

肝硬化患者肠道微生态的变化

吴旭, 吴云峰, 毛朝亮, 吴中明

吴旭, 吴云峰, 毛朝亮, 遵义市第一人民医院消化内科 贵州省遵义市 563000

吴旭, 吴中明, 遵义医学院基础医学院微生物学研究室 贵州省遵义市 563000

吴旭, 副主任医师, 主要从事感染免疫研究.

作者贡献分布: 此课题设计和论文撰写由吴旭完成; 研究过程由吴旭、吴云峰及毛朝亮操作完成; 课题设计、研究指导及论文审核修改由吴中明指导.

通讯作者: 吴中明, 教授, 563000, 贵州省遵义市汇川区大连路201号, 遵义医学院基础医学院微生物研究室.

zhongming wu0552@sina.com

电话: 0852-8609545

收稿日期: 2012-03-16 修回日期: 2012-07-10

接受日期: 2012-07-19 在线出版日期: 2012-09-18

Changes in intestinal microflora in patients with hepatic cirrhosis

Xu Wu, Yun-Feng Wu, Chao-Liang Mao, Zhong-Ming Wu

Xu Wu, Yun-Feng Wu, Chao-Liang Mao, Department of Gastroenterology, the First People's Hospital of Zunyi, Zunyi 563000, Guizhou Province, China

Xu Wu, Zhong-Ming Wu, Zunyi Medical College, Zunyi 563000, Guizhou Province, China

Correspondence to: Zhong-Ming Wu, Department of Microbiology, School of Basic Medical Sciences, Zunyi Medical College, Zunyi 563000, Guizhou Province, China. zhongming wu0552@sina.com

Received: 2012-03-16 Revised: 2012-07-10

Accepted: 2012-07-19 Published online: 2012-09-18

Abstract

AIM: To compare the differences in the numbers of *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Eubacterium rectale-Clostridium*, *Escherichia coli*, *Enterococcus*, *Clostridium difficile* in stool samples between patients with hepatic cirrhosis and controls to understand the changes in intestinal flora in patients with hepatic cirrhosis.

METHODS: Stool samples collected from 29 patients with hepatic cirrhosis who were treated at the First People's Hospital of Zunyi during the period between March to December 2010 and 13 healthy volunteers were used in this study. The samples were fixed, smeared on slides, and analyzed by fluorescent in situ hybridization (FISH) and laser scanning confocal microscopy (LSCM). The *t*-test and rank correlation test were used for

statistical analysis.

RESULTS: The numbers of *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Eubacterium rectale-Clostridium*, *Escherichia coli*, *Enterococcus*, and *Clostridium difficile* were significantly lower in patients with hepatic cirrhosis than in controls ($Z = -4.006, -4.34, -4.399, -4.174, -3.558, -3.95$; all $P < 0.01$). The proportions of all 6 kinds of bacteria were changed. The numbers of obligate anaerobes such as *Bifidobacterium* and *Bacteroides* were reduced, while those of *E. coli*, *Eubacterium rectale-Clostridium*, *Enterococcus*, and *Clostridium difficile* were increased (all $P < 0.05$). The numbers and portions of bacteria had no significant correlation with etiology and severity of hepatic cirrhosis (Child-Pugh classification).

CONCLUSION: The numbers and proportions of six kinds of bacteria changed in patients with hepatic cirrhosis. Changes in intestinal microflora have no significant correlation with etiology and Child-Pugh classification.

Key Words: Hepatic cirrhosis; Intestinal microflora; Fluorescent in situ hybridization; Laser scanning confocal microscopy

Wu X, Wu YF, Mao CL, Wu ZM. Changes in intestinal microflora in patients with hepatic cirrhosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(26): 2491-2495

摘要

目的: 观察肝硬化(hepatic cirrhosis, HC)患者粪便中类杆菌、双歧杆菌、肠球菌、大肠杆菌、直肠真杆菌-球形梭菌和梭状芽胞杆菌, 比较肝硬化患者与健康对照组之间肠道微生态的差异, 以了解肝硬化患者肠道菌群的变化.

方法: 收集2010-03/2010-12遵义市第一人民医院消化科所收治的肝硬化患者29例, 并以13例同期健康在校大学生作对照, 收集粪便标本. 经固定、玻片上涂片, 荧光原位杂交(fluorescent in situ hybridization, FISH), 激光共聚焦扫描显微镜(laser scanning confocal microscopy, LSCM)对细菌进行计数观察. 应用秩相关检测法进行分析.

■背景资料

肝脏与肠道之间有很密切的关系, 构成人体的肠肝循环及肠肝屏障. 肠道菌群与肝硬化及其并发症的发病机制有相关性. 肠道是微生物在人体内最大的定居和活动场所. 由于人肠道中的绝大多数细菌不能培养, 应用培养方法很难从种类水平上获得可靠和定量的结果. 因此选择一种简便、快速并且精确的方法鉴定肠道细菌群, 研究它们与机体的关系显得急迫而重要.

■同行评议者

刘森, 副教授, 安徽医科大学病原生物学

■研究前沿

肠道微生物的鉴定作为肝硬化患者病情严重程度、愈后评估和治疗的基础研究,受到国内外研究人员的广泛关注,成为肝硬化的研究热点之一。如何对种类繁多且复杂多变的肠道微生物进行鉴定是目前亟待研究的问题。

结果:肝硬化患者与健康对照组比较粪便中双歧杆菌、类杆菌、真杆菌-直肠梭菌、肠球菌、大肠杆菌和梭状芽胞杆菌均较健康对照组显著减少($Z = -4.006$ 、 -4.34 、 -4.399 、 -4.174 、 -3.558 、 -3.95 , 均 $P < 0.01$), 6种细菌的比例发生改变, 表现为双歧杆菌及类杆菌专性厌氧菌的数量减少, 大肠杆菌、直肠真杆菌-球形梭菌、肠球菌和芽胞杆菌的数量增多($P < 0.05$)。细菌数量及比例之间的这种改变与肝硬化病因及肝硬化严重程度(Child-Pugh)分级无明显相关性($P > 0.05$)。

结论:肝硬化患者肠道中6种细菌数量及构成比发生改变, 肠道微生态的这种变化与肝硬化不同病因及疾病严重程度之间无明显相关性。

关键词:肝硬化; 肠道微生态; 荧光原位杂交; 激光共聚焦扫描显微镜

吴旭, 吴云峰, 毛朝亮, 吴中明. 肝硬化患者肠道微生态的变化. 世界华人消化杂志 2012; 20(26): 2491-2495
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/2491.asp>

0 引言

肝硬化患者由于肝功能损害, 肝脏库普弗细胞解毒功能减低、门脉高压形成、肠肝屏障受损, 从肠道入血的各种物质不经过肝脏的解毒而绕过肝脏直接进入体循环, 并发各种细菌感染、内毒素血症和脓毒血症等, 各种炎症刺激物长期慢性刺激, 激活机体免疫系统, 引起异常免疫反应, 导致全身炎症反应综合征甚至多器官功能衰竭。这反过来又加重了肠道微生态的失调和肝脏的损伤, 形成恶性循环, 从而影响肝硬化愈后。因此研究肝硬化与肠道微生态之间的关系至关重要。本研究应用荧光原位杂交(fluorescent in situ hybridization, FISH)结合激光共聚焦扫描显微镜(laser scanning confocal microscopy, LSCM)对肝硬化患者粪便中的6种细菌的数量及比例进行检测, 为深入研究肝硬化患者肠道微生态奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料 酒精性肝硬化和非酒精性肝硬化参照中华医学会肝脏病学分会脂肪肝和酒精性肝病学组于2002-10南京会议制定的诊断标准, 病毒性肝炎肝硬化参照中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会2000年西安会议联合修订的病毒性肝炎防治方案中乙肝后肝硬化的诊断标准。收集2010-03/2010-12遵义市第一人民医院消化科诊断的肝硬化失代偿期患者29例, 年

龄23-83岁, 平均59.93岁, 排除消化道出血, 其中病毒性肝炎肝硬化9例, 酒精性肝硬化12例, 非酒精性脂肪性肝病所致肝硬化8例; Child-Pugh分级, A级8例, B级14例, C级7例。以13例同期健康在校大学生自愿者为对照组, 年龄20-24岁, 平均22.46岁, 半年内未使用抗生素及益生菌类药物。寡核苷酸探针购自上海生工生物工程有限公司, LCSM(Leica TCS-SP2)。

1.2 方法

1.2.1 标本收集: 收集一次新鲜全便, 持续混匀粪便样本5 min; 不能及时混匀的粪便, 放在4 °C冰箱内, 在12 h内进行混匀处理。

1.2.2 标本固定: 称取0.5 g粪便加到4.5 mL经过滤处理的磷酸盐缓冲液(PBS)中, 加入玻璃球珠, 漩涡震荡器混匀5 min; 离心 10×100 r/min, 2 min, 20×100 r/min, 2 min; 取1 mL上清液置于3 mL新鲜配制的40 g/L多聚甲醛溶液(PFA)中固定, 4 °C放置过夜, 分装。

1.2.3 标本脱水: 上述经固定处理的标本涂片, 50 mL/L、70 mL/L、90 mL/L和无水乙醇梯度乙醇脱水固定10 min, 空气中自然干燥。

1.2.4 标本消化: 溶菌酶稀释缓冲液消化10 min, 0.1% DEPC水清洗3次, 空气中自然干燥。

1.2.5 标本杂交及漂洗: 在暗室中将终浓度为1.0 g/mL的探针100 μ L均匀加到涂片表面, 放于湿盒内, 置50 °C恒温水浴箱内杂交12 h; 漂洗缓冲液50 °C漂洗30 min, 超纯水快速漂净, 空气中自然干燥。

1.2.6 细菌数量的检测: 应用LCSM检测杂交后的细菌数量(图1, 2, 使用激发波长见表1)。

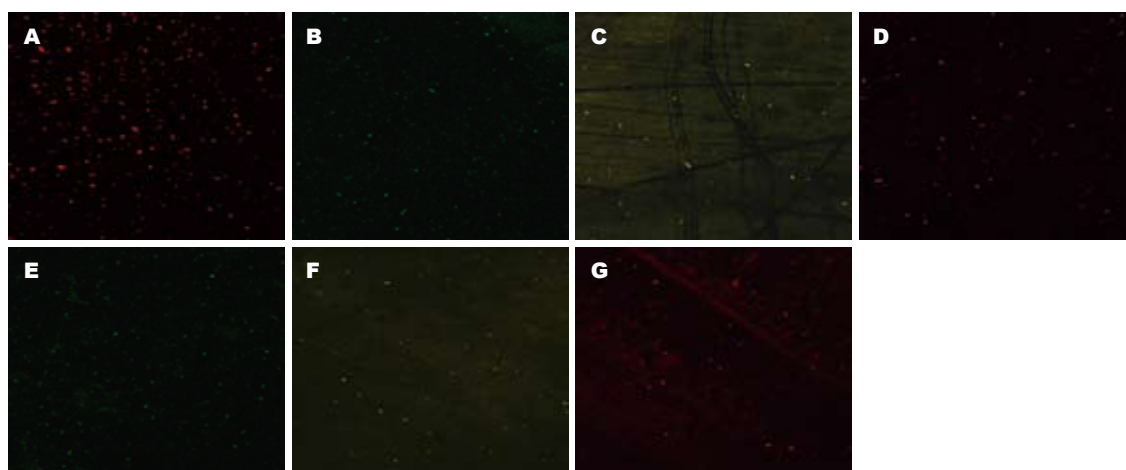
统计学处理 非正态分布的变量用中位数(四分位数间距)描述。肝硬化组3种不同病因之间以及肝硬化组Child-Pugh分级6种肠道细菌计数实验数据采用非参数检验Kruskal-Wallis法(非正态分布), 采用SPSS13.0软件, 进行统计分析, $P < 0.05$ 认为有差异。

2 结果

FISH细菌计数、肝硬化组及健康对照组比较, 6种不同细菌计数存在显著差异($P < 0.01$); 所有6种细菌计数均较健康对照组明显降低, 对于6种细菌的构成比, 肝硬化组双歧杆菌和类杆菌的比例较健康对照组降低, 而直肠真杆菌-球形梭菌、大肠杆菌、肠球菌和梭状芽胞杆菌的比例较健康对照组增高。不同病因以及不同Child-Pugh分级肝硬化之间细菌计数无明显差异($P > 0.05$, 表2-4)。

■相关报道

Cesaro等认为肠道微生物的失衡、细菌过长生长、免疫异常改变肠道通透性、诱导和促进肝脏损害、参与肝硬化并发症的发生。Garbuzenko等证实肠道菌群在肝硬化感染和高动力循环状态中起重要作用。



■创新盘点

本文应用FISH结合LCSM技术, 无需对细菌进行分离培养, 也不需要提取DNA, 而是以微生物基因组的核酸序列为基础, 利用荧光标记的寡核苷酸探针进行原位杂交来鉴定对肝硬化患者的肠道菌群进行分析。

图1 健康对照组细菌LCSMX60扫描图片. A: 所有细菌荧光; B: 类杆菌; C: 双歧杆菌; D: 芽胞杆菌; E: 大肠杆菌; F: 直肠真杆菌-梭菌; G: 肠球菌。

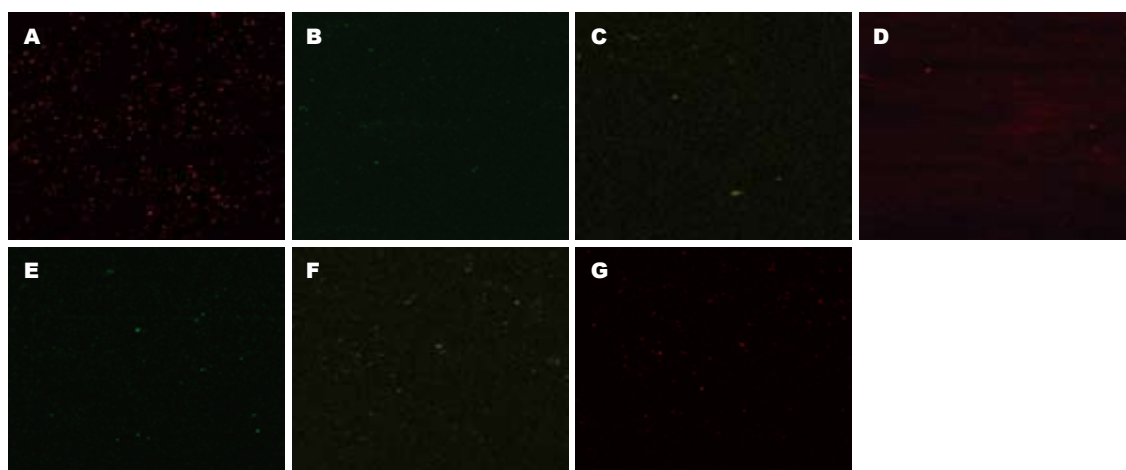


图2 肝硬化组细菌LCSMX60扫描图片. A: 所有细菌荧光; B: 类杆菌; C: 双歧杆菌; D: 芽胞杆菌; E: 大肠杆菌; F: 直肠真杆菌-梭菌; G: 肠球菌。

3 讨论

肝脏与肠道之间有很密切的联系. 肠腔内正常微生物的定植, 可持续性的抑制炎症反应和肝脏免疫耐受, 维持肝脏的免疫平衡^[1]. 肠道微生物的改变可引起肝脏网状内皮细胞系统功能损害^[2], 导致随时间而持续加重的免疫损害^[3], 对肝脏的作用可从无症状到肝纤维化和肝硬化^[4]. 肝硬化是慢性肝病的终末阶段, 越来越多的证据表明肠道菌群与肝硬化及其并发症的发病机制有相关性^[5,6].

门静脉系统接受来自肠道的血液, 肠道的血活化肝功能. 肝脏反过来通过分泌胆汁进入肠道而影响肠道功能. 肠道微生物屏障防御致病菌的定植, 影响肠道的动力和渗透性、刺激肠黏膜免疫系统、降低细菌的易位、产生维生素、肠道微生物的异常改变在诱导和促进肝脏损害中起重要作用^[7]. 他从黏膜水平上影响机体的内稳态^[8]. 肝硬化时肠道动力障碍是肠道细菌过度生长的前

提条件, 他降低了肠道清除能力, 为致病菌提供了黏附和生长机会, 过度生长的细菌及其分泌的毒素引起肠上皮细胞病变; 肝脏分泌的胆汁有肠道去垢作用, 肝硬化患者胆汁分泌减少, 导致肠道黏膜致病菌的定植; 抗生素尤其是广谱抗生素的不合理使用, 引起肠道细菌数量的减少或菌群间比例的失调. Sekirov等^[9]研究发现抗生素虽然没有显著改变肠道细菌的总数, 但改变了微生物的构成, 导致了肠道屏障功能的异常. 同时抗生素治疗可以改变肠道菌群的情况, 导致肠道菌群易位、肝功能的恶化和内毒素血症^[10,11], 在肝硬化感染和高动力循环状态中起重要作用^[12,13].

粪便干质量的1/3-2/5由细菌组成, 基本代表人下消化道主要是结肠菌群状态. 因此, 通过粪便微生物的检测, 对肠道菌群进行定性和定量研究是最简捷的方法^[14]. 粪便微生物有高度的结构性和空间构成^[15]. Berg等^[16]根据细菌发生易位

■应用要点

75%来自人结肠的16S rRNA序列定义的细菌种系是不能用现有方法培养出来的, FISH作为对肠道菌群研究的一种方法, 根据目标微生物16S rRNA基因序列的相对保守区域设计寡聚核苷酸探针, 利用荧光素进行标记, 与靶细菌杂交, 通过检测目标序列来确定微生物的种类、数量及空间分布, 同时能显示多种颜色便于区别等优点, 但只对16S rRNA序列已知的微生物进行检测, 对于序列未知的微生物则无能为力。

表 1 16S rRNA寡核苷酸探针序列

探针	序列(5'→3')	靶细菌	荧光素	颜色	激发波长(nm)
EREC482	GCTTCTTAGTCAGGTACCG	梭状芽胞杆菌	FAM	红色	495
Enc	CCCTCTGATGGGTAGGTT	肠球菌	FAM	红色	495
Ecoli	GCAAAGGTATTAACCTTACTCCC	大肠杆菌	HEX	绿色	538
Bac303	CCAATGTGGGGGACCTT	类杆菌	HEX	绿色	538
Bif164	CATCCGGCATTACCACCC	双歧杆菌	TAMRA	黄色	559
Lowgc2p	GGGACGTTGTTTCTGAGT	直肠真杆菌-梭菌	TAMRA	黄色	559
EUB338	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	所有细菌	ROX	红色	588

表 2 肝硬化组和健康对照组之间肠道几种细菌的比较 [中位数(P₂₅, P₇₅)]

分组	总的细菌	类杆菌	双歧杆菌	梭状芽胞	大肠杆菌	肠球菌	真杆-梭菌
肝硬	624.72	17.09	32.14	34.68	13.11	25.78	21.91
化组	(276.29, 973.14)	(8.89, 25.30)	(-8.40, 62.68)	(10.52, 58.84)	(1.60, 24.62)	(5.63, 45.93)	(12.49, 31.33)
健康	1674.72	128.38	289.67	173.84	80.18	175.92	91.48
对照组	(356.63, 992.81)	(-3.01, 259.76)	(142.08, 37.27)	(-51.05, 398.73)	(5.60, 154.77)	(106.70, 245.14)	(26.71, 156.25)
Z值	3.11	-4.34	-4.006	-3.95	-3.558	-4.174	-4.399
P值	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

表 3 肝硬化3种不同病因之间的肠道细菌计数比较 [中位数(P₂₅, P₇₅)]

病因	总的细菌	类杆菌	双歧杆菌	梭状芽胞	大肠杆菌	肠球菌	真杆-梭菌
肝炎症	891.10	17.41	19.62	35.28	27.15	60.45	21.60
	(174.48, 1607.72)	(12.17, 22.64)	(-90.51, 129.75)	(5.23, 65.33)	(14.24, 40.07)	(18.74, 1.2.13)	(-4.33, 47.53)
酒精性	436.43	17.36	19.04	19.01	10.65	18.20(3.21,	22.14
	(172.79, 700.07)	(4.65, 30.08)	(0.37, 37.71)	(3.28, 34.73)	(5.05, 16.25)	33.19)	(10.85, 33.43)
非酒精	712.09	15.77	60.41	51.28	9.01	23.809	18.46
性	(478.28, 945.76)	(-1.45, 32.89)	(26.39, 94.42)	(10.10, 92.45)	(-11.57, 29.58)	(7.23, 40.49)	(9.97, 26.94)
Z值	4.463	0.48	1.825	1.193	1.428	2.71	1.527
P值	0.324	0.624	0.181	0.319	0.258	0.085	0.236

表 4 肝硬化不同Child-Pugh分级肠道细菌计数比较 [中位数(P₂₅, P₇₅)]

分组	n	总的细菌	类杆菌	双歧杆菌	梭状芽胞	大肠杆菌	肠球菌	真杆-梭菌
A级	8	578.19	19.59	50.20	27.81	6.57	17.59	10.37
		(190.4, 965.98)	(8.13, 31.06)	(9.20, 91.21)	(0.22, 55.39)	(3.88, 9.27)	(7.19, 27.98)	(3.38, 17.37)
B级	14	723.56	18.55	29.55	47.90	19.04	38.15	24.07
		(337.93, 109.18)	(5.69, 31.41)	(-20.70, 79.80)	(22.55, 73.25)	(6.47, 31.60)	(11.09, 45.19)	(13.21, 34.92)
C级	7	436.43	12.28	19.04	21.07	15.76	23.15	21.68
		(148.13, 688.73)	(5.54, 19.03)	(0.99, 37.08)	(5.79, 36.34)	(8.90, 22.62)	(5.93, 40.37)	(16.88, 26.74)
Z值		1.858	0.624	0.509	1.203	4.534	2.446	3.231
P值		0.395	0.732	0.775	0.548	0.104	0.294	0.199

的效能将肠道细菌分为3类: (1)最易发生易位的是肠杆菌、大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌等; (2)具有中等易位能力的是乳杆菌、表皮链球菌和粪肠杆菌等; (3)最不易发生易位的是密度很高的专性厌氧菌。双歧杆菌/肠杆菌(B/E)率, 可以

显示肠道微生物定植抗力。肝硬化患者肠道中的双歧杆菌、类杆菌等专性厌氧菌显著减少, 而肠杆菌、肠球菌和酵母菌等兼性厌氧菌增加, 肠道微生态失调, 其失调的程度与肝病的严重程度相关。Chen等^[17]研究表明肝硬化患者粪

便微生物群发生了显著的变化,拟杆菌比例显著降低,而变形杆菌和梭状杆菌明显增高,肠杆菌、韦荣球菌和链球菌在肝硬化组也增高。在肝硬化患者中,大肠杆菌是最常引起的感染易位到肠外并引起严重并发症的微生物。接近一半分离的细菌属于定植,展示出强大的毒力性,这可能与更大的侵袭潜力有关^[18]。金黄色葡萄球菌感染是肝病患者最常见的细菌感染方式之一,对死亡率有较高的预测性^[19]。

由于肝硬化患者的肠道菌群失调与细菌易位之间存在的种群相关性,我们的研究得出,相对于健康对照组,肝硬化组双歧杆菌、类杆菌的比例降低,而肠球菌、大肠杆菌、梭状芽胞杆菌和真杆菌-直肠梭菌比例增高同样证实了这一结果。但从本研究结果显示肝硬化患者肠道菌群之间数量和比例的失调与肝硬化病因无相关性,与Child-Pugh分级之间也无明显相关性,这与文献报道不同^[20],原因可能是:(1)由于未对肝硬化患者进行严格限定,部分肝硬化患者虽然Child-Pugh总评分不高,但以肝性脑病、黄疸、低蛋白血症、腹水、凝血功能异常的其中某一项或二项评分较高,加之合并糖尿病、感染、电解质紊乱和肝肾综合征等并发症,或虽肝功能损害不重,但门静脉高压明显,肠道黏膜瘀血缺氧,屏障的完整性和通透性发生改变,部分肝硬化患者由于感染应用抗生素使肠道菌群失调变得复杂;(2)实验组肝硬化标本例数虽有29例,但从病因分类和Child-Pugh分级而言相对较少;(3)选取的6种细菌为益生菌和条件致病菌,其数量均减少,与文献报道有差异,但有无真菌、金黄色葡萄球菌、链球菌和克雷伯菌等致病菌的二重感染,需进一步增加对致病菌的研究。

本研究仅选择了肠道中的常见的6种细菌进行研究,相对于肠腔中的1 000余种细菌,种类过少,尚有待增加对细菌种类尤其是致病菌种类的研究及实验组条件的限定,深入了解肝硬化患者肠道细菌紊乱的种类及程度。此外,作为细菌易位替代标志的细菌DNA在肠腔外组织器官的存在与肠道菌群的关系以及他们与肝硬化并发症、严重程度及愈后的关系还需要深入研究。

4 参考文献

- 1 Singh R, Bullard J, Kalra M, Assefa S, Kaul AK, Vonfeldt K, Strom SC, Conrad RS, Sharp HL, Kaul R. Status of bacterial colonization, Toll-like receptor expression and nuclear factor-kappa B activation in normal and diseased human livers. *Clin Immunol* 2011; 138: 41-49

- 2 O'Sullivan DJ. Genomics can advance the potential for probiotic cultures to improve liver and overall health. *Curr Pharm Des* 2008; 14: 1376-1381
- 3 Mehta AK, Lyon GM. Infectious diseases in end-stage liver disease patients. *Crit Care Nurs Clin North Am* 2010; 22: 291-307
- 4 Talwani R, Gilliam BL, Howell C. Infectious diseases and the liver. *Clin Liver Dis* 2011; 15: 111-130
- 5 Papp M, Norman GL, Vitalis Z, Tornai I, Altorjay I, Foldi I, Udvardy M, Shums Z, Dinya T, Orosz P, Lombay B, Par G, Par A, Veres G, Csak T, Osztoivits J, Szalay F, Lakatos PL. Presence of anti-microbial antibodies in liver cirrhosis--a tell-tale sign of compromised immunity? *PLoS One* 2010; 5: e12957
- 6 Guerrero Hernández I, Torre Delgadillo A, Vargas Vorackova F, Uribe M. Intestinal flora, probiotics, and cirrhosis. *Ann Hepatol* 2008; 7: 120-124
- 7 Cesaro C, Tiso A, Del Prete A, Cariello R, Tuccillo C, Cotticelli G, Del Vecchio Blanco C, Loguercio C. Gut microbiota and probiotics in chronic liver diseases. *Dig Liver Dis* 2011; 43: 431-438
- 8 Lata J, Jurankova J, Kopacova M, Vitek P. Probiotics in hepatology. *World J Gastroenterol* 2011; 17: 2890-2896
- 9 Sekirov I, Tam NM, Jogova M, Robertson ML, Li Y, Lupp C, Finlay BB. Antibiotic-induced perturbations of the intestinal microbiota alter host susceptibility to enteric infection. *Infect Immun* 2008; 76: 4726-4736
- 10 Zhang W, Gu Y, Chen Y, Deng H, Chen L, Chen S, Zhang G, Gao Z. Intestinal flora imbalance results in altered bacterial translocation and liver function in rats with experimental cirrhosis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2010; 22: 1481-1486
- 11 Merli M, Lucidi C, Giannelli V, Giusto M, Riggio O, Falcone M, Ridola L, Attili AF, Venditti M. Cirrhotic patients are at risk for health care-associated bacterial infections. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2010; 8: 979-985
- 12 Garbuzenko DV. [The role of intestinal microflora in the development of complications of hepatic cirrhosis-associated portal hypertension]. *Klin Med (Mosk)* 2007; 85: 15-19
- 13 Wunsch E, Marlicz W, Milkiewicz P. [Probiotics in chronic liver diseases]. *Pol Merkur Lekarski* 2010; 29: 390-394
- 14 廖卫, 张敏, 孙政敏. 新鲜粪便PH和涂片检查小儿肠道菌群失调. *中国微生态学杂志* 2007; 19: 72-73
- 15 Swidsinski A, Loening-Baucke V, Verstraelen H, Osowska S, Doerffel Y. Biostructure of fecal microbiota in healthy subjects and patients with chronic idiopathic diarrhea. *Gastroenterology* 2008; 135: 568-579
- 16 Berg RD. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. *Trends Microbiol* 1995; 3: 149-154
- 17 Chen Y, Yang F, Lu H, Wang B, Chen Y, Lei D, Wang Y, Zhu B, Li L. Characterization of fecal microbial communities in patients with liver cirrhosis. *Hepatology* 2011; 54: 562-572
- 18 Bert F, Johnson JR, Ouattara B, Leflon-Guibout V, Johnston B, Marcon E, Valla D, Moreau R, Nicolas-Chanoine MH. Genetic diversity and virulence profiles of *Escherichia coli* isolates causing spontaneous bacterial peritonitis and bacteremia in patients with cirrhosis. *J Clin Microbiol* 2010; 48: 2709-2714
- 19 Kang CI, Song JH, Ko KS, Chung DR, Peck KR. Clinical significance of *Staphylococcus aureus* infection in patients with chronic liver diseases. *Liver Int* 2010; 30: 1333-1338
- 20 张爱军, 战淑慧, 许琳. 肝硬化患者小肠细菌过度生长与肝功能及自发性腹膜炎的关系. *肝脏* 2009; 14: 389-390

■同行评价

本研究对肝硬化患者肠道微生态研究有一定指导意义。