

肠易激综合征患者结肠5-HT的分布特点

姜敏, 凌立平, 傅宝玉

姜敏, 凌立平, 傅宝玉, 中国医科大学附属第一医院消化内科
辽宁省沈阳市 110001

项目负责人: 姜敏, 110001, 辽宁省沈阳市和平区南京北街155号, 中国医科大学附属第一医院. jiang-min@163.com

电话: 024-23256666-6199

收稿日期: 2004-11-12 接受日期: 2004-11-29

摘要

目的: 探讨肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)患者结肠黏膜嗜铬细胞(EC)的分布特点。

方法: 符合RomeII诊断标准的IBS患者53例, 腹泻型27例, 便秘型14例, 腹泻与便秘交替型12例; 活动性溃疡性结肠炎(UC)患者5例作为对照。正常对照组12名。组织切片采用免疫组化的方法, 用兔抗人5-HT多克隆抗体, 计数一定范围内EC数量进行定量分析。

结果: 直肠-乙状结肠交界部EC明显多于回盲部($P<0.05$)。IBS患者直肠-乙状结肠交界部EC明显高于正常对照组($P<0.05$), 其中腹泻型IBS患者EC明显增加($P<0.01$)。在活动性溃疡性结肠炎患者, 直肠-乙状结肠交界部可见到EC增加, 但与正常对照组相比较没有统计学意义。

结论: IBS患者, 尤其是以腹泻为主的IBS患者, 直肠-乙状结肠交界部EC明显增加。

姜敏, 凌立平, 傅宝玉. 肠易激综合征患者结肠5-HT的分布特点. 世界华人消化杂志 2005;13(4):541-543
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/541.asp>

0 引言

IBS是一种与胃肠道动力、神经内分泌以及感觉有关的复杂的疾病。5-HT是调节消化道功能的一种重要的神经递质。在IBS的发病机制研究中已经受到广泛的重视。然而, 还不清楚肠道5-HT系统的改变是否与IBS的病理生理有关。本实验的目的在于探讨IBS患者肠道嗜铬细胞EC的分布, IBS患者较正常对照组是否在分布上、数量上存在差异, 各种不同类型IBS患者EC在分布以及数量上有什么不同, 以探讨5-HT在IBS发病机制以及与IBS的临床症状是否相关。

1 材料和方法

1.1 材料 符合Rome II诊断标准的IBS患者53例。男15例, 女38例, 年龄26-65(平均41)岁。其中腹泻型27例; 便秘型14例; 腹泻与便秘交替型12例。发病初期有肠道感染者11例。正常对照组为健康志愿者12名, 男5名, 女7名, 年龄25-58(平均42)岁。活动性溃疡性结肠炎患者

5例, 男2例, 女3例, 年龄范围为25-48(平均37)岁。

1.2 方法 均接受结肠镜检查。分别于回盲部距离回盲瓣开口远端3 cm处、距离肛门10 cm直肠-乙状结肠交界处取活检立即放入40 g/L甲醛固定液中, 固定后的标本制成石蜡切片。首先进行HE染色, 判断组织学是否正常, 进一步根据浆细胞、淋巴细胞、嗜酸细胞、中性粒细胞以及在急性炎症时巨噬细胞的浸润程度, 将炎症分为轻、中、重度。EC染色采用兔抗人5-HT多克隆抗体(北京中山生物技术有限公司), 5-HT的染色按S-P免疫组化染色步骤进行。含有5-HT的EC染成黄色, 连续观察5个互不重叠的视野。观察的范围为黏膜层和黏膜下层。放大倍数为10×40倍。取每视野的平均细胞数。

统计学处理 所有数据用mean ± SD表示, 各组间采用t检验进行统计学分析。

2 结果

光镜下回盲部EC数量均很少(图1), 而直肠-乙状结肠交界部EC分布很多(图2)。在回盲部各组之间EC数量上没有明显差异。在直肠-乙状结肠交界部IBS组与正常对照组相比, EC数明显增加有统计学意义($P<0.05$ 表1)。

活动型溃疡性结肠炎组炎症越明显EC的数量越多, 平均EC数多于正常对照组, 但没有统计学意义。在IBS患者, 腹泻型IBS组直肠-乙状结肠交界部EC明显增加, 与正常对照组相比较有显著差异($P<0.01$, 图2)。

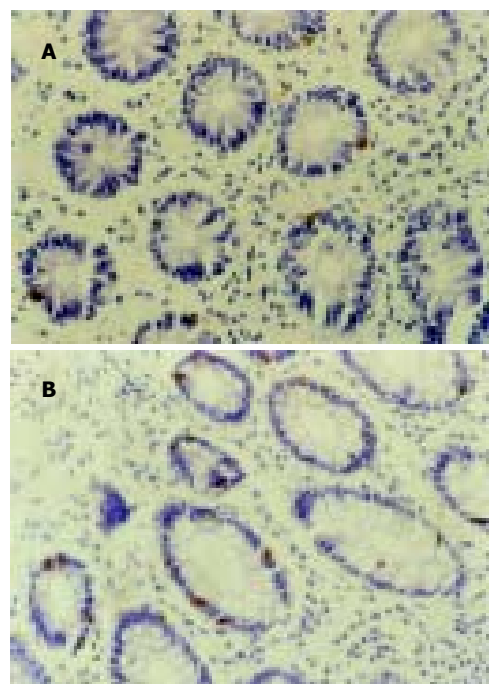


图1 S-P免疫组化染色结果。A: 回盲部EC较少; B: 直-乙状结肠交界部EC较多。S-P×400。

表1 IBS患者EC的数量

分组	回盲部	直-乙状结肠交界部
IBS组	4.49 ± 1.66	16.20 ± 2.28 ^a
UC组	4.07 ± 0.84	11.00 ± 3.63
正常对照组	4.89 ± 1.64	8.92 ± 4.76

^aP<0.05 vs 正常对照组.

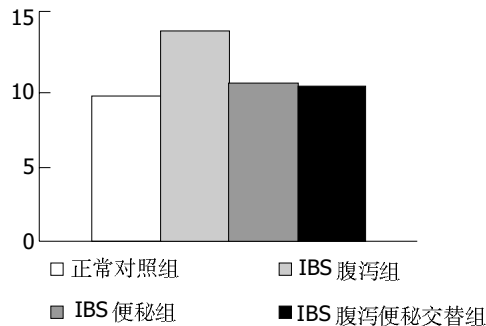


图2 各组 IBS 患者直-乙状结肠 EC 数量的比较腹泻组与正常对照组相比较 EC 数量明显增加(P<0.05).

3 讨论

5-HT 调节肠道的动力^[1-2]和电解质的转运^[3]. 外周神经系统的 5-HT 几乎全部由位于胃肠腺腔基底部的 EC 产生、贮存和再摄取^[4]. 发生于 EC 类癌通常由于分泌过多的 5-HT, 使肠道转运加速和餐后肠道的兴奋性增加而导致临床出现腹泻症状^[5]. 最近在人类和动物的研究发现, 肠黏膜受刺激使肠道产生蠕动, 反射性的引起 5-HT 的释放, 作用于位于肠黏膜上皮内的 5-HT 受体而起作用^[6-7]. 另外, 一些临床研究提示, 投与选择性的 5-HT₃ 受体拮抗剂可以使肠道的传输功能减慢, 这种情况不仅出现在健康人, 也可以出现在以腹泻为主的 IBS 患者^[8-9]. 这些研究结果提示在人类 5-HT 具有调节胃肠动力及改变排便习惯的作用. 我们的研究表明, 在包括 IBS 组和正常对照组所有的实验对象, EC 在肠道的分布特点是, 直肠-乙状结肠交界部较回盲部明显增多. 这一研究结果与 Miwa *et al*^[10]通过高效液相色谱的方法检测到由盲肠到直肠各段肠黏膜组织内 5-HT 的含量逐渐增高, Zhao *et al*^[11]通过组织化学的方法检测结肠黏膜 EC 的分布, 发现右半结肠较左半结肠 EC 数量明显增加等实验结果相一致. 我们的研究还发现, IBS 组与正常对照组相比较, 虽然回盲部 EC 数量有所增加, 但缺乏统计学意义, 而 IBS 组直肠-乙状结肠交界部 EC 细胞明显高于正常对照组(P<0.05). El-Salhy *et al*^[12]也发现在慢传输型便秘患者结肠黏膜的 5-HT 活性细胞高于正常对照组. Koyama *et al*^[13]认为, EC 如同肠道的机械化学感受器, 当肠道内压力增高, EC 释放 5-HT, 感觉神经传递信息到肌间神经丛促成肠道的蠕动. 已经确定在 IBS 患者存在肠动力异常, 5-HT 可能是 IBS 的病理生理基础. 当然, 导致 IBS 发生的病理生理过程是十分复杂的, 5-HT 只是其中的一个重要因素. 5-HT 在人体内有多种亚型存在, 各种亚型的受体分布广泛, 各自的作用机

制尚不十分清楚. 有学者认为 5-HT 在外周神经系统有镇痛作用, 例如使用 5-HT₄ 受体拮抗剂能减轻内脏和皮肤的痛觉^[14]. 也有学者发现, 服用 5-HT₃ 受体拮抗剂后会使疼痛的阈值明显升高^[15]. 这些研究都提示 5-HT 参与机体不同类型的伤害性刺激所介导的痛觉反应. 5-HT₄ 受体兴奋后, 在肠道可以促进肠上皮腺体的分泌, 增加肠腔内液体的容量, 导致腹泻和排便次数增加. 最近的研究, 用选择性的 5-HT₃ 受体拮抗剂可以抑制感觉神经的兴奋性, 减慢腹泻型 IBS 患者的肠道传输速度, 从而改善临床症状^[16-17]. 总之, 5-HT 在 IBS 的发病过程中扮演着重要角色, 对 5-HT 的深入研究可以进一步揭示 IBS 的发病机制, 同时也对 IBS 的预防和治疗有重要意义.

4 参考文献

- 1 Foxx-Orenstein AE, Kueemmerle JF, Grider JR. Distinct 5-HT receptors mediate the peristaltic reflex induced by mucosal stimuli in human and guinea pig intestine. *Gastroenterology* 1996;111:1281-1290
- 2 Appel S, Kumle A, Meier R. Clinical pharmacodynamics of SDZ HTF919: a new 5-HT₄ receptor agonist, in a model of slow colonic transit. *Clin Pharmacol Ther* 1997;62:546-555
- 3 Sidhu M, Cooke HJ. Role for 5-HT and ACh in submucosal reflexes mediating colonic secretion. *Am J Physiol* 1995;269(3 Pt 1):G346-G351
- 4 Furness JB, Costa M. Neurons with 5-hydroxytryptamine-like immunoreactivity in the enteric nervous system: their projection in the guinea-pig small intestine. *Neuroscience* 1982;7:341-349
- 5 von der Ohe MR, Camilleri M, Kvols LK, Thomforde GM. Motor dysfunction of the small bowel and colon in patients with the carcinoid syndrome and diarrhea. *N Engl J Med* 1993;329:1073-1078
- 6 Crowell MD. The role of serotonin in the pathophysiology of irritable bowel syndrome. *Am J Manag Care* 2001;7(8 Suppl):S252-260
- 7 Grider JR, Kueemmerle JF, Jin JG. 5-HT released by mucosal stimuli initiates peristalsis by activating 5-HT₄/5-HT_{1p} receptors on sensory CGRP neurons. *Am J Physiol* 1996;270(5 Pt 1):G778-G782
- 8 Steadman CJ, Talley NJ, Phillips SF, Zinsmeister AR. Selective 5-hydroxytryptamine type 3 receptor antagonism with ondansetron as treatment for diarrhea-predominant irritable bowel syndrome: a pilot study. *Mayo Clin Proc* 1992;67:732-738
- 9 Prior A, Read NW. Reduction of rectal sensitivity and postprandial motility by granisetron, a 5-HT₃ receptor antagonist, in patients with irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther* 1993;7:175-180
- 10 Miwa J, Echizen H, Masueda K, Umeda N. Patients with constipation-predominant irritable bowel syndrome (IBS) may have elevated serotonin concentrations in colonic mucosa as compared with diarrhea-predominant patients and subjects with normal bowel habits. *Digestion* 2001;63:188-194
- 11 Zhao R, Baig MK, Wexner SD, Chen W, Singh JJ, Noguera JJ, Woodhouse S. Enterochromaffin and serotonin cells are abnormal for patients with colonic inertia. *Dis Colon Rectum* 2000;43:858-863
- 12 El-Salhy M, Norrgard O, Spinnell S. Abnormal colonic endocrine cells in patients with chronic idiopathic slow-transit constipation. *Scand J Gastroenterol* 1999;34:1007-1011
- 13 Koyama E, Minegishi A, Ishizaki T. Simultaneous determination of four monoamine metabolites and serotonin in cerebrospinal fluid by 'high-performance' liquid chromatography with electrochemical detection: Application for patients with Alzheimer's disease. *Clin Chem* 1988;34:680-684
- 14 Espejo EF, Gil E. Antagonism of peripheral 5-HT₄ receptors

- reduces visceral and cutaneous pain in mice, and induces visceral analgesia after simultaneous inactivation of 5-HT₃ receptors. *Brain Res* 1998;788:20-24
- 15 Kozlowski CM, Green A, Grundy D, Boissonade FM, Bountra C. The 5-HT₃ receptor antagonist alosetron inhibits the colorectal distention induced depressor response and spinal c-fos expression in the anesthetised rat. *Gut* 2000;46:474-480
- 16 Delvaux M, Louvel D, Mamet JP, Campos-Oriola R, Frexinos

- J. Effect of alosetron on responses to colonic distension in patients with irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther* 1998;12:849-855
- 17 Viramonts BE, Camilleri M, McKinzie S, Pardi DS, Burton D, Thomforde GM. Gender related differences in slowing colonic transit by a 5-HT₃ antagonist in subjects with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 2001;92:2671-2676

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

ntPCR-RFLP 检测 HBV 阿德福韦耐药变异-rtN236T 变异

闫杰, 冯鑫, 王磊, 宋淑静, 谢雯, 欧蔚妮, 李蕴珈

闫杰, 谢雯, 欧蔚妮, 李蕴珈, 北京地坛医院五病区 北京市 100011
冯鑫, 宋淑静, 北京地坛医院病毒研究室 北京市 100011
王磊, 山东大学医学院济南市传染病医院四病区 山东省济南市 250021
首都医学发展科研基金, No. 2002-3046
山东省卫生厅计划项目, No. 2001CA1CAA11
项目负责人: 闫杰, 100011, 北京市安外大街地坛公园 13 号, 北京地坛医院五病区. jieyan@bnn.cn
电话: 010-64211031-2330 传真: 010-64281540
收稿日期: 2004-11-23 接受日期: 2004-11-29

摘要

目的: 建立一种简便、快速、实用的乙型肝炎病毒(HBV)阿德福韦(ADV)耐药变异-rtN236T 变异的快速检测方法。

方法: 根据 GenBank 收录的 HBV 基因全序设计巢式 PCR 引物, 使野生株(rt236N)PCR 产物中含有 DraI 酶切位点(5' TTTAAA3'), 而变异株(rt236T)无此限制性酶切位点。同时 PCR 扩增 2 份已行 HBV RT 区基因测序证实未出现 rtN236T 变异的慢性乙型肝炎患者血清及自行构建的对照质粒, 扩增产物经 DraI 酶切, 30 g/L 琼脂糖凝胶电泳后, 进行限制性片段长度多态性(RFLP)分析。

结果: 所建立的 ntPCR-RFLP 方法灵敏度高, 可以检测到 10⁶copies/L 的 HBV DNA; 特异性强, 其 RFLP 分析结果与 DNA 测序结果一致。

结论: ntPCR-RFLP 方法灵敏、特异、简便、实用, 适用于 ADV 耐药变异的临床监测工作。

闫杰, 冯鑫, 王磊, 宋淑静, 谢雯, 欧蔚妮, 李蕴珈. ntPCR-RFLP 检测 HBV 阿德福韦耐药变异-rtN236T 变异. 世界华人消化杂志 2005;13(4):543-545
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/543.asp>

0 引言

阿德福韦酯(adeфовир dipivoxil, ADV)是由美国 Gilead Science 公司开发的新型核苷类抗乙型肝炎病毒(hepatitis B, virus HBV)药物, 已在海外进行了 II、III 期临床试验^[1-2], 并已获美国 FDA 批准上市^[3]. 我国药品监督管理局于 2000-12 批准该药在中国进行临床试验, 目前, I 期临床试验已结束, II 期临床试验也已在 2002-12 正式启动. 临床研究表明 ADV 能有效地抑制 HBV DNA 复制, 使 HBV DNA 滴度迅速降低, 而且在出现拉米夫定(lamivudine)耐药的患者中 ADV 能继续有效地抑制变异株^[1-2, 4]. 但随之出现 ADV 耐药变异株为 HBV rtN236T 变异^[5-6]. 为此, 我们建立了基于巢式聚合酶链反应-限制性片段长度多态技术(ntPCR-RFLP assay)的快速检测方法, 以便对该耐药变异进行监测, 指导临床合理用药。

1 材料和方法

1.1 材料 两份慢性乙型肝炎患者血清取自北京地坛医院就诊患者, 为拉米夫定治疗前保留血清(标本号 216, 393). 其 HBV RT 区基因序列已采用 PCR 产物直接测序方法进行检测, 结果表明未出现 rtN236T 变异(测序结果已提交至 GenBank, accession number: AY762898, AY762900). 采用异硫氰酸胍一步法提取血清中的 DNA. 待检血清 50 μL 加入含 4 mol/L 异硫氰酸胍的裂解液 60 μL, 37℃ 温育 10 min; 加入酚/氯仿/异戊醇(25:24:1) 50 μL, 震荡混匀后 13 000 g 离心 10 min; 取上清, 加入等量异丙醇, -20℃ 沉淀 2 h, 13 000 g 离心 10 min, 弃上清; 加入 600 mL/L 乙醇