

· 综 述 ·

特殊的器官移植——粪菌移植治疗难辨梭状芽孢杆菌相关性腹泻

陶 林¹, 陈东风², 饶贤才^{3△}(1. 第三军医大学学员旅 17 队, 重庆 400038; 2. 第三军医大学大坪医院野战外科研究所
消化内科, 重庆 400042; 3. 第三军医大学基础部微生物学教研室, 重庆 400038)**关键词:**粪菌移植; 难辨梭状芽孢杆菌; 腹泻; 治疗

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2013.18.042

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)18-2159-03

难辨梭状芽孢杆菌相关性腹泻 (clostridium difficile-associated diarrhea, CDAD) 是由难辨梭状芽孢杆菌感染 (clostridium difficile infection, CDI) 引起的腹泻, 病理表现为结肠黏膜的急性渗出坏死性炎症, 在受累黏膜常有一层伪膜形成, 又称伪膜性肠炎 (pseudomembranous colitis, PMC), 是抗菌药物相关性腹泻中的一个严重亚型。近年来, 随着抗菌药物的广泛使用以及人口的老齡化, CDAD 的发病率及严重程度在全球范围内呈上升趋势^[1], 在美国、加拿大和欧洲甚至出现暴发流行^[2]。由于难辨梭状芽孢杆菌多重耐药性的出现, 使标准化的抗菌药物治疗往往易出现复发。在国外, 粪菌移植 (fecal microbiota transplantation) 治疗 CDAD 已取得良好效果, 而在中国对于粪菌移植的临床应用尚未被广泛认可。本文就粪菌移植治疗 CDAD 进行综述。

1 CDAD 的发病机制及其危险因素

难辨梭状芽孢杆菌属革兰阳性专性厌氧菌, 为条件性致病菌, 主要毒力因子为毒素 A 和毒素 B。毒素 A 为肠毒素, 通过激活炎症细胞释放炎症介质和细胞因子, 引起局部黏膜血管通透性增加、黏液分泌、炎症细胞浸润甚至黏膜坏死; 毒素 B 为细胞毒素, 可刺激单核细胞释放促炎性细胞因子, 造成局部变态反应使黏膜变性坏死, 纤维素、黏蛋白渗出形成伪膜, 且毒素 B 对肠道的损伤作用是毒素 A 的 10 倍。CDAD 常发生于抗菌药物长期应用后期, 正常肠道菌群中敏感菌数量减少, 而耐药难辨梭状芽孢杆菌因失去其他细菌的拮抗作用而大量繁殖, 造成菌群失调, 进而诱发 CDAD, 其危险性的高低与抗菌药物的使用频率、强度和时间的长短有关^[3]。接受胃肠道手术或操作、麻醉、伴有严重心肺疾病、尿毒症、恶性肿瘤接受化疗、接受脏器移植治疗、妊娠、糖尿病、ICU 患者、高龄、长期住院以及接受质子泵抑制剂治疗等均为 CDAD 发生的危险因素^[4-7]。

2 CDAD 的治疗现状

2.1 对症支持治疗 诊断为 CDAD 患者, 应立即停用抗菌药物, 若因疾病需要不能停药时, 则应选用针对性强的窄谱抗菌药物, 同时应避免使用抑制肠蠕动的药物, 如阿托品、洛派丁胺、麻醉止痛剂等, 防止毒素聚集于肠腔而加重疾病。对重症患者给予对症支持治疗, 如纠正水、电解质紊乱, 有休克表现则应及时给予抗休克治疗。

2.2 抗菌药物治疗 甲硝唑和万古霉素至今仍为治疗 CDAD 的主要抗菌药物, 随着甲硝唑治疗 CDAD 的无效率逐年升高^[8-11], 美国食品与药物管理局将万古霉素作为治疗 CDAD 的惟一药物^[12], 且对于复发性 CDAD, 万古霉素治疗后再次复发

的风险性也将提高^[13]。因此, 对于 CDAD 的治疗, 抗菌药物的应用成为越来越棘手的问题。

2.3 微生态制剂 CDAD 通常为肠道菌群失调的结果, 而微生态制剂有助于肠道正常菌群的恢复, 对于治疗 CDAD 有很大帮助。且世界胃肠病学组织于 2011 年发表益生菌应用指南称干酪乳杆菌能有效预防 CDAD 的发生^[14]。

2.4 中医治疗 中医认为抗菌药物的不合理使用是 CDAD 的诱因, 治疗上主要采用温中、固涩、健脾、分利的原则。且大黄、丹参、黄芪等对 CDAD 均有一定疗效^[15]。但对于 CDAD 的治疗仍存在较多局限性。

3 粪菌移植治疗 CDAD

3.1 粪菌移植 粪菌移植近年来是临床治疗 CDAD 的最新方案, 是将健康人粪便中的功能菌群移植到患者胃肠道内, 重建具有正常功能的肠道菌群。肠道菌群与宿主的关系密切, 近年来, 肠道微生物群被认为是人体另一个“隐藏器官”已逐渐达成共识。粪菌移植被定义为一种特殊的器官移植, 且人类菌群是人类可以真正共享而不会发生免疫排斥问题的器官。在国外, 粪菌移植可追溯到 1958 年, 4 例患有严重伪膜性肠炎经抗生素、氢化可的松、益生菌等治疗后仍有严重腹泻, 最后决定试用患者健康家属的大便制成粪水对患者进行灌肠, 结果 3 例患者几天之内康复出院, 另 1 例死于非肠道感染疾病^[16]。之后 20 年内则无人重视该疗法, 直至 1978 年, 与抗菌药物使用密切相关的 CDI 被认为是发生伪膜性肠炎的主要原因, 粪菌治疗才逐渐得到重视^[17-18], 近 3 年为粪菌移植发展最快的时期。2012 年, Brandt 等^[19] 研究报道, 粪菌移植治疗 CDI 总治愈率高达 98%, 而且 91% 患者通过 1 次移植即可治愈。在国内, 粪水治疗疾病起源于明朝李时珍《本草纲目》中的记载, 后出于粪便为污秽之物的认知, 该疗法逐渐淡出人们视野, 迄今鲜有报道。菌群移植的目的是在菌群失调后重新建立肠道菌群的正常组成, 并刺激肠黏膜产生获得性和体液性免疫。有研究表明, CDI 患者肠道内保护性微生物减少, 但通过粪菌移植后, 其菌群的组成与供粪者类似, 症状也迅速消失^[20]。van Nood 等^[21] 研究发现, 十二指肠粪菌灌注治疗 CDI 效果明显优于万古霉素。粪菌移植治疗 CDAD 疗效明确, 移植的正常人类菌群改善了患者肠道的菌群失衡, 但其治疗的机制尚不清楚。

3.2 粪菌移植具体方案 到目前为止, 由于没有完整的随机实验证明粪菌移植的疗效性及安全性, 因而还没有其临床应用的标准方案。但一些感染病及胃肠病学专家给出了一个建议的实践指南, 介绍如下^[22]。

3.2.1 粪菌移植的主要适应证 (1)复发性 CDI——复发 3 次以上轻至中度 CDI,使用万古霉素递减法治疗 6~8 周无效,或者复发 2 次以上需住院治疗的重度 CDI;(2)标准治疗 1 周无效的轻至中度 CDI;(3)标准治疗 48 h 无效的重度或爆发性难辨梭状芽孢杆菌结肠炎。

3.2.2 粪菌供者筛选 因肠道菌群不断地有来自于周围环境的细菌加入,故供者应与受者具有相同的生活环境,最好是日常生活中经常接触的人。目前,多选患者家属或亲密的人。在进行粪菌移植前,医师对供粪者必须进行详细的病史采集及相关检查,但并不是所有疾病都可以检测出来,尤其是在疾病的初发阶段或窗口期。同时,供粪者的血液及粪便都必须进行传染性疾病的筛查,如 HIV、肝炎、梅毒、寄生虫、难辨梭状芽孢杆菌等。接受移植患者有权利在移植前对自身进行传染病的检测,进而避免粪菌移植后其他医疗问题的产生。对筛查结果呈阳性的需再次测试验证。

3.2.3 粪菌移植前准备及粪菌液的制备 粪菌移植前需取得供粪者及接受者的知情同意。粪菌供者准备工作:(1)避免进食对患者可能造成过敏的食物;(2)报告任何感染的症状和体征;(3)移植的前 1 d 晚上口服渗透性缓泻剂(氢氧化镁合剂,乳果糖)。接受粪菌移植患者的准备:(1)粪菌移植 3 d 前停用口服万古霉素和甲硝唑;(2)移植前晚用聚乙二醇进行肠道准备;(3)在移植前 1 d 晚上及当天早晨分别口服 20 mg 奥美拉唑(通过上消化道移植);(4)移植当天口服洛哌丁胺(经下消化道移植)。粪菌液制备:收集 6 h 内的新鲜粪便样本,经生理盐水或 4% 牛奶混匀后过滤。

3.2.4 移植途径 移植途径的选择主要依赖于患者的临床实际情况。(1)上消化道途径:将鼻胃管、鼻空肠管或内窥镜插入上消化道,用注射器抽取 25~50 mL 粪菌悬浮液推注,并用 25 mL 生理盐水进行冲洗,管道拔出后患者即可回家并进行正常的饮食。该途径相较于结肠镜更容易实现、花费更少,且无肠穿孔的风险性。缺点是粪菌悬液有可能不能到达结肠远端部位,尤其合并有肠道梗阻的患者。同时,对于年龄较大的患者,由于其胃酸的减少,增加了细菌过度生长的风险性。(2)下消化道途径(结肠镜、保留灌肠):结肠镜灌注途径目前被认为是粪菌移植的一线方法。签署知情同意书及麻醉后,患者行常规结肠镜检查,必要时也可进行活检,注射器吸取 20 mL 左右粪菌悬浮液从结肠镜活检通道注入后缓慢退镜,每退镜 5~10 cm 灌注 1 次,总共灌注量为 250~500 mL。患者在粪菌移植后 30~45 min 内应避免排便。该途径能够使粪菌悬液灌注至整个结肠,但对中毒性巨结肠患者经结肠镜移植时容易发生肠穿孔。用标准的灌肠包可以使患者在家中保留灌肠,其缺点为每 3~5 d 需灌注 1 次,同时由于粪液回漏可能引起患者不适,粪菌悬液常常只能到达脾曲,而盲肠、升结肠和横结肠无粪菌悬液,可能会影响疗效。

3.2.5 疗效评价 如果患者症状消失且在 8 周内无复发则认为粪菌移植治疗成功。对于无症状患者不推荐进行难辨梭状芽孢杆菌的检测,因为该菌也可在人体内定植而不引发疾病。对于粪菌移植无效的患者该如何进一步治疗目前并未达成共识,可进行口服万古霉素治疗或用其他供者粪菌进行再次灌注。

参考文献:

[1] Aslam S, Musher DM. An update on diagnosis, treatment,

and prevention of clostridium difficile-associated disease [J]. *Gastroenterol Clin North Am*, 2006, 35(2): 315-335.

- [2] 王飞, 贺蓓. 难辨梭状芽孢杆菌相关性腹泻暴流行的调查[J]. *中华医学杂志*, 2006, 84(6): 432-434.
- [3] Pareja Sierra T, Hornillos Calvo M. Clostridium difficile associated diarrhea in the elderly patient [J]. *Rev Clin Esp*, 2007, 207(2): 86-90.
- [4] Asha NJ, Tompkins D, Wilcox MH. Comparative analysis of prevalence, risk factors, and molecular epidemiology of antibiotic-associated diarrhea due to clostridium difficile, clostridium perfringens, and staphylococcus aureus [J]. *J Clin Microbiol*, 2006, 44(8): 2785-2791.
- [5] Hookman P, Barkin JS. Clostridium difficile associated infection, diarrhea and colitis [J]. *World J Gastroenterol*, 2009, 15(13): 1554-1580.
- [6] Abdel Samie A, Traub M, Bachmann K, et al. Risk factors for recurrence of clostridium difficile-associated diarrhea [J]. *Hepato Gastroenterol*, 2013, 60(12): 1324-1326.
- [7] Shakov R, Salazar RS, Kagunye SK, et al. Diabetes mellitus as a risk factor for recurrence of clostridium difficile infection in the acute care hospital setting [J]. *Am J Infect Control*, 2011, 39(3): 194-198.
- [8] Pepin J, Alary ME, Valiquette L, et al. Increasing risk of relapse after treatment of clostridium difficile colitis in Quebec, Canada [J]. *Clin Infect Dis*, 2005, 40(11): 1591-1597.
- [9] Musher DM, Aslam S, Logan N, et al. Relatively poor outcome after treatment of clostridium difficile colitis with metronidazole [J]. *Clin Infect Dis*, 2005, 40(11): 1586-1590.
- [10] Lagrotteria D, Holmes S, Smieja M, et al. Prospective, randomized inpatient study of oral metronidazole versus oral metronidazole and rifampin for treatment of primary episode of Clostridium difficile-associated diarrhea [J]. *Clin Infect Dis*, 2006, 43(5): 547-552.
- [11] Tomkins K, Raynor J, Rothwell L, et al. The management of clostridium difficile-associated diarrhoea in a community hospital [J]. *West Indian Med J*, 2011, 60(1): 57-60.
- [12] Gerding DN. Metronidazole for clostridium difficile-associated disease: is it okay for Mom? [J]. *Clin Infect Dis*, 2005, 40(11): 1598-1600.
- [13] Tang-Feldman Y, Mayo S, Silva J, et al. Molecular analysis of clostridium difficile strains isolated from 18 cases of recurrent clostridium difficile-associated diarrhea [J]. *J Clin Microbiol*, 2003, 41(7): 3413-3414.
- [14] Guarner F, Khan AG, Garisch J, et al. World gastroenterology organisation practice guideline. probiotics and prebiotics [J]. *World Gastroenterol Organ*, 2011, 26(2): 253-256.
- [15] 秦卓, 任爱民, 王红. 难辨梭状芽孢杆菌相关性腹泻发病机制与治疗的研究进展 [J]. *临床和实验医学杂志*, 2012, 11(7): 547-549.

- [16] Eiseman B, Silen W, Bascom GS, et al. Fecal enema as an adjunct in the treatment of pseudomembranous enterocolitis[J]. Surg, 1958, 44(5): 854-859.
- [17] Freeman J, Bauer MP, Baines SD, et al. The changing epidemiology of clostridium difficile infections[J]. Clin Microbiol Rev, 2010, 23(3): 529-549.
- [18] Kelly CP, Lamont JT. Clostridium difficile-more difficult than ever[J]. N Engl J Med, 2008, 359(18): 1932-1940.
- [19] Brandt LJ, Aroniadis OC, Mellow M, et al. Long-term follow-up of colonoscopic fecal microbiota transplant for recurrent clostridium difficile infection[J]. Am J Gastroenterol, 2012, 107(7): 1079-1087.
- [20] Khoruts A, Dicksved J, Jansson JK, et al. Changes in the

composition of the human fecal microbiome after bacteriotherapy for recurrent clostridium difficile-associated diarrhea[J]. J Clin Gastroenterol, 2010, 44(5): 354-360.

- [21] van Nood E, Vrieze A, Nieuwdorp M, et al. Duodenal infusion of donor feces for recurrent clostridium difficile[J]. N Engl J Med, 2013, 368(5): 407-415.
- [22] Agito MD, Atreja A, Rizk MK. Fecal microbiota transplantation for recurrent C difficile infection: ready for prime time? [J]. Cleve Clin J Med, 2013, 80(2): 101-108.

(收稿日期: 2012-12-08 修回日期: 2013-02-21)

· 综 述 ·

脐带间充质干细胞研究现状与临床治疗

王 艳¹, 张晋林², 黄晓兵², 张潇潇³综述, 朱一帆^{4△}审校

(1. 遵义医学院研究生院, 贵州遵义 563000; 2. 四川省人民医院血液科, 成都 610072; 3. 四川省人民医院妇产科, 成都 610072; 4. 四川省人民医院器官移植研究所, 成都 610072)

关键词: 脐带; 间充质干细胞; 临床治疗

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2013.18.043

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)18-2161-03

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是一类起源于中胚层的成体干细胞,可以从骨髓、脂肪、胎盘、脐带血以及脐带中分离出来,具有自我更新、高度增殖和多向分化的潜能。1991年 McElreavey 首次从人脐带华尔通胶(Wharton's jelly, WJ)分离培养出一种具有多项分化潜能的成纤维样细胞,即人脐带间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cells, hUC-MSCs)。hUC-MSCs 比来源于骨髓、胎盘及其他组织的 MSCs 更具有优势。首先,脐带的来源不受伦理争议,并且成本较低;其次, hUC-MSCs 不会引起畸胎瘤,且具有抑癌性。由于 hUC-MSCs 还具有低免疫原性、免疫调节、基质支持、旁分泌、迁移和基因稳定性,故具有良好的临床治疗潜能。

1 hUC-MSCs 的培养与生物学标志

1.1 hUC-MSCs 的培养 可使用全脐带或分离脐带动静脉和羊膜后的华尔通胶分离出 hUC-MSCs。一般采用组织块贴壁培养法和酶消化法,后者又分为单纯胶原酶消化和胶原酶、胰酶双酶消化。酶消化法分离培养 hUC-MSCs 的原代培养时间明显短于组织块贴壁培养法。

1.2 细胞生物学标志 流式细胞检测表明, hUC-MSCs 高度表达 MSCs 相关的细胞表面标志,如 CD13、CD29、CD44、CD73、CD90、CD105 和人类白细胞抗原-1 类分子(HLA-1),低表达造血干细胞相关的细胞表面标志,如 CD45、CD34、CD14、CD19 和 HLA-DR。

2 hUC-MSCs 的分化潜能

大量研究发现 hUC-MSCs 具有强大的分化潜能,能够分化成内胚层、中胚层及外胚层 3 个胚层的细胞。在肝细胞生长

因子、成纤维生长因子联合诱导下, hUC-MSCs 可表达出肝细胞特异性抗原甲胎蛋白、清蛋白,证实 hUC-MSCs 可以分化为肝细胞。同时该研究证实, hUC-MSCs 体外特定条件下可以诱导分化成脂肪细胞和成骨细胞,且可在体外连续传代 40 次以上,形态和表型保持稳定^[1]。

将人 hUC-MSCs 与大鼠胰岛细胞共同培养,在第 3、7、14 天采用放射免疫法检测,发现共培养的 hUC-MSCs 随葡萄糖浓度的增高而分泌的胰岛素量也增加,逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测到共培养组有 Pdx-1 基因表达^[2]。该研究又将未诱导的 hUC-MSCs 通过尾静脉移植入糖尿病鼠体内,移植后第 60 天 RT-PCR 检测到病鼠胰腺有人胰岛素基因表达,提示人 hUC-MSCs 具有在体内外的微环境中向胰岛样细胞分化的潜能。

Cho 等^[3]采用次声波振动(SSV)诱导 hUC-MSCs,可使其分化为神经细胞。分化后的细胞表达神经细胞的一些特殊标记,如 MAP2、NF-L 和 NeuroD1。该研究提示 SSV 可能通过激活 ERK 的机制诱导 hUC-MSCs 分化为神经细胞。

3 hUC-MSCs 的研究现状及临床治疗进展

3.1 移植物抗宿主病(GVHD)的治疗 血液病患者接受同种异体造血干细胞移植术后,急性移植物抗宿主病(aGVHD)可导致高病死率。目前,糖皮质激素是 aGVHD 最初治疗的黄金标准。但仅对部分患者有效。有研究报道, MSCs 对 aGVHD 治疗有效^[4]。国内研究者将 40 例 aGVHD 患者分为 hUC-MSCs 组和常规治疗组, hUC-MSCs 组:接受他克莫司加甲氨蝶呤(MTX)+hUC-MSCs 抗 GVHD 治疗,常规治疗组:仅接受他克莫司+MTX 治疗。结果 hUC-MSCs 组治愈率及治疗