

肠道细菌CGC定植及其对局部细胞活性的影响

刘俊康, 廖玉芳, 胡峻晨, 吴小兰, 徐启旺

■背景资料

IBS发病机制研究多集中于脑-肠轴的改变, 其中重点又放在诸如5-HT信号过程等的研究。但对肠道局部的变化迄今未予重视, 还有待加强。近年来, 探讨微生物感染与IBS的关系成为该领域的一个热点, 本文在此基础上探讨肠道菌群生长状态的改变是否与IBS发病有关。

刘俊康, 廖玉芳, 胡峻晨, 吴小兰, 徐启旺, 中国人民解放军第三军医大学医学检验系生物波研究室 重庆市 400038
刘俊康, 医学博士, 副教授, 主要从事临床检验及生物复杂性等方面的研究。

重庆市自然科学基金计划资助项目, No. 2006BB5068

通讯作者: 徐启旺, 400038, 重庆市, 中国人民解放军第三军医大学医学检验系生物波研究室. biowave2000@163.com

收稿日期: 2006-12-04 接受日期: 2007-02-08

Colonization of bacterial cryptic growth cells and its influence on the local cellular activity

Jun-Kang Liu, Yu-Fang Liao, Jun-Chen Hu, Xiao-Lan Wu, Qi-Wang Xu

Jun-Kang Liu, Yu-Fang Liao, Jun-Chen Hu, Xiao-Lan Wu, Qi-Wang Xu, Research Center of Bio-wave, Department of Laboratory Medicine, the Third Military Medical University, Chongqing 400038, China

Supported by the Natural Science Planning Foundation of Chongqing Science and Technology Committee, No. 2006BB5068

Correspondence to: Qi-Wang Xu, Research Center of Bio-wave, Department of Laboratory Medicine, the Third Military Medical University, Chongqing 400038, China. biowave2000@163.com

Received: 2006-12-04 Accepted: 2007-02-08

Abstract

AIM: To explore the predominant location and the influence of bacterial cryptic growth cell (CGC) colonization on the activity of local enterocytes.

METHODS: The bacterial CGC was induced by the antibiotics Cefuroxime, and the colonized status was detected by the techniques of local colonization *in vivo*. After the establishment of irritable bowel syndrome (IBS) model, the energy charge (EC) of adenosine triphosphate (ATP) and the ratio of ATP to the total amount of adenylic acid pool in colonic epithelial cells at the ileocecum with better colonization were determined by high performance liquid chromatography (HPLC).

RESULTS: Normal rats had just a few bacterial CGC, but a great number of bacterial CGC were

detected in model rats. The bacterial CGC colonized mainly at the ileocecum and ascending colon and fewer at the other parts; the energy charge of ATP and the ratio of ATP to the total amount of adenylic acid pool in the three parts of ileocecal colon of IBS rats were significantly lower than those in the normal control groups, respectively (both $P < 0.05$).

CONCLUSION: CGC colonization causes a down-regulation of the cellular activity, which may help to explore the mechanism of IBS pathogenesis.

Key Words: Irritable bowel syndrome; Intestinal bacterial cryptic growth cell; Ileocecum; Mitochondrion

Liu JK, Liao YF, Hu JC, Wu XL, Xu QW. Colonization of bacterial cryptic growth cells and its influence on the local cellular activity. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(11):1198-1201

摘要

目的: 探讨肠道细菌CGC在体内定植分布的主要位置及这种定植对局部细胞活性的影响。

方法: 采用头孢呋辛钠诱导CGC产生, 以体内细菌定植的原位检测方法对结肠各段CGC定植情况进行检测。在建立了IBS动物模型基础上, 采用高效液相色谱法对CGC定植较多的回盲部肠黏膜上皮细胞的腺苷酸能荷及ATP与腺苷酸库比值进行测定, 以反映细胞活性状态。

结果: 正常大鼠检测未见大量细菌CGC, 在模型鼠标本的连续检测结果中检出大量CGC。通过肠道细菌定植检测, 细菌CGC主要定植在回盲部和升结肠段; 与正常组相比, IBS模型组回盲部三个肠段的细胞线粒体ATP能荷值以及ATP与总腺苷酸库比值检测结果明显降低, 相应肠段之间数值差异显著(均 $P < 0.05$)。

结论: 细菌CGC在大鼠体内定植显优势分布, 在局部定植后能引起细胞活性降低。

关键词: 肠易激综合征; 肠道细菌潜生体; 回盲部; 线粒体

刘俊康, 廖玉芳, 胡峻晨, 吴小兰, 徐启旺. 肠道细菌CGC定植及其对局部细胞活性的影响. 世界华人消化杂志 2007;15(11):1198-1201

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1198.asp>

0 引言

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)是一种肠道功能性疾病,严重影响人类生活质量,缺乏特效治疗药物,原因在于发病机制不清.当前的研究主要集中在脑-肠轴异常与IBS发病联系方面^[1],而脑肠轴异常的起因尚未阐明.近年来抗生素应用^[2]、肠道感染^[3]及肠道菌群改变^[4]与IBS的相关性的研究为此提供了颇有价值的线索,随之产生的一些新的理论认识如:生物波理论提出的肠道细菌潜生体(cryptic growth cell, CGC)是IBS发病原因的新假说等^[5],本文在此基础上研究CGC在肠道内定植分布特点及其对肠黏膜上皮细胞活性的影响,以期有助于阐明IBS发病的细菌CGC的相关机制.

1 材料和方法

1.1 材料 Wistar大鼠,雌雄各半,体质量200-250 g,购自第三军医大学动物所,常规饲养. 头孢呋辛钠,葛兰素史克公司出品, J100328; KMnO_4 , K_2CO_3 , Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , HClO_4 均为分析纯,美蓝为市售并常规配制,干辣椒为市售. 光学显微镜, XSZ-4G, 重庆光学仪器厂; 高效液相色谱, 1100, Agilent.

1.2 方法 随机抽取10只大鼠作为正常对照,实验期间常规饲养. 另取50只大鼠每日按10 g/L $\times 1$ mL的剂量腹腔注射头孢呋辛钠,连续3 d给药,停药后检测粪便细菌CGC情况,并测定粪便含水量. 将粪便含水量明显升高并且粪便标本连续3次检测到细菌CGC的大鼠挑选出来进行下一步实验,7 d后给辣椒水刺激(100 g干辣椒加1000 mL水煮沸至500 mL),连续3 d灌胃总量为大鼠体质量的1/8. 检测大鼠粪便含水量,粪便含水量又显著增高的大鼠即是实验需要的模型鼠.

1.2.1 大鼠腺苷酸能荷及ATP与总腺苷酸库比值的测定 取20只模型鼠处死,立即剪取回盲部,于0℃的生理盐水中洗净内容物,从上到下截为三段肠1(近回肠部分)、肠2(中间部分)、肠3(近盲肠部分). 立即加入9倍0℃的分离介质(0.25 mol/L蔗糖、10 mol/L的Tris-HCl、0.5 mol/L的

EDTA),匀浆,然后在1250 g离心8 min,取上层液体,5000 g离心10 min取沉淀;再加入适量分离介质,混匀后,5000 g离心10 min弃取上清液,如此清洗数次,得到较纯的线粒体,另取1 mL分离介质加入,振匀,得线粒体悬液. 取0.2 mL加入0.4 mL 1.6 mol/L的 HClO_4 , 0℃静置5 min后,12 500 g离心15 min,取上清液,加入2.5 mol/L的 K_2CO_3 溶液至液体呈中性(pH6.5). 0℃静置10 min,再次12 500 g离心15 min,取上清液为待检样品.

用高效液相色谱法检测. 色谱条件: 检测波长254 nm, 碳十八色谱柱, 流动相为磷酸盐缓冲液(pH6.0), 流速1 mL/min, 柱温37℃, 进样量10 μL .

1.2.2 细菌CGC在定植部位的检测 取10只模型鼠处死后, 无菌解剖, 分别取直肠, 降结肠, 横结肠, 升结肠, 盲肠, 回肠, 空肠, 十二指肠段, 沿纵向剖开, 去除内容物, 撕去浆膜层和肌层, 然后将肠段沿肠系膜纵向剖开, 在无菌PBS缓冲液中漂洗除去未定植的细菌, 然后将肠片黏膜面向上平铺于玻片上, 自然干燥. 将干燥好的肠组织标本, 加1 g/L美蓝水溶液浸没2 min, 再用蒸馏水洗至无染液流出为止, 加1 g/L高锰酸钾水溶液浸没标本15 s后迅速用蒸馏水冲洗, 此时标本呈黄绿色, 如果颜色偏蓝, 则重复上一步操作, 直到颜色呈黄绿色为止, 酒精灯干燥, 油镜下观察检测各肠段CGC的定植状况. 定植阳性为在黄绿色的背景上可以看到蓝色的CGC密集排列或散在于表面.

统计学处理 采用SPSS11.0统计软件分析处理数据.

2 结果

2.1 CGC肠道定植分布测定结果 正常大鼠检测的粪便连续3 d未见多量CGC(图1A); 在模型鼠粪便标本的连续检测结果中检出大量CGC(图1B). 对模型鼠肠道多部位进行CGC定植情况检测, 结果显示肠道内CGC主要定植在回盲部和升结肠段, 空肠、十二指肠段未曾发现CGC, 而在降结肠、乙状结肠等部位可见, 但数量不多(表1), CGC在模型鼠肠道回盲部定植的原位染色观察结果如图2所示, 回盲部肠黏膜表面定植有大量的呈纤细状密集排列的肠道细菌CGC; 这些细菌的形态与图1B粪便中所见的CGC形态上相似; 而图1A中未见CGC.

2.2 CGC定植部位肠黏膜细胞线粒体腺苷酸含量变化检测结果 能荷测定结果: 采用液相色谱

■创新盘点

本文认为, 作为IBS主要发病机制的脑-肠轴异常变化中, 不仅要研究肠道黏膜上的介质受体或介质相关调节因素, 还要研究作为介质作用对象的肠道局部细胞的活性变化, 并探讨引起变化的因素, 这样有助于查出IBS的病因.

■应用要点

本文认为, CGC在肠道的定植可以引起局部细胞活性降低, 初步表明是引起脑-肠轴异常变化的因素之一. 因此, 寻找减少CGC产生和排除CGC定植的方法和物质将有助于减少IBS发病.

■名词解释

细菌CGC: 是生物波研究中定义的一种细菌特殊生长状态, 表现为代谢方式改变, 菌体延长、运动活泼、较强的侵袭力等特征, 可以受抗菌素作用、生存环境变化等影响而产生。

表 1 CGC体内定植测定结果

大鼠编号	粪便	直肠	降结肠	横结肠	升结肠	盲肠	回肠	空肠	十二指肠
1	++	-	-	-	++	+++	-	-	-
2	++	+	+	++	++	++	+	-	-
3	+++	-	+	++	+++	+++	-	-	-
4	+	-	-	++	++	+++	-	-	-
5	++	+	++	+++	++	+++	-	-	-
6	+++	-	-	++	+++	+++	+	-	-
7	+++	+	++	-	+	+++	-	-	-
8	++	-	-	+	+	++	-	-	-
9	+	-	++	+	+	+++	+	-	-
10	+++	+	+	+	+	+++	-	-	-

结果判定标准: 数20个视野中平均每个视野中出现的CGC的量, -: 0-2个; +: 2-5个; ++: 5-10个; +++: >10个。

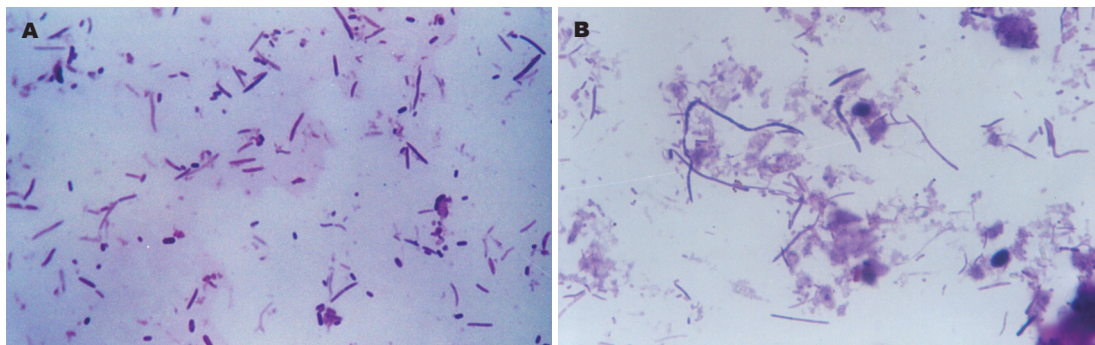


图 1 各组大鼠粪便标本检测结果. A: 正常大鼠; B: 应用头孢夫辛钠后大鼠.

法测定回盲部细胞ATP能荷, 按其计算公式 $EC = (1/2ADP+ATP)/(AMP+ADP+ATP)$, 分别计算两组大鼠回盲部三肠段的能荷值(图3). 正常鼠回盲部三个肠段肠黏膜细胞ATP能荷值较IBS模型鼠相应各肠段肠黏膜细胞能荷值高, 相应肠段之间数值差异显著($P<0.05$).

ATP与总腺苷酸库比的测定结果: 采用液相色谱法测定ATP与总腺苷酸库比的值(图4). 回盲部三个肠段肠黏膜细胞的ATP与总腺苷酸库比值在正常鼠较IBS模型鼠为高; 数据统计分析表明两者间在个肠段均差异显著($P<0.05$).

3 讨论

IBS的发病机制近年来较多认为与脑肠轴相关, 对其相关的神经递质改变研究较多^[6], 对肠动力改变也有较长时间的研究^[7], 但对IBS中肠道黏膜细胞的活性研究较少. 较早时候, 在研究肠平滑肌电图的过程中有研究认为肠道组织细胞有活性降低倾向^[8]. 在此基础上, 本文在抗生素应用后IBS发病率有所上升和抗生素可广泛诱导

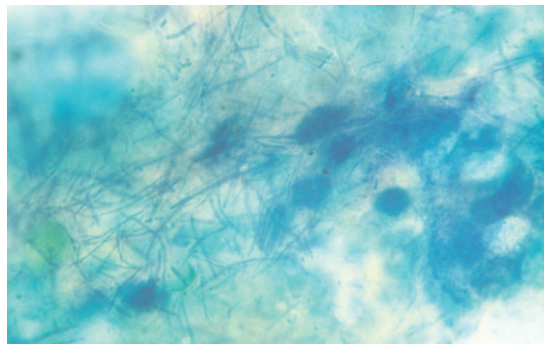


图 2 大鼠回盲部CGC定植观察结果(原位染色, $\times 1000$).

CGC产生的工作基础上, 探讨了抗生素作用下肠道细菌CGC形成后定植情况, 以及定植局部细胞活性情况结果表明, 肠道细菌CGC在产生后主要定植在回盲部, 也有部分分布在升结肠段, 而其余部位则较少或无. 线粒体作为细胞活动的主要供能场所^[9], 是物质代谢和能量转化的中心站, 细胞的各种活动所需能量绝大部分由ATP直接提供, 而细胞内80% ATP在线粒体产生. 以HPLC方法检测细胞ATP产生状况, 反映线粒

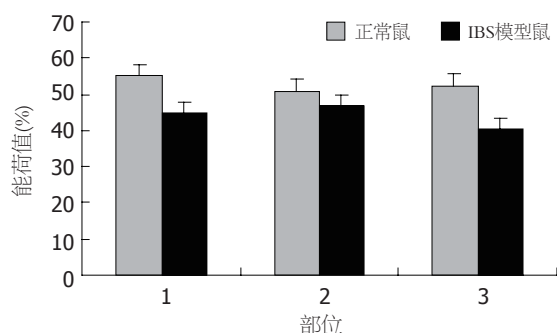


图3 能荷统计直方图.

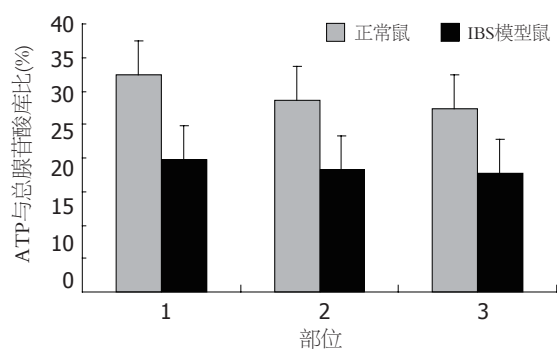


图4 ATP与总腺苷酸库比统计直方图.

体功能, 代表细胞活性, 结果显示, 与正常动物相比, 回盲部有大量CGC定植时其回盲部黏膜细胞的能荷比及ATP与总腺苷酸库的比值均较低, 与正常者相比存在着显著差异. 这提示CGC定植与肠黏膜细胞活性降低之间有联系. 这为

将CGC作为IBS发病的病因的研究和以CGC定植为基础又加上外部刺激进行的IBS动物模型建立研究找到了实验依据. 至于CGC定植引起肠黏膜细胞活性降低的机制初步认为可能与CGC表面存在特殊的化学物质如内毒素等的作用有关, 尚有待于进一步研究.

4 参考文献

- 1 Gilkin RJ Jr. The spectrum of irritable bowel syndrome: A clinical review. *Clin Ther* 2005; 27: 1696-1709
- 2 许春娣. 肠易激综合征. 实用儿科临床杂志 2004; 19: 164-165
- 3 Maxwell PR, Rink E, Kumar D, Mendall MA. Antibiotics increase functional abdominal symptoms. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 104-108
- 4 Borgaonkar MR, Ford DC, Marshall JK, Churchill E, Collins SM. The incidence of irritable bowel syndrome among community subjects with previous acute enteric infection. *Dig Dis Sci* 2006; 51: 1026-1032
- 5 章荣华, 闫国华, 刘俊康, 徐启旺. 肠道细菌潜在体形成的诱导因素实验分析. 实用诊断与治疗杂志 2006; 20: 391-393
- 6 王伟岸, 钱家鸣, 潘国宗, 温淑豪, 张艳萍. 脑-肠互动指向性条件应激肠易激综合征动物模型的建立. 中华消化杂志 2004; 24: 590-593
- 7 邹多武, 许国铭. 内脏高敏感在功能性胃肠病中的作用. 胃肠病学 2006; 11: 451-453
- 8 翟俊山, 李楠. 肠易激综合征患者胃肠激素与免疫细胞变化研究进展. 中国医师杂志 2005; 7: 1295-1296
- 9 Psarra AM, Solakidi S, Sekeris CE. The mitochondrion as a primary site of action of steroid and thyroid hormones: presence and action of steroid and thyroid hormone receptors in mitochondria of animal cells. *Mol Cell Endocrinol* 2006; 246: 21-33

电编 张敏 编辑 张焕兰

■同行评价

本文对肠道细菌CGC定植对肠黏膜上皮细胞的活性变化进行了初步探索, 对IBS的发病机制的研究有一定益处, 而且实验结果可信, 结论比较明确, 为进一步进行IBS机制的深入研究奠定了较好基础.

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

中国科学技术信息研究所情报方法研究中心关于 2005年世界华人消化杂志指标检索报告

本刊讯 2005年度《世界华人消化杂志》的总被引频次为2079, 位居全部1652种中国科技论文统计源期刊的第51位, 内科医学类28种期刊的第4位. 2005年《世界华人消化杂志》的影响因子为0.485, 位居全部1652种中国科技论文统计源期刊的第449位, 内科医学类28种期刊的第14位. 《世界华人消化杂志》的即年指标0.070, 他引率0.66, 地区分布数26, 基金论文比0.43, 国际论文比0.02, 学科影响指标0.46. (世界胃肠病学杂志社2006-10-27)