

doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2016.02.004

论著 · 临床研究

反复肺炎患儿的肠道菌群与血清 D-乳酸变化及相关性研究

彭韶 杜天华 张曼

(郑州大学第一附属医院儿科, 河南 郑州 450000)

[摘要] **目的** 研究反复肺炎患儿的肠道菌群变化和 D-乳酸变化及意义。**方法** 收集 30 例反复肺炎(反复组)患儿、30 例急性肺炎(急性组)患儿及 15 例外科手术儿童(外科组)的粪便标本和血标本,采用 16S rRNA 荧光定量 PCR 技术定量检测各组粪便标本的双歧杆菌和大肠杆菌的数量,并计算双歧杆菌和大肠杆菌数量对数值的比值(B/E 值),同时测定血清 D-乳酸含量,并进行肠道菌群与 D-乳酸的相关性分析。**结果** 反复组患儿的双歧杆菌数量以及 B/E 值均低于急性组及外科组($P<0.05$),而大肠杆菌数量高于外科组($P<0.05$),反复组患儿的大肠杆菌数量与急性组差异无统计学意义($P>0.05$);反复组患儿 D-乳酸较急性组及外科组均增高($P<0.05$);反复组患儿的 B/E 值与血清 D-乳酸呈直线负相关($r=-0.539, P<0.05$)。**结论** 反复肺炎患儿存在肠黏膜生物屏障及肠黏膜机械屏障受损。 [中国当代儿科杂志, 2016, 18(2): 113-116]

[关键词] 反复肺炎; 肠道菌群; D-乳酸; 儿童

Changes in gut microbiota and serum D-lactate level and correlation analysis in children with recurrent pneumonia

PENG Shao, DU Tian-Hua, ZHANG Man. Department of Pediatrics, First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450000, China (Email: pengshaodh630@126.com)

Abstract: Objective To study the changes in gut microbiota and serum D-lactate level and their significance in children with recurrent pneumonia. **Methods** The stool and blood samples were collected from 30 children with recurrent pneumonia (recurrent group), 30 children with acute pneumonia (acute group), and 15 children receiving surgical operation (surgery group). The 16S rRNA fluorescent quantitative polymerase chain reaction (FQ-PCR) was applied to determine the numbers of *Bifidobacterium* and *Escherichia coli* in stool samples, and the ratio between the logarithmic values of the numbers of *Bifidobacterium* and *Escherichia coli* (B/E value) was calculated. The serum D-lactate level was measured, and correlation analysis was performed. **Results** The recurrent group had a significantly lower number of *Bifidobacterium* and a significantly lower B/E value than the acute group and the surgery group ($P<0.05$), as well as a significantly higher number of *Escherichia coli* than the surgery group ($P<0.05$). There was no significant difference in the number of *Escherichia coli* between the recurrent group and the acute group. The recurrent group had a significantly higher serum D-lactate level than the acute group and the surgery group ($P<0.05$). In the recurrent group, B/E value was negatively correlated with serum D-lactate level ($r=-0.539, P<0.05$). **Conclusions** Children with recurrent pneumonia may have biological and mechanical barrier damage in the intestinal mucosa.

[Chin J Contemp Pediatr, 2016, 18(2): 113-116]

Key words: Recurrent pneumonia; Gut microbiota; D-lactate; Child

肺炎是儿童常见病、多发病,随着诊疗水平的提高,死亡率明显下降,但部分患儿反复发生肺炎,且反复肺炎发病率逐年增加^[1],影响儿童的身心健康。反复肺炎发病机制复杂,在排除基础

疾病或免疫缺陷性疾病的基础上仍有部分反复肺炎原因不明。有报道益生菌可以通过调节免疫功能,增强机体抗感染能力,缩短反复呼吸道感染病程^[2-3]。而目前关于反复肺炎患儿的肠道菌群变

[收稿日期] 2015-10-31; [接受日期] 2015-12-25

[作者简介] 彭韶,女,硕士,主任医师。

化、肠道黏膜的机械屏障功能变化以及二者关系的报道较少。本文旨在通过对照研究反复肺炎患儿、急性肺炎患儿及正常儿童粪便中的双歧杆菌、大肠杆菌菌群变化,以及血液中的 D-乳酸水平,以期为益生菌治疗反复肺炎提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 研究对象

反复肺炎组(反复组):2014年6月至2015年6月经郑州大学第一附属医院儿科门诊或住院首次确诊的反复肺炎患儿30例,中位年龄5(4.52,6.16)岁,男22例,女8例,平均体重 18.7 ± 4.3 kg。反复肺炎的判断标准:指1年内反复发生肺炎 ≥ 2 次,或一生中任意时段3次肺炎;肺炎由肺部体征和影像学证实,两次肺炎期间肺炎体征和影像学改变完全消失^[4]。急性肺炎组(急性组):不满足反复肺炎诊断条件,同期我院门诊或住院的急性肺炎患儿30例,中位年龄5(4.371,5.86)岁,男19例,女11例,平均体重 18.1 ± 3.6 kg。外科组:同期我院小儿外科住院的无感染的发育异常儿童,如多指畸形等,15例,中位年龄5(4.66,6.34)岁,男9例,女6例,平均体重 18.5 ± 3.7 kg。其中3组患儿的年龄、性别、体重差异无统计学意义($P > 0.05$)。

以上3组儿童近4周内均未用抗生素、激素、抗组胺药及微生态制剂;平时饮食未摄入含益生菌的奶制品;近4周无胃肠道病史,无先天性心脏病、先天性肺发育畸形、先天性免疫缺陷病、支气管哮喘、肾脏疾病、过敏性紫癜、糖尿病等基础疾病;此次病程不超过3天,且外院应用抗生素不超过1天或未应用抗生素。本研究通过医院医学伦理委员会批准,同时获得家长书面知情同意。

1.2 标本采集

入院第1天留取标本。用无菌离心管收集粪便标本,放置于 -80°C 冰箱保存;同时采集静脉血2 mL于肝素钠管中,离心后血清标本放置于 -80°C 冰箱内保存。

1.3 16S rRNA 荧光定量 PCR 检测粪便双歧杆菌和大肠杆菌

粪便目的细菌 DNA 提取试剂盒选用 TIANamp

Bacteria DNA Kit (TIANGEN), 荧光染料为 RealMasterMix (SYBR Green) (TIANGEN)。

提取肠道细菌基因组 DNA。称取粪便样本 200 mg 冻融,按照试剂盒说明提取粪便细菌 DNA, -20°C 保存备用。

PCR 引物设计。根据 PubMed 基因库中双歧杆菌及大肠杆菌 16S rDNA 基因序列设计引物,由天根生化有限科技公司合成,分别在 BLAST 数据库(www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)进行比较。其中双歧杆菌引物:上游 5-GATTCTGGCTCAGGATGAACGC-3,下游 5-CTGATAGGACGCGACCCCAT-3,扩增片段为 230 bp;大肠杆菌引物:上游 5-CATGCCGCGTGTATGAAGAA-3,下游 5-CGGGTAACGTCAATGAGCAAA-3,扩增片段为 95 bp。

引物特异性检测,取外科组粪便进行荧光定量 PCR,反应体系为:上游引物 1 μL ,下游引物 1 μL ,SYBR Green 9 μL ,DNA 模板 7 μL ,ddH₂O μL ,共 20 μL ,双歧杆菌和大肠杆菌反应条件均为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min 后,95 $^{\circ}\text{C}$ 40 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 20 s,68 $^{\circ}\text{C}$ 40 s,共 40 个循环,最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min 结束。取 PCR 产物 10 μL 与 2 μL Loading Buffer 混匀上样,琼脂糖凝胶电泳,可见 2 种细菌 PCR 扩增产物均显示出特异性条带。

荧光定量 PCR,取外科组粪便提取的 DNA,分别用双歧杆菌及大肠杆菌特异性引物进行扩增,将扩增产物按 DNA 琼脂糖凝胶回收试剂盒说明进行纯化回收,测定纯化产物吸光度值及浓度,换算为各标准品 1 μL 的拷贝数用于制作标准曲线。将 3 组提取的 DNA 分别进行 16S rRNA 荧光定量 PCR,每次实验同时设标准品校正和 ddH₂O 代替 DNA 模板作为阴性对照,根据溶解曲线分析 PCR 产物的特异性,并由 Light Cycler PCR 仪分析定量结果。

双歧杆菌和大肠杆菌含量以其对数值(拷贝数/g 湿便)表示,并计算双歧杆菌和大肠杆菌含量的比值(B/E 值)

1.4 血清 D-乳酸检测

采用 BioVision D-Lactate 试剂盒,血浆经高氯酸去蛋白后,用酶偶联紫外分光光度法检测。

1.5 统计学分析

采用 SPSS 15.0 统计软件, 进行统计学处理。计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 或中位数 (四分位间距) [$M(Q)$] 表示, 组间比较采用 Kruskal-Wallis 检验, 组间两两比较采用 Wilcoxon 检验。相关性分析采用 Pearson 相关分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大肠杆菌及双歧杆菌定量分析结果

反复组患儿双歧杆菌数量明显低于急性组及外科组 (Z 分别为 -2.139 和 -3.854 , 均 $P < 0.05$), 急性组患儿双歧杆菌数量低于外科组 ($Z = -3.349$, $P < 0.05$); 反复组、急性组患儿大肠杆菌数量明显高于外科组 (Z 分别为 -2.364 和 -3.160 , 均 $P < 0.05$), 反复组大肠杆菌数量与急性组差异无统计学意义 ($Z = -1.643$, $P > 0.05$); 反复组患儿 B/E 值明显低于急性组和外科组 (Z 分别为 -3.026 和 -3.149 , 均 $P < 0.05$), 急性组患儿 B/E 值与外科组的差异无统计学意义 ($Z = -1.341$, $P > 0.05$)。见表 1。

表 1 各组两种细菌含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	双歧杆菌	大肠杆菌	B/E
外科组	15	5.2 ± 0.3	3.94 ± 1.76	1.20 ± 0.40
急性组	30	4.2 ± 1.2^a	4.56 ± 1.16^a	0.97 ± 0.05
反复组	30	3.7 ± 1.6^{ab}	5.32 ± 0.15^a	0.83 ± 0.33^{ab}
H 值		19.85	12.05	13.47
P 值		<0.05	<0.05	<0.05

注: [B/E] 双歧杆菌与大肠杆菌含量比值。a 示与外科组比较, $P < 0.05$; b 示与急性组比较, $P < 0.05$ 。

2.2 各组血清 D- 乳酸结果

反复组患儿血清 D- 乳酸明显高于急性组及外科组 (Z 分别为 6.071 和 16.411 , 均 $P < 0.05$), 急性组患儿血清 D- 乳酸较外科组高 ($Z = 20.707$, $P < 0.05$)。见表 2。

2.3 反复组患儿 B/E 值与血清 D- 乳酸相关性分析

Pearson 相关分析表明, 反复组患儿的 B/E 值与血清 D- 乳酸呈直线负相关 ($r = -0.539$, $P < 0.05$)。见图 1。

表 2 各组 D- 乳酸的定量分析结果比较 ($\bar{x} \pm s$, $\mu\text{g/mL}$)

组别	例数	D- 乳酸
外科组	15	0.40 ± 0.09
急性组	30	3.70 ± 0.72^a
反复组	30	5.92 ± 1.50^{ab}
H 值		19.85
P 值		<0.05

注: a 示与外科组比较, $P < 0.05$; b 示与急性组比较, $P < 0.05$ 。

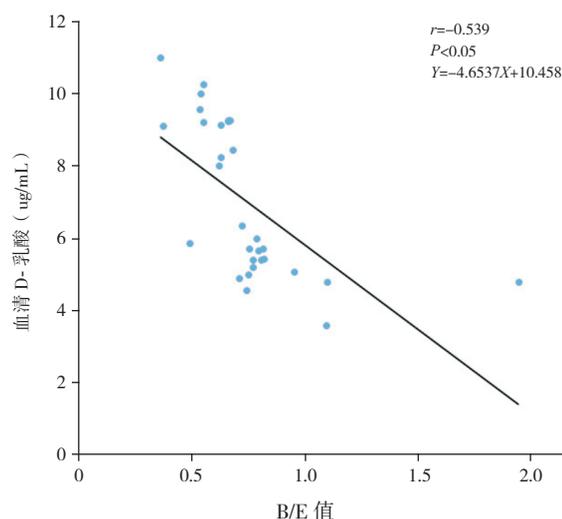


图 1 反复肺炎患儿的 B/E 值与血清 D- 乳酸的相关性

3 讨论

肺炎是儿童常见疾病, 多见于学龄前儿童, 死亡率仍较高。反复肺炎占儿童肺炎总数的 8% 左右, 其发病受多种因素影响^[5]。目前国内外研究发现, 反复肺炎患儿存在免疫功能紊乱, 主要以细胞免疫紊乱为主, 尤其是辅助 T 淋巴细胞功能异常是儿童反复肺炎的重要原因^[6-7]; 另外吴小川等^[8]报道反复肺炎可能是导致高 IgE 的免疫基础, 有促发气道高反应及哮喘等可能; Chillvers 等^[9]认为反复肺炎也可引起支气管哮喘的发生, 因此反复肺炎也可能与过敏性疾病相关。而肠道菌群紊乱可以引起免疫功能改变及过敏性疾病的发生^[10]。

目前关于反复肺炎与肠道菌群及血浆 D- 乳酸变化的相关性研究较少。临床研究显示, 益生菌治疗反复肺炎有明确疗效, 但相关机制尚未明确^[11]。本研究发现, 反复肺炎患儿双歧杆菌数量明显减少, 大肠杆菌数量增加说明反复肺炎可能存在菌群失调。研究发现双歧杆菌或乳酸杆菌可

通过 Toll 样受体 2 (TLR2) 影响肥大细胞的功能, 在体外双歧杆菌预处理的致敏 IgE 肥大细胞, 经抗原刺激未发生脱颗粒, 提示益生菌可能产生抗过敏效应^[12], 而过敏体质是反复肺炎的危险因素之一^[13]。另有研究发现^[2-3], 益生菌通过免疫调节作用可以促进黏膜的抗病原能力甚至产生免疫耐受, 作用于肠道外远隔部位的黏膜免疫。口服益生菌可通过作用于 TLR2 产生细胞因子, 募集中性粒细胞或增强其功能, 减少促炎因子及下调黏附分子的表达来提高固有免疫, 同时还可以增加呼吸道产生 IgA 的细胞及促进 IgA 循环^[14]。这些研究均提示益生菌可以上调呼吸道的特异性及非特异性免疫反应, 减少过敏及呼吸道感染的发生。

肠道内 B/E 可作为评估肠道微生物定植抗力的新指标^[15-16]。本研究发现反复肺炎患儿 B/E 值 <1, 明显低于急性肺炎及外科组患儿, 说明反复肺炎患儿肠道定植抗力较急性肺炎患儿及正常儿童均低, 进一步说明反复呼吸道感染患儿肠道定植抗力减弱。

D- 乳酸主要由胃肠道细菌发酵产生, 正常情况下很少被吸收, 在肠黏膜发生急性缺血等情况下, 血清 D- 乳酸可在损伤早期就升高, 且与肠黏膜的损伤程度呈正比, 血清 D- 乳酸水平可以反映肠道黏膜损害的程度和通透性变化^[17]。本研究发现反复肺炎患儿血清 D- 乳酸较急性肺炎患儿高, 说明其肠道黏膜损伤较急性肺炎重。另外反复肺炎患儿 B/E 值与血清 D- 乳酸呈直线负相关, 说明肠道菌群平衡可能对肠道黏膜的机械屏障有重要作用, 肠黏膜屏障受损可能在反复肺炎发生中起重要作用。

综上所述, 反复肺炎患儿可能存在肠道菌群紊乱, 表现为双歧杆菌减少, 大肠杆菌增加, 肠道黏膜通透性明显增加。因此, 在合理应用抗生素同时, 加强肠道微生态平衡, 刺激增强免疫作用, 从而促进疾病恢复。

[参 考 文 献]

- [1] Lodha R, Puranik M, Natchu UCM, et al. Recurrent pneumonia in children: clinical profile and underlying causes[J]. *Acta Paediatr*, 2002, 91(11): 1170-1173.
- [2] Villena J, Oliverira ML, Ferreira PC, et al. Lactic acid bacteria in the prevention of pneumococcal respiratory infection: future opportunities and challenges[J]. *Int Immunopharmacol*, 2011, 11(11): 1633-1645.
- [3] Vouloumanou EK, Makris GC, Karageorgopoulos DE, et al. Probiotics for the prevention of respiratory tract infections: a systematic review[J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2009, 34(3): e1-e10.
- [4] 中华医学会儿科学分会呼吸学组, 《中华儿科杂志》编辑委员会. 反复呼吸道感染的临床概念和处理原则 [J]. *中华儿科杂志*, 2008, 46(2): 108-110.
- [5] 中华医学会儿科学分会呼吸学组, 《中华儿科杂志》编辑委员会. 儿童社区获得性肺炎管理指南 (2013 修订) (上) [J]. *中华儿科杂志*, 2013, 51(10): 745-752.
- [6] Owayed AF, Campbell DM, Wang EE. Underlying causes of recurrent pneumonia in children[J]. *Arch Pediatr Adolesc Med*, 2000, 154(2): 190-194.
- [7] 李小青, 段明玥, 李丹, 等. 反复呼吸道感染患儿细胞及体液免疫功能分析 [J]. *中国妇幼健康研究*, 2013, 24(4): 469-471.
- [8] 吴小川, 周杜娟. 儿童反复呼吸道感染的支气管粘膜免疫和气道高反应变化 [J]. *临床儿科杂志*, 2011, 29(1): 22-25.
- [9] Chilvers MA, O'Callaghan C. Local mucociliary defence mechanisms[J]. *Pediatr Respir Rev*, 2000, 1(1): 27-34.
- [10] Takahashi K. Interaction between the intestinal immune system and commensal bacteria and its effect on the regulation of allergic reactions[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2010, 74(4): 691-695.
- [11] 陈汝文, 杨静, 薛辉, 等. 益生菌治疗反复呼吸道感染的相关机制 [J]. *中国小儿急救医学*, 2012, 19(5): 539-540.
- [12] Kasakura K, Takahashi K, Aizawa T, et al. A TLR2 ligand suppresses allergic inflammatory reactions by action directly on mast cells[J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2009, 150(4): 359-369.
- [13] Dellepiane RM, Pavesi P, Patria MF, et al. Atopy in preschool Italian children with recurrent respiratory infections[J]. *Med Surg Pediatr*, 2009, 31(4): 161-164.
- [14] Salava S, Villena J, Alvarez S. Immunomodulatory activity of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from goat milk: impact on intestinal and respiratory infections[J]. *Int J Food Microbiol*, 2010, 141(1-2): 82-89.
- [15] van der Waaij D, Berghuis-de Vries JM, Lekkerkerk-van der Wees JEC. Colonization resistance of the digestive tract in conventional and antibiotic-treated mice[J]. *J Hyg (Lond)*, 1971, 69(3): 405-411.
- [16] 吴仲文, 李兰娟, 马伟航, 等. 肠道微生物定植抗力的新指标—B/E 值 [J]. *浙江预防医学*, 2000, 12(7): 4-5.
- [17] Szalay L, Umar F, Khadem A, et al. Increased plasma D-lactate is associated with the severity of hemorrhagic/traumatic shock in rats[J]. *Shock*, 2003, 20(3): 245-250.

(本文编辑: 王庆红)