

• 临床检验研究论著 •

定量分析肠道细菌总数及其与 2 型糖尿病的关系*

张立平,葛才保,张 力,陈六生,王书华

(南京市溧水区人民医院/皖南医学院教学医院检验科,江苏南京 211200)

摘 要:目的 研究肠道细菌总数与 2 型糖尿病之间的相关性。方法 以肠道细菌的葡萄糖消耗为定量依据,计算出肠道细菌总数,比较对照组、糖尿病前期组、2 型糖尿病(T2DM)组间肠道细菌葡萄糖消耗量的差异,分析其与糖尿病发生的关系。结果 对照组、糖尿病前期组、T2DM 组肠道细菌总数分别为 $(6.25\sim 8.77)\times 10^{10}/g$ 、 $(4.87\sim 7.26)\times 10^{10}/g$ 、 $(2.79\sim 5.09)\times 10^{10}/g$,肠道细菌数量与胰岛素抵抗指数呈负相关($r=-0.95$)。结论 肠道细菌总数减少与 2 型糖尿病的发生密切相关。

关键词:肠道细菌; 糖尿病,2 型; 葡萄糖

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.16.012

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)16-2091-02

Quantitative analysis of the total number of intestinal bacteria and its relationship with type 2 diabetes*

Zhang Liping, Ge Caibao, Zhang Li, Chen Liusheng, Wang Shuhua

(Department of Clinical Laboratory, Lishui District People's Hospital of Nanjing City/Southern Anhui Medical School Teaching Hospital, Nanjing, Jiangsu 211200, China)

Abstract: **Objective** To study the correlation between the total number of intestinal bacteria and type 2 diabetes mellitus. **Methods** The quantitative analysis was based on the amount of glucose consumption in bacterial culture. The total number of intestinal bacteria was calculated. The amount of glucose consumption was compared between groups, including control group, pre-diabetes group, and type 2 diabetes mellitus group. Its correlation with type 2 diabetes mellitus were analyzed. **Results** The number of intestinal bacteria in the control group, pre-diabetes group, type 2 diabetes mellitus group were $(6.25\sim 8.77)\times 10^{10}/g$, $(4.87\sim 7.26)\times 10^{10}/g$, $(2.79\sim 5.09)\times 10^{10}/g$, respectively, and negatively correlated with diabetes resistance index. **Conclusion** The total number reduction of intestinal bacteria is closely related to the incidence of type 2 diabetes.

Key words: enteric bacteria; diabetes mellitus, type 2; glucose

肠道细菌通过影响机体的能量吸收和代谢平衡,与肥胖和 2 型糖尿病(T2DM)的流行密切相关^[1-3]。已有的研究主要关注了肠道细菌各种属比例和疾病的相关性,但对肠道细菌总数变化、肠道细菌和 T2DM 发病机理的内在联系还需要进一步研究。本研究通过比较健康体检者、糖尿病前期人群、T2DM 患者间肠道细菌总数,及其他相应的临床生化检测指标,分析了肠道细菌总数和 T2DM 发生的相关性。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取于本院进行健康体检的人群为研究对象,排除腹泻、便秘、近期抗菌药物使用者,活菌制剂使用者,及心、脑、血管、肝、肾疾病者,抗糖尿病治疗者。对年龄、肥胖因素进行匹配,差异无统计学意义($P>0.05$)。将 $FPG\leq 6.0$ mmol/L,餐后 2 h 血糖(2hPG) ≤ 8.0 mmol/L,空腹胰岛素(FINS)正常的健康体检者作为对照组(130 例);依据美国糖尿病学会糖尿病前期标准^[4],将 $FPG: 6.1\sim 7.0$ mmol/L,2hPG ≤ 11.0 mmol/L 的体检者作为糖尿病前期组(前期组,51 例);根据 T2DM 诊断标准,将 $FPG> 7.0$ mmol/L 或/和 2hPG ≥ 11.0 mmol/L 作为 T2DM 组(51 例)。

1.2 方法

1.2.1 各种指标的测定和计算 常规测量研究对象的身高、体质量,计算体质指数(BMI)。正常饮食 1 周后空腹静脉取血,测定 FPG, FINS、TC、TG、HDL-C、LDL-C、糖化血红蛋白(HbA1c),及餐后 2 h 后采血测定 2hPG。留取新鲜粪便作肠道细菌总数测定。依据 FPG 和空腹胰岛素,计算胰岛素抵抗

指数(HOMA-IR)。葡萄糖试剂也同时用于培养液葡萄糖测定,葡萄糖消耗量=培养液原始葡萄糖量-培养后葡萄糖剩余量(mmol/L)。

1.2.2 肠道细菌定量分析方法 依据细菌培养过程中葡萄糖消耗不可逆原理,定量分析培养液细菌培养前后的葡萄糖浓度。肠道细菌经 37℃ 培养 5 h 后,计算葡萄糖消耗量,而葡萄糖消耗量与样本细菌含量呈正相关 $Y=82.475X^{2.1492}$, $r^2=0.9325$ ^[5]。

1.3 仪器与试剂 HITAICHI 7600 生化分析仪,配套 CEN-TRONIC 葡萄糖、TC、TG、HDL-C、LDL-C 等试剂用于血液相关项目测定。Abbott i2000 免疫发光分析仪及其配套试剂用于胰岛素测定。糖化血红蛋白分析仪(英国 DREW DS5)用于糖化血红蛋白测定。细菌培养采用生物梅里埃 ATBTMMedium(批号:866960601)培养液。

1.4 统计学处理 统计分析采用统计软件包 SPSSV13.0,计量数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组内数据作配对 t 检验,组间数据的比较采用非独立样本 t 检验,检测指标间的相关性采用 Person 相关分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 常规生化及临床指标的比较 见表 1, TG 水平:前期组高于对照组($P<0.01$), T2DM 组高于对照组($P<0.01$), T2DM 组和前期组比较,差异无统计学意义($P>0.05$); HDL-C 水平:前期组低于对照组($P<0.05$), T2DM 组低于对照组($P<0.05$), T2DM 组低于前期组($P<0.05$); BMI:前期组高于对

* 基金项目:南京市科技局基金资助项目(201106017)。作者简介:张立平,男,医师,主要从事临床生物化学检验研究。

照组($P<0.01$),T2DM 组高于对照组($P<0.01$),T2DM 组高于前期组($P<0.05$)。其余指标组间两两比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.2 葡萄糖消耗量、肠道细菌数量与糖尿病相关检测指标的关系 细菌培养液葡萄糖原始浓度为 14.0 mmol/L,根据葡萄

糖消耗量计算肠道细菌数量,见表 2。FPG 水平:由高到低依次为 T2DM 组、前期组、对照组,两两比较差异均有统计学意义($P<0.01$)。HBA1C、2hPG、FINS、HOMA-IR、葡萄糖消耗量各组间两两比较,差异均有统计学意义($P<0.01$)。HOMA-IR 和葡萄糖消耗量呈负相关($r=-0.95$)。

表 1 3 组研究对象常规生化及临床指标的比较(±s)

分组	n	性别(男/女)	年龄(岁)	TC(mmol/L)	TG(mmol/L)	HDL-C(mmol/L)	LDL-C(mmol/L)	BMI(kg/m ²)
对照组	130	60/70	56.57±12.39	5.10±0.87	1.62±0.83	1.41±0.50	3.07±0.72	23.24±2.24
前期组	51	31/20	59.96±9.00	5.33±0.85	2.07±0.98	1.20±0.30	3.17±0.71	24.36±2.56
T2DM 组	51	37/14	55.78±8.09	5.37±0.81	2.16±1.01	1.03±0.22	3.25±0.87	25.48±2.72

表 2 3 组研究对象的糖尿病相关检测指标、葡萄糖消耗量及肠道细菌数量(±s)

分组	n	FPG (mmol/L)	HBA1c (%)	2hBG (mmol/L)	FINS (mU/L)	HOMA-IR	葡萄糖 剩余量	葡萄糖 消耗量	肠道细菌 数量(×10 ¹⁰ /g)
对照组	130	5.49±0.35	5.32±0.41	7.42±0.52	7.02±1.12	1.71±0.41	5.87±0.64	8.13±0.64	6.25~8.77
前期组	51	6.46±0.29	6.71±0.68	8.69±0.91	10.21±1.35	2.93±0.87	6.65±0.68	7.35±0.68	4.87~7.26
T2DM 组	51	8.66±1.25	8.98±1.01	13.21±2.24	14.45±1.65	5.56±1.12	8.02±0.83	5.98±0.83	2.79~5.09

3 讨 论

以大肠杆菌为主的多种肠道细菌在生长、繁殖过程中能释放大量细胞内 ATP 到细胞外而形成细胞外腺苷三磷酸(eATP),进而促进葡萄糖、脂肪酸等物质的细胞膜转运,血浆 eATP 的来源之一是肠道菌群释放^[6-7]。eATP 不足会导致葡萄糖转运障碍、胰岛素效应下降、胰岛素抵抗、机体多细胞功能障碍、多激素分泌异常。本文通过照组、前期组、T2DM 组间的比较分析,进一步阐明了肠道细菌数量下降会导致 eATP 不足,进而引起的细胞膜转运障碍在 T2DM 发病机理中具有重要作用。

美国一个研究组将相同饲料提供给无菌小鼠和肠道定植正常菌群的普通小鼠,结果普通小鼠身体脂肪总量增加 42%,而每天食物消耗却减少了 29%。后续实验又将正常小鼠的肠道菌群重新移植到无菌小鼠肠道内,结果发现食物摄入量比移植前减少,但 14 d 内小鼠体内脂肪反而增加了 60%,并产生胰岛素抵抗,结论是肠道菌群的出现产生了胰岛素抵抗^[8]。本文结果与该报道相反,肠道细菌数量下降导致胰岛素抵抗的发生。Musso 等^[9]认为肠道菌群对肥胖、T2DM 的作用,不光是肠道菌群造成脂肪的过量吸收,还与肠多肽、胰高血糖素样多肽的分泌相关,与内毒素致低烈度炎症相关,并建议开展更多的肠道菌群与细胞功能的相关研究。Harris 等^[10]分析了近期 100 多项肠道菌群和代谢性疾病的重要研究,对文献[8]的研究结论提出疑问,认为个别肠道菌群与代谢性疾病的关系并不确切,肠道菌群与疾病相关性的潜在机制可能在肠道细菌总数的变化上。无菌小鼠移植正常肠道菌群实验中,因为肠壁定植菌群不能在短时间内完全移植,完全可能存在肠道菌群的数量不足问题。因肠道细菌数量不足,释放 ATP 减少,血浆 eATP 不足,细胞膜转运障碍导致胰岛素抵抗。本文结果表明足够量的肠道菌群释放足够量 eATP,既保证肠道吸收过程中细胞膜转运对 eATP 需求,也能满足机体细胞利用葡萄糖、脂肪酸等物质的细胞膜转运过程中的 eATP 需求,只有足量肠道菌群释放足量 eATP 才能阻止葡萄糖、脂肪酸在细胞外的堆积,所以肠道细菌总数下降是 T2DM 发生的重要原因。

已有一些文献报道了肠道菌群会影响机体细胞功能,Clarke 等^[11]发现小鼠在无菌或使用抗菌药物情况下,体内免

疫细胞功能下降,如将无菌小鼠重新置于含有正常菌群的环境中就可以使其恢复免疫功能。陶祝华等^[12]发现通过链脲佐菌素(STZ)建模的大鼠胰腺 β 细胞内质网扩张、线粒体空泡化、酶原颗粒减少、颗粒外晕扩大等结构性改变。杨晓庆等^[13]用 STZ 建立的 T2DM 小鼠模型粪便中的乙酸、丙酸和正丁酸等肠道菌群代谢产物明显低于正常对照组,表明建模过程中肠道菌群受到抑制,与 T2DM 发病机理密切相关。Zhao^[14]研究发现,T2DM 动物模型的肠道乳酸杆菌数量明显下降,硬壁菌门和梭菌的比例也明显下降。

高脂饮食诱导的 T2DM 也存在肠道菌群受到抑制因素,Kankaanpää 等^[15]发现不饱和脂肪酸普遍具有抗菌活性,能够抑制肠道菌群的生长、繁殖;亚麻酸、花生四烯酸、二十二碳六烯酸对乳酸杆菌等多种肠道菌群具有抑制作用,并影响肠道菌群在肠腔黏膜表面的黏附。Patrone 等^[16]也证实高脂饮食能够降低肠道乳酸杆菌等菌群数量。Peng 等^[17]研究表明,脂类物质的异常分布,导致细胞内内质网逆境,与胰岛素抵抗密切相关。本研究表明,血脂水平与肠道细菌数量呈负相关,高脂饮食与 T2DM 发生正相关。肠道菌群组成极为复杂,Bäckhed 等^[18]通过 16S rRNA 序列测定表明,在 1 822 种肠道菌群中有 1 689 种细菌不能通过培养获得。肠道各段的肠道菌群组成也各不相同,在小肠段主要以需氧菌和革兰氏阳性菌为主,厌氧性细菌如类杆菌、双歧杆菌等主要在回肠末端出现^[19]。所以,虽然本文进行的是需氧菌的定量分析,但更能代表肠道吸收段的实际菌群状况,对微球菌、厌氧菌、肠壁定植菌等的研究还需深入进行。

参考文献

[1] Serino M, Luche E, Chabo C, et al. Intestinal microflora and metabolic diseases[J]. Diabetes Metab, 2009, 35(4): 262-272.
[2] Murphy EF, Cotter PD, Healy S, et al. Composition and energy harvesting capacity of the gut microbiota: relationship to diet, obesity and time in mouse models[J]. Gut, 2010, 59(12): 1635-1642.
[3] Greiner T, Bäckhed F. Effects of the gut microbiota on obesity and glucose homeostasis[J]. Trends Endocrinol Metab. (下转第 2094 页)

测 AFU、AFP 可提高原发性肝癌异常检出率。

表 2 各组血清 AFU、AFP 单独及联合检测的异常检出率(%)

组别	n	AFU	AFP	AFP+AFU
原发性肝癌组	68	77.5	70.4	83.2
肝脏良性病变组	79	14.8	23.8	39.6
肝外恶性肿瘤组	72	21.2	31.7	47.2
健康对照组	100	8.3	14.6	24.9

3 讨 论

原发性肝癌患者血清 AFU 水平增高^[2],血清 AFU 水平与肿瘤大小不相关,更常表达于原发性肝癌早期。同时,它的表达水平与血清 AFP 表达水平没有相关性。原发性肝癌患者血清 AFU 水平升高的机制,目前尚无准确定论。有学者认为肝癌时伴随肿瘤蛋白质的合成,AFU 合成增加并大量释放入血,以及含岩藻糖的糖蛋白和糖脂的代谢紊乱有关^[3]。但另有研究者发现肝癌组织 AFU 活性反而小于肝癌旁组织和正常组织^[4]。也有研究者认为,肝癌细胞产生了一种 AFU 抑制剂,使其对底物水解能力下降,引起底物堆积及 AFU 代偿性增高^[5]。本研究显示原发性肝癌组血清 AFU 水平明显高于健康对照组,同时 AFU 在原发性肝癌中有较高的异常检出率。

有研究表明肝癌患者血清 AFP 水平变化的速度以及程度与肿瘤组织的恶性程度高低有一定的相关性^[6-7]。一般而言,良性肝病患者血清 AFP 水平增高是一过性的,但是恶性肿瘤则会出现进行性升高,所以动态观察血清 AFP 水平既可鉴别良、恶性肝病,又可早期诊断肝癌。本研究显示原发性肝癌组患者血清 AFP 水平明显高于健康对照组,且其异常检出率也较高。然而并非所有的原发性肝癌癌细胞都分泌这种标志蛋白,大约有 40%左右原发性肝癌早期患者能正常表达此种蛋白,而受到肝癌细胞分化程度等因素的影响,血清 AFP 诊断肝

癌的敏感性较低^[8-10]。所以单独依靠血清 AFP 诊断原发性肝癌很容易造成漏诊和误诊。为了提高肿瘤标志物在原发性肝癌中的检出率,特别是在早期可治疗阶段的肝癌,应探寻新的对原发性肝癌的诊断敏感度较高的肿瘤标志物。本研究中,血清 AFU 和 AFP 联合检测可使原发性肝癌患者异常检出率达到 83.3%,比单独检测血清 AFU 或者 AFP 都高。所以联合检测血清 AFP 和 AFU 有助于对原发性肝癌的早期诊断和提高其异常检出率。

参考文献

[1] 陆再英,终南山.内科学[M].7版.北京:人民卫生出版社,2008:457-462.

[2] 尹琰,赵宗豪.血清 AFU 和 AFP 联合检测对原发性肝癌诊断的临床价值[J].安徽医学,2010,31(3):211-212.

[3] 韦仕高,韦霞,韦忠理.血清肿瘤标志物联合检测对原发性肝癌的诊断价值[J].现代预防医学,2010,37(13):2598-2599.

[4] 陆文杰. AFP、AFU 与 SF 三者联检在原发性肝癌诊断中的应用[J].齐齐哈尔医学院学报,2010,31(18):2891.

[5] 杨晓虹,许海生.原发性肝癌血清 AFP 与 AFU 组合检测的必要性研究[J].中国实用医药,2010,05(22):106-107.

[6] 王菊英,陈丽萍,雷静月.血清 AFP、CEA、SF、AFU 联检在肝癌诊断中的意义[J].放射免疫学杂志,2007,20(1):48-49.

[7] 武昌,朱崇云,李强. PHC 患者血清 AFP AFU SF 联合检测的意义[J].山东医学高等专科学校学报,2005,27(4):267-269.

[8] 李小月,李宗光,沈继龙.血清 α -L-岩藻糖苷酶和甲胎蛋白在原发性肝癌中的临床应用[J].安徽医学,2011,32(7):924-925.

[9] 黄义强,刘斌.血清甲胎蛋白、碱性磷酸酶、 α -L-岩藻糖苷酶和 γ -谷氨酰转氨酶对原发性肝癌的诊断价值[J].中外健康文摘,2012,09(25):169-170.

[10] 雷鸣,黄吉敢,胡超杰.原发性肝癌患者血清酶类指标变化的临床价值[J].陕西肿瘤医学,2010,18(4):765-767.

(收稿日期:2013-05-13)

(上接第 2092 页)

2011,22(4):117-123.

[4] Colagiuri S. Epidemiology of prediabetes[J]. Med Clin North Am, 2011,95(2):299-307.

[5] 王书华,葛才保.葡萄糖消耗定量分析法在粪便肠道菌群总数检测中的应用[J].国际检验医学杂志,2012,33(8):969-970.

[6] 葛才保.以细胞膜转运理论分析 2 型糖尿病发病机理[J].实用糖尿病杂志,2011,7(4):11-13.

[7] 葛才保,陈六生,张力.细胞外三磷酸腺苷在细胞膜物质转运中的作用机制与 2 型糖尿病和肿瘤的病因研究[J].国际检验医学杂志,2010,31(1):75-76.

[8] Bäckhed F,Ding H,Wang T,et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage[J]. Proc Natl Acad Sci U S A,2004,101(44):15718-15723.

[9] Musso G,Gambino R,Cassader M. Obesity, diabetes, and gut microbiota: the hygiene hypothesis expanded[J]. Diabetes Care, 2010,33(10):2277-2284.

[10] Harris K,Kassis A,Major G,et al. Is the gut microbiota a new factor contributing to obesity and its metabolic disorders[J]. J Obes,2012,2012:879151.

[11] Clarke TB,Davis KM,Lysenko ES,et al. Recognition of peptidoglycan from the microbiota by Nod1 enhances systemic innate immunity[J]. Nat Med,2010,16(2):228-231.

[12] 陶祝华,任晓丽,周燕,等.肠道菌群重构 II 型糖尿病大鼠胰腺细胞线粒体电镜观察[J].中国卫生检验杂志,2011(3):540-542.

[13] 杨晓庆,李琳琳,王烨.小鼠肠道菌群代谢产物与糖尿病的相关性研究[J].中国微生态学杂志,2011,23(2):134-136,140.

[14] Zhao L. Genomics: the tale of our other genome[J]. Nature,2010,465(7300):879-880.

[15] Kankaanpää PE,Salminen SJ,Isolauri E,et al. The influence of polyunsaturated fatty acids on probiotic growth and adhesion[J]. FEMS Microbiol Lett,2001,194(2):149-153.

[16] Patrone V,Ferrari S,Lizier M,et al. Short-term modifications in the distal gut microbiota of weaning mice induced by a high-fat diet[J]. Microbiology,2012,158(Pt 4):983-992.

[17] Peng G,Li L,Liu Y,et al. Oleate blocks palmitate-induced abnormal lipid distribution, endoplasmic reticulum expansion and stress, and insulin resistance in skeletal muscle[J]. Endocrinology,2011,152(6):2206-2218.

[18] Bäckhed F,Ley RE,Sonnenburg JL,et al. Host-bacterial mutualism in the human intestine[J]. Science,2005,307(5717):1915-1920.

[19] 徐志毅.肠道正常菌群与人体关系[J].微生物学通报,2005,32(3):117-120.

(收稿日期:2013-04-08)