酪酸梭菌抗阿司匹林致小鼠胃溃疡作用的初步研究

沈淑蓉　朱静　张浩　曾静静　付瑶阳　王雅琪　王方岩

【摘要】 **目的**　观测酪酸梭菌是否对阿司匹林导致的胃溃疡具有预防效应，并对其机制进行初步探讨。**方法**　取 30 只健康雄性 ICR 小鼠，随机分成 3 组，每组各 10 只，即模型组、酪酸梭菌组、奥美拉唑组。酪酸梭菌组以 6×10^8cfu/ 只的菌量，模型组和奥美拉唑组均予以相同体积的无菌培养基，灌胃 4d 后再饥饿处理 48h，然后以 250mg/kg 剂量的阿司匹林灌胃造模，奥美拉唑组小鼠于造模前 30min，腹腔注射奥美拉唑（13mg/kg）。造模 4h 后，取胃组织分别测定 SOD、CAT 活力、MDA 含量；进行常规 HE 染色观察胃黏膜组织结构变化，PAS 染色判断黏液量的变化，免疫组化法测定 Bcl-2、Bax 表达水平。**结果**　模型组的 SOD、CAT 活性明显降低，MDA 含量显著增加，而酪酸梭菌预处理后逆转了该趋势（$P<0.01$），与奥美拉唑组比较无统计学差异。HE 染色观察，酪酸梭菌能减轻胃黏膜的病理损伤，与奥美拉唑组无统计学差异。PAS 结果提示酪酸梭菌能够增加黏液量。酪酸梭菌组的 Bcl-2 表达较模型组显著增多，同时 Bax 表达显著减少。**结论**　酪酸梭菌预处理通过抗氧化应激、增加胃黏液量、上调 Bcl-2/Bax 表达比例，减轻阿司匹林造成的胃溃疡损伤。

【关键词】 酪酸梭菌　阿司匹林　胃溃疡　氧化应激

Clostridium butyricum prevents gastric ulcer induced by aspirin in mice

SHEN Shurong, ZHU Jing, ZHANG Hao, et al. Department of Oncology, Wenzhou Hospital of Integrated Chinese and Western Medicine, Wenzhou 325000, China

【Abstract】 **Objective**　To investigate the effect of Clostridium butyricum (C. butyricum) in prevention of gastric ulcer (GU) induced by aspirin in mice. **Methods**　Thirty ICR mice were randomly divided into model group, bacteria group andomeprazole group (n=10/group). After starvation for 48h, mice were given orally with 250mg/kg aspirin to establish GU model.Mice in bacteria group were orally pretreated with C. butyricum 6×10^8cfu for 4d before starvation, while mice in model group and omeprazole groupwere given the samevolume of sterile culture medium.Mice in omeprazole group were intraperitoneally injected with 13mg/kg omeprazole 30 min priorto aspirin treatment. Modeling for 4 h, gastric tissue was to harvest for measuring the activity of SOD and CAT, the content ofMDA, Bcl-2 and Bax, HE staining and PAS staining were performed. **Results**　In model group, the activity of SOD, CAT were significantly reduced while the content of MDA was significantly increased. The activity of SOD,CAT were increased while the content of MDA was reduced in bacteria group ($P<0.01$), there was no significant difference between bacteria and omeprazole group. The Bcl-2 expression increased and Bax expression reduced in bacteria group. PAS stainning showed that the mucus secretion was increased in bacteria group and HE staining showed that the mucosa injury was attenuated in bacteria gorup. **Conclusion**　C. butyricum can effectively protect the gastric mucosa against damages caused by aspirin in mice.

【Key words】 Clostridium butyricum　Aspirin　Gastric ulcer　Oxidative stress

胃溃疡（gastric ulcer，GU）是最为常见的胃部疾病，其发病率高，在造成胃黏膜损伤的诸多原因中，以非甾体抗炎药物（non-steroidal anti-inflammatory drug，NSAID）的广泛应用最为突出[1-3]，其中阿司匹林对胃黏膜的直接损害作用最为显著。如何防治该类 GU 的发生与复发，仍是广大研究人员所面对的重大课题。酪酸梭菌（Clostridium butyricum，C.butyricum）是专性厌氧的革兰阳性芽胞杆菌，1933 年由日本宫入近治博士首次发现。其形态呈直杆状或稍有弯曲，中间轻度膨隆，两端钝圆，是一种存在于人和畜禽肠黏膜内的益生菌。其在人体肠道内可促进多种有益菌群的增殖，抑制有害菌和腐败菌的生长、繁殖，改善肠道内的微生态环境，减少肠毒素的

基金项目：温州市科技局项目（Y20130215，Y20110136）；浙江省新苗计划项目（2014R413032）

作者单位：325000　温州市中西医结合医院肿瘤科（沈淑蓉）；温州医科大学检验医学院、生命科学学院（朱静、张浩、曾静静、付瑶阳、王雅琪）；温州医科大学基础医学院病生教研室，温州市中山医院内科（王方岩）

通信作者：王方岩，E-mail：wzyxywfy@126.com

产生。在临床应用中，酪酸梭菌治疗肠道菌群紊乱引起的肠炎、腹泻、消化不良等疾患，取得了显著疗效[4-6]。在胃部疾病的治疗中，酪酸梭菌已被用于拮抗幽门螺杆菌，且效果颇佳，但该菌对胃黏膜是否具有直接的保护作用，仍未有探讨。本实验旨在探索酪酸梭菌能否预防阿司匹林导致的 GU，希望由此改善阿司匹林的不良反应，并且对酪酸梭菌在 GU 直接防治方面，提供更有力的支持。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 本实验室保藏酪酸梭菌株（CGMCC NO. 8808）

1.1.2 液体培养基(TPY 培养基) 水解酪蛋白 10g/L，植物胨 5.0g/L，酵母粉 2.0g/L，葡萄糖 5.0g/L，L-半胱氨酸 0.5g/L，磷酸氢二钾 2.0g/L，氯化镁 0.5g/L，硫酸锌 0.25g/L，氯化钙 0.15g/L，氯化铁 0.0001g/L，吐温 80 1.0g/L，pH 6.5±0.1。

1.1.3 试剂 注射用奥美拉唑钠(江苏奥赛康药业股份有限公司)，BCA 蛋白定量试剂盒丙二醛(MDA)测定试剂盒(碧云天生物技术研究所)，PAS 染色试剂盒、超氧化物歧化酶(SOD) 测定试剂盒、过氧化氢酶(CAT) 测定试剂盒(南京建成生物工程研究所)，阿司匹林(美国 Sigma 公司)，Bcl-2 多克隆抗体(美国 Biovision 公司)，Bax 多克隆抗体(美国 Cell signal 公司)，免疫组化试剂盒(北京中杉公司)。

1.1.4 动物 ICR 小鼠 30 只，雄性，体重(25.0±2.0)g，购自温州医科大学实验动物中心，按随机数字表法分成 3 组，每组各 10 只。

1.2 方法

1.2.1 酪酸梭菌活化与传代 取酪酸梭菌活化后将培养基置于 37℃厌氧培养箱中培养 20h，菌的浓度达 2×10^9cfu/ml。

1.2.2 造模 酪酸梭菌组灌胃 0.3ml 酪酸梭菌培养液/只；模型组和奥美拉唑组均灌胃相同体积的无菌培养基，处理 4d 后饥饿 48h，以 250mg/kg 剂量的阿司匹林灌胃造模[7]。奥美拉唑组造模前 30min 腹腔注射奥美拉唑 13mg/kg。

1.2.3 胃组织获取 将小鼠颈椎脱臼处死，分别结扎贲门，幽门端后取胃，每组 4 只鼠胃置于 10%甲醛中固定 15min，沿胃大弯剪开，0.9%氯化钠溶液冲洗，滤纸吸干水分，拍照。保存至甲醛溶液中，用于后期组织切片与染色观察；剩余胃组织(每组 6 只)用冰 0.9%氯化钠溶液洗净，存于-80℃冰箱，用于后续 SOD、CAT、MDA 指标测定。

1.2.4 溃疡面积测定 将上述固定胃组织展开平置用扫描仪扫描，通过软件 Image-Pro Plus(IPP)6.0 测量胃组织的总面积及出血溃疡面，并计算两者的相对面积比例。

1.2.5 HE 染色 将固定后的胃组织进行常规脱水石蜡包埋，制成病理切片，切片厚度约为 5μm，HE 染色在光镜下观察胃黏膜的组织学变化。

1.2.6 PAS 染色 将石蜡包埋的胃组织标本切片后，行常规 PAS 染色，在光镜下观察胃黏膜的黏液变化情况。

1.2.7 氧化还原指标测定 取出冻存胃组织称重，用冰 0.9%氯化钠溶液制成 10%胃组织匀浆，4℃ 2 500r/min×10min，离心取上清液，采用双缩脲蛋白质定量(BCA)法进行蛋白定量，检测并计算以下各氧化还原指标单位含量。(1)SOD 活力测定采用黄嘌呤氧化酶法：通过黄嘌呤及黄嘌呤氧化酶反应系统产生超氧自由基，后者氧化羟氨形成亚硝酸盐，在显色剂的作用下呈现紫红色，显色后于 550nm 处有最大吸收峰[以吸光度(A)表示]。具体操作按试剂盒说明书进行。(2)CAT 活力测定采用 H_2O_2 法：过氧化氢酶(CAT)分解 H_2O_2 的反应可通过钼酸铵而迅速中止，剩余的 H_2O_2 与钼酸铵作用产生淡黄色的络合物，在 405nm 处测定生成量，可以利用对照管和测定管的 A 值差异即可求出每毫克蛋白 CAT 活力(U/mgprot)。具体操作按试剂盒说明书进行。(3)MDA 含量测定采用硫代巴比妥酸(TBA)法：MDA 与 TBA 缩合，生成红棕色产物，在 532 nm 处有最大吸收峰。根据标准曲线计算获得 MDA 的摩尔浓度(μmol/mgprot)。具体操作按试剂盒说明书进行。

1.2.8 免疫组化法测定 Bcl-2、Bax 表达 将组织切片常规脱蜡后，行枸橼酸抗原修复。分别用 Bcl-2(1:80)、Bax（1:200）一抗 4℃孵育过夜，滴加二抗室温 2h 后，DAB 工作液显色，在显微镜下观察，当出现特异性显色时用蒸馏水终止反应，苏木素复染 10s 左右，PBS 返蓝。最后脱水、透明、中性树脂封片。

1.3 统计学处理

采用 SPSS17.0 统计软件，测得计量资料采用$\bar{x}\pm s$表示，方差齐性者采用 LSD 法分析，不齐者采用 Tamhane's T2 分析，两两比较采用 q 检验。

2 结果

2.1 小鼠胃黏膜损伤情况

见图 1-2。

由图 1 可见，模型组的胃黏膜表面出血明显，呈弥散性。但经酪酸梭菌预防性处理后，黏膜损伤显著减轻，与奥美拉唑的效果相似。

由图 2 可见，经 PPI 软件计算所得的溃疡指数，也

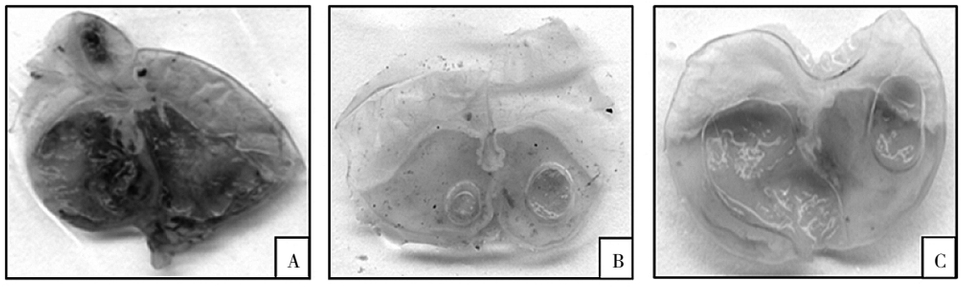
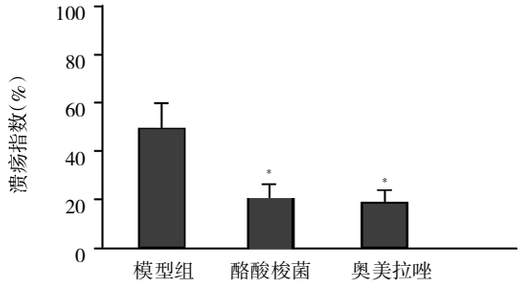


图 1 各组小鼠胃黏膜标本形态(A:模型组;B:酪酸梭菌组;C:奥美拉唑组)



注:与模型组比较,*$P<0.01$

图 2 各组胃黏膜溃疡指数变化

提示模型组黏膜溃疡显著,而酪酸梭菌与奥美拉唑预处理后溃疡指数得到明显改善(均 $P<0.01$)。

2.2 小鼠胃黏膜 HE 染色光镜观察 见图 3。

由图 3 可见,模型组胃黏膜严重缺损,局部坏死脱落,腺体破坏严重。酪酸梭菌组和奥美拉唑组胃黏膜组织较完整,腺体排列较整齐,有少量炎症细胞浸润。

2.3 小鼠胃黏膜 PAS 染色光镜观察 见图 4。

由图 4 可见,模型组胃黏膜黏液层明显变薄。与模型组相比,酪酸梭菌组与奥美拉唑组黏液层显著增厚,

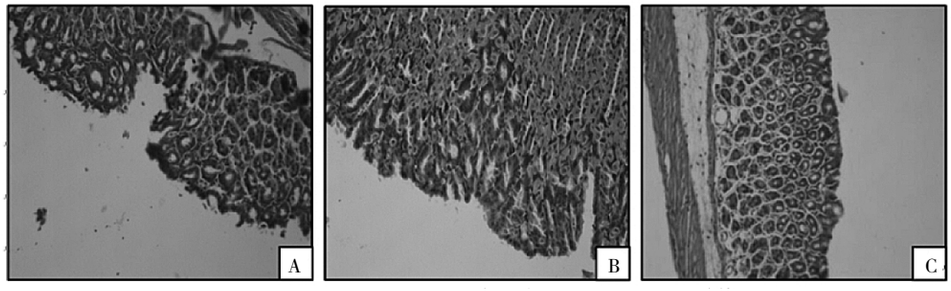


图 3 各组小鼠胃黏膜 HE 染色病理图(A:模型组;B:酪酸梭菌组;C:奥美拉唑组;×200)

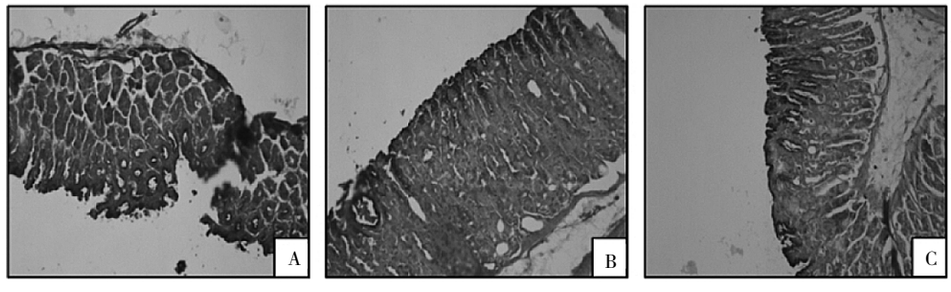


图 4 各组小鼠胃黏膜 PAS 染色病理图(A:模型组;B:酪酸梭菌组;C:奥美拉唑组;×200)

酪酸梭菌组 PAS 甚至略优于奥美拉唑组。

2.4 各组胃组织的 SOD、CAT 活性及 MDA 含量变化 见表 1。

由表 1 可见,阿司匹林处理后,胃组织内的 SOD、CAT 活性明显降低,而 MDA 含量显著升高,在酪酸梭菌预处理后,以上这些变化都得到明显改善(均 $P<0.01$)。

表 1 各组胃组织的 SOD、CAT 活性及 MDA 含量变化

组别	n	SOD(A_{550nm})	CAT(U/mgprot)	MDA(μmol/mgprot)
模型组	6	45.04 ± 11	1.20 ± 0.13	3.56 ± 0.49
酪酸梭菌组	6	73.35 ± 17a	3.16 ± 0.22*	1.67 ± 0.21*
奥美拉唑组	6	81.54 ± 23a	3.29 ± 0.45*	1.41 ± 0.18*

注:与模型组比较,*$P<0.01$

酪酸梭菌组的各项指标较奥美拉唑组无统计学差异。　2.5　胃组织 Bcl-2、Bax 表达情况　见图 5。

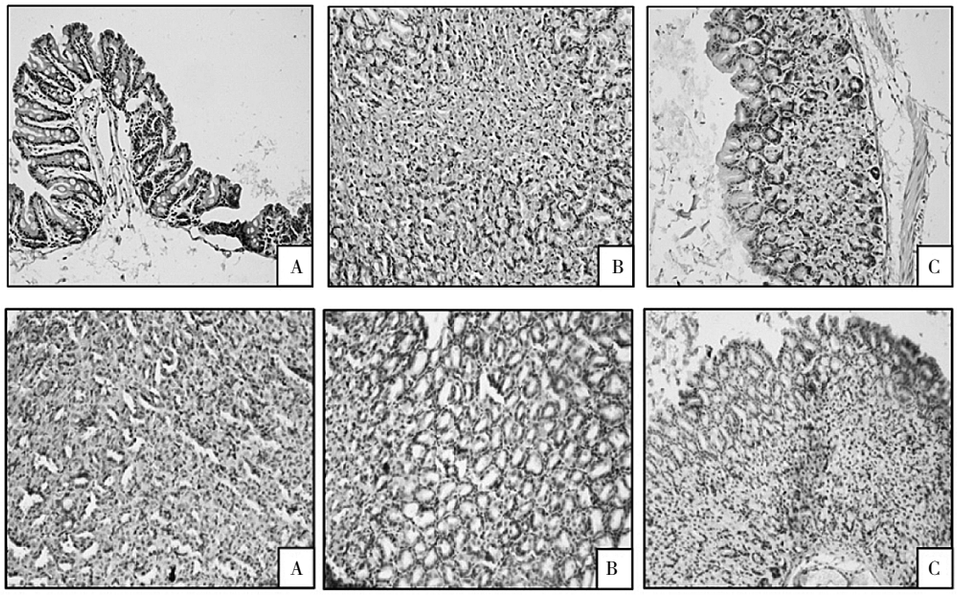


图 5　各组胃组织 Bcl-2，Bax 免疫组化（上排：Bcl-2，下排：Bax；A：模型组，B：酪酸梭菌组，C：奥美拉唑组，×200）

由图 5 可见，模型组 Bcl-2 的表达呈阴性或弱阳性，Bax 呈强阳性。酪酸梭菌处理后 Bcl-2 显著升高、Bax 明显下降，而奥美拉唑组 Bcl-2、Bax 的表达基本都呈阴性或弱阳性。

3　讨论

阿司匹林是临床上广泛应用的 NSAID 类药物，常用于预防及治疗风湿性关节炎和血栓性心血管病。随着人口老龄化的加剧，此类疾病日益增多，阿司匹林的应用越来越广泛，由其诱发的 GU 亦愈发常见。环氧合酶（COX）能够促进胃黏液分泌，增强胃的屏障作用，而阿司匹林抑制了 COX，从而削弱了胃黏膜的屏障功能，造成胃对损伤因素的易感性[8]。在此过程中，有炎症因子的参与如 IL-1β、TNF-α 等[9]，活性氧族（reactive oxygen species，ROS）也是重要的损伤因素[10]。

阿司匹林复制的小鼠 GU 模型，与患者服用 NSAID 类药物造成的 GU，在发病机制及临床表现方面都有高度的拟合性。该模型是研究 NSAID 造成 GU 的机制及筛选防治药物的良好模型[11]。本研究中，我们也成功复制该模型，并发现明显的病理损伤及氧化应激，这与以往的研究相一致[10]。

在本研究中，酪酸梭菌预处理后，能够较明显的缓解阿司匹林所造成 GU。肉眼观察及病理切片结果显示，酪酸梭菌减轻了胃黏膜的损伤程度。阿司匹林造成的 SOD、CAT 含量活性降低以及 MDA 升高，经酪酸梭菌预处理后也得到明显改善。该结果提示，酪酸梭菌可能通过减轻氧化应激实现对胃黏膜的保护作用。在非酒精性肝病的研究中，酪酸梭菌可减少由肝病引起的 ROS 产量，实现对肝脏的保护效应[12]。PAS 染色的结果提示酪酸梭菌能够促进胃黏液的产生，从而保护胃黏膜，这是临床现行的 GU 治疗措施所不具备的特性，在将来的研究中可以更深入的阐述其机制，为临床应用提供理论基础。免疫组化的结果提示酪酸梭菌具有上调 Bcl-2/Bax 比例的能力，提示该菌能够由此发挥抗凋亡作用。

正常人胃液的 pH 值为 1.5~2.0，胃液里的盐酸可以杀死随食物进入胃内的细菌[13]，因此鲜有细菌能在胃内定植。但酪酸梭菌具有较强的抗酸能力，有学者已发现该菌能够在小鼠胃内定植[14]，本研究则发现该菌能从多层面多角度对胃黏膜实施的保护作用，该特点是其他益生菌很难企及的。酪酸梭菌的这种显著效应可能与其代谢产物有关，已有多个中心证实该菌两个主要代谢产物丁酸和氢气均是较为有效的抗氧化物质，而且丁酸是典型的组蛋白去乙酰化酶抑制剂，能够调节基因的表达，这很可能是酪酸梭菌改变 Bcl-2/Bax 比例的主要原因[15-16]。

该菌是临床上常规使用的益生菌，广泛用于治疗肠炎、腹泻、消化不良等疾患，若在临床研究中也能够证实其对胃黏膜的直接保护效应，将是广大 NSAID 服用者

（下转第 1045 页）

beled anti-carcinoembryonic antigen antibody[J]. Nuclear Medicine Communications,2011, 32(2): 147-154.
[5] 张应强,李家平.肝癌放射免疫治疗的研究进展[J].国际医学放射学杂志, 2012,5(1):63 - 65.
[6] 李蓓蕾,陈绍亮,徐兆强,等. 131 碘肿瘤细胞核人鼠嵌合单抗肺癌内直接注射后体内的生物学分布[J]. 复旦学报(医学版),2009,36(4):475-478.
[7] Boerman O C,Koppe M J,Postema E J,et al.Radionuclide therapy of cancer with radiolabeled antibodies[J]. Anticancer Agents Med Chem,2007,7(3):335-343.
[8] 叶胜龙,秦叔逵.原发性肝癌规范化诊治的专家共识[J].肿瘤,2009,29(4):295-304.
[9] Alessandro C, Fabio P, Matteo C, et al. Conditional Survival after Hepatic Resection for Hepatocellular Carcinoma in Cirrhotic Patients[J]. Clin Cancer Res,2012, 18(16):698-711.
[10] Jaoong-won P, Deepark A,Yee C, et al.Consensus recommendations and review by an international expert panel on interventions in hepatocellular carcinima(EPOIHCC)[J].Liver Int,2013,33:327-337.
[11] Yasunori M,Masatoshi K. Radiofrequency Ablation of Hepatocellular Carcinoma A Literature Review[J]. International Journal of Hepatology,2011, 10:10468.
[12] Peng Z W, Zhang Y J, Chen M S, et al. Radiofrequency ablation with or without transcatheter arterial chemoembolization in the treatment of hepatocellular carcinoma:A prospective randomized trial[J].J Clin Oncol,2013,31(2):426-432.
[13] Chen S, YU L, Jiang C, et al. pivotal study of iodine-131-labeled chimeric tumor necrosis treatment radioimmunotherapy in patients with advanced lung cancer[J]. J Clin Oncol, 2005, 23(7): 1538-1547.
[14] 许建林, 袁彬, 梁晓燕,等.^{131}I- chTNT 放射免疫治疗晚期肺癌的疗效观察[J].M odern Oncology,2008,16(9):1526- 1528.

（收稿日期：2014-04-14）
（本文编辑：沈昱平）

（上接第 1040 页）
的福音。

4 参考文献

[1] Wallace J L. Prostaglandins, NSAIDs, and gastric mucosal protection: why doesn't the stomach digest itself[J]. Physiol Rev, 2008, 88(4): 1547-1565.
[2] Darling R L, Romero J J, Dial E J, et al. The effects of aspirin on gastric mucosal integrity, surface hydrophobicity, and prostaglan-din metabolism in cyclooxygenase knockout mice [J]. Gastroenterology,2004,127(1): 94-104.
[3] Duggan J M. Gastrointestinal haemorrhage gastric ulcer, and aspirin abuse [J]. Gut,1969,10(1): 77.
[4] Nakajima N, Matsuura Y. Purification and characterization of konjac glucomannan degrading enzyme from anaerobic human intestinal bacterium, Clostridium butyricum-Clostridium beijerinckii group [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 1997, 61(10): 1739-1742.
[5] 吴恺, 王冰娴, 王兴鹏. 宫入菌对急性坏死性胰腺炎大鼠肠道细菌移居的作用[J]. 世界华人消化杂志, 2000, 8(8): 883-886.
[6] 朱晓慧, 唐宝英, 刘佳. 酪酸菌对肠道有益菌的增殖作用和共生关系研究[J]. 中国微生态学杂志, 2005,16(4): 193-194.
[7] 丁顺, 王昕. 生姜对阿司匹林诱发胃溃疡大鼠的胃粘膜保护作用研究[J]. 中国民族民间医药, 2012, 21(21):22,24.
[8] Laine L, Takeuchi K, Tarnawski A. Gastric mucosal defense and cytoprotection: bench to bedside [J]. Gastroenterology, 2008, 135(1): 41-60.
[9] Santucci L, Fiorucci S, Di M F M, et al. Role of tumor necrosis factor alpha release and leukocyte margination in indomethacin-induced gastric injury in rats[J]. Gastroenterology, 1995, 108(2): 393-401.
[10] Das S K, Roy C. The protective role of Aegle marmelos on aspirin-induced gastro-duodenal ulceration in albino rat model: a possible involvement of antioxidants[J]. Saudi J Gastroenterol, 2012, 18(3): 188-194.
[11] Astudillo L, Rodriguez J A, Schmeda-Hirschmann G. Gastroprotective activity of oleanolic acid derivatives on experimentally induced gastric lesions in rats and mice [J]. J Pharm Pharmacol, 2002, 54(4): 583-588.
[12] Endo H, Niioka M, Kobayashi N, et al. Butyrate-producing probiotics reduce nonalcoholic fatty liver disease progression in rats: new insight into the probiotics for the gut-liver axis [J]. PLoS One, 2013, 8(5): e63388.
[13] 张芝颖,王欣然,韩斌如. 胃 - 肺感染途径致呼吸机相关性肺炎研究进展[J]. 中华护理杂志,2005,(8):625-628
[14] Takahashi M, Taguchi H, Yamaguchi H, et al. Studies of the effect of Clostridium butyricum on Helicobacter pylori in several test models including gnotobiotic mice [J]. J Med Microbiol, 2000,49(7): 635-642.
[15] Ohira H, Fujioka Y, Katagiri C, et al. Butyrate attenuates inflammation and lipolysis generated by the interaction of adipocytes and macrophages[J]. J Atheroscler Thromb, 2013, 20(5): 425-442.
[16] Buchholz B M, Kaczorowski D J, Sugimoto R, et al. Hydrogen inhalation ameliorates oxidative stress in transplantation induced intestinal graft injury[J]. Am J Transplant, 2008, 8(10): 2015-2024.

（收稿日期：2014-12-18）
（本文编辑：沈昱平）