

益生菌在儿科临床中的应用

张振 王宝香 鲍连生 主编



湖北科学技术出版社

益生菌在儿科临床中的应用

张 振 王宝香 鲍连生 主编

YISHENGJUN ZAI ERKE LINCHUANG ZHONG DE YINGYONG



湖北科学技术出版社

编 委 会

主 编: 张 振 王宝香 鲍连生

副主编: 艾洪武 刘映乐 徐 俊 蔡小芳

主 审: 王卫民 彭少华 董宗祈

编 者: (以姓氏笔画为序)

丁 艳 王宝香 王瑞耕 王文娟

王 佳 王晓梅 邓淑珍 艾洪武

孙继民 刘映乐 刘 芳 刘汉楚

李建新 张 振 张光萍 张 多

余小红 余 星 姚承钢 林 红

郑源泉 徐 俊 徐润琳 彭罕鸣

鲍连生 虞 涛 鄢素琪 蔡小芳

内 容 提 要

本书共分五章:以研究儿童身体微生态系统为基础,对双岐杆菌和乳酸杆菌等益生菌在儿童体内黏附定殖、产生的生理活性物质、发挥的重要生理作用等进行了系统的总结和论述;详细讲述了目前正常菌群在儿科临床诊断中的应用进展;重点介绍了益生菌在儿科疾病治疗中的应用情况。

本书理论性和系统性较强,同时也具有较好的实用性。

本书大部分内容通俗易懂,可供儿科医学工作者、大中专院校相关专业师生阅读和参考,也可作为父母养育孩子的健康指导书籍。

前言

益生菌是大自然赋予人类的宝贵财富,目前益生菌在儿科临床中的研究与应用仍处于起步阶段。总结前人研究益生菌的成果,了解国内外研究益生菌的最新现状,提出其未来发展的趋势和动态,无疑对儿科疾病的预防和治疗都是十分重要的。

益生菌全部来自正常微生物群,因此研究益生菌离不开对正常微生物群的研究。21 世纪初,资深的微生态学家 Dw ayne C. Savage(美国田纳西州大学微生物研究室名誉教授)于 2002 年 2 月 28 日在日本东京召开的“21 世纪肠内细菌学”国际会议上提出以下两点:①正常微生物群是自然界中的人(或高等动物)生存必须的生理器官;②人(或高等动物)是动物真核细胞和微生物原核细胞的综合体。目前上述两点已得到大多数科学家的认可,在人体已有的几个生理系统中应该把正常微生物群系统列入第 13 个生理系统,这个系统是人类必须承认的全部生理学系统的一部分。同人体的其他生理系统一样,正常微生物群是人体的组成部分之一。

2005 年,益生菌和消化道疾病领域的专家在美国耶鲁大学医学院成立了一个工作组。专家们分析了大量益生菌的临床检测结果,并给医生们提出了一些指导性的建议。专家们认为:①人类所患的许多疾病是由于体内菌群失衡造成的;②益生菌能够促进免疫应答,对自身免疫性疾病有一定疗效;③益生菌可以用于治疗急性腹泻、抗生素相关腹泻和回肠贮袋炎;④有证据表明益生菌可能有助于治疗幽门螺杆菌感染、放化疗引起的腹泻、阴道感染、溃疡性结肠炎、克罗恩病以及炎症性肠病等疾病。他们的建议刊登在 2006 年的《临床胃肠病学杂志》(Journal of Clinical Gastroenterology)上。

近年来,随着人们对益生菌研究的深入,益生菌对多种疾病的治疗效果已得到了肯定。然而,现在我们儿科疾病研究的重点仍然是致病菌,治疗方案也是首选抗生素,对正常菌群的研究远远滞后于致病菌的研究。目前,关于益生菌在儿科临床应用方面的书不多见。为了使儿科临床工作者简捷、快速地了解益生菌,利用好益生菌,我们在参阅了大量国内外相关文献资料的基础上,结合我们工作的实践编写了这本书。

本书编排有绪论、儿童身体微生态系统、益生菌的生物学特性、正常菌群在儿科临床诊断中的应用、益生菌在儿科疾病治疗中的应用共五章内容,另有儿科常用的微生态制剂等三个附录内容可供读者查阅。

由于篇幅有限,本书中引用的文献无法全部在附录参考文献中一一列出,敬请文献作者谅解!

本书的撰写、编辑和出版自始至终得到了国家科技重大专项“传染病监测技术平台”(2009ZX10004-207)课题组组长单位武汉大学的大力支持,得到了武汉市妇女儿童医疗保健中心领导的热心帮助,得到了多位微生态学、微生物学、临床检验诊断学及儿科疾病学专家的精心指导,在此表示衷心的感谢!

由于编写人员水平有限,书中一定存在许多疏漏与不足之处,希望读者批评指正。

编 者
2011 年 2 月于武汉

目 录

第一章 绪论	1
第一节 益生菌的概念	1
第二节 益生菌的种类	2
第三节 正常菌群的研究历史	2
第四节 益生菌疗法——儿科疾病治疗的新观念	6
第二章 儿童身体微生态系统	12
第一节 儿童身体微生态系统的概念	12
第二节 儿童呼吸道微生态	14
第三节 儿童口腔微生态	20
第四节 儿童胃微生态	27
第五节 儿童肠道微生态	30
第六节 儿童皮肤微生态	42
第七节 女童阴道微生态	43
第三章 益生菌的生物学特性	49
第一节 常见的益生菌	49
第二节 益生菌的定殖	84
第三节 益生菌产生的生理活性物质	106
第四节 益生菌的生理作用	112
第四章 正常菌群在儿科临床诊断中的应用	168
第一节 儿童正常菌群的定性检测	168
第二节 儿童正常菌群的定量检测	172
第三节 双歧杆菌的检测	180
第四节 乳酸杆菌的检测	185
第五节 益生菌分子生物学鉴定方法	192
第六节 双歧杆菌的分子生物学研究	205
第七节 乳酸杆菌的分子生物学研究	220
第八节 益生菌的筛选与保存	234
第五章 益生菌在儿科疾病治疗中的应用	240
第一节 消化系统疾病	240
第二节 幽门螺杆菌感染	263
第三节 呼吸道疾病	272
第四节 口腔疾病	274

第五节	自身免疫病·····	279
第六节	早产儿感染·····	283
第七节	新生儿高胆红素血症·····	287
第八节	皮肤病·····	291
第九节	高胆固醇血症·····	295
第十节	变态反应性疾病·····	299
第十一节	小儿孤独症·····	309
第十二节	小儿癫痫·····	313
第十三节	肿瘤·····	316
第十四节	小儿泌尿生殖道感染·····	323
第十五节	治疗功能益生菌的研发趋势·····	330
第十六节	国内常用益生菌的耐药性分析·····	338
第十七节	益生菌在儿科疾病治疗应用中面临的问题·····	342
附录一	儿科常用的微生态制剂·····	348
附录二	益生菌菌株治疗疾病的研究资料汇总·····	357
参考文献	·····	360

第一章 绪 论

第一节 益生菌的概念

“益生菌”的英文单词“Probiotics”是由 LILLY 和 STILLWELL 于 1965 年在《Science》发表研究论文时创造的。联合国粮农组织(FAO) 和世界卫生组织(WHO) 联合专家组在 2001 年给出益生菌的概念是“经适量服用后,有益于其宿主健康的活的微生物。”

20 世纪 60 年代,由于抗生素的广泛使用引起的副作用,使得人们开始注意到一些活菌制剂在改善动物健康中的作用。LILLY 和 STILLWELL 最初创造“Probiotics”时,是用来指一种原生动物分泌的用于刺激另一种原生动物生长的物质。1974 年 PARKER 则用“Probiotics”来描述那些能通过促进动物肠道菌群平衡从而改善动物健康的动物饲料制剂,包括各种生物或化学物质,如抗生素等。1989 年, FULLER 将益生菌重新定义为“一种活的微生物制剂,它通过改善宿主动物肠道菌群的组成从而有利于动物健康。”这一概念强调益生菌必须是由活细胞组成,从而排除了抗生素。1992 年, HAVENAAR 等人将益生菌定义为“由单一或多种微生物组成的活菌制剂,当应用于人或动物后,能通过改善宿主土著菌群的组成,从而促进人或动物的健康。”该概念从多方面发展了益生菌这一概念。首先,它不再将益生菌的作用仅局限于肠道菌群,而是还有可能作用于其他部位,例如呼吸道、泌尿生殖道和皮肤等部位;其次,它首次明确地提出了益生菌在人体中应用的概念;第三,益生菌可以由一种以上的微生物组成。后来,为了区分普通的酸奶菌种与益生菌产品, SCHREZENMIER 等(2001 年) 将 HAVENAAR(1992 年) 等所提出的益生菌概念进行了修订,修订后的益生菌的概念为“含有足够数量活菌、组成明确的微生物制剂或产品,能通过定殖作用改变宿主某一部位菌群组成、从而产生有利于宿主健康作用。”该概念的不足之处在于仍然没有区分特定的微生物与其产品的具体形式。

我们给出益生菌的概念为:通过定殖作用可改变宿主某一部位菌群的组成,从而产生有利于宿主健康作用的单一或组成明确的混合微生物。采用该概念的理由如下。

(1) 到目前为止,对肠道或泌尿生殖道等部位土著菌群的最佳组成并不十分清楚,因此相对于“改善土著菌群组成”的概念,该概念可能更确切。“土著菌群”是指定殖于宿主特定部位、没有受到药物处理或疾病影响的微生物菌群,而益生菌在多数情况下是作用于已经发生紊乱的菌群。

(2) 该概念明确指出益生菌的作用是通过在特定部位的定殖而发挥其对宿主健康的有利作用。

(3) 该概念区分了特定的微生物与具体的产品形式。

(4) 尽管对于某一特定的微生物而言,要发挥其作用需要一定的数量,但只是一种剂量效应而已,不需要在概念中过分强调活菌数量的概念。

第二节 益生菌的种类

益生菌种类繁多,目前用于人体的益生菌主要有三类:第一类为专性厌氧的双歧杆菌属,是人体肠道内最重要的生理性菌群,该属现有 32 种,其中已用作肠道微生态制剂的有 5 种,即长双歧杆菌(*Bifidobacterium longum*)、婴儿双歧杆菌(*Bifidobacterium infants*)、青春双歧杆菌(*Bifidobacterium adolescentis*)、两双歧杆菌(*Bifidobacterium bifidum*)和短双歧杆菌(*Bifidobacterium breve strain*),双歧杆菌最宜在温度为 37 ~ 42℃、pH 为 6.5 ~ 7.0 的环境繁殖。研究发现随着年龄的增长,双歧杆菌在肠道中的含量会逐渐降低,很多老年人的肠道已无双歧杆菌存在;第二类为厌氧的乳杆菌属,至今已报道的有 56 种,临床具有良好记录的包括鼠李糖乳杆菌 GG(*Lactobacillus rhamnosus* GG)、干酪乳酸菌 Shirota(*Lactobacillus casei* Shirota)和詹氏乳杆菌 L-1(*Lactobacillus johnsonii* L-1)等。主要用于微生态制剂者约有 10 种,包括嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*)、短乳杆菌(*Lactobacillus brevis*)、干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*)和保加利亚乳杆菌(*Lactobacillus bulgaricus*)等,乳杆菌最宜在温度为 35 ~ 40℃、pH 为 3.4 ~ 4.5 的弱酸性环境繁殖,且具有很强的抗酸抗盐能力;第三类为兼性厌氧球菌,如属于肠球菌属(*Enterococcus*)中的粪肠球菌(*E. faecalis*)和屎肠球菌(*E. faecium*),属于乳球菌属(*Lactococcus*)的乳酸乳球菌乳亚种(*L. lactis*)和乳酸乳球菌乳脂亚种(*L. lactis* subsp)以及属于链球菌属(*Streptococcus*)的唾液链球菌嗜热亚种(*S. salivarius* subsp *thermophilus*)和中间链球菌(*S. intermedius*)等。

儿科患者免疫力低下,与成年人相比,更易受到致病微生物的感染,而益生菌在体内定殖后有维护菌群平衡、增强免疫力、拮抗感染、抑制肿瘤生长、促进营养物质的吸收、降低血清胆固醇等一系列的重要作用。因此,了解益生菌,正确利用好益生菌对儿童(特别是儿科患者)的健康成长(及康复)极其重要。

第三节 正常菌群的研究历史

人类生活在一个处处都有微生物存在的世界里,婴儿自出生 1 ~ 2h 后即可从体内分离出细菌。成人身体凡与外界接触或相通的部位皆有微生物的存在,其数量约为人体的总细胞数的 10 倍,总重约 1 271g:其中胃肠道约 1 000g,皮肤约 200g,口、肺、泌尿生殖器官各约 20g,鼻约 10g,眼约 1g。人体微生物种类繁多,数量巨大。这些微生物通过多种方式影响着人体,同时又受到各种内外因素的影响,形成了一个复杂的系统。

生活在人体各个部位、数量大、种类多、一般能发挥有益作用的稳定的微生物种群(正常微生物群),称为正常菌群(Normal flora)。目前的益生菌都是从正常菌群中得到的,因此研究益生菌必须从正常菌群的研究开始。另有一些微生物在一定条件下会引起人的疾病,称为条件致病菌(Conditional pathogen)。正常菌群、条件致病菌与宿主之间,以及与周围环境之间存在着种种密切关系,组成了人体的微生态系统(Human micro-ecologic system)。

20 世纪 20 年代,德国的细菌学家曾提出生理细菌学与病理细菌学的概念,生理细菌

学就是研究正常菌群的,与病理细菌学相比,生理细菌学的研究历史更悠久,可以说生理细菌学的研究历史就是细菌学的研究历史。

一、启蒙时期

从 1676—1910 年,人们开始逐渐认识了细菌和其他的一些微生物,而且对它们进行了一系列启蒙性的研究。这些研究包括细菌的发现、纯培养的开展和对正常菌群的认识。

1. 细菌的直接观察

细菌是荷兰人吕文胡克(ANTONY VAN LEEUWENBOEK, 1632—1723 年)在 1676 年发现的,这个结论迄今还没有人持反对意见。吕文胡克活了 91 岁,在他一生中,大约有 50 年在磨制玻璃镜。在其 44 岁(1676 年)以前就已制成了一台世界上最原始的显微镜。吕文胡克就是利用这台显微镜观察“小动物世界”的。他长期不懈地努力,锲而不舍,终于获得了成功,成为了世界上原生动物学及细菌学的创始人。据美国细菌学家多贝尔(CDOBELL, 1932 年)的考察证明,吕文胡克的显微镜能扩大 300 倍,并且也许曾经用过暗视野的观察方法。

吕文胡克通过他 1676 年 10 月 9 日给英国伦敦皇家医学会的函件,向全世界宣布了他的成就。在那封信里,他明确地记载他所发现的细菌内容。7 年后,吕文胡克于 1683 年 9 月 17 日又给皇家医学会写了第二封信。在第二封信里,他更明显地描述了几种细菌的形态,除了描述啤酒中的酵母菌外,他还描述了人、动物的大便以及他自己牙缝里的微生物。

直接观察人和动物体的正常微生物至今仍是最可靠的方法。培养观察的方法,由于培养基条件的不同,有的细菌能生长,有的细菌不能生长,因而得出的结果往往不能代表真实的、客观的、符合生态组合的本来面貌。可以肯定,吕文胡克所描述的微生物,并不是致病菌,而是正常粪便与口腔内的细菌,因为他所描绘的图像和今天我们见到的这些地方的微生物很相似。吕文胡克描绘的细菌图像有球形、杆形、丝状和螺旋体形,所有这些都是我们在口腔、粪便内可以观察到的细菌形态。

2. 纯培养和固体培养基

自吕文胡克发现和描述细菌以来,到 19 世纪下半叶,其他的一些学者又相继描述了另外一些细菌、酵母、螺旋体和原虫。但是由于没有纯培养的方法,不能分离细菌,只能直接观察或混合培养(液体培养),无法明确地建立起种的概念。这种情况,一直延续到 19 世纪末。在当时,甚至著名的巴斯德(PASTEUR, 1822—1895 年)也只能用混合培养的方法来研究细菌。

这个问题的解决归功于德国的一个乡村医生,后来成为细菌学家的科赫(KOCH, 1843—1910 年)。科赫在工作之余,研究了炭疽热。他做了许多实验,但有一个问题一直在干扰着他的工作,这就是污染问题。因为是液体培养基,十分容易污染杂菌,致使实验失败。但是,科赫以精湛的技巧,终于用悬滴法在凹玻片上做出了纯培养。

科赫在柏林做研究工作时,偶然发现,在半块被人丢弃的土豆上长着许多不同颜色的小点,有灰色、红色和黄色,还有的带紫黑色。科赫敏感地联想,会不会是空气里的细菌掉在上面,长出这些小点。为了证明自己的想法,他与两名助手开始涂片,并在显微镜下观察。发现一种点点就是一种细菌,而不同点点的细菌形态不同。科赫联想,这很像殖民

地。因此,他就将这些小点点称作“细菌的殖民地”(colony)。直到今天,这个字还在沿用,只不过中文译作菌落而已。

这一发现的重要性就在于发现了能生长表面菌落的“纯培养”这个划时代的新技术。有了“纯培养”技术,不仅解决了观察细菌的混乱局面,而且很快就发现了更多的正常菌群成员和致病菌。科赫发现“纯培养”技术后,在不到 10 年的时间里,研究人员就相继发现了霍乱弧菌、结核杆菌、白喉杆菌、大肠杆菌、双歧杆菌、肺炎双球菌、淋病双球菌及破伤风杆菌等重要细菌。因此,人们将这十年称为细菌学的黄金时代。

科赫发现土豆上的菌落以后,就着手制作固体培养基,经过摸索发现,琼脂在 90℃ 以上才溶化,42℃ 以下凝固。这就是直到今天一直使用的固体培养基的基础来源。当时,科赫带领的另一位学生彼特(R. J. PETRI)发明了一种特制玻璃平皿,可用来制作成琼脂平板,培养细菌。100 年后今天,我们仍然在使用着这种方法。

有了固体培养基,才有进行纯培养的可能。只有纯培养,才能进行科学的生物学与分类学的研究。在 1910 年以前,几个主要的正常菌群成员如双歧杆菌、乳杆菌、肠链球菌及酵母菌相继被发现了,但对厌氧菌如双歧杆菌则很难培养出来,尽管在涂片上(如婴儿大便)大量存在。

二、停滞时期

从 1910—1945 年的 35 年中,整个病原细菌学有了很大发展。但是在这一时期,对正常菌群的研究却进展不大,除了对某些方面有些补充和提高外,几乎处于停滞状态。停滞的原因主要是因为烈性传染病的大流行,认识上的片面性和方法学的缺陷。

1. 停滞时期的状况

(1) 烈性传染病大流行。第一次与第二次世界大战,由于人与人交往频繁,增加了人与人之间的接触,这也促进了传染病的大流行。霍乱、鼠疫、天花、流感、肠伤寒、斑疹伤寒、回归热等都曾发生过大流行,这些传染病夺去了亿万人的生命。这些亟待解决的问题,迫使和吸引了广大微生物学研究者重视病原微生物学的工作,从而暂缓了对正常菌群的研究。

(2) 认识的片面性。自 19 世纪末叶对微生物学进行广泛科学研究以来,微生物学工作者甚至整个医学工作者,形成了一个机械唯物论的观点,这就是单一病因论:即一种病原物引起一种疾病,或一种疾病是由一种病原物引起的。同时,机械的坚持把微生物分为致病菌、条件致病菌和非致病菌的单纯定性观点,忽视了定量的观点,更忽视了从相互关系中看待菌与菌、菌与宿主间的生态学关系。这种片面的观点阻碍了对正常菌群的研究。

(3) 方法学的缺陷。自吕文胡克以来,人们发现大便中 60% 以上是细菌,但只有极少数能培养出来。对这些培养不出来的细菌,当时有不少学者认为是死菌。其实,这些菌主要是厌氧菌,在现在的厌氧菌培养法改进的情况下,95% 都能培养出来。由此可见,由于方法学的限制,极大地阻滞了对正常菌群的研究。

2. 停滞时期的工作

停滞只是发展缓慢,没有突破性的进展,在这段时期,还是进行了一些重要的工作。

(1) 分类学的研究进展。19 世纪,虽然大部分正常菌群成员都分离出来了,但研究得不够,在分类学上比较混乱。例如双歧杆菌(*Bifidobacterium*),自 1899 年巴斯德研究院的

蒂塞(TISSIER) 自健康婴儿大便分离出双歧杆菌以后,一直到 1924 年才由丹麦学者奥拉金森(ORLARJENSEN) 进行了初步分类研究。双歧杆菌的科学分类,直到 20 世纪 60 年代以后才逐步完善,甚至到今天还有许多争议。

(2) 正常菌群与营养。在 20 世纪 40 年代前后,在试管内首先证明了大肠杆菌与产气杆菌能合成硫胺素、核黄素、泛酸、吡多醇和维生素 K。随后,科学家采用维生素缺乏食饲喂动物(大鼠、小鼠) 等方法来观察益生菌合成某些营养素的作用。经过大量实验,在 40 年代已经证明,非反刍动物的肠道菌群在体内也能合成维生素 B 族复合体、维生素 K 与维生素 E,在人体也证明了肠道菌群能合成硫胺素、核黄素、叶酸、烟酰胺及尼克酸等,并为宿主所用。

所有这些成果,虽然是初步的,但都被后来的现代化实验动物模型所证实。

三、发展时期

从 1945—1970 年,对正常菌群的研究有三大发展:一是抗生素的应用;二是无菌动物的饲养;三是厌氧菌占绝对优势的确定。

1. 抗生素的应用

抗生素的出现是从英国细菌学家弗莱明(FLEMING,1888—1955 年) 偶然发现青霉素能抑制葡萄球菌生长开始的。

在 1929 年,弗莱明发现了青霉素,他的论文发表在英国实验病理学杂志。青霉素问世后,虽然证明对革兰阳性球菌有杀菌和抑菌作用,并在临床上显示出疗效,但在第一次世界大战前,一直未投入工业生产。只是在 1945 年以后才首先在美国生产,随后推行于全世界。继青霉素之后,又陆续出现了链霉素、杆菌肽等其他抗生素。抗生素在防治各种传染病和感染上起了不可估量的作用,挽救了亿万人的生命。

抗生素的功绩是肯定的,但也表现出一些弊端。几乎与抗生素问世的同时,人们就注意到它的副作用,会引起菌群失调和细菌耐药性。抗生素的弊端是不可取的,但由于这些弊端引起了人们对正常微生物菌群的注意却又是抗生素问世以来的又一功绩。抗生素的出现,也日渐唤醒了人们重新研究正常菌群的决心。

2. 无菌动物的饲养

为了论证正常菌群的作用,巴斯德设想用无菌动物证明其有益性。而巴斯德学说的反对派也想用无菌动物证明其有害性。1895 年,柏林大学奴特尔特与特菲得尔(NUTTALL 与 THIERFELDER) 开始饲养无菌动物(豚鼠、鸡等),均未获得最后成功,一般都在 10 ~ 30d 内宣告失败。

无菌动物的饲养并不是一件简单的事,它需要一系列现代技术的配合。从上个世纪末到 1945 年,虽已探索了 50 年之久,终未获得满意的成功。真正稳定地饲养和传代是在美国印第安纳州圣母院大学由瑞尼尔(REYNIER) 领导的洛邦实验室从 1943—1945 年完成的。随后在瑞典、日本、英国等也相继建立了无菌动物室。动物室一开始是由重型不锈钢制成的,后来又改为轻型不锈钢,近年来英国曲克勒斯(TREXLER) 教授改用透明塑料薄膜制成。由于造价便宜易于推广,颇受欢迎。

现在几乎所有动物(大鼠、小鼠、豚鼠、鸡、猪、牛、羊等) 都可培育成无菌动物。无菌动物的饲养对正常菌群研究的帮助如下:

(1) 重要工具。无菌动物模型可揭示菌与菌、菌与宿主的相互关系。因此,无菌动物已成为当代研究生命科学的重要工具。

(2) 悉生动物(Gnotobiotics)的来源。悉生动物是由无菌动物衍化来的携带已知菌的动物。悉生动物为研究正常菌群内部各成员的生理作用和相互关系提供了可能性。

(3) 排除未知微生物的干扰。无菌动物或悉生动物可排除由各种未知微生物对生理、生化、病理及药理实验的干扰。从上述事实来看,抗生素与无菌动物这两个因素的出现,对正常微生物群的研究发展,起了明显的促进作用。

3. 厌氧菌在肠道内占优势的确定

1957年,东德的微生物学家黑奈通过各种厌氧培养,最终确定人体肠道内厌氧菌占绝对优势,无论是婴幼儿,还是成人,只要是健康的,厌氧菌就占肠道菌群总数的95%以上。

自从确定厌氧菌在肠道内占优势以后,各国学者又相继证明呼吸道、口腔、阴道、皮肤等部位的菌群中厌氧菌也占优势,这极大地促进了对正常菌群的研究。

四、现代化时期

自1970—1983年可以说是对正常菌群研究的现代化时期,在这个时期的几个重要标志如下。

1. 悉生生物学的发展

悉生生物学(Gnotobiology)是由无菌动物研究而发展起来的新兴学科。它研究的是正常菌群中微生物与微生物、微生物与宿主之间生态学的关系。因此,也有人称作微生物生态学(Microbial ecology)。悉生生物学的崛起,对益生菌的研究发挥了划时代的促进作用。

2. 厌氧菌培养技术的现代化

厌氧菌培养方法,近年来有很大改进,过去培养不出来的厌氧菌,或者认为的死菌,现在都可以培养出来。在过去认为大便涂片所见到的细菌,90%以上都是死菌,而现在事实上绝大部分都能培养出来,这就是厌氧菌培养技术现代化的结果。

3. 厌氧菌分类学的进展

过去许多分离不出来的细菌,现在分离出来了。分离出来后,首要问题就是进行鉴定。现在细菌分类的现代化技术主要有代谢产物的气液相色谱分析、核酸构成百分比($G+C\%$)的测定和利用电子计算机的数学分析法等。这些技术的进步,提高了分类的速度和准确性。

4. 临床应用

对正常菌群研究所取得的丰富知识,近年已逐步应用于临床。对菌群失调、生态防治方法的研究,已在临床实践中显示了其重要意义和实际效果。

第四节 益生菌疗法——儿科疾病治疗的新观念

医学发展到今天,儿科医学工作者在获得许多医学知识并不断丰富自己解决各种疑难疾病经验的同时,也面临着许多无法解决的问题:①越来越多的实验证实,多种儿科疾病与感染无关,而是与免疫功能异常有关,传统的治疗方法对患儿免疫功能异常并无多大

效果;②临床抗生素耐药率不断升高,对多种常见致病性病毒、细菌、真菌的抗感染效果越来越差;③有些儿科常见病,如肠道感染、呼吸道感染,经治疗后会反复发作,经久不愈;④对部分儿科疾病,如肠易激综合征、过敏、孤僻症、高胆固醇症、肿瘤等,尚无有效的治疗方法。值得庆幸的是:应用益生菌,可能会为儿科工作者解决上述问题带来新希望。

一、儿科肠道疾病

近年来随着人们生活水平的提高,饮食结构的变化,肠道疾病的发病率有逐年上升的趋势。

1. 小儿腹泻(Infantile diarrhea)

益生菌可通过自身及其代谢产物调整菌群之间的关系,维系菌群最佳优势组合,调节肠道菌群。具有改善肠道功能的益生菌必须具备某种特性才能在微环境中保持优势,如黏附、竞争排斥、占位和产生抑制物等。ISOLAURI 等给 4~45 个月大的儿童服用鼠李糖乳杆菌 LGG(*Lactobacillus rhamnosus* GG)制成的干粉($10^{10} \sim 10^{11}$ cfu/g)或发酵乳,发现二者均可有效地缓解儿童的急性腹泻。近年来的研究表明:*L. rhamnosus* 19070-2 和 *L. reuteri* DSM 12246 的搭配混服(10^{10} cfu),可有效减轻轮状病毒肠炎症状。有些致病菌可分泌粘蛋白酶而降解粘蛋白,益生菌则可通过刺激肠粘蛋白的表达实现对肠道的保护作用,因此益生菌对病毒性腹泻的治疗有效。目前已证实对肠炎具有预防与治疗功效的专利菌株包括 LGG、*L. rhamnosus* 19070-2、*L. reuteri* DSM 12246、*Bifidobacterium* Bb-12 和 *L. paracasei* ST11 等。

在使用抗生素的患儿中,有 20% 会发生腹泻,即抗生素性腹泻(Antibiotic-associated diarrhea, AAD)。AAD 是由于肠道内微生物的失调引起的。AAD 可导致有定植抗性的正常菌群减少及结肠发酵能力的下降,益生菌的摄入能够阻止 AAD 的发生。GOTZ 等对 79 名接受阿司匹林治疗的研究发现,嗜酸乳杆菌(*L. acidophilus*)和保加利亚乳杆菌(*L. bulgaricus*)能有效地防治抗生素相关性腹泻。对布拉氏酵母菌(*Saccharomyces boulardii*)的研究表明,这种酵母菌对儿童和成人的抗生素相关性腹泻均有治疗作用。研究证实 *S. boulardii*、*L. acidophilus*、*L. casei* GG、*S. faecium* SF68 对患儿的抗生素相关性腹泻有明显的治疗作用。

2. 炎症性肠病(Inflammatory bowel disease, IBD)

炎症性肠病(IBD)以慢性或复发性肠炎为特征,临床上表现为两种交错的征型,即局限性回肠炎和溃疡性结肠炎,他们主要影响患儿的结肠和(或)小肠末端,其病原学还不完全清楚,但遗传因素和肠道菌群被认为起着重要的作用。改善正常菌群的组成和活性可以使病情好转,益生菌可以减少该病的复发和延长缓解期。目前研究认为炎症性肠病是由基因的易感性,环境因素和肠道免疫系统失调等多种因素交互作用引起的消化系统自身免疫性慢性疾病。研究证实在患儿结肠内灌注 *L. reuteri* R2LC、*S. boulardii*、*L. acidophilus* 对缓解患儿炎症性肠病症状有明显的缓解效果。

3. 乳糖不耐受(Lactose intolerance)

乳糖不耐受或者更准确地称之为乳糖消化不良,是由于患儿 α -半乳糖苷酶产生障碍引起的。主要发生于患儿(原发性乳糖消化不良)及肠切除者或患肠炎的患儿(继发性乳糖消化不良)。研究显示,轮状病毒感染患儿容易继发乳糖不耐受。乳糖不耐受患儿

消化乳糖的能力差,其结果是乳糖的吸收不充分。乳糖不耐受患者的症状和体征,包括肠管内气体增多,腹部胀气和腹泻,水样便。多种乳酸杆菌含有 α -半乳糖酶,可以促进乳糖的消化和吸收,使乳糖不耐受症状减轻。对具有乳糖吸收不良症状的患儿,给予乳酸杆菌的牛奶后症状会显著改善。对糖类吸收不良患儿,急性腹泻期每日摄食含乳酸杆菌酸奶后症状会明显减轻。一些学者研究证实 *L. debrueckii* subsp. *bulgaricus*、*S. thermophilus*、*L. acidophilus*、*L. lactis* 能很好地缓解患儿乳糖不耐受的症状。

二、幽门螺杆菌感染

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*) 感染与患儿胃炎发生相关。动物及人体试验表明,益生菌及其代谢产物具有预防和抑制幽门螺杆菌感染的作用。MRDA 等给 14 名感染了幽门螺杆菌的患者服用嗜酸乳杆菌制成的发酵乳(含嗜酸乳杆菌 $4 \times 10^9 \sim 1 \times 10^{10}$ cfu/g), 2 个月后有 6 名患者的症状得到明显的缓解。SGOURAS 等报道,感染 *H. pylori* 的小鼠饮用 *L. casei* Shirota 菌悬液 9 个月后,*H. pylori* 在胃体和胃窦的定殖量明显下降,慢性及活动性胃炎均有好转。目前已有许多关于益生菌预防和抑制幽门螺杆菌感染的动物试验和人体试验的报道。已知的可抑制幽门螺杆菌的乳酸菌包括: *L. acidophilus* LA-1、*L. casei* Shirota、*Lactobacillus reuteri* ATCC 55730、*L. gasseri* OLL 2716、*L. rhamnosus* GG 等。

三、小儿肥胖

目前,儿童肥胖率的迅速增长,已经成为世界性的问题。肥胖儿童在现代家庭多见的一部分原因是由于家长片面地追求高营养,结果造成营养过剩。孩子胖起来后,身体状况会越来越糟,感冒、哮喘、胃肠炎可能会经常发生。肥胖与高血脂、高胆固醇、高血压及早期动脉硬化等慢性疾病相关,调查表明儿时肥胖者成年后患这类疾病的危险,比体重正常儿童明显增多,甚至是成倍增加。

动物试验和临床试验证明益生菌具有降低血脂和胆固醇的作用。GILLILAND(1977 年)对分离自肠道的嗜酸乳杆菌、干酪乳酸菌、唾液乳杆菌等 10 株乳酸菌进行了体外实验,发现嗜酸乳杆菌可降解胆盐促进胆固醇的分解代谢,从而降低血液中胆固醇含量。AKALIN(1997 年)等分别给小鼠饲喂鲜牛奶和含有嗜酸乳杆菌的酸奶,发现饲喂含乳酸杆菌的酸奶可显著降低小鼠血浆总胆固醇和低密度脂蛋白胆固醇浓度。NARUSZEWICZ 等在临床试验中发现植物乳杆菌能降低低密度脂蛋白胆固醇含量并升高高密度脂蛋白胆固醇含量。

另有研究表明益生菌也具有调节血压功能,其活性物质主要来自于降压肽和肽聚糖。SAWADA 等(1990 年)发现 *L. casei* 细胞壁成分对自发性高血压大鼠(SHR)和肾性高血压大鼠(RHR)具有明显降压作用,这种降压作用呈现出一定的剂量效应。YAMAMOTO 等(1994 年)发现 *L. helveticus* CP790 的胞外蛋白酶水解 α s1-酪蛋白和 α -酪蛋白后可产生多种对 ACE 具有强烈抑制作用的寡肽,而利用胞外蛋白酶缺失的突变株 *L. helveticus* CP791 制备的发酵乳则没有降压效果。目前已申报具有降低血脂胆固醇功能的专利菌株众多,包括 *L. acidophilus* RP32、*L. acidophilus* ATCC 4962、*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC 33409、*L. plantarum* 299V、*L. helveticus* CP790、*L. helveticus* CM4、*L. casei* YIT9018、*L. casei* LC2W 等。

四、免疫功能异常

正常情况下,儿童的免疫系统可以战胜几乎所有入侵的有害微生物,从而保持身体健康。如果免疫功能异常则会导致多种疾病,例如:①由于感染、营养不良、意外伤害、情绪波动等原因,会造成儿童免疫功能障碍,继而会导致一系列疾病的发生;②儿童的免疫系统也可能会出现错误,将某种有害物质当成安全的,从而引发疾病,包括癌症;③另外,如果免疫系统把一种无害物质当作有害物质来对待,则会引起过敏等一系列健康问题。

已经证实益生菌能调节患儿的免疫功能,改善患儿免疫功能异常情况。KAILAM 等(1992 年)发现 *L. rhamnosus* GG($10^{10} \sim 10^{11}$ cfu/g)能提高患儿血清中由轮状病毒引起的 IgA 的含量,而那些口服经过高温灭菌的 *L. rhamnosus* GG 的患儿体内则无此作用。动物实验表明干酪乳杆菌 *L. casei* F19 可通过对细胞因子白介素 10 的调节而缓解结肠炎的症状。WAGNER 等(1997 年)发现,给免疫缺陷的小鼠喂服嗜酸乳杆菌后,小鼠体内不但产生了抵御白假丝酵母菌的抗体,而且小鼠体内的 IgG、IgA 和 IgM 的含量也有所增加。双歧杆菌具有诱导 TNF - A、IL - 2、IL - 6、IL - 10 和 INF - A 的 mRNA 表达增强作用,激活巨噬细胞如 NK 细胞、T 细胞和淋巴细胞,提高机体的特异性及非特异性免疫功能。目前已知可提高机体免疫功能的专利菌株有 *L. rhamnosus* GG、*Lactobacillus casei* F19、*Lactobacillus casei* Shirota、*L. johnsonii* LA - 1 等。

五、肿瘤

正常情况下,只有当身体需要时,人体内的细胞才会增长和分裂,从而产生新的细胞,这种有序的过程能帮助身体保持健康。但在某些特殊情况下,即使身体不需要新细胞,细胞也会分裂,这些多余的细胞就形成了肿瘤。

肿瘤分良性和恶性两种。良性肿瘤不会癌变,也不会向身体的其他部位扩散,更不会危及生命。良性肿瘤可以被摘除,大多数情况下病情不会反复。但是,恶性肿瘤则会癌变,它会在不能控制或无序的情况下进行分裂。恶性肿瘤也会入侵并摧毁附近的组织和器官,还会脱离原组织,进入血流或淋巴系统,导致恶性增生。目前,由于生活方式、环境和遗传等因素,患白血病、血管瘤、神经纤维瘤等肿瘤的患儿有逐年增多的趋势。

关于乳酸杆菌抗肿瘤作用的报道始于 BOG - DANOV(1962 年),他从保加利亚乳杆菌中分离出了 3 种具有抗癌活性的糖肽。SEKINE 等(1985 年)将从 *B. infantis* ATCC 15697 细胞壁分离出的肽壁糖和肿瘤细胞混合后进行皮下注射,观察到了明显的抑制肿瘤生长的效果。TAVAN 等(2002 年)检测了 84 株乳酸菌的抗突变性,发现八株乳酸杆菌具有抗突变活性。目前推测乳酸杆菌抑制肿瘤的机理可能与其降解与吸附致癌物质、产生抗突变物质、增强宿主免疫系统等有关。目前已知的具有抗肿瘤作用的益生菌包括:*B. infantis* ATCC 15697、*L. acidophilus* NCD01748、*L. casei* Shirota 等。

六、过敏

从 20 世纪 80 年代早期开始,过敏性疾病的发病率急剧升高。根据美国疾病预防和控制中心的报告,从 1980—1995 年,5 ~ 14 岁的儿童患哮喘的发病率增长了 80% 以上;在 15 ~ 64 岁这个年龄段,哮喘的发病率也升高了 70% 以上;然而,增速最快的却是 0 ~ 4 岁