

双歧杆菌对应激大鼠肠道菌群及促肾上腺皮质激素释放激素的影响

付蕾, 冀建伟, 郑鹏远, 罗予, 张军

■背景资料

IBS在人群中的发病率很高,越来越多的学者认为生活压力能够导致或加重IBS。益生菌是人类肠道的原籍菌,在维持宿主胃肠道正常生理功能中发挥重要作用。益生菌不仅能够调节肠道菌群失调,而且能够显著改善IBS和IBD患者的相关症状。

付蕾, 冀建伟, 郑州大学药学院 河南省郑州市 450001
郑鹏远, 张军, 郑州大学第二附属医院 郑州大学医学微生物学研究所 河南省郑州市 450014
罗予, 河南省医药科学研究所 河南省郑州市 450052
冀建伟, 2010年郑州大学在读硕士, 主要从事消化疾病的研究。
国家自然科学基金资助项目, No. 30772028
作者贡献分布: 付蕾、冀建伟及郑鹏远对此文贡献均等; 此课题由冀建伟、付蕾及郑鹏远设计; 研究过程由冀建伟与罗予完成; 研究所用新试剂和分析工具由付蕾、郑鹏远和罗予提供; 数据分析由冀建伟完成; 本论文写作由冀建伟、郑鹏远、付蕾及张军完成。
通讯作者: 付蕾, 450001, 河南省郑州市科学大道100号, 郑州大学药学院。 oldfu@zzu.edu.cn
电话: 0371-67781908
收稿日期: 2010-02-09 修回日期: 2010-05-03
接受日期: 2010-05-10 在线出版日期: 2010-05-28

Influence of *Bifidobacterium* on the intestinal microflora and corticotropin-releasing factor in rats following chronic psychological stress

Lei Fu, Jian-Wei Ji, Peng-Yuan Zheng, Yu Luo, Jun Zhang

Lei Fu, Jian-Wei Ji, School of Pharmaceutical Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, Henan Province, China

Peng-Yuan Zheng, Jun Zhang, the Second Affiliated Hospital of Zhengzhou University & Institute of Medical Microecology, Zhengzhou University, Zhengzhou 450014, Henan Province, China

Yu Luo, Henan Academy of Medical and Pharmaceutical Sciences, Zhengzhou 450052, Henan Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30772028

Correspondence to: Lei Fu, School of Pharmaceutical Sciences, Zhengzhou University, 100 Kexue Road, Zhengzhou 450001, Henan Province, China. oldfu@zzu.edu.cn

Received: 2010-02-09 Revised: 2010-05-03

Accepted: 2010-05-10 Published online: 2010-05-28

Abstract

AIM: To determine the influence of chronic psychological stress on intestinal microflora and corticotropin-releasing factor (CRF) and to investigate the protective effects of *Bifidobacterium* on intestinal function in rats.

METHODS: Fifty female Sprague-Dawley rats were randomly and equally divided into five

groups: normal group, stress group, *Bifidobacterium* group, Smecta group, and *Bifidobacterium* plus Smecta group. All these groups were subjected to either water avoidance stress (WAS) or normal condition for 2 h per day for 7 consecutive days. The *in vivo* intestinal permeability was evaluated by measuring urinary sucralose and other sugar probes including lactulose and mannitol using capillary column gas chromatography (CCGC). Some representative genera of gut flora in rat feces were counted on selective culture medium plates. The mesenteric lymph nodes (MLN) were removed, homogenized and cultured to determine bacterial translocation. The contents of serum CRF and adrenocorticotrophic hormone (ACTH) were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

RESULTS: Compared with the normal group, the number of *Escherichia coli* (7.347 ± 0.277 vs 7.078 ± 0.229 , $P < 0.05$), the 24-h urinary concentration of mannitol ($5.097\% \pm 0.453\%$ vs $4.718\% \pm 0.399\%$, $P < 0.05$), the rate of bacterial translocation to the MLN (40% vs 10% , $P < 0.05$), and the levels of CRF ($300.8 \text{ ng/L} \pm 34.3 \text{ ng/L}$ vs $267.0 \text{ ng/L} \pm 32.3 \text{ ng/L}$, $P < 0.05$) and ACTH ($6.79 \text{ ng/L} \pm 0.651 \text{ ng/L}$ vs $5.68 \text{ ng/L} \pm 0.799 \text{ ng/L}$, $P < 0.05$) increased significantly in the stress group. In comparison with the stress group, the number of *Escherichia coli* (7.044 ± 0.281 vs 7.347 ± 0.277 , $P < 0.05$) and bacteroid (9.075 ± 0.393 vs 9.485 ± 0.306 , $P < 0.05$); the rate of bacterial translocation to the MLN (10% vs 40% , $P < 0.05$) and ACTH level ($5.92 \text{ ng/L} \pm 0.477 \text{ ng/L}$ vs $6.79 \text{ ng/L} \pm 0.651 \text{ ng/L}$, $P < 0.05$) decreased significantly in the *Bifidobacterium* intervention group.

CONCLUSION: The disturbance of intestinal microflora occurs and CRF increases significantly in rats suffered from chronic psychological stress. *Bifidobacterium* could alleviate the disturbance of gut microflora caused by chronic psychological stress and partly restore intestinal barrier function.

Key Words: Probiotic; Chronic psychological stress;

■同行评议者

陈敬贤, 教授, 安徽医科大学微生物教研室

Intestinal permeability; Intestinal microflora; Corticotropin-releasing factor

Fu L, Ji JW, Zheng PY, Luo Y, Zhang J. Influence of *Bifidobacterium* on the intestinal microflora and corticotropin-releasing factor in rats following chronic psychological stress. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(15): 1544-1549

摘要

目的: 探讨应激对大鼠肠道菌群及血清促肾上腺皮质激素释放激素(CRF)的影响及双歧杆菌对应激大鼠肠道功能的调节作用。

方法: 50只SD大鼠随机分为5组: 正常对照组、压力实验组、双歧杆菌干预组、思密达干预组、双歧杆菌+思密达共同干预组。采用WAS(water avoidance stress)避水实验构建大鼠应激模型, 以三糖为探针, 衍生化毛细管气相色谱法测定大鼠尿液中三种糖的浓度, 以三氯蔗糖/甘露醇(S/M)评价大鼠肠道通透性; 取大鼠新鲜粪便, 用选择性培养基平皿计数法检测大鼠粪便菌群中几种代表性菌种的数量; 取肠系膜淋巴结(MLN)培养后测定细菌移位率; 用酶联免疫法测定大鼠血清中CRF和促肾上腺皮质激素(ACTH)的含量。

结果: 与正常对照组相比, 压力实验组大鼠粪便中以大肠杆菌杆菌为主的条件致病菌数量增多(7.347 ± 0.277 vs 7.078 ± 0.229 , $P < 0.05$); 24 h尿液中甘露醇量升高($5.097\% \pm 0.453\%$ vs $4.718\% \pm 0.399\%$, $P < 0.05$), MLN细菌移位率升高(40% vs 10% , $P < 0.05$); CRF (300.8 ng/L ± 34.3 ng/L vs 267.0 ng/L ± 32.3 ng/L, $P < 0.05$), ACTH (6.79 ng/L ± 0.651 ng/L vs 5.68 ng/L ± 0.799 ng/L, $P < 0.05$)水平升高。与压力实验组相比, 双歧杆菌干预组大肠杆菌(7.044 ± 0.281 vs 7.347 ± 0.277 , $P < 0.05$)、类杆菌(9.075 ± 0.393 vs 9.485 ± 0.306 , $P < 0.05$)数量显著下降, 细菌移位率下降(10% vs 40% , $P < 0.05$); ACTH水平下降(5.92 ng/L ± 0.477 ng/L vs 6.79 ng/L ± 0.651 ng/L, $P < 0.05$)。

结论: 在慢性应激条件下, 大鼠出现肠道菌群失调、肠道通透性升高、神经内分泌处于应激状态的现象, 双歧杆菌能够缓解慢性应激所导致的上述现象。

关键词: 益生菌; 应激; 肠道通透性; 肠道菌群; 促肾上腺皮质激素释放激素

付蕾, 冀建伟, 郑鹏远, 罗予, 张军. 双歧杆菌对应激大鼠肠道菌群及促肾上腺皮质激素释放激素的影响. *世界华人消化杂志*

2010; 18(15): 1544-1549

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1544.asp>

0 引言

近年来, 社会心理因素对压力相关性(stress-associated)疾病如肥胖、代谢综合征、II型糖尿病以及疼痛和慢性疲劳综合征的影响日益得到关注^[1,2]。越来越多的学者认为生活压力能够导致或加重功能性肠病如肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)^[3,4]以及炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD), 如克罗恩病、溃疡性结肠炎^[4,5]。在胃肠道门诊中仅IBS患者就达到了40%^[6], 而4%-31%的IBS与生活压力和细菌性肠胃炎有关^[7]。IBS等压力相关性胃肠道疾病的高发病率促使我们研究社会心理因素在胃肠道疾病发病机制中的具体作用并为其治疗寻找新的靶标。目前普遍认为, 促肾上腺皮质激素释放激素(corticotropin-releasing factor, CRF)在应激所导致的胃肠道疾病中发挥重要作用^[8]。CRF是应激反应系统中重要的效应因子。中枢CRF是调节自主神经系统重要神经递质, 在胃肠道也存在CRF的表达^[4,9], 二者通过调节自主神经系统、胃肠道神经系统和免疫系统在压力相关性的IBS和IBD中发挥作用^[6,10,11]。益生菌是人类肠道的原籍菌, 已经广泛应用于临床, 在维持宿主胃肠道正常生理功能中发挥重要作用。益生菌不仅能够调节肠道菌群失调, 而且能够显著改善IBS和IBD患者的相关症状^[12], 尽管大量的数据显示益生菌能够调节肠道免疫^[13]、阻断病原菌黏附提高黏膜屏障功能^[14,15], 但其在应激所导致的胃肠道疾病中的治疗作用研究较少。思密达是临床上常用的肠道黏膜屏障保护剂, 可抑制细菌移位, 临床上常用来治疗腹泻。在本实验中我们拟以避水实验模拟环境和心理压力, 观察在应激条件下大鼠肠道生理生化指标的变化, 使用长双歧杆菌、思密达干预应激大鼠, 观察二者对应激条件下大鼠肠道功能的调节作用以及在保护应激大鼠肠道黏膜屏障有无协同作用。

1 材料和方法

1.1 材料 SD大鼠(郑州大学实验动物中心合格证号SCXK(豫)2005-0001); 长双歧杆菌(自金双歧片中分离, 内蒙古双歧药业, 批号: 090106); 思密达(蒙脱石散, 博福-益普生天津制药公司, 批号: T0461); 大鼠CRF、ACTH-ELISA试剂盒(美国ADL公司); 乳果糖(纯度99%, 比利时Acros公司);

■ 研发前沿

压力相关性IBS的发病机制目前仍不清楚, 目前研究多集中在肠道菌群状态、肠道屏障功能等方面, 其中CRF作为应激反应中重要的效应因子备受研究者关注。

■相关报道

Zairian等研究发现益生菌能够提高应激大鼠肠道屏障功能、阻断细菌移位。Gareau等认为肠道微生物群的变化是结肠病变的病因,益生菌改善应激幼鼠的肠道功能可能与其调节HPA轴正常化有关。在本课题组的前期研究中也发现应激可以导致嗜酸性粒细胞释放CRF。

甘露醇(纯度98%,比利时Acros公司);三氯蔗糖(纯度99%,美国Sigma公司); α -D-甲基甘露糖苷(内标1,纯度99%,美国Sigma公司);蔗糖(内标2,纯度99%,美国Sigma公司);N-三甲硅烷基咪唑、吡啶、盐酸羟胺(美国Sigma公司)。

1.2 方法

1.2.1 分组及应激模型的建立:清洁级SD大鼠50只,♀,体质量 $200\text{ g}\pm 20\text{ g}$,随机分为5组:正常对照组(A)、压力实验组(B)、双歧杆菌干预组(C)、思密达干预组(D)、双歧杆菌+思密达共同干预组(E),每组10只。A、B、C、D、E组分别灌胃给以下列溶液2 mL(ig):生理盐水、生理盐水、长双歧杆菌 10^7 CFU/mL 、思密达 0.6 g/kg 、长双歧杆菌 10^7 CFU/mL +思密达 0.6 g/kg ,每日8:00给药1次。WAS(water avoidance stress)模型^[14]:每日称质量给药后,除A组外其余各组动物均放置到一个 $8\text{ cm}\times 6\text{ cm}$ 的平台上,平台固定在一个直径为50 cm,深50 cm的有水塑料容器内,离水面的距离为1 cm,每次放置2 h(8:00-10:00am),实验周期为7 d。

1.2.2 肠道通透性测定:糖摄取和尿液采集:第8天早晨8:00开始,每组大鼠分别灌胃给予甘露醇(M)80 mg、三氯蔗糖(S)60 mg、乳果糖(L)120 mg后放入大鼠代谢笼,3 h后自由饮水,该过程禁食^[16]。收集前5 h和其后19 h尿液,记录尿液体积。实验结束后将采集到的尿液置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下储存,进行后续的分析。样品制备^[17]: $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱内取出尿液样品解冻,取100 μL 样品加入20 μL 内标溶液(含5 g/L内标1、2 g/L内标2),混匀后 $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 氮气吹干,干燥物加入200 μL 含25 g/L盐酸羟胺的无水吡啶溶液, $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 反应1 h后,样品于2 250 r/min离心5 min,取100 μL 上清液转移到小锥形瓶中,加入100 μL N-三甲硅烷基咪唑在 $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 反应30 min,得到的硅烷化衍生物密封储存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱。在大鼠空白尿液中加入已知量两种糖制成标准品平行分析。测定方法^[17]:衍生化毛细管气相色谱法(capillary column gas chromatography, CCGC)测定大鼠尿液中甘露醇、三氯蔗糖浓度。色谱柱:HP-5(5%苯甲基硅烷)柱($30\text{ m}\times 320\text{ }\mu\text{m}\times 0.25\text{ }\mu\text{m}$);流动相:高纯氮气,1.0 mL/min;柱温:程序升温;检测器:氢火焰离子化检测器, $T=280\text{ }^{\circ}\text{C}$;进样量:2 μL ,手动进样,进样口温度 $250\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。每种糖定位由相应标准品的保留时间来确定,内标标准曲线法计算样品中每种糖的量。在该色谱条件下,内标1、甘露醇、内标2、三氯蔗糖和乳果糖的保留时

间分别是3.5、4.6、13.7、14.6和15.8 min。

1.2.3 血清中CRF、ACTH测定:实验结束日采用断头法处死大鼠,收集血液,室温下凝固20 min,低温离心($4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、4 000 r/min, 30 min)分离血清,采用ELISA法测定血清中CRF和促肾上腺皮质激素(adrenocorticotrophic hormone, ACTH)的量。

1.2.4 粪便菌群分析^[13]:大鼠处死后取其新鲜粪便0.1 g左右,立即装入已称质量并装有5 mL生理盐水和2-3粒玻璃珠的无菌试管中,然后用生理盐水以10倍的比例倍比稀释成系列混悬液。取上述系列稀释液25 μL 滴种到4种选择性培养基上:大肠杆菌(伊红美兰培养基)、类杆菌(Bds培养基)、乳酸杆菌(Lbs培养基)、双歧杆菌(Blb培养基)。大肠杆菌需氧培养24 h,其余三菌置于厌氧罐中厌氧培养48 h,记录菌落数。根据菌落形态、涂片分析及耐氧实验结果计算各个菌种每克粪便中菌落形成单位(CFU/g)。

1.2.5 细菌移位:大鼠处死后以750 mL/L乙醇溶液浸泡1 h,于超净台内无菌取肠系膜淋巴结(mesenteric lymph node, MLN),匀浆后接种于血琼脂平板, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 需氧24 h后或厌氧48 h后观察是否有细菌生长并记录菌落数。平板有细菌生长者记为MLN细菌移位阳性。移位率=阳性大鼠个数/每组大鼠总数。

统计学处理 实验结果采用SPSS10.0统计软件包分析。组间均数比较选用单因素方差分析,移位率的比较采用行 \times 列表 χ^2 检验。采用 $\alpha=0.05$ 为假设检验标准。

2 结果

2.1 粪便菌群分析 与正常对照组相比,压力实验组大肠杆菌数量显著增加($P<0.05$,表1),说明应激环境下大鼠肠道出现了条件致病菌增多,肠道菌群紊乱现象;与压力实验组相比,双歧杆菌干预组及思密达干预组的大肠杆菌数量显著下降,双歧杆菌和双歧杆菌+思密达干预组大鼠的类杆菌数量显著下降($P<0.05$),但三组实验组之间均无显著性差异,说明长双歧杆菌、思密达均能改善应激所导致的肠道菌群紊乱,二者无协同作用。

2.2 细菌移位 MLN培养结果显示各组大鼠均有细菌移位现象发生,但压力实验组细菌移位率显著高于其他各组($P=0.00$,表2)。双歧杆菌或思密达干预后,实验组移位率显著降低($P=0.00$);双歧杆菌+思密达组移位率与双歧杆菌组无明显差异。

2.3 大鼠肠道通透性的测定 在该实验中以大鼠

表 1 大鼠粪便菌群分析结果 (n = 10, LgCFU/g, mean ± SD)

分组	大肠杆菌	类杆菌	乳杆菌	双歧杆菌
正常组	7.078 ± 0.229	9.214 ± 0.323	8.158 ± 0.388	9.175 ± 0.312
压力组	7.347 ± 0.277 ^a	9.485 ± 0.306	8.066 ± 0.287	9.027 ± 0.353
双歧杆菌组	7.044 ± 0.281 ^c	9.075 ± 0.393 ^c	8.123 ± 0.245	9.088 ± 0.288
思密达组	7.054 ± 0.302 ^c	9.145 ± 0.381	8.039 ± 0.234	9.084 ± 0.352
双歧杆菌+思密达	7.128 ± 0.298	9.127 ± 0.328 ^c	8.040 ± 0.347	9.136 ± 0.401

^aP<0.05 vs 正常组; ^cP<0.05 vs 模型组.

表 2 各组大鼠细菌移位率结果

分组	正常组	压力组	双歧杆菌组	思密达组	双歧杆菌+思密达组
MLN阳性数	1	4	1	2	1
总动物数	10	10	10	10	10
移位率(%)	10 ^c	40 ^a	10 ^c	20 ^{ac}	10 ^c

^aP<0.05 vs 正常组; ^cP<0.05 vs 模型组.

表 3 24 h大鼠尿液中甘露醇、三氯蔗糖的量及S/M (n = 10, %, mean ± SD)

分组	甘露醇(M)	三氯蔗糖(S)	S/M
正常组	4.718 ± 0.399	6.997 ± 0.520	1.304 ± 0.119
压力组	5.097 ± 0.453 ^a	6.167 ± 0.588	1.252 ± 0.096
双歧杆菌组	4.753 ± 0.363	6.031 ± 0.477	1.242 ± 0.095
思密达组	4.826 ± 0.419	6.075 ± 0.520	1.259 ± 0.052
双歧杆菌+思密达	4.806 ± 0.370	6.041 ± 0.496	1.259 ± 0.079

^aP<0.05 vs 正常组.

尿液S/M值来评价其肠道通透性. 大鼠尿液5 h和24 h甘露醇、三氯蔗糖、S/M结果见表3. 5 h(数据未显示)和24 h时S/M值可以分别用来评价小肠的通透性及整个胃肠道的通透性. 从表3可以看出压力实验组24 h尿液中甘露醇的量与正常对照组有显著性差异, 应激条件下大鼠肠道通透性发生了改变.

2.4 应激对大鼠血清CRF、ACTH的影响 与正常对照组相比压力实验组血清CRF、ACTH水平都有显著升高(P<0.05, 表4); 与压力实验组相比, 双歧杆菌干预组和双歧杆菌+思密达干预组ACTH水平显著下降(P<0.001). 这说明在应激的环境下, 大鼠的神经内分泌处于应激状态, 而益生菌对这种应激状态有缓解作用.

3 讨论

近年来有关益生菌治疗应激所导致的胃肠道

疾病的研究进展迅速, 但其治疗机制目前仍不清楚. 关于其治疗作用目前主要集中在益生菌对CRF的调节作用上^[18]. 本实验中应激大鼠也出现了血清CRF升高、肠道通透性改变及肠道菌群紊乱现象, 而双歧杆菌能够缓解上述现象, 这与Gareau等^[15]的研究结果相符. 在应激反应中, CRF通过中枢的下丘脑-垂体-肾上腺轴(hypothalamic-pituitary- adrenal, HPA轴)或者外周的以CRF为基础的旁分泌系统的激活来调节胃肠道^[11]. 在一定程度上说明益生菌可能是通过HPA轴这样一个长反射弧来调节应激所导致的胃肠道功能紊乱: (1)在其生长的肠道上皮位置, 调节肠道菌群正常化, 阻止病原菌黏附, 通过保护肠上皮的完整性来增强肠道的屏障功能. (2)通过神经体液因子途径, 益生菌可能间接刺激传入神经纤维. (3)降低全身皮质酮和ACTH的分泌^[19].

■创新盘点

本文探讨双歧杆菌对应激大鼠肠道功能的保护作用, 可以恢复受损的肠道屏障功能, CCGC测定应激大鼠肠道通透性的方法专属性较高, 灵敏度高, 降低了实验成本.

■应用要点

双歧杆菌和思密达能部分缓解慢性应激所导致的肠道功能紊乱现象,但二者联合使用没有意义,提示在临床实践中可以单用益生菌治疗。

表 4 大鼠神经内分泌测定结果 ($n = 10$, ng/L, mean \pm SD)

	正常组	压力组	双歧杆菌组	思密达组	双歧杆菌+思密达组
CRF	267.0 \pm 32.3	300.8 \pm 34.3 ^a	279.5 \pm 29.6	281.6 \pm 32.3	277.8 \pm 31.9
ACTH	5.68 \pm 0.799	6.79 \pm 0.651 ^a	5.92 \pm 0.477 ^c	6.24 \pm 0.787	5.94 \pm 0.650 ^c

^a $P < 0.05$ vs 正常组; ^c $P < 0.05$ vs 模型组。

应激大鼠出现肠道通透性的改变可能有下列原因。CRF是HPA轴的重要神经递质,其分泌具有昼夜节律性。CRF由下丘脑室旁核小细胞部神经元产生,于垂体前叶与CRF受体结合诱导ACTH释放,进而刺激肾上腺糖皮质激素释放^[20],而糖皮质激素是调节炎症及免疫反应的重要物质。CRF受体是一种G蛋白偶联受体,其信号传导是由通过激动cAMP所介导的级联反应^[21],并最终增加细胞内Ca²⁺浓度^[22]改变膜电位来实现的。肥大细胞通过抑制Ca²⁺内流来抑制自身活化和脱颗粒,而CRF能够促进Ca²⁺内流从而激活肥大细胞^[23]。肠道的上皮细胞是由一层柱状细胞组成,通过紧密连接蛋白进行连接,阻止抗原等大分子物质和细菌等通过旁细胞途径进行渗透,并且能够分泌大量的黏液素和抑菌蛋白来阻断细菌黏附。在应激条件下,细菌和抗原等可以由滤泡相关细胞如肥大细胞或紧密连接结构断裂等方式通过上皮屏障而进入体内^[24],进而引起细菌移位,通透性发生改变,而使用肥大细胞稳定剂后没有出现应激相关性的肠道通透性升高^[3]。因此,CRF调节肠道通透性可能是通过肥大细胞实现的。CRF信号传导的活化,能够导致致炎因子的释放^[25],促进肥大细胞释放组胺、IL-1 β 、TNF- α 等炎症因子^[26]。在我们前期研究中发现应激可以导致嗜酸性粒细胞释放CRF^[27],而使用CRF受体阻断剂可以显著的改善应激所导致的肠道屏障功能紊乱^[28]。因此,CRF在应激相关肠道功能紊乱中起着重要作用,但其确切的作用机制如作用位点等仍需进一步研究。

肠道通透性的测量是评估肠道屏障功能完整性的最直接方法,常用大分子糖探针来进行测定。乳果糖和甘露醇的被认为是旁细胞和跨细胞途径通透性的反映,二者比率曾是一种灵敏度高的小肠通透性标记。但由于乳果糖是一种二糖易被结肠的细菌分解,改变的结肠pH,可能改变结肠微生物群,改变肠道通透性而不宜选用。而三氯蔗糖无这些缺点,尿液中三氯蔗糖的排泄可以应用于整个肠道(包括小肠和结肠)

通透性的评估^[17]。本实验中流动相采用了氮气得到的峰形较好,分离度能满足实验要求,降低了实验成本。由于相关文献较少,建立有效的三氯蔗糖与甘露醇比例(S/M)作为整体肠道通透性的标记的方法还需深入研究。本实验中应激大鼠虽出现肠道甘露醇的通透性升高,但S/M虽有升高趋势却无明显变化,可能有以下原因:大鼠对应激具有适应性、WAS模型刺激较弱需延长造模周期。该实验中采用了单一菌株干预且干预时间为较短,益生菌的联合长期应用值得我们进一步研究。

本实验中应激大鼠出现了肠道菌群失调、CRF水平升高、细菌移位等现象,大鼠的神经内分泌处于应激状态,肠道通透性亦发生了改变。本实验的结果也证实了双歧杆菌能够缓解上述现象,为益生菌治疗应激所导致的肠道相关疾病的治疗提供了实验依据。

4 参考文献

- 1 Miller G, Chen E, Cole SW. Health psychology: developing biologically plausible models linking the social world and physical health. *Annu Rev Psychol* 2009; 60: 501-524
- 2 Muscatell KA, Slavich GM, Monroe SM, Gotlib IH. Stressful life events, chronic difficulties, and the symptoms of clinical depression. *J Nerv Ment Dis* 2009; 197: 154-160
- 3 Santos J, Alonso C, Vicario M, Ramos L, Lobo B, Malagelada JR. Neuropharmacology of stress-induced mucosal inflammation: implications for inflammatory bowel disease and irritable bowel syndrome. *Curr Mol Med* 2008; 8: 258-273
- 4 Stengel A, Taché Y. Neuroendocrine control of the gut during stress: corticotropin-releasing factor signaling pathways in the spotlight. *Annu Rev Physiol* 2009; 71: 219-239
- 5 Maunier RG, Levenstein S. The role of stress in the development and clinical course of inflammatory bowel disease: epidemiological evidence. *Curr Mol Med* 2008; 8: 247-252
- 6 Taché Y, Brunnhuber S. From Hans Selye's discovery of biological stress to the identification of corticotropin-releasing factor signaling pathways: implication in stress-related functional bowel diseases. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1148: 29-41
- 7 Spiller R, Garsed K. Postinfectious irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2009; 136: 1979-1988
- 8 Yang PC, Jury J, Söderholm JD, Sherman PM,

- McKay DM, Perdue MH. Chronic psychological stress in rats induces intestinal sensitization to luminal antigens. *Am J Pathol* 2006; 168: 104-114; quiz 363
- 9 Fekete EM, Zorrilla EP. Physiology, pharmacology, and therapeutic relevance of urocortins in mammals: ancient CRF paralogs. *Front Neuroendocrinol* 2007; 28: 1-27
- 10 Fukudo S. Role of corticotropin-releasing hormone in irritable bowel syndrome and intestinal inflammation. *J Gastroenterol* 2007; 42 Suppl 17: 48-51
- 11 Paschos KA, Kolios G, Chatzaki E. The corticotropin-releasing factor system in inflammatory bowel disease: Prospects for new therapeutic approaches. *Drug Discov Today* 2009; 14: 713-720
- 12 Hörmannspurger G, Haller D. Molecular crosstalk of probiotic bacteria with the intestinal immune system: clinical relevance in the context of inflammatory bowel disease. *Int J Med Microbiol* 2010; 300: 63-73
- 13 张利利, 郑鹏远, 罗予, 王新亭, 刘志强, 黄煌. 双歧杆菌对食物过敏小鼠肠道屏障功能及Th1/Th2细胞因子的影响. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 450-550
- 14 Zareie M, Johnson-Henry K, Jury J, Yang PC, Ngan BY, McKay DM, Soderholm JD, Perdue MH, Sherman PM. Probiotics prevent bacterial translocation and improve intestinal barrier function in rats following chronic psychological stress. *Gut* 2006; 55: 1553-1560
- 15 Gareau MG, Jury J, MacQueen G, Sherman PM, Perdue MH. Probiotic treatment of rat pups normalises corticosterone release and ameliorates colonic dysfunction induced by maternal separation. *Gut* 2007; 56: 1522-1528
- 16 Meddings JB, Gibbons I. Discrimination of site-specific alterations in gastrointestinal permeability in the rat. *Gastroenterology* 1998; 114: 83-92
- 17 Farhadi A, Keshavarzian A, Holmes EW, Fields J, Zhang L, Banan A. Gas chromatographic method for detection of urinary sucralose: application to the assessment of intestinal permeability. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2003; 784: 145-154
- 18 Kiank C, Taché Y, Larauche M. Stress-related modulation of inflammation in experimental models of bowel disease and post-infectious irritable bowel syndrome: role of corticotropin-releasing factor receptors. *Brain Behav Immun* 2010; 24: 41-48
- 19 Eutamene H, Bueno L. Role of probiotics in correcting abnormalities of colonic flora induced by stress. *Gut* 2007; 56: 1495-1497
- 20 Lightman SL. The neuroendocrinology of stress: a never ending story. *J Neuroendocrinol* 2008; 20: 880-884
- 21 Hauger RL, Grigoriadis DE, Dallman MF, Plotsky PM, Vale WW, Dautzenberg FM. International Union of Pharmacology. XXXVI. Current status of the nomenclature for receptors for corticotropin-releasing factor and their ligands. *Pharmacol Rev* 2003; 55: 21-26
- 22 Gutknecht E, Van der Linden I, Van Kolen K, Verhoeven KF, Vauquelin G, Dautzenberg FM. Molecular mechanisms of corticotropin-releasing factor receptor-induced calcium signaling. *Mol Pharmacol* 2009; 75: 648-657
- 23 Wallon C, Yang PC, Keita AV, Ericson AC, McKay DM, Sherman PM, Perdue MH, Söderholm JD. Corticotropin-releasing hormone (CRH) regulates macromolecular permeability via mast cells in normal human colonic biopsies in vitro. *Gut* 2008; 57: 50-58
- 24 Al-Sadi R, Boivin M, Ma T. Mechanism of cytokine modulation of epithelial tight junction barrier. *Front Biosci* 2009; 14: 2765-2778
- 25 Gay J, Kokkotou E, O'Brien M, Pothoulakis C, Karalis KP. Corticotropin-releasing hormone deficiency is associated with reduced local inflammation in a mouse model of experimental colitis. *Endocrinology* 2008; 149: 3403-3409
- 26 Rao KN, Brown MA. Mast cells: multifaceted immune cells with diverse roles in health and disease. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1143: 83-104
- 27 Zheng PY, Feng BS, Oluwole C, Struiksma S, Chen X, Li P, Tang SG, Yang PC. Psychological stress induces eosinophils to produce corticotrophin releasing hormone in the intestine. *Gut* 2009; 58: 1473-1479
- 28 Teitelbaum AA, Gareau MG, Jury J, Yang PC, Perdue MH. Chronic peripheral administration of corticotropin-releasing factor causes colonic barrier dysfunction similar to psychological stress. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008; 295: G452-G459

■同行评价

本研究观察大鼠在应急模型中肠道主要菌群发生的改变, 以及双歧杆菌干预对此改变的调节作用, 有很好的科学意义。

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》入选《中国学术期刊评价研究报告—RCCSE 权威、核心期刊排行榜与指南》

本刊讯 《中国学术期刊评价研究报告-RCCSE权威、核心期刊排行榜与指南》由中国科学评价研究中心、武汉大学图书馆和信息管理学院联合研发, 采用定量评价和定性分析相结合的方法, 对我国万种期刊大致浏览、反复比较和分析研究, 得出了65个学术期刊排行榜, 其中《世界华人消化杂志》位居396种临床医学类期刊第45位。(编辑部主任: 李军亮 2010-01-08)