

# 溃疡性结肠炎患者肠道菌群含量变化及其与炎性因子及 TOLL 样受体分子的相关性

李会荣<sup>1</sup> 崔昭<sup>2</sup> 梁博<sup>2</sup> 李国东<sup>3</sup> 何明璇<sup>4</sup> 刘亚维<sup>5</sup> 周建华<sup>2</sup>

1.河北省保定市第二医院医学检验科,河北保定 071000;2.河北省保定市第二医院医学皮肤科,河北保定 071000;  
3.河北省保定市第二医院消化内科,河北保定 071000;4.河北省保定市第一中心医院肿瘤内科,河北保定 071000;  
5.河北大学附属医院中西医结合科,河北保定 071000

**[摘要]** 目的 探讨溃疡性结肠炎(UC)患者肠道菌群含量变化及其与炎性因子及 TOLL 样受体(TLRs)分子的相关性。方法 选取2016年2月~2018年8月河北省保定市第二医院收治的UC患者82例作为观察组,另选取同期行健康体检的志愿者70例作为对照组,检测白细胞介素(IL)-4(IL-4)、IL-6、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、肠道菌群含量情况以及TLRs分子(TLR4、TLR9)表达情况并进行比较,采用Pearson相关性分析TLRs分子表达与肠道菌群、炎性因子的相关性。结果 观察组肠杆菌、拟杆菌、肠球菌以及梭杆菌含量高于对照组,而乳杆菌、双歧杆菌含量则低于对照组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$ )。观察组TLR4、TLR9、IL-6、TNF- $\alpha$ 高于对照组,IL-4低于对照组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$ )。Pearson相关性分析结果显示,UC患者TLR4、TLR9与肠杆菌、拟杆菌、肠球菌、梭杆菌、IL-6、TNF- $\alpha$ 呈正相关( $r > 0, P < 0.05$ ),与乳杆菌、双歧杆菌、IL-4呈负相关( $r < 0, P < 0.05$ )。结论 UC患者体内肠道菌群失调,其可通过促进TLRs分子表达进而提高促炎因子水平,降低抑炎因子水平,介导肠黏膜炎性反应。

**[关键词]** 溃疡性结肠炎;肠道菌群;炎性因子;TOLL样受体;相关性

**[中图分类号]** R574.62

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1673-7210(2020)07(a)-0156-04

## Changes of intestinal flora in patients with ulcerative colitis and its correlation with inflammatory factors and TOLL-like receptor molecules

LI Huirong<sup>1</sup> CUI Zhao<sup>2</sup> LIANG Bo<sup>2</sup> LI Guodong<sup>3</sup> HE Mingxuan<sup>4</sup> LIU Yawei<sup>5</sup> ZHOU Jianhua<sup>2</sup>

1.Department of Medical Laboratory, the No.2 Hospital of Baoding, Hebei Province, Baoding 071000, China; 2.Department of Medical Dermatology, the No.2 Hospital of Baoding, Hebei Province, Baoding 071000, China; 3.Department of Gastroenterology, the No.2 Hospital of Baoding, Hebei Province, Baoding 071000, China; 4.Department of Medical Oncology, Baoding First Central Hospital, Hebei Province, Baoding 071000, China; 5.Department of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Affiliated Hospital of Hebei University, Hebei Province, Baoding 071000, China

**[Abstract] Objective** To investigate the changes of intestinal flora in patients with ulcerative colitis (UC) and its correlation with inflammatory factors and TOLL-like receptors (TLRs) molecules. **Methods** A total of 82 patients with UC admitted to the NO.2 Hospital of Baoding Hebei Province from February 2016 to August 2018 were selected as the observation group, and 70 volunteers who underwent physical examination during the same period were selected as the control group. The levels of interleukin (IL)-4, IL-6, tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), intestinal flora content and the expression of TLRs molecules (TLR4 and TLR9) were detected and compared. Pearson correlation was used to analyze the correlation between TLRs expression and intestinal flora and inflammatory factors. **Results** The contents of *Enterobacter*, *Bacteroides*, *Enterococcus* and *Fusobacterium* in the observation group were higher than those in the control group, while the contents of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* in the observation group were lower than those in the control group, with statistically significant differences (all  $P < 0.05$ ). TLR4, TLR9, IL-6 and TNF- $\alpha$  in the observation group were higher than those in the control group, and IL-4 was lower than that in the control group, with statistically significant differences (all  $P < 0.05$ ). Pearson correlation analysis showed that TLR4 and TLR9 in UC patients were

**[基金项目]** 河北省医学科学研究重点课题计划项目(20170264)。

**[作者简介]** 李会荣(1980.3-),女,硕士;研究方向:医学检验。

positively correlated with *Enterobacter*, *Bacteroides*, *Enterococcus*, *Fusobacterium*, IL-6 and TNF- $\alpha$  ( $r > 0, P < 0.05$ ), but negatively correlated with *Lactobacillus*,

*Bifidobacterium* and IL-4 ( $r < 0, P < 0.05$ ). **Conclusion** In patients with UC, intestinal flora is dysregulated, which can promote the expression of TLRs molecules to increase the level of pro-inflammatory factors, reduce the level of anti-inflammatory factors, and mediate the inflammatory response of intestinal mucosa.

**[Key words]** Ulcerative colitis; Intestinal flora; Inflammatory factors; TOLL-like receptors; Correlation

溃疡性结肠炎(UC)属于慢性炎症性肠道疾病,临床表现为腹泻、腹痛以及黏液脓血便等症状<sup>[1]</sup>。该病变位于大肠,多数累及直肠以及乙状结肠,呈连续弥漫性分布,病情迁延不愈,反复发作,给患者带来巨大的身心痛苦<sup>[2]</sup>。UC发病机制迄今尚未阐明,可能的发病因素包括免疫、感染、遗传以及环境因素等<sup>[3-4]</sup>。人体肠道内存在数量巨大、种类繁多的细菌群体,正常情况下主要参与肠道内的分解、代谢,维持肠道内免疫系统稳定。由于免疫应答紊乱以及细胞炎性反应是引发UC的关键病理过程,而肠道菌群失调可能是免疫应答紊乱以及细胞炎性反应过程的激发因素,因此,不少研究认为肠道菌群失调在UC的病情进展中发挥重要作用<sup>[5-6]</sup>。但有关肠道菌群引起肠黏膜炎症损伤的具体分子机制的相关报道尚不多见,本研究通过检测UC患者肠道菌群变化与炎性因子及TOLL样受体(TLRs)分子表达,进一步分析其相关性。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

选取2016年2月~2018年8月河北省保定市第二医院(以下简称“我院”)接收的82例UC患者作为观察组,本研究已经我院医学伦理学委员会批准进行。纳入标准:①均符合《炎症性肠病诊断与治疗的共识意见》<sup>[7]</sup>中有关UC的相关标准;②均有以下临床症状:腹痛、腹泻以及黏液脓血便,且呈反复发作状态;③病程>4周;④均经结肠镜的检查确诊为UC;⑤患者及其家属知情且已签署了同意书。排除标准:①近期使用过免疫抑制剂、抗生素以及激素者;②因肠结核、细菌性痢疾、寄生虫感染等原因导致的UC者;③合并其他消化系统疾病者;④合并其他慢性疾病、肿瘤疾病者;⑤合并重要脏器功能不全者。其中观察组男46例,女36例;年龄27~63岁,平均(48.73±6.18)岁;病程2~5周,平均(3.72±0.84)周。另选取同期来我院行健康体检的志愿者70名作为对照组,男41名,女29名;年龄28~60岁;平均(47.29±5.28)岁。两组性别、年龄等一般资料比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),具有可比性。

### 1.2 方法

1.2.1 炎性因子检测 观察组于入院次日、对照组于体检当天,采集清晨空腹静脉血4 mL,经3000 r/min离心10 min,离心半径11 cm,分离上清液,置于-70℃冰箱中待测。采用酶联免疫吸附试验检测白细胞介素

(IL)-4、IL-6、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ),试剂盒购自上海中信国健药业股份有限公司(生产批号:20160122、20151023、20151226),严格遵循试剂盒说明书操作执行。

1.2.2 肠道菌群检测 两组研究对象均随机选取0.5 g新鲜粪便标本,置于含有4.5 mL的稀释液(含有3~4粒玻璃珠)中,后置于3000 r/min的漩涡混合器震荡1 min,另取6只均含有1.8 mL稀释液的无菌青霉素小瓶,从首只小瓶中取0.2 mL的混悬液至第2只小瓶中,震荡混匀,再从第2只小瓶中取0.2 mL的混悬液至第3只小瓶中,依次稀释,稀释后的标本取10  $\mu$ L接种于相应的培养基上,不同的菌种使用不同的培养基,培养基购自上海中信国健药业股份有限公司,经37℃温箱培养48 h后,细菌革兰染色,计算每克粪便中含有的菌群数目。

1.2.3 TLRs分子检测 两组研究对象均于肠镜检查时,取对照组正常健康黏膜组织、观察组适量病变肠黏膜组织,加入上海基尔顿生物有限公司生产的RIPA裂解液,离心分离上清液,采用购自南京卡米洛生物工程技术有限公司酶联免疫吸附试验试剂盒检测TLR4、TLR9蛋白表达量(生产批号:20151108),抗体则采购自上海中信国健药业股份有限公司,采用北京天象邦定生物医学科技有限公司生产的BCA试剂盒(生产批号:20150923)测定总蛋白含量,计算每毫克蛋白中TLRs蛋白含量。

### 1.3 统计学方法

采用SPSS 22.0统计学软件对所得数据进行分析,计量资料均符合正态分布采用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间比较采用 $t$ 检验,计数资料采用百分率表示,组间比较采用 $\chi^2$ 检验。采用Pearson相关性分析肠道菌群变化与炎性因子及TLRs分子表达的相关性。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 两组肠道菌群含量比较

观察组肠杆菌、拟杆菌、肠球菌以及梭杆菌含量高于对照组,而乳杆菌、双歧杆菌含量则低于对照组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$ )。见表1。

### 2.2 两组TLRs分子表达、炎性因子比较

观察组TLR4、TLR9、IL-6、TNF- $\alpha$ 高于对照组,IL-4低于对照组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$ )。见表2。

表1 两组肠道菌群含量比较(CFU/g,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	乳杆菌	双歧杆菌	肠杆菌	拟杆菌	肠球菌	梭杆菌
对照组 ( $n = 70$ )	8.56±1.15	9.35±1.31	8.09±1.94	2.31±0.69	4.63±1.05	7.31±1.11
观察组 ( $n = 82$ )	5.73±1.04	5.34±1.57	15.98±1.87	4.07±1.06	8.15±0.96	9.23±1.64
<i>t</i> 值	15.926	16.922	25.485	11.902	21.579	8.303
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

表2 两组TLRs分子表达、炎症因子比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	TLR4( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	TLR9( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	IL-4( $\text{ng}/\text{mL}$ )	IL-6( $\text{ng}/\text{mL}$ )	TNF- $\alpha$ ( $\text{ng}/\text{mL}$ )
对照组 ( $n = 70$ )	1.97±0.31	0.92±0.21	22.36±8.42	134.67±22.95	42.53±12.87
观察组 ( $n = 82$ )	3.46±0.37	1.65±0.28	8.02±1.37	274.14±34.79	84.98±11.95
<i>t</i> 值	26.640	17.926	15.197	28.635	21.068
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注:TLRs:TOLL样受体;IL:白细胞介素;TNF- $\alpha$ :肿瘤坏死因子- $\alpha$

### 2.3 肠道菌群变化与炎症因子及TLRs分子表达的相关性分析

UC患者TLR4、TLR9与肠杆菌、拟杆菌、肠球菌、梭杆菌、IL-6、TNF- $\alpha$ 呈正相关( $r > 0, P < 0.05$ ),与乳杆菌、双歧杆菌、IL-4呈负相关( $r < 0, P < 0.05$ )。见表3。

表3 肠道菌群变化与炎症因子及TLRs分子表达的相关性分析

项目	TLR4		TLR9	
	<i>r</i> 值	<i>P</i> 值	<i>r</i> 值	<i>P</i> 值
乳杆菌	-0.392	0.007	-0.428	0.024
双歧杆菌	-0.483	0.012	-0.498	0.019
肠杆菌	0.472	0.001	0.495	0.015
拟杆菌	0.432	0.003	0.409	0.006
肠球菌	0.504	0.009	0.485	0.012
梭杆菌	0.525	0.003	0.518	0.000
IL-4	-0.421	0.006	-0.453	0.003
IL-6	0.527	0.005	0.519	0.011
TNF- $\alpha$	0.582	0.000	0.571	0.000

注:TLRs:TOLL样受体;IL:白细胞介素;TNF- $\alpha$ :肿瘤坏死因子- $\alpha$

### 3 讨论

UC是以肠黏膜慢性炎症损伤为主要病理特征的肠道疾病,病因至今未明。随着对该疾病研究的深入,越来越多的学者认同肠道菌群失调与UC的发生发展密切相关,可能是造成炎症反应增强、机体免疫失衡的始动因素<sup>[8-9]</sup>。正常人体肠道内含有大量细菌,主要集中于结肠和小肠末端,肠道菌群根据种类可划分为以下3种:①人体共生细菌,此类细菌被称为肠道优势菌群,具有分解、代谢、调节免疫等作用,以乳杆菌、双歧杆菌等为主要代表;②机会致病菌,此类细菌被称为非优势菌群,通常情况下人体含量较少,当机体免疫功能下降时则可大量繁殖,以肠杆菌、肠球菌等为主要代表;③病原菌,此类细菌不在肠道内定植,大部分为过路菌,以拟杆菌、梭杆菌等为主要代表<sup>[10-11]</sup>。正常情况下肠道菌群根据一定的比例组合共存形成

一个总体的生态平衡。肠道菌群失调后,诱导自身异常免疫反应,引起大量炎症细胞在肠黏膜上聚集,引起机体肠黏膜反应<sup>[12-13]</sup>。本研究结果中,观察组肠杆菌、拟杆菌、肠球菌以及梭杆菌含量高于对照组,而乳杆菌、双歧杆菌含量则低于对照组,可见在UC的病情进展中,肠道菌群平衡被打破,优势菌群繁殖受到明显抑制,而非优势菌群、病原菌的繁殖显著增强。

TOLL基因最早于果蝇体内发现,其编码的跨膜受体蛋白称TLR,TLR是一个新型的细胞受体蛋白家族,而TLRs则是体内重要的模式识别受体,具有识别多种病原菌的能力,通过下游髓样分化因子88以促进核因子- $\kappa\text{B}$ 进入细胞核,最终启动多种炎症因子表达<sup>[14-15]</sup>。其中TLR4能识别脂多糖,同时能介导肠上皮细胞对细菌胞壁成分的反应,有研究表明,高TLR4水平可通过影响肠上皮细胞对细菌胞壁成分的信号传递,促进炎症因子的增殖,导致肠道炎症反应<sup>[16]</sup>;TLR9能够识别细菌的非甲基化的胞嘧啶-磷酸-鸟嘌呤基序,可介导胞嘧啶-磷酸-鸟嘌呤基序激活T细胞、DC细胞、B细胞等多种免疫细胞,诱导免疫应答,参与UC的发生发展<sup>[17]</sup>。本研究中观察组TLR4、TLR9高于对照组,可见肠黏膜中的TLR4、TLR9参与UC的病情进展,与陈胜等<sup>[18]</sup>学者研究结果一致。进一步Pearson相关性分析结果提示,TLR4、TLR9与肠杆菌、拟杆菌、肠球菌、梭杆菌呈正相关,与乳杆菌、双歧杆菌呈负相关,提示UC患者中肠道菌群紊乱可促进TLR4、TLR9高表达,与李顺清等<sup>[15]</sup>研究结论相符。TNF- $\alpha$ 是炎症启动因子,参与着炎症的发生发展过程<sup>[19]</sup>。IL-4为抑炎因子,可下调炎症细胞因子基因的转录及其分泌,发挥抗炎和免疫调节作用,是肠道免疫的重要因子<sup>[20]</sup>。IL-6是一种促炎细胞因子,可加剧肠黏膜炎症反应<sup>[21]</sup>。本研究中观察组IL-6、TNF- $\alpha$ 均高于对照组,IL-4低于对照组,可见IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-4均参与着UC的病情进展过程,同时相关性分析也显示

TLR4、TLR9 与 IL-6、TNF- $\alpha$  呈正相关,与 IL-4 呈负相关,说明肠黏膜中的 TLR4、TLR9 可能通过识别肠道内异常繁殖的肠杆菌、肠球菌等条件致病菌及拟杆菌、梭杆菌等病原菌调控 IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-4 水平进而介导炎症反应<sup>[22-25]</sup>。

综上所述,UC 患者体内肠道菌群失调,其可通过促进 TLRs 分子表达进而提高促炎因子水平,降低抑炎因子水平,介导肠黏膜炎症反应。

#### [参考文献]

- [1] Ungaro R, Mehandru S, Allen PB, et al. Ulcerative colitis [J]. *Lancet*, 2017, 389(10080): 1756-1770.
- [2] 李世权, 吕晓丹, 谢彦飞, 等. 溃疡性结肠炎小鼠外周血和结肠组织中 Tfh、Tfr 细胞水平变化及意义[J]. *山东医药*, 2018, 58(9): 9-12.
- [3] 施煜燕, 周建波. 老年溃疡性结肠炎患者炎症细胞因子、T 淋巴细胞亚群和凝血功能变化[J]. *中国老年学杂志*, 2018, 38(2): 382-384.
- [4] Adams SM, Bornemann PH. Ulcerative colitis [J]. *Am Fam Physician*, 2013, 87(10): 699-705.
- [5] 杨斐, 郑晓娟, 刘近春, 等. 溃疡性结肠炎肠道菌群失调的治疗进展[J]. *胃肠病学*, 2018, 23(1): 56-58.
- [6] Ordás I, Eckmann L, Talamini M, et al. Ulcerative colitis [J]. *Lancet*, 2012, 380(9853): 1606-1619.
- [7] 中华医学会消化病学分会炎症性肠病学组. 炎症性肠病诊断与治疗的共识意见(2012年·广州)[J]. *中华内科杂志*, 2012, 51(10): 818-831.
- [8] Cross R, Ko CW, Singh S. Mild-to-Moderate Ulcerative Colitis Guideline [J]. *Gastroenterology*, 2019, 156(3): 768.
- [9] 王晓宏, 张邑. 槐花散联合仙方活命饮治疗溃疡性结肠炎临床研究[J]. *国际中医中药杂志*, 2017, 39(8): 701-704.
- [10] Fukuda T, Naganuma M, Kanai T. Current new challenges in the management of ulcerative colitis [J]. *Intest Res*, 2019, 17(1): 36-44.
- [11] 张永利, 申妮. 溃疡性结肠炎患者肠道菌群的变化特征[J]. *河北医药*, 2018, 40(7): 1054-1057.
- [12] 刘志威, 王学群, 李甜甜, 等. 溃疡性结肠炎患者肠道菌群变化的临床意义[J]. *胃肠病学和肝病学杂志*, 2016, 25(5): 554-556.
- [13] 李静, 陈卫刚. 肠道菌群治疗溃疡性结肠炎的研究进展[J]. *实用医学杂志*, 2017, 33(24): 4189-4192.
- [14] 谭芳. 益生菌对溃疡性结肠炎大鼠肠黏膜 TLRs 表达的影响[D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2015.
- [15] 李顺清. 溃疡性结肠炎患者肠道菌群含量以及细胞因子、TLRs 分子表达情况的检测[J]. *海南医学院学报*, 2017, 23(5): 662-664, 668.
- [16] 徐晓云, 李冬斌, 李彬. TLR4、NF- $\kappa$ B p65、IL-8 在溃疡性结肠炎中的表达[J]. *疑难病杂志*, 2012, 11(3): 181-183, 封3.
- [17] 何雁, 王启之. Toll 样受体 9 与溃疡性结肠炎[J]. *安徽医药*, 2009, 13(6): 593-595.
- [18] 陈胜, 邹开芳, 杨天, 等. Toll 样受体 (TLR) 2、TLR4 和 TLR9 在大鼠结肠炎模型结肠组织中的表达及其意义[J]. *胃肠病学*, 2007, 12(6): 339-343.
- [19] Panés J, Alfaró I. New treatment strategies for ulcerative colitis [J]. *Expert Rev Clin Immunol*, 2017, 13(10): 963-973.
- [20] 岳文杰, 刘懿, 徐薇, 等. 溃疡性结肠炎 (UC) 肠黏膜中 IL-2、IL-4、IL-17 和 IL-10 的表达特点及其与疾病活动度的关系[J]. *复旦学报: 医学版*, 2012, 39(5): 454-459, 488.
- [21] 黄鹤, 伦伟健, 梁晓燕, 等. 沙利度胺对溃疡性结肠炎大鼠 MMP-9、COX-2、IL-6 水平的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2016, 36(7): 1594-1596.
- [22] 张爱军, 朱叶珊, 费亚军等. 中药封包电磁波导入辅助治疗溃疡性结肠炎的疗效及对血清炎症因子和免疫球蛋白的影响[J]. *疑难病杂志*, 2018, 17(4): 370-373.
- [23] 邓台燕, 全大祥, 吴彬, 等. 复方黄柏液联合美沙拉嗪对溃疡性结肠炎及肠道菌群和血清炎症因子的影响[J]. *中国现代医学杂志*, 2016, 26(9): 124-127.
- [24] 王云滨, 陈霞. 益生菌联合美沙拉嗪对溃疡性结肠炎患者血清炎症因子及免疫功能的影响[J]. *中国现代医生*, 2020, 58(9): 40-43.
- [25] 李琳, 钟青. 溃疡性结肠炎患者肠道菌群变化与细胞因子、TLRs 分子表达的相关性研究[J]. *传染病信息*, 2017, 30(6): 361-364.

(收稿日期: 2019-07-30)