

论著·临床研究

儿童肠道分节丝状菌年龄分布特征 及其与肠黏膜免疫的关系

刘伟荣^{1,2} 舒小莉¹ 顾伟忠¹ 彭克荣¹ 赵泓¹ 陈波¹ 江丽琴¹ 江米足¹

(1. 浙江大学医学院附属儿童医院消化科, 浙江 杭州 310003;
2. 浙江省绍兴市人民医院儿科, 浙江 绍兴 312000)

[摘要] **目的** 了解儿童肠道分节丝状菌(SFB)年龄分布特征及其与肠道黏膜免疫的关系。**方法** 收集177例儿童的新鲜粪便及47例儿童肠镜检查时的回盲部肠液,采用RT-PCR法测定SFB,ELISA法测定其sIgA浓度。采用免疫组化方法测定23例儿童回肠末端黏膜IL-17A细胞数量和上皮内淋巴细胞数量及Th细胞分化相关的转录因子T-bet、FOXP3和ROR- γ t的表达。**结果** 儿童肠道SFB阳性率为19.2%(34/177)。趋势分析显示SFB阳性率随年龄增加呈降低趋势:0岁~、1岁~、2岁~、3岁~、4岁~、5岁~、6岁~、7~15岁分别为40%、47%、32%、15%、12%、13%、15%、4%($P<0.001$)。SFB阳性患儿(24例)的肠液sIgA浓度明显高于SFB阴性患儿(23例)($P<0.01$)。SFB阳性组(12例)回肠末端黏膜上皮细胞内淋巴细胞数量及转录因子T-bet、FOXP3和ROR- γ t的表达与SFB阴性组(11例)的差异无统计学意义,而SFB阳性组回肠末端黏膜IL-17A细胞数量明显低于SFB阴性组($P<0.05$)。**结论** 儿童SFB肠道定植与年龄相关,其中3岁以内婴幼儿SFB肠道定植率较高;SFB阳性者肠道sIgA分泌增加,回肠末端IL-17A细胞数量减少。

[中国当代儿科杂志, 2019, 21(6): 534-540]

[关键词] 分节丝状菌; 黏膜免疫; sIgA; Th17细胞; 儿童

Age distribution characteristics of intestinal segmented filamentous bacteria and their relationship with intestinal mucosal immunity in children

LIU Wei-Rong, SHU Xiao-Li, GU Wei-Zhong, PENG Ke-Rong, ZHAO Hong, CHEN Bo, JIANG Li-Qin, JIANG Mi-Zu. Department of Gastroenterology, Children's Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310003, China (Jiang M-Z, Email: mizu@zju.edu.cn)

Abstract: Objective To investigate the age distribution characteristics of intestinal segmented filamentous bacteria (SFB) in children and their relationship with intestinal mucosal immunity. **Methods** The fresh feces of 177 children and the ileocecal fluid of 47 children during colonoscopy were collected. The SFB was determined by real-time PCR. The concentration of secretory immunoglobulin A (sIgA) was determined by enzyme-linked immunosorbent assay. The numbers of interleukin 17A (IL-17A) cells and intraepithelial lymphocytes in the terminal ileum mucosa and the expression of transcription factors associated with the differentiation of T helper (Th) cells, T-box transcription factor (T-bet), forkhead box P3 (FOXP3), and retinoid-related orphan receptor gamma t (ROR- γ t), were determined by immunohistochemistry. **Results** The positive rate of intestinal SFB in these children was 19.2% (34/177). Trend analysis showed that the positive rate of SFB was correlated with age: the rates for children aged 0-, 1-, 2-, 3-, 4-, 5-, 6-, and 7-15 years were 40%, 47%, 32%, 15%, 12%, 13%, 15% and 4% respectively ($P<0.001$). The concentration of sIgA in intestinal fluid was significantly higher in SFB-positive children ($n=24$) than in SFB-negative children ($n=23$) ($P<0.01$). The number of intraepithelial lymphocytes in the terminal ileum mucosa and the expression of T-bet, FOXP3, and ROR- γ t were not significantly different between the SFB-positive group ($n=12$) and the SFB-negative group ($n=11$), but the

[收稿日期] 2018-12-24; [接受日期] 2019-04-04

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973)(2013CB531404); 国家卫生计生委科学研究基金-浙江省医药卫生重大科技计划(WKJ-ZJ-1622)。

[作者简介] 刘伟荣,男,硕士研究生,副主任医师。

[通信作者] 江米足,男,教授,主任医师。Email: mizu@zju.edu.cn。

number of IL-17A cells in the terminal ileum mucosa was significantly lower in the SFB-positive group than in the SFB-negative group ($P < 0.05$). **Conclusions** Intestinal SFB colonization in children is age-related, and the colonization rate is relatively high in children under 3 years old. In SFB-positive children, the secretion of intestinal sIgA is increased, while the number of IL-17A cells in the terminal ileum is reduced. [Chin J Contemp Pediatr, 2019, 21(6): 534-540]

Key words: Segmented filamentous bacterium; Mucosal immunity; sIgA; Th17 cell; Child

分节丝状菌 (*segmented filamentous bacterium*, SFB) 是一种革兰阳性、产芽孢厌氧菌, 广泛存在于多种脊椎动物及无脊椎动物肠道内的一类形态结构特异的“原籍”细菌^[1]。既往相关研究多为动物实验研究, 结果表明 SFB 与宿主的免疫成熟密切相关, 它能促进宿主 sIgA 的分泌、调控 T 细胞的分化和平衡、诱导 Th17 细胞的分化、抵抗外来致病菌的感染^[2-3]。这类细菌常出现在宿主动物免疫系统成熟前后 (幼年时期), 一旦宿主动物进入成年期, 这类细菌大多消失。通过对小鼠、大鼠和鸡的研究, 发现 SFB 在动物中定植存在年龄依赖关系, 随着年龄的增长, SFB 的定植逐渐减少^[4-5]。SFB 在人类肠道是否存在一直有争议。Yin 等^[6]通过 PCR 技术发现人 SFB 肠道定植且存在年龄依赖关系, 在 7~12 个月龄时 SFB 阳性率最高 (78.6%), 到 3 岁后阳性率降低。Caselli 等^[7]在溃疡性结肠炎患者回盲瓣部位发现类似 SFB 细菌, 这是形态学的定植依据。SFB 在人类肠道定植特点及年龄分布特征需要更多的依据来明确, 其与肠道黏膜免疫的关系尚不清楚。本研究旨在通过 RT-PCR 技术了解不同年龄儿童粪便 SFB 检出率, 并通过测定肠液中的 sIgA 浓度、回肠末端 IL-17A 细胞数量、上皮内淋巴细胞数量, 及 Th17 细胞、Th1 细胞、Treg 细胞等细胞分化相关转录因子表达, 初步探讨儿童 SFB 肠道定植年龄分布特征及其与肠黏膜免疫的关系。

1 资料与方法

1.1 研究对象

收集在浙江大学医学院附属儿童医院住院的 0~15 岁非胃肠道疾病、非感染性疾病患儿的新鲜粪便, 排除抗生素应用及益生菌应用史, 共有 177 例 (男 100 例, 女 77 例) 患儿纳入本研究。

另选择因腹痛或便血在浙江大学医学院附属儿童医院行肠镜检查未发现大肠明显异常的患儿, 收集其回盲部肠液, 共有 47 例获得肠液, 年龄 8

个月至 9 岁 1 个月。另外, 肠镜检查到达回肠末端者取回肠黏膜, 纳入回肠黏膜病理未见明显异常者 24 例, 年龄 1 岁 3 月至 12 岁 1 个月。

1.2 标本采集

(1) 粪便标本: 收集符合纳入标准的患儿粪便标本, 用无菌的竹签将新鲜粪装入收集管中, 然后放到装有冰块的保温罐中, 1 h 内送到实验室, 分装到 1.5 mL 灭菌离心管中, 放置在 -80°C 冰箱保存备用。

(2) 肠液标本: 采集电子结肠镜检查时回盲部肠液至无菌吸引瓶中, 再用无菌吸引管吸取 20 mL 左右至试管, 然后放置在 -80°C 冰箱保存备用。

(3) 回肠末端黏膜标本: 电子结肠镜进镜至回肠末端时, 活检回肠末端黏膜, 迅速放入收集管中, 用 10% 福尔马林溶液固定。

1.3 SFB 标准质粒鉴定和 16S rRNA 目的基因 PCR 扩增

(1) SFB 引物设计和合成: 从 GenBank 中获取 SFB 的序列, 根据细菌的 16S rRNA 特异性基因序列, 设计其特异性引物, 并在 BLAST 基因库 (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) 中进行比对, 验证其特异性。SFB 引物由英潍捷基 (上海) 贸易有限公司合成, 上游引物 5'-TGTGGGTTGTGAATAACAAT-3', 下游引物 5'-GCGGGCTTCCCTCATTACAAGG-3', 目的片段长度 229 bp。SFB 标准质粒由浙江省农科院植微所免疫微生物实验室提供。

(2) SFB 标准质粒常规 PCR 扩增的反应体系和条件: 标准质粒倍比稀释, $10 \times$ 缓冲液 5 μL , 上游引物 (10 μM) 1 μL , 下游引物 (10 μM) 1 μL , 模板 DNA 5 μL , dNTP Mixture 4 μL , TaKaRa LA Taq 酶 0.5 μL , ddH₂O 33.5 μL , 总反应体积 50 μL 。所用 PCR 仪为 Biometra Tpersonal PCR 仪。PCR 条件: 95°C 5 min; 95°C 30 s, 58°C 30 s, 72°C 30 s, 35 个循环; 72°C 5 min。取 10 μL PCR 扩增产物与 1 μL $10 \times$ loading Buffer 混合后, 在含有约 0.5 mg/L 溴化乙锭的 2% 琼脂糖凝胶中电泳

(50 mA)，约20 min后于凝胶成像仪中观察，确认电泳条带，以验证引物的特异性^[8]。

1.4 粪便及肠液 SFB 的定性测定

(1) 粪便、肠液菌群 DNA 的提取及浓度测定：所用试剂为 QIAgen DNA Stool Mini Kit 试剂盒，按说明书进行操作，用微量紫外分光光度计 (NanoDrop®ND-1000) 测定粪便及肠液菌群 DNA 浓度。已纯化洗脱的 DNA 置于 -20℃ 冰箱中保存。

(2) 实时荧光定量 PCR 反应体系及条件：所用试剂盒为 SYBR Premix Ex Taq，所用仪器为 ABI7500 型实时荧光定量 PCR 扩增仪。具体方法为：取 SFB 标准质粒、空白对照 (ddH₂O) 及样本为模板，进行实时 PCR 反应，每个样本均做 2 个复孔。反应体系：SYBR Premix Ex Taq 12.5 μL，上游引物 0.5 μL，下游引物 0.5 μL，模板 DNA X μL，ddH₂O Y μL (X 为 50 μg ÷ 模板 DNA 浓度，Y=11.5-X)，总反应体积 25 μL。反应条件：95℃ 2 min，1 个循环；95℃ 45 s，60℃ 45 s，40 个循环；95℃ 15 s，60℃ 1 min，95℃ 15 s，1 个循环。得到 SFB 标准质粒及样本的扩增曲线、熔解曲线，实时 PCR 产物再经 2% 琼脂糖凝胶电泳，确认 SFB 条带^[9]。

1.5 ELISA 法测定肠液 sIgA 浓度

冰冻保存的肠液于 4℃ 放置 2 h 后，取 5 mL，予 1000 r/min 离心 20 min，取上清液 1.5 mL 入微量离心管。提前配置好所有试剂，如洗涤液、标准品及稀释液、生物素化抗体工作液、酶结合物工作液，各试剂均应平衡至室温，并制作标准曲线，按说明书进行操作。如样品浓度过高时，按样品稀释液进行稀释。用酶标仪在 450 nm 波长测量各孔的光密度 (OD 值)，根据标准曲线计算出样品 sIgA 浓度，再乘以稀释倍数，即为样品 sIgA 的实际浓度。

1.6 免疫组化法测定回肠黏膜免疫相关细胞数量及 Th 细胞分化相关转录因子表达

(1) 免疫组化法：石蜡切片经连续切片成厚 3~4 μm，捞在防脱的载玻片上，60~62℃ 烘箱 (DHG-9140A 型电热恒温箱) 烤片 2 h。二甲苯脱蜡 10 min × 2 次、无水乙醇 3 min × 2 次、95% 乙醇 2 min × 2 次、80% 乙醇 2 min、70% 乙醇 2 min，至水化，蒸馏水洗涤。高温高压抗原修复后，3% H₂O₂ 水溶液阻断内源性过氧化物酶，滴加适当比

例稀释的一抗，37℃ 孵育 60 min (用 PBS 代替一抗为实验的空白对照)。滴加山羊抗兔或小鼠 IgG 抗体-HRP 多聚体的二抗，37℃ 孵育 40 min。DAB 显色液显色 1 min，自来水冲洗终止反应。Harris 苏木素液复染细胞核 1 min，95%、100% 乙醇脱水，二甲苯透明，中性树胶封片。免疫组织化学染色黄色或黄棕色为阳性，细胞核衬染呈蓝色。

(2) 免疫组化阳性结果的判断和分析：CD45 阳性主要表达在所有淋巴细胞的胞膜上，每个标本观察 6~10 个绒毛，计数每个绒毛上皮层内每 100 个柱状上皮细胞间淋巴细胞数，再换算成百分比 (%)。

IL-17A、FOXP3 和 ROR-γt 表达在肠道黏膜上皮细胞和固有层内的淋巴细胞等胞浆内，其具体的表达程度采用半定量计分的方法，即染色阳性强度计分和阳性细胞百分比计分的乘积。(1) 染色强度计分，即 0 分：无色；1 分：淡黄色；2 分：棕黄色；3 分：棕褐色。(2) 阳性细胞所占的百分比计分，即 0 分：阴性；1 分：阳性细胞 ≤ 10%；2 分：11%~50%；3 分：51%~75%；4 分：>75%。

T-bet 阳性细胞数采用百分数 (%) 表示，即每张切片在 200 倍视野下计数 200 个以上细胞中 T-bet 染色阳性的细胞数，换算成阳性指数 (%)，即视野内的阳性细胞数 / 视野内总的细胞数 × 100%。

1.7 统计学分析

应用 SPSS 17.0 统计软件分析实验数据。计量资料用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 或中位数 (四分位数间距) [$P_{50} (P_{25}, P_{75})$] 表示。两组之间差异比较用独立样本 *t* 检验或非参数秩和检验，趋势分析采用 Cochran-Armitage 检验。 $P < 0.05$ 示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般临床资料

(1) 采集粪便标本的患儿年龄分组：0 岁 ~ 组 20 例，1 岁 ~ 组 19 例，2 岁 ~ 组 19 例，3 岁 ~ 组 20 例，4 岁 ~ 组 17 例，5 岁 ~ 组 15 例，6 岁 ~ 组 13 例，7~15 岁组 54 例。

(2) 采集了肠液标本的患儿分组：根据肠

液 SFB 测定结果分为 SFB 阳性组 ($n=24$, 女 8 例, 男 16 例) 和 SFB 阴性组 ($n=23$, 女 6 例, 男 17 例)。

(3) 采集了回肠黏膜标本的患儿分组: 根据肠液 SFB 测定结果, 将采集了回肠黏膜的患儿分为 SFB 阳性组 ($n=12$, 女 1 例, 男 11 例) 和 SFB 阴性组 ($n=11$, 女 2 例, 男 9 例)。

2.2 SFB 标准质粒经 PCR 扩增产物的鉴定

(1) SFB 标准质粒的鉴定: 图 1 所示, SFB 标准质粒倍比稀释后经 PCR 扩增产物的电泳条带, 位于 1、2、3、4 道, 与目标基因 229 bp 大小相符。

(2) 样本 DNA 经过实时 PCR 扩增产物的鉴定: 如图 2 所示, 除了样本 2、5、7 泳道及 ddH₂O 阴性对照泳道外, 各个电泳条带与目标基因 229 bp 大小相符。条带的亮度不同, 代表样本中 SFB DNA 的浓度不等。

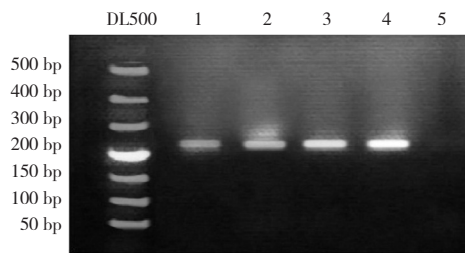


图 1 SFB 标准质粒经 PCR 扩增产物琼脂糖电泳
1~4 泳道为 SFB 标准质粒, 浓度分别为 10^{-3} 、 10^{-2} 、 10^{-1} 、1; 5 泳道为 ddH₂O。

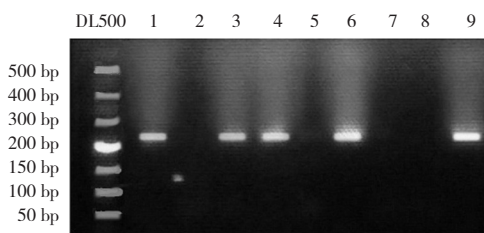


图 2 SFB 标准质粒和样本 DNA 经实时 PCR 扩增产物的验证
1~7 泳道为样本 DNA; 8 泳道为 ddH₂O; 9 泳道为 SFB 标准质粒。

2.3 肠道 SFB 在不同年龄组的分布特征

在收集的 177 例粪便样本中, 34 例 (19.2%) SFB 阳性, 其在各个年龄段的分布呈现年龄依赖关系, 其中 0 岁 ~ 组 SFB 阳性率是 40%, 1 岁 ~ 组最高, 达 47%, 而 7 岁后阳性率明显下降, 仅 4%。Cochran-Armitage 趋势检验显示, 肠道 SFB 定

植阳性率随着年龄的增加呈降低趋势 ($\chi^2=4.778$, $P<0.001$), 可以看出 SFB 在 3 岁以内婴幼儿定植率较高 (表 1、图 3)。

表 1 肠道 SFB 在各年龄段的分布

年龄分组 (岁)	例数	阳性例数	阳性率 (%)
0~	20	8	40
1~	19	9	47
2~	19	6	32
3~	20	3	15
4~	17	2	12
5~	15	2	13
6~	13	2	15
7~15	54	2	4
χ^2 值			4.778
P 值			<0.001

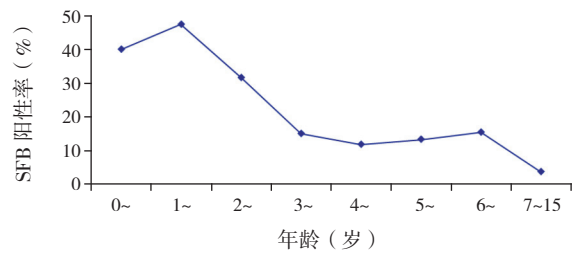


图 3 肠道 SFB 在各个年龄段阳性率趋势图

2.4 肠液 sIgA 浓度与 SFB 关系

SFB 阳性组肠液 sIgA 浓度较 SFB 阴性组明显升高, 分别为 111 ± 31 、 72 ± 23 $\mu\text{g/mL}$, 其差异有统计学意义 ($t=4.835$, $P<0.01$)。

2.5 SFB 定植对回肠末端黏膜上皮内淋巴细胞和 IL-17A 细胞数量的影响

SFB 定植与未定植者回肠末端黏膜上皮内淋巴细胞数量的差异无统计学意义 ($P>0.05$); 而 IL-17A 细胞在 SFB 阳性组较 SFB 阴性组明显减少, 其差异有统计学意义 ($P<0.05$), 如表 2、图 4 所示。

2.6 SFB 定植对 Th 细胞分化相关的转录因子的影响

SFB 定植后回肠黏膜转录因子 FOXP3 及 ROR- γt 较未定植组有所增高, 但差异无统计学意义 ($P>0.05$); 而转录因子 T-bet 较未定植组有所减少, 差异也无统计学意义 ($P>0.05$)。见表 3。

表2 回肠末端黏膜免疫相关细胞数量 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	IL-17A 细胞	上皮内淋巴细胞 (%)
SFB 阴性组	11	6.4 ± 2.0	6.1 ± 2.3
SFB 阳性组	12	4.7 ± 1.7	6.3 ± 3.8
t 值		-2.293	0.143
P 值		0.032	0.888

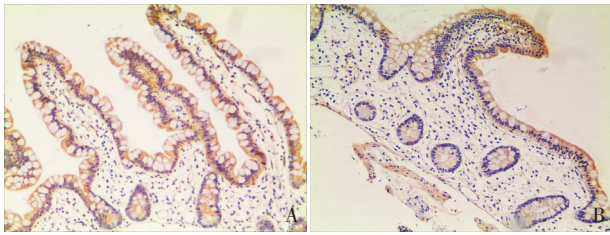


图4 回肠末端黏膜 IL-17A 细胞数量比较 (免疫组化染色, ×100) SFB 阳性组 (图 B) IL-17A 细胞数量少于 SFB 阴性组 (图 A)。黄色或褐色细胞为阳性细胞。

表3 回肠末端黏膜免疫相关转录因子的表达

[P_{50} (P_{25} , P_{75})]

组别	n	FOXP3	ROR- γ t	T-bet(%)
SFB 阴性组	11	4.0(1.5, 6.0)	4.0(4.0, 6.0)	2.5(0, 8.1)
SFB 阳性组	12	4.5(4.0, 6.0)	5.0(4.0, 6.8)	1.5(0.1, 8.7)
Z 值		1.080	0.668	0.189
P 值		0.316	0.525	0.880

3 讨论

SFB 的定植与年龄密切相关, 这主要归因于宿主随着年龄增加而日趋成熟的免疫系统^[4-6]。如在小鸡中, SFB 并不是在小鸡孵化出壳后马上就定植到肠道中, 而是在小鸡生长到 1 周左右 (第 6 天) 才出现的, 之后 SFB 的数量逐渐增高, 第 2、3 周内数量稳定在一定的高度, 之后又开始降低, 下降期与回肠内 sIgA 的增加相一致^[4]。在小鼠中, 回肠中 SFB 在断奶后到自身产生的 IgA 前这段期间内迅速增加, 而后又逐渐下降^[5]。SFB 选择性地定植在回肠, 是因为 SFB 高度依靠其他生物提供营养, 回肠细菌的密度非常高, 可能为 SFB 的定植提供了必需的物质^[10]。SFB 在宿主体内的定植, 不仅受自身产生的 sIgA 或外来的 sIgA (如母乳) 的影响, 而且还受到其他因素的影响, 如饮食、生活环境等^[11]。而饮食在肠道菌群的变化中是个

重要因素, 如用高动物脂肪、少蔬菜和膳食纤维的食物喂养的老鼠, 肠道中厚壁菌多于拟杆菌^[12], 所以饮食是可以通过肠道菌群的变化而改变 SFB 的定植。Jin 等^[13]证实小剂量青霉素可引起肠道菌群的变化, 关键是 SFB 的清除, 并进一步抑制 IL-17 的表达和回肠 IL-17 细胞的分化, 而青霉素的这种抑制作用是 SFB 依赖的。

虽然关于 SFB 在动物的定植、分布及宿主关系的研究较多, 但在人类中的研究非常少, 需要进一步的验证。对于人肠道 SFB 的分布调查, 多根据小鼠 SFB 的全基因序列来检测是否存在 SFB。Prakash 等^[14]及 Sczesnak 等^[15]在 263 例人肠道宏基因中未能确定 SFB 的序列, 提出人粪便中不存在 SFB 的观点。但 Caselli 等^[7]在溃疡性结肠炎患者回盲瓣部位发现类似 SFB 细菌, 并通过 PCR 技术证实溃疡性结肠炎患儿回肠黏膜存在 SFB, 且与炎症的活动度有关^[9]。Yin 等^[6]通过 PCR 技术发现 SFB 在人类中定植并存在年龄依赖关系, 在 7~12 个月龄时阳性率最高 (78.6%), 到 3 岁后阳性检测率显著降低。并发现儿童 24 个月以前肠道 sIgA 水平相当低且稳定, 而 SFB 的定植在 24 个月后逐渐下降, 推测肠道内 sIgA 影响了 SFB 的定植。本研究通过 PCR 技术, 检测各年龄段儿童粪便中 SFB 阳性率的差异, 结果表明 SFB 在 3 岁以内阳性率较高, 3 岁以后则明显下降, 与既往报道^[6]基本一致。

在动物模型中, SFB 肠道定植与 sIgA 的产生相互影响, 一方面, SFB 的定植受到肠内 sIgA 浓度的影响, 但另一方面, SFB 的定植可以影响肠内 sIgA 的浓度^[16-18]。Klaasen 等^[9]研究发现, 相比无菌小鼠, 单一定植 SFB 小鼠的回肠和盲肠黏膜 sIgA 细胞数量明显上升, 而血清 IgA 和肠道 sIgA 的滴度也随之增加。Ohashi 等^[5]发现, 小鼠粪便 IgA 量和粪便 SFB 的数量呈正相关。Talham 等^[20]发现, 无菌小鼠肠腔中 IgA 接近于 0, 但单一 SFB 定植后, 其浓度达到普通小鼠肠腔 IgA 浓度的 2/3。本研究通过测定 SFB 阳性及阴性儿童肠液中 sIgA 的浓度, 发现 SFB 定植在人体内后, 能显著促进肠道 sIgA 的分泌。这一现象符合单一定植 SFB 的动物模型实验, 证明 SFB 能促进 sIgA 的分泌。而 sIgA 是局部肠道黏膜免疫屏障重要功能分子, sIgA 抑制肠道内的细菌黏附肠道黏膜表面的

作用是通过黏膜内蠕动和绒毛清除来阻止黏膜与病原体的接触^[21]。SFB通过肠道定植和粘附于肠上皮细胞,尤其是潘氏小结,诱导和增强肠道IgA的分泌^[16]。而一旦IgA产生,即具有控制SFB生长的能力,但如肠道IgA缺乏,可促使SFB生长^[16,18]。所以SFB的定植,可通过调控肠道sIgA的分泌从而促进肠道黏膜免疫功能的成熟和功能的发挥。

哺乳动物在刚刚出生或无菌状态下,免疫系统主要依靠Th2细胞来应答,但暴露于肠道细菌后,可导致其他T淋巴细胞亚群的分化如Th1、Treg细胞和Th17细胞^[3,22-23]。例如脆弱拟杆菌定植后不仅可优化系统Th1/Th2的平衡,还可以诱导肠道Treg细胞分化^[24]。与其他共生菌区别的是:SFB粘附在无菌小鼠回肠末端肠上皮细胞后,可特异性地诱导Th17细胞生成,但不影响Th1或Treg细胞比例,且不侵犯上皮细胞,不穿透上皮细胞屏障,不引起肠道炎症^[22-23]。本研究通过免疫组化方法,测定SFB阳性及阴性儿童回肠末端黏膜IL-17A细胞、上皮内淋巴细胞数量,以及与Th1细胞、Th17细胞、Treg细胞等细胞分化相关的转录因子表达,发现SFB定植对回肠黏膜表面肠道上皮内淋巴细胞数量,以及与Th17细胞、Treg细胞、Th1细胞分化相关的转录因子的表达影响均不大。肠道上皮内淋巴细胞、Th1细胞及Th17细胞在肠道抗感染、抗肿瘤反应中发挥重要作用,特别是Th17细胞具有强大的致炎症潜能,是自身免疫性疾病的重要介导细胞^[25]。Treg细胞是一种具有免疫抑制作用和抗炎作用的细胞,可以减轻组织损伤T细胞对宿主的损伤,减轻过度的炎症反应。本研究发现,SFB阳性者并没有明显促进肠道上皮T细胞的分化,这与动物模型中的实验结果是有区别的^[22]。考虑SFB在动物中定植与在人类中定植对宿主的免疫功能影响可能是不同的,SFB在人类中定植对宿主T细胞的影响需要进一步研究。

本研究还发现,SFB阳性者回肠末端黏膜Th17细胞的分化相关的转录因子表达与阴性者无明显差异,但SFB定植组IL-17A细胞数量较未定植组IL-17A细胞数量明显减少,这与其他文献报道不同^[22,26]。我们推测Th17细胞是一群重要的介导炎症反应的细胞,分泌的细胞因子除了IL-17A外,还包括IL-17F,以及IL-21、IL-22、IL-6、TNF- α 等细胞因子,人与动物的Th17细胞产生的

相关因子可能是不一样的,人类肠道SFB定植后,Th17细胞分泌的细胞因子类型的变化需要进一步研究。

综上所述,本研究结果表明,儿童SFB肠道定植与年龄相关,随年龄增加呈降低趋势,其中3岁以内婴幼儿定植率较高;SFB阳性者肠道sIgA分泌增加,回肠末端IL-17A细胞数量减少;SFB肠道定植对儿童免疫功能的影响尚需进一步研究。

[参 考 文 献]

- [1] Human Microbiome Project Consortium. A framework for Human Microbiome Research[J]. *Nature*, 2012, 486 (7402): 215-221.
- [2] Chung H, Pamp SJ, Hill JA, et al. Gut immune maturation depends on colonization with a host-specific microbiota[J]. *Cell*, 2012, 149(7): 1578-1593.
- [3] Flannigan KL, Denning TL. Segmented filamentous bacteria-induced immune responses: a balancing act between host protection and autoimmunity[J]. *Immunology*, 2018, 154: 537-546.
- [4] Liao N, Yin Y, Sun G, et al. Colonization and distribution of segmented filamentous bacteria (SFB) in chicken gastrointestinal tract and their relationship with host immunity[J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 2012, 81(2): 395-406.
- [5] Ohashi Y, Hiraguchi M, Ushida K. The composition of intestinal bacteria affects the level of luminal IgA[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2006, 70(12): 3031-3035.
- [6] Yin Y, Wang Y, Zhu L, et al. Comparative analysis of the distribution of segmented filamentous bacteria in humans, mice, and chickens[J]. *ISME J*, 2013, 7(3): 615-621.
- [7] Caselli M, Tosini D, Gafa R, et al. Segmented filamentous bacteria-like organisms in histological slides of ileo-cecal valves in patients with ulcerative colitis[J]. *Am J Gastroenterol*, 2013, 108(5): 860-861.
- [8] Ge Z, Feng Y, Woods SE, et al. Spatial and temporal colonization dynamics of segmented filamentous bacteria is influenced by gender, age and experimental infection with *Helicobacter hepaticus* in Swiss Webster mice[J]. *Microbes Infect*, 2015, 17(1): 16-22.
- [9] Finotti A, Gasparello J, Lampronti I, et al. PCR detection of segmented filamentous bacteria in the terminal ileum of patients with ulcerative colitis[J]. *BMJ Open Gastroenterol*, 2017, 4(1): e000172.
- [10] Ericsson AC, Hagan CE, Davis DJ, et al. Segmented filamentous bacteria: commensal microbes with potential effects on research[J]. *Comp Med*, 2014, 64(2): 90-98.
- [11] Schnupf P, Gaboriau-Routhiau V, Gros M, et al. Growth and host interaction of mouse segmented filamentous bacteria in vitro[J]. *Nature*, 2015, 520(7545): 99-103.
- [12] Turnbaugh PJ, Ridaura VK, Faith JJ, et al. The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in

- humanized gnotobiotic mice[J]. *Sci Transl Med*, 2009, 1(6): 6ra14.
- [13] Jin S, Zhao D, Cai C, et al. Low-dose penicillin exposure in early life decreases Th17 and the susceptibility to DSS colitis in mice through gut microbiota modification[J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 43662.
- [14] Prakash T, Oshima K, Morita H, et al. Complete genome sequences of rat and mouse segmented filamentous bacteria, a potent inducer of Th17 cell differentiation[J]. *Cell Host Microbe*, 2011, 10(3): 273-284.
- [15] Szczesnak A, Segata N, Qin X, et al. The genome of Th17 cell-inducing segmented filamentous bacteria reveals extensive auxotrophy and adaptations to the intestinal environment[J]. *Cell Host Microbe*, 2011, 10(3): 260-272.
- [16] Suzuki K, Meek B, Doi Y, et al. Aberrant expansion of segmented filamentous bacteria in IgA-deficient gut[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(7): 1981-1986.
- [17] Brandzaeg P. Mucosal immunity: induction, dissemination, and effector functions[J]. *Scand J Immunol*, 2009, 70(6): 505-515.
- [18] Palm NW, de Zoete MR, Cullen TW, et al. Immunoglobulin A coating identifies colitogenic bacteria in inflammatory bowel disease[J]. *Cell*, 2014, 158(5): 1000-1010.
- [19] Klaasen HL, Van der Heijden PJ, Stok W, et al. A pathogenic, intestinal, segmented, filamentous bacteria stimulate the mucosal immune system of mice[J]. *Infect Immun*, 1993, 61(1): 303-306.
- [20] Talham GL, Jiang HQ, Bos NA, et al. Segmented filamentous bacteria are potent stimuli of a physiologically normal state of the murine gut mucosal immune system[J]. *Infect Immun*, 1999, 67(4): 1992-2000.
- [21] Lamm ME. Interaction of antigens and antibodies at mucosal surfaces[J]. *Annu Rev Microbiol*, 1997, 51: 311-340.
- [22] Farkas AM, Panea C, Goto Y, et al. Induction of Th17 cells by segmented filamentous bacteria in the murine intestine[J]. *J Immunol Methods*, 2015, 421: 104-111.
- [23] Atarashi K, Tanoue T, Ando M, et al. Th17 cell induction by adhesion of microbes to intestinal epithelial cells[J]. *Cell*, 2015, 163(2): 367-380.
- [24] Furusawa Y, Obata Y, Hase K. Commensal microbiota regulates T cell fate decision in the gut[J]. *Semin Immunopathol*, 2015, 37(1): 17-25.
- [25] Teng F, Klinger CN, Felix KM, et al. Gut microbiota drive autoimmune arthritis by promoting differentiation and migration of Peyer's patch T follicular helper cells[J]. *Immunity*, 2016, 44(4): 875-888.
- [26] Ivanov II. Microbe hunting hits home[J]. *Cell Host Microbe*, 2017, 21(3): 282-285.
- (本文编辑: 邓芳明)

· 消息 ·

本刊再度入选 CSCD 核心数据库

2019年4月29日,中国科学院文献情报中心发布了中国科学引文数据库(Chinese Science Citation Database, CSCD)2019~2020年来源期刊遴选结果,本刊再度入选CSCD核心数据库。衷心感谢各位编委、作者、读者对本刊的关心、支持与帮助!成绩的取得也将成为本刊进一步发展的动力,并时刻鞭策我们不忘初心,砥砺前行。

《中国当代儿科杂志》编辑部
2019年5月6日