

慢性肝病患者中小肠细菌过度生长的研究

黄梦雪¹, 陈刚¹, 王鹏², 曹世国¹, 许建明¹, 梅俏¹, 洪汝涛¹, 张卫平¹

摘要 目的 利用乳果糖氢呼气试验(LHBT)检测肝硬化和慢性肝炎肝纤维化(CHF)患者中小肠细菌过度生长(SIBO)的发生率,探讨其与炎症因子及氧化应激相关指标的关系。方法 选取38例CHF患者和60例肝硬化患者以及31例健康对照组,利用LHBT的方法评估各组SIBO发生率。然后将受试者分为SIBO阳性组和SIBO阴性组,比较两组间临床症状和实验室检查,并检测其血清脂多糖(LPS)、白细胞介素(IL)-6、肿瘤坏死因子(TNF)- α 、IL-10水平以及二胺氧化酶(DAO)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽(GSH)、过氧化氢酶(CAT)水平,并对所检测的LPS、IL-6、TNF- α 、IL-10、DAO、SOD、GSH、CAT的浓度与LHBT集值的相关性进行统计学分析。结果 ① CHF组和肝硬化组以及对照组SIBO阳性率分别为36.84%、60.00%和9.68%,差异有统计学意义($P < 0.01$); ② SIBO阳性组患者和阴性组患者在Child-Pugh(CTP)分级及腹水的表现上差异有统计学意义($P < 0.05$); ③ SIBO阳性患者血清中LPS、IL-6、DAO、CAT、SOD水平高于SIBO阴性患者($P < 0.05$),IL-10、TNF- α 以及GSH水平与SIBO阴性组差异无统计学意义; ④ 患者LHBT集值与LPS、IL-6、DAO、SOD、CAT呈正相关($P < 0.05$),与TNF- α 、IL-10、GSH的相关性差异无统计学意义。结论 CHF以及肝硬化患者较健康对照组更易发生SIBO,且与外周血中多种炎症因子和氧化应激指标水平升高相关。SIBO可能通过肠道菌群失调导致的炎症反应和氧化应激等途径加重CHF和肝硬化患者的病情变化。

关键词 肝硬化; 小肠细菌过度生长; 呼气试验; 氧化应激; 肠道菌群

中图分类号 R 575.2; R 574

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2022)07-1134-04
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.07.022

肝硬化是一种常见的消化系统疾病,它是各种慢性肝病发展的终末阶段,以肝脏弥漫性纤维化、假小叶形成为特征^[1]。近年来研究^[2-3]表明肝纤维

化的发生以及肝硬化发病与肠道菌群失调有着密切关系。肠道菌群是指在小肠内各种细菌的统称,它在宿主的消化、代谢、免疫等功能中发挥重要作用。小肠细菌过度生长(small intestinal bacterial overgrowth, SIBO)是指小肠菌群的密度增加和组成类型的改变^[4]。该研究旨在通过乳果糖氢呼气试验(lactulose hydrogen breath test, LHBT)的方法初步检测SIBO在慢性肝炎肝硬化(chronic hepatitis fibrosis, CHF)以及肝硬化患者中的发生率,并通过检测炎症因子及氧化应激相关指标水平及其与LHBT集值的相关分析来揭示可能参与的SIBO发生的分子机制。

1 材料与方法

1.1 病例资料 选取2018年9月—2019年9月在安徽医科大学第一附属医院就诊的CHF患者和肝硬化患者,其诊断基于病史、临床症状和体征、生化病理学检查和影像学检查。

排除标准包括:①入院前4周内使用抗生素或益生菌;②入院前2周内服用促动力药;③2周内急性上消化道出血;④4周内结肠镜检查 and 灌肠;⑤患有严重的呼吸系统疾病或其他可能影响胃肠动力疾病;⑥胃肠切除术既往史(不包括阑尾切除术)。经过筛查,共有38例CHF患者和60例肝硬化患者符合入组标准。另选择31例健康对照组:年龄与以上两组相近;无明确的消化道疾病既往史;无呼吸系统疾病如哮喘、慢性阻塞性肺疾病等;无长期服用药物史;近1年内无大量吸烟史、饮酒史。

1.2 主要试剂与仪器 乳果糖口服溶液(商品名杜密克)购自美国雅培制药有限公司,LPS检测试剂盒购自武汉优尔生科技股份有限公司,IL-6、TNF- α 、IL-10、DAO、CAT、SOD、GSH检测试剂盒购自南京建成生物科技有限公司,Sunvou-P200型纳库仑呼气分析仪购自无锡尚沃医疗公司。

1.3 LHBT实验 LHBT按照罗马会议共识建议的标准^[5]进行。要求受试者实验前24 h内避免食用高产氢的食物,并注意避免过饱;空腹至少12 h;

2022-01-22 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81700521)

作者单位:¹安徽医科大学第一附属医院消化内科,合肥 230022

²安徽医科大学基础医学院,合肥 230032

作者简介:黄梦雪,女,硕士研究生;

张卫平,男,博士,主治医师,硕士生导师,责任作者,E-mail: zw0202@163.com

测试开始前避免剧烈运动,以减少对肠蠕动和肺通气的影响。研究选用无锡尚沃医疗公司研发的 Sunvou-P200 型纳库仑呼气分析仪,该仪器可同时检测呼气中的氢气和甲烷的浓度。呼气样本中的氢气、甲烷浓度以 ppm(百万分之一)表示。首先使用标准气体进行校准,测试基础呼气中氢气、甲烷浓度后嘱患者快速服下乳果糖溶液 10 g,30 min 后测量 1 次,持续 3 h,记录各时间点氢气和甲烷的浓度数值,并将测得的氢气浓度相加计作 LHBT 集值^[6]。

1.4 诊断标准 参考北美共识会议^[7]结论现拟定以下诊断标准:①基础呼气中氢气浓度 ≥ 20 ppm 或甲烷 ≥ 10 ppm,且每隔 30 min 复测,氢气浓度均 ≥ 20 ppm 或甲烷浓度 ≥ 10 ppm;②服用乳果糖后,出现典型的氢气双峰图形(小肠峰和结肠峰),第 1 个峰起始点在 90 min 之前出现,较空腹值至少升高 12 ppm。符合上述二者之一的即为 SIBO 阳性,反之则为 SIBO 阴性。

1.5 血清学指标检测 采集受试者空腹静脉血 2 ml,静置 30 min 后分离出血清(4℃、1 200 r/min,5 min),置于-80℃冰箱保存。血清学指标检测严格根据试剂盒说明书执行。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 23.0 统计软件进行数据分析,检测数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。对计量资料进行独立性检验时采用 *t* 检验,计数资料采用 χ^2 检验。进行相关性分析时,符合正态分布时采用 Pearson 相关分析,不符合正态分布时采用 Spearman 相关分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般资料 共纳入对照组共 31 例,CHF 组 38 例,肝硬化患者 60 例。3 组受试者性别、年龄以及 BMI 间分布差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 对照组、CHF 组和肝硬化组资料的比较($\bar{x} \pm s$)

项目	对照组	CHF 组	肝硬化组	F/χ^2 值	<i>P</i> 值
性别				0.747	0.688
男	21	26	45		
女	10	12	15		
年龄(岁)	46.7±8.8	49.5±10.4	51.6±8.6	2.871	0.060
BMI(kg/m ²)	23.14±2.80	22.38±2.32	21.40±2.96	2.851	0.064

2.2 对照组、CHF 组和肝硬化组 SIBO 发病率的比较 肝硬化组 SIBO 率高于 CHF 组,两组均高于对照组的 SIBO 阳性率,差异有统计学意义($\chi^2 = 21.785, P < 0.01$)。受试者 SIBO 阳性者和阴性者

在性别、年龄、BMI、门静脉血栓、白蛋白上的差异无统计学意义($P > 0.05$),而 SIBO 阳性组的腹水发生率高于 SIBO 阴性组,CTP 分级中 B/C 级 SIBO 的发生率高于 A 级中 SIBO 的发生率,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2、3。

表 2 对照组、CHF 组和肝硬化组 SIBO 阳性率

组别	SIBO		合计	阳性率(%)
	阳性(<i>n</i>)	阴性(<i>n</i>)		
对照	3	28	31	9.68
CHF	14	24	38	36.84
肝硬化	36	24	60	60.00

表 3 SIBO 阳性组和阴性组各项指标的比较($\bar{x} \pm s, n(\%)$)

项目	SIBO 阳性组 (<i>n</i> = 53)	SIBO 阴性组 (<i>n</i> = 76)	<i>t</i> / χ^2 值	<i>P</i> 值
性别			0.006	0.936
男	38	54		
女	15	22		
年龄(岁)	51.75±8.39	51.42±9.03	0.146	0.884
BMI(kg/m ²)	22.01±1.77	22.11±2.10	0.198	0.844
CTP 分级(<i>n</i>)			5.127	0.024
A	25(32.9)	51(67.1)		
B/C	28(52.8)	25(47.2)		
门静脉血栓	5(9.4)	3(3.9)	2.057	0.152
腹水	34(64.1)	33(43.4)	5.055	0.025
白蛋白(g/L)	35.15±4.63	35.49±4.52	0.280	0.780

2.3 血清炎症因子和氧化应激指标的比较 对肝硬化 SIBO 阳性组和阴性组受试者血清中内毒素(LPS)和 IL-6、IL-10、TNF- α 进行比较,结果显示 SIBO 阳性组血清中 TNF- α 和 IL-10 的水平与阴性组差异无统计学意义($P > 0.05$),LPS 和 IL-6 水平前者高于后者,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

在所检测的氧化应激指标方面,SIBO 阳性组血清中的 GSH 浓度与阴性组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),而血清中 DAO、SOD、CAT 浓度则高于阴性组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 4。

表 4 血清炎症因子和氧化应激指标的比较($\bar{x} \pm s$)

项目	SIBO 阳性组	SIBO 阴性组	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
LPS(pg/ml)	45.92±8.21	40.39±6.76	2.702	0.009
TNF- α (ng/L)	380.29±51.70	367.07±68.53	0.820	0.416
IL-6(ng/L)	31.13±7.00	26.09±5.51	2.568	0.014
IL-10(ng/L)	18.71±4.52	16.66±3.63	1.586	0.120
DAO(μ g/L)	85.90±30.15	56.96±27.63	3.945	0.009
SOD(μ g/L)	5.95±2.80	4.50±2.19	2.424	0.018
GSH(mg/L)	2.06±0.30	2.09±0.25	0.402	0.689
CAT(μ g/L)	2.71±0.80	2.26±0.81	2.090	0.041

2.4 LHBT 集值与炎症因子和氧化应激指标的相关性分析 将患者的 LHBT 集值与 LPS、TNF- α 、IL-6 及 IL-10 作相关分析 结果表明患者 LHBT 集值与 LPS 和 IL-6 呈正相关($P < 0.05$) 与 TNF- α 及 IL-10 无明显相关($P > 0.05$)。将患者的 LHBT 集值与氧化应激指标 DAO、SOD、GSH 及 CAT 作相关性分析, 结果显示 LHBT 集值与 DAO、SOD、CAT 呈正相关($P < 0.05$) 与 GSH 无明显相关($P > 0.05$)。见表 5。

表 5 LHBT 集值与炎症因子和氧化应激指标的相关性分析

项目	LPS	TNF- α	IL-6	IL-10	DAO	SOD	GSH	CAT
r 值	0.699	0.281	0.563	0.301	0.442	0.356	0.103	0.392
P 值	<0.010	0.102	<0.010	0.079	<0.010	0.036	0.556	0.020

3 讨论

目前全球约有 20 亿人感染 HBV, 预计其中 10% ~ 20% 终将转化为肝硬化甚至肝癌, 严重威胁人类健康^[8]。当肝脏病变乃至肝硬化时, 患者肠道蠕虫减慢、胃内 pH 升高、胆汁酸分泌减少等会导致 SIBO 及菌群易位。LHBT 是一种无创的诊断 SIBO 的方法, 通过检测结肠内菌群对碳水化合物酵解产生并随呼吸排出(肠道内产生的氢气约 14% ~ 20% 由肺排出) 的氢气浓度初步判断肠道内菌群的状态(此外约有 30% 成人肠道内含有产甲烷菌, 可消耗氢气生成甲烷, 因此同时检测呼气中的氢气和甲烷能提高 SIBO 的检出率^[9])。国外文献^[10]报道基于以小肠抽吸液菌落计数的结果为参照, LHBT 的敏感性可达 86% 特异性可达 78% ~ 100%, 说明其检测结果与既往的“金标准”检测结果基本一致。正常情况下, 乳糖后被结肠内细菌分解产生氢气, 若此时进行 LHBT 会出现氢呼气单峰; 而存在 SIBO 时呼气中氢浓度提前升高或出现双峰图形(表明底物在小肠内被提前酵解)。

该研究结果显示肝硬化组 SIBO 的发生率高于 CHF 组, 均高于对照组。另外肝硬化 SIBO 阳性组肝硬化病变严重程度及腹水的发生率高于阴性组($P < 0.05$) , 这与 Pande et al^[11] 的研究结果相似。此外, Pande et al^[11] 的研究表明血清胆红素水平 ≥ 2 mg/dl 且合并腹水的肝硬化患者患 SIBO 的概率达 82% , 而此两者均不存在的肝硬化患者发生 SIBO 的概率仅为 10%。这表明此两项指标在氢呼气试验以及不能进行空肠抽吸的情况下对于预测 SIBO 的存在有一定的帮助。

该研究结果显示 SIBO 阳性组患者血浆中的内

毒素、IL-6 水平高于 SIBO 阴性组, 而 IL-10、TNF- α 在两组间差异无统计学意义。血清中内毒素升高可导致肝细胞对 K⁺ 的通透性增高, 使线粒体肿胀进而导致 ATP 生成受阻, 引起肝细胞肿胀坏死。Toll 样受体(TLR) 是一种重要的模式识别受体, 通过识别多种细菌、病毒等的相关结构成分来激活免疫反应。其中 TLR4 作为 LPS 的天然配体, 当血清中 LPS 升高时结合 CD14 作用于固有免疫细胞表面的 TLR4 经 MyD88 依赖性信号途径和 MyD88 非依赖性信号途径, 刺激引发炎症级联反应, 造成各种促炎症介质如 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 等增多^[12], 对肝脏造成进一步的损害。此外细菌 DNA 介导的巨噬细胞活化会导致 TNF- α 、IL-6 和 IL-12 的合成, 后两种细胞因子能激活 B 细胞以及 T 细胞并通过自然杀伤细胞的激活来调节 IFN- γ 的产生。由于 IFN- γ 受体也在巨噬细胞表面表达, IFN- γ 水平的增加进一步促进了 TNF- α 的产生, 并上调了诱导型一氧化氮合酶(iNOS) 基因的转录, 导致巨噬细胞一氧化氮(NO) 合成能力的增加^[13]。NO 的增高使胃肠道及血管平滑肌膜电位超极化, 致使胃肠平滑肌的松弛及局部淤血的发生, 从而导致肠蠕动的减慢, 增加肠道细菌及毒素的吸收, 进一步加重肝硬化患者肝功能的损害从而形成恶性循环^[14]。

DAO 是广泛存在于小肠黏膜上层绒毛细胞中高度活性的细胞内酶。生理条件下, 血液中 DAO 含量很低, 肠道被损伤后肠道绒毛上皮细胞将其释放并进入血液循环, 血液中 DAO 含量与肠黏膜损伤程度呈正相关^[15]。因此, SIBO 阳性患者体内 DAO 浓度升高佐证了肠道菌群的增加损伤肠黏膜使其通透性增加。CAT、SOD 等是体内主要的抗氧化酶, 在消除 ROS 的过程中起重要作用。CAT 活性的增加可以抵御氧化应激对红细胞膜的有害影响, 而 SOD 和 CAT 活性的增高可能是抑制脂质过氧化导致自由基扩增的一种保护机制。

参考文献

- [1] 徐小元, 丁惠国, 李文刚, 等. 肝硬化诊治指南[J]. 中华肝脏病杂志 2019 27(11): 846-65.
- [2] Sanduzzi Z M, Rocco A, Compare D, et al. The gut microbiota: a new potential driving force in liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma[J]. United European Gastroenterol J 2017 5(7): 944-53.
- [3] Giannelli V, Di Gregorio V, Jebba V, et al. Microbiota and the gut-liver axis: bacterial translocation, inflammation and infection in cirrhosis[J]. World J Gastroenterol 2014 20(45): 16795-810.
- [4] Ghosh G, Jesudian A B. Small intestinal bacterial overgrowth in

- patients with cirrhosis [J]. *J Clin Exp Hepatol* 2019 ,9(2) : 257 - 67.
- [5] Gasbarrini A , Corazza G R , Gasbarrini G , et al. Methodology and indications of H₂-breath testing in gastrointestinal diseases: the rome consensus conference [J]. *Aliment Pharmacol Ther* , 2009 , 29: 1 - 49.
- [6] 马英杰 , 高晓 , 周东晓 , 等. 肝硬化患者小肠细菌过度生长与外周血内毒素水平、TLR2、TLR4 表达的关系 [J]. *医学研究杂志* , 2018 ,47(4) : 130 - 3.
- [7] Rezaie A , Buresi M , Lembo A , et al. Hydrogen and methane-based breath testing in gastrointestinal disorders: the north american consensus [J]. *Am J Gastroenterol* , 2017 ,112(5) : 775 - 84.
- [8] 陈萌萌 , 郑吉顺 , 刘艳艳 , 等. 慢性乙型肝炎以及肝硬化患者肠道微生物研究 [J]. *安徽医科大学学报* 2015 ,50(5) : 648 - 52.
- [9] Rao S S C , Bhagatwala J. Small intestinal bacterial overgrowth: clinical features and therapeutic management [J]. *Clin Transl Gastroenterol* 2019 ,10(10) : e00078.
- [10] Khoshini R , Dai S C , Lezcano S , et al. A systematic review of diagnostic tests for small intestinal bacterial overgrowth [J]. *Dig Dis Sci* , 2008 , 53(6) : 1443 - 54.
- [11] Pande C , Kumar A , Sarin S K. Small-intestinal bacterial overgrowth in cirrhosis is related to the severity of liver disease [J]. *Aliment Pharmacol Ther* 2009 ,29(12) : 1273 - 81.
- [12] Seki E , Schnabl B. Role of innate immunity and the microbiota in liver fibrosis: crosstalk between the liver and gut [J]. *J Physiol* , 2012 ,590(3) : 447 - 58
- [13] Francés R , Muñoz C , Zapater P , et al. Bacterial DNA activates cell mediated immune response and nitric oxide overproduction in peritoneal macrophages from patients with cirrhosis and ascites [J]. *Gut* , 2004 , 53(6) : 860 - 4.
- [14] Enomote N , Ikejima K , Bradford B U , et al. Role of kupffer cells and gut-derived endotoxins in alcoholic liver injury [J]. *J Gastroenterol Hepatol* 2000 ,15: 20 - 5.
- [15] 章波 , 伊贝拜汗·买买提 , 张焯 , 等. 维持性血液透析患者合并血流感染的影响因素及病原菌特点 [J]. *广西医学* 2019 (12) : 1481.

Study of intestinal bacterial overgrowth in patients with chronic liver disease

Huang Mengxue¹ , Chen Gang¹ , Wang Peng² , Cao Shiguo¹ , Xu Jianming¹ ,
Mei Qiao¹ , Hong Rutao¹ , Zhang Weiping¹

(¹*Dept of Gastroenterology , The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University , Hefei 230022;*

²*Basic Medical College , Anhui Medical University , Hefei 230032)*

Abstract Objective To detect the difference in the incidence of small intestinal bacterial overgrowth (SIBO) in patients with liver cirrhosis and chronic hepatitis fibrosis (CHF) with the lactulose hydrogen breath test (LHBT) , and to explore the relationship between SIBO and inflammatory factors and oxidative stress related indicators. **Methods** LHBT was performed on 38 CHF patients , 60 cirrhosis patients and 31 healthy controls to evaluate the incidence of SIBO. The patients were further divided into SIBO-positive and negative group. Then we compared related clinical symptoms and laboratory tests between the two groups and detected lipopolysaccharide (LPS) , interleukin (IL)-6 , tumor necrosis factor (TNF)- α , IL-10 level , and several kinds of oxidative stress indicators such as diamine oxidase (DAO) , superoxide dismutase (SOD) , glutathione (GSH) , catalase (CAT) . Statistical analysis was conducted to analyze the correlation between the concentration of LPS , IL-6 , TNF- α , DAO , SOD , GSH , CAT and LHBT summation value. **Results** ① The positive rate of SIBO in CHF group , cirrhosis group and control group was 36.84% , 60.00% and 9.68% , respectively. The difference was statistically significant ($P < 0.01$) . ② The differences in CTP classification and ascites were statistically significant between the two subgroups with and without SIBO ($P < 0.05$) . ③ The levels of LPS , IL-6 , CAT , DAO and SOD in SIBO-positive group were higher than those in negative group ($P < 0.05$) . However , the concentrations of IL-10 , TNF- α and GSH were similar between the two groups. ④ The LHBT summation value was positively correlated with the concentrations of LPS , IL-6 , DAO , SOD and CAT in serum ($P < 0.05$) , but had no significant correlation with TNF- α , IL-10 and GSH. **Conclusion** Compared with healthy controls , CHF and cirrhosis patients are more likely to develop SIBO. It is also related to the increase of inflammatory factors and oxidative stress indexes in peripheral blood. SIBO may aggravate the inflammatory response of CHF and cirrhosis patients through intestinal flora dysregulation and oxidative stress , thus aggravating the disease change.

Key words cirrhosis; small intestinal bacterial overgrowth; breath test; oxidative stress; gut microbiota