

· 短篇论著 ·

同型半胱氨酸对溃疡性结肠炎患者肠黏膜通透性的影响

刘晓昌 梅俏 黄健 丁浩 许建明 何桂珍 王佳佳

溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 是一种慢性非特异性肠道炎症性疾病, 属于炎症性肠病 (inflammatory bowel disease, IBD), 病因和发病机制尚不完全明确。研究表明, IBD 患者结肠黏膜及血浆中同型半胱氨酸 (Hcy) 水平增加, 可能在 IBD 发病机制中有重要作用^[1]。Hcy 水平增加可诱发、加重 IBD 患者微血管内皮细胞和肠黏膜的炎症反应^[2-3]。

IBD 患者肠黏膜通透性增高, 肠道高通透性参与 IBD 的发病, 并且在慢性持续黏膜炎症反应中起重要作用, 可能是 IBD 反复发作迁延不愈的重要原因。Hcy 是否影响 UC 患者的肠黏膜通透性尚不明确。研究显示, Hcy 可通过上调基质金属蛋白酶 (MMP), 导致血管内皮细胞屏障功能障碍, 微血管通透性增加^[4]; 是否可通过激活 MMP, 增加肠黏膜的通透性尚不明确。因此, 本研究采用高效液相色谱法 (high performance liquid chromatography, HPLC) 检测 60 例 UC 患者和 10 例健康对照者血浆 Hcy 水平和肠黏膜通透性, 探讨 Hcy 对 UC 患者肠黏膜通透性的影响及机制。

一、对象与方法

1. 研究对象: (1) UC 患者: 纳入标准: 年龄 16 ~ 70 岁; 符合 2012 年中华医学会消化病学分会炎症性肠病学组制定的《炎症性肠病诊断与治疗的共识意见》的 UC 诊断标准^[5]; 无全结肠镜检查禁忌证。排除标准: 合并严重并发症; 肠道感染; 孕期及哺乳期; 心、肺及其他严重疾病或不能合作者。采用经典的 Truelove-Witts 标准^[5]判断 UC 严重程度。(2) 健康对照者: 既往无慢性疾病、自身免疫病、遗传性疾病家族史及肿瘤等病史, 检测前 1 个月内无其他胃肠道疾病及服药史。

2. 试剂和设备: 乳果糖测试液、甘露醇测试液、Hcy 标准品 (美国 Sigama 公司)、MMP-2 和 MMP-9 ELISA 试剂盒 (美国 R & D 公司)、高效液相色谱仪 (HPLC-PED, 美国 DIONEX 公司)、高效液相荧光色谱仪 (HPLC-FD, 日本岛津公司)、酶标仪 (Elx800, 美国 Bio-Tek 公司)、荧光分光光度计 (F4600, 日本 Hitachi 公司)。

3. 检测方法: (1) 肠黏膜通透性检测: 采用尿液乳果糖/

甘露醇比值 (L/M) 进行评价。空腹 8 h 的 UC 患者和对照者排空尿液后, 口服测试液 50 ml (乳果糖口服液 15 ml, 20% 甘露醇溶液 25 ml, 生理盐水 10 ml), 之后禁水 1 h, 禁食 2 h, 收集口服测试液后 6 h 内的全部尿液, 取其中 40 ml 处理后 -80℃ 保存待检测。采用带脉冲电化学检测器的高效液相色谱仪检测尿液中乳果糖和甘露醇含量, 计算 L/M。(2) 血浆 Hcy 检测: 空腹采集 UC 患者及对照者外周血 4 ml, 分离血浆, -80℃ 保存待检测。采用带荧光检测器的高效液相荧光色谱仪检测血浆 Hcy 水平。(3) 血浆 MMP-2、MMP-9 含量检测: 空腹采集 UC 患者及对照者外周血 4 ml, 4℃ 过夜, 分离血浆, -80℃ 保存待测, 按 ELISA 试剂盒说明书检测血浆中 MMP-2 和 MMP-9 酶活性。

4. 统计学方法: 采用 SPSS 11.5 统计软件处理数据。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 *t* 检验; 计数资料以例数 (百分率) 表示, 以卡方检验进行分析; Hcy 水平、MMP-2、MMP-9 与肠黏膜通透性改变的相关性分析采用 Spearman 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

二、结果

1. 一般资料: UC 患者 60 例, 男 32 例, 女 28 例, 年龄 (41.0 ± 13.8) 岁; 活动期患者 57 例, 缓解期患者 3 例; 活动期 UC 患者严重程度分级: 轻度 12 例, 中度 23 例, 重度 22 例。正常对照组 10 例, 男 5 例, 女 5 例, 年龄 (41.7 ± 11.6) 岁。2 组的年龄及性别分布的差异无统计学意义。

2. 肠黏膜通透性: UC 患者肠黏膜通透性明显增高, 其尿液 L/M 值为 0.081 ± 0.068, 较对照者显著升高 (0.020 ± 0.002, P = 0.001)。

3. 血浆 Hcy 水平、MMP-2 和 MMP-9 含量: UC 组患者血浆 Hcy、MMP-2、MMP-9 水平均明显高于对照组 (表 1)。MMP-2、MMP-9 含量与 Hcy 水平变化趋势一致, 相关系数分别为 0.666 (P = 0.001)、0.557 (P = 0.007)。

表 1 两组 Hcy、MMP-2、MMP-9 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	Hcy (μmol/L)	MMP-2 (μg/L)	MMP-9 (μg/L)
溃疡性结肠炎组	60	52.42 ± 22.24 ^a	6.13 ± 2.73 ^b	7.65 ± 3.19 ^b
对照组	10	8.01 ± 2.42	3.83 ± 1.63	4.93 ± 1.61

注: Hcy: 同型半胱氨酸; MMP: 基质金属蛋白酶; 与对照组比较, ^aP < 0.001, ^bP < 0.05

4. UC 患者血浆 Hcy 水平与肠黏膜通透性相关分析: UC 患者血浆 Hcy 水平与 L/M 呈正相关 (r = 0.697, P = 0.001), 见图 1。

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0578-1426.2014.04.014

作者单位: 230022 合肥, 安徽医科大学第一附属医院消化科 安徽省消化系病重点实验室 (刘晓昌、梅俏、黄健、丁浩、许建明); 中国医学科学院 北京协和医学院 北京协和医院肠外肠内营养科 (何桂珍); 安徽医科大学药理研究所 (王佳佳)

通信作者: 梅俏, Email: meiqiaomq@aliyun.com

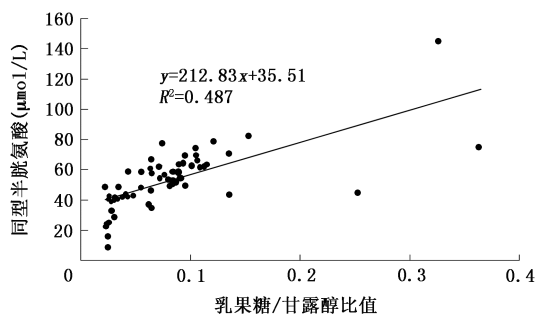


图 1 60 例溃疡性结肠炎患者血浆同型半胱氨酸 (Hcy) 水平与乳果糖/甘露醇比值的相关性分析

讨论 Hcy 是一种含硫氨基酸, 血浆 Hcy 水平主要受叶酸、维生素 B₁₂ 水平及主要相关代谢酶的遗传多态性影响。Hcy 水平升高易导致各种心、脑血管疾病, 包括动脉粥样硬化、冠状动脉疾病和血管性痴呆等, 是慢性炎症和退行性疾病的危险因素。发病机制可能与 Hcy 激活金属蛋白酶, 抑制组织金属蛋白酶抑制剂, 引起微血管内皮细胞通透性改变有关。另一方面, Hcy 通过氧化应激损伤血管内皮细胞和组织上皮细胞。

UC 患者血浆和肠黏膜 Hcy 水平明显高于正常人^[1-2,6]。高 Hcy 血症与 UC 患者肠血管内皮细胞损伤、肠系膜血管血栓形成关系密切^[3]。研究还发现, Hcy 水平增加可诱发、加重患者微血管内皮细胞和肠黏膜的炎症反应^[2-3], 而肠黏膜炎症反应中的大量促炎性介质、细胞因子和氧自由基等可直接或间接损伤肠黏膜上皮细胞, 使上皮细胞的完整性破坏, 肠黏膜通透性增加。肠黏膜通透性增加又可诱发和/或加重肠黏膜炎症反应和免疫反应, 增加促炎性介质等, 从而导致炎症反应和组织损伤之间形成恶性循环。本研究显示, UC 患者血浆 Hcy 水平、L/M 值明显增高, 并且血浆 Hcy 水平与 L/M 呈正相关, 提示 Hcy 水平增高可能与肠黏膜通透性增加有关。

MMP 可能在 Hcy 引起肠黏膜通透性增加中发挥重要作用^[5,7]。其中 MMP-2 和 MMP-9 是一类依赖锌和钙的内肽酶, 能够降解细胞外基质, 参与细胞外基质的重塑过程。研究表明, Hcy 可激活 MMP-2 和 MMP-9, 减少钙黏蛋白, 闭合小环蛋白-1 等内皮细胞连接蛋白表达, 增加肠道微血管内皮细胞层 (HIMEC) 和跨细胞通透性。抑制 MMP-9 活性可降低跨细胞通透性^[5,7]。在本研究中, UC 患者血浆 MMP-2 和 MMP-9 含量增加, 与 Hcy 水平变化及 L/M 变化一致, 提示 Hcy 可能通过 MMP-2 和 MMP-9 损伤肠黏膜上皮细胞, 开放上皮细胞紧密连接, 增加肠黏膜上皮细胞的细胞旁通透性。

Büning 等^[8]的研究显示, UC 患者肠黏膜通透性改变与患者病情分期、病变范围等有关, 活动期及全结肠 UC 患者肠黏膜通透性较对照组明显增高。Drzewoski 等^[3]的研究显示, 活动期 UC 患者血浆 Hcy 水平高于缓解期患者

[(11.2 ± 3.5) mmol/L 比 (9.0 ± 2.3) mmol/L, P = 0.048], 血浆 Hcy 水平和疾病持续时间具有良好的相关性 (r = 0.663, P < 0.05)。但有学者认为, UC 患者血浆 Hcy 水平与病情分期、病变程度及病变范围无关^[6,9], 遗传因素 (MTR 2756G 等位基因等)、叶酸和维生素 B₁₂ 等营养因素则可影响 Hcy 水平^[10]。本研究显示, UC 患者血浆 Hcy 水平升高, 肠黏膜通透性增加; Hcy 可能通过增加 MMP-2、MMP-9 含量损伤肠黏膜上皮细胞, 开放细胞紧密连接, 参与肠黏膜通透性调节; Hcy 水平与肠黏膜通透性间具有较好的相关性, 提示 Hcy 水平可能与病情分期等临床指标有关, 但由于纳入研究的缓解期 UC 患者仅有 3 例, 未再进一步行相关性分析。目前国内外对 Hcy 和临床指标间的相关性研究结果不一, 进一步的研究需要扩大 UC 患者样本数。

参 考 文 献

- [1] Erzin Y, Uzun H, Celik AF, et al. Hyperhomocysteinemia in inflammatory bowel disease patients without past intestinal resections: correlations with cobalamin, pyridoxine, folate concentrations, acute phase reactants, disease activity, and prior thromboembolic complications [J]. J Clin Gastroenterol, 2008, 42: 481-486.
- [2] Danese S, Sgambato A, Papa A, et al. Homocysteine triggers mucosal microvascular activation in inflammatory bowel disease [J]. Am J Gastroenterol, 2005, 100: 886-895.
- [3] Drzewoski J, Gasiorowska A, Malecka-Panas E, et al. Plasma total homocysteine in the active stage of ulcerative colitis [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2006, 21: 739-743.
- [4] Miyazono Y, Gao F, Horie T. Oxidative stress contributes to methotrexate-induced small intestinal toxicity in rats [J]. Scand J Gastroenterol, 2004, 39: 1119-1127.
- [5] 中华医学会消化病学分会炎症性肠病学组. 炎症性肠病诊断与治疗的共识意见 (2012 年. 广州) [J]. 中华内科杂志, 2012, 51: 818-831.
- [6] Chen M, Mei Q, Xu J, et al. Detection of melatonin and homocysteine simultaneously in ulcerative colitis [J]. Clin Chim Acta, 2012, 413: 30-33.
- [7] Munjal C, Tyagi N, Lominadze D, et al. Matrix metalloproteinase-9 in homocysteine-induced intestinal microvascular endothelial paracellular and transcellular permeability [J]. J Cell Biochem, 2012, 113: 1159-1169.
- [8] Büning C, Geissler N, Prager M, et al. Increased small intestinal permeability in ulcerative colitis: rather genetic than environmental and a risk factor for extensive disease? [J]. Inflamm Bowel Dis, 2012, 18: 1932-1939.
- [9] Vagianos K, Bernstein CN. Homocysteinemia and B vitamin status among adult patients with inflammatory bowel disease: a one-year prospective follow-up study [J]. Inflamm Bowel Dis, 2012, 18: 718-724.
- [10] Jiang Y, Xia X, Wang W, et al. Hyperhomocysteinemia and related genetic polymorphisms correlate with ulcerative colitis in Chinese Han population in Central China [J]. Cell Biochem Biophys, 2012, 62: 203-210.

(收稿日期: 2013-12-06)

(本文编辑: 沈志伟)