

Hp 感染的功能性消化不良腹痛症状与 P 物质、降钙素基因相关肽的关系*

何平¹, 田文广^{2△}, 张小丽¹, 鲍森¹, 黄剑¹

(重庆医科大学附属永川医院:1. 消化内科;2. 感染科, 重庆 402160)

[摘要] **目的** 初步探讨幽门螺杆菌(Hp)感染的功能性消化不良(FD)患者腹痛的发病机制。**方法** 根据罗马Ⅲ诊断标准,选择以上腹痛为临床表现的FD患者36例。胃镜下Hp快速尿素酶及C13尿素呼气试验将36例患者分为Hp(+)组($n=20$)和Hp(-)组($n=16$),同时选择12例健康人设立对照组。免疫组织化学法检测P物质(SP)、降钙素基因相关肽(CGRP)在各组组织中的密度值及明确SP、CGRP在细胞中的定位。视觉模拟评分将Hp感染的FD患者腹痛程度分为轻度、中度、重度,比较SP、CGRP在不同腹痛程度患者中的平均光密度值。**结果** Hp(+)组SP、CGRP的平均光密度值高于Hp(-)组($SP:0.056\pm 0.016$ vs. 0.027 ± 0.009 ; $CGRP:0.073\pm 0.018$ vs. 0.034 ± 0.009 , $P<0.05$)。SP、CGRP在重度腹痛患者中的平均光密度值明显高于中度腹痛者($SP:0.074\pm 0.011$ vs. 0.055 ± 0.012 ; $CGRP:0.094\pm 0.005$ vs. 0.075 ± 0.009 , $P<0.05$);中度腹痛患者的平均光密度值明显高于轻度腹痛者($SP:0.055\pm 0.012$ vs. 0.043 ± 0.008 ; $CGRP:0.075\pm 0.009$ vs. 0.054 ± 0.010 , $P<0.05$)。显微镜下观察到CGRP位于胃窦腺上皮细胞胞质内,SP同样位于胃黏膜细胞胞质。**结论** Hp感染的FD患者腹痛与SP、CGRP有关。

[关键词] 消化不良;腹痛;P物质;降钙素基因相关肽;Hp感染;功能性消化不良

[中图分类号] R57

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2016)14-1906-03

The relationship between the abdominal pain of functional dyspepsia with Hp infection and SP, CGRP*

He Ping¹, Tian Wenguang^{2△}, Zhang Xiaoli¹, Bao Miao¹, Huang Jian¹

(1. Department of Gastroenterology; 2. Department of Infectious Diseases, Yongchuan

Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 402160, China)

[Abstract] **Objective** To explore the pathogenesis of abdominal pain in functional dyspepsia patients with H pylori(Hp) infection. **Methods** According to the Rome Ⅲ diagnostic criteria, 36 cases of functional dyspepsia patients with clinical manifestations of abdominal pain were selected. All cases were divided into Hp (+) group ($n=20$) and Hp (-) group ($n=16$) through gastro-scope Hp rapid urease and C13 urea breath tests. And we chose 12 healthy subjects as control group. The mean optical density values of SP and CGRP in each group were detected by immunohistochemistry, and the localization of SP and CGRP in cells were detected. Functional dyspepsia patients with Hp infection were also divided into mild, moderate, severe abdominal pain degree by visual analogue scale (VAS), and then we compared the mean optical density value of SP and CGRP in patients with different abdominal pain. **Results** The mean optical density of SP and CGRP in Hp (+) group were significantly higher than those in Hp (-) group ($SP:0.056\pm 0.016$ vs. 0.027 ± 0.009 ; $CGRP:0.073\pm 0.018$ vs. 0.034 ± 0.009 , $P<0.05$). The mean optical density of SP and CGRP in patients with severe abdominal pain were significantly higher than those in patients with moderate abdominal pain ($SP:0.074\pm 0.011$ vs. 0.055 ± 0.012 ; $CGRP:0.094\pm 0.005$ vs. 0.075 ± 0.009 , $P<0.05$), and the expression of in patients with moderate abdominal pain was significantly higher than those patients with of mild abdominal pain ($SP:0.055\pm 0.012$ vs. 0.043 ± 0.008 ; $CGRP:0.075\pm 0.009$ vs. 0.054 ± 0.010 , $P<0.05$). Under the microscope, CGRP was located in the cytoplasm of the glandular epithelial cells of the stomach, and SP was also located in the cytoplasm of gastric mucosa. **Conclusion** Hp infection of functional dyspepsia patients with abdominal pain might be associated with SP, CGRP.

[Key words] dyspepsia; abdominal pain; substance P; calcitonin gene-related peptide; Hp infection; functional dyspepsia

罗马Ⅲ诊断标准将功能性消化不良(FD)定义为起源于胃、十二指肠区域的症状,并且排除引起这些症状的器质性、全身性或代谢性疾病,这些症状包括上腹痛、上腹烧灼感、餐后饱胀等^[1-2]。目前FD以药物治疗为主,但治疗效果不理想,明确FD的病因和发病机制以进行针对性的治疗成为近年来研究的

热点^[3]。P物质(substance P, SP)是最早发现的一种神经肽,广泛分布于胃肠道、呼吸道、皮肤等组织和器官,它与疼痛关系密切,既可传递痛觉信息、产生疼痛,又有镇痛作用^[4-5]。降钙素基因相关肽(calcitonin gene related peptide, CGRP)是一种体内分布广泛的生物活性肽,CGRP在痛觉调控中起着重要作

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81171526);重庆市永川区自然科学基金计划项目(YCSTC, 2011BE5015);重庆医科大学附属永川医院院级课题(YJYB2011010)。 作者简介:何平(1966—),副主任医师,本科,主要从事功能性胃肠道疾病研究。 △ 通讯作者, E-mail: TWG9366@163.com。

用,是与伤害性信息传导密切相关的神经活性物质^[6]。SP、CGRP 是反映痛觉的重要指标。Monnikes 等^[7]研究发现,幽门螺杆菌感染阳性[Hp(+)]FD 患者其疼痛阈值降低,胃黏膜中 CGRP 和 SP 的表达却显著升高,而目前国内关于 Hp(+)的 FD 患者胃黏膜 CGRP 和 SP 的水平变化鲜有报道。本研究按照罗马 III 标准筛选以上腹痛为临床表现的 FD 患者 36 例,采用免疫组织化学法检测到 SP、CGRP 在 Hp(+)组患者中的表达明显高于 HP 感染阴性[Hp(-)]患者, Hp(+)FD 患者腹痛程度越重, SP、CGRP 表达越高,表明 SP、CGRP 在 Hp(+)FD 患者腹痛的发病机制中起着重要作用,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2013 年 1 月至 2014 年 12 月就诊于本院消化内科门诊的 36 例 FD 患者,均仅以上腹痛为临床表现。其中,男 15 例,女 21 例,年龄 20~50 岁。同时,选取 12 例无上腹痛症状且无 Hp 感染的健康人为对照组。所有研究对象均签署研究知情同意书。患者纳入标准:根据罗马 III 标准筛选 FD 患者,有上腹痛、上腹烧灼感、餐后饱胀等症状,内镜检查阴性。排除标准:患有冠心病、有上消化道手术史,同时伴有肠易激综合征者。

1.2 方法

1.2.1 主要试剂 兔抗 CGRP(武汉博士德生物)多抗,兔抗 SP(武汉三鹰生物)多抗,山羊抗兔免疫球蛋白 G(IgG)/辣根酶标记(中杉金桥);放射免疫分析法(RIPA)裂解液(强),化学发光(ECL)显色试剂盒,十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)凝胶配制试剂盒(Beyotime 公司);二氨基联苯胺(DAB)显色试剂盒(中杉金桥)。

1.2.2 FD 的分组 结合内镜下 Hp 快速尿素酶试验及 C13 尿素呼气试验两种方法将所有研究对象分为 Hp(+)组和 Hp(-)组,同时设立对照组。两种试验方法测得 Hp 均为阳性或阴性即可纳入试验组,否则不能归入试验组。严格按照罗马 III 标准纳入 FD 的 36 例患者,经检测后, Hp(+)20 例, Hp(-)16 例,所有患者均于胃小弯胃窦处取活检,行免疫组织化学染色,计算平均光密度值(OD 值)。

1.2.3 腹痛程度的分组 根据视觉模拟(VAS)评分标准^[8]可将腹痛程度分级。其中,0 分为无疼痛感觉;>0~<4 分为轻度(有轻微的疼痛感,能忍受);4~<7 分为中度(疼痛并影响睡眠,尚能忍受);7~10 分为重度(有渐强烈的疼痛感,疼痛难忍,影响睡眠)。比较 SP、CGRP 在不同腹痛程度 Hp(+)FD 患者中的 OD 值。

1.2.4 免疫组织化学检测 SP、CGRP 在胃黏膜中的表达 标本采用 4%多聚甲醛固定后,以石蜡包埋、切片,滴加正常山羊血清封闭后,分别滴加一抗兔抗 SP(武汉三鹰,1:50)、兔抗 CGRP(博士德,1:100)抗体恒温孵育 1 h 后,转入 4℃冰箱孵育 24~36 h,滴加生物素化山羊抗兔二抗恒温孵育 2 h,底物 DAB/H₂O₂ 法染色,脱水透明封片。棕黄色为阳性反应。

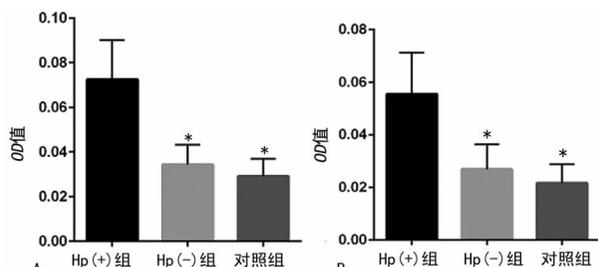
1.2.5 SP、CGRP 在各组胃黏膜中的 OD 值 应用计算机图像处理系统 CMOS(日本 OLYMPUS 公司)及专用软件(美国 Media Cybernetics 公司 Image-Pro Plus),计算随机 5 个视野胃黏膜 SP、CGRP 表达的 OD 值,OD 值越大,表示 SP、CGRP 水平越多。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件分析数据,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验;计数资料用率表示,组间采用 χ^2 检验,检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况比较 本研究筛选的 FD 患者中, Hp(+)组的平均年龄为(39.50±6.72)岁, Hp(-)组为(38.44±7.47)岁,对照组为(38.33±8.83)岁; Hp(+)组的 BMI 为 23.18±3.24, Hp(-)组为 23.34±2.85,对照组为 23.74±3.37。 Hp(+)组、 Hp(-)组、对照组 3 组 BMI、年龄分布均差异无统计学意义($P>0.05$)。

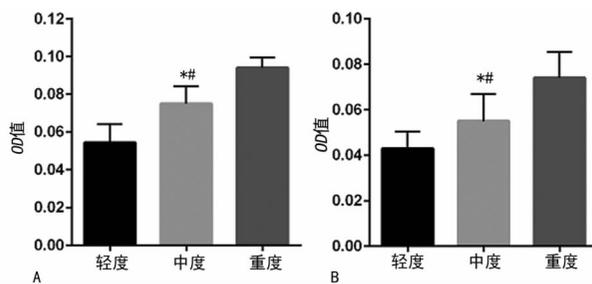
2.2 SP、CGRP 在各组胃黏膜中的 OD 值 免疫组织化学法检测到 Hp(+)组 SP、CGRP 的 OD 值高于 Hp(-)组(SP: 0.056±0.016 vs. 0.027±0.009; CGRP: 0.073±0.018 vs. 0.034±0.009, $P<0.05$); 而 Hp(-)组与对照组之间的 OD 值差异无统计学意义(SP: 0.027±0.009 vs. 0.022±0.007; CGRP: 0.034±0.009 vs. 0.029±0.008, $P>0.05$),见图 1。



A: CGRP OD 值比较; B: SP OD 值比较。* : $P<0.05$, 与 Hp(+)组比较。

图 1 CGRP、SP 在各组组织中的 OD 值比较

2.3 SP、CGRP 在不同腹痛程度 Hp(+)FD 患者中的 OD 值 按照 VAS 疼痛评分标准,轻度腹痛患者 7 例,中度 8 例,重度 5 例。SP、CGRP 在重度腹痛患者中的 OD 值明显高于中度腹痛者(SP: 0.074±0.011 vs. 0.055±0.012; CGRP: 0.094±0.005 vs. 0.075±0.009, $P<0.05$); 中度腹痛患者的 OD 值明显高于轻度腹痛者(SP: 0.055±0.012 vs. 0.043±0.008; CGRP: 0.075±0.009 vs. 0.054±0.010, $P<0.05$),见图 2。



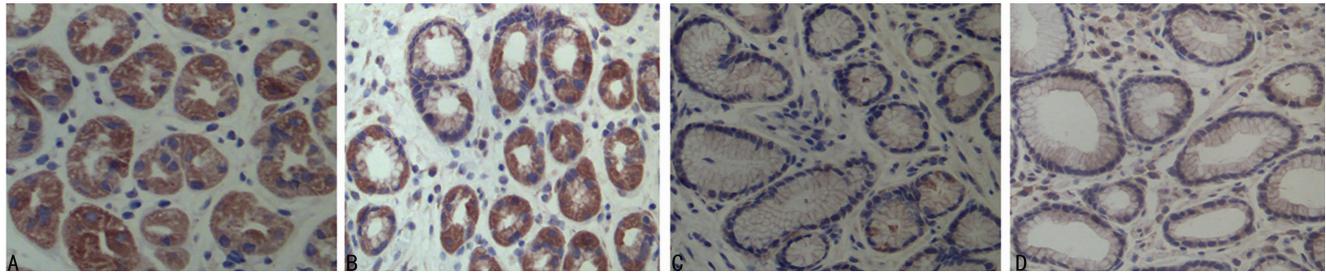
A: 不同腹痛程度的 CGRP OD 值比较; B: 不同腹痛程度的 SP OD 值比较。* : $P<0.05$, 与轻度腹痛比较; # : $P<0.05$, 与重度腹痛比较。

图 2 CGRP、SP 在不同腹痛程度 Hp(+)FD 患者中的 OD 值比较

2.4 SP、CGRP 在胃黏膜中的分布 人胃窦所取胃黏膜组织经免疫组织化学染色后,镜下所见 CGRP、SP 阳性细胞反应呈棕黄色或棕褐色。CGRP 阳性细胞位于胃窦腺上皮, CGRP 充

满细胞胞质内,细胞核为阴性;SP 同样位于胃黏膜细胞胞质

内,细胞核无表达,见图 3。



A:Hp(+)组胃黏膜 CGRP 染色;B:Hp(+)组胃黏膜 SP 染色;C:对照组 CGRP 染色;D:对照组 SP 染色。

图 3 CGRP、SP 在胃黏膜中的免疫组织化学染色观察($\times 400$)

3 讨 论

对健康人群及功能性胃肠病患者进行生活质量调查显示,FD 患者生活质量最低,其社会功能、情感职能、心理健康维度和精神心理健康总评分显著降低^[9-11]。目前 FD 以药物治疗为主,但疗效不明显^[3],明确 FD 的病因和发病机制成为近年来研究的热点和突破口。SP 是最早发现的一种神经肽,由 11 个氨基酸组成,属于胃肠肽中的速激肽族,广泛分布于中枢、外周神经系统,是伤害性传入末梢释放的一种兴奋性递质,它与疼痛关系密切,既可传递痛觉信息,又具致痛作用^[4-5]。朱建军^[12]研究表明,在多种慢性疼痛中,SP 作为疼痛递质通过感觉神经传入纤维向上传递至脊髓中枢,参与疼痛在脊髓中枢的传导和调制。SP 不仅在疼痛信息传递中起着重要作用,而且具有致痛作用。Henry^[13]研究表明,大剂量 SP 可直接引起感觉神经元兴奋,导致痛觉过敏,并掩盖鸦片样物质的止痛作用。CGRP 是由 37 个氨基酸组成的神经肽,广泛分布于中枢、外周神经系统及心血管、消化、呼吸等系统,参与机体多种生理活动、功能的调节^[14]。房春燕等^[6]认为,CGRP 是与伤害性信息传递密切相关的神经活性物质,在痛觉调控过程中起着重要作用。综上所述,CGRP、SP 是反映痛觉的重要指标,也是伤害性信息传入的神经递质。

Monnikes 等^[7]研究者证实, Hp(+) 的 FD 患者其胃容量扩张的不适阈值和疼痛阈值降低,胃黏膜中 CGRP 和 SP 表达水平却显著升高,得出 CGRP、SP 神经肽与 FD 发病机制有关的结论。而目前国内关于胃黏膜 CGRP、SP 神经肽是否参与 FD 发病机制的研究报道甚少。李启祥等^[15]研究表明,FD 感知过敏组患者胃黏膜中 SP、CGRP OD 值高于 FD 感知正常组及健康人,SP、CGRP 在 FD 患者的发病中可能起着较重要的作用,与本试验研究结果相同。

综上所述,以上研究结果表明 SP、CGRP 神经肽与 Hp(+)FD 患者腹痛的发病机制密切相关,为今后深入研究 FD 患者的药物治疗提供靶点。

参考文献

[1] Fang YJ, Liou JM, Chen CC, et al. Distinct aetiopathogenesis in subgroups of functional dyspepsia according to the Rome III criteria[J]. Gut, 2015, 64(10):1517-1528.
[2] Tack J, Talley NJ, Camilleri M, et al. Functional gastroduodenal disorders [J]. Gastroenterology, 2006, 130(5):1466-1479.

[3] Stein B, Everhart KK, Lacy BE. Treatment of functional dyspepsia and gastroparesis[J]. Curr Treat Options Gastroenterol, 2014, 12(4):385-397.
[4] Raap M, Rüdrieh U, Ständer S, et al. Substance P activates human eosinophils[J]. Exp Dermatol, 2015, 24(7):557-559.
[5] 王凌,李丽,司军强. P 物质与疼痛的关系[J]. 包头医学院学报, 2009, 25(5):102-104.
[6] 房春燕,李宁,史立宏,等. 神经性痛和炎性痛大鼠伏核内 CGRP mRNA 表达的变化[J]. 神经解剖学杂志, 2007, 23(2):155-158.
[7] Monnikes H, Van Der Voort IR, Wollenberg BA, et al. Gastric perception thresholds are low and sensory neuropeptide levels high in Helicobacter pylori-positive functional dyspepsia[J]. Digestion, 2005, 71(2):111-123.
[8] 宋文阁. 实用临床疼痛学[M]. 郑州:河南科学技术出版社, 2008:530-531.
[9] 平丽,李瑜元,聂玉强,等. 功能性胃肠病患病情况调查[J]. 实用医学杂志, 2003, 19(4):424-426.
[10] Halder SL, Locke GR, Schleck CD. Natural history of functional gastrointestinal disorders: a 12-year longitudinal population-based study[J]. Gastroenterology, 2007, 133(3):799-807.
[11] 张艳丽,宋志强,丁召路,等. 上胃肠道功能和动力障碍性疾病患者的生活质量评价[J]. 胃肠病学, 2006(8):499-502.
[12] 朱建军. P 物质在脊髓痛觉机制中的作用研究进展[J]. 交通医学, 2007, 21(3):247-248, 251.
[13] Henry JL. Future basic science directions into mechanisms of neuropathic pain[J]. J Orofac Pain, 2004, 18(4):306-310.
[14] Russell FA, King R, Smillie SJ, et al. Calcitonin gene-related peptide: physiology and pathophysiology[J]. Physiol Rev, 2014, 94(4):1099-1142.
[15] 李启祥,朱良如,侯晓华. 功能性消化不良病人胃黏膜 CGRP、SP 免疫阳性纤维与胃机械感觉过敏的关系[J]. 湖北民族学院学报(医学版), 2003, 20(4):1-4.