

# 肠道菌群与艰难梭菌相互作用的研究

苏文金\*

(厦门大学生物学系)

Bourlioux P

(巴黎南大学药学院微生物学系)

伪膜性结肠炎常见于服用抗生素的病人,其症状与厌氧的艰难梭菌(*Clostridium difficile*)及其毒素的作用有关,但其发病机制尚不清楚。有作者怀疑与抗生素疗法所引起的肠道菌群平衡失调,致使艰难梭菌在肠道中定植并产生毒素有关<sup>[1]</sup>。由于动物肠道微生态系统(细菌种类达几百种,菌数达 $10^{14}$ ,影响因素众多)的复杂性,难以利用普通动物模型加以验证。因此,1980年代初,作者将一组仓鼠盲肠菌群移植至C3H系无菌小鼠,建立了一个研究肠道菌群与艰难梭菌相互作用的悉生动物模型,对与艰难梭菌相关的伪膜性结肠炎进行了系统研究<sup>[2-12]</sup>,试图阐明肠道菌群与侵袭性细菌的相互作用机制,以期了解抗生素疗法引起的伪膜性结肠炎的致病机理。

## 1. 屏障菌群的证明与转移

首先,验证了艰难梭菌在C3H系无菌小鼠肠道中的定居和分布情况。在接种艰难梭菌CdFD菌株24h后,CdFD就可在无菌动物肠道中定植下来,数量达 $10^8$ CFU/g粪便,并一直保持稳定。在消化道中,胃CdFD含量最低,小肠次之,盲肠最高;但在盲肠、大肠和粪便之间,CdFD密度的差异并不显著( $P > 0.05$ )。因此,其数量分布也符合一般厌氧菌在正常动物肠道中的分布。这说明这一种动物可作为研究拮抗艰难梭菌的肠道菌群的实验动物模型。

给3只成年普通仓鼠接种CdFD。接种后,其粪便中CdFD含量从未超过 $10^4$ CFU/g粪便。

再将CdFD同枯草杆菌嗜热变种芽孢(无法在体内发芽繁殖而作为目标菌正常通过肠道的标记物)一起接种于实验动物,结果CdFD含量总是低于枯草杆菌芽孢含量,证明了普通仓鼠肠道中确实存在一可拮抗艰难梭菌定植的菌群。

上述仓鼠经用乙醚处死后,迅速送入无氧手套箱,在无氧条件下取出盲肠,做匀浆,稀释后立即送入饲养6~8周龄C3H无菌小鼠的无菌隔离器内,通过食道接种于无菌小鼠,1周后受体小鼠接受CdFD和枯草杆菌芽孢接种物以验证屏障菌群是否已在受体小鼠中定植。结果表明,艰难梭菌无法在接受仓鼠盲肠菌群的无菌小鼠肠道中定植。

## 2. 屏障菌群责任菌株的分离与鉴定

植入受体小鼠的屏障菌群成分非常复杂,难以研究菌群与艰难梭菌的作用机制。因此,有必要简化该菌群成分。为此,作者先用抗生素(8mg红霉素/d·只,通过饮用水连续给药8天)处理受体小鼠,除去了肠内对红霉素敏感的细菌,特别是大部分肠杆菌,但屏障作用仍得以保留。后将初步简化的屏障菌群加热(即取出动物盲肠,在无氧手套箱中匀浆后放入安瓿瓶,密封,在70℃水浴锅内加热10min),再植入新的无菌小鼠。细菌定量分析表明,如此连续简化的菌群仅由厌氧菌组成,但仍可拮

\* 通讯地址:厦门大学生物系,福建省厦门市 361005

抗艰难梭菌在肠道中的定植。这表明, 厌氧菌是拮抗艰难梭菌肠道定植的责任菌株(表 1)。

此后, 再用严格厌氧菌培养技术, 作分离菌群屏障责任菌株的尝试, 但难度极大。另经数年, 终于从简化菌群中分离得到 4 株厌氧菌株, 其中有 1 株属于极端氧敏感细菌, 3 株属于严格厌氧菌。经鉴定, 这 4 株菌株分别属于 *Fusobacterium sp.*、*Eubacterium sp.*、*Clostridium cocleatum*、*Clostridium indolis*。其中后 3 株按 *Clostridium indolis*、*Clostridium cocleatum*、*Eubacterium sp.* 顺序先后植入无菌小鼠后, 即构成一拮抗艰难梭菌肠道定植的屏障菌群, 使艰难梭菌无法在三菌小鼠肠道中定植, 从而证明了严格厌氧菌是拮抗艰难梭菌肠道定植的责任菌株。

表 1 不同动物粪便菌群的定量分析(Ig 细菌数±标准差/g 粪便, 每组 3 只动物)

细菌种类	普通仓鼠菌群	单菌小鼠菌群	受体小鼠菌群	抗生素简化菌群	热简化菌群
厌氧菌总数	9.58±0.27	8.74±0.44	9.52±0.45	9.77±0.21	8.63±0.06
好氧菌总数	6.29±0.50	0	7.97±0.31	6.59±0.11	<3.0
大肠埃希氏菌	5.98±0.57	0	7.29±0.40	<3.0	<3.0
奇异变形菌	5.49±0.49	0	6.56±0.31	6.27±0.35	<3.0
耐氧链球菌	6.09±0.44	0	7.47±0.43	5.99±0.44	<3.0
乳杆菌	8.16±0.75	0	9.05±0.23	8.48±0.31	<3.0
艰难梭菌	<2.0	8.74±0.44	<2.0	<2.0	<2.0

是极端氧敏感细菌 *Eubacterium sp.*。因此, 估计这些责任菌株的肠道定植与肠道生态系统的营养、氧化还原电势和粘附位点等因素有关。为此, 作者对这些菌株可能拥有的分解粘蛋白的酶组分进行了分析。体内外分析结果表明, 首先在无菌小鼠肠道中定植的 *C. indolis* 并不拥有降解粘蛋白的酶系, 无菌小鼠与结合 *C. indolis* 单菌小鼠粪便样品中的酶谱完全一致。*C. cocleatum* 则拥有活性高、底物范围广的酶系, 在体外可降解粘蛋白中的寡糖链, 但不降解其中的多肽, 而在结合 *C. indolis*、*C. cocleatum*、*Eubacterium sp.* 的三菌小鼠中, 由于 *C. cocleatum* 和 *Eubacterium sp.* 的协同作用, 粪便中原有的糖蛋白被降解并消失了。并

### 3. 屏障菌群作用机制研究

关于体内细菌间相互作用机制存在着多种假说, 但由于肠道菌群成分的复杂性, 皆未获得体内实验结果的证实。曾有学者认为挥发性脂肪酸(特别是丁酸)是抑制艰难梭菌肠道定植的因素, 但本文作者用含不同类型菌群的悉生动物及其他体外实验并未能重现这一结果。在屏障功能不同(有些可绝对抑制艰难梭菌的肠道定植, 有些仅能部分抑制艰难梭菌的定植)的动物组中, 其盲肠内含物中挥发性脂肪酸(特别是丁酸)的浓度差异并不显著。因此, 单靠肠道厌氧菌产生的挥发性脂肪酸并不足以抑制艰难梭菌在肠道中的定植。

在屏障菌群责任菌株的体内研究中发现, 只有当 *C. indolis* 首先在无菌小鼠肠道中定植后, *C. cocleatum* 才能定植, 最后定植的

且, 在 *C. cocleatum* 和 *Eubacterium sp.* 定植并保持其高数量后, *C. indolis* 就转变为三菌小鼠肠道菌群中的亚优势菌群成分。这些结果提示: *C. indolis* 首先定植的作用并不是提供 *C. cocleatum* 肠道定植所需的来自粘蛋白的营养成分, 而可能是修饰了肠道微生态系统中的氧化还原电势、pH 或使某些 *C. cocleatum* 定植所需的粘附位点得以暴露出来, 然后 *C. indolis* 和 *C. cocleatum* 再联合作用, 创造了极端氧敏感细菌 *Eubacterium sp.* 定植所需的厌氧环境, 此后再由 *C. cocleatum* 和 *Eubacterium sp.* 发挥对抗艰难梭菌肠道定植的菌群屏障作用。

因此, 屏障菌群与艰难梭菌相互作用的另一种可能机制是屏障菌群占据了艰难梭菌定植

所需的同一粘附位点(受体), 或通过其酶系的作用, 将粘蛋白降解, 从而使艰难梭菌失去了在粘蛋白上的粘附位点, 或产生了可抑制艰难梭菌增殖的抑(杀)菌物质。

#### 4. 抗生素对屏障菌群的作用

为了解抗生素对屏障菌群定植阻力的影响, 选择引起伪膜性结肠炎频率较高的氯林霉素(Clindamycin)和用以治疗伪膜性结肠炎的灭滴灵(Metronidazole)进行实验。将12只结合有热处理简化屏障菌群的悉生小鼠分成4组(3只动物/组), 并接受以下处理: 2.5 mg 氯林霉素/只·d, 7天(第1组); 1.9 mg 氯林霉素/只·d, 4周(第2组); 1.0 mg 灭滴灵/只·d, 7天(第3组); 饮用水(对照实验, 第4组)。给药结束后, 动物经口植入艰难梭菌 CdFD 菌株, 以验证菌群屏障是否受破坏。结果表明, 肠道菌群拮抗艰难梭菌定植屏障作用是否遭破坏与抗生素种类有关。氯林霉素处理会使动物暂时失去菌群屏障作用, 在接种 CdFD 后的第1周, CdFD 菌数保持在  $10^8$  CFU/g 粪便的高水平, 然后逐渐下降。而灭

滴灵处理组与对照组相同, CdFD 在接种后 48 小时内就下降到  $10^4$  CFU/g 粪便以下。

在另一实验中, 32 只悉生小鼠分别接受 2 周的氯林霉素(1.9 mg/只·d, 第1组, 共 16 只)、灭滴灵(1.0 mg/只·d, 第2组, 共 8 只)和饮用水(对照实验, 第3组, 共 8 只), 再转移至两个不同的无菌隔离器, 并分别接种 CdFD(弱毒株)和 VPI 10463(强毒株)。此时, 第1组动物又分成 2 小组, 其中 1 组在接受艰难梭菌接种物的同时还接受灭滴灵(1.0 mg/只·天, 第1组 B)。在艰难梭菌接种后 5、10、24 和 72 h 处死动物, 检查动物盲肠内含物中的艰难梭菌菌数和细胞毒素滴度(表 2)。该实验除证实氯林霉素处理对菌群屏障的破坏作用外, 还表明在艰难梭菌菌数达一定水平 ( $>10^8$  CFU/g 盲肠内含物)时, 可在动物盲肠中检测到细胞毒素, 而在菌群屏障受氯林霉素破坏的情况下, 灭滴灵可抑制艰难梭菌的肠道定植(如 CdFD)或将其抑制在一定的菌体水平, 使其不能产生毒素(如 VPI 10463)。这些结果为灭滴灵对伪膜性结肠炎的治疗机制提供了实

表 2 抗生素处理的悉生小鼠盲肠内含物中的艰难梭菌菌数和细胞毒素滴度\*

	接种 CdFD 后时间/h								接种 VPI 10463 后时间/h							
	5		10		24		72		5		10		24		72	
	CdFD	CT	CdFD	CT	CdFD	CT	CdFD	CT	CdVPI	CT	CdVPI	CT	CdVPI	CT	CdVPI	CT
第1组	8.52	—	9.65	$10^2$	8.08	$10^2$	8.26	$10^2$	7.30	—	8.30	$10^5$	8.30	$10^5$	8.60	$10^4$
第1组 B	8.32	—	7.87	—	6.20	—	2.00	—	7.60	—	7.90	—	7.48	—	7.30	—
第2组	6.93	—	6.64	—	4.18	—	2.30	—	7.30	—	6.85	—	3.60	—	4.30	—
第3组	6.30	—	5.18	—	3.86	—	2.30	—	7.00	—	6.78	—	4.85	—	2.90	—

\* CdFD 和 CdVPI: 艰难梭菌菌数(Ig/g 盲肠内含物); CT: 细胞毒素滴度; —: 未检出。

验依据。

#### 5. 关于抗生素疗法引发伪膜性结肠炎的假说

上述研究结果表明, 以作用于厌氧菌(肠道菌群的优势成份)的抗生素处理寄居有屏障菌群的无菌小鼠, 可使动物丧失对艰难梭菌肠道定植的拮抗能力, 使艰难梭菌在肠道中繁殖和定植; 后者菌数达到一定水平时, 还可在

动物盲肠中检测到艰难梭菌毒素; 停用抗生素后, 天然菌群屏障会逐渐恢复。根据这些结果, 结合已有文献报道, 可以假设: 抗生素直接作用于大肠内正常菌群(特别是其中的厌氧菌成份), 致使菌群屏障失去作用。艰难梭菌虽以较小比例存在于健康人的正常菌群内, 并且中断抗生素疗法, 可使天然菌群屏障得到恢复, 但在停用药物和菌群屏障恢复之前的这段

时间里,原来受正常菌群或抗生素抑制的内源艰难梭菌,或从环境中乘虚而入的外袭性艰难梭菌就容易在肠道中定植;如果定植的艰难梭菌为强毒株的话,就有可能在短时间内诱发诸如伪膜性结肠炎之类的肠道疾病。中国的抗生素应用广泛,伪膜性结肠炎之类的疾病也时有报道,应引起临床医生的重视。

### 参 考 文 献

- 1 Bartlett JG. *Clostridium difficile*: clinical consideration. Rev Infect Dis, 1990, 12 (Suppl 2): S 243-S 254
- 2 Su WJ, Bournaud M, Besnier MO *et al*. Transfer of hamster coecal flora to C 3 H germfree mice- utilization of this model to study the anti-*C. difficile* microflora. Microecol Ther, 1984, 14: 277-278
- 3 Su WJ, Bourlioux P, Bournaud M *et al*. Transfert de la flore caecale du hamster à la souris C 3 H axénique: utilisation de ce modèle pour étudier la flore de barrière anti-*C. difficile*. Can J Microbiol, 1986, 32: 132-136
- 4 Su WJ, Waechter MJ, Bourlioux P *et al*. Role of volatile fatty acids in colonization resistance to *C. difficile* in gnotobiotic mice. Infect Immun, 1987, 55: 1686-1691
- 5 苏文金. 肠道菌群对艰难梭菌拮抗作用的动

物模型研究. 厦门大学学报(自然科学版), 1988, 27: 578-582

- 6 Boureau H, Decre D, Popoff M *et al*. Isolation and identification of microflora resistant to colonization by *C. difficile*. Microecol Ther, 1989, 18: 117-120
- 7 Bourlioux P, Boureau H, Fourniat J *et al*. Les barrières anti-*C. difficile* In: *C. difficile* associated intestinal diseases Paris, Springer-Verlag. 1990, 95-104
- 8 Bourlioux P, Boureau H, Su WJ *et al*. Isolement et identification des souches responsables de la résistance à la colonisation par *C. difficile* sur un modèle expérimental. Méd Mal Infect, 1990, 20(hors serie): 63-66
- 9 苏文金. 抗生素在体内外对肠道厌氧菌的作用. 厦门大学学报(自然科学版), 1990, 29: 223-227
- 10 苏文金, Bourlioux P. 对引入仓鼠菌群的 C 3 H 无菌小鼠拮抗艰难梭菌定居实验模型的研究. 中国微生态学杂志, 1990, 2(2): 24-27
- 11 苏文金, Bourlioux P. 抗生素在体内外对厌氧菌和艰难梭菌细胞毒素生成的作用. 中国微生态学杂志, 1992, 4(2): 4-9
- 12 Barc MC, Depitre C, Corthier G *et al*. Effect of antibiotics and other drugs on toxin production in *C. difficile* in vitro and in vivo. Antimicrob Agents Chemother, 1992, 36: 1332-1335