黏膜肥大细胞和降钙素基因相关肽在肠易激综合征中的表达

牛庆慧, 张翠萍, 鞠辉, 刘希双, 赵洁, 董萍

牛庆慧, 张翠萍, 董萍, 青岛大学医学院附属医院消化内科
山东省青岛市 266003

鞠辉, 刘希双, 青岛大学医学院附属医院内镜室 山东省青
岛市 266003

赵洁, 青岛大学医学院附属医院病理科 山东省青岛市
266003

作者贡献分布: 牛庆慧与张翠萍对此文所作贡献均等; 此课题由
牛庆慧与张翠萍设计; 研究过程由牛庆慧、鞠辉、刘希双及赵洁
操作完成; 研究所用工具由董萍提供; 数据分析由牛庆慧完成;
论文写作由牛庆慧与张翠萍完成。

通讯作者: 张翠萍, 266003, 山东省青岛市, 青岛市江苏路16号,
青岛大学医学院附属医院消化内科. jianyu16@yahoo.com.cn

电话: 0532-82911304

收稿日期: 2008-11-20 修回日期: 2008-12-10

接受日期: 2008-12-15 在线出版日期: 2009-01-18

Expression of mast cell and calcitonin gene related peptides in the mucosa of irritable bowel syndrome

Qing-Hui Niu, Cui-Ping Zhang, Hui Ju, Xi-Shuang Liu,
Jie Zhao, Ping Dong

Qing-Hui Niu, Cui-Ping Zhang, Ping Dong, Department
of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Qingdao
University Medical College, Qingdao 266003, Shandong
Province, China

Hui Ju, Xi-Shuang Liu, Department of Endoscopy, the Af-
filiated Hospital of Qingdao University Medical College,
Qingdao 266003, Shandong Province, China

Jie Zhao, Department of Pathology, the Affiliated Hospital
of Qingdao University Medical College, Qingdao 266003,
Shandong Province, China

Correspondence to: Cui-Ping Zhang, Department of Gas-
troenterology, the Affiliated Hospital of Qingdao University
Medical College, 16 Jiangsu Road, Qingdao 266003, Shan-
dong Province, China. jianyu16@yahoo.com.cn

Received: 2008-11-20 Revised: 2008-12-10

Accepted: 2008-12-15 Published online: 2009-01-18

Abstract

AIM: To discuss whether mast cell (MC) and calcitonin gene related peptides (CGRP) have some influence on irritable bowel syndrome (IBS) and to offer theoretical basis for analysis of IBS from the perspective of nerve-endocrine-immune network.

METHODS: Immunohistochemistry and rabbit anti-CGRP 1/2 polyclonal antibody were used to

determine CGRP, and specific staining method was used to determine mast cells.

RESULTS: The number of mast cells was greater in four types of IBS patients in the mucosa of ileocecum compared with control group ($t = 11.8, 6.8, 2.5, 12.2, P < 0.05$ or 0.01); in colon sigmoid-eum, only the diarrhea type had notable difference ($t = 2.1, 0.01 < P < 0.05$). Patients with diarrhea type had significantly higher intensity of CGRP in ileocecum and colon sigmoideum compared with control group (11.13 ± 1.3 vs $7.9 \pm 1.5, 9 \pm 2.1$ vs $7.5 \pm 1.2, P < 0.05$ or 0.01). The number of MC in mucosa of ileocecum was positively correlated with expression power of CGRP ($r = 0.7, P < 0.01$).

CONCLUSION: MC and CGRP may have certain effect on the morbidity of IBS.

Key Words: Irritable bowel syndrome; Mast cell; Calcitonin gene related peptides

Niu QH, Zhang CP, Ju H, Liu XS, Zhao J, Dong P. Expression of mast cell and calcitonin gene related peptides in the mucosa of irritable bowel syndrome. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(2): 213-217

摘要

目的: 探讨肥大细胞和降钙素基因相关肽(CGRP)对肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)发病机制的影响, 为今后从神经-内分泌-免疫网络方面分析研究IBS的发生机制提供理论依据。

方法: 组织切片采用免疫组织化学的方法, 用兔抗人降钙素基因相关肽多克隆抗体, 测定染色阳性的CGRP, 用特殊染色的方法测定染色阳性的肥大细胞。

结果: 四型IBS与对照组肠黏膜肥大细胞的数目相比在回盲部的分布不同($t = 11.8, 6.8, 2.5, 12.2, P < 0.05$ 或 0.01); 在乙状结肠部位只有腹泻型不同($t = 2.1, 0.01 < P < 0.05$)。IBS腹泻型患

■背景资料

肠易激综合征 (IBS)是临床最常见的功能性胃肠病之一, 主要表现为腹痛或腹部不适, 伴有大便性状的变化和大便习惯的改变。对于IBS患者的发病机制, 目前尚无定论, 近年来提出了神经-内分泌-免疫网络机制。

■同行评议者

潘秀珍, 教授, 福建省立医院消化研究室

■相关报道

有关研究发现IBS患者肠黏膜中肥大细胞明显高于对照组,且有一些神经肽表达增多。

者回盲部、乙状结肠部肠黏膜中降钙素基因相关肽阳性神经肽纤维强度与对照组比较显著增强(11.13 ± 1.3 vs 7.9 ± 1.5 , 9 ± 2.1 vs 7.5 ± 1.2 , $P < 0.05$ 或 0.01)。IBS回盲部黏膜中肥大细胞数和降钙素基因相关肽阳性神经肽纤维强度的表达呈正相关($r = 0.7$, $P < 0.01$)。

结论:肥大细胞和降钙素基因相关肽对IBS的发病可能有一定程度的影响。

关键词:肠易激综合征;肥大细胞;降钙素基因相关肽

牛庆慧, 张翠萍, 鞠辉, 刘希双, 赵洁, 董萍. 肠道黏膜肥大细胞和降钙素基因相关肽在肠易激综合征中的表达. 世界华人消化杂志 2009; 17(2): 213-217

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/213.asp>

0 引言

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)的病因和发病机制迄今还不完全清楚。目前认为与肠道感染,精神社会因素,胃肠动力,内脏感觉过敏,脑肠轴的异常改变以及免疫等因素有关。研究^[1]发现IBS患者回肠末端,回盲部及升结肠黏膜肥大细胞数量增多和活性增强,结肠黏膜脑肠肽表达增强,说明肠道免疫系统和肠神经系统之间存在活化通路,可能参与了IBS的发病。本实验通过对IBS患者和正常对照组回盲部和乙状结肠处肠黏膜活检标本的特殊染色和免疫组织化学检测,来探讨IBS患者肠道黏膜肥大细胞(mast cell, MC)和降钙素基因相关肽(calcitonin gene related peptides, CGRP)的分布,从神经-内分泌-免疫网络轴来揭示IBS的发病机制。

1 材料和方法

1.1 材料 2007-10/2008-05自青岛大学医学院附属医院消化内科门诊随机选取IBS患者53例,男24例,女29例,年龄14-74(平均年龄45.3)岁。腹泻型16例,便秘型13例,混合型10例,未定型14例。详细询问病史和细致的系统体格检查,当发现报警症状时,进行相关的检查以明确排除器质性疾病,根据患者情况以及需要鉴别的器质性疾病行相关检查,包括:(1)尿,便常规,大便潜血;(2)血生化检查;(3)结肠镜或钡灌肠;(4)腹部超声。还需要与炎症性肠病,结直肠肿瘤,先天性巨结肠,糖尿病以及甲亢等鉴别。诊断参照新近颁布的罗马III诊断标准^[2]。正常对照组15例,为结肠息肉电切术后复查者,男6例,女9例,年

龄18-72岁,平均年龄43岁。无消化道和神经系统症状和体征,无免疫疾病史,感染病史,无近期服药史。

主要试剂和仪器:兔抗人降钙素基因相关肽多克隆抗体购自北京博奥森,甲苯胺蓝和PV-9000二步法免疫组化检测试剂盒购自北京中杉。Olympus电子肠镜,德国Opten公司图像分析系统, Olympus显微照相系统,日本Jem-3100F 300 kV场发射透射电子显微镜。

1.2 方法

1.2.1 实验步骤:检钳取肠道黏膜标本,分别于回盲部和距肛门20-25 cm乙状结肠部位取4块标本固定后制成石蜡切片。58℃电热恒温干燥箱过夜,脱蜡至水,30 mL/L去离子水20 min,灭活内源性过氧化物酶,水洗,抗原修复,水浴,加试剂(严格按照试剂说明进行),DAB显色,乙醇脱水,二甲苯透明,封片,镜下观察。

1.2.2 结果判断:肥大细胞采用甲苯胺蓝染色染成紫蓝色,在40×10放大倍数下观察5个不重复视野,观察范围为黏膜和黏膜下层,取每个视野的平均数。采用包埋法^[3]处理肥大细胞后,电镜下观察其脱颗粒现象。CGRP免疫组化切片用VIDAS图像分析系统对CGRP行阳性纤维强度定量分析。

统计学处理 实验数据采用SPSS10.0统计软件包进行统计学处理,将病例组与对照组进行比较,细胞数以每高倍视野的mean±SD表示。两样本均数之间比较采用t检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义, $P < 0.01$ 为差异有高度统计学意义。

2 结果

2.1 组织形态学观察 53例IBS患者与对照组的结肠黏膜均无充血,水肿,渗出等炎症改变。

2.2 光镜下观察:IBS-D患者回盲部肠黏膜MC呈现紫蓝色,胞核呈蓝色,如图1中箭头所示。

2.2.1 肠黏膜MC的表达:肥大细胞用甲苯胺蓝染色,呈现紫蓝色,胞核呈蓝色,散布于黏膜固有层,黏膜下层,细胞大小不等,未脱颗粒者细胞完整,胞质均匀,胞膜清晰,脱颗粒者则胞膜破溃,颗粒涌出胞膜,细胞形状不规则。IBS患者与对照组肠黏膜肥大细胞的数目分布:在回盲部,IBS患者与对照组比较结果:腹泻型 $t = 11.8$, $P < 0.01$;便秘型 $t = 6.8$, $P < 0.01$;混合型 $t = 2.5$, $0.01 < P < 0.05$;未定型 $t = 12.2$, $P < 0.01$ 。在乙状结肠部位,IBS患者与对照组比较结果:腹泻型 $t = 2.1$, $0.01 < P < 0.05$;便秘型, $t = 1.25$, $P > 0.05$;混合

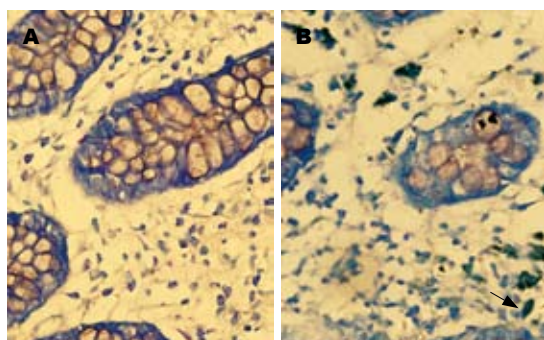


图 1 回盲部黏膜MC表达(40 × 10). A: 对照组; B: IBS-D.

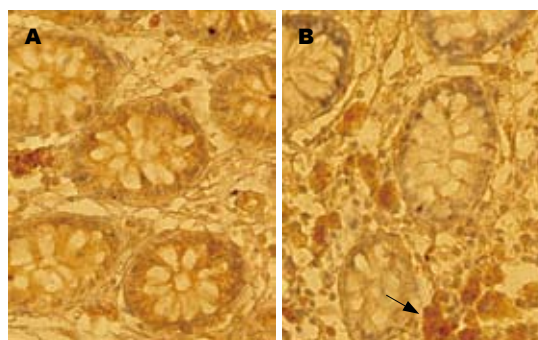


图 2 回盲部黏膜CGRP的表达(40 × 10). A: 对照组; B: IBS-D.

■应用要点

本文可对探讨IBS发病机制中的神经-内分泌-免疫网络机制提供一定的依据。

表 1 IBS患者与对照组回盲部MC的表达 (mean ± SD)

部位	腹泻型	便秘型	混合型	未定型	对照组
回盲部	29.8 ± 3.4 ^b	24.5 ± 3.0 ^b	20.6 ± 3.0 ^a	24.9 ± 3.2 ^b	18.3 ± 1.7
乙状结肠	18.3 ± 1.1 ^a	18.2 ± 1.5	18.1 ± 1.2	18.3 ± 1.4	17.9 ± 1.8

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 对照组.

表 2 IBS患者与对照组肠黏膜CGRP的表达 (mean ± SD)

部位	腹泻型	便秘型	混合型	未定型	对照组
回盲部	11.13 ± 1.3 ^b	7.9 ± 1.6	7.9 ± 1.2	8.1 ± 1.1	7.9 ± 1.5
乙状结肠	9 ± 2.1 ^a	7.4 ± 1.8	7.4 ± 1.0	7.6 ± 0.6	7.5 ± 1.2

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 对照组.

表 3 IBS患者回盲部MC和CGRP的相关性分析 (x, y)

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
MC(x)	28	24	25	27	23	25	27	24	23	22	23	25	20	21	22
CGRP(y)	11	8	9	8	7	8	9	8	7	6	8	9	8	7	8

型, $t = 0.8$, $P > 0.05$; 未定型, $t = 0.67$, $P > 0.05$ (表1).

2.2.2 肠黏膜CGRP的表达: IBS患者以及对照组肠黏膜内CGRP染色的表达: 光镜下, CGRP染色呈现棕褐色, 颗粒状或波浪状(图2). 腹泻型IBS患者回盲部和乙状结肠部位的肠黏膜CGRP阳性神经肽纤维强度较对照组高($t = 6.27$, $^bP < 0.01$; $t = 2.41$, $0.01 < ^aP < 0.05$), IBS便秘型、IBS混合型、IBS未定型回盲部和乙状结肠CGRP的表达与对照组相比差异($t = 0$, $t = 0.175$; $t = 0$, $t = 0.2$; $t = 1.0$, $t = 0.3$, 均 $P > 0.05$)无统计学意义(表2).

2.2.3 MC和CGRP的相关性分析: 从53例IBS患者中随机选取15例, 男7例, 女8例, 平均年龄42岁, 分别计数其回盲部肥大细胞数和降钙素基因相关肽阳性纤维强度值, 对二者行相关性分析, 得 r

$= 0.7$, $P < 0.01$, 说明IBS患者回盲部黏膜肥大细胞与降钙素基因相关肽的表达呈高度正相关(表3).

2.3 电镜下观察 电镜下, 可见IBS伴腹泻型患者回盲部有一肥大细胞脱颗粒现象(图3).

3 讨论

IBS的病因和发病机制尚不完全清楚, 长期以来认为主要是一种肠道动力异常性疾病, 但近年来的研究表明感染, 应激, 尤其是神经内分泌免疫机制在IBS的发病中占重要地位, 肥大细胞在此网络中兼有桥梁的作用, 其由造血祖细胞衍化而来, 在其表面有与IgE抗体Fc段具有高亲和力的受体(FcεRI)表达, 当与细胞受体结合的IgE抗体识别特异性多种抗原时, 发生特征性生化

■同行评价

本研究立意有依据, 病例诊断根据充分, 研究方法设计严谨, 虽然研究内容比较简单, 但有一定的技术难度, 结果可靠, 讨论简洁, 条理性强, 观点明确, 对探讨IBS的发病机制有一定的参考意义。

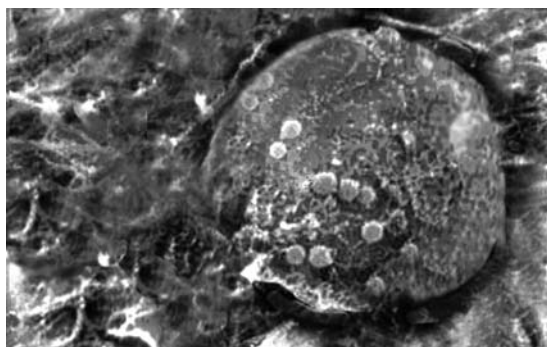


图3 电镜下观察MC脱颗粒现象。

和形态学变化, 称为过敏性脱颗粒, 引起生物活性介质的通道开放。本实验采用传统的甲苯胺蓝染色肥大细胞, 发现IBS患者回盲部肥大细胞的数目比对照组显著增多, 与文献[4]报道结果相似。陈文科 *et al*^[5]研究亦发现IBS患者回盲部黏膜MC数明显高于对照组。电镜下, 我们还发现在IBS伴腹泻型患者的回盲部肠黏膜中有肥大细胞脱颗粒现象。王静 *et al*^[6]研究也发现IBS患者MC数量和脱颗粒比率增多。肥大细胞能释放生物活性介质: 生物胺, 酶, 花生四烯酸及代谢产物, 腺苷, 神经肽, 细胞因子等, 他们作用既广泛又复杂多样: 可使微血管平滑肌和通透性发生改变; 使肠道平滑肌收缩和舒张状态发生改变, 从而可致腹泻症状。这些因子调节腺体分泌功能, 调节机体免疫状态, 使痛觉敏感性发生改变^[7], 这可能是IBS患者大部分都表现有腹痛或腹部不适症状的一个原因。有研究发现^[8]肥大细胞也通过TGF- β 1来调节肠道的运动功能和敏感性。肥大细胞参与肠黏膜的免疫调节, 当机体处于应激或受到炎症刺激后肥大细胞被极大活化, 保持高活性状态, 通过释放介质参与肠道的免疫反应, 同时使肠道对痛觉的敏感性增高。

我们在近期的IBS流行病学调查中发现, IBS患者表现为腹痛者中, 有42%表现为左下腹痛, 推测患者降结肠和乙状结肠部位亦可能存在大量免疫细胞和神经肽。在本实验研究中发现, 在距肛门20-25 cm的乙状结肠部位, 腹泻型IBS患者肠黏膜肥大细胞数目比对照组显著增多, 其他三种类型与对照组相比差异无显著性, 究其原因可能此处肥大细胞数量较少, 亦可能是实验过程中的误差所致。尚需要进一步做大量试验来提供资料。

CGRP是一种含有37个氨基酸残基的多肽, 广泛分布于中枢和外周神经系统, 特别是感觉神经元胞体和末梢以及胃肠道壁内神经丛, 具

有调节胃肠血流、胃肠分泌及运动功能。我们发现, 腹泻型IBS患者回盲部和乙状结肠部位CGRP阳性神经肽纤维强度明显增强。其余三型与对照组比较无明显增强, 有研究^[9]资料显示, IBS患者结肠黏膜CGRP含量较低, 分析原因, 可能是计算机图像分析敏感度不足, 对该物质阳性纤维难以分析。一些研究发现^[10], 大脑的神经系统调节异常对IBS的肠道敏感性增高有重要的促进作用。研究发现^[3], IBS患者肠黏膜内肥大细胞周围CGRP等阳性神经纤维表达增强, 而且在神经肽周围, 肥大细胞的数量明显增多。另有研究^[11]发现, 刺激荷兰猪的结肠黏膜, 黏膜细胞释放大量的5-HT, 与含有CGRP的感觉神经肽表面的5-HT₄受体结合, 会放大结肠的蠕动反射。有关专家^[12]研究马的结肠血管发现, CGRP, P物质, 血管活性肠肽等在调节肠道血管的缺血再灌注中发挥重要的做用, CGRP会引起结肠动脉的舒张, 进一步加快了结肠的蠕动, 从而会导致腹泻, 正如我们的实验数据所示, 腹泻型患者结肠黏膜CGRP阳性神经肽纤维强度明显强于对照组, 推测CGRP在IBS腹泻型的发病机制中有一定的作用。

我们还发现IBS患者回盲部肠黏膜中肥大细胞和CGRP的表达有高度正相关, 有研究亦表明^[13], 在炎症性肠病(IBD)和IBS患者的发生与肠黏膜中肥大细胞和神经肽的相互作用有关。我们以往的研究还发现, D-IBS患者中肠黏膜IFN- γ , IL-2的表达与SP存在相关性, 提示黏膜免疫系统和神经末梢之间有相关性。近年来, 神经免疫研究发现, 神经肽可通过免疫细胞膜表达的相应受体作用于免疫系统, 加入其他神经肽, CGRP就是这样一种神经肽。人类淋巴细胞能够组成性表达 α CGRP和 β CGRP, 在用淋巴细胞丝裂原刺激时 β CGRP的表达增强^[14], 但淋巴细胞来源的CGRP的生理意义目前仍不清楚。有研究^[15]发现CGRP与神经生长因子以及大脑衍生性神经营养因子共同作用能导致老鼠结肠敏感性增高, 这可能提示CGRP在IBS的发病机制中具有一定的作用。肥大细胞作为神经-内分泌-免疫网络的桥梁, 在IBS的发病机制中有重要作用。CGRP作为一种神经肽, 是否可通过肥大细胞表面的相应受体作用于免疫系统, 在神经-内分泌-免疫网络中是否具有重要的作用, 目前关于此神经肽的研究较少, 还未形成定论, 还需大量的实验资料证实。

4 参考文献

- 1 董文珠, 邹多武, 李兆申, 许国铭, 邹晓平, 朱爱勇, 尹宁, 满晓华. 肠易激综合征患者内脏高敏性的机制研究. 中华消化杂志 2004; 24: 18-22
- 2 刘新光. 肠易激综合征与罗马Ⅲ诊断标准. 胃肠病学 2006; 11: 736-738
- 3 王利华, 方秀才, 潘国宗. 肠易激综合征患者肠黏膜肥大细胞与神经纤维的关联. 中华消化杂志 2003; 23: 8-11
- 4 姜敏, 李红菊, 汤浩, 张义侠, 傅宝玉. 肥大细胞在肠易激综合征患者结肠的分布特点及其作用. 中国医科大学学报 2005; 55: 335-336
- 5 陈文科, 邹益友, 李富军, 罗丹. 肠易激综合征精神心理因素、肠黏膜肥大细胞及5-羟色胺的变化. 世界华人消化杂志 2007; 15: 46-50
- 6 王静, 梁列新, 张志雄, 李国华, 钱伟, 侯晓华. 肠易激综合征患者肠黏膜肥大细胞的变化. 世界华人消化杂志 2004; 12: 136-138
- 7 Bradding P, Holgate ST. Immunopathology and human mast cell cytokines. *Crit Rev Oncol Hematol* 1999; 31: 119-133
- 8 Gebhardt T, Lorentz A, Detmer F, Trautwein C, Bektas H, Manns MP, Bischoff SC. Growth, phenotype, and function of human intestinal mast cells are tightly regulated by transforming growth factor beta1. *Gut* 2005; 54: 928-934
- 9 李兆申, 董文珠, 邹多武, 满晓华, 邹晓平, 尹宁, 朱爱勇. 肠易激综合征肠黏膜SP、VIP、CGRP变化的研究. 第二军医大学学报 2003; 24: 147-151
- 10 Drossman DA. The functional gastrointestinal disorders and the Rome III process. *Gastroenterology* 2006; 130: 1377-1390
- 11 Grider JR, Piland BE. The peristaltic reflex induced by short-chain fatty acids is mediated by sequential release of 5-HT and neuronal CGRP but not BDNF. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 292: G429-G437
- 12 MacLachlan EM. An analysis of the release of acetylcholine from preganglionic nerve terminals. *J Physiol* 1975; 245: 447-466
- 13 Rijnierse A, Nijkamp FP, Kraneveld AD. Mast cells and nerves tickle in the tummy: implications for inflammatory bowel disease and irritable bowel syndrome. *Pharmacol Ther* 2007; 116: 207-235
- 14 陈慧诚, 李健峰. 降钙素基因相关肽及其在免疫系统的功能. 动物医学进展 2006; 27: 50-53
- 15 Delafoy L, Gelot A, Ardid D, Eschaliere A, Bertrand C, Doherty AM, Diop L. Interactive involvement of brain derived neurotrophic factor, nerve growth factor, and calcitonin gene related peptide in colonic hypersensitivity in the rat. *Gut* 2006; 55: 940-945

编辑 史景红 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志中文摘要要求

本刊讯 本刊中文摘要必须在350字左右, 内容应包括目的(应阐明研究的背景和设想、目的), 方法(必须包括材料或对象、应描述课题的基本设计, 双盲、单盲还是开放性, 使用什么方法, 如何进行分组和对照, 数据的精确程度. 研究对象选择条件与标准是否遵循随机化、齐同化的原则, 对照组匹配的特征. 如研究对象是患者, 应阐明其临床表现, 诊断标准. 如何筛选分组, 有多少例进行过随访, 有多少例因出现不良反应而中途停止研究), 结果(应列出主要结果, 包括主要数据, 有什么新发现, 说明其价值和局限, 叙述要真实、准确、具体, 所列数据经用何种统计学方法处理; 应给出结果的置信区间和统计学显著性检验的确切值; 概率写 P , 后应写出相应显著性检验值), 结论(全文总结, 准确无误的观点及价值). (常务副总编辑: 张海宁 2009-01-18)