

· 临床研究 ·

培菲康对腹泻型肠易激综合征结肠黏膜 5-HT₃ 受体表达的影响

张秋琴¹, 左艳¹, 刘懿², 钟颖¹

1. 上海市宝山区仁和医院消化科, 上海 200431; 2. 复旦大学附属华山医院消化科, 上海 200040

摘要: **目的** 观察腹泻型肠易激综合征(IBS-D) 患者服用双歧杆菌三联活菌胶囊(培菲康)前后腹部症状评分及 5-羟色胺(5-HT)₃ 受体表达的变化,探讨培菲康治疗 IBS-D 的临床疗效及可能的作用机制。**方法** 选取 2014 至 2017 年上海市宝山区仁和医院消化内科门诊及住院确诊的 IBS-D 患者 29 例为受试组,以行电子结肠镜未见异常、无 IBS 样症状及其他器质性疾病的健康体检者 25 例为健康对照组。运用免疫组化方法检测受试组 IBS-D 患者治疗前后及对照组结肠黏膜 5-HT₃ 受体的表达(以中等阳性加强阳性计算阳性率),并观察 IBS-D 患者经培菲康治疗后腹部症状的变化。**结果** 健康对照组 25 例结肠黏膜中 5-HT₃ 受体表达阴性 23 例、弱阳性 2 例、中等阳性 0 例、强阳性 0 例,阳性率为 0。受试组 29 例 IBS-D 患者培菲康治疗前 5-HT₃ 受体表达阴性 2 例、弱阳性 3 例、中等阳性 6 例、强阳性 18 例,阳性率为 82.76%;经培菲康治疗 4~10 个疗程后,受试组患者腹部症状积分(2.01 ± 2.10 vs 6.69 ± 1.80, $P < 0.01$)较治疗前降低,结肠黏膜 5-HT₃ 受体表达阳性率(31.03% vs 82.76%, $P < 0.01$)较治疗前降低,差异均有统计学意义。**结论** 培菲康可能通过下调 IBS-D 患者结肠黏膜 5-HT₃ 受体的表达,降低其活性,从而改善 IBS-D 患者的腹部症状,达到治疗 IBS-D 的效果。

关键词: 肠易激综合征,腹泻型; 双歧杆菌三联活菌胶囊; 5-羟色胺 3 受体; 免疫组化

中图分类号: R 574.4 **文献标识码:** B **文章编号:** 1674-8182(2018)07-0943-04

Effect of Bifico on 5-HT₃ receptor expression in colonic mucosa of diarrhea predominant irritable bowel syndrome

ZHANG Qiu-qin*, ZUO Yan, LIU Yi, ZHONG Ying

* Department of Gastroenterology, Renhe Hospital of Baoshan District, Shanghai 200431, China

Corresponding author: LIU Yi, E-mail: hsluiyi0205@163.com

Abstract: Objective To observe the abdominal symptom score and the changes of the expression of 5-serotonin (5-HT)₃ receptor in the patients with diarrhea predominant irritable bowel syndrome (IBS-D) before and after the use of bifidotrigeminal live bacteria capsule (Bifico) and explore the clinical efficacy and possible mechanism of action. **Methods**

Twenty-nine IBS-D patients treated in Gastroenterology Department of Renhe Hospital of Baoshan District of Shanghai from 2014 to 2017 were selected as test group, and 25 healthy persons were served as controls who did not have abnormal symptom, IBS-like symptoms and other organic diseases by electronic colonoscopy. Immunohistochemical method was used to detect the expression of 5-HT₃ receptor (positive rate calculated with moderate positive plus strong positive), and the changes of the abdominal symptoms after the treatment of Bifico were observed in test group. **Results** In control group, colon mucosa showed negative expression of 5-HT₃ receptor in 23 cases, 2 cases of weak positive, 0 case of medium positive, 0 case of strong positive, and the positive rate was 0. In test group, there were negative expressions of 5-HT₃ receptor in 2 cases, weak positive expressions in 3 cases, moderate positive expressions in 6 cases, strong positive expressions in 18 cases, and the positive rate was 82.76% before treatment. After 4-10 courses of treatment, the abdominal symptom score [gastrointestinal symptoms rating scale (GSRS)] was significantly lower than that before treatment (2.01 ± 2.10 vs 6.69 ± 1.80, $P < 0.01$), and the positive expression rate of 5-HT₃ receptor was significantly lower than that before treatment (31.03% vs 82.76%, $P < 0.01$). **Conclusions** Bifico may reduce the activation of 5-HT₃ receptor in the colon mucosa of IBS-D patients by down-regulating the expression of 5-HT₃ receptors, thus improving the abdominal

symptoms of IBS-D patients and achieving the effect of treating IBS-D.

Key words: Irritable bowel syndrome, diarrhea predominant; Bifidotrigeminal live bacteria capsule; 5-serotonin 3 receptor; Immunohistochemistry

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)是一种常见的消化内科疾病,临床表现包括腹胀、腹痛及排便异常等,根据症状的不同可将该病分为便秘腹泻交替型(IBS-A)、便秘主导型(IBS-C)及腹泻主导型(IBS-D)三种^[1]。IBS 患者的症状极易反复发作,当受到寒冷、饮食或精神因素等刺激时,还会导致疾病加重,因此在临床上需要积极探寻治疗 IBS 的有效方法。IBS-D 是以腹痛或腹部不适伴排便习惯改变和/或大便性状异常(软片状、糊状或水样粪)为特征的一组肠道功能障碍综合征。在罗马Ⅲ诊断标准中,一般认为诊断上需排除生化或组织结构异常所导致的症状^[2]。培菲康(双歧杆菌三联活菌胶囊)治疗 IBS-D 有着较好的疗效^[3]。本课题采用免疫组化的方法检测应用培菲康治疗的 IBS-D 患者,比较治疗前后及健康对照组结肠黏膜 5-HT3 受体表达的变化,探讨培菲康治疗 IBS-D 的可能作用机制。

1 资料与方法

1.1 一般资料 从 2014 至 2017 年上海市宝山区仁和医院消化内科门诊及住院患者中,选择符合 2006 年 IBS Rome Ⅲ 诊断标准的合格受试者 29 例,其中男 19 例,女 10 例;年龄(44.04 ± 9.82)岁。从常规体检人群中选择行电子结肠镜未见异常、无 IBS 样症状及其他器质性疾病的健康体检者 25 例,其中男 15 例,女 10 例;年龄(35.02 ± 1.35)岁。均征得两组对象的知情同意。

1.2 受试组纳入、排除标准 纳入标准:均符合 2006 年 IBS Rome Ⅲ 诊断标准。排除标准:(1)肠道器质性疾病,如细菌性痢疾、炎症性肠病、结肠癌、结肠息肉、小肠吸收不良等。(2)2 周内已使用治疗 IBS 的有关药物,尤其是微生物制剂。(3)目前服用其他治疗药物且疗效稳定。(4)非 IBS 或患有其他消化系统病变者。(5)妊娠期或哺乳期妇女,有妇科盆腔疾病的当前诊断和病史患者。(6)腹泻合并心脏、肝脏、肾脏等主要脏器或内分泌、神经、血液等系统器质性病变及精神病患者。

1.3 症状评分 采用胃肠道症状分级评分标准(gastrointestinal symptoms rating scale GSRS)^[4]。(1)评分项目:腹痛或腹部不适的程度;大便次数异常的频度;大便性状异常的频率;排便异常(排便困难、排便不尽)的频度;出现黏液便的频度。(2)评分

标准:①程度评分,0 = 无,1 = 轻度(提示后方觉有症状),2 = 中度(有症状但能正常活动),3 = 重度(有症状,影响正常活动);②频率评分,0 = 无,1 = 偶尔(1% ~ 24% 时间内出现症状),2 = 经常(25% ~ 50% 时间内出现),3 = 持续(>50% 时间内出现)。

1.4 标本的取材和检测试剂 所有研究对象均行电子结肠镜检查。依据文献[5]在直肠和乙状结肠交界处以及升结肠处取活检,各夹取 1 块组织。获取组织标本后迅速放入装有福尔马林固定液的容器内,检测试剂为上海燃宇生物有限公司提供的三鹰 1:2005-HTR3A。

1.5 给药方法 受试组在接受常规治疗的基础上口服培菲康(上海信谊药厂有限公司,国药准字:S10950032),每天早、中、晚各服用 1 次,420 mg/次。以 1 月为 1 个疗程,连续治疗 4 ~ 10 个疗程。健康对照组不服用任何药物。

1.6 5-HT3 受体的检测

1.6.1 方法 严格按试剂盒的说明进行操作。石蜡切片脱蜡至水:依次将切片放入二甲苯 I 15 min—二甲苯 II 15 min—无水乙醇 I 5 min—无水乙醇 II 5 min—85% 酒精 5 min—75% 酒精 5 min—蒸馏水洗。抗原修复:组织切片置于盛满 EDTA 抗原修复缓冲液(pH 8.0)的修复盒中于微波炉内进行抗原修复,中火 8 min 至沸,停火 8 min 保温再转中低火 7 min,此过程中应防止缓冲液过度蒸发,切勿干片。自然冷却后将玻片置于 PBS(pH 7.4)中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次,每次 5 min。阻断内源性过氧化物酶:切片放入 3% 过氧化氢溶液(双氧水:纯水 = 1:9),室温避光孵育 25 min,将玻片置于 PBS(pH 7.4)中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次,每次 5 min。BSA 封闭:切片稍甩干后用组化笔在组织周围画圈(防止抗体流走),在圈内滴加 3% BSA 均匀覆盖组织,室温封闭 30 min。加一抗:轻轻甩掉封闭液,在切片上滴加 BSA 按一定比例配好的一抗,切片平放于湿盒内 4 ℃ 孵育过夜。(湿盒内加少量水防止抗体蒸发)加二抗:玻片置于 PBS(pH 7.4)中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次,每次 5 min。切片稍甩干后在圈内滴加与一抗相应种属的二抗(HRP 标记)覆盖组织,室温孵育 50 min。DAB 显色:玻片置于 PBS(pH 7.4)中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次,每次 5 min。切片稍甩干后在圈内滴加新鲜配制的 DAB 显色液,显微镜下控制显色时间,

阳性为棕黄色,自来水冲洗切片终止显色。复染细胞核:Harris 苏木素复染 3 min 左右,自来水洗,1% 盐酸酒精分化数秒,自来水冲洗,氨水返蓝,流水冲洗。脱水封片:将切片依次放入 75% 酒精 6 min—85% 酒精 6 min—无水乙醇 I 6 min—无水乙醇 II 6 min—二甲苯 I 5 min 中脱水透明,将切片从二甲苯拿出来稍晾干,中性树胶封片。显微镜镜检,图像采集分析。DAB 显出的阳性表达为棕黄色。结果观察与阳性标准:主要在肠黏膜的细胞膜(绒毛表面/基底/细胞间隙)及胞浆出现棕黄色沉积物提示有表达。定性判断标准:阳性细胞数在 10% 以下为阴性,10% ~ 25% 为弱阳性,~49% 为中等阳性,>50% 为强阳性。

1.6.2 结果分析 所有免疫组化的图片经消化科及病理科 2~3 位医生在不同时间进行阅片,每人至少随机观察 5~10 个高倍视野(HPF),取其平均值,计算 5-HT3 受体的表达百分比。阳性率计算:(中等阳性+强阳性)例数/总例数×100%。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 描述,先行正态性检验与方差齐性检验,对符合正态分布及方差齐性的资料,以及不满足正态性或方差齐性的资料进行自然对数转换为接近正态后,采用两独立样本 *t* 检验;计数资料采用频数(%)描述,组间比较采用 χ^2 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 受试组治疗前后主要症状积分变化 受试组 IBS-D29 例患者经培菲康治疗 4~10 个疗程后,临床症状改善显著,各腹部症状积分及总积分明显低于治疗前,差异有统计学意义(*P* 均 < 0.01)。见表 1。

2.2 5-HT3 受体表达情况及比较 健康对照组 25 例患者中 5-HT3 受体表达阴性 23 例、弱阳性 2 例、中等阳性 0 例、强阳性 0 例,故阳性率为 0,显示健康者结肠黏膜 5-HT3 受体几无表达。受试组 29 例 IBS-D 患者治疗前受体表达阴性 2 例、弱阳性 3 例、中等阳性 6 例、强阳性 18 例,阳性率为 82.76%,显示 IBS-D 患者结肠黏膜 5-HT3 受体高表达;经培菲康治疗后,阳性率下降为 31.03%,显示 IBS-D 结肠黏膜 5-HT3 受体表达下调,与治疗前比较差异有统计学意义(*P* < 0.01)。见表 2。

2.3 5-HTR3 表达的免疫组化结果 IBS-D 患者治疗前结肠黏膜 5-HTR3 表达情况见图 1,治疗后 5-HTR3 表达情况见图 2;健康对照组 5-HTR3 表达情况见图 3。

表 1 受试组治疗前后主要症状积分变化比较

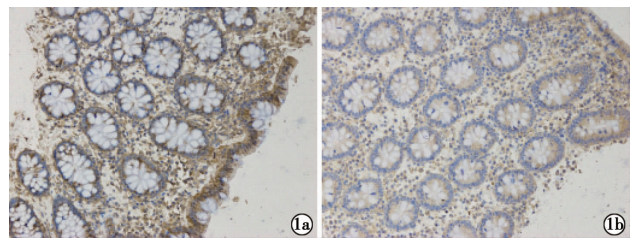
(*n* = 29, $\bar{x} \pm s$)

症状	治疗前	治疗后*	<i>P</i> 值
腹痛或腹部不适	1.80 ± 0.63	0.62 ± 0.76	<0.01
大便次数	1.40 ± 0.52	0.48 ± 0.62	<0.01
大便性状	1.42 ± 0.65	0.40 ± 0.60	<0.01
黏液便	1.02 ± 0.80	0.25 ± 0.48	<0.01
排便不尽感	1.04 ± 0.70	0.25 ± 0.50	<0.01
总积分	6.69 ± 1.80	2.01 ± 2.10	<0.01

注:* 表示治疗后数据均行自然对数转换为接近正态后进行检验。

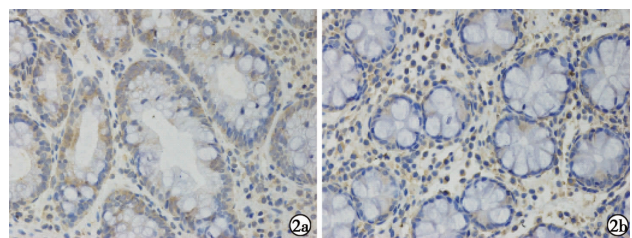
表 2 受试组治疗前后 5-HT3 受体表达比较 (例)

组别	例数	5-HT3 受体表达				阳性[例(%)]
		<10%	10%~25%	~49%	>50%	
受试组						
治疗前	29	2	3	6	18	24(82.76)
治疗后	29	5	15	3	6	9(31.03)
χ^2 值						15.82
<i>P</i> 值						<0.01



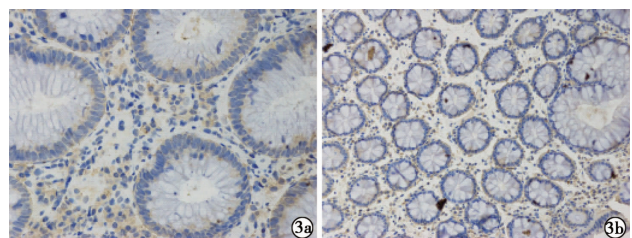
注:1a:70%左右的细胞膜及胞浆见棕黄色沉积物(×200);1b:80%左右的细胞膜及胞浆见棕黄色沉积物(×100)。

图 1 IBS-D 患者治疗前结肠黏膜 5-HTR3 表达免疫组化结果



注:2a:20%左右的细胞膜及胞浆见棕黄色沉积物(×400);2b:6%左右的细胞膜及胞浆见棕黄色沉积物(×200)。

图 2 IBS-D 患者治疗后结肠黏膜 5-HTR3 表达免疫组化结果



注:3a:5%左右的细胞膜及胞浆见棕黄色沉积物(×400);3b:<5%的细胞膜及胞浆见棕黄色沉积物(×100)。

图 3 健康对照组结肠黏膜 5-HTR3 表达免疫组化结果

3 讨论

IBS 是一种较为特殊的疾病,患者的症状难以用

现存的生物化学、形态学改变的相关知识进行解释,且目前尚未有权威的报告明确指出 IBS 的发病机制及病因。在临床方面,部分学者对 IBS 发病机制提出了以下几种观点:(1)肠道动力处于紊乱状态。相关研究发现,相对于健康人,IBS 患者的胃肠道发挥消化作用时,小肠的复合运动会发生移行性异常改变;异常改变主要表现为空肠中存在大量丛集或离散收缩波,复合运动周期缩短。出现以上变化时,患者极易产生腹痛症状。(2)肠道感染。引起肠道感染的病原主要包括寄生虫、病毒及细菌等,当肠道内出现炎症感染时,就会导致肠功能受损或紊乱;在肠道炎症不断加重的情况下就会发展为 IBS。(3)精神因素。IBS 患者的应激症状较为常见,这与精神状态存在一定的联系;如因精神状态不佳而导致心理应激长期存在,则不但会诱发 IBS 症状,同时还可能导致症状持续化或加重现象。有报道指出,抑郁及焦虑等是引起心理应激、心理障碍的主要因素,因此 IBS 患者多处于情绪失落状态^[6]。除了以上分析的三种诱因外,饮食结构不合理及肠道中的有益菌群及有害菌群失衡也会引起 IBS。例如,当肠道中的纤维素不断发酵时会产生大量气体,并由此加重腹胀症状。

由于在 IBS 发病原因方面尚未达成统一的共识,所以临床治疗 IBS 时所采用的方法也较多,如采用中药、止泻药及缓泻剂等,所获的临床疗效也不相同。由于不同药物的不良反应不尽相同,临床应用受到限制,李运红等^[7]研究发现 IBS-D 患者结肠黏膜 5-HT 合成和分泌增多,5-HT₃ 受体表达上调,提示 5-HT 和 5-HT₃ 受体可能为 IBS-D 的分子生物学基础之一,可能成为 IBS-D 治疗的分子靶点。Andresen 等^[8]研究发现 5-HT₃ 受体拮抗剂能有效治疗 IBS-D,但由于其不良反应限制了其在临床的广泛使用。人类的肠道中生存着大量细菌,这些细菌大部分处于共生状态,在目前发现的 400 多种微生物当中,链球菌、乳酸杆菌及双歧杆菌等益生菌所占比例约为 98% 左右,除了益生菌外,其余的微生物主要包括有害菌及不会产生有害作用或有益作用的细菌。健康人肠道中的有害菌、条件性致病菌及有益菌处于相互制衡的状态,这对于肠道正常功能,如免疫应答、食物代谢等功能的发挥有着非常重要的作用。当肠道菌群的平衡性被破坏时,致病菌及有害菌的比例就会增大,并由此引发多种肠道疾病。目前也有部分学者认为肠道菌群发生失衡或紊乱是引起 IBS 的主要原因,因此给予益生菌治疗是一个较好的治疗方法,且副作用少,患

者容易接受。培菲康中含有粪肠球菌、嗜乳酸杆菌及双歧杆菌,是三联活菌制剂,通过口服给药便能获得较好的临床疗效。由于培菲康中的三种有益菌属肠道中的固有菌,服用后可对菌群失调及紊乱状态进行改善,同时还可清除或抑制致病菌,避免因有害菌群过量增加导致肠内生成腐败物质及毒素。另外,培菲康还能够促进肠蠕动,使肠道能更快地消化营养物,并加快肠道合成各类维生素,因此其还能有效增强患者的机体免疫能力。已经有研究表明培菲康治疗 IBS 取得了较好的疗效^[3]。

综上所述,本研究结果显示:IBS-D 患者结肠黏膜 5-HT₃ 受体表达水平明显高于健康人,培菲康治疗 IBS-D 患者能有效降低其 5-HT₃ 受体表达水平,改善其临床症状;提示 5-HT₃ 受体与 IBS-D 的发病存在密切联系,培菲康治疗后同步发生 5-HT₃ 受体表达水平的下调和腹泻腹痛等症状的改善。由此推测:培菲康可能是通过下调 IBS-D 患者结肠黏膜 5-HT₃ 受体表达水平来抑制肠黏膜上 5-HT₃ 受体的活化,从而调节肠道神经系统,抑制肠道分泌功能,提高吸收能力,减弱平滑肌收缩力,提高内脏痛阈,消除肠道过敏,降低肠道高敏感,达到综合治疗的目的。

参考文献

- [1] 孙现周. 马来酸曲美布汀联合培菲康治疗腹泻型肠易激综合征 75 例疗效观察[J]. 中国现代药物应用, 2013, 7(21): 149.
- [2] Mostafa R. Rome III: The functional gastrointestinal disorders, third edition, 2006 [J]. World J Gastroenterol, 2008, 14(13): 2124-2125.
- [3] 孟凡军, 刘晓波, 刘光军, 等. 左氧氟沙星联合培菲康治疗腹泻型肠易激综合征的疗效分析[J]. 疑难病杂志, 2013, 12(8): 598-600.
- [4] Svedlund J, Sjödin I, Dotevall G. GSRS-a clinical rating scale for gastrointestinal symptoms in patients with irritable bowel syndrome and peptic ulcer disease[J]. Dig Dis Sci, 1988, 33(2): 129-134.
- [5] 姜敏, 凌立平, 傅宝. 肠易激综合征患者结肠 5-HT 的分布特点[J]. 世界华人消化杂志, 2005, 13(4): 119-121.
- [6] 蔡涛. 黄芪桂枝五物汤治疗腹泻型肠易激综合征脾胃虚寒证型 83 例疗效观察[J]. 医学信息, 2012, 25(12): 231-232.
- [7] 李运红, 朱晓蕾, 徐肇敏. 腹泻型肠易激综合征患者结肠黏 5-羟色胺和 5-羟色胺 3 受体的研究[J]. 胃肠病学, 2006, 11(8): 477-480.
- [8] Andresen V, Hollerbach S. Reassessing the benefits and risks of alosetron: what is its place in the treatment of irritable bowel syndrome? [J]. Drug Saf, 2004, 27(5): 283-292.

收稿日期: 2018-04-01 修回日期: 2018-06-10 编辑: 王国品