

连理汤对感染后肠易激综合征患者结肠黏膜 NLRP-3 及 PGRP-4 的影响

廉洁

山西省中医院, 山西 太原 030000

[摘要] 目的: 探讨连理汤对感染后肠易激综合征患者结肠黏膜 NLRP-3 及 PGRP-4 的影响。方法: 将感染后肠易激综合征患者 48 例分为 2 组, 治疗组予连理汤, 对照组予得舒特, 连续 4 周。采用半定量症状计分法, 记录治疗前、治疗后 2 周及 4 周症状计分变化; 采用荧光定量 PCR 技术和 Western-blot 技术检测结肠 NLRP-3、PGRP-4 变化。结果: 治疗组总有效率为 83.33%, 对照组总有效率为 79.16%, 2 组总有效率比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。治疗前, PI-IBS 患者结肠黏膜 NLRP-3 表达上升、PGRP-4 表达下降; 治疗后, 治疗组患者结肠黏膜 NLRP-3 表达下降、PGRP-4 表达上升, 与治疗前比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论: 连理汤具有明确缓解 PI-IBS 患者腹痛、腹泻症状的效用, 其疗效靶点考虑与上调 NLRP-3、PGRP-4 表达, 提高肠道先天免疫反应, 维持肠黏膜免疫屏障完整相关。

[关键词] 感染后肠易激综合征; 连理汤; NOD 样受体-3 (NLRP-3); 肽聚糖结合识别蛋白-4 (PGRP-4)

[中图分类号] R574.4 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2016) 05-0080-04

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2016.05.031

部分肠道感染患者在急性肠道感染恢复后, 仍存在腹痛、腹部不适、腹泻等症状, 即所谓感染后肠易激综合征(post-infectious irritable bowel syndrome, PI-IBS), 这类患者占消化科就诊患者 20% 以上^[1-2]。生理情况下, 肠道处于弱炎症状态, 弱炎症主要是先天免疫(innate immune)发挥重要作用, 它主要通过模式识别相关危险分子, 激活巨噬细胞、NK 细胞等, 启动防御机制, 通过抵御外来抗原对消化道损害, 维持肠黏膜屏障完整, 减少有害物质透过肠道屏障, 渗入黏膜下层, 从而保证肠道共生菌群正常^[3]。病理状态下, 肠道先天免疫失衡, 模式识别分子如 NOD 样受体家族(NLRs)、Toll 样受体家族(TLRs)、肽聚糖结合识别蛋白家族(PGRPs)表达异常, 均有可能导致肠道防御机制受损, 导致大量外来抗原入侵消化道, 引起肠道功能失调^[4]。笔者在中医药理论指导下, 从“湿热邪毒留恋, 其泻乍发乍止”角度出发, 结合上述研究进展, 应用随机、对照设计, 观察连理汤对于 PI-IBS 患者临床症状、NOD 样受体-3(NLRP-3)、肽聚糖结合识别蛋白-4(PGRP-4)表达的作用。

1 临床资料

1.1 一般资料 全部病例均源自于山西省中医院门诊患者 48 例, 采用随机、对照、开放试验设计: 随机号应用简明统计分析软件设计随机数字表后取号将患者分为 2 组各 24 例, 治疗组男 14 例, 女 10 例; 平均病程(1.41 ± 0.29)年, 平均年龄(46.73 ± 13.21)岁。对照组男 16 例, 女 8 例; 平均病程(1.36 ± 0.38)年, 平均年龄(47.10 ± 12.94)岁。2 组年龄、病程、性别及症状计分等基线资料经统计学处理, 差异均无统计学意义($P > 0.05$), 具有可比性。

1.2 诊断标准 参照 2006 年功能性胃肠病罗马 III 诊断标准关于肠易激综合征中相关内容^[5]。中医诊断标准参照中华中医药学会发布《中医内科学常见病诊疗指南·西医疾病部分》中关于肠易激综合征中医辨证论治内容, 符合脾虚湿盛证^[6]。

1.3 纳入标准 符合诊断标准; 年龄 18 ~ 65 岁; 签署知情同意书。

1.4 排除标准 不符合诊断标准; 伴有心脑血管疾病、精神病, 肝肾功能障碍者; 伴有消化道肿瘤者; 孕妇或近 3 月有意怀孕者; 不能理解知情同意书者。

[收稿日期] 2016-01-22

[作者简介] 廉洁 (1983-), 女, 住院医师, 主要从事脾胃病科临床工作。

2 研究方法

2.1 治疗组 给予免煎中药制剂,连理汤(黄连、炙甘草各8g,茯苓12g,白术15g,人参、干姜各6g,江苏江阴天江药业有限公司生产),用200mL水冲服,每天1剂,分2次服用,连续4周。

2.2 对照组 给予匹维溴铵(法国苏威制药生产,国药准字:H20120127,商品名:得舒特),50mg,每天3次,连续4周。

3 观察指标与统计学方法

3.1 症状计分 参照罗马Ⅲ标准以及中华中医药学会发布《中医内科学常见病诊疗指南·西医疾病部分》中关于肠易激综合征相关内容,采用半定量计分法,将PI-IBS症状列为主要症状即腹泻(0分:无症状、2分:大便每天3次;4分:大便每天3次以上);次要症状即腹部不适(0分:无症状;1分:偶有腹部不适,不影响工作;2分:腹部不适频繁,严重影响工作),腹痛(0分:无症状;1分:偶有腹痛,不影响工作;2分:腹痛频繁,严重影响工作)。

3.2 PI-IBS患者结肠黏膜NLRP-3、PGRP-4蛋白及mRNA表达 采用Real-time PCR技术和western-blot技术检测患者结肠黏膜NLRP-3、PGRP-4蛋白及mRNA表达,具体实验步骤严格按说明进行。NLRP-3、PGRP-4及GAPDH引物委托广州吉坤生物技术有限公司完成。NLRP-3、PGRP-4一抗购自美国SanTa公司,二抗购自武汉博士德生物有限公司。

表1 NLRP-3、PGRP-4及GAPDH引物序列

基因	上游(5'-3')	下游(5'-3')	扩增长度(bp)
NLRP-3	AAACTCCACCTACCTCCTAC	TTTCTACTGAAGTGGCTCTGTCTG	127
PGRP-4	TTACTGTCAATGTCAGGTTG	ACAAATTCGTGACACTTAAC	184
GAPDH	GTTGTCTCCTGCCACTTCA	GCCCTCCTGTTATTATGG	93

注:在GenBank上查找目的基因mRNA序列,在CDS区设计特异性引物。

3.3 统计学方法 应用SPSS18.0 for Windows统计软件,数据以($\bar{x} \pm s$)表示,符合正态分布资料采用单因素方差分析(ANOVA)检验;若为非正态分布资料采用Mann-Whitney U秩和检验。

4 疗效评价与研究结果

4.1 疗效评价 主要症状腹泻改善为疗效评价终点,即采用单一疗效评价作为主要评价手段,综合考虑总体症状计分变化以判断临床疗效。

4.2 2组临床疗效比较 全部病例均完成本次临床观察,治疗组临床完全缓解6例,显效4例,有效

10例,无效4例,总有效率为83.33%。对照组临床完全缓解5例,显效5例,有效9例,无效5例,总有效率为79.16%。2组总有效率比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

4.3 2组治疗前后主要症状计分比较 见表2。治疗后,2组主要症状腹泻均明显改善,治疗后2周、治疗后4周症状计分与治疗前比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表2 2组治疗前后主要症状计分比较($\bar{x} \pm s$) 分

组别	n	治疗前	治疗后2周	治疗后4周
治疗组	24	7.24 ± 0.25	3.65 ± 0.42 ^①	2.14 ± 0.16 ^①
对照组	24	7.31 ± 0.17	3.89 ± 0.38 ^①	2.61 ± 0.20 ^①

与治疗前比较,① $P < 0.05$

4.4 2组治疗前后NLRP-3、PGRP-4蛋白及mRNA表达比较 见表3。治疗前,PI-IBS患者结肠黏膜NLRP-3表达上升、PGRP-4表达下降;治疗后,治疗组患者结肠黏膜NLRP-3表达下降、PGRP-4表达上升,与治疗前比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);而对照组患者治疗后结肠黏膜NLRP-3、PGRP-4蛋白及mRNA表达与治疗前比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表3 2组治疗前后NLRP-3、PGRP-4蛋白及mRNA表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	时间	n	NLRP-3蛋白	PGRP-4蛋白	NLRP-3 mRNA	PGRP-4 mRNA
治疗组	治疗前	24	1.46 ± 0.14	0.82 ± 0.07	1.52 ± 0.10	0.89 ± 0.06
	治疗后	24	0.86 ± 0.11 ^①	1.38 ± 0.10 ^①	0.85 ± 0.15 ^①	1.44 ± 0.13 ^①
对照组	治疗前	24	1.42 ± 0.12	0.86 ± 0.13	1.54 ± 0.08	0.92 ± 0.14
	治疗后	24	1.37 ± 0.09 ^②	0.75 ± 0.08 ^②	1.49 ± 0.11 ^②	0.86 ± 0.08 ^②

与治疗组治疗前比较,① $P < 0.05$;与对照组治疗前比较,② $P > 0.05$

5 讨论

流行病学资料已明确证实胃肠道感染与IBS之间存在密切联系,有学者依据罗马Ⅲ型标准将PI-IBS的定义为以前未患IBS个体,早期胃肠道感染恢复后出现IBS症状;胃肠道感染符合以下2条或2条以上特征:发热,呕吐,腹泻,粪便标本致病微生物培养阳性^[7]。中医学将PI-IBS归属于泄泻范畴,诚所谓“泄泻之由,无不由于脾胃”。PI-IBS从临床特点看“其病乍发乍止”,与休息痢病机相似,《诸病源候论》指出其形成是由于肠胃虚弱,胃管有停饮,冷热气乘之而成。笔者在上述理论指导下,提出温中健脾为本,佐以清热化湿为标,应用连理汤治疗PI-IBS患者临床疗效可靠,该方具有明确缓

解腹泻、腹痛及腹部不适的效用，其疗效与得舒特基本相似。

早期胃肠道感染导致的肠道黏膜损伤、肠道屏障功能受损、肠道通透性改变和肠道微生物失衡，以淋巴细胞浸润、炎症因子释放、肠神经内分泌细胞增殖等为主要表现的肠道持续性、低级别炎症反应状态，肠道感觉、运动功能和脑-肠轴功能异常等因素都可能参与PI-IBS的发病机制^[9]。NLRP-3炎症小体是由NOD样受体分子3、IL-1 β 、ASC等分子构成蛋白复合体，主要表达于上皮细胞，属于一种可调节炎症反应的胞内受体，参与机体先天免疫防御^[9]。有研究证实，PI-IBS患者小肠细菌过度生长，导致NLRP-3炎症小体表达上升，促使caspase-1活化，从而裂解前体形成的IL-1 β 使其成为有生物活性的IL-1 β ，同时，NLRP-3炎症小体可诱导激活Toll样受体识别后激活NF- κ B途径，从转录水平增加固有层巨噬细胞中IL-1 β 前体的表达，从而引发肠道炎症反应^[10]。本研究结果发现，治疗前，PI-IBS患者NLRP-3表达增加，该变化与患者临床症状呈正相关；而予中药连理汤治疗后，患者PGRP-4表达下降并伴随症状逐步改善。

肽聚糖作为先天免疫理想靶标，在宿主体内是不能自行产生的，而多源于外来抗原，是重要的病原相关模式分子，而肽聚糖结合识别蛋白(PGRPs)通过识别肽聚糖，水解肽聚糖，并阻断Toll样受体信号通路，诱导产生抗菌肽，发挥杀菌作用^[11-12]。PGRP-4主要表达于肠黏膜上皮细胞，具有直接杀菌和清道夫作用，参与机体炎症反应，能够帮助机体维持健康的肠道菌群，保护宿主免受结肠炎的损害^[13-14]。本研究发现，治疗前，PI-IBS患者结肠黏膜PGRP-4表达下降，该变化与患者临床症状呈正相关；而予中药连理汤治疗后，患者PGRP-4表达上调并伴随症状逐步改善。

综上，连理汤能缓解PI-IBS腹痛、腹泻等症状，笔者推测其效用靶点可能与下调NLRP-3表达，上调PGRP-4表达，提高肠道先天免疫反应，维持肠黏膜免疫屏障完整相关。

[参考文献]

- [1] Nielsen HL, Engberg J, Ejlersen T, et al. Psychometric scores and persistence of irritable bowel after *Campylobacter concisus* infection [J]. *Scand J Gastroenterol*, 2014, 49(5): 545-551.
- [2] Dickinson B, Surawicz CM. Infectious diarrhea: an overview [J]. *Curr Gastroenterol Rep*, 2014, 16 (8): 399.
- [3] Schwille-Kiuntke J, Unverdorben A, Weimer K, et al. Bacterial infections in childhood: A risk factor for gastrointestinal and other diseases? [J]. *United European Gastroenterol J*, 2015, 3(1): 31-38.
- [4] Wouters MM, Van Wanrooy S, Nguyen A, et al. Psychological comorbidity increases the risk for postinfectious IBS partly by enhanced susceptibility to develop infectious gastroenteritis[J]. *Gut*, 2015: gutjnl-2015-309460.
- [5] Drossman DA. Rome III: the new criteria[J]. *Chin J Dig Dis*, 2006, 7(4): 181-185.
- [6] 中华中医药学会. 中医内科常见病诊疗指南·西医疾病部分[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2008: 112-116.
- [7] Kanazawa M, Palsson OS, van Tilburg MA, et al. Motility response to colonic distention is increased in postinfectious irritable bowel syndrome (PI-IBS) [J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2014, 26(5): 696-704.
- [8] Kanazawa M, Fukudo S. Relationship between infectious gastroenteritis and irritable bowel syndrome [J]. *Clin J Gastroenterol*, 2014, 7(1): 14-18.
- [9] Yen H, Sugimoto N, Tobe T. Enteropathogenic *Escherichia coli* Uses NleA to Inhibit NLRP3 Inflammasome Activation[J]. *PLoS Pathog*, 2015, 11(9): e1005121.
- [10] Sun YL, Zhang M, Chen CC, et al. Stress-induced corticotropin-releasing hormone-mediated NLRP6 inflammasome inhibition and transmissible enteritis in mice[J]. *Gastroenterology*, 2013, 144(7): 1478-1487.
- [11] Nanau RM, Neuman MG. Metabolome and inflammasome in inflammatory bowel disease [J]. *Transl Res*, 2012, 160(1): 1-28.
- [12] Saha S, Jing X, Park SY, et al. Peptidoglycan recognition proteins protect mice from experimental colitis by promoting normal gut flora and preventing induction of interferon-gamma[J]. *Cell Host Microbe*, 2010, 8(2): 147-162.
- [13] Richardson WM, Sodhi CP, Russo A, et al. Nucleotide-binding oligomerization domain-2 inhibits toll-like receptor-4 signaling in the intestinal epithelium[J]. *Gastroenterology*, 2010, 139(3): 904-917.
- [14] Lee J, Geddes K, Streutker C, et al. Role of mouse peptidoglycan recognition protein PGLYRP2 in the innate immune response to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection in vivo [J]. *Infect Immun*, 2012, 80(8): 2645, 2654.

(责任编辑: 骆欢欢, 李海霞)