

# 嗜酸乳杆菌对感染人轮状病毒乳鼠肠黏膜的保护作用

高源, 张振, 王宝香, 鲍连生, 彭罕鸣

高源, 王宝香, 彭罕鸣, 武汉市妇女儿童医疗保健中心消化科 湖北省武汉市 430016

张振, 鲍连生, 武汉市妇女儿童医疗保健中心检验科 湖北省武汉市 430016

作者贡献分布: 高源与张振对此文所作贡献均等; 此课题由高源与张振设计; 彭罕鸣主任指导; 研究过程由高源、张振、王宝香及鲍连生操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由张振提供; 数据分析由高源、王宝香完成; 本论文写作由高源、张振完成。

通讯作者: 张振, 副主任技师, 430016, 湖北省武汉市, 武汉市妇女儿童医疗保健中心检验科. zhangzhen20092010@yahoo.cn  
电话: 027-82433425

收稿日期: 2011-07-02 修回日期: 2011-10-02

接受日期: 2011-10-06 在线出版日期: 2011-10-08

## Protective effect of *Lactobacillus acidophilus* on intestinal mucosa of neonatal mice infected with a human rotavirus

Yuan Gao, Zhen Zhang, Bao-Xiang Wang,  
Lian-Sheng Bao, Han-Ming Peng

Yuan Gao, Bao-Xiang Wang, Han-Ming Peng, Department of Gastroenterology, Wuhan Women and Children's Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430016, Hubei Province, China

Zhen Zhang, Lian-Sheng Bao, Department of Medical Laboratory, Wuhan Women and Children's Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430016, Hubei Province, China

Correspondence to: Zhen Zhang, Associate Chief Technician, Department of Medical Laboratory, Wuhan Women and Children's Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430016, Hubei Province, China. zhangzhen20092010@yahoo.cn

Received: 2011-07-02 Revised: 2011-10-02

Accepted: 2011-10-06 Published online: 2011-10-08

## Abstract

**AIM:** To investigate the possible protective effect of *Lactobacillus acidophilus* (*L.acidophilus*) on intestinal mucosa of neonatal mice infected with a human rotavirus (HRV).

**METHODS:** Sixty 4-day-old Kunming mice were randomly and equally divided into control group, HRV-infected group, *L.acidophilus*-pretreated group (treated before HRV infection) and *L.acidophilus*-treated group (treated after HRV infection). The symptoms in these mice

were observed each day for 8 d. On day 8, nine mice of each group were sacrificed by cervical dislocation. Caecum samples were taken for bacterial isolation and culture to count bacterial colonies. Secretory IgA (sIgA) from the intestinal mucosa and serum interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) and tumor necrosis factors- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) were detected by ELISA. The thickness of intestinal mucosa, height of villus and depth of crypt were measured using Image-Pro Plus 5.1 software.

**RESULTS:** The mice in the normal control group did not suffer from diarrhea, whereas the HRV-infected group showed altered intestinal flora, decreased level of intestinal sIgA, increased serum IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  levels, and damaged intestinal mucosal barrier. Compared to the HRV-infected group, mice of the *L.acidophilus*-pretreated and -treated groups showed some amelioration in intestinal flora, intestinal sIgA, serum IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ , and intestinal mucosal barrier. More obvious protective effect on intestinal mucosa was observed in the pretreatment group than in the treatment group.

**CONCLUSION:** *L.acidophilus* possesses protective effect on intestinal mucosa of HRV-infected neonatal mice. Pretreatment with *L.acidophilus* has better protective effect than *L.acidophilus* treatment.

**Key Words:** Human rotavirus; *L.acidophilus*; Neonatal mice; Intestinal mucosa

Gao Y, Zhang Z, Wang BX, Bao LS, Peng HM. Protective effect of *Lactobacillus acidophilus* on intestinal mucosa of neonatal mice infected with a human rotavirus. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 19(28): 2963-2969

## 摘要

**目的:** 观察嗜酸乳杆菌(*L.acidophilus*)对感染人轮状病毒(human rotavirus, HRV)乳鼠肠黏膜的保护作用。

**方法:** 将60只昆明种乳鼠随母鼠按窝随机均分为4组, 给4日龄的乳鼠灌服HRV作为感染组, 灌服HRV的前和后灌服*L.acidophilus*作为

## ■背景资料

嗜酸乳杆菌(*L.acidophilus*)等益生菌是肠道内的正常菌群, 可以维护肠道正常的结构及功能, 具有免疫调节、抗感染等作用。*L.acidophilus*是近几年用于小儿轮状病毒(HRV)腹泻治疗的新型益生菌制剂, 但目前报道的治疗效果不太一致, 且*L.acidophilus*的使用剂量和使用方法也不明确。

## ■同行评议者

邢建峰, 副教授, 西安交通大学医学院

## ■研究前沿

*L.acidophilus*已被用于HRV腹泻的治疗,并被部分研究证实有一定的效果,但其具体的作用机制仍不清楚。

预防组和治疗组,正常对照组灌服同剂量的MEM Eagle细胞培养液。在实验的第8天下午杀死每组9只乳鼠,取乳鼠盲肠内容物分离培养后,进行菌群分析;ELISA法检测肠黏膜分泌性免疫球蛋白(SIgA)、血清干扰素- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )和肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ );HE法染色乳鼠小肠黏膜切片,利用Image-Pro Plus 5.1图像软件分析各组乳鼠小肠黏膜厚度、绒毛高度和隐窝深度。

**结果:**与正常对照组比较,HRV感染组乳鼠出现了肠道菌群失调、肠黏膜SIgA下降、血清IFN- $\gamma$ 和TNF- $\alpha$ 上升、肠黏膜机械屏障受损,预防组和治疗组乳鼠肠道菌群失调、肠黏膜免疫力下降和肠黏膜机械屏障受损的情况均得到了改善。预防组与治疗组相比,前者对乳鼠肠黏膜受损的保护作用效果更好。

**结论:***L.acidophilus*对感染HRV乳鼠肠黏膜有一定的保护作用,感染前灌服*L.acidophilus*的保护效果好于感染后灌服。

**关键词:**轮状病毒;嗜酸乳杆菌;乳鼠;肠黏膜

高源,张振,王宝香,鲍连生,彭罕鸣.嗜酸乳杆菌对感染人轮状病毒乳鼠肠黏膜的保护作用.世界华人消化杂志 2011; 19(28): 2963-2969  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2963.asp>

## 0 引言

人轮状病毒(human rotavirus, HRV)是婴幼儿非细菌性腹泻的主要病毒性病原。国内部分地区近期统计:天津市住院腹泻患儿中HRV阳性检出率为37.53%<sup>[1]</sup>;重庆儿童医院就诊的非细菌性急性腹泻婴幼儿大便轮状病毒检测阳性率为50.69%,高峰月份在11-12月,分别为63.27%和62.16%<sup>[2]</sup>;张昕等<sup>[3]</sup>统计我国5岁及以下儿童占人群其他感染性腹泻病例总数的50.98%,病原学诊断90.65%为病毒性,病毒性感染性腹泻以HRV(92.75%)感染为主。虽然婴幼儿HRV感染率很高,但至今尚无理想的HRV感染预防疫苗和特效治疗药物。益生菌可通过激发机体免疫系统中的树突状细胞,增强宿主的免疫防御功能,并可高效定植于肠黏膜上皮细胞,从而抑制多种病原体在肠道上皮细胞上的定植,益生菌也可产生一些小分子蛋白质P40和P70等,这类蛋白质能减轻过H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>对肠道上皮细胞的氧化伤害<sup>[4-7]</sup>。虽然目前有一些应用益生菌治疗多种腹泻的研究报道,但我们仍然没有完全了解益

生菌复杂的作用机制,通过对益生菌的深入研究,能使其更好地为我们服务。我们先前探讨过*L.acidophilus*对乳鼠感染HRV的预防和治疗作用<sup>[8]</sup>,但未深入研究*L.acidophilus*对感染HRV乳鼠肠黏膜的保护作用。本文我们进一步探讨*L.acidophilus*对感染HRV乳鼠肠黏膜生物屏障、免疫屏障和机械屏障的保护作用,结果报告如下。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** HRV Wa毒株,由中国预防医学科学院病毒研究所提供,用于病毒增殖和测定的细胞为MA104细胞(非洲绿猴胎肾细胞传代细胞系)。MA104细胞在MEM Eagle培养液中生长和传代,采用空斑形成法滴定病毒的感染滴度,待病毒滴度达到10<sup>7</sup>空斑形成单位(plaque forming unit, pfu)时行动物实验。嗜酸乳杆菌:*L.acidophilus* 1.1878购自中国科学院微生物研究所菌种库,实验时配成10<sup>8</sup> cfu/mL的菌液,经口灌服。实验动物:购自武汉大学动物实验中心,SPF级昆明种乳鼠60只,孕晚期购回,乳鼠自然娩出,实验选择雌雄各半的小鼠,体质量2.20 g±0.94 g,小鼠饲养于有空气过滤膜的鼠笼内。动物使用许可证:SYXK(鄂)2008-0013。实验前成年鼠大便HRV抗原均为阴性。肠球菌培养基(EC)、肠杆菌培养基(EMB)、双歧杆菌培养基(TPY)、乳酸杆菌培养基(LBS)均购自青岛海博技术有限公司;SIgA试剂购自Sigma公司;IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 试剂购自上海森雄科技实业有限公司;Ringer缓冲液购自OXOID公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 实验分组及*L.acidophilus*干预方法:**实验选用60只乳鼠(雌雄各30只),随母鼠按窝均分为4组:正常对照组、HRV感染组、*L.acidophilus*预防组、*L.acidophilus*治疗组,每组15只。HRV感染组按照参考文献<sup>[9,10]</sup>的方法建立乳鼠感染HRV模型,即乳鼠出生的第4天上午用改良的1 mL注射器经口灌服(自然吸吮法)50  $\mu$ L HRV液(3×10<sup>6</sup> pfu/mL);*L.acidophilus*预防组出生后第1天起,每天灌服50  $\mu$ L *L.acidophilus*(10<sup>8</sup> cfu/mL),连续3 d,第4天灌服50  $\mu$ L HRV液(3×10<sup>6</sup> pfu/mL);*L.acidophilus*治疗组第4天灌服50  $\mu$ L HRV液(3×10<sup>6</sup> pfu/mL),1 h后,灌服50  $\mu$ L *L.acidophilus*,次日日起每天灌服50  $\mu$ L *L.acidophilus*,连续4 d。正常对照组出生后第4天灌服50  $\mu$ L细胞培养液。

**1.2.2 临床观察及乳鼠大便HRV抗原检测:**从第

表 1 乳鼠腹泻、死亡数及大便HRV抗原阳性天数 (mean  $\pm$  SD,  $n = 15$ )

分组	腹泻鼠( $n$ )	死亡鼠( $n$ )	时间(d)	
			腹泻	HRV抗原阳性
正常对照组	0	0	0.00	0.00
HRV感染组	15	6	4.20 $\pm$ 0.37	3.88 $\pm$ 0.54
<i>L.acidophilus</i> 预防组	2	0	1.74 $\pm$ 0.38 <sup>b</sup>	1.15 $\pm$ 0.26 <sup>b</sup>
<i>L.acidophilus</i> 治疗组	4	2	2.17 $\pm$ 0.32 <sup>b</sup>	1.32 $\pm$ 0.38 <sup>b</sup>

<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 感染组.

4天开始, 每天2次(早晚各1次), 观察乳鼠的腹泻情况, 计数乳鼠死亡数量. 按试剂说明书用ELISA方法检测乳鼠大便HRV抗原. 腹泻的判断分为6级: 1级为无大便; 2级为黄色成型便; 3级为黄色糊状便; 4级为黄色水样黏液便; 5级为黄色蛋汤样便; 6级为完全黄色水样便. 3级(黄色糊状便)及以上的才判断为腹泻, 3、4、5级腹泻为轻型, 6级为重型.

1.2.3 乳鼠盲肠内容物菌群分析: 实验过程的第8天下午, 断头处死每组9只乳鼠, 取盲肠内新鲜粪便0.1 g置于9 mL含半胱氨酸的Ringer稀释液内, 搅拌混匀, 并制成浓度为 $10^{-2}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-8}$  g/mL的4种混悬液, 各取0.1 mL分别接种于肠杆菌选择性培养基(EMB)、肠球菌选择性培养基(EC)、乳酸杆菌选择性培养基(LBS)、双歧杆菌选择性培养基(TPY)中, 每个稀释度接种3个平板. 接种后, EMB、EC置于37 °C需氧培养18-24 h, LBS、TPY置于37 °C厌氧培养48-72 h, 培养后以菌落形态、Gram染色镜检、生化反应等鉴定菌落并计数每个平板上目的菌的菌落个数, 计算每克粪便的菌落形成单位(colony forming unit, cfu),  $\text{cfu} = \text{菌落数} \times 10^n \times 10$  ( $n$ 为相应的稀释度, 10为换算系数), 结果用相应的对数值表示.

1.2.4 乳鼠肠黏膜SigA测定: 取乳鼠幽门下5 cm至回盲部约10 cm小肠段, 平铺于滤纸上, 纵行剪开, 无菌PBS反复冲洗肠腔表面后, 用载玻片轻刮黏膜表面黏液, 收集于1.5 mL无菌Eppendorf管内, -70 °C保存待测. 等所有标本采集完毕, 取出复溶, 取上清液及标准品, 按试剂盒操作, 用ELISA方法检测SigA.

1.2.5 乳鼠血清IFN- $\gamma$ 和TNF- $\alpha$ 检测: 断头处死乳鼠后取血2-3 mL, 4 °C, 2 500 r/min离心10 min, 吸取血清. 按试剂盒操作, 用ELISA方法检测IFN- $\gamma$ 和TNF- $\alpha$ 的吸光度值, 制作标准曲线并计算出IFN- $\gamma$ 和TNF- $\alpha$ 的含量.

1.2.6 乳鼠小肠黏膜厚度、绒毛高度和隐窝深度测量: 取每组9只乳鼠小肠段2 cm, 10%甲醛固定制成石蜡切片, 每只2张, 共18张, HE染色, 用Image-Pro Plus 5.1图像软件测量所有乳鼠小肠的黏膜厚度、绒毛高度和隐窝深度, 并计算绒毛高度与隐窝深度的比值(绒毛高度/隐窝深度).

统计学处理 各组数据以mean  $\pm$  SD表示, 采用SPSS13.0统计软件对数据进行 $t$ 检验和方差分析,  $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

## 2 结果

2.1 临床观察及乳鼠大便HRV抗原检测结果 正常对照组乳鼠全过程未见腹泻, 精神良好, 活动正常, 皮肤无皱褶, 无死亡, 死亡率为0%. HRV感染组乳鼠在第4-8天出现明显腹胀, 精神倦怠, 活动减少, 第4-8天排出淡黄色稀水样便, 腹泻率达100%, 其中轻型腹泻4只, 重型腹泻11只, 至第8天死亡6只, 死亡率为40.0%. *L.acidophilus*预防组乳鼠的腹泻数仅2只, 且都为轻型腹泻, 乳鼠精神状态与感染组相比明显好转, 至第8天死亡率为0%. *L.acidophilus*治疗组乳鼠有4只腹泻, 精神状态与感染组相比也有好转, 至第8天死亡率为13.33%. 与HRV感染组相比较, 预防组和治疗组腹泻持续天数及HRV阳性天数明显缩短( $P < 0.01$ ). 预防组和治疗组之间腹泻持续时间及HRV阳性时间没有统计学差异. 总体而言预防组的临床表现好于治疗组(数据剔除死亡乳鼠)(表1).

2.2 乳鼠盲肠内容物菌群分析 除HRV感染组肠杆菌减少外(与对照组比较 $P < 0.05$ ), 其他3组肠杆菌差异无统计学意义; 4组肠球菌差异也无统计学意义; HRV感染组乳酸杆菌和双歧杆菌数量明显低于其他3组( $P < 0.01$ ); 治疗组乳酸杆菌和双歧杆菌数量与正常对照组相比, 差异无统计学意义; 预防组的双歧杆菌数量与正常对照组相比, 差异无统计学意义, 但乳酸杆菌数量差

## ■相关报道

石海砚等发现 *L.acidophilus* 对感染HRV的乳鼠有免疫保护作用, 其机制可能与抑制白细胞黏附分子-1, 增强IFN- $\gamma$ 的表达有关.



## ■创新盘点

本文应用*L.acidophilus*干预感染HRV乳鼠,从肠黏膜屏障(生物屏障、机械屏障与免疫屏障)功能水平探讨了*L.acidophilus*对感染HRV乳鼠的保护作用。

表 2 乳鼠盲肠内容物活菌计数结果 (lgcfu/g, mean  $\pm$  SD,  $n = 9$ )

分组	肠杆菌	肠球菌	双歧杆菌	乳酸杆菌
正常对照组	4.26 $\pm$ 0.62	5.13 $\pm$ 0.38	6.19 $\pm$ 0.51	6.12 $\pm$ 0.58
HRV感染组	3.32 $\pm$ 0.38 <sup>a</sup>	4.65 $\pm$ 0.63	4.28 $\pm$ 0.47 <sup>b</sup>	4.22 $\pm$ 0.66 <sup>b</sup>
<i>L.acidophilus</i> 预防组	4.04 $\pm$ 0.48	4.92 $\pm$ 0.27	5.76 $\pm$ 0.44 <sup>d</sup>	7.25 $\pm$ 0.56 <sup>ade</sup>
<i>L.acidophilus</i> 治疗组	3.78 $\pm$ 0.45	4.77 $\pm$ 0.34	5.41 $\pm$ 0.67 <sup>d</sup>	5.96 $\pm$ 0.74 <sup>d</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 正常对照组; <sup>d</sup> $P < 0.01$  vs 感染组; <sup>e</sup> $P < 0.05$  vs 治疗组。

表 3 乳鼠肠黏膜SIgA及血清IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 测定结果(mean  $\pm$  SD,  $n = 9$ )

分组	SIgA( $\mu$ mol/L)	IFN- $\gamma$ (pg/mL)	TNF- $\alpha$ (pg/mL)
正常对照组	1.08 $\pm$ 0.46	27.16 $\pm$ 3.87	75.31 $\pm$ 10.28
HRV感染组	0.62 $\pm$ 0.18 <sup>b</sup>	37.54 $\pm$ 5.66 <sup>b</sup>	90.45 $\pm$ 16.13 <sup>a</sup>
<i>L.acidophilus</i> 预防组	2.27 $\pm$ 0.62 <sup>bde</sup>	45.21 $\pm$ 4.21 <sup>bde</sup>	73.36 $\pm$ 8.67 <sup>c</sup>
<i>L.acidophilus</i> 治疗组	1.68 $\pm$ 0.71 <sup>ad</sup>	39.36 $\pm$ 6.12 <sup>b</sup>	81.06 $\pm$ 9.14 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 正常对照组; <sup>d</sup> $P < 0.01$  vs 感染组; <sup>e</sup> $P < 0.05$  vs 治疗组。

表 4 各组乳鼠小肠黏膜厚度、绒毛高度和隐窝深度IPP5.1测量结果 (mean  $\pm$  SD,  $n = 9$ )

分组	黏膜厚度( $\mu$ m)	绒毛高度( $\mu$ m)	隐窝深度( $\mu$ m)	绒毛高度/隐窝深度
正常对照组	332 $\pm$ 32.4	308 $\pm$ 24.2	35 $\pm$ 2.4	8.8 $\pm$ 0.62
HRV感染组	324 $\pm$ 28.1	294 $\pm$ 36.5	43 $\pm$ 3.6 <sup>a</sup>	6.8 $\pm$ 0.83 <sup>b</sup>
<i>L.acidophilus</i> 预防组	338 $\pm$ 40.3	312 $\pm$ 40.2	36 $\pm$ 4.2 <sup>c</sup>	8.7 $\pm$ 0.46 <sup>d</sup>
<i>L.acidophilus</i> 治疗组	326 $\pm$ 33.5	302 $\pm$ 38.4	35 $\pm$ 3.3 <sup>c</sup>	8.6 $\pm$ 0.71 <sup>d</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 正常对照组; <sup>c</sup> $P < 0.05$ , <sup>d</sup> $P < 0.01$  vs 感染组。

异有统计学意义( $P < 0.05$ ); 与治疗组相比, 预防组乳酸杆菌( $P < 0.05$ )恢复得更快(表2)。

2.3 乳鼠肠黏膜SIgA测定 HRV感染组与正常组比较, SIgA明显下降( $P < 0.01$ ), IFN- $\gamma$ 和TNF- $\alpha$ 都有不同程度的上升; 预防组和治疗组乳鼠肠黏膜SIgA、血清IFN- $\gamma$ 及TNF- $\alpha$ 都恢复到了正常水平, 而且预防组肠黏膜SIgA、血清IFN- $\gamma$ 明显高于正常对照组( $P < 0.01$ ); 预防组与治疗组相比肠黏膜SIgA、血清IFN- $\gamma$ 升高明显( $P < 0.05$ ), 表明预防组对HRV的免疫应答效果更好(表3)。

2.4 乳鼠小肠黏膜厚度、绒毛高度和隐窝深度测量 4组乳鼠肠黏膜厚度基本无差异, 绒毛高度差别也不大, 但隐窝深度有差别, HRV感染组低于其他3组( $P < 0.05$ ); 绒毛高度/隐窝深度也有明显差别, HRV感染组与其他3组相比, 差异有统计学意义( $P < 0.01$ ), 表明*L.acidophilus*能够帮助感染HRV乳鼠肠黏膜隐窝深度及绒毛高度/隐窝

深度恢复到正常水平(表4)。

### 3 讨论

HRV感染组15只乳鼠在感染HRV的第2天全部出现腹泻症状, 大便HRV病毒抗原检测全为阳性, 检测感染组中的6只乳鼠小肠HRV结构蛋白VP7基因全为阳性, 病理切片显示乳鼠小肠黏膜上皮细胞出现广泛的空泡样变性, 感染HRV乳鼠全都出现了肠黏膜受损的情况<sup>[8]</sup>。这表明我们建立的HRV感染乳鼠模型是成功的。

肠黏膜屏障主要由3部分组成: 正常微生物形成的生物屏障、免疫球蛋白(SIgA为主)和免疫因子(IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 等)形成的免疫屏障以及完整的肠黏膜结构形成的机械屏障<sup>[11-13]</sup>。在营养不良、创伤、严重感染等情况下, 肠黏膜屏障可能会被破坏, 继而会导致肠道菌群失调、病原体黏附和入侵、内毒素入血等一系列严重症状, 甚至可发展为全身性炎症反应综合征(systemic

inflammatory response syndrome, SIRS)和多器官功能衰竭综合征(multiple organs deficiency syndrome, MODS)<sup>[14]</sup>.因此,在某些疾病可能导致肠黏膜屏障破坏的早期,采取有效措施保护肠黏膜屏障功能,有助于控制病情<sup>[15]</sup>.

生物屏障由定植于肠黏膜表面的常驻菌群形成.正常情况下,肠黏膜表面生长着大量的厌氧菌(乳酸杆菌、双歧杆菌等),他们可通过黏附作用与肠上皮细胞紧密结合,有序定植于肠上皮表面,形成菌膜.这种菌膜一方面起占位性保护作用,另一方面可产生H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>等物质,抑制病原菌黏附和生长繁殖.此外,乳酸杆菌还可促进受损肠黏膜修复,防止致病菌在肠上皮细胞间易位,产生短链脂肪酸、乳酸等营养成分<sup>[16-19]</sup>.本实验中的乳鼠感染HRV后,肠黏膜中的乳酸杆菌、双歧杆菌显著减少,需氧菌相对增多,导致菌群紊乱,肠黏膜生物屏障受损.*L.acidophilus*是乳酸杆菌中比较重要的一大类,他们定植于肠道内,可阻止致病菌或病毒对黏膜细胞的侵入,促进肠道内正常菌群的生长繁殖,对引起急慢性腹泻的多种致病菌和病毒均有抑制作用<sup>[20,21]</sup>.本实验结果显示,感染HRV乳鼠灌服*L.acidophilus*后,肠道菌群完全恢复正常,提示*L.acidophilus*不仅能补充乳酸杆菌数量,还能刺激双歧杆菌等其他益生菌增殖,同时抑制需氧菌(肠杆菌、肠球菌等)的生长,使肠道菌群失衡得到改善.我们的实验还显示,在HRV感染前灌服*L.acidophilus*比感染后灌服更有利于保持肠道常驻菌群的稳定,提示*L.acidophilus*在乳鼠肠道感染HRV前灌服的效果好于感染后治疗.

肠黏膜免疫屏障是由多种免疫成分组成的.肠黏膜SIgA是黏膜表面主要的体液免疫成分,是防御病原体在黏膜黏附和定植的重要防线.SIgA可抑制细菌或病毒黏附在肠上皮表面,抑制病毒的装配和在细胞间的释放,对减少病毒在黏膜上的复制起着重要的作用<sup>[22,23]</sup>.本实验显示,乳鼠感染HRV后,SIgA分泌减少,在灌服*L.acidophilus*后,肠黏膜SIgA分泌显著增加,提示*L.acidophilus*是刺激感染HRV乳鼠肠黏膜SIgA分泌增加的有效诱因.另有研究显示,正常菌群与肠道黏膜间具有高度适应性,能促使肠道黏膜分泌IgA,其分泌量是整个免疫系统分泌量的417倍<sup>[24]</sup>.本实验显示,*L.acidophilus*在乳鼠肠道感染HRV前定植更能有效刺激肠黏膜SIgA的分泌.

IFN- $\gamma$ 主要由活化Th1细胞和NK细胞产生,

是机体抗HRV病毒感染中最重要的细胞因子之一,是一种多功能的免疫活性物质,具有抗病毒、抗肿瘤、免疫调节等作用. IFN- $\gamma$ 能增强细胞毒性T细胞和NK细胞杀伤靶细胞的能力,增强巨噬细胞的杀伤能力,并促进单核巨噬细胞的抗病毒功能. HRV感染小鼠小肠上皮黏膜细胞后,可刺激CTL和Th1细胞产生IFN- $\gamma$ 等细胞因子<sup>[25,26]</sup>.石海帆等<sup>[27]</sup>研究发现,HRV感染乳鼠小肠黏膜IFN- $\gamma$ 表达细胞数及灰度值均显著高于正常组,表明HRV感染乳鼠小肠黏膜IFN- $\gamma$ 表达细胞数增多.本实验显示,感染组与正常对照组相比血清IFN- $\gamma$ 明显增加,提示细胞免疫已被激活.与感染组相比,预防组和治疗组血清IFN- $\gamma$ 又有明显升高,提示*L.acidophilus*可通过提高IFN- $\gamma$ 水平来调节感染HRV乳鼠的细胞免疫功能.预防组与治疗组相比,IFN- $\gamma$ 水平又有明显升高,提示预防组免疫因子提升得更快.

TNF- $\alpha$ 主要由激活的单核巨噬细胞产生,在机体受到损伤性时,可很快产生并在短时间内达到高峰. TNF- $\alpha$ 可促使中性粒细胞聚集,被激活后可释放大量的活性氧代谢产物(reactivated oxygen species, ROS)、弹性蛋白酶(elastase, ET)、杀菌性通透性增加蛋白酶(bactericidal permeability increasing protein, BPIP)、防御素等,对血管内皮细胞和肠黏膜上皮细胞造成损伤. TNF- $\alpha$ 还可刺激诱导型一氧化氮合成酶(iNOS),使其活性增加,生成大量的一氧化氮(NO),并通过其毒性代谢产物过氧亚硝基阴离子损伤肠黏膜<sup>[28]</sup>; TNF- $\alpha$ 还能通过交感-肾上腺髓质系统使儿茶酚胺分泌增加,儿茶酚胺可促进多种血管活性物质释放,如白三烯(LT)、前列腺素(PG)、血栓素A<sub>2</sub>(TXA<sub>2</sub>)、PAF等,加剧微循环障碍,加重肠黏膜屏障损伤; TNF- $\alpha$ 还能引起发热、食欲减退等,间接引起肠黏膜屏障损伤.总之, TNF- $\alpha$ 在应激状态下,可激活一系列的炎症因子,并不断相互作用循环促进,形成“瀑布样”反应,在引起一系列炎症病理变化的同时引起肠黏膜屏障的损伤<sup>[29,30]</sup>.另有研究证实HRV肠炎时,肠黏膜的病理损伤与TNF- $\alpha$ 的高表达有关<sup>[31,32]</sup>.本实验显示,感染HRV乳鼠血清TNF- $\alpha$ 水平升高,肠黏膜出现了病理损伤,经*L.acidophilus*治疗后, TNF- $\alpha$ 水平降低,肠黏膜炎症减轻,提示*L.acidophilus*可通过下调TNF- $\alpha$ 水平来减轻感染HRV乳鼠肠黏膜的损伤.

用光镜观察肠黏膜厚度、绒毛高度和隐窝深度,可直接从结构上反映肠黏膜的机械屏障

#### ■应用要点

*L.acidophilus*对感染HRV乳鼠有预防和治疗作用,而且在乳鼠感染HRV前灌服10<sup>8</sup> cfu/mL浓度*L.acidophilus*的效果比感染后灌服好.*L.acidophilus*对感染HRV乳鼠的预防和治疗作用与其能够保护小鼠肠黏膜免受损伤有关.

## ■同行评价

本文从肠黏膜生物屏障、免疫屏障和机械屏障等方面,对嗜酸乳杆菌对感染人轮状病毒鼠肠黏膜的保护作用进行了探讨,为嗜酸乳杆菌的进一步临床应用奠定了基础,有一定的实际意义。

情况。本实验显示,HRV感染组与正常对照相比,黏膜厚度和绒毛高度变化不大,但隐窝深度加大,绒毛高度/窝深度显著减低。从形态上可见感染HRV乳鼠肠上皮细胞出现广泛的空泡样变性<sup>[8]</sup>,但测量绒毛高度并无太大变化,分析其原因可能有二:感染HRV乳鼠肠绒毛有水肿、萎缩发生,但脱落并不明显;与测量时间有关。陈军华等<sup>[33]</sup>研究认为,乳鼠感染HRV后第1-2天绒毛高度与正常对照组比较差异有统计学意义,第3天后差异就不明显了;乳鼠感染后第2、3、4天正常对照组与感染组肠隐窝深度差异有显著性。我们在乳鼠感染HRV后第4天检测,发现隐窝深度加大、绒毛高度/隐窝深度显著减低,这与陈军华等的研究基本一致。在灌服*L.acidophilus*后,感染HRV乳鼠的小肠隐窝深度及绒毛高度/隐窝深度都恢复到了正常水平,提示*L.acidophilus*对感染HRV乳鼠肠黏膜机械屏障有保护作用。

总之,*L.acidophilus*对感染HRV乳鼠肠黏膜的生物屏障、免疫屏障和机械屏障均有一定的保护作用,感染前灌服*L.acidophilus*的保护效果好于感染后灌服,但*L.acidophilus*对感染HRV乳鼠肠黏膜菌群调节的机制、免疫调节的通路等尚有待进一步研究。

志谢:感谢艾洪武、王晓梅及刘冰波在本实验中给予的大力帮助。

## 4 参考文献

- 马慧,黄敬孚,林书祥,李丽静,王瑞雪,彭林. 儿童轮状病毒腹泻的流行病学研究. 中国实用儿科杂志 2010; 25: 52-53
- 廖炆,陈军华,朱朝敏,许红梅,刘作义. 重庆婴幼儿轮状病毒分子流行病学特征及相关临床资料分析. 第三军医大学学报 2010; 32: 77-80
- 张昕,高永军,冯子健,王子军,冉陆. 2008年全国其他感染性腹泻报告病例信息分析. 世界华人消化杂志 2009; 17: 3370-3375
- Pagnini C, Saeed R, Bamias G, Arseneau KO, Pizarro TT, Cominelli F. Probiotics promote gut health through stimulation of epithelial innate immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 454-459
- Spinler JK, Taweekhotipatr M, Rognerud CL, Ou CN, Tumwasorn S, Versalovic J. Human-derived probiotic *Lactobacillus reuteri* demonstrate antimicrobial activities targeting diverse enteric bacterial pathogens. *Anaerobe* 2008; 14: 166-171
- Shanahan F. Probiotics in perspective. *Gastroenterology* 2010; 139: 1808-1812
- Seth A, Yan F, Polk DB, Rao RK. Probiotics ameliorate the hydrogen peroxide-induced epithelial barrier disruption by a PKC- and MAP kinase-dependent mechanism. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008; 294: G1060-G1069
- 张振,王宝香,周诗琼,鲍连生,刘冰波. 嗜酸乳杆菌对乳鼠感染人轮状病毒的预防和治疗作用观察. 中华消化杂志 2010; 30: 465-469
- 杨蒙蒙,罗佳波,陈文,杨占秋,张琰. 人轮状病毒感染昆明小鼠乳鼠模型的建立. 中国比较医学杂志 2009; 19: 45-49
- 夏群,陈兰举,陈名武,周瑞,沈怀云,丁周志,徐家丽,薛莲,刘欣. 轮状病毒肠道外感染乳鼠模型的建立. 蚌埠医学院学报 2010; 35: 1-3
- Liboni KC, Li N, Scumpia PO, Neu J. Glutamine modulates LPS-induced IL-8 production through IkappaB/NF-kappaB in human fetal and adult intestinal epithelium. *J Nutr* 2005; 135: 245-251
- Arrieta MC, Bistritz L, Meddings JB. Alterations in intestinal permeability. *Gut* 2006; 55: 1512-1520
- Barrett KE. New ways of thinking about (and teaching about) intestinal epithelial function. *Adv Physiol Educ* 2008; 32: 25-34
- Walser EM, Nealon WH, Marroquin S, Raza S, Hernandez JA, Vasek J. Sterile fluid collections in acute pancreatitis: catheter drainage versus simple aspiration. *Cardiovasc Intervent Radiol* ; 29: 102-107
- 杨书良,李兰梅,陈育民. 肠黏膜屏障的构成与功能研究进展. 临床荟萃 2008; 23: 1809-1811
- Foligné B, Nutten S, Steidler L, Dennin V, Goudercourt D, Mercenier A, Pot B. Recommendations for improved use of the murine TNBS-induced colitis model in evaluating anti-inflammatory properties of lactic acid bacteria: technical and microbiological aspects. *Dig Dis Sci* 2006; 51: 390-400
- Fuentes S, Eger M, Jiménez-Valera M, Ramos-Cormentzana A, Ruiz-Bravo A, Smidt H, Monteoliva-Sanchez M. Administration of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum* affects the diversity of murine intestinal lactobacilli, but not the overall bacterial community structure. *Res Microbiol* 2008; 159: 237-243
- Kwon HK, Lee CG, So JS, Chae CS, Hwang JS, Sahoo A, Nam JH, Rhee JH, Hwang KC, Im SH. Generation of regulatory dendritic cells and CD4+Foxp3+ T cells by probiotics administration suppresses immune disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 2159-2164
- Foligne B, Nutten S, Grangette C, Dennin V, Goudercourt D, Poiret S, Dewulf J, Brassart D, Mercenier A, Pot B. Correlation between in vitro and in vivo immunomodulatory properties of lactic acid bacteria. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 236-243
- Beausoleil M, Fortier N, Guénette S, L'ecuyer A, Savoie M, Franco M, Lachaine J, Weiss K. Effect of a fermented milk combining *Lactobacillus acidophilus* C1285 and *Lactobacillus casei* in the prevention of antibiotic-associated diarrhea: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Can J Gastroenterol* 2007; 21: 732-736
- Buck BL, Altermann E, Svingerud T, Klaenhammer TR. Functional analysis of putative adhesion factors in *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71: 8344-8351
- De-Souza DA, Greene LJ. Intestinal permeability and systemic infections in critically ill patients: effect of glutamine. *Crit Care Med* 2005; 33: 1125-1135
- 高金生,杨书良. 肠黏膜屏障损伤的原因与机制研究进展. 世界华人消化杂志 2009; 17: 1540-1544
- Macpherson AJ, Uhr T. Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. *Science* 2004; 303: 1662-1665
- 徐锦,杨毅,孙家娥,丁韵珍,苏犁云,邵彩虹. 急性轮



- 26 殷坚, 彭芝配, 滕久祥, 伍参荣, 张国民, 王丽, 唐曦. 秦香颗粒对人轮状病毒感染乳鼠血清IFN- $\gamma$ 的影响. 湖南中医药大学学报 2010; 30: 25-27
- 27 石海矾, 陈益平, 徐志伟, 狄军波. 嗜酸乳杆菌对人轮状病毒感染乳鼠小肠黏膜白细胞黏附分子-1、 $\gamma$ -干扰素表达的影响. 实用医学杂志 2010; 26: 1314-1317
- 28 Vallance BA, Dijkstra G, Qiu B, van der Waaij LA, van Goor H, Jansen PL, Mashimo H, Collins SM. Relative contributions of NOS isoforms during experimental colitis: endothelial-derived NOS maintains mucosal integrity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 287: G865-G874
- 29 张嘉, 刘瑞林, 刘牧林. 肠道屏障功能损伤机制的研究进展. 蚌埠医学院学报 2005; 30: 277-279
- 30 杨武, 肖桦, 黄勇坤. 肠屏障功能障碍发生机制与诊断治疗. 实用儿科临床杂志 2007; 22: 1514-1515
- 31 Jijon H, Backer J, Diaz H, Yeung H, Thiel D, McKaigney C, De Simone C, Madsen K. DNA from probiotic bacteria modulates murine and human epithelial and immune function. *Gastroenterology* 2004; 126: 1358-1373
- 32 苏平五, 计学理, 孙巧玲. 小儿轮状病毒肠炎致全身炎症反应综合征IL-2、IL-6及TNF的变化及意义. 世界中西医结合杂志 2009; 4: 335-337
- 33 陈军华, 解元元, 凌华, 刘作义. 轮状病毒感染乳鼠致病机制的实验研究. 第三军医大学学报 2007; 29: 1230-1233

编辑 何基才 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011年版权归世界华人消化杂志

## • 消息 •

### 《世界华人消化杂志》性质、刊登内容及目标

本刊讯 《世界华人消化杂志》[国际标准刊号ISSN 1009-3079 (print), ISSN 2219-2859 (online), 国内统一刊号CN 14-1260/R, Shijie Huaren Xiaohua Zazhi/World Chinese Journal of Digestology], 是一本由来自国内23个省、市、自治区、特别行政区的496位胃肠病学和肝病专家支持的开放存取的同行评议的旬刊杂志, 旨在推广国内各地的胃肠病学和肝病领域临床实践和基础研究相结合的最具有临床意义的原创性及各类评论性的文章, 使其成为一种公众资源, 同时科学家、医生、患者和学生可以通过这样一个不受限制的平台来免费获取全文, 了解其领域的所有的关键的进展, 更重要的是这些进展会为本领域的医务工作者和研究者服务, 为他们的患者及基础研究提供进一步的帮助。

除了公开存取之外, 《世界华人消化杂志》的另一大特色是对普通读者的充分照顾, 即每篇论文都会附带有一组供非专业人士阅读的通俗易懂的介绍大纲, 包括背景资料、研发前沿、相关报道、创新盘点、应用要点、名词解释、同行评价。

《世界华人消化杂志》报道的内容包括食管、胃、肠、肝、胰肿瘤, 食管疾病、胃肠及十二指肠疾病、肝胆疾病、肝脏疾病、胰腺疾病、感染、内镜检查法、流行病学、遗传学、免疫学、微生物学, 以及胃肠道运动对神经的影响、传送、生长因素和受体、营养肥胖、成像及高科技技术。

《世界华人消化杂志》的目标是出版高质量的胃肠病学和肝病领域的专家评论及临床实践和基础研究相结合具有实践意义的文章, 为内科学、外科学、感染病学、中医学、肿瘤学、中西医结合学、影像学、内镜学、介入治疗学、病理学、基础研究等医生和研究人员提供转换平台, 更新知识, 为患者康复服务。