

微生态制剂与炎症性肠病

张峰睿, 缪应雷

■背景资料

微生态制剂(益生菌、益生元)在炎症性肠病的治疗中已经取得了临床医师的认可,虽国内外有大量基础及临床研究,但其作用机制、临床药物剂型的选择、用量等问题尚无统一标准,对微生态制剂的合理运用造成了困难,本文选取大量国内外相关研究,并提出微生态制剂研究中的相关问题。

张峰睿, 缪应雷, 昆明医科大学第一附属医院消化内科 云南省昆明市 650032

张峰睿,在读硕士,主要从事炎症性肠病的研究。

作者贡献分布: 本文综述由张峰睿完成; 缪应雷审校。

通讯作者: 缪应雷, 主任医师, 650032, 云南省昆明市西山区西昌路295号, 昆明医科大学第一附属医院消化内科。myldu@sina.com 电话: 0871-65324888-2532

收稿日期: 2013-05-22 修回日期: 2013-07-17

接受日期: 2013-08-29 在线出版日期: 2013-09-28

Microbial ecological agents and inflammatory bowel disease

Feng-Rui Zhang, Ying-Lei Miao

Feng-Rui Zhang, Ying-Lei Miao, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650032, Yunnan Province, China

Correspondence to: Ying-Lei Miao, Chief Physician, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, 295 Xichang Road, Xishan District, Kunming 650032, Yunnan Province, China. myldu@sina.com

Received: 2013-05-22 Revised: 2013-07-17

Accepted: 2013-08-29 Published online: 2013-09-28

Abstract

Inflammatory bowel disease (IBD), including ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD), is a chronic non-specific inflammatory condition of the gastrointestinal tract with unknown etiology. During the exploration of the etiology, treatment and other aspects of IBD, it has been gradually realized that microbial ecological agents (MEAs) are helpful in the treatment of IBD. This article reviews the relationship between MEAs and IBD with regard to the intestinal environment in IBD, the therapeutic effect of MEA in IBD and the possible mechanisms involved.

© 2013 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

Key Words: Inflammatory bowel disease; Intestinal environment; Microbial ecological agents

Zhang FR, Miao YL. Microbial ecological agents and inflammatory bowel disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(27): 2792-2801 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/2792.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i27.2792>

■同行评议者

季国忠, 教授, 南京医科大学第二附属医院消化科

摘要

炎症性肠病(inflammation bowel disease, IBD), 是一种病因不清的, 慢性非特异性肠道炎症性疾病, 包括溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)与克罗恩病(Crohn's disease, CD). 在对IBD病因、治疗等方面的探索过程中, 人们逐渐开始重视微生态制剂(microbial ecological agent, MEA)对IBD的重要作用, 国内外大量研究提示微生态制剂对于IBD的治疗有所帮助. 本文总结了近年来MEA与IBD关系的研究进展, 就IBD肠道环境、MEA的治疗效果及作用机制等方面作一综述。

© 2013年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词: 炎症性肠病; 肠道环境; 微生态制剂

核心提示: 微生态制剂在治疗炎症性肠病中的运用已经逐渐常规化, 国内外亦在探索其作用机制及临床效果, 但微生态制剂的确切作用机制以及临床使用中剂型、剂量、用药时间等相关问题仍无统一结论, 本文选取大量相关文献, 并提出亟待解决的问题, 为实验研究及临床运用提出了一定的建议与参考。

张峰睿, 缪应雷. 微生态制剂与炎症性肠病. 世界华人消化杂志 2013; 21(27): 2792-2801 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/2792.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i27.2792>

0 引言

炎症性肠病(inflammation bowel disease, IBD)病因未明, 治疗主要依赖柳氮磺胺吡啶(salazosulfapyridine, SASP)制剂或氨基水杨酸制剂(5-amino salicylic acid, 5-ASA), 反应不佳或病情严重者可加用糖皮质激素或免疫抑制剂, 近年来, 众多有关微生态制剂(microbial ecological agent, MEA)在IBD治疗中的研究成果, 不断地阐释和验证了MEA在IBD治疗中的机制与疗效. 在临床工作中, 对MEA的运用也逐渐成为IBD治疗中的常规选择, 本文就MEA与IBD的基础研究及临床运用作一综述。

1 正常人肠道菌群

1.1 正常肠道菌群组成 正常人体消化系统中含近500余种细菌, 数量达 10^{14} 个左右, 主要由厌氧菌、需氧菌及兼性厌氧菌组成, 据报道^[1], 成人体内杆菌属及厚壁菌属常占据主导地位, 而放线菌、变形细菌虽常见, 但仅是次要组成部分, 在不同人群中, 虽然肠道菌群的主要成分保持一致性, 但肠道微生态的相对比例和种类, 仍存在显著差异. 不同种类细菌的分布与肠道位置息息相关, G⁺菌与需氧菌主要位于上段小肠, 而厌氧菌则密集于回盲部, 结肠中的厌氧菌数量则更多, 如双歧杆菌、乳酸菌、类杆菌等, 不同种类的细菌共存于肠道环境中, 共同参与并调节肠道微环境, 并维护肠道微生物生态系统的平衡.

1.2 正常肠道菌群分类 肠道菌群可根据来源分为常驻菌群与过路菌群, 常驻菌群是指一类长期定居于人体肠腔内, 并维持正常肠道功能的一组细菌. 过路菌群又称病原菌, 长期定植机会较少, 故正常情况下人体内该种菌群数量少, 不足以致病, 一旦肠道微环境破坏, 正常菌群优势消失, 病原菌群则可导致肠道疾病发生.

根据细菌作用分为生理菌、条件致病菌及病原菌, 生理菌为宿主所长期携带, 为肠道优势菌群, 对人体无害, 并且具有营养、生物拮抗、免疫等作用; 条件致病菌为非优势菌群, 在肠道环境平衡的情况下可与宿主共存, 特定条件下可致病, 主要包括肠球菌、大肠杆菌等; 病原菌多为过路菌, 当一定数量的该种细菌进入宿主后, 可导致疾病发生, 如变形杆菌、产气荚膜杆菌等.

2 IBD患者肠道菌群

2.1 UC患者肠道菌群的改变 多项国内外研究皆提示溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)患者肠道菌群与正常人肠道菌群存在差异, 无论处于活动期、缓解期, UC患者和健康对照者粪便细菌存在着显著的差异. Yukawa等^[2]提出, 在UC患者粪便中, 发现了增高的*varium*梭杆菌; Nemoto等^[3]选取48例临床诊断UC的患者, 利用终端-限制性片段长度多态性(terminal-restriction fragment length polymorphism, T-RFLP)、实时荧光定量PCR(Real-time PCR)以及细胞培养, 结果提示UC患者肠道菌群多样性较健康人明显下降, 其中杆菌明显下降, 而肠球菌数量则较健康人升高, 同时发现UC患者粪便内有机酸含量下

降. Linskens等^[4]提出UC患者粪便中, 兼性厌氧菌含量升高, 乳杆菌、双歧杆菌等正常菌群数量下降. 崔海宏等^[5]采用梯度稀释, 进行肠道菌群分析, 发现UC急性期菌群中肠杆菌、肠球菌等致病菌数量明显上升, 而乳杆菌等正常菌群数量明显下降, 缓解期患者的拟杆菌属双歧杆菌较急性期明显上升, 且与对照组无明显差别. Kleessen等^[6]利用荧光原位杂交, 发现在83%的UC结肠黏膜标本中存在细菌对肠黏膜的侵袭, 但在对照组中并未发现.

2.2 CD患者肠道菌群的改变 Aomatsu等^[7]将UC、克罗恩病(Crohn's disease, CD)及健康人肠道菌群进行对比, 发现CD患者肠道菌群中梭状芽胞杆菌及*Faecalibacterium*属细菌含量均明显较UC患者及健康人降低, 杆菌属细菌同样较健康人明显下降, Shannon多样性指数提示CD患者的肠道细菌多样性较健康人下降. Ricanek等^[8]的团队利用rRNA分子探针技术对CD患者回肠及结肠病变部位黏膜的细菌分布情况, 结果提示CD患者杆菌较健康对照组明显下降(CD: 42%, 对照: 71%); 厚壁菌属上升(CD: 42%, 对照: 28%); 变形菌上升(CD: 15%, 对照: 0%). 国内Liu等^[9]选取了15例CD患者, 23例肠道结核患者以及21例健康志愿者, 分别对3组对象进行粪便细菌检测, 结果提示在CD患者中, 乳酸杆菌及双歧杆菌明显较健康志愿者下降, 但拟杆菌数量上升. Verma等^[10]将共计84例IBD患者(UC: 72例, CD: 12例)及65例健康对照者纳入实验, 经内镜取材后, 利用rRNA探针技术及RT-PCR技术分析肠黏膜细菌情况, 他们发现乳酸杆菌、瘤胃球菌属、双歧杆菌属在UC与CD患者均有明显下降. 梭状芽胞杆菌在CD患者中的变化不显著, 但在UC患者中明显增加; 革兰氏阳性球菌及消化链球菌属细菌在CD患者体内数量增加; 和健康对照者相比, CD患者及UC患者体内有明显增加的弯曲杆菌属细菌, 而其两者之间又存在显著差异, 且弯曲菌属数量随疾病的进展而变化, 当疾病进入缓解期时, 则弯曲菌属数量亦趋于恢复正常.

可见, IBD患者普遍存在肠道菌群失调, 以致病菌增加、正常菌群减少为其特点, 而肠道菌群失调将进一步导致肠屏障功能障碍, 从而促进IBD病情的发展, 故IBD患者肠道菌群的调整十分必要.

2.3 两种特殊细菌与IBD的关系 目前在关注IBD患者肠道菌群失调的同时, 亦不断提出一些肠

■研发前沿

微生态制剂在炎症性肠病中的研究热点集中于各类型益生菌及益生元在溃疡性结肠炎或克罗恩病治疗中的作用机制及临床效果, 虽有大量上述研究报道, 但针对微生态制剂作用机制以及其剂型、剂量、用药时间等临床问题的选择, 仍缺乏统一的共识, 亟待解决.

■创新盘点

本文不仅涉及益生菌在炎症性肠病治疗中的运用及机制研究,亦涉及国外对益生元及合生元运用的讨论,且提出了难辨梭状芽孢杆菌及普拉梭菌在炎症性肠病中的影响,在综合近年来国内外相关最新研究的同时,亦提出了微生物制剂在炎症性肠病治疗中尚存的相关问题。

道细菌在IBD病情发生、发展中的相关机制,其中以难辨梭状芽孢杆菌与普拉梭菌相关的研究较多。

2.3.1 难辨梭状芽孢杆菌: 难辨梭状芽孢杆菌(*Clostridium difficile*, *Cd*)是一种较为常见的革兰氏阳性杆菌,在长期应用抗生素的情况下,其在肠道生长速度加快,可以造成抗生素相关性肠炎。而*Cd*在IBD中的重要性逐渐被人们重视,国外流行病学报道称IBD患者的*Cd*易感性高于普通人群^[11],IBD与*Cd*间的关联可能是由于多种因素的影响,包括可能改变肠道菌群并促进*Cd*定植的治疗药物、改变免疫与营养状态的药物以及频繁的住院^[12]。*Cd*对于肠黏膜的破坏有可能来自于其黏附于肠黏膜后引发的过度免疫反应^[13]。在很多的临床试验以及流行病学研究结果中,我们同样可以看到存在*Cd*感染的IBD患者,往往有更高的结肠切除率、死亡率等更差的预后^[14-17]。

*Cd*在致病过程当中释放毒素A、B,毒素A可以通过活化包括钙/钙调蛋白(Ca^{2+} /calmodulin)、钙调素蛋白激酶(calcium/calmodulin-dependent kinase)、酪氨酸蛋白激酶(presence of protein tyrosine kinase, PTK)、核因子- κB (nuclear factor- κB , NF- κB)以及激活蛋白-1在内的通路,从而使单核细胞分泌白介素-8(interleukin-8, IL-8)增加^[18]。对于毒素B而言,其在人体肠道内已经被证明可以诱导肠上皮细胞损伤、增加肠黏膜通透性、刺激IL-8的合成并引发以中性粒细胞募集为特征的急性炎症反应^[19]。毒素B可以通过活化表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)以及ERK-MAP激酶而增加IL-8的基因表达。总之,毒素A、B介导的炎症反应机制涉及到激活MAP激酶、NF- κB 、AP-1以及促进IL-8的合成释放。

在Navaneethan等^[20]的研究中,UC患者并*Cd*感染(*Clostridium difficile* infection, CDI)的情况下,初次就诊的急诊室就诊率远高于无*Cd*感染的UC患者(37.8% vs 4.0%, $P < 0.001$),CDI在一年后的结肠切除率的比较中仍然远高于对照组(35.6% vs 9.9%, $P < 0.001$);CDI患者在一年内有55.8%需要治疗上的升级,而对照组则仅有12.9%患者的治疗需要提升,从多个角度对比*Cd*感染与否,均提示*Cd*的感染是IBD发展、加重的潜在原因。国内刘晶晶等^[21]研究提示,IBD患者中存在一定的*Cd*感染率(UC: 16.7%, CD: 8.6%),特别是在IBD活动期,且随着IBD疾病严重程度

的上升,*Cd*感染率亦逐步逐步增高。

到目前为止,尚未有明确证据提示*Cd*的感染先于IBD的发生,然而*Cd*激活的炎症反应则有助于IBD的发展与加重。随着对*Cd*在IBD发生、发展中作用认识的深入,对IBD患者检测*Cd*感染已成为了决定治疗策略及判断患者预后的重要指标。

2.3.2 普拉梭菌: 普拉梭菌(*Faecalibacterium prausnitzii*, *Fp*)属于厚壁菌属,在人体内可以代谢肠道未吸收的糖类并产生大量的丁酸,成为了肠道中主要产丁酸的细菌,而丁酸被广泛认为是肠黏膜上皮细胞的主要能量物质,对于维持肠黏膜屏障功能起到了重要作用^[22]。*Fp*在IBD患者体内减少,且经国内外研究证实,*Fp*具有抗炎特性,而*Fp*的减少有可能带来由细菌介导的黏膜抗炎活性的下降^[23]。

在Sokol等^[24]的研究中,22例活动期CD患者、10例缓解期CD患者、13例活动期UC患者、4例缓解期UC患者、8例感染性肠炎患者及27例健康对照者参与到实验当中,运用RT-PCR及16S rRNA探针技术测定各组患者粪便细菌并进行比较,*Fp*在活动期IBD及感染性肠炎患者中明显降低,同时他们提出*Fp*对于肠道微生物的稳定可能是至关重要的,而*Fp*的减少可能带来肠道黏膜保护能力的降低。

除了*Fp*分泌丁酸的机制外,关于*Fp*在IBD中抗炎机制的研究仍有很多提示。在Sokol等^[25]的研究中发现,*Fp*不仅仅能够产生丁酸供能,尚可调节肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、IL-10、IL-12等多种细胞因子的合成与释放,调整肠道菌群的组成,从而达到对IBD的治疗效果。国内洪娜等^[26]的研究提示,*Fp*具有上调外周血和脾内的Foxp3⁺Treg水平,抑制促炎因子IL-17、IL-6分泌,重建Treg/Th17平衡等作用,从而达到降低局部炎症反应的作用。提示*Fp*在IBD治疗过程中参与免疫调节。

可见对于IBD而言,*Fp*具有全面的作用机制,包括维持和增强肠黏膜屏障功能、调节肠黏膜免疫反应、维持肠道微生态环境等方面,故*Fp*应该更加具有开发潜力。

3 微生物制剂

3.1 微生物制剂分类 MEA包括益生菌(probiotic)与益生元(prebiotic),益生菌(probiotics)是指活微生物,口服后影响并改变肠道微环境,最终起到

有益作用, Thompson-Chagoyan将其定义为: 人体自有的, 且对宿主自身无致病性, 可定植于肠道并于肠道内繁殖, 有抗菌作用, 可调节免疫, 并对宿主代谢活动产生影响的多种微生物^[27], 当前临床常用制剂包括双歧杆菌、乳酸杆菌、地衣芽孢杆菌等。益生元是一种通过选择性的刺激一种或少数种菌落中的细菌的生长与活性而对寄主产生有益的影响从而改善寄主健康的不可被消化的食品成分, 可以将益生元理解为肠道益生菌的“食物”, 帮助益生菌的生长和繁殖。主要包括菊粉、乳果糖等多种寡糖类物质。合生元是益生菌与益生元的混合物, 既补充了益生菌, 同时也使用益生元促进了益生菌的生长与繁殖。目前临床常用的微生态制剂包括金双歧、贝飞达、丽珠肠乐、整肠生等。

3.2 微生态制剂的药理作用机制

3.2.1 增强肠道屏障: Anderson等^[28]通过跨膜电阻检测(transsepithelial electrical resistance, TEER)发现, 益生菌可使TEER上升, 达到增强紧密连接, 提升肠道屏障功能的作用, 其中又以植物乳杆菌DSM2648效果最佳; MEA尚可与其他厌氧菌等形成生物学屏障, 从而阻止病原菌的入侵与定植^[29]。尚有报道提出^[30], 布拉氏酵母菌能够通过活化 $\alpha 2\beta 1$ 整合胶原蛋白受体增强肠上皮自身修复能力, 加强肠道屏障功能。可见, 通过增强肠黏膜上皮间的紧密连接、增强肠上皮自身修复能力、形成生物学屏障等途径, MEA可有效增强肠道屏障作用, 从而达到改善IBD患者肠道病变的目的。

3.2.2 免疫调节: Rajput等^[31]在动物实验中, 给予肉鸡益生菌, 后在肉鸡肠黏膜发现明显升高的肠道细胞因子; Dharmani等^[32]在临床实验中发现, VSL#3可以影响胃粘蛋白Muc-5ac的合成, 并调节细胞因子IL-10、环氧酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)及多种生长因子的合成与分泌。在Sokol等^[25]的试验中, 他们发现*Fp*能够在体外刺激单核细胞, 并使其与正常情况下相比分泌较多的IL-10以及更少的IL-12与干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ)。免疫因素的参与已被广泛认为与IBD的发生、发展密不可分, 对促炎因子的抑制、抗炎因子的促进均体现了MEA在IBD患者中的免疫调节作用。

3.2.3 抗肿瘤: Mano Horinaka等^[33]利用细胞培养技术, 发现乳杆菌属可以使肿瘤坏死因子相关凋亡配体(tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL)在人体外周血单核细胞

中产生增加, 并可以使自然杀伤细胞(nature killer cell, NK)活性升高, 从而增强机体抗肿瘤能力; 益生菌在结肠癌的预防中, 涉及多种信号传导通路以及细胞代谢途径的改变, 也被广泛认同^[34-36]。IBD潜在的癌变可能已被证实, 但MEA抗肿瘤作用在IBD治疗过程中的机制及临床效果均缺乏相关研究证据, 有待进一步研究。

3.2.4 营养作用: 肠道菌群能够合成人体多种营养物质, 如B族维生素(维生素B1、B2、B6、B12), 维生素K等, 还可合成非必需氨基酸, 如天冬氨酸、丙氨酸、缬氨酸和苏氨酸等, 并参与糖类和蛋白质的代谢, 同时还能促进铁、镁、锌等矿物元素的吸收。IBD患者常伴不同程度的营养不良, 而运用MEA维系肠道菌群, 将直接关系到上述多方面营养物质的合成或代谢。

4 微生态制剂在IBD治疗中的应用

4.1 微生态制剂治疗UC中的应用

4.1.1 临床试验: 在Tursi等^[37]的研究中, 他们选出总计144例确诊UC患者, 这些患者均为正在接受5-ASA或免疫抑制剂治疗, 在此基础上, 将他们随机分为两组, 治疗组71例, 安慰剂组73例, 其中, 给予治疗组患者益生菌制剂VSL#3(剂量为 3.6×10^{12} 细菌/d)治疗, 给予安慰剂组患者安慰剂, 结果在完成实验的共计131例患者(治疗组65例, 安慰剂组66例)中统计分析, 在服用VSL#3的治疗组中, 溃疡性结肠炎活动指数(ulcerative colitis activity index, UCDAI)的降低较安慰剂组明显(63.1 vs 40.8 ; PP: $P = 0.010$, 95%CI: $0.51-0.74$; ITT: $P = 0.031$, 95%CI: $0.47-0.69$); 治疗组缓解率亦高于安慰剂组(47.7% vs 32.4% ; PP: $P = 0.069$, 95%CI: $0.36-0.60$; ITT: $P = 0.132$, 95%CI: $0.33-0.56$)。在另一项研究中, Miele等^[38]将共计29例平均年龄9.8岁的明确诊断UC的患者随机分为治疗组与对照组, 治疗组给予常规IBD治疗及VSL#3(计量根据体重而定, $0.45 \times 10^{12}-1.8 \times 10^{12}$ 细菌/d), 安慰剂组给予安慰剂及常规IBD治疗, 并于治疗开始后1、2、6 mo及1年时评估患者病情活动情况, 得到结论: 治疗组中13例患者(92.8%)的症状得到缓解, 安慰剂组中4例患者(36.4%)的症状得到缓解($P < 0.001$); 在接下来的1年中, 治疗组中有3例患者(21.4%)复发, 安慰剂组中有11例患者(73.3%)复发($P = 0.014$, RR = 0.32 , 95%CI: $0.025-0.773$, NNT = 2), 其中3例治疗组患者及6例安慰剂组患者在6 mo内复发。在Ishikawa等^[39]的实验中, 将41例临床诊断

■应用要点

本文通过总结国内外对微生态制剂在炎症性肠病中作用机制及临床运用的最新研究报道, 提示了其运用中的机制研究热点及有效的临床运用模式, 为相关实验研究的开展及临床工作提供了参考。

■同行评价

本文综述了微生态制剂与炎症性肠病的研究进展,有一定的临床参考价值。

UC的患者随机分为两组,治疗组给予合生元(益生菌:1 g/次,3次/d,每次剂量 1×10^9 细菌/g;5.5 g半乳糖寡糖)治疗,持续1年,对照组则仅给予基本UC治疗,不给予合生元。在试验开始前后分别使用肠镜指标、MPO定量及粪便细菌计数等方法判断疾病活动情况。结果经过1年合生元治疗,治疗组患者肠镜下改善较对照组明显,且MPO亦有明显下降,在粪便细菌中,治疗组粪便内类杆菌科细菌及粪便PH均较对照组下降。

4.1.2 Meta分析:在Sang等^[40]关于益生菌对UC诱导缓解及维持缓解疗效的系统评价中,他们利用计算机检索Cochrane、MEDLINE、EMBASE等数据库,经Meta分析后得出结论:益生菌联合标准方案对诱导和维持UC缓解的疗效明显优于空白对照治疗方案;在丁娟等^[41]关于益生菌制剂VSL#3对UC诱导缓解作用的系统评价中,他们同样利用计算机检索MEDLINE、EMBASE、Cochrane Library和中国生物医学文献数据、万方数据库,并系统评价了益生菌尤其是VSL#3诱导UC缓解的有效性和安全性,并最终得出结论:VSL#3对UC的诱导缓解作用优于对照组且安全性高。尚有多项^[42,43]关于微生态制剂治疗UC的Meta分析,均提出微生态制剂在UC诱导缓解及维持缓解中的明确作用。

在MEA治疗UC的临床实验以及Meta分析中可以发现,使用MEA联合常规治疗药物的联合用药模式,相对单纯使用常规IBD治疗药物而言,拥有更高的疾病缓解率及更低的复发率,MEA对于UC的治疗作用得到了临床应用的肯定。但国内外相关研究仅提示在常规治疗基础上联合运用益生菌或合生元治疗相比单用常规治疗更加有效,但均未涉及益生菌与合生元治疗效果的比较,即未明确益生元的治疗效果,亦未提出UC患者MEA治疗的剂型、剂量、运用时间等相关问题的用药原则,上述问题均有待进一步研究。

4.2 微生态制剂治疗CD中的应用

4.2.1 临床试验:Steed等^[44]及他的团队对35例临床诊断活动性CD的患者进行了一项随机、双盲以及空白对照的试验,给予治疗组合生元(其中包括双歧杆菌 2×10^{11} 细菌/g,2次/d),并分别于试验开始时、试验3、6 mo进行患者病情评估,包括临床表现、肠道活检、细胞因子等方面,结果提示:在克罗恩病活动指数方面(Crohn's disease activity index, CDAI),治疗组明显得到改善(起始:219±74.6;结束:147±74, $P = 0.020$),

而对照组则无明显改变(起始:249±79.4;结束:233±155, $P = 0.810$);在细胞因子方面,治疗组3 mo时TNF- α 已有明显下降,而对照组无明显改变。Garcia Vilela等^[45]将34例临床诊断CD的患者随机选出,并在基础治疗药物(美沙拉嗪、硫唑嘌呤、强的松等)治疗的情况下,给予啤酒酵母菌治疗,并在试验开始前以及给予布拉氏酵母菌(saccharomyces boulardii)治疗后第一个月及第3个月先后三次检测患者肠道通透性,同时选取15例健康志愿者作为空白对照。结果提示:试验开始前,健康志愿者肠道果糖/甘露醇为 0.005 ± 0.0037 ,CD患者为 0.021 ± 0.01 ,治疗3 mo后,CD患者该比值降低为 0.008 ± 0.006 ,提示肠道通透性得到改善,从而改善了肠道屏障功能。Fujimori等^[46]及团队随即选择10例未经手术治疗,且经过初期对氨基水杨酸及激素治疗未达缓解的CD患者,给予合生元(益生菌:双歧杆菌及乳酸杆菌 7.5×10^{10} CFU/d;益生元:欧车前9.9 g/d),整个实验过程中,药物的计量与用药持续时间均由患者自行调整,平均治疗时间为 $13.0 \text{ mo} \pm 4.5 \text{ mo}$,治疗结束后,CDAI及IOIBD两项评分均较治疗前明显下降(CDAI:治疗前255 vs 治疗后136, $P = 0.009$; IOIBD:治疗前3.5 vs 治疗后2.1, $P = 0.03$)。结果提示高剂量的益生菌与益生元合用可以有效而安全的治疗活动性CD。

4.2.2 Meta分析:Doherty等^[47]对术后CD复发与益生菌的使用进行了Meta分析,但结果提示在CD复发的危险性方面,益生菌的使用与安慰剂的使用结果没有明显差异,但仍值得进一步研究。同Doherty等相类似,Rahimi等^[48]与他的团队查询了PUMBED与Cochrane中心,对益生菌与防治CD维持缓解的关系进行了Meta分析,但结果类似,仍没有证明益生菌在CD维持缓解、预防复发方面的有效性,但建议使用含有乳酸菌与大肠杆菌或酵母的混合物。

在CD的治疗方面,MEA同样得到临床研究的认可,在临床实验中,通过MEA在增强肠黏膜屏障、调节免疫、改善肠道菌群等方面的作用,与治疗UC患者相比,CD患者同样在缓解率及复发率等方面取得了与常规治疗相比更好的水平,并且论证了MEA在治疗过程中的安全性,但Meta分析的结论无论在MEA治疗CD的有效性亦或是安全性方面,均没有支持上述临床研究结论,故MEA在CD治疗中的相关问题尚需进一步研究。同时,与MEA治疗UC存在的问题一致,MEA在CD中的运用同样缺乏MEA剂量、剂

型、用药时间等问题的用药原则总结, 益生元的使用与否亦未得到论证。

5 微生态制剂治疗IBD作用机制

通过上文可以明确MEA在IBD治疗中的作用, 但其作用机制尚不清, 目前国内外关于MEA在IBD治疗中的机制研究包括动物实验与临床研究, 主要以细胞因子、机体活性物质的调节为主要研究对象。

5.1 动物实验 国内曹艳菊^[49]将10-12周龄♂SD大鼠30只随机分为正常对照组、模型组及实验组, 每组10只, 利用葡聚糖硫酸钠(dextran sulfate sodium, DSS)针对模型组及实验组建立实验性结肠炎大鼠模型, 建立后给予实验组大鼠双歧三联活菌500 mg/(kg·d)灌胃, 1次/d, 共计2 wk, 期间对照组及模型组同期使用生理盐水灌胃, 2 wk后处死大鼠取材, 并利用RT-PCR及免疫组织化学分别检测大鼠肠上皮细胞内Toll样受体2及受体4(Toll-like receptors 2、4, TLR2、TLR4)表达及NF-κB p65活化情况, 结果提示实验组中TLR2表达上调, TLR4的表达及NF-κB p65活化受到抑制, 推测益生菌对于UC的治疗作用可能与上调TLR2表达、抑制TLR4-NF-κB信号通路相关。

Hudcovic等^[50]将免疫缺陷SCID小鼠及免疫正常Balb/c小鼠共分为6组, SCID小鼠及Balb/c小鼠各3组, 以SCID小鼠为例, SCID1组给予DSS诱导建立结肠炎模型, 并给予梭状芽胞杆菌灌肠治疗, SCID2组仅给予DSS诱导建立结肠炎模型, SCID3组为空白对照, Balb/c小鼠分组同SCID小鼠, 结果提示, 经梭状芽胞杆菌治疗的小鼠, 其肠黏膜上皮内TNF-α、IL-18均较未经治疗的小鼠降低, 而紧密连接蛋白ZO-1也在治疗组中得到保护。

Zhao等^[51]将40只C57/BL小鼠随机分为4组, 即空白对照组、模型组(由TNBS建模, 不给予治疗)、培菲康组(由TNBS建模, 每日给予双歧杆菌、乳杆菌、肠球菌三联胶囊345 mg/kg)及美沙拉嗪组(由TNBS建模, 每日给予美沙拉嗪300 mg/kg), 建模24 h后, 培菲康组及美沙拉嗪组开始给药, 持续治疗10 d, 同期, 空白对照组及模型组灌胃生理盐水。第11天处死小鼠, 利用流式细胞术、RT-PCR、ELISA等相关技术, 检测各组小鼠肠黏膜CD4(+), CD25(+), Fox3(+)及IL-2、IL-4、IL-10、TNF-α及IFN-γ等指标, 结果提示, 在培菲康组及美沙拉嗪组中, CD4(+), CD25(+), Fox3(+)及IL-2、IL-4、IL-10表达上

调, TNF-α及IFN-γ表达下调, 考虑益生菌对于Th1与Th2细胞因子间的平衡存在调控作用。

在另外一组实验中^[52], 实验人员利用DSS诱导建立结肠炎大鼠模型, 后随机分组, 治疗组给予合生元(益生菌: Ultrabiotique; 益生元: 菊粉)治疗, 对照组仅给予生理盐水灌胃, 后对大鼠腹腔巨噬细胞培养并于上清液中发现一氧化氮(NO)的量增高, 在治疗组的大鼠中, NO量明显低于对照组, 且治疗组大鼠的肠道恢复情况明显好于对照组, 考虑NO在UC的发病过程中可能扮演重要角色, 且再次说明了微生态制剂对于UC的治疗作用。

5.2 临床试验 Dotan等^[53]对益生菌在UC治疗中机制的回顾中提到, 使用益生菌治疗UC后, 患者体内促炎性细胞因子、干扰素-γ、TNF-α以及IL-12均会下降, 且益生菌可影响致病菌对于肠黏膜的黏附, 而在分子机制层面, 益生菌对于NF-κB与热休克蛋白(heat-shock protein, HSP)的抑制带来的抗炎作用也被提及。

Soo等^[54]针对UC患者肠黏膜上碱性鞘磷脂酶活性与益生菌相关性展开研究, 他们选取15例确诊溃疡性结肠炎患者, 在给予治疗前行肠镜并给予肠黏膜活检, 检测肠黏膜碱性鞘磷脂酶活性, 并评价患者UCDAI, 之后每日给予VSL#3 2次(9×10^{11} 个细菌/次), 持续5 wk, 治疗后再次于肠镜下取材活检, 检测黏膜碱性鞘磷脂酶活性, 并再次评价患者UCDAI, 结果发现接受治疗后, 患者UCDAI由 5.3 ± 1.8946 下降至 0.70 ± 0.34 ($P = 0.02$), 且黏膜碱性鞘磷脂酶活性较治疗前升高。

Bai等^[55]随机选择临床诊断UC的患者, 并行肠镜活检取材病变黏膜, 后将病变黏膜随机分为共培养组与对照组, 在共培养组中, 将病变黏膜与双歧杆菌共培养, 并利用酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)检测共培养后病变黏膜内TNF-α及IL-8的表达量, 利用免疫组织化学方法检测共培养病变黏膜内NF-κB P65阳性的固有层单核细胞(lamina propria mononuclear cells)数量, 结果提示共培养组TNF-α、IL-8及NF-κB P65阳性的固有层单核细胞数量均较空白对照组明显下降。

Lammers等^[56]在针对益生菌对于UC治疗机制的回顾性研究中发现, 经过益生菌治疗后的患者, 病变部位黏膜上的IL-1β、IL-8以及IFN-γ的mRNA均较空白对照组明显下降, 从而提示益生菌对于病变黏膜免疫反应存在调节作用, 降

低了促炎性细胞因子的合成与释放。

Hegazy等^[57]将明确诊断UC的30例患者随机分为两组,实验组给予柳氮磺胺吡啶(SASP)(2400 mg/d)+益生菌,对照组仅给予柳氮磺胺吡啶(2400 mg/d),在给药前及治疗后8 wk,分别利用紫外分光光度法检测病变部位结肠髓过氧化物酶活性;利用ELISA检测病变部位肠黏膜IL-6及粪便钙卫蛋白的含量表达;利用免疫组织化学及RT-PCR检测NF- κ B P65及TNF- α 在病变黏膜组织中的表达。结果发现上述指标均较对照组明显下降。

Cui等^[58]筛选出30例明确针对UC炎的患者,并给予SASP及糖皮质激素治疗,后将30例患者随机分为治疗组及对照组,治疗组加用双歧三联活菌胶囊(BIFICO 1.26 g/d),继续治疗8 wk,后利用Western blot、RT-PCR、电泳迁移率变动分析(electrophoretic mobility shift assay, EMSA)等技术,检测两组患者治疗后病变黏膜处NF- κ B p65、NF- κ B DNA表达、抗炎及促炎细胞因子表达等多项指标,结果提示:治疗组与对照组比较,治疗组内NF- κ B p65、NF- κ B DNA表达、促炎细胞因子(TNF- α 、IL-1 β)均较对照组下降,而抗炎细胞因子(IL-10)则较对照组上升。

Lin等^[59]利用乳酸杆菌所产生的分泌因子影响明确临床诊断CD患者体内单核细胞及巨噬细胞,并使用定量免疫测定、RT-PCR、ELISA等相关技术,检测受影响后细胞因子分泌的变化,并寻找受影响的特殊转录因子,结果发现,乳酸杆菌通过由脂多糖激活的单核细胞以及单核细胞源性巨噬细胞,能够明显强烈抑制人体TNF的分泌与合成,细胞因子MCP-1/CCL2也受影响而数量减少,并提示人体TNF转录的调节可能是益生菌相关的免疫调节机制的起始,乳酸杆菌通过抑制MAP的活化、蛋白激酶调节的c-Jun以及转录因子AP-1来达到免疫调节作用。

Llopis等^[60]通过手术收集CD患者肠黏膜标本,并在体外让病变黏膜分别与大肠埃希菌(*Escherichia coli*, *E. coli* ATCC 35345及干酪乳杆菌DN-114001或其DNA基因组共培养,之后分别测定组织释放的关键促炎因子(如IL-6、TGF- β 、IL-23p19、IL-12p35、IL-17F)以及趋化因子(IL-8、CXCL1、CXCL2),结果提示,干酪乳杆菌DN-114001明显降低了TNF- α 、IFN- γ 、IL-2、IL-6、IL-8以及CXCL1的释放,并下调了IL-8、IL-6以及CXCL1的表达,但对IL-23 p19、IL-12 p35以及IL-17F的表达无调控作用,*E. coli*则明显

上调了上述所有细胞因子的表达,而干酪乳杆菌DN-114001基因组DNA则对上述细胞因子没有调控作用,他们还发现一个有趣的现象,即干酪乳杆菌DN-114001可以抵消*E. coli* ATCC 35345在CD中的致炎作用。

此外,益生菌在IBD治疗中的机制还涉及与病原菌竞争性黏附于肠上皮细胞、促进上皮细胞分泌黏液、防止细菌易位;增强巨噬细胞吞噬能力及IgA的分泌^[61,62]。

上述大量动物及临床研究,集中体现了MEA对IBD患者体内促炎细胞因子的抑制、抗炎细胞因子的促进,其中广泛涉及IL、IFN、TNF、NF- κ B及HSP等。但不同种类的MEA对上述细胞因子的调节作用不同,故因UC与CD在发病过程中细胞因子参与的不尽相同,MEA治疗UC与CD亦应有所区别,但未见相关报道同种类MEA治疗UC与CD的对比,亦未见不同种类MEA治疗UC或CD的疗效评价,故针对不同IBD(UC或CD)患者,MEA治疗的个体化应当受到重视。

6 结论

MEA已经逐渐成为了IBD治疗中研究热点,其针对IBD的诱导缓解及维持缓解作用已经逐渐得到的公认,但在临床应用中,仍然存在不少问题。

首先,虽有越来越多的相关研究与试验^[63,64]证明了微生态制剂在一定剂量范围内的耐受性与安全性,但仍有少量报道^[37]提出了微生态制剂的不良反应,如流感样症状、腹胀等轻微反应,也曾有心内膜炎、肝脓肿、脑膜炎等严重不良反应的报道^[65]。如今尚缺乏关于MEA治疗IBD不良反应的大样本、随机、双盲研究,用药安全值得关注。

其次,微生态制剂品种繁多,不同菌株、剂量及疗程的选择对于疾病的治疗至关重要,但由于微生态制剂药理作用及各种菌株作用机制研究的欠缺,无法为临床提供指导,从而造成了菌株、剂量及疗程的选择缺乏针对性,往往无法做到“择优而用”。如上文所述,MEA治疗IBD机制尚未阐明,但发现不同种类MEA对不同细胞因子的调节作用不同,故MEA的个体化治疗当受到重视,通过相关研究寻找UC或CD最佳的MEA治疗方案是将来研究的重点。

再次,在IBD的治疗中,特别是重症患者,抗生素的运用较为普遍,而MEA与抗生素同时使用的方式缺乏指导,容易造成MEA,特别是益生菌的补充成为“徒劳”,造成实际益生菌用量

的不足, 导致治疗效果的下降. 故MEA与抗生素同时运用时的用药方法、时间、剂量等相关问题有待进一步研究阐述.

总之, MEA在IBD治疗中的研究与发展有目共睹, 虽目前尚存在一些问题, 但相信随着分子生物学和细胞生物学等基础学科的不断发展, 未来定能将各种MEA的作用机制明确区分, 也逐渐揭示出不同MEA间的内在联系, 从而让MEA的作用机制进一步得以揭示, 增强临床用药针对性, 进一步发挥MEA在IBD治疗中作用.

7 参考文献

- Lozupone CA, Stombaugh JL, Gordon JL, Jansson JK, Knight R. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature* 2012; 489: 220-230 [PMID: 22972295 DOI: 10.1038/nature11550]
- Yukawa T, Ohkusa T, Shibuya T, Tsukinaga S, Mitobe J, Takakura K, Takahara A, Odahara S, Matsudaira H, Nagatsuma K, Kitahara T, Kajihara M, Uchiyama K, Arakawa H, Koido S, Tajiri H. Nested culture method improves detection of *Fusobacterium* from stool in patients with ulcerative colitis. *Jpn J Infect Dis* 2013; 66: 109-114 [PMID: 23514906 DOI: 10.7883/yoken.66.109]
- Nemoto H, Kataoka K, Ishikawa H, Ikata K, Arimochi H, Iwasaki T, Ohnishi Y, Kuwahara T, Yasutomo K. Reduced diversity and imbalance of fecal microbiota in patients with ulcerative colitis. *Dig Dis Sci* 2012; 57: 2955-2964 [PMID: 22623042 DOI: 10.1007/s10620-012-2236-y]
- Linskens RK, Huijsdens XW, Savelkoul PH, Vandenbroucke-Grauls CM, Meuwissen SG. The bacterial flora in inflammatory bowel disease: current insights in pathogenesis and the influence of antibiotics and probiotics. *Scand J Gastroenterol Suppl* 2001; (234): 29-40 [PMID: 11768558]
- 崔海宏, 陈村龙, 孙勇, 王亚东, 张耀东, 杨玉捷, 王群英, 潘令嘉. 炎症性肠病患者肠黏膜菌群改变及抗体反应. *胃肠病学和肝病学杂志* 2003; 12: 276-278
- Kleessen B, Kroesen AJ, Buhr HJ, Blaut M. Mucosal and invading bacteria in patients with inflammatory bowel disease compared with controls. *Scand J Gastroenterol* 2002; 37: 1034-1041 [PMID: 12374228]
- Aomatsu T, Imaeda H, Fujimoto T, Takahashi K, Yoden A, Tamai H, Fujiyama Y, Andoh A. Terminal restriction fragment length polymorphism analysis of the gut microbiota profiles of pediatric patients with inflammatory bowel disease. *Digestion* 2012; 86: 129-135 [PMID: 22846404 DOI: 10.1159/000339777]
- Ricanek P, Lothe SM, Frye SA, Rydning A, Vatn MH, Tønnum T. Gut bacterial profile in patients newly diagnosed with treatment-naïve Crohn's disease. *Clin Exp Gastroenterol* 2012; 5: 173-186 [PMID: 23049264 DOI: 10.2147/CEG.S33858]
- Liu X, Cui Y, Ouyang C, Li X, Lu F, Wu X. [Characteristics and differential diagnosis of intestinal flora in Crohn's disease and intestinal tuberculosis]. *Zhongnan Daxue Xuebao Yixueban* 2010; 35: 1196-1200 [PMID: 21131744 DOI: 10.3969/j.issn.1672-7347]
- Verma R, Verma AK, Ahuja V, Paul J. Real-time analysis of mucosal flora in patients with inflammatory bowel disease in India. *J Clin Microbiol* 2010; 48: 4279-4282 [PMID: 20861337 DOI: 10.1128/JCM.01360-10]
- Reddy SS, Brandt LJ. Clostridium difficile Infection and Inflammatory Bowel Disease. *J Clin Gastroenterol* 2013; 47: 666-671 [PMID: 23507767 DOI: 10.1097/MCG.0b013e31828b288a]
- Freeman HJ. Recent developments on the role of Clostridium difficile in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 2794-2796 [PMID: 18473400 DOI: 10.3748/wjg.14.2794]
- Bien J, Palagani V, Bozko P. The intestinal microbiota dysbiosis and Clostridium difficile infection: is there a relationship with inflammatory bowel disease? *Therap Adv Gastroenterol* 2013; 6: 53-68 [PMID: 23320050 DOI: 10.1177/1756283X12454590]
- Musa S, Thomson S, Cowan M, Rahman T. Clostridium difficile infection and inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 2010; 45: 261-272 [PMID: 20025557 DOI: 10.3109/00365520903497098]
- Wułańska D, Banaszkiewicz A, Radzikowski A, Obuch-Woszczatyński P, Młynarczyk G, Brazier JS, Pituch H, van Belkum A. Clostridium difficile infection in Polish pediatric outpatients with inflammatory bowel disease. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2010; 29: 1265-1270 [PMID: 20577773 DOI: 10.1007/s10096-010-0997-9]
- Bossuyt P, Verhaegen J, Van Assche G, Rutgeerts P, Vermeire S. Increasing incidence of Clostridium difficile-associated diarrhea in inflammatory bowel disease. *J Crohns Colitis* 2009; 3: 4-7 [PMID: 21172241 DOI: 10.1016/j.crohns.2008.09.003]
- Murthy SK, Steinhart AH, Tinmouth J, Austin PC, Daneman N, Nguyen GC. Impact of Clostridium difficile colitis on 5-year health outcomes in patients with ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2012; 36: 1032-1039 [PMID: 23061526 DOI: 10.1111/apt.12073]
- Kim JM, Lee JY, Yoon YM, Oh YK, Youn J, Kim YJ. NF-kappa B activation pathway is essential for the chemokine expression in intestinal epithelial cells stimulated with Clostridium difficile toxin A. *Scand J Immunol* 2006; 63: 453-460 [PMID: 16764699 DOI: 10.1111/j.1365-3083.2006.001756.x]
- Lyras D, O'Connor JR, Howarth PM, Sambol SP, Carter GP, Phumoonna T, Poon R, Adams V, Vedantam G, Johnson S, Gerding DN, Rood JI. Toxin B is essential for virulence of Clostridium difficile. *Nature* 2009; 458: 1176-1179 [PMID: 19252482 DOI: 10.1038/nature07822]
- Navaneethan U, Mukewar S, Venkatesh PG, Lopez R, Shen B. Clostridium difficile infection is associated with worse long term outcome in patients with ulcerative colitis. *J Crohns Colitis* 2012; 6: 330-336 [PMID: 22405170 DOI: 10.1016/j.crohns.2011.09.005]
- 刘晶晶, 袁耀宗. 难辨梭状芽孢杆菌与炎症性肠病关系的初步研究. *中华消化杂志* 2012; 32: 245-248
- Sherman PM, Ossa JC, Johnson-Henry K. Unraveling mechanisms of action of probiotics. *Nutr Clin Pract* 2009; 24: 10-14 [PMID: 19244144 DOI: 10.1177/0884533608329231]
- Fujimoto T, Imaeda H, Takahashi K, Kasumi E, Bamba S, Fujiyama Y, Andoh A. Decreased abundance of *Faecalibacterium prausnitzii* in the gut microbiota of Crohn's disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2013; 28: 613-619 [PMID: 23216550 DOI: 10.1111/jgh.12073]

- 24 Sokol H, Seksik P, Furet JP, Firmesse O, Nion-Larmurier I, Beaugerie L, Cosnes J, Corthier G, Marteau P, Doré J. Low counts of *Faecalibacterium prausnitzii* in colitis microbiota. *Inflamm Bowel Dis* 2009; 15: 1183-1189 [PMID: 19235886 DOI: 10.1002/ibd.20903]
- 25 Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, Lakhdari O, Bermúdez-Humarán LG, Gratadoux JJ, Blugeon S, Bridonneau C, Furet JP, Corthier G, Grangette C, Vasquez N, Pochart P, Trugnan G, Thomas G, Blottière HM, Doré J, Marteau P, Seksik P, Langella P. *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 16731-16736 [PMID: 18936492 DOI: 10.1073/pnas.0804812105]
- 26 洪娜, 邱新运, 张明明, 杨晓彤, 于成功. 普拉梭菌对实验性大鼠结肠炎防治的初步研究. *中华消化杂志* 2012; 32: 459-465
- 27 Thompson-Chagoyán OC, Maldonado J, Gil A. Aetiology of inflammatory bowel disease (IBD): role of intestinal microbiota and gut-associated lymphoid tissue immune response. *Clin Nutr* 2005; 24: 339-352 [PMID: 15896420 DOI: 10.1016/j.clnu.2005.02.009]
- 28 Anderson RC, Cookson AL, McNabb WC, Kelly WJ, Roy NC. *Lactobacillus plantarum* DSM 2648 is a potential probiotic that enhances intestinal barrier function. *FEMS Microbiol Lett* 2010; 309: 184-192 [PMID: 20618863 DOI: 10.1111/j.1574-6968.2010.02038.x]
- 29 Ewaschuk JB, Diaz H, Meddings L, Diederichs B, Dmytrash A, Backer J, Looijer-van Langen M, Madsen KL. Secreted bioactive factors from *Bifidobacterium infantis* enhance epithelial cell barrier function. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008; 295: G1025-G1034 [PMID: 18787064 DOI: 10.1152/ajpgi.90227.2008]
- 30 Canonici A, Pellegrino E, Siret C, Terciolo C, Czerucka D, Bastonero S, Marvaldi J, Lombardo D, Rigot V, André F. *Saccharomyces boulardii* improves intestinal epithelial cell restitution by inhibiting $\alpha\beta 5$ integrin activation state. *PLoS One* 2012; 7: e45047 [PMID: 23028753 DOI: 10.1371/journal.pone.0045047]
- 31 Rajput IR, Li LY, Xin X, Wu BB, Juan ZL, Cui ZW, Yu DY, Li WF. Effect of *Saccharomyces boulardii* and *Bacillus subtilis* B10 on intestinal ultrastructure modulation and mucosal immunity development mechanism in broiler chickens. *Poult Sci* 2013; 92: 956-965 [PMID: 23472019 DOI: 10.3382/ps.2012-02845]
- 32 Dharmani P, De Simone C, Chadee K. The probiotic mixture VSL#3 accelerates gastric ulcer healing by stimulating vascular endothelial growth factor. *PLoS One* 2013; 8: e58671 [PMID: 23484048 DOI: 10.1371/journal.pone.0058671]
- 33 Horinaka M, Yoshida T, Kishi A, Akatani K, Yasuda T, Kouhara J, Wakada M, Sakai T. *Lactobacillus* strains induce TRAIL production and facilitate natural killer activity against cancer cells. *FEBS Lett* 2010; 584: 577-582 [PMID: 19995562 DOI: 10.1016/j.febslet.2009.12.004]
- 34 Kumar M, Nagpal R, Verma V, Kumar A, Kaur N, Hemalatha R, Gautam SK, Singh B. Probiotic metabolites as epigenetic targets in the prevention of colon cancer. *Nutr Rev* 2013; 71: 23-34 [PMID: 23282249 DOI: 10.1111/j.1753-4887.2012.00542.x]
- 35 Verma A, Shukla G. Probiotics *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus acidophilus* suppresses DMH-induced procarcinogenic fecal enzymes and preneoplastic aberrant crypt foci in early colon carcinogenesis in Sprague Dawley rats. *Nutr Cancer* 2013; 65: 84-91 [PMID: 23368917 DOI: 10.1080/01635581.2013.741746]
- 36 Bassaganya-Riera J, Viladomiu M, Pedragosa M, De Simone C, Hontecillas R. Immunoregulatory mechanisms underlying prevention of colitis-associated colorectal cancer by probiotic bacteria. *PLoS One* 2012; 7: e34676 [PMID: 22511958 DOI: 10.1371/journal.pone.0034676]
- 37 Tursi A, Brandimarte G, Papa A, Giglio A, Elisei W, Giorgetti GM, Forti G, Morini S, Hassan C, Pistoia MA, Modeo ME, Rodino S, D'Amico T, Sebkova L, Sacca' N, Di Giulio E, Luzzza F, Imeneo M, Larussa T, Di Rosa S, Annese V, Danese S, Gasbarrini A. Treatment of relapsing mild-to-moderate ulcerative colitis with the probiotic VSL#3 as adjunctive to a standard pharmaceutical treatment: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Am J Gastroenterol* 2010; 105: 2218-2227 [PMID: 20517305 DOI: 10.1038/ajg.2010.218]
- 38 Miele E, Pascarella F, Giannetti E, Quaglietta L, Baldassano RN, Staiano A. Effect of a probiotic preparation (VSL#3) on induction and maintenance of remission in children with ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 2009; 104: 437-443 [PMID: 19174792 DOI: 10.1038/ajg.2008.118]
- 39 Ishikawa H, Matsumoto S, Ohashi Y, Imaoka A, Setoyama H, Umesaki Y, Tanaka R, Otani T. Beneficial effects of probiotic *bifidobacterium* and galactooligosaccharide in patients with ulcerative colitis: a randomized controlled study. *Digestion* 2011; 84: 128-133 [PMID: 21525768 DOI: 10.1159/000322977]
- 40 Sang LX, Chang B, Zhang WL, Wu XM, Li XH, Jiang M. Remission induction and maintenance effect of probiotics on ulcerative colitis: a meta-analysis. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 1908-1915 [PMID: 20397271 DOI: 10.3748/wjg.v16.i15.1908]
- 41 丁娟, 熊光苏, 杨川华, 吴江红. 益生菌制剂VSL#3对溃疡性结肠炎诱导缓解作用的系统评价. *胃肠病学* 2012; 17: 521-526
- 42 Holubar SD, Cima RR, Sandborn WJ, Pardi DS. Treatment and prevention of pouchitis after ileal pouch-anal anastomosis for chronic ulcerative colitis. *Cochrane Database Syst Rev* 2010; (6): CD001176 [PMID: 20556748 DOI: 10.1002/14651858]
- 43 Vegter S, Tolley K, Wilson Waterworth T, Jones H, Jones S, Jewell D. Meta-analysis using individual patient data: efficacy and durability of topical alicoforsen for the treatment of active ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2013; 38: 284-293 [PMID: 23750909 DOI: 10.1111/apt.12369]
- 44 Steed H, Macfarlane GT, Blackett KL, Bahrami B, Reynolds N, Walsh SV, Cummings JH, Macfarlane S. Clinical trial: the microbiological and immunological effects of synbiotic consumption - a randomized double-blind placebo-controlled study in active Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2010; 32: 872-883 [PMID: 20735782 DOI: 10.1111/j.1365-2036.2010.04417.x]
- 45 Garcia Vilela E, De Lourdes De Abreu Ferrari M, Oswaldo Da Gama Torres H, Guerra Pinto A, Carolina Carneiro Aguirre A, Paiva Martins F, Marcos Andrade Goulart E, Sales Da Cunha A. Influence of

- Saccharomyces boulardii on the intestinal permeability of patients with Crohn's disease in remission. *Scand J Gastroenterol* 2008; 43: 842-848 [PMID: 18584523 DOI: 10.1080/00365520801943354]
- 46 Fujimori S, Tatsuguchi A, Gudis K, Kishida T, Mitsui K, Ehara A, Kobayashi T, Sekita Y, Seo T, Sakamoto C. High dose probiotic and prebiotic cotherapy for remission induction of active Crohn's disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22: 1199-1204 [PMID: 17688660 DOI: 10.1111/j.1440-1746.2006.04535.x]
- 47 Doherty GA, Bennett GC, Cheifetz AS, Moss AC. Meta-analysis: targeting the intestinal microbiota in prophylaxis for post-operative Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2010; 31: 802-809 [PMID: 20055785 DOI: 10.1111/j.1365-2036.2010.04231.x]
- 48 Rahimi R, Nikfar S, Rahimi F, Elahi B, Derakhshani S, Vafaie M, Abdollahi M. A meta-analysis on the efficacy of probiotics for maintenance of remission and prevention of clinical and endoscopic relapse in Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 2008; 53: 2524-2531 [PMID: 18270836 DOI: 10.1007/s10620-007-0171-0]
- 49 曹艳菊. 益生菌对实验性结肠炎大鼠肠黏膜TLR2、TLR4表达及NF- κ B活性的影响. *胃肠病学和肝病学杂志* 2012; 21: 760-763
- 50 Hudcovic T, Kolinska J, Klepetar J, Stepankova R, Rezanka T, Srutkova D, Schwarzer M, Erban V, Du Z, Wells JM, Hrnecir T, Tlaskalova-Hogenova H, Kozakova H. Protective effect of Clostridium tyrobutyricum in acute dextran sodium sulphate-induced colitis: differential regulation of tumour necrosis factor- α and interleukin-18 in BALB/c and severe combined immunodeficiency mice. *Clin Exp Immunol* 2012; 167: 356-365 [PMID: 22236013 DOI: 10.1111/j.1365-2249.2011.04498.x]
- 51 Zhao HM, Huang XY, Zuo ZQ, Pan QH, Ao MY, Zhou F, Liu HN, Liu ZY, Liu DY. Probiotics increase T regulatory cells and reduce severity of experimental colitis in mice. *World J Gastroenterol* 2013; 19: 742-749 [PMID: 23430765 DOI: 10.3748/wjg.v19.i5.742]
- 52 Abdelouhab K, Rafa H, Toumi R, Bouaziz S, Medjber O, Touil-Boukoffa C. Mucosal intestinal alteration in experimental colitis correlates with nitric oxide production by peritoneal macrophages: effect of probiotics and prebiotics. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2012; 34: 590-597 [PMID: 22211319 DOI: 10.3109/08923973.2011.641971]
- 53 Dotan I, Rachmilewitz D. Probiotics in inflammatory bowel disease: possible mechanisms of action. *Curr Opin Gastroenterol* 2005; 21: 426-430 [PMID: 15930982]
- 54 Soo I, Madsen KL, Tejpar Q, Sydora BC, Sherbaniuk R, Cinque B, Di Marzio L, Cifone MG, Desimone C, Fedorak RN. VSL#3 probiotic upregulates intestinal mucosal alkaline sphingomyelinase and reduces inflammation. *Can J Gastroenterol* 2008; 22: 237-242 [PMID: 18354751]
- 55 Bai AP, Ouyang Q, Xiao XR, Li SF. Probiotics modulate inflammatory cytokine secretion from inflamed mucosa in active ulcerative colitis. *Int J Clin Pract* 2006; 60: 284-288 [PMID: 16494642 DOI: 10.1111/j.1368-5031.2006.00833.x]
- 56 Lammers KM, Vergopoulos A, Babel N, Gionchetti P, Rizzello F, Morselli C, Caramelli E, Fiorentino M, d'Errico A, Volk HD, Campieri M. Probiotic therapy in the prevention of pouchitis onset: decreased interleukin-1 β , interleukin-8, and interferon- γ gene expression. *Inflamm Bowel Dis* 2005; 11: 447-454 [PMID: 15867584 DOI: 10.1097/01.mpa.0000160302.40931.7b]
- 57 Hegazy SK, El-Bedewy MM. Effect of probiotics on pro-inflammatory cytokines and NF- κ B activation in ulcerative colitis. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 4145-4151 [PMID: 20806430 DOI: 10.3748/wjg.v16.i33.4145]
- 58 Cui HH, Chen CL, Wang JD, Yang YJ, Cun Y, Wu JB, Liu YH, Dan HL, Jian YT, Chen XQ. Effects of probiotic on intestinal mucosa of patients with ulcerative colitis. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1521-1525 [PMID: 15133865]
- 59 Lin YP, Thibodeaux CH, Peña JA, Ferry GD, Versalovic J. Probiotic Lactobacillus reuteri suppress pro-inflammatory cytokines via c-Jun. *Inflamm Bowel Dis* 2008; 14: 1068-1083 [PMID: 18425802 DOI: 10.1002/ibd.20448]
- 60 Llopis M, Antolin M, Carol M, Borruel N, Casellas F, Martinez C, Espin-Basany E, Guarner F, Malagelada JR. Lactobacillus casei downregulates commensals' inflammatory signals in Crohn's disease mucosa. *Inflamm Bowel Dis* 2009; 15: 275-283 [PMID: 18839424 DOI: 10.1002/ibd.20736]
- 61 Sartor RB. Therapeutic manipulation of the enteric microflora in inflammatory bowel diseases: antibiotics, probiotics, and prebiotics. *Gastroenterology* 2004; 126: 1620-1633 [PMID: 15168372 DOI: 10.1053/j.gastro.2004.03.024]
- 62 Candela M, Perna F, Carnevali P, Vitali B, Ciati R, Gionchetti P, Rizzello F, Campieri M, Brigidi P. Interaction of probiotic Lactobacillus and Bifidobacterium strains with human intestinal epithelial cells: adhesion properties, competition against enteropathogens and modulation of IL-8 production. *Int J Food Microbiol* 2008; 125: 286-292 [PMID: 18524406 DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.04.012]
- 63 Jones ML, Martoni CJ, Di Pietro E, Simon RR, Prakash S. Evaluation of clinical safety and tolerance of a Lactobacillus reuteri NCIMB 30242 supplement capsule: a randomized control trial. *Regul Toxicol Pharmacol* 2012; 63: 313-320 [PMID: 22561556 DOI: 10.1016/j.yrtph.2012.04.003]
- 64 Ulsemer P, Toutounian K, Kressel G, Schmidt J, Karsten U, Hahn A, Goletz S. Safety and tolerance of Bacteroides xylanisolvens DSM 23964 in healthy adults. *Benef Microbes* 2012; 3: 99-111 [PMID: 22417778 DOI: 10.3920/BM2011.0051]
- 65 Donohue DC. Safety of probiotics. *Asia Pac J Clin Nutr* 2006; 15: 563-569 [PMID: 17077077]

编辑 田滢 电编 鲁亚静

