

DOI: 10.3969/j.issn.1671-9638.2018.12.018

· 综述 ·

## 肠道微生物群和免疫反应在艰难梭菌感染中的作用研究进展

# Role of intestinal microbiota and immune response in *Clostridium difficile* infection

赵杏珍(ZHAO Xing-zhen)<sup>1</sup>, 杨靖(YANG Jing)<sup>1,2</sup>, 赵建宏(ZHAO Jian-hong)<sup>1,2</sup>

(1 河北医科大学第二医院, 河北 石家庄 050000; 2 河北省临床检验中心, 河北 石家庄 050000)

(1 The Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China; 2 Hebei Provincial Center for Clinical Laboratory, Shijiazhuang 050000, China)

[关键词] 艰难梭菌; 感染; 肠道微生物群; 免疫反应

[中图分类号] R378.8 [文献标识码] A [文章编号] 1671-9638(2018)12-1117-05

艰难梭菌是一种革兰阳性厌氧芽孢杆菌。近年来由于高产毒株 027/NAP1/BI 型艰难梭菌在欧美地区的暴发流行, 艰难梭菌感染(*Clostridium difficile* infection, CDI)的严重程度和发病率急剧上升<sup>[1]</sup>。在美国, 艰难梭菌已经取代耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)成为医院感染的首要病原菌, 因此其将艰难梭菌的威胁等级定为最高“紧急”级别。CDI 的临床表现可从无症状定植到轻度自限性腹泻或重度假膜性肠炎甚至危及生命。其临床症状的发生发展主要取决于两个方面, 一是艰难梭菌的毒力, 二是宿主肠道微生物群及免疫反应。毒素是艰难梭菌最主要的毒力因子, 包括毒素 A(TcdA)和毒素 B(TcdB), 两者均能灭活 GTP 结合蛋白, 引发一系列反应最终导致腹泻和肠炎<sup>[2-3]</sup>。此外, 某些特殊型别的菌株如 027/NAP1/BI 还能产生二元毒素, 与 CDI 的高发病率和病死率相关<sup>[4]</sup>。黏附是艰难梭菌另一项重要的毒力因素, 参与黏附的物质有很多, 如艰难梭菌表面蛋白、鞭毛等均可参与细菌黏附过程<sup>[5-8]</sup>。不管是毒素还是细菌表面成分均可引起免疫反应, 如炎性介质释放、免疫效应细胞趋化等。肠道微生物群在 CDI 过程中也是至关重要的, 一旦微生物群平衡被破坏, 便可促进肠道内艰难梭菌芽孢的萌发、

生长、繁殖、定植、产毒。目前, 在中国和其他许多亚洲国家, CDI 尚未引发暴发流行, 但人们对 CDI 的重视程度不够, 国内关于 CDI 的研究数据非常有限。因此, 本文就艰难梭菌的致病过程及肠道微生物群和免疫反应在 CDI 发生发展过程中的作用予以综述。

### 1 CDI 的致病过程

肠道微生物群失衡为 CDI 创造了有利条件, 其致病过程可分为以下步骤: 芽孢经粪-口途径进入肠道, 继而萌发成繁殖体; 繁殖体生长繁殖, 并定植于肠道; 艰难梭菌分泌毒素 A 和 B, 个别型别的艰难梭菌还可以产生二元毒素。毒素 A 和毒素 B 均为单糖基转移酶, 分别由 *tcdA* 和 *tcdB* 基因编码, 两者均可灭活 Rho GTP 酶家族中的 Rho、Rac 及 Cdc4, 从而破坏细胞骨架及紧密连接, 使细胞变圆、破裂、死亡<sup>[2]</sup>。这一过程可严重损伤上皮细胞屏障的完整性, 使其通透性增加、液体分泌增多, 从而损伤肠道。与此同时, 毒素还能诱发一系列免疫反应。免疫细胞释放的炎症介质趋化中性粒细胞聚集, 进一步损伤肠道, 最终导致腹泻和肠炎<sup>[3]</sup>。

黏附功能在定植及致病过程中也起着重要作用

[收稿日期] 2017-11-29

[基金项目] 河北省自然科学基金(H2013206450); 河北省科技厅基础条件平台建设项目(10966142D); 河北医科大学第二医院科研基金(2h2201605)

[作者简介] 赵杏珍(1991-), 女(汉族), 河北省邢台市人, 初级检验师, 主要从事细菌感染性病原体的检测与流行病学研究。

[通信作者] 赵建宏 E-mail: zhaojh\_2002@yahoo.com

用。介导艰难梭菌和肠道相互作用的主要物质是细菌表面蛋白,也叫细胞壁蛋白(cell wall protein, Cwp),包括 S 层蛋白(S-layer protein, SLP)、黏附素 Cwp66 和半胱氨酸蛋白酶 Cwp84 等。SLP 是细菌表面最主要的物质,能够在细菌表面紧密排列形成晶体层,SLP 又分为低分子量 SLP(low-molecular weight S-layer protein, LMW-SLP)和高分子量 SLP(high-molecular weight S-layer protein, HMW-SLP)。前者暴露于细菌表面参与黏附过程;后者固定于细胞壁,可结合细胞外基质蛋白,如胶原蛋白 I、血小板反应蛋白和玻璃体结合蛋白等,促进艰难梭菌结合到人体肠道<sup>[6]</sup>。半胱氨酸蛋白酶 Cwp84 同样位于细菌表面,其 N 端有蛋白水解位点,C 端锚定在细胞壁上。Cwp84 能将前体 SlpA(S-layer protein A, SlpA)分解为上述两种 SLPs。此外,它还能降解细胞外基质蛋白,如纤维蛋白、层黏连蛋白和玻璃体结合蛋白,促进细菌扩散<sup>[7]</sup>。Cwp66 蛋白也具有黏附功能,其 C 端暴露于细菌表面,具有高度变异性和免疫原性,N 端锚定于细胞壁,菌种间保守。其他表面蛋白还包括:纤维连接蛋白结合蛋白 Fbp68,位于细菌表面,参与细菌黏附于纤维连接蛋白和上皮细胞,不同菌种间保守并有高度免疫原性<sup>[6]</sup>;热休克蛋白 GroEL 是细菌热休克后释放到细胞外的一种物质,菌种间高度保守,具有细胞黏附作用<sup>[8]</sup>;胶原蛋白结合蛋白 CbpA 的 N 端有胶原结合位点,位于细菌表面<sup>[9]</sup>;脂蛋白具有高度黏附能力和免疫原性<sup>[10]</sup>。

此外,艰难梭菌还可分泌一些蛋白促进其扩散,如分泌型锌金属蛋白酶能清除宿主体内某些蛋白,如 IgA 抗体、纤维蛋白原及纤维连接蛋白,破坏体内纤连蛋白网<sup>[11-12]</sup>。另外,许多艰难梭菌都具有运动力。艰难梭菌的鞭毛不仅参与定植、黏附和生物膜形成等过程,还具有免疫原性<sup>[13]</sup>。

## 2 肠道微生物群在 CDI 过程中的作用

抗菌药物暴露、年龄、炎症性肠病、化学治疗、使用质子泵抑制剂等都是引发 CDI 的危险因素<sup>[14]</sup>,且这些危险因素均与肠道菌群多态性及种类的改变有关,提示肠道微生物群在 CDI 过程中发挥着重要作用,主要包括两点:定植抵抗和代谢调节。

**2.1 肠道微生物群的定植抵抗作用** 肠道微生物群可以有效抵抗艰难梭菌定植、扩散。正常小鼠肠道内微生物种类高达 60 种,其中拟杆菌门和厚壁菌

门数量最多。目前,尚未确定真正发挥定植抵抗作用的特异性菌种。但研究<sup>[15]</sup>发现,经克林霉素处理后的小鼠,其肠道微生物群中发生明显改变的菌种有肠杆菌科、肠球菌属、毛螺菌科,提示以上 3 科/属菌种可能与定植抵抗相关。肠道微生物群对艰难梭菌的定植抵抗包括直接作用和间接作用。前者指共生菌与艰难梭菌之间的直接作用,如竞争生存空间、营养素或者共生菌分泌细菌素抑制艰难梭菌定植<sup>[16-20]</sup>。如 Rea 等<sup>[20]</sup>通过对人体末端结肠模型的研究发现苏云金菌素 CD 对艰难梭菌有很好的抑制作用,同时对其他共生菌无影响,提示细菌素可以作为 CDI 新的治疗方法。间接作用指肠道微生物群通过调节代谢影响艰难梭菌生长。如肠道内一些共生菌可以自由分泌唾液酸酶促使上皮细胞分泌唾液酸入肠道,唾液酸作为共生菌的能量来源被利用。而长期服用抗菌药物可使肠道内共生菌丰度降低,唾液酸等代谢产物增多,从而促进艰难梭菌的生长<sup>[16]</sup>。以上研究均证明肠道微生物群与艰难梭菌定植之间有着紧密的联系,但是两者之间具体明确的关系尚不清楚。Buffie 等<sup>[21]</sup>通过建立数学模型对抗菌药物处理的小鼠模型进行分析,结果发现 Scindens 梭菌与艰难梭菌定植高度相关。Kinnebrew 等<sup>[14]</sup>采用相同的方法对一位接受造血干细胞移植的艰难梭菌肠炎患者的肠道菌群组分进行分析,同样发现 Scindens 梭菌与艰难梭菌定植密切相关。可能是因为 Scindens 梭菌的染色体上有胆酸诱导操纵子(bile acid inducible, bai),能够编码脱羧基酶调节初级胆盐转化为次级胆盐<sup>[22]</sup>,而次级胆盐可以抑制艰难梭菌芽孢萌发。再次证实了肠道微生物群在定植抵抗中的重要作用。

### 2.2 肠道微生物群的代谢调节作用

**2.2.1 胆盐代谢** 除了上述定植抵抗机制外,肠道微生物群还可以通过调节代谢影响艰难梭菌的生长。初级胆盐,如牛磺胆酸和甘氨酸胆酸,是艰难梭菌芽孢的萌发剂,可促进芽孢转化为繁殖体;相反,次级胆盐鹅脱氧胆酸能抑制芽孢萌发<sup>[23]</sup>。研究<sup>[24]</sup>发现抗菌药物作用后,微生物群的变化可以增加盲肠内牛磺胆酸盐含量,降低脱氧胆酸盐含量从而促进艰难梭菌萌发。Buffie 等<sup>[21]</sup>将经抗菌药物处理后的小鼠盲肠内容物移植到试验小鼠体内,结果显示艰难梭菌在其体内扩散增强;将不经处理的且次级胆盐含量较多的小鼠盲肠内容物移植到试验小鼠体内,发现该小鼠对艰难梭菌的抵抗能力增强。同时还发现,通过移植四种菌也可以达到抵抗能力增强

的效果,其中最重要的就是 *Scindens* 梭菌。以上结果均可证实胆盐代谢在艰难梭菌生长繁殖中的重要作用。

**2.2.2 碳水化合物发酵** 肠道微生物发酵食物可以生成短链脂肪酸(short chain fatty acid, SCFA),如乙酸、丙酸、丁酸等。有研究<sup>[25]</sup>发现在服用抗菌药物的人体内或者是经抗菌药物处理的动物模型中,短链脂肪酸含量均减少,提示短链脂肪酸可能与 CDI 有关。具体机制可能有两种:一是当短链脂肪酸浓度降低时,pH 值升高,提示短链脂肪酸可能是通过改变肠道的 pH 值进而影响艰难梭菌的生长;二是通过丁酸发挥作用。丁酸具有抗炎作用,能够降低细胞通透性,从而增加肠道内抗菌肽含量和黏液量,毛螺菌科和疣微菌科均能产生丁酸,并且这两种菌科在住院的 CDI 高危人群以及 CDI 患者粪便中均显著减少<sup>[26-29]</sup>。目前,一些研究虽然都通过动物模型对短链脂肪酸在 CDI 中的作用进行了评估,但结果却不尽相同。其具体的机制还有待进一步确证。

**2.3 肠道微生物群与 CDI 的治疗** 肠道微生物群除了能够很好地降低宿主艰难梭菌感染的敏感性外,还可以治疗 CDI。粪便菌群移植(fecal microbiota transplantation, FMT)就是将健康人的粪便处理后再移植到 CDI 患者肠道内,用于修复患者肠道微生物群的失衡,从而达到治疗 CDI 的作用。此外,FMT 治疗后患者肠道微生物群稳态的恢复还可以防止万古霉素治疗后 CDI 的复发。目前关于 FMT 的动物实验较为热门,一项来自新英格兰医学杂志的报道<sup>[30]</sup>显示,FMT 用于治疗复发性 CDI 患者的治愈率高达 90%,再次证实了肠道微生物群对艰难梭菌的抵抗和治疗作用。但是对于初发性 CDI, FMT 的治疗效果如何尚不清楚。另外,移植未知菌种后给患者带来的长期风险尚不可知。因此,随着测序技术的不断发展,FMT 未来的发展方向应该是快速的靶向细菌治疗,即锁定某一种或者几种已知的菌种治疗 CDI,不仅可以重新恢复正常菌群,还可以最大程度地限制副作用。Zhang 等<sup>[31]</sup>采用二代测序技术对不同人群进行了研究,结果发现无症状携带者粪便样本中变形菌门较 CDI 患者少,但是双歧杆菌科丰度很高,而双歧杆菌在 CDI 患者粪便样本中是绝对缺乏的。这些数据提示相比于整个肠道微生物群的多态性,某种微生物种类的存在或缺失对于判断 CDI 敏感性或治疗更重要。但由于肠道微生物群在不同个体间的差异使得寻找

到具有 CDI 生物标记作用或具有定植抵抗作用特定菌种的过程更具挑战性。

### 3 免疫反应在艰难梭菌感染过程中的双重作用

宿主对抗艰难梭菌有 3 道防线:肠道上皮细胞屏障、固有免疫屏障、获得性免疫屏障。艰难梭菌在肠道定植后释放毒素 A 和毒素 B 破坏上皮细胞屏障,随后毒素可直接作用于黏膜细胞和免疫细胞,激活炎症信号引发级联反应,刺激肠道上皮细胞释放炎症因子,如白细胞介素(IL)-8、 $\gamma$  干扰素(IFN- $\gamma$ )、炎症性巨噬细胞蛋白-2(MIP-2)、前列腺素 2(PGE 2)、生长相关原癌基因(GRO $\alpha$ )和单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)<sup>[32]</sup>。与此同时,艰难梭菌表面蛋白被宿主肠道内蛋白识别受体识别,两者结合后刺激免疫细胞释放 IL-6、IL-8、IL-10、IL-12、IL-23、肿瘤坏死因子(TNF)- $\alpha$  和 IFN- $\gamma$ ,最终这些促炎症因子和趋化因子能够使中性粒细胞、免疫细胞及防御因子聚集,从而引发一系列免疫反应。适应性免疫反应是抵抗艰难梭菌的最后一道防线,毒素及艰难梭菌表面蛋白都可以引发机体产生特异性抗体,如抗表面蛋白和毒素 A 的 IgG、抗毒素 B 的 IgA 等<sup>[32]</sup>,从而更好的保护宿主。目前针对艰难梭菌毒素的类毒素疫苗正在研究中,用于保护宿主肠道上皮细胞免于毒素损伤。一直以来 CDI 过程中宿主免疫反应所起作用的利弊均有争议,最新研究表明其保护性和致病性同时存在。

**3.1 免疫反应的保护作用** 免疫反应的实质是一种自我保护的防御机制。非特异性免疫细胞和免疫因子的聚集以及特异性抗体的释放在 CDI 过程中均发挥着重要作用。许多 CDI 动物模型的研究结果均显示免疫系统的缺失对机体本身是不利的<sup>[33]</sup>。瘦素(leptin, LP)是一种和免疫调节相关的激素,能够增强机体清除艰难梭菌的能力,以及增加免疫调节因子释放的作用。此外,固有淋巴细胞,特别是 1 群淋巴细胞释放的  $\gamma$ -干扰素, I 型促炎性细胞因子能够降低 CDI 患者的病死率,IL-22、17 型促炎性细胞因子能够提高 CDI 患者的存活率。此外 IL-22 还能够增强免疫细胞的吞噬作用,限制病原菌转移<sup>[34-35]</sup>。以上结论均可证实免疫反应在 CDI 过程的有利作用。

**3.2 免疫反应的致病作用** 适当的免疫反应对机体有保护作用,但是当免疫反应过激时同样也可以对机体造成损伤。活性氧(reactive oxygen species,

ROS)是毒素刺激机体后产生的,ROS 能够参与信号通路介导生成 IL-8 等免疫因子,但是 ROS 本身也能损伤肠道<sup>[36]</sup>。Feghaly 等<sup>[38]</sup>通过检测 CDI 患者粪便中的细胞因子含量发现免疫反应的强弱和 CDI 的严重程度及持续时间密切相关。近期相关研究<sup>[37-38]</sup>也表明体内一些炎症标志物的增多可准确预测患者的不良预后。例如趋化因子配体-5(CXCL5)和 IL-8 作为免疫调节因子,能趋化中性粒细胞,但是 CXCL5 和 IL-8 水平增高也可减缓 CDI 患者病情的康复。此外,IL-8 表达增多与 CDI 复发增加相关,再次证明过度的免疫反应会加重 CDI。Buonomo 等<sup>[39]</sup>的研究证实了细胞因子 IL-23 也能够增加 CDI 的严重程度,该研究发现,缺乏 IL-23 的小鼠,其 CDI 的致病率和病死率明显下降,提示 CDI 过程中,IL-23 能够扰乱免疫环境,造成肠道损伤。总之,以上研究均证实了在 CDI 过程中,一些免疫因子确实能对机体造成更严重的损伤。因此,从免疫反应过程中寻找治疗 CDI 的突破点成为当前炙手可热的研究方向。例如通过激活或者抑制固有免疫反应中某种信号通路达到减少有害炎症因子的释放等。

#### 4 总结和展望

CDI 在全球范围内已经成为临床、公共卫生和基础研究等多个领域广为关注的问题。更多地了解 CDI 过程能够为后续的预防和治疗提供新的思路。长期使用抗菌药物可以对肠道菌群造成不可估量的损害,所以临床应严格把控抗菌药物的使用指征。此外,FMT、干预免疫反应通路、类毒素疫苗等都为 CDI 的治疗和预防带来了新的曙光。

#### [参考文献]

[1] He M, Miyajima F, Roberts P, et al. Emergence and global spread of epidemic healthcare-associated *Clostridium difficile* [J]. Nat Genet, 2013, 45(1): 109 - 113.

[2] Rineh A, Kelso MJ, Vatansever F, et al. *Clostridium difficile* infection: molecular pathogenesis and novel therapeutics [J]. Expert Rev Anti Infect Ther, 2014, 12(1): 131 - 150.

[3] Bobo LD, El Feghaly RE, Chen YS, et al. MAPK-activated protein kinase 2 contributes to *Clostridium difficile*-associated inflammation[J]. Infect Immun, 2013, 81(3): 713 - 722.

[4] Cheng JW, Xiao M, Kudinha T, et al. Molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of *Clostridium difficile* isolates from a university teaching hospital in China[J]. Front

Microbiol, 2016, 7: 1621.

[5] Duan Q, Zhou M, Zhu L, et al. Flagella and bacterial pathogenicity[J]. J Basic Microbiol, 2013, 53(1): 1 - 8.

[6] Lynch M, Walsh TA, Marszalowska I, et al. Surface layer proteins from virulent *Clostridium difficile* ribotypes exhibit signatures of positive selection with consequences for innate immune response[J]. BMC Evol Biol, 2017, 17(1): 90.

[7] Chapetón Montes D, Collignon A, Janoir C. Influence of environmental conditions on the expression and the maturation process of the *Clostridium difficile* surface associated protease Cwp84[J]. Anaerobe, 2013, 19(1): 79 - 82.

[8] Péchiné S, Denève-Larrazet C, Collignon A. *Clostridium difficile* adhesins[J]. Methods Mol Biol, 2016, 1476: 91 - 101.

[9] Tulli L, Marchi S, Petracca R, et al. CbpA: a novel surface exposed adhesin of *Clostridium difficile* targeting human collagen[J]. Cell Microbiol, 2013, 15(10): 1674 - 1687.

[10] Kovacs-Simon A, Leuzzi R, Kasendra M, et al. Lipoprotein CD0873 is a novel adhesin of *Clostridium difficile* [J]. J Infect Dis, 2014, 210(2): 274 - 284.

[11] Cafardi V, Biagini M, Martinelli M, et al. Identification of a novel zinc metalloprotease through a global analysis of *Clostridium difficile* extracellular proteins[J]. PLoS One, 2013, 8(11): e81306.

[12] Hensbergen PJ, Klychnikov OI, Bakker D, et al. A novel secreted metalloprotease (CD2830) from *Clostridium difficile* cleaves specific proline sequences in LPXTG cell surface proteins[J]. Mol Cell Proteomics, 2014, 13(5): 1231 - 1244.

[13] Ghose C, Eugenis I, Sun X, et al. Immunogenicity and protective efficacy of recombinant *Clostridium difficile* flagellar protein FliC[J]. Emerg Microbes Infect, 2016, 5: e8.

[14] Kinnebrew MA, Lee YJ, Jenq RR, et al. Early *Clostridium difficile* infection during allogeneic hematopoietic stem cell transplantation[J]. PLoS One, 2014, 9(3): e90158.

[15] Britton RA, Young VB. Role of the Intestinal microbiota in resistance to colonization by *Clostridium difficile* [J]. Gastroenterology, 2014, 146(6): 1547 - 1553.

[16] Ng KM, Ferreyra JA, Higginbottom SK, et al. Microbiota-liberated host sugars facilitate post-antibiotic expansion of enteric pathogens[J]. Nature, 2013, 502(7469): 96 - 99.

[17] Maltby R, Leatham-Jensen MP, Gibson T, et al. Nutritional basis for colonization resistance by human commensal *Escherichia coli* strains HS and Nissle 1917 against *E. coli* O157: H7 in the mouse intestine [J]. PLoS One, 2013, 8(1): e53957.

[18] Theriot CM, Koenigsnecht MJ, Carlson PE Jr, et al. Antibiotic-induced shifts in the mouse gut microbiome and metabolome increase susceptibility to *Clostridium difficile* infection [J]. Nat Commun, 2014, 5: 3114.

[19] Jump RL, Polinkovsky A, Hurless K, et al. Metabolomics analysis identifies intestinal microbiota-derived biomarkers of colonization resistance in clindamycin-treated mice [J]. PLoS

- One, 2014, 9(7): e101267.
- [20] Rea MC, Dobson A, O'Sullivan O, et al. Effect of broad- and narrow-spectrum antimicrobials on *Clostridium difficile* and microbial diversity in a model of the distal colon[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, 108(Suppl 1): 4639 - 4644.
- [21] Buffie CG, Bucci V, Stein RR, et al. Precision microbiome reconstitution restores bile acid mediated resistance to *Clostridium difficile*[J]. Nature, 2015, 517(7533): 205 - 208.
- [22] Ridlon JM, Hylemon PB. Identification and characterization of two bile acid coenzyme A transferases from *Clostridium scindens*, a bile acid 7 $\alpha$ -dehydroxylating intestinal bacterium[J]. J Lipid Res, 2012, 53(1): 66 - 76.
- [23] Winston JA, Theriot CM. Impact of microbial derived secondary bile acids on colonization resistance against *Clostridium difficile* in the gastrointestinal tract[J]. Anaerobe, 2016, 22(5): 44 - 50.
- [24] Theriot CM, Young VB. Interactions between the gastrointestinal microbiome and *Clostridium difficile* [J]. Annu Rev Microbiol, 2015, 69: 445 - 461.
- [25] Ross CL, Spinler JK, Savidge TC, et al. Structural and functional changes within the gut microbiota and susceptibility to *Clostridium difficile* infection[J]. Anaerobe, 2016, 41: 37 - 43.
- [26] Gu S, Chen Y, Zhang X, et al. Identification of key taxa that favor intestinal colonization of *Clostridium difficile* in an adult Chinese population[J]. Microbes Infect, 2016, 18(1): 30 - 38.
- [27] Antharam VC, Li EC, Ishmael A, et al. Intestinal dysbiosis and depletion of butyrogenic bacteria in *Clostridium difficile* infection and nosocomial diarrhea[J]. J Clin Microbiol, 2013, 51(9): 2884 - 2892.
- [28] Schubert AM, Rogers MA, Ring C, et al. Microbiome data distinguish patients with *Clostridium difficile* infection and non-*C. difficile*-associated diarrhea from healthy controls[J]. MBio, 2014, 5(3): e01021 - 14.
- [29] Vincent C, Stephens DA, Loo VG, et al. Reductions in intestinal Clostridiales precede the development of nosocomial *Clostridium difficile* infection[J]. Microbiome, 2013, 1(1): 18.
- [30] 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.
- [31] Zhang L, Dong D, Jiang C, et al. Insight into alteration of gut microbiota in *Clostridium difficile* infection and asymptomatic *C. difficile* colonization[J]. Anaerobe, 2015, 34: 1 - 7.
- [32] Péchiné S, Collignon A. Immune responses induced by *Clostridium difficile*[J]. Anaerobe, 2016, 41: 68 - 78.
- [33] Madan R, Guo X, Naylor C, et al. Role of leptin-mediated colonic inflammation in defense against *Clostridium difficile* colitis[J]. Infect Immun, 2014, 82(1): 341 - 349.
- [34] Abt MC, Lewis BB, Caballero S, et al. Innate immune defenses mediated by two ILC subsets are critical for protection against acute *Clostridium difficile* infection[J]. Cell Host Microbe, 2015, 18(1): 27 - 37.
- [35] Geiger TL, Abt MC, Gasteiger G, et al. Nfil3 is crucial for development of innate lymphoid cells and host protection against intestinal pathogens[J]. J Exp Med, 2014, 211(9): 1723 - 1731.
- [36] Frädrieh C, Beer LA, Gerhard R. Reactive oxygen species as additional determinants for cytotoxicity of *Clostridium difficile* toxins A and B[J]. Toxins (Basel), 2016, 8(1): E25.
- [37] El Feghaly RE, Stauber JL, Deych E, et al. Markers of intestinal inflammation, not bacterial burden, correlate with clinical outcomes in *Clostridium difficile* infection[J]. Clin Infect Dis, 2013, 56(12): 1713 - 1721.
- [38] El Feghaly RE, Stauber, JL, Tarr PI, et al. Intestinal inflammatory biomarkers and outcome in pediatric *Clostridium difficile* infections[J]. J Pediatr, 2013, 163(6): 1697 - 1704.
- [39] Buonomo EL, Madan R, Pramoongjago P, et al. Role of interleukin 23 signaling in *Clostridium difficile* colitis[J]. J Infect Dis, 2013, 208(6): 917 - 920.

(本文编辑:张莹、陈玉华)