

论著·临床研究

胆汁淤积性肝病婴儿粪便中细菌相关代谢产物短链脂肪酸水平的分析

李檬^{1,2} 刘四香³ 王明英³ 刘梅¹ 胡红卫^{1,2} 丁臻博¹ 黄永坤^{1,2}

(1. 昆明医科大学第一附属医院儿科, 云南 昆明 650032; 2. 云南省检验医学重点实验室, 云南 昆明 650032; 3. 昆明医科大学附属儿童医院, 云南 昆明 650034)

[摘要] **目的** 比较婴儿胆汁淤积性肝病(ICH)患儿和健康婴儿粪便中细菌相关代谢产物短链脂肪酸的差异,并探讨其临床意义。**方法** 选取诊断为ICH患儿30例,另选取健康婴儿30例为对照组。收集ICH患儿治疗前组、治疗后组和对照组的粪便标本。应用气相色谱技术定量测定各组婴儿粪便中短链脂肪酸包括乙酸、丙酸、丁酸、异丁酸、异戊酸的含量,并进行比较。**结果** 对照组、治疗前组、治疗后组的乙酸、丙酸浓度差异无统计学意义($P>0.05$),治疗后组丁酸浓度较治疗前组升高($P<0.05$)。对照组异丁酸、异戊酸浓度高于治疗前组及治疗后组($P<0.05$)。**结论** ICH患儿的肠道蛋白质代谢产物与正常婴儿存在差异,而碳水化合物代谢产物差异不显著。

[中国当代儿科杂志, 2019, 21(7): 676-679]

[关键词] 胆汁淤积性肝病; 粪便; 短链脂肪酸; 肠道菌群; 婴儿

Levels of short-chain fatty acids in enterobacteria-related metabolites in the feces of infants with cholestatic hepatopathy

LI Meng, LIU Si-Xiang, WANG Ming-Ying, LIU Mei, HU Hong-Wei, DING Zhen-Bo, HUANG Yong-Kun. Department of Pediatrics, First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650032, China (Huang Y-K, Email: hykkmyncnwd@163.com)

Abstract: Objective To compare the levels of short-chain fatty acids in enterobacteria-related metabolites in feces between infants with cholestatic hepatopathy and healthy infants. **Methods** Thirty infants with cholestatic hepatopathy were enrolled in this study as the disease group, while 30 healthy infants were enrolled as the control group. Fecal specimens were collected from the disease group before and after treatment and from the control group. Gas chromatography was used to quantitatively determine the content of short-chain fatty acids in the feces of both groups including acetic acid, propionic acid, butyric acid, isobutyric acid, and isovaleric acid. **Results** There were no significant differences in the concentrations of acetic acid and propionic acid between the control and disease groups before and after treatment, as well as no significant changes in the two markers in the disease group after treatment ($P>0.05$). The disease group had a significantly increased concentration of butyric acid after treatment ($P<0.05$). The concentrations of isobutyric acid and isovaleric acid in the control group were significantly higher than those in the disease group before and after treatment ($P<0.05$). **Conclusions** Intestinal protein metabolites in infants with cholestatic hepatopathy are significantly different from those in healthy infants, whereas there is no significant difference with respect to carbohydrate metabolites.

[Chin J Contemp Pediatr, 2019, 21(7): 676-679]

Key words: Cholestatic hepatopathy; Feces; Short-chain fatty acids; Intestinal bacteria; Infant

婴儿胆汁淤积性肝病(infantile cholestatic hepatopathy, ICH)是婴儿时期因肝胆系统疾病住院治疗患儿的首要病因。根据2017年北美小儿胃肠

病、肝病和营养学会及欧洲儿科胃肠病、肝病和营养学会的联合建议^[1],当婴儿的血清直接胆红素 >1.0 mg/dL(17 mmol/L)时,无论总胆红素是否增

[收稿日期] 2019-01-19; [接受日期] 2019-04-30

[基金项目] “十二五”云南省特色学科建设项目(云学位[2011]17号);云南省卫生内设研究机构项目(2014NS181)。

[作者简介] 李檬,女,博士研究生,主治医师。

[通信作者] 黄永坤,男,硕士,主任医师。Email: hykkmyncnwd@163.com。

高,都可诊断为胆汁淤积。在我国,ICH定义为:发生或起病于婴儿期,由多种病因如感染、遗传、代谢或发育障碍引起,兼具胆汁淤积和肝病两部分临床表现征象的一组疾病^[2]。肠道菌群参与消化道中碳水化合物、蛋白质和脂肪三大物质的代谢^[3],肠道短链脂肪酸(short chain fatty acids, SCFAs)是碳水化合物和蛋白质在肠道菌群作用下生成的终末产物^[4]。本研究对ICH患儿粪便中SCFAs(乙酸、丙酸、丁酸、异丁酸、异戊酸)含量进行测定与分析,深入探讨ICH与粪便中肠道菌群相关代谢产物SCFAs的关系,为今后诊治该疾病寻找更好的生物标记物。

1 资料与方法

1.1 研究对象及分组

选取2014年11月至2015年11月在昆明医科大学第一附属医院儿科及昆明医科大学附属儿童医院消化内科住院治疗,符合纳入标准的ICH患儿30例为研究对象,其中男16例(53%),女14例(47%),日龄 63 ± 18 d。收集ICH患儿入院未经治疗前的第1次粪便标本为治疗前组,收集治疗5~7 d后的粪便标本为治疗后组。所有ICH患儿均给予保肝、利胆治疗,用药为:熊去氧胆酸,5 mg/次,每日3次,口服;还原型谷胱甘肽,0.3 g/次,每日1次,静脉滴注。

纳入标准:(1)兼具胆汁淤积和肝病两部分临床征象,符合ICH诊断标准^[1-2]。胆汁淤积征象包括黄疸、粪便颜色改变、血清直接胆红素 >1.0 mg/dL(17 mmol/L)、血清总胆红素值增加、血清碱性磷酸酶和 γ -谷氨酰转肽酶值增加;肝病征象包括肝脏质地变硬或伴肝脏体积增大(超过锁骨中线右肋缘下2 cm)、血清丙氨酸氨基转移酶和/或门冬氨酸氨基转移酶值增高。(2)年龄在28~120 d间。(3)混合喂养,未添加辅食。(4)入院前2周内未应用过抗生素及益生菌制剂。(5)入院时无腹泻,大便常规检查正常。(6)云南本地人口。

对照组选取同期在昆明医科大学第一附属医院预防保健科体检的健康婴儿30例,其中男17例(57%),女13例(43%),日龄 62 ± 23 d。纳入标准:(1)年龄在28~120 d间。(2)混合

喂养,未添加辅食。(3)体检前2周内未应用过抗生素及益生菌制剂。对照组于体检时收集粪便标本。

ICH组与对照组性别构成($\chi^2=0.067$, $P=0.795$)、年龄构成($t=0.301$, $P=0.764$)差异均无统计学意义。本研究获得昆明医科大学医学伦理委员会批准,并取得家长知情同意。

1.2 标本收集和保存

用无菌粪便收集盒收集粪便标本,每次粪便标本收集后即冰袋填埋,2 h内保存到 -80°C 冰箱待检测和研究。

1.3 标本预处理

粪便预处理参照本课题组前期工作所总结的试验方法^[5],将0.2 g冻干粪便标本解冻,加入至0.5%氯化钠饱和的磷酸液1 mL中涡旋混匀,随后加入2 mL乙醚,间断摇动混匀。置高速离心机上4000 r/min离心10 min。以0.22 μm 的针式过滤器过滤上清液,后置色谱瓶待测。

1.4 粪便SCFAs的测定

使用气相色谱技术检测粪便SCFAs,所有SCFAs标准品均为德国Dr.Ehrenstorfer公司标准品。气相色谱仪使用美国瓦里安公司的456-GC气相色谱仪。色谱条件:色谱柱为KB624(30 m \times 0.32 mm \times 1.80 μm),载气为氮气,初始柱温 50°C ,保持5 min,以 $10^\circ\text{C}/\text{min}$ 的速度升温至 150°C ,保持10 min,以 $20^\circ\text{C}/\text{min}$ 的速度升温至 200°C ,保持12 min。检测器与进样口温度分别为 280°C 、 230°C ,分流比为20:1,进样量为1 μL 。

1.5 统计学分析

采用SPSS 17.0软件进行统计学分析,正态分布计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用独立 t 或配对 t 检验。偏态分布计量资料以中位数(四分位间距) $[M(P_{25}, P_{75})]$ 表示,组间比较采用Mann-Whitney U 检验或Wilcoxon配对秩和检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肠道菌群相关碳水化合物代谢产物的比较

ICH患儿治疗后组丁酸浓度高于治疗前组,差异有统计学意义($Z=-2.031$, $P=0.042$),余各组差异均无统计学意义($P > 0.05$),见表1。

表1 三组间乙酸、丙酸、丁酸比较

$[\bar{x} \pm s$ 或 $M(P_{25}, P_{75})$, mg/g]

组别	例数	乙酸	丙酸	丁酸
对照组	30	2.5 ± 1.6	0.91(0.12, 1.83)	0.27(0.03, 0.82)
治疗组				
治疗前组	30	3.0 ± 2.6	0.29(0.06, 0.78)	0.07(0.00, 0.62)
治疗后组	30	2.6 ± 2.5	0.23(0.09, 1.61)	0.29(0.00, 1.58) ^a

注: a 示与治疗前组比较, $P < 0.05$ 。

2.2 肠道菌群相关蛋白质代谢产物的比较

对照组粪便异丁酸、异戊酸浓度高于 ICH 治疗前组 (分别 $Z = -3.465$ 、 -3.592 , $P < 0.01$) 和治疗后组 (分别 $Z = -3.460$ 、 -2.343 , $P = 0.001$ 、 0.019), 差异均有统计学意义; 而异丁酸、异戊酸治疗前、后组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 2。

表2 三组间异丁酸、异戊酸比较

$[M(P_{25}, P_{75})$, mg/g]

组别	例数	异丁酸	异戊酸
对照组	30	0.0772(0.0036, 0.1798)	0.0498(0.0186, 0.0892)
治疗组			
治疗前组	30	0.0012(0.0000, 0.0156) ^a	0.0168(0.0126, 0.0218) ^a
治疗后组	30	0.0000(0.0000, 0.0143) ^a	0.0219(0.0126, 0.0437) ^a

注: a 示与对照组比较, $P < 0.05$ 。

3 讨论

ICH 是婴儿期最常见的肝脏疾病, 其研究一直备受关注, 国内对该病的研究热点集中在病因与鉴别诊断, 基因诊断是目前研究的关注点^[6], 而关于该病与肠道菌群、肠道菌群代谢产物间相关性的研究较匮乏。

近十年来, 越来越多的研究证实肠道菌群与胃肠道及胃肠道外疾病存在相关性, 如炎症性肠病、代谢性疾病、心血管疾病和过敏性疾病等^[7-9]。随着肠-肝轴概念的提出, 肠道菌群与肝脏通过肠道菌群代谢产物的双向交流, 在人体健康和各种肝脏疾病如脂肪肝、胆汁淤积性肝病中的作用备受关注, 这可能成为今后诊断、治疗和预防肝病的新靶点^[10]。SCFAs 是由 1~6 个碳原子组成的有机脂肪酸, 主要包括乙酸、丙酸、丁酸、异丁酸、异戊酸。其中乙酸、丙酸和丁酸为碳水化合物在肠道菌群作用下产生的代谢产物^[4], 是宿主肠上皮

细胞的能量来源, 能降低结肠 pH 值, 抑制有害菌生长, 调节宿主肠道免疫力, 降低结肠炎症反应, 在体内能够刺激大肠和小肠上皮细胞的生长, 增加肠道对营养物质的吸收, 还可以通过一系列复杂的机制调节基因表达进而影响机体能量平衡, 与结肠炎、肿瘤、肥胖、营养不良及肠道感染有密切关系^[11-14]。异丁酸和异戊酸属于支链 SCFAs, 为蛋白质代谢产物, 能调节电解质的吸收与分泌^[4], 其生物活性和功能还有待更深入的研究。

碳水化合物被肠道菌群酵解后产生的乙酸大部分被吸收进入门静脉, 是人体能量的重要来源, 约提供人体日总能量的 10%, 并对肝脏及骨骼肌中的糖原进行补充^[15]。本研究中, ICH 患儿治疗前、后组粪便的乙酸浓度均有高于对照组趋势, 但无统计学意义, 提示 ICH 导致的一系列病理生理改变和肠道菌群改变, 可能引起了肠道对乙酸的代谢能力改变和 / 或吸收减少, 该改变是否参与了 ICH 患儿营养不良的发生值得进一步研究。

丙酸可增强肠黏膜机械屏障功能, 减少炎症的氧化应激^[16]。丁酸为肠道上皮细胞的主要能量来源, 并调节肠上皮细胞中先天性和适应性免疫细胞的产生、运输和功能, 对肠黏膜屏障产生保护作用^[17]。本研究中, ICH 组患儿治疗前及治疗后组粪便中丙酸浓度较对照组降低, 治疗前组粪便丁酸浓度也较对照组降低, 虽未达统计学意义, 但提示该病可能通过肠道菌群影响丙酸和丁酸水平, 从而影响肠上皮细胞能量的供给、破坏肠黏膜屏障的完整性及影响炎症介质的释放, 进而影响 ICH 患儿的转归。经保肝利胆的对症治疗后, ICH 治疗后组患儿粪便丁酸浓度较治疗前组显著增高, 提示治疗后 ICH 患儿的肠道屏障功能好转。

ICH 患儿治疗前组粪便肠道菌群相关碳水化合物代谢产物乙酸、丙酸和丁酸浓度虽较对照组有改变趋势, 但差异均未达统计学意义, 可能与选择病例时为避免延误病情而排除了需外科手术干预者及肝功能衰竭需抢救治疗者, 入组病例病情相对平稳、上述代谢产物尚未发生显著变化有关, 也可能与观察病例数较少有关。

异丁酸及异戊酸分别由缬氨酸和亮氨酸发酵产生^[18], 是肠腔内蛋白质分解的标志物。本研究中, ICH 患儿治疗前组异丁酸、异戊酸浓度显著低于对照组, 治疗后组异丁酸及异戊酸浓度仍低于

对照组。ICH 患儿伴发的营养不良，原因包括疾病导致的异常消耗增多、肠道胆汁分泌不足导致的蛋白质及脂溶性维生素等营养素吸收障碍、肝功能损伤导致的肝脏对氨基酸、脂肪、碳水化合物的代谢能力低下等。ICH 患儿治疗前组异丁酸、异戊酸浓度减低，证实了患儿蛋白质的代谢吸收与对照组存在差异。而 ICH 患儿治疗后组异丁酸、异戊酸浓度较治疗前组未发生显著改变，但仍显著低于对照组，提示经治疗 ICH 患儿的蛋白质代谢吸收还未有效改善，一方面与治疗时间短疾病未完全恢复有关，另一方面提示应重视胆汁淤积性肝病的针对性营养治疗。人体内的酶不能降解蛋白质产生支链脂肪酸，肠道中的支链脂肪酸主要由肠道微生物对蛋白质进行无氧酵解所产生^[19]，本研究中粪便中异丁酸、异戊酸的改变提示 ICH 组肠道菌群与对照组存在差异，且治疗后肠道菌群尚未恢复正常。已有研究证实，ICH 患儿的肠道菌群与健康婴儿存在差异^[20]，值得对 ICH 患儿的肠道菌群改变进行更多深入研究。值得注意的是，除了产生 SCFAs 以外，肠道菌群还可以产生许多其他类别的代谢产物，如胆汁酸和氨基酸衍生物等^[21]。异丁酸、异戊酸等支链 SCFAs 有可能和胆汁酸等代谢产物一样，具有某些基本的信号功能。

综上所述，在排除喂养、地域的影响因素后，ICH 患儿的肠道蛋白质代谢产物与正常婴儿存在差异，而碳水化合物代谢产物差异不显著。测定 ICH 患儿粪便中 SCFAs 含量，分析其变化特点，有望把其作为关键的生物标记物靶点来判断病情和治疗效果，从而来促进 ICH 的转化医学研究。

[参 考 文 献]

[1] Fawaz R, Baumann U, Ekong U, et al. Guideline for the evaluation of cholestatic jaundice in infants: joint recommendations of the North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition and the European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition[J]. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2017, 64(1): 154-168.

[2] 董永绥. 婴儿胆汁淤积性肝病研究进展及展望[J]. *中国实用儿科杂志*, 2013, 28(4): 241-245.

[3] 胡红卫, 段江, 赵波, 等. 生物标记物粪便胆汁酸的测定在过敏性紫癜患儿诊治中的意义[J]. *中国当代儿科杂志*, 2016, 18(6): 517-521.

[4] Cummings JH, Pomare EW, Branch WJ, et al. Short chain

fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood[J]. *Gut*, 1987, 28(10): 1221-1227.

[5] 胡红卫, 潘媛, 赵波, 等. 过敏性紫癜患儿粪便细菌代谢相关产物短链脂肪酸水平测定及其意义[J]. *中国实用儿科杂志*, 2017, 32(7): 531-533.

[6] 廖琼, 万朝敏, 朱渝, 等. 婴儿胆汁淤积性肝病在中国的研究现状的可视化分析[J]. *中国当代儿科杂志*, 2017, 19(5): 529-533.

[7] McCoy KD, Ignacio A, Geuking MB. Microbiota and type 2 immune responses[J]. *Curr Opin Immunol*, 2018, 54: 20-27.

[8] Komaroff AL. The microbiome and risk for atherosclerosis[J]. *JAMA*, 2018, 319(23): 2381-2382.

[9] Zuo T, Kamm MA, Colombel JF, et al. Urbanization and the gut microbiota in health and inflammatory bowel disease[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2018, 15(7): 440-452.

[10] Adolph TE, Grander C, Moschen AR, et al. Liver-microbiome axis in health and disease[J]. *Trends Immunol*, 2018, 39(9): 712-723.

[11] Gonçalves P, Araújo JR, Di Santo JP. A cross-talk between microbiota-derived short-chain fatty acids and the host mucosal immune system regulates intestinal homeostasis and inflammatory bowel disease[J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2018, 24(3): 558-572.

[12] Sun M, Wu W, Chen L, et al. Microbiota-derived short-chain fatty acids promote Th1 cell IL-10 production to maintain intestinal homeostasis[J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 3555.

[13] 高晓琳, 万朝敏. 儿童肥胖症与肠道菌群相关性的研究进展[J]. *中国当代儿科杂志*, 2017, 19(3): 368-371.

[14] 王慧慧, 文飞球, 魏菊荣. 营养不良儿童肠道菌群状况研究进展[J]. *中国当代儿科杂志*, 2016, 18(11): 1188-1193.

[15] Fushimi T, Tayama K, Fukaya M, et al. Acetic acid feeding enhances glycogen repletion in liver and skeletal muscle of rats[J]. *J Nutr*, 2001, 131(7): 1973-1977.

[16] Tong LC, Wang Y, Wang ZB, et al. Propionate ameliorates dextran sodium sulfate-induced colitis by improving intestinal barrier function and reducing inflammation and oxidative stress[J]. *Front Pharmacol*, 2016, 7: 253.

[17] Kelly CJ, Zheng L, Campbell EL, et al. Crosstalk between microbiota-derived short-chain fatty acids and intestinal epithelial HIF augments tissue barrier function[J]. *Cell Host Microbe*, 2015, 17(5): 662-671.

[18] Smith EA, Macfarlane GT. Dissimilatory amino acid metabolism in human colonic bacteria[J]. *Anaerobe*, 1997, 3(5): 327-337.

[19] 谢洁玲, 史晓翀, 史姣霞, 等. 人肠道微生物对海带岩藻聚糖硫酸酯及其寡糖的降解利用[J]. *海洋与湖沼*, 2017, 48(1): 50-56.

[20] Guo C, Li Y, Wang P, et al. Alterations of gut microbiota in cholestatic infants and their correlation with hepatic function[J]. *Front Microbiol*, 2018, 9: 2682.

[21] Koh A, De Vadder F, Kovatcheva-Datchary P, et al. From dietary fiber to host physiology: short-chain fatty acids as key bacterial metabolites[J]. *Cell*, 2016, 165(6): 1332-1345.

(本文编辑: 王颖)