

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.04.001

腹泻型感染后 IBS 患者外周血和结肠黏膜 IFN- γ 、IL-10 表达及临床意义*何周桃¹, 孙晓宁¹, 周旭春², 黄白丽¹, 陈益耀¹, 邓桃枝¹, 韩向阳¹, 蓝程^{1 Δ}

(1. 海南省人民医院消化内科, 海口 570311; 2. 重庆医科大学附属第一医院消化内科, 重庆 400046)

[摘要] **目的** 探讨腹泻型感染后肠易激综合征(PI-IBS)患者外周血和肠黏膜细胞因子表达变化及其与临床症状积分的关系。**方法** 选择 2013 年 1—12 月海南省人民医院门诊及住院的腹泻型 PI-IBS 患者 30 例(观察组), 同期健康体检者 30 例(对照组)。分离培养两组对象的外周血单个核细胞(PBMC), ELISA 检测外周血及细胞培养上清液中干扰素 γ (IFN- γ)、白细胞介素(IL)-10 水平; 结肠镜取结肠黏膜组织, 免疫组织化学检测结肠黏膜 IFN- γ 及 IL-10 蛋白表达。Spearman 相关分析 IFN- γ 、IL-10 水平变化与临床症状积分的相关性。**结果** 两组对象外周血中 IL-10、IFN- γ 水平比较, 差异无统计学意义($P>0.05$); 与对照组比较, 观察组患者 PBMC 分离培养液中 IFN- γ 水平升高, IL-10 水平降低, 差异有统计学意义($P<0.01$)。观察组患者肠道主要症状积分与 PBMC 培养上清液及结肠黏膜中 IFN- γ 表达水平呈正相关($r=0.45, 0.94, P<0.01$), 与 IL-10 表达水平呈负相关($r=-0.52, -0.79, P<0.01$)。**结论** IFN- γ /IL-10 失衡可能参与腹泻型 PI-IBS 发病, 并可作为疾病活动的观察指标。

[关键词] 肠易激综合征; 腹泻型; 感染; 干扰素 II 型; 白细胞介素 10

[中图分类号] R574.62

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2018)04-0433-03

Expression of IFN- γ and IL-10 in peripheral blood and intestinal mucosa of patients with diarrhea post-infectious irritable bowel syndrome*

HE Zhoutao¹, SUN Xiaoning¹, ZHOU Xuchun², HUANG Baili¹, CHEN Yiyao¹, DENG Taozhi¹, HAN Xiangyang¹, LAN Cheng^{1 Δ}

(1. Department of Gastroenterology, Hainan Provincial People's Hospital, Haikou, Hainan 570311, China;

2. Department of Gastroenterology, First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400046, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the expression change of cytokines in peripheral blood and intestinal mucosa in the patients with diarrhea post-infectious irritable bowel syndrome(PI-IBS) and its relation with clinical symptoms scores. **Methods** Thirty outpatients and inpatients with diarrhea PI-IBS(observation group) and contemporaneous 30 individuals undergoing physical examination(control group) in the Hainan Provincial People's Hospital from January to December 2013 were selected. The peripheral blood mononuclear cells(PBMC) were separated and cultured. Then the levels of IFN- γ and IL-10 in peripheral blood and cell culture supernatant fluid were detected by ELISA. The colonic mucosal tissue was taken by colonoscopy. Then colonic mucosal IFN- γ and IL-10 protein expression was detected by immunohistochemistry staining. Furthermore, the relationship between the level change of IFN- γ and IL-10 with clinical symptom score was analyzed by using the Spearman correlation method. **Results** Peripheral blood IL-10 and IFN- γ levels had no statistical difference between the two groups($P>0.05$). Compared with the control group, in PBMC separation and culture, the IFN- γ level in the observation group was increased and IL-10 level was decreased, the difference was statistically significant($P<0.01$). The intestinal main symptom score in the observation group had the positive correlation with IFN- γ expression level of PBMC culture supernatant fluid and colonic mucosal IFN- γ expression level($r=0.45, 0.94, P<0.01$), and had the negative correlation with IL-10 expression level($r=-0.52, -0.79, P<0.01$). **Conclusion** The unbalance of IFN- γ and IL-10 level could be involved in the pathogenesis of diarrhea PI-IBS, which can serve as the observation indicators of disease activity.

[Key words] irritable bowel syndrome; diarrhea; infection; interferon type II; interleukin-10

感染后肠易激综合征(post-infectious irritable bowel syndrome, PI-IBS)与感染后肠道低度炎症和持续免疫激活有关,但其具体机制并不完全清楚^[1-4]。除免疫细胞外,炎症细胞因子在感染后免疫应答中起着承上启下的关键作用^[5-6]。有研究发现 IBS 细胞因子表达异常可能存在 1 型辅助 T 细胞/2 型辅助 T 细胞(Th1/Th2)失衡,但这些细胞因子的变化与 IBS 临床症状的关系还不太明确^[7-9]。本文探讨 PI-IBS 患者外周血和结肠黏膜炎症细胞因子干扰素 γ (IFN- γ)、白细胞介素(IL)-10 表达变化及其与临床症状的相关性。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2013 年 1—12 月海南省人民医院门诊及住院的腹泻型 PI-IBS 患者 30 例(观察组),其中男 19 例,女 11 例,年龄 28~64 岁,平均(43.02 \pm 10.73)岁。健康体检者(行

肠镜检查黏膜正常者)30 例(对照组),其中男 17 例,女 13 例,年龄 24~61 岁,平均(41.30 \pm 11.02)岁。两组对象性别、年龄比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。PI-IBS 患者符合罗马 III 诊断标准^[10],至少有 1 次急性肠道感染的病史,未足量足程使用抗菌药物治疗,处于疾病发作期(近 1 个月内反复腹痛、排便异常等)。30 例 PI-IBS 患者经抗菌药物治疗后,临床症状均获得不同程度的缓解。患者均行血、尿、粪常规检查,血液生化检查,胸腹部影像学检查及内窥镜检查,以排除器质性疾病。排除标准:严重心肺疾病及神经内分泌疾病患者;精神疾病患者及特殊人群,如孕期、哺乳期妇女及 14 岁以下儿童;其他各种原因致依从性差者。所有研究对象入组时签署知情同意书,研究方案获得海南省人民医院医学伦理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 实验材料 重组人 IL-2, IL-23 购自美国 R&D 公司。所有抗体均购自美国 BD Bioscience 公司。DU530 分光光度计为美国 Beckman 公司产品。人细胞因子 ELISA 试剂盒为美国 R&D 公司产品。免疫组织化学试剂盒为武汉博士德公司产品。

1.2.2 外周血单个核细胞(PBMC)的分离培养 采集外周血 5 mL, 枸橼酸抗凝, Ficoll 离心法分离 PBMC, 悬于 RPMI-1640 中, 加 ConA 10 g/L, IL-2 10 ng/L 和 IL-23 10 ng/L 刺激, 37 °C, 5%CO₂ 培养 48 h, 3 000 r/min 4 °C 离心 5 min, 取上清液, 冻存于 -80 °C 冰箱备检。

1.2.3 结肠黏膜细胞因子表达 采用免疫组织化学染色法检测结肠黏膜细胞因子表达。受试者行结肠镜检查时取近端结肠组织(距回盲部 5 cm), 组织超薄冰冻切片, 肠组织切片脱蜡至水, 一抗为小鼠抗人 IFN- γ 、IL-10 单克隆 IgG 抗体, 二抗为辣根过氧化物酶(HRP) polymer 酶标大鼠抗小鼠多克隆 IgG 抗体, DAB 显色。所有组化切片统一由同一台专业相机摄像, 用专业图像分析软件 Image-ProPlus(IPP) 6.0 测定阳性染色的平均吸光度(平均吸光度 = 累积吸光度/面积)。

1.2.4 细胞因子表达水平检测 外周血和 PBMC 培养上清中 IFN- γ 和 IL-10 用相应的人 IFN- γ 、IL-10 ELISA 试剂盒测定, 按说明书操作。

1.2.5 临床症状积分 在疾病发作期的每天记录排便次数、排便急促次数、里急后重次数、腹胀时间、腹痛时间、黏液便次数、大便性状, 根据表 1 的评分标准计算各症状的每日积分, 1 周后计算平均每天积分^[11]。大便性状评定标准参照 Bristol 大便分型^[12]。

表 1 腹泻型 PI-IBS 临床症状积分表

症状	0 分	1 分	2 分	3 分
腹痛时间(h/d)	无	1~<4	4~<7	≥7
腹胀时间(h/d)	无	1~<4	4~<7	≥7
里急后重比例	无	<1/4	1/4~3/4	>3/4
大便性状(分型)	3~4	5	6	7
黏液便比例	无	<1/4	1/4~3/4	>3/4
大便次数(次/天)	0~2	3~4	5~6	≥7
排便急迫比例	无	<1/4	1/4~3/4	>3/4

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行统计学分析, 计量资料经方差齐性检验符合正态分布的以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验, 两组变量的相关性采用 Spearman 相关性分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组对象临床症状积分比较 对照组、观察组临床症状积分分别为(18.07±1.82)、(1.78±0.82)分, 两组比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。

2.2 两组对象外周血及 PBMC 分离培养液中细胞因子表达水平比较 两组对象外周血中 IL-10、IFN- γ 水平比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$); PBMC 分离培养液中 IL-10、IFN- γ 水平比较, 差异有统计学意义($P < 0.01$), 见表 2。

表 2 两组对象外周血及 PBMC 分离培养液中细胞因子表达水平比较($\bar{x} \pm s, n = 30, \text{pg/mL}$)

组别	外周血		PBMC 分离培养液	
	IL-10	IFN- γ	IL-10	IFN- γ
观察组	173.06±14.39	304.17±17.78	97.22±10.48 ^a	508.79±17.30 ^a
对照组	193.26±29.71	235.45±61.39	202.78±21.39	187.48±55.00

^a: $P < 0.01$, 与对照组比较

2.3 两组对象结肠黏膜细胞因子表达水平比较 与对照组比较, 观察组结肠黏膜中 IL-10 水平降低($P < 0.01$); 两组对象结肠黏膜中 IFN- γ 水平比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。IL-10 的阳性染色主要位于细胞质内, 肠黏膜固有层、腺体周围, 呈黄色或棕色颗粒沉积; IFN- γ 的阳性染色主要位于细胞质内, 肠黏膜层、腺体周围, 呈黄色或棕色颗粒沉积。两组对象结肠黏膜细胞因子的表达, 见图 1、表 3。

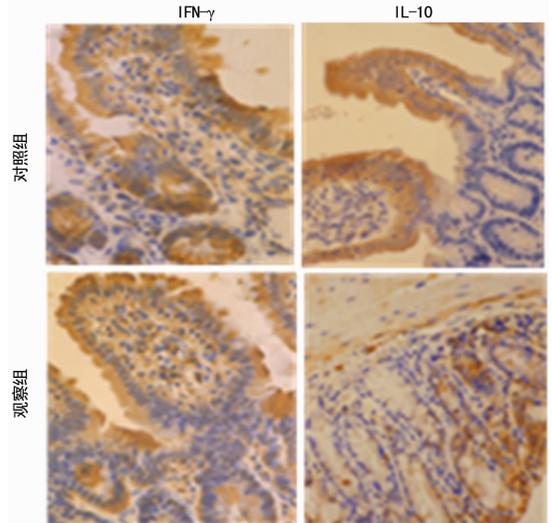


图 1 两组对象结肠黏膜细胞因子的表达

表 3 两组对象结肠黏膜细胞因子表达水平比较($\bar{x} \pm s, n = 30, \text{pg/mL}$)

组别	IL-10	IFN- γ
观察组	10.52±2.05 ^a	28.16±3.11
对照组	20.18±3.21	15.38±2.26

^a: $P < 0.01$, 与对照组比较

2.4 观察组 PI-IBS 患者细胞因子表达与临床积分的相关性分析 Spearman 相关性分析表明, 观察组肠黏膜及 PBMC 培养上清液中 IFN- γ 表达水平与临床症状积分呈正相关($r = 0.94, 0.45, P < 0.01$)。肠黏膜及 PBMC 培养上清液中 IL-10 水平则与临床症状积分呈负相关($r = -0.79, -0.52, P < 0.01$)。外周血中 IL-10、IFN- γ 水平与临床症状积分无相关性($r = -0.16, -0.13, P > 0.05$), 见表 4。

表 4 观察组细胞因子表达与临床积分的相关性分析

指标	外周血		PBMC		结肠黏膜	
	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>
IFN- γ	0.13	>0.05	0.45	<0.01	0.94	<0.01
IL-10	-0.16	>0.05	-0.52	<0.01	-0.79	<0.01

3 讨论

IBS 被定义为一种功能性肠病, 原因在于其缺乏生化和肉眼可见的形态学异常。一些学者试图寻找 IBS 发病时的理化和生物学变化以探讨其发病机制, 并作为疾病进展或风险的指标。有研究报道 IBS 时细胞因子的变化可能与感染后 IBS 发病有关^[5]; 熊青等^[13]报道 IBS 患者外周血 miRNA 水平变化可能作为疾病的预测指标。但目前还没有一个较好的疾病观测指标^[14]。

目前研究发现在 PI-IBS 时, 外周血、PBMC 及结肠局部的炎症细胞因子的变化有所不同。何晓荣等^[15]报道腹泻型 IBS 患者血清 IFN- γ 水平升高, 但 IL-10 水平无明显变化; 吴萍

等^[16]报道 IBS 患者 PBMC 分泌 IFN- γ 水平升高,IL-10 水平明显降低。RANA 等^[17]报道腹泻型 IBS 患者血清 IL-6、TNF- α 水平升高而 IL-10 水平没有明显变化。这些结果不一致的原因还不清楚,有可能是外周血中其他理化和生物学因素互相制衡的缘故。另一方面,外周血和组织局部的情况可能有所差异。

IFN- γ 是一种由 Th1 分泌的主要的促炎性细胞因子,其主要作用是促进 Th1 和巨噬细胞富含性的炎性反应,抑制 Th2 和嗜酸性粒细胞富含性的炎性反应^[18-19]。IL-10 是一种抗炎性与免疫抑制性细胞因子,可通过抑制激活的单核细胞、巨噬细胞、粒细胞和 T 淋巴细胞等发挥其功能,在稳定肠道黏膜内环境中起到重要作用。剔除 IL-10 基因的小鼠可自发结肠炎,说明 IL-10 在肠道正常黏膜免疫平衡调节中发挥着重要作用^[20]。

由此可见,机体 IFN- γ /IL-10 平衡可能是维持局部内环境稳态的作用因素。在疾病状态下,这一平衡被打破而造成持续的免疫活化和低度炎症。本研究进一步发现 IFN- γ 与临床症状呈正相关,IL-10 则与临床症状呈负相关,证实了这一推测。SCHMULSON 等^[21]也认为血清低 IL-10 水平可能是 IBS 的独立预测因素。因此,结肠黏膜细胞因子 IFN- γ 、IL-10 的变化可较好地反映腹泻型 PI-IBS 的临床症状,将来可能成为疾病病情的预测和评估指标。

另外趋化因子也参与 IBS 发病^[22],甚至可能还存在其他细胞因子平衡异常^[23],IFN- γ /IL-10 异常可能并不是 PI-IBS 发病的惟一途径。细胞因子 IFN- γ 、IL-10 在 PI-IBS 中变化的细胞来源及其下游事件还有待于进一步深入研究。

参考文献

- ISHIHARA S, TADA Y, FUKUB N, et al. Pathogenesis of irritable bowel syndrome-review regarding associated infection and immune activation[J]. *Digestion*, 2013, 87(3):204-211.
- FUTAGAMI S, ITOH T, SAKAMOTO C. Systematic review with meta-analysis: post-infectious functional dyspepsia[J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2015, 41(2): 177-188.
- CHEY W D, KURLANDER J, ESWARAN S. Irritable bowel syndrome:a clinical review[J]. *JAMA*, 2015, 313(9): 949-958.
- MAYER E A, LABUS J S, TILLISCH K, et al. Towards a systems view of IBS[J]. *Nature Reviews Gastroenterol Hepatol*, 2015, 12(10):592-605.
- YANG B, ZHOU X, LAN C. Changes of cytokine levels in a mouse model of post-infectious irritable bowel syndrome[J]. *BMC Gastroenterol*, 2015, 15(1):43-46.
- SUNDIN J, RANGEL I, KUMAWAT A K, et al. Aberrant mucosal lymphocyte number and subsets in the colon of post-infectious irritable bowel syndrome patients[J]. *Scand J Gastroenterol*, 2014, 49(9):1068-1075.
- CHANG L, ADEYEMO M, KARAGIANNIDES I, et al. Serum and colonic mucosal immune markers in irritable bowel syndrome[J]. *Am J Gastroenterol*, 2012, 107(2): 262-272
- CHEN J, ZHANG Y, DENG Z. Imbalanced Shift of cytokine expression between T helper 1 and T helper 2(Th1/Th2) in intestinal mucosa of patients with post-infectious irritable bowel syndrome[J]. *BMC Gastroenterol*, 2012, 12(1):91-98.
- SUNDIN J, RANGEL I, REPSILBER D, et al. Cytokine response after stimulation with key commensal bacteria differ in post-infectious irritable syndrome (PI-IBS) patients compared to healthy controls[J]. *PLoS One*, 2015, 10(9):e0134836.
- DROSSMAN D A. The functional gastrointestinal disorders and the Rome III process [J]. *Gastroenterology*, 2006, 130(5):1377-1390.
- ABBAS Z, YAKOOB J, JAFRI W, et al. Cytokine and clinical response in *Saccharomyces boulardii* therapy in diarrhea-Dominant irritable bowel syndrome;a randomized trial[J]. *Eue J Gastroenterol Hepatol*, 2014, 26(6):630-639.
- CAROFF D A, EDELSTEIN P H, HAMILTON K, et al. The Bristol stool scale and its relationship to *Clostridium difficile* infection[J]. *J Clin Microbiol*, 2014, 52(9):3437-3439.
- 熊青, 许龙, 李强, 等. IBS 患者循环 microRNA 表达谱[J]. *世界华人消化杂志*, 2013, 21(5):392-396.
- CHIRA A, DUMITRASCU D L. Serum biomarkers for irritable bowel syndrome[J]. *Clujul Med*, 2015, 88(3): 258-264.
- 何晓荣, 田尧, 郑志存, 等. 腹泻型肠易激综合征患者血清炎性细胞因子分析[J]. *现代医药卫生*, 2013, 29(2):180-181.
- 吴萍, 张海燕, 张葆, 等. 肠易激综合征患者细胞因子的变化及其临床意义[J]. *中国医师杂志*, 2006, 8(10):1406-1407.
- RANA S V, SHARMA S, SINHA S K, et al. Pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokine response in diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome patients[J]. *Trop Gastroenterol*, 2012, 33(4):251-256.
- LEES J R. Interferon gamma in autoimmunity:A complicated player on a complex stage[J]. *Cytokines*, 2015, 74(1):18-26.
- ASKENASY N. Interferon and tumor necrosis factor as humoral mechanisms coupling hematopoietic activity to inflammation and injury[J]. *Blood Rev*, 2015, 29(1):11-15.
- WEINSTOCK J V, BLUM A, METWALI A, et al. Substance P regulates Th1-type colitis in IL-10 knockout mice[J]. *J Immunol*, 2003, 171(7):3762-3767.
- SCHMULSON M, PULIDO-LONDON D, RODRIGUEZ O, et al. Lower serum IL-10 is an independent predictor of IBS among volunteers in Mexico[J]. *Am J Gastroenterol*, 2012, 107(5):747-753.
- DARKOH C, COMER L, ZEWDIE G, et al. Chemotactic chemokines are important in the pathogenesis of irritable bowel syndrome[J]. *PLoS One*, 2014, 9(3):e93144.
- BASHASHATI M, REZAEI N, SHAFIEYOUN A, et al. Cytokine imbalance in irritable bowel syndrome: a systematic review and meta-analysis[J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2014, 26(7):1036-1048.