

论著

文章编号:1000-5404(2013)21-2282-04

直肠内脱垂患者直肠顺应性变化与肠黏膜中 TRPV1、5-HT 表达的关系

张鑫, 田跃, 童卫东, 李凡, 王李, 赵松, 叶景旺, 刘宝华 (400042 重庆, 第三军医大学大坪医院野战外科研究所普通外科, 全军便秘诊治中心)

[摘要] **目的** 探讨直肠内脱垂(internal rectal prolapse, IRP)患者直肠顺应性改变与 TRPV1、5-HT 在直肠黏膜层表达的关系。**方法** 选择临床诊断 IRP 的患者 20 例及对照组 20 例先进行肛管直肠测压, 然后行结肠镜检查, 在齿状线上方 4 cm 处下段直肠取黏膜活检, 行 TRPV1 和 5-HT 免疫组化染色, 采用图像分析法分析免疫反应阳性情况。**结果** 与对照组比较, IRP 组初始感觉容积明显增高 ($Z = -3.710, P < 0.01$), 最大感觉耐受容积明显降低 ($Z = -5.181, P < 0.01$), 直肠顺应性明显降低; 对照组黏膜层仅有少量 TRPV1 表达, IRP 组直肠黏膜腺体可见大量 TRPV1 阳性染色, 与对照组相比, IRP 组直肠黏膜层 TRPV1 的表达显著增强 ($Z = -5.085, P < 0.01$); 对照组黏膜层 5-HT 免疫阳性染色很少, 而 IRP 组黏膜层腺体细胞内 5-HT 表达量显著升高 ($Z = -4.734, P < 0.01$)。**结论** IRP 患者直肠顺应性明显低于对照组, 与直肠黏膜层 TRPV1 和 5-HT 免疫反应阳性显著增强导致直肠高敏感有关, 可能是 IRP 患者肛门坠胀、便意频繁等排便功能障碍的机制之一。

[关键词] 肛管直肠测压; TRPV1; 5-HT; 直肠内脱垂

[中图分类号] R392.3; R446.8; R574.63

[文献标志码] A

Relationship of TRPV1/5-HT expression in intestinal mucosa and rectal compliance in patients with internal rectal prolapse

Zhang Xin, Tian Yue, Tong Weidong, Li Fan, Wang Li, Zhao Song, Ye Jingwang, Liu Baohua (Department of General Surgery, Center of Constipation Diagnosis and Treatment, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the relationship of expression changes of transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) and 5-hydroxytryptamine (5-HT) in rectal mucosa and rectal compliance in the patients with internal rectal prolapse (IRP). **Methods** A total of 20 out-patients who were diagnosed as IRP in our department and 20 sex- and age-matched healthy individuals for physical examination from October to December 2012 were enrolled in this study. They received colonoscopy after anorectal manometry. Immunohistochemical assay for TRPV1 and 5-HT was carried out in the mucosal samples from the lower rectum at 4 cm above the dentate line. **Results** The initial sensation volume was significantly higher in IRP group than in normal control ($Z = -3.710, P < 0.01$), but the largest feeling tolerance volume was obviously lower in IRP group ($Z = -5.181, P < 0.01$). The rectal compliance was significantly lower in the IRP group than in normal control. TRPV1 was extensively expressed in the rectal mucosa of IRPs when compared in that of control ($Z = -5.085, P < 0.01$). Similar expression was found in 5-HT in the rectal mucosa ($Z = -4.734, P < 0.01$). **Conclusion** Rectal compliance in patients with IRP is significantly lower than normal control, which might be related with the significantly enhanced expression of TRPV1 and 5-HT in rectal mucosa which causes rectal hypersensitivity. It may be one of the mechanisms of bowel dysfunction as anal bulge and frequent defecation in patients with internal rectal prolapse.

[Key words] anorectal manometry; transient receptor potential vanilloid 1; 5-hydroxytryptamine; internal rectal prolapse

Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2013jjB0092), the Starting Fund of Scholars Returning From Overseas of Third Military Medical University (2011XHG08) and the International Cooperation Project of Chongqing (2011gz0045). Corresponding author: Tong Weidong, E-mail: tongweidong@gmail.com

[基金项目] 重庆市自然科学基金重点项目(CSTC2013jjB0092); 第三军医大学留学回国人员启动基金(2011XHG08); 重庆市国际合作项目(2011gz0045)

[通信作者] 童卫东, E-mail: tongweidong@gmail.com

[优先出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130925.1544.005.html>(2013-09-25)

直肠内脱垂(internal rectal prolapse, IRP)是指排便过程中近端直肠黏膜层或全层折入远端肠腔或肛管内而未脱出肛门外缘,并在粪块排出后持续存在的一种疾病,是造成出口梗阻性便秘的重要原因^[1],严重影响患者健康和生活质量。手术、硬化剂注射等方法可一定程度上纠正 IRP 的解剖异常,但临床症状的缓解率并不理想,且术后并发症及复发率较高^[2-4],提示 IRP 的病理生理机制并不单纯是直肠黏膜脱垂的解剖异常,可能涉及更复杂的感觉与运动神经调控机制。IRP 表现为肛门直坠胀、便意频繁、排便不尽感等直肠高敏感为主的排便障碍症状群,提示可能存在直肠的感觉功能异常。研究发现,40% 的 IRP 患者存在直肠感觉功能异常,但机制不详^[5]。辣椒素受体(transient receptor potential vanilloid 1, TRPV1)及 5-羟色胺(serotonin, 5-HT)是胃肠道感觉信号调控的重要介质,二者在肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)患者肠道黏膜层过度表达,导致痛觉过敏及排便次数增多等肠道感觉、运动高敏感已有报道^[6-9]。我们推测 IRP 患者以直肠敏感性增高为特征的系列排便功能障碍症状可能与直肠黏膜层 TRPV1、5-HT 的表达异常以及直肠顺应性改变相关,但 TRPV1、5-HT 在 IRP 患者直肠黏膜的表达及其与直肠顺应性变化方面的研究迄今少见报道。本研究拟通过肛管直肠测压,检测 IRP 患者直肠黏膜 TRPV1、5-HT 的表达,探讨 IRP 患者直肠顺应性变化及其与 TRPV1、5-HT 表达的关系,旨在为深入研究其病理生理机制奠定基础。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取 2012 年 10-12 月我院胃结直肠肛门外科门诊就诊并诊断为 IRP 的患者 20 例,包括男性 5 例,女性 15 例,年龄 29~72(52.70±10.75)岁,病程为 1~3(2.03±0.61)年,未行药物及手术治疗。对照组:同期来我院健康体检行结肠镜检查的人群,无便秘及排便障碍病史,无泻剂服用史,结肠镜检查结果正常,共收集 20 例,包括男性 6 例,女性 14 例,年龄 25~68(46.45±11.78)岁。IRP 组与对照组在年龄及性别方面差异均无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。研究对象均签署知情同意书,本研究经第三军医大学大坪医院野战外科研究所伦理委员会批准。IRP 组纳入标准:以肛内坠胀、便意频繁等排便障碍为主诉来我院结直肠外科门诊就诊的患者,符合功能性便秘诊断的罗马 III 标准^[10],经排粪造影诊断为 IRP,结肠镜或钡灌肠排除大肠器质性疾病。排除标准:有泻剂服用史;伴有结肠慢传输、直肠前突、盆底痉挛、巨直肠等其他便秘类型,存在精神障碍。

1.2 肛管直肠测压

使用美国美敦力公司的 ploygraf 肛门直肠压力监测仪,检查前 3 d 起停用影响肠道动力的药物。检查前 1 d 不服用泻剂或灌肠,检查当日排空直肠。检查时取左侧屈膝卧位。测压导管排空气泡并校正后以甘油润滑,缓慢插入肛管。置测压导管气囊于距离肛缘 4 cm 按每次 10 mL/5 s 充气扩张直肠,测量引起直肠初始感觉的容积和最大感觉耐受容积的气囊容积。

1.3 主要试剂

TRPV1 多克隆抗体(1:100)、5-HT 单克隆抗体(1:10)均购自 ABCAM 公司。二步法 S-P 9000 免疫组化试剂盒购自北京中杉金桥公司。

1.4 免疫组化染色

纳入对象在我院内镜中心进行结肠镜检查,在齿状线上方 4 cm 处下段直肠取黏膜活检 2 块,放入 4% 多聚甲醛溶液中固定 6 h。常规石蜡包埋,5 μm 厚度切片。将切片放入 60 °C 恒温烘箱内烤片 2 h,然后依次放入二甲苯中脱蜡,100%~70% 梯度酒精中水化,抗原修复。按照 S-P 9000 免疫组化试剂盒步骤说明依次孵育山羊血清、双氧水工作液,一抗 4 °C 恒温冰箱过夜、二抗孵育、DAB 染色、复染,70%~100% 梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树脂封片。保持显微镜下相同光强度,采用 OLYMPUS 显微镜(型号:IX-71),关掉采图自动白平衡等功能,全部用手动设置等,拍摄(×400)数码照片,选择 640×480 像素范围进行裁切图像。采用 Image Pro Plus(IPP)软件图像半定量分析技术进行分析。首先将 IPP 程序系统的灰度单位转换成光密度单位。分析免疫组化染色的图像时,把采集的图像中呈现黄色的区域(TRPV1、5-HT 阳性染色部分)作为 AOI 进行光密度测定分析。选择测量面积、平均光密度和累积光密度(integrated optical density, IOD)进行测量,取 IOD 的累计值(SUM)进行分析。

1.5 统计学处理

采用 SPSS 13.0 统计软件,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,对肛管直肠测压得到的初始感觉容积参数和最大感觉耐受容积参数以及 IPP 软件分析得到的 TRPV1、5-HT 的 IOD 的 SUM 值进行两独立样本比较的秩和检验。

2 结果

2.1 直肠初始感觉容积和最大感觉耐受容积测定

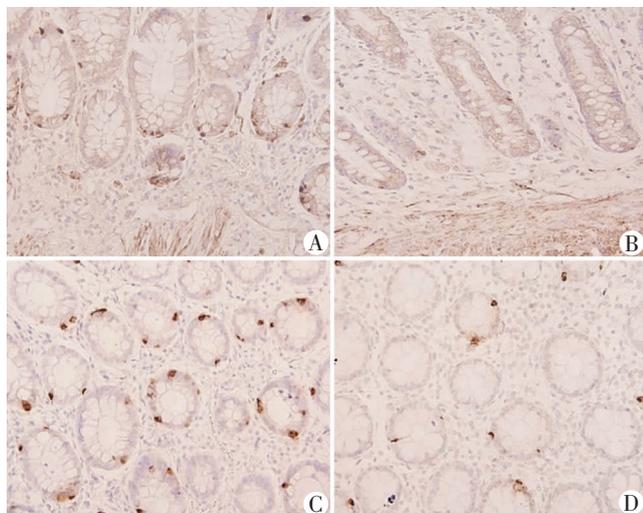
与对照组(29.70±4.79)比较,IRP 组直肠初始感觉容积(46.90±15.14)明显增加($P<0.01$),但直肠最大耐受感觉容积明显降低[(180.90±10.34) vs (144.70±17.21)], $P<0.01$,IRP 组直肠顺应性与对照组相比明显降低。

2.2 TRPV1 的表达

TRPV1 免疫反应阳性区域呈棕褐色,广泛分布于黏膜上皮腺管细胞。与对照组相比,IRP 组直肠黏膜层 TRPV1 免疫反应阳性显著增强(图 1A、B),图像分析显示增高 5.28 倍($P<0.01$,表 1)。

2.3 5-HT 的表达

免疫组化切片显示 5-HT 免疫反应阳性区域呈棕褐色,广泛分布于黏膜上皮腺管细胞中。与对照组相比,IRP 组直肠黏膜层 5-HT 免疫反应阳性明显增强(图 1C、D),图像分析显示增高 3.44 倍($P < 0.01$,表 1)。



A, B: TRPV1; C, D: 5-HT; A, C: IRP 组; B, D: 对照组

图 1 免疫组化染色观察 2 组直肠黏膜组织 TRPV1 与 5-HT 表达 (S-P $\times 400$)

表 1 2 组直肠黏膜组织 TRPV1 与 5-HT 免疫组化染色图像分析 ($n = 20, \bar{x} \pm s$)

检测指标	对照组	IRP 组	Z 值	P 值
TRPV1	986.40 \pm 762.30	5 204.70 \pm 2 847.33	-5.085	<0.01
5-HT	4 554.48 \pm 4 509.69	15 686.44 \pm 4 469.95	-4.734	<0.01

3 讨论

IRP 严重影响患者的健康和生活质量,目前常用的治疗方法包括综合保守治疗、硬化剂注射、手术等,但总体疗效不理想,有效率差别极大^[2-4],尚无一种公认的最佳治疗方案。IRP 疗效不好的主要原因是对其病理生理机制的认识仍然不清。传统上认为 IRP 的发生可能与以下因素有关:各种原因导致的盆底肌肉松弛;分娩时造成的阴部神经损伤。手术、硬化剂注射等可一定程度上纠正 IRP 的解剖学异常,对部分患者有效,但相当一部分 IRP 患者术后复查排粪造影时 IRP 解剖学异常已经得到纠正,但其临床症状缓解并不明显,提示 IRP 的发病存在更为复杂的病理生理机制。近年研究认为肠黏膜感觉信号对运动功能有着重要的调控作用,肠动力调节的感觉神经调控机制引起了人们极大关注。IRP 的临床症状突出地表现为肛门直肠坠胀、便意频繁、排便不尽感,呈现出典型的直肠高敏

感状态。这种直肠感觉高敏感、运动功能紊乱是否与直肠黏膜相关的感觉信号分子表达异常以及直肠顺应性变化有关,尚不清楚。

肛管直肠测压是一种安全、无创、客观的肛管直肠功能检测技术^[11]。研究证明便秘患者存在直肠感觉和功能异常^[12]。大部分 IRP 患者存在肛门直肠坠胀、排便不尽感等症状,但直肠指检发现直肠内并无大便残留,表明 IRP 患者存在直肠感觉功能异常。本研究发现 IRP 患者初始感觉容积与对照组相比明显增高,但最大感觉耐受容积却低于对照组,提示 IRP 患者直肠顺应性与对照组相比明显降低,这种降低可能与 IRP 患者便意频繁等症状相关。

TRPV1 属于瞬时感受器电位离子通道(transient receptor potential channel, TRP)超家族,广泛分布于肠道中,参与消化道感觉、运动的调节^[13-15]。TRPV1 表达异常在肠道感觉、运动功能失调的发病中有着重要的病理意义^[13-15]。已有 TRPV1 在具有典型内脏高敏感表现的 IBS 患者结肠黏膜表达明显增高,并且这种增高与症状严重程度显著相关的报道^[16]。在对具有典型内脏高敏感的非腐蚀性反流性食管炎患者食管黏膜进行免疫组化染色也发现了 TRPV1 表达明显升高^[17]。陈晓敏等^[7]在研究 IBS 患者内脏高敏感与结肠黏膜 TRPV1 的相关性实验中也得到了相同的结论。动物实验发现用不同浓度的辣椒素刺激小鼠直肠,可以诱发生成强烈收缩反应,并且这种收缩反应成浓度依赖性^[18]。另有研究证明 TRPV1 拮抗剂可以降低辣椒素诱导的这种直肠强烈收缩^[19]。这证明了 TRPV1 能够感受肠腔内刺激,并通过一定的通路调节直肠的运动。

5-HT 作为一种自体活性物质,主要分布于胃肠道,90% 的 5-HT 在肠嗜铬细胞(enterochromaffin cell, EC)中合成并储存。肠嗜铬细胞受到肠腔内的物理、化学刺激后可释放 5-HT,释放出的 5-HT 与黏膜及黏膜下 5-HT₃、5-HT₄受体等结合,产生系列生物效应,从而调节肠道蠕动、体液分泌和局部血流量的变化^[9]。5-HT 的表达在肠道中异常升高可以导致腹痛、肠蠕动增加等内脏高敏感状态^[20]。

研究发现 TRP 家族中另一成员 TRPA1 是 EC 细胞的感受器分子,通过介导 5-HT 释放调控肠动力^[21],TRPV1 在诸多神经和非神经细胞上与 TRPA1 共表达,并在功能上具有协同作用^[22-23],两者在肠动力的感觉信号传入调控中发挥重要作用。因此,我们推测 TRPV1 可以通过介导 5-HT 的释放从而起到调节肠动力

的作用。

本研究发现 IRP 组直肠黏膜 TRPV1、5-HT 表达显著高于对照组,直肠顺应性低于对照组,提示 IRP 患者直肠黏膜 TRPV1、5-HT 表达异常升高导致直肠高敏感可能与直肠顺应性下降有关,从而导致患者便意频繁、肛门坠胀、排便不尽感等症状的发生。IRP 患者直肠黏膜 TRPV1 在感受肠腔内的各种物理和化学刺激后,通过与 EC 细胞上的 TRPA1 协同作用,激活 EC 细胞释放大量的 5-HT,释放的 5-HT 与黏膜及黏膜下 5-HT₃、5-HT₄受体等结合,从而导致直肠感觉、运动功能紊乱,其详细机制需要进一步研究证实。另外,TRP 家族的其他成员如 TRPM7 参与 Cajal 间质细胞调控胃肠道慢波活动的调节,TRPA1 参与肠 EC 细胞释放 5-HT 的调节^[21],这些相关的信号分子在 IRP 发病机制中的作用也值得深入研究。

参考文献:

[1] Wijffels N A, Angelucci G, Ashrafi A, *et al.* Rectal hyposensitivity is uncommon and unlikely to be the central cause of obstructed defecation in patients with high-grade internal rectal prolapse[J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2011, 23(2): 151-154, e30.

[2] Formijne-Jonkers H A, Poirier N, Draaisma W A, *et al.* Laparoscopic ventral rectopexy for rectal prolapse and symptomatic rectocele: an analysis of 245 consecutive patients[J]. *Colorectal Dis*, 2013, 15(6): 695-699.

[3] Michalopoulos A, Papadopoulos VN, Panidis S, *et al.* Surgical management of rectal prolapse[J]. *Tech Coloproctol*, 2011, 15 Suppl 1: S25-S28.

[4] Pescatori M, Zbar A P. Tailored surgery for internal and external rectal prolapse: functional results of 268 patients operated upon by a single surgeon over a 21-year period[J]. *Colorectal Dis*, 2009, 11(4): 410-419.

[5] Gladman M A, Scott S M, Chan C L, *et al.* Rectal hyposensitivity: prevalence and clinical impact in patients with intractable constipation and fecal incontinence[J]. *Dis Colon Rectum*, 2003, 46(2): 238-246.

[6] Qin H Y, Luo J L, Qi S D, *et al.* Visceral hypersensitivity induced by activation of transient receptor potential vanilloid type 1 is mediated through the serotonin pathway in rat colon[J]. *Eur J Pharmacol*, 2010, 647(1/3): 75-83.

[7] 陈晓敏, 施月芳, 吴跃龙, 等. 肠易激综合征患者结肠黏膜 TRPV1 表达与腹痛的关系[J]. *胃肠病学和肝病杂志*, 2010, 19(10): 944-946.

[8] Wang Y M, Chang Y, Chang Y Y, *et al.* Serotonin transporter gene promoter region polymorphisms and serotonin transporter expression in the colonic mucosa of irritable bowel syndrome patients[J]. *Neurogas-*

troenterol Motil, 2012, 24(6): 560-565, e254-e255.

[9] Cirillo C, Vanden-Berghe P, Tack J. Role of serotonin in gastrointestinal physiology and pathology[J]. *Minerva Endocrinol*, 2011, 36(4): 311-324.

[10] 德罗斯曼. 罗马 III——功能性胃肠疾病[M]. 柯美云, 方秀才, 译. 北京: 科学出版社, 2008: 457.

[11] Siddiqui A, Rosen R, Nurko S. Anorectal manometry may identify children with spinal cord lesions[J]. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2011, 53(5): 507-511.

[12] Czerwionka-Szaflarska M, Zielinska-Duda H, Mierzwa G, *et al.* The value of anorectal manometry as differentiated organic and functional disorders in children and youth with chronic constipation[J]. *Pol Merkur Lekarski*, 2006, 21(124): 319-324.

[13] Luo X J, Peng J, Li Y J. Recent advances in the study on capsaicinoids and capsinoids[J]. *Eur J Pharmacol*, 2011, 650(1): 1-7.

[14] Peng J, Li Y J. The vanilloid receptor TRPV1: role in cardiovascular and gastrointestinal protection[J]. *Eur J Pharmacol*, 2010, 627(1/3): 1-7.

[15] Alawi K, Keeble J. The paradoxical role of the transient receptor potential vanilloid 1 receptor in inflammation[J]. *Pharmacol Ther*, 2010, 125(2): 181-195.

[16] Keszthelyi D, Troost F J, Jonkers D M, *et al.* Alterations in mucosal neuropeptides in patients with irritable bowel syndrome and ulcerative colitis in remission: A role in pain symptom generation? [J]. *Eur J Pain*, 2013, 17(9): 1299-1306.

[17] Chua Y C, Aziz Q. Perception of gastro-oesophageal reflux[J]. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2010, 24(6): 883-891.

[18] Matsumoto K, Kurosawa E, Terui H, *et al.* Localization of TRPV1 and contractile effect of capsaicin in mouse large intestine: high abundance and sensitivity in rectum and distal colon[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2009, 297(2): G348-G360.

[19] De-Schepper H U, De-Winter B Y, Van-Nassauw L, *et al.* TRPV1 receptors on unmyelinated C-fibres mediate colitis-induced sensitization of pelvic afferent nerve fibres in rats[J]. *J Physiol*, 2008, 586(Pt 21): 5247-5258.

[20] Chi Y, Liu X G, Wang H H, *et al.* Effect of the 5-HT₄ receptor and serotonin transporter on visceral hypersensitivity in rats[J]. *Braz J Med Biol Res*, 2012, 45(10): 948-954.

[21] Nozawa K, Kawabata-Shoda E, Doihara H, *et al.* TRPA1 regulates gastrointestinal motility through serotonin release from enterochromaffin cells[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(9): 3408-3413.

[22] Fernandes E S, Fernandes M A, Keeble J E. The functions of TRPA1 and TRPV1: moving away from sensory nerves[J]. *Br J Pharmacol*, 2012, 166(2): 510-521.

[23] Staruschenko A, Jeske N A, Akopian A N. Contribution of TRPV1-TRPA1 interaction to the single channel properties of the TRPA1 channel[J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(20): 15167-15177.

(收稿:2013-07-10;修回:2013-09-22)

(编辑 龙亮)