

## 慢性乙型肝炎以及肝硬化患者肠道微生物研究

陈萌萌<sup>1,2</sup>, 郑吉顺<sup>3</sup>, 刘艳艳<sup>2</sup>, 李家斌<sup>1</sup>

**摘要** 目的 探讨慢性乙型肝炎以及肝硬化患者的肠道菌群变化及其与细胞因子、肝功能之间的关系。方法 选取30例健康志愿者、50例肝炎后肝硬化患者以及50例慢性乙型肝炎患者,采用实时荧光定量PCR法检测粪便中九种肠道菌群含量,比较三组间肠道菌群变化;同时采用ELISA法检测慢性乙型肝炎患者血清中细胞因子如白介素-17A(IL-17)、白介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )、白介素-6(IL-6)、干扰素- $\alpha$ (INF- $\alpha$ )、CXC趋化因子(CXCL13)的浓度,分析肠道菌群与细胞因子以及肝功能之间的关系。结果 与健康对照组相比,慢性乙型肝炎以及肝硬化患者体内的双歧杆菌、乳酸杆菌、拟杆菌属以及瘤胃球菌属含量减少;肠杆菌科细菌、肠球菌、梭菌属、白色念珠菌以及普雷沃氏菌含量明显增加。慢性乙型肝炎患者体内的肠杆菌科细菌与凝血酶原时间(PT)呈正相关性,肠球菌与谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)呈正相关性;双歧杆菌与AST、碱性磷酸酶(AKP)以及HBV DNA水平呈负相关性,普雷沃氏菌属与AST、AKP以及PT呈负相关性,拟杆菌属与AST和PT呈负相关性,瘤胃球菌属与白蛋白(ALB)呈负相关性。另外9种肠道菌群中只有肠球菌与IL-17A呈正相关性。结论 慢性乙型肝炎以及肝硬化患者体内存在不同程度的肠道菌群失调,其中乙肝患者体内过度繁殖的肠球菌与IL-17A协同参与肝脏炎症反应过程,以致于肝功能受损呈恶性循环状态。

**关键词** 慢性乙型肝炎; 肠道微生物; 肝功能; 细胞因子  
中图分类号 R 512.6

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)05-0648-05

肠道菌群寄居在人体胃肠道内各个部位,是一个种类繁多、动态变化的微生物群体。随着对“肠-肝轴”概念的深入认知以及肠道微生态学研究的不断进展,肠道菌群与慢性肝病的关系引起了广泛的关注。既往研究<sup>[1-2]</sup>表明,慢性乙型肝炎患者的肝脏功能受到损伤后,可通过肠-肝轴改变胆汁的分泌、减少肠道的血供和蠕动等因素,导致肠道黏膜

的破坏和肠道菌群失衡。但究竟是哪种肠道微生物在肝病发生发展中起着关键作用,其作用机制与细胞因子是否有关联,目前尚不明确。该研究采用荧光定量PCR法检测正常人、慢性乙型肝炎以及肝炎后肝硬化患者的肠道菌群,旨在阐明肠道菌群在肝病发展中所起的作用,并且对慢性乙型肝炎患者的肠道菌群与细胞因子以及肝功能之间的关系作进一步探讨。

## 1 材料与方法

**1.1 标本来源** 50例慢性乙型肝炎患者和50例肝炎后肝硬化患者的粪便标本来源于安徽医科大学第一附属医院2012年7月~2014年2月住院患者,30例健康志愿者的粪便标本来源于安徽医科大学第一附属医院体检中心(所有研究对象均签署知情同意书并上报医院伦理委员会批准),临床诊断符合2011年版中华医学会肝病学分会、中华医学会感染病学分会联合修订的《慢性乙型肝炎防治指南》诊断标准。病例入选条件:血清学乙肝标志物表面抗原阳性病史超过6个月,现在或曾有过肝功能异常,排除合并其他原因引起的肝功能损害;患者两周内未服用任何护肝抗病毒的药以及抗生素。研究对象的临床资料比较见表1。

表1 3组人群临床资料比较( $\bar{x} \pm s$ )

| 项目                 | 健康对照组            | 慢性乙型肝炎组            | 肝炎后肝硬化组             |
|--------------------|------------------|--------------------|---------------------|
| 人数(n)              | 30               | 50                 | 50                  |
| 性别(男/女)            | 14/16            | 16/34              | 12/38               |
| 年龄(岁)              | 36.5 $\pm$ 10.7  | 40.8 $\pm$ 14.7    | 53.2 $\pm$ 11.3     |
| 粪便湿重(g)            | 198.4 $\pm$ 23.9 | 200.4 $\pm$ 21.2   | 201.4 $\pm$ 23.2    |
| TBIL( $\mu$ mol/L) | 12.7 $\pm$ 3.2   | 45.6 $\pm$ 43.4*   | 101.4 $\pm$ 157.0*  |
| ALT(U/L)           | 23.9 $\pm$ 5.8   | 682.8 $\pm$ 668.9* | 117.3 $\pm$ 225.9*# |
| AST(U/L)           | 21.8 $\pm$ 4.0   | 548.5 $\pm$ 609.2* | 123.3 $\pm$ 173.0*# |
| ALB(g/L)           | 47.9 $\pm$ 2.7   | 39.9 $\pm$ 4.2*    | 31.5 $\pm$ 7.9*#    |
| GGT(U/L)           | 24.7 $\pm$ 7.6   | 128.8 $\pm$ 78.3*  | 119.7 $\pm$ 143.3*  |
| AKP(U/L)           | 60.9 $\pm$ 9.7   | 111.4 $\pm$ 57.1*  | 151.3 $\pm$ 94.7*#  |
| PT(s)              | 12.0 $\pm$ 0.4   | 14.1 $\pm$ 2.2     | 17.6 $\pm$ 14.0*    |
| HBV DNA水平(IU/ml)   | —                | 6.7 $\pm$ 13.0     | 6.8 $\pm$ 14.0      |

与健康对照组比较:\* $P < 0.05$ ;与慢性乙型肝炎组比较:# $P < 0.05$ ;TBIL:总胆红素;ALT:谷丙转氨酶;AST:谷草转氨酶;ALB:白蛋白;GGT:谷氨酰转氨酶;AKP:碱性磷酸酶;PT:凝血酶原时间

2015-01-22 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81172737)

作者单位:<sup>1</sup>安徽医科大学第一附属医院感染科,合肥 230022

<sup>2</sup>安徽省细菌耐药监控中心,合肥 230022

<sup>3</sup>合肥市第一人民医院感染科,合肥 230012

作者简介:陈萌萌,女,硕士研究生;

李家斌,男,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: lijiabin948@vip.sohu.com

1.2 标本采集 清晨采集隐血实验阴性并且未被尿液污染的尾便于无菌容器中 将粪便搅匀后,用电子天平称取 200 mg 分装于无菌 EP 管中保存于 -80 °C 待用。另外采集慢性乙型肝炎患者空腹静脉血 3 ml 分离血清后 -20 °C 冷冻保存待测。

1.3 试剂与仪器 QIAamp DNA Stool Mini Kit 试剂盒、Rotor-Gene3000 荧光定量 PCR 仪购自德国 Qia-gen 公司; TaKaRa SYBR® Premix Ex Taq II 试剂盒、TaKaRa Taq 酶、TaKaRa Easy dilution、TaKaRa Mini-BEST Agarose Gel DNA Extraction Kit 试剂盒以及 pMD™18-T Vector 购自大连宝生物有限公司; 细胞因子试剂盒购自武汉新启迪生物有限公司; TProfessional Thermocycler PCR 仪购自德国 Biometra 公司; Tanon 5200 multi 凝胶成像系统购自上海天能公司; Multiskan MK3 酶标仪购自上海 Thermo Fisher 公司。

#### 1.4 方法

1.4.1 粪便总 DNA 的抽提 使用 QIAamp DNA Stool Mini Kit 试剂盒法抽提粪便总 DNA。将 200 mg 粪便与缓冲液 ASL 混匀,置于 95 °C 水浴 5 min,加入 EXTablet 抑制剂,室温静置后加入蛋白酶 K 和缓冲液 AL。用乙醇沉淀 DNA 过柱洗脱后溶解于 70 μl AE 中,-80 °C 保存备用(具体抽提过程严格按照试剂盒说明书要求进行)。

1.4.2 常规 PCR 反应 9 种肠道菌群的引物均参照相关文献<sup>[3-6]</sup>,并用 BLAST 软件在线核实其特异性后,由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。引物序列见表 2。以提取的粪便总 DNA 为模板,采用 25 μl 反应体系: 10 × PCR Buffer 2.5 μl ,dNTP (2.5 mmol/L) 2 μl ,上、下游引物各 1 μl ,Taq 酶(5 U/μl) 0.2 μl ,模板 DNA 1 μl ,ddH<sub>2</sub>O 17.5 μl。扩增反应条件:94 °C 预变性 8 min 94 °C 变性 1 min 退火 45 s 72 °C 延伸 30 s(双歧杆菌 45 s) 循环 32 次,72 °C 后延伸 10 min 4 °C 保存。取 PCR 反应产物进行 1 % 琼脂糖凝胶电泳,于凝胶成像系统中分析扩增结果。

1.4.3 标准品质粒的构建 将 PCR 扩增产物进行切胶回收纯化并与 pMD™18-T 载体连接,转化到 JM109 感受态细胞中,经蓝白斑筛选,随机挑取 4 个白色克隆。菌落 PCR 鉴定得到阳性克隆后,提取并纯化质粒 DNA,送至大连宝生物工程有限公司测序。用紫外分光光度计准确定量后,根据以下公式计算出其拷贝数,进行 10 倍梯度稀释,作为标准品

保存于 -20 °C 备用。

$$\text{拷贝数}(\text{copies}/\mu\text{l}) = \frac{6.03 \times 10^{23} \text{ copies/mol}}{\text{MW}(\text{g/mol})} \times \text{concentration}(\text{g}/\mu\text{l})$$

$$\text{MW} = \text{size in bp} \times 660 \text{ g} / (\text{mol bp})$$

表 2 9 种肠道菌群的引物序列以及 PCR 反应条件

| 肠道菌群   | 引物序列(5'-3')                        | 片段长度 (bp) | 退火温度 |
|--------|------------------------------------|-----------|------|
|        |                                    |           | (°C) |
| 肠杆菌科细菌 | F: CATTGACGTTACCCGGCAGAGAAGC       | 195       | 55   |
|        | R: CTCTACGAGCTCAAGCTTGC            |           |      |
| 肠球菌    | F: CCCTTATTGTTAGTTGCCATCATT        | 144       | 54   |
|        | R: ACTCGTTGTTACTCCCATGT            |           |      |
| 双歧杆菌   | F: CTCCTGGAAACGGGTGG               | 550       | 52   |
|        | R: GGTGTCTTCCCGATATCTAC            |           |      |
| 乳酸杆菌   | F: AGCAGTAGGAATCTTCCA              | 341       | 52   |
|        | R: CACCGCTACACATGGAG               |           |      |
| 梭菌属    | F: AAATGACGGTACCTACTAA             | 440       | 50   |
|        | R: GC clamp-CTTTGAGTTTCATTCTTGCGAA |           |      |
| 白色念珠菌  | F: TTTATCAACTGTACACCCAGA           | 273       | 50   |
|        | R: ATCCCGCCTTACCCTACCG             |           |      |
| 普雷沃氏菌属 | F: GAAGGTCGCCCCACATGG              | 418       | 53   |
|        | R: CAATCGGAGTTCTTCTGTG             |           |      |
| 拟杆菌属   | F: TCAGTGTGAAAAGTTTGGG             | 287       | 53   |
|        | R: GC clamp-GTRTATCGGMAACAGCGA     |           |      |
| 瘤胃球菌属  | F: GGTGGCAAAGCCATTCCGT             | 182       | 53   |
|        | R: GTTACGGGACGCTCAGAG              |           |      |

GC clamp 是 CGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCC

1.4.4 标准曲线的建立 以 10 倍梯度稀释的质粒标准品为模板进行实时荧光定量 PCR。采用 20 μl 反应体系: SYBR Premix Ex Taq II 10 μl 模板 2 μl ,上、下游引物各 0.8 μl ,DEPC-ddH<sub>2</sub>O 6.4 μl。PCR 扩增程序为:95 °C 预变性 30 s ; 95 °C 变性 8 s 退火 20 s 72 °C 10 s(拟杆菌属、乳酸杆菌、白色念珠菌 20 s ,普雷沃氏菌属以及双歧杆菌 30 s) ,循环 40 次。用起始模板拷贝数的 lg 值对每个稀释标准品的 CT 值绘图,最终得到标准曲线。

1.4.5 肠道菌群的定量检测 实时荧光定量 PCR 反应体系及反应条件同上,对研究对象的 DNA 样品进行检测,同时设置空白对照。每个样品要设置复孔并取平均值(复孔 CT 值相差不得超过 0.5) 根据测得的 CT 值与标准曲线得到样品中 DNA 拷贝数。

1.4.6 细胞因子的检测 按照 ELISA 试剂盒说明书检测血清中细胞因子白介素 (interleukin ,IL) -17A、IL-1、IL-6、干扰素-α (interferon-α ,INF-α) 、CXC 趋化因子 13(C-X-C motif chemokine 13 ,CXCL13) 水平,并用酶标仪记录这些细胞因子的浓度。

**1.5 统计学处理** 用 SPSS 16.0 统计软件进行分析,定量检测所得的 DNA 拷贝数经对数转换后以  $\bar{x} \pm s$  表示,两组间比较采用 *t* 检验,多组资料比较采用单因素方差分析,两两指标的相关性采用 Pearson 相关性分析。

**2 结果**

**2.1 引物特异性检测** 用 1% 琼脂糖凝胶电泳分析常规 PCR 产物,以 Marker 为标准。可见常规 PCR 产物均显示特异性条带,与目的 DNA 片段长度相吻合。见图 1。

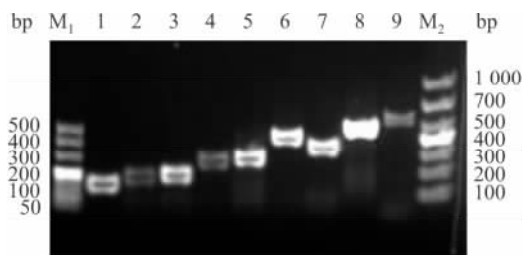


图 1 常规 PCR 产物凝胶电泳图

M<sub>1</sub>: DL500 DNA Marker; M<sub>2</sub>: DL1 000 DNA Marker; 1: 肠球菌 (144 bp); 2: 瘤胃球菌 (182 bp); 3: 肠杆菌科细菌 (195 bp); 4: 白色念珠菌 (273 bp); 5: 拟杆菌属 (287 bp); 6: 乳酸杆菌 (341 bp); 7: 普雷沃氏菌属 (418 bp); 8: 梭菌属 (440 bp) 9: 双歧杆菌 (550 bp)

**2.2 3 组间肠道菌群的比较** 与健康对照组相比,慢性乙型肝炎组和肝炎后肝硬化组的肠杆菌科细菌、肠球菌、梭菌属、白色念珠菌以及普雷沃氏菌属计数均显著增加 ( $P < 0.05$ ); 而双歧杆菌、拟杆菌属以及瘤胃球菌属计数均显著减少 ( $P < 0.05$ )。从 DNA 拷贝数来看,肝炎后肝硬化组的变化趋势远比慢性乙型肝炎组明显。慢性乙型肝炎组的乳酸杆菌数量比健康对照组显著减少 ( $P < 0.001$ ); 肝炎后肝

硬化组的乳酸杆菌数量虽然比健康对照组有所减少,但两组间差异无统计学意义。另外,肝炎后肝硬化组的乳酸杆菌和瘤胃球菌属的数量明显高于慢性乙型肝炎组 ( $P < 0.05$ ),其它菌属比较两组间差异无统计学意义。见表 3。

**2.3 慢性乙型肝炎患者的肠道菌群与肝功能以及 HBV DNA 水平之间的相关性分析** 肠杆菌科细菌与 PT 呈正相关性 ( $r = 0.29, P = 0.04$ ); 肠球菌与 ALT ( $r = 0.31, P = 0.03$ ) 以及 AST ( $r = 0.29, P = 0.04$ ) 呈正相关性。双歧杆菌与 AST 呈负相关性 ( $r = -0.37, P = 0.01$ ),也与 AKP ( $r = -0.34, P = 0.02$ ) 以及 HBV DNA 水平 ( $r = -0.18, P = 0.05$ ) 呈负相关性。同样的,普雷沃氏菌属与 AST 呈负相关性 ( $r = -0.56, P < 0.001$ ),也与 AKP ( $r = -0.30, P = 0.03$ ) 以及 PT ( $r = -0.29, P = 0.04$ ) 呈负相关性。拟杆菌属与 AST ( $r = -0.44, P = 0.01$ ) 和 PT ( $r = -0.37, P = 0.01$ ) 呈负相关性,而瘤胃球菌属只与 ALB 呈负相关性 ( $r = -0.40, P = 0.01$ )。见表 4。

表 3 3 组间肠道菌群的比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 肠道菌群   | 健康对照组<br>(n=30) | 慢性乙型肝炎组<br>(n=50) | 肝炎后肝硬化组<br>(n=50) |
|--------|-----------------|-------------------|-------------------|
| 肠杆菌科细菌 | 7.60 ± 0.46     | 8.37 ± 1.11*      | 8.85 ± 0.84*      |
| 粪肠球菌   | 5.72 ± 0.42     | 6.90 ± 1.00*      | 7.22 ± 0.90*      |
| 双歧杆菌   | 8.31 ± 0.96     | 7.49 ± 1.16*      | 7.53 ± 1.20*      |
| 乳酸杆菌   | 8.46 ± 1.42     | 6.92 ± 1.36*      | 8.17 ± 1.46#      |
| 梭菌属    | 7.44 ± 1.07     | 9.24 ± 1.13*      | 9.68 ± 0.98*      |
| 白色念珠菌  | 5.83 ± 0.23     | 6.28 ± 0.29*      | 6.36 ± 0.40*      |
| 普雷沃氏菌属 | 8.00 ± 1.47     | 9.28 ± 1.73*      | 9.59 ± 1.52*      |
| 拟杆菌属   | 10.95 ± 0.41    | 10.16 ± 1.11*     | 9.96 ± 1.38*      |
| 瘤胃球菌属  | 6.68 ± 0.99     | 5.69 ± 0.68*      | 6.09 ± 0.74*#     |

与健康对照组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与慢性乙型肝炎组比较: #  $P < 0.05$

表 4 慢性乙型肝炎患者的肠道菌群与肝功能以及 HBV DNA 水平之间的相关性分析

| 肠道菌群   | TBIL  |      | ALT   |      | AST   |      | ALB   |      | GGT   |      | AKP   |      | PT    |      | HBV DNA 水平 |      |
|--------|-------|------|-------|------|-------|------|-------|------|-------|------|-------|------|-------|------|------------|------|
|        | r 值   | P 值  | r 值   | P 值  | r 值   | P 值  | r 值   | P 值  | r 值   | P 值  | r 值   | P 值  | r 值   | P 值  | r 值        | P 值  |
| 肠杆菌科细菌 | 0.19  | 0.18 | 0.22  | 0.12 | 0.20  | 0.17 | 0.42  | 0.77 | -0.05 | 0.73 | 0.08  | 0.58 | 0.29  | 0.04 | -0.11      | 0.47 |
| 肠球菌    | 0.10  | 0.50 | 0.31  | 0.03 | 0.29  | 0.04 | -0.24 | 0.09 | 0.20  | 0.17 | 0.20  | 0.17 | 0.21  | 0.15 | 0.05       | 0.73 |
| 双歧杆菌   | -0.06 | 0.66 | -0.05 | 0.72 | -0.37 | 0.01 | 0.11  | 0.43 | -0.09 | 0.55 | -0.34 | 0.02 | -0.21 | 0.15 | -0.28      | 0.05 |
| 乳酸杆菌   | 0.02  | 0.89 | 0.05  | 0.72 | 0.12  | 0.43 | -0.09 | 0.52 | 0.07  | 0.65 | 0.03  | 0.82 | 0.11  | 0.43 | -0.13      | 0.36 |
| 梭菌属    | -0.09 | 0.55 | -0.24 | 0.09 | -0.13 | 0.38 | -0.09 | 0.56 | 0.17  | 0.23 | 0.12  | 0.41 | -0.19 | 0.20 | 0.10       | 0.48 |
| 白色念珠菌  | 0.26  | 0.07 | 0.21  | 0.14 | 0.18  | 0.21 | -0.18 | 0.22 | 0.18  | 0.20 | 0.02  | 0.91 | 0.22  | 0.13 | -0.01      | 0.50 |
| 普雷沃氏菌属 | -0.24 | 0.09 | -0.23 | 0.10 | -0.44 | 0.01 | 0.06  | 0.69 | -0.15 | 0.30 | -0.30 | 0.03 | -0.30 | 0.04 | -0.03      | 0.86 |
| 拟杆菌属   | -0.20 | 0.18 | -0.23 | 0.11 | -0.56 | 0.00 | -0.08 | 0.57 | -0.12 | 0.39 | -0.04 | 0.77 | -0.37 | 0.01 | -0.06      | 0.70 |
| 瘤胃球菌属  | 0.21  | 0.15 | -0.13 | 0.38 | -0.03 | 0.86 | -0.40 | 0.00 | 0.09  | 0.55 | -0.14 | 0.35 | 0.06  | 0.67 | -0.11      | 0.46 |

2.4 慢性乙型肝炎患者的肠道菌群与细胞因子之间的相关性分析 9种肠道菌群中只有肠球菌与 IL-17A 呈正相关性 ( $r=0.29$   $P=0.04$ )。

### 3 讨论

全球约有 20 亿人口感染 HBV, 其中约有 10%~20% 慢性乙型肝炎患者最终发展为失代偿期肝硬化或肝癌, 严重危害人类健康<sup>[7]</sup>。因此为有效救治慢性肝病患者, 进一步揭示其发生发展的规律和机制, 探索适当的干预和治疗措施显得尤为迫切。

本研究通过对 9 种肠道代表菌群的定量检测, 发现慢性乙型肝炎以及肝硬化患者体内存在不同程度的菌群失调, 表现为双歧杆菌、乳酸杆菌、拟杆菌属以及瘤胃球菌属含量减少; 肠杆菌科细菌、肠球菌、梭菌属、白色念珠菌以及普雷沃氏菌含量明显增加, 与 Liu et al<sup>[3]</sup> 研究结果一致。肠杆菌科细菌在正常情况下属于肠道非优势菌群, 只有在特定的条件下具有侵袭性而对人体造成伤害。最新研究<sup>[6,8]</sup>表明肝硬化患者体内的肠杆菌科细菌异常增多, 而血浆内毒素水平与肠杆菌科细菌数量呈正相关性, 过度繁殖的肠杆菌科细菌产生大量的内毒素释放到肠腔内, 抑制肠上皮细胞的蛋白质合成, 继而导致肠道屏障受损, 出现细菌易位和肠道菌群失调, 菌群失调又会加重肠杆菌科细菌过度繁殖, 如此形成恶性循环。白色念珠菌在正常人肠道中含量极少, 却在慢性肝病患者肠道内大大增加, 这可能与患者延迟排便以及肠道活性降低有关<sup>[5]</sup>。文献<sup>[9]</sup>已证实, 慢性乙型肝炎患者的肝功能受损后会导致补体合成减少, 使得机体免疫力下降以及网状内皮细胞功能受损, 进而导致条件致病菌如白色念珠菌迅速增殖。另外, 肝硬化患者的肝功能严重受损, 肠黏膜氧化应激造成肠黏膜屏障功能减退, 肠道通透性增加, 最终可能引发真菌感染<sup>[10]</sup>。

Arumugam et al<sup>[11]</sup> 对 22 名志愿者的肠道微生物宏基因组进行测序比对, 发现人体肠道中的微生物并非随机组合, 而是可以分为拟杆菌属、普雷沃氏菌属和瘤胃球菌属 3 个肠型, 并且这些肠型与宿主的年龄、性别、种族、体重指数以及地域环境无关。肠道分型概念提出以后, 不少研究者试着找出疾病与肠道分型之间的关联, 以便于筛选和预防某种疾病, 最大限度地控制疾病的发生发展。本研究通过定量检测以上 3 种菌属发现健康志愿者的拟杆菌属

含量高, 肝病患者的普雷沃氏菌属含量增加而拟杆菌属含量减少。初步推测健康志愿者的肠道菌群属于 1 类肠型, 而慢性乙型肝炎以及肝硬化患者的肠道菌群属于 2 类肠型。若要明确慢性肝病患者的肠道分型, 还有待通过定量观察微生物生态学 (QI-IME) 技术做进一步的研究。

IL-17A 是近年发现的一种新型促炎性细胞因子, 可以促进 IL-1、IL-6、TNF- $\alpha$ 、前列腺素 E2 和基质金属蛋白酶等的表达, 引发组织细胞通透性增加, 甚至坏死<sup>[12]</sup>。本研究结果表明, 慢性乙型肝炎患者体内肠球菌与 IL-17A 呈正相关性, 可能是由于乙肝患者体内肠球菌迅速繁殖, 并产生大量多形核白细胞趋化因子<sup>[13]</sup>, 介导肝脏发生炎症反应, 使得大量细胞因子 (尤其是 TGF- $\beta$ 、IL-23、IL-1 $\beta$ ) 释放, Th-17 细胞被活化, 通过分泌并活化 IL-17A 来上调相关细胞因子如 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-23 P19 等, 而这些细胞因子又会进一步加重肝脏的炎症反应和损伤<sup>[14]</sup>。另外, 研究显示肠杆菌科细菌和肠球菌与反应肝脏损伤严重程度指标—肝功能以及 PT 呈正相关性, 而乳酸杆菌与拟杆菌属以及瘤胃球菌属等益生菌与部分肝功能呈负相关性。这进一步说明慢性乙型肝炎患者的肠道菌群结构变化对肝脏组织有损伤作用, 是 HBV 相关性肝病发生发展中不容忽视的致病因素。

综上所述, 慢性乙型肝炎以及肝硬化患者体内存在不同程度的肠道菌群失调, 其中乙肝患者体内过度繁殖的肠球菌与 IL-17A 协同参与肝脏炎症反应过程, 使肝功能受损呈恶性循环状态。因此, 合理使用有效的微生态制剂来抑制肠道潜在致病菌的繁殖, 对延缓和预防肝硬化的发生有着重要临床意义。

### 参考文献

- [1] Othman M, Agfiero R, Lin H C. Alterations in intestinal microbial flora and human disease [J]. *Curr Opin Gastroenterol*, 2008, 24 (1): 11-6.
- [2] Shimizu K, Ogura H, Goto M, et al. Altered gut flora and environment in patients with severe SIRS [J]. *J Trauma*, 2006, 60 (1): 126-33.
- [3] Liu J, Wu D, Ahmed A, et al. Comparison of the gut microbe profiles and numbers between patients with liver cirrhosis and healthy individuals [J]. *Curr Microbiol* 2012, 65(1): 7-13.
- [4] Di Cagno R, Rizzello C G, Gagliardi F, et al. Different fecal microbiotas and volatile organic compounds in treated and untreated children with celiac disease [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2009,

- 75(12): 3963–71.
- [5] Guo R Y, Chen Z J, Chen N, et al. Quantitative real-time PCR analysis of intestinal regular fungal species in fecal samples from patients with chronic hepatitis B virus infection [J]. *Science*, 2010, 41(10): 591–6.
- [6] Lu H, Wu Z, Xu W, et al. Intestinal microbiota was assessed in cirrhotic patients with hepatitis B virus infection [J]. *Microb Ecol*, 2011, 61(3): 693–703.
- [7] Trepo C, Chan H L, Lok A. Hepatitis B virus infection [J]. *Lancet*, 2014, 384(9959): 2053–63.
- [8] Chen Y, Yang F, Lu H, et al. Characterization of fecal microbial communities in patients with liver cirrhosis [J]. *Hepatology*, 2011, 54(2): 562–72.
- [9] Foschi F G, Trevisani F, Loggi E, et al. Effect of liver transplantation on tuftsin activity and phagocytic activity of neutrophil granulocytes in patients with liver cirrhosis [J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2005, 137(3): 258–62.
- [10] Li J, Cheng L F, Li Z, et al. Intestinal intraepithelial lymphocytes in cirrhosis: Experiment with rats [J]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2008, 88(4): 233–5.
- [11] Arumugam M, Raes J, Pelletier E, et al. Enterotypes of the human gut microbiome [J]. *Nature*, 2011, 473(7346): 174–80.
- [12] Zhang X, Angkasekwinai P, Dong C, et al. Structure and function of interleukin-17 family cytokines [J]. *Protein Cell*, 2011, 2(1): 26–40.
- [13] Semedo T, Almeida Santos M, Martins P, et al. Comparative study using type strains and clinical and food isolates to examine hemolytic activity and occurrence of the *cyl* operon in enterococci [J]. *J Clin Microbiol*, 2003, 41(6): 2569–76.
- [14] Zhang J Y, Zhang Z, Wang F S, et al. Interleukin-17-producing CD4(+) T cells increase with severity of liver damage in patients with chronic hepatitis B [J]. *Hepatology*, 2010, 51(1): 81–91.

## Changes of intestinal microbiota in patients with chronic hepatitis B and liver cirrhosis

Chen Mengmeng<sup>1,2</sup>, Zheng Jishun<sup>3</sup>, Liu Yanyan<sup>2</sup>, et al

(<sup>1</sup>*Dept of Infectious Diseases, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;*

<sup>2</sup>*Anhui Center for Surveillance of Bacterial Resistance, Hefei 230022;*

<sup>3</sup>*Dept of Infectious Diseases, The First People's Hospital of Hefei, Hefei 230012)*

**Abstract Objective** To investigate changes of intestinal flora and correlation with cytokines and liver function in patients with chronic hepatitis B and liver cirrhosis. **Methods** 30 healthy subjects, 50 patients with chronic hepatitis B and 50 patients with cirrhosis were selected. Nine kinds of intestinal flora were quantified by FQ-PCR to compare the changes among three groups. Then the IL-17A, IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN- $\alpha$ , CXCL-13 concentrations in the serum of patients with chronic hepatitis B were measured with ELISA to explore the relationship between intestinal flora and cytokines, liver function. **Results** The numbers of *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Bacteroides* and *Ruminococcus* were significantly decreased in patients with chronic hepatitis B and liver cirrhosis compared with healthy controls, while the numbers of *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus*, *Clostridium*, *Candida albicans* and *Prevotella* were significantly increased. Positive correlations were found between *Enterobacteriaceae* and PT, as well as *Enterococcus* and ALT, AST in patients with chronic hepatitis B. *Bifidobacterium* was negatively linked to AST, AKP, HBV DNA. *Prevotella* was negatively linked to AST, AKP, PT. There was a negative correlation between *Ruminococcus* and ALB, as well as *Bacteroides* and AST, PT. In addition, *Enterococcus* was positively linked to IL-17A. **Conclusion** Varying degrees of intestinal flora imbalance exists in patients with chronic hepatitis B and liver cirrhosis. The overgrowth of *Enterococcus* acts synergistically with IL-17A to induce liver inflammation and result in impaired liver function.

**Key words** chronic hepatitis B; intestinal microbiota; liver function; cytokines