

# 不同分期溃疡性结肠炎患者黏膜相关菌群的变化及意义

褚源,王巧民

**摘要** 目的 研究活动期、缓解期溃疡性结肠炎(UC)患者肠黏膜标本中梭菌属、肠球菌属、乳酸杆菌属、双歧杆菌属及拟杆菌属、大肠杆菌属这6种菌群含量,探讨肠道膜菌群改变在UC发病中的可能作用及意义。方法 收集35例UC患者(活动期组20例、缓解期组15例)及20例健康体检者(对照组)乙状结肠黏膜活检组织,提取标本细菌DNA,根据细菌的16S rDNA序列设计特异性引物,应用实时荧光定量PCR法测定不同细菌的数量。结果 与对照组相比,活动期组的肠黏膜标本中大肠杆菌含量增加,双歧杆菌属、拟杆菌属、乳酸杆菌属、梭菌属含量减少( $P < 0.05$ ),但肠球菌属含量无明显变化;与对照组比较,缓解期组拟杆菌属及双歧杆菌属减少( $P < 0.05$ ),大肠杆菌属、乳酸杆菌属、梭菌属、肠球菌属含量无明显变化。活动期组患者双歧杆菌/大肠杆菌(B/E)值 $< 1$ ,较对照组降低,而缓解期组与对照组B/E值均 $> 1$ ,且两者间差异无统计学意义。结论 UC患者结肠黏膜存在明显的菌群变化,以活动期UC更明显,提示肠道菌群改变与UC发生发展密切相关。

**关键词** 溃疡性结肠炎;黏膜相关菌群;实时荧光定量PCR  
中图分类号 R 574

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)10-1444-04

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是一种慢性、非特异性肠道疾病,其病因及发病机制目前尚不明确,近年来研究<sup>[1]</sup>提示肠道菌群可能是参与UC发病的始动因素。肠道菌群包括腔菌群和黏膜相关菌群,目前针对UC与肠道菌群关系的研究主要集中在粪便标本,国内外对UC患者黏膜相关菌群研究报道相对较少。该研究选取人体肠道中的6种代表菌属,包括双歧杆菌属、梭菌属、肠球菌属、乳酸杆菌属、拟杆菌属、肠杆菌属,根据不同细菌种属的16S rDNA基因序列设计特异性引物,采用实时荧光定量PCR法分别对活动期、缓解期及健康志愿者乙状结肠黏膜标本中6种菌群进行定量分析,比较不同时期UC患者黏膜相关菌群的变化。

2014-05-06 接收

基金项目:安徽省卫生厅医学科研课题(编号:13zc031)

作者单位:安徽医科大学附属省立医院消化内科,合肥 230001

作者简介:褚源,女,硕士研究生;

王巧民,女,主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail:

wqmin928@163.com

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 研究对象** 以2012年中华医学会消化病学分会炎症性肠病治疗学组制定的《我国炎症性肠病诊断与治疗的共识意见》作为诊断标准<sup>[2]</sup>,连续选取2013年4月~2013年8月安徽医科大学附属省立医院消化科门诊及住院的UC患者35例,其中活动期UC患者20例作为活动期组,年龄18~54( $39.0 \pm 10.1$ )岁,其中男11例,女9例;缓解期UC患者15例作为缓解期组,年龄27~53( $39.0 \pm 7.2$ )岁,其中男7例,女8例。以无慢性消化道疾病的健康志愿者20例作为对照组,年龄20~57( $41.45 \pm 10.25$ )岁,其中男9例,女11例。排除标准:年龄 $< 18$ 岁;近4周内使用微生态制剂、抗生素者及柳氮磺吡啶者;有腹部手术史者;有心血管、呼吸、肾脏等其他系统的严重疾病者。所有研究对象检查前签署知情同意书。

**1.1.2 标本采集** 由同一名有经验的内镜医师对UC患者及健康志愿者进行结肠镜检查,在结肠镜检查结束后退镜时使用一次性活检钳在乙状结肠钳取3块新鲜组织,放入1.5 ml EP管并用1 ml PBS缓冲液洗涤3次,称重,置入新的无菌EP管内, $-80^{\circ}\text{C}$ 保存待检。

**1.1.3 主要仪器、试剂及标准菌株** 2720普通PCR扩增仪、ABI 7500实时荧光定量PCR仪(美国ABI公司); $-80^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱(日本SANYO公司);低温高速离心机(珠海黑马医学仪器有限公司);电泳仪及紫外透射仪凝胶成像分析系统(美国BIO RAD公司);QIAamp DNA Mini Kit、QIAamp DNA Micro Kit(德国QIAGEN公司);普通DNA产物纯化试剂盒(美国AXYGEN公司);UltraSYBR Mixture(北京世纪康为生物科技有限公司);普通PCR试剂(美国Thermo Scientific公司);双歧杆菌、嗜酸乳杆菌、大肠杆菌、粪肠球菌、产气荚膜梭菌、脆弱拟杆菌标准菌株购自广州环凯微生物科技有限公司 $4^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 引物的设计与合成** 参阅文献<sup>[3-5]</sup>报道,设

计特异性 PCR 引物序列,在 BLAST 基因库内比对其特异性,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。见表 1。

表 1 6 种菌株引物序列

细菌名称	扩增片段长度(bp)	引物序列(5'-3')
肠球菌属	144	上游:5'-CCCTTATTGTTACTTGCCATCATT-3' 下游:5'-ACTCGTTGACTTCCCATTGT-3'
双歧杆菌属	243	上游:5'-TCGCGTCCGGTGTGAAAG-3' 下游:5'-CCACATCCAGCATCCAC-3'
梭菌属	260	上游:5'-TGAAAGATGGCATCATCAAC-3' 下游:5'-GGTACCGTCATTATCTTCCCAA-3'
乳酸杆菌属	341	上游:5'-AGCAGTAGGGAATCTTCCA-3' 下游:5'-CACCGCTACACATGGAG-3'
大肠杆菌	340	上游:5'-GTTAATACCTTTGCTGATTGA-3' 下游:5'-ACCAGGGTATCTTAATCTGTT-3'
拟杆菌属	175	上游:5'-GCGGGCATGCGACCGACAAT-3' 下游:5'-TAGCGGGCCGAGGGAACTA-3'

**1.2.2 标准菌株、黏膜标本 DNA 的提取** 标准菌株冻干粉接种于相应培养基,按细菌的生长条件分别置于需氧培养箱和厌氧培养箱中,进行复苏、培养。连续培养 1 代后,挑取单一的细菌菌落,用 QIAamp DNA Mini Kit 试剂盒提取标准菌株 DNA。用 QIAamp DNA Micro Kit 试剂盒按说明书步骤提取黏膜细菌基因组 DNA。所提取的 DNA 均置于 -20 °C 保存。

**1.2.3 鉴定引物特异性** 分别取 1 例患者和 1 例健康志愿者的黏膜 DNA 及各种标准菌株 DNA 进行普通 PCR 反应。反应体系(25 μl):dNTP 0.5 μl、MgCl<sub>2</sub> 2.5 μl、Forward primer 0.5 μl、Reverse primer 0.5 μl、Taq 酶 1 μl、模板 DNA 3 μl、ddH<sub>2</sub>O 15.5 μl、10 × Buffer 2.5 μl。反应条件:95 °C 预变性 5 min、95 °C 变性 30 s、52 °C 退火 30 s、72 °C 延伸 1 min、循环 35 次。产物置于 -4 °C 保存。用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳分析 UC 患者、健康志愿者及标准菌株普通 PCR 产物,均仅见单一特异性目的条带,说明引物特异性良好,可进行实时定量 PCR 反应。

**1.2.4 标准曲线的制作** 将各标准菌株进行普通 PCR 扩增,反应体系及反应条件 1.2.3。扩增产物用普通 DNA 产物纯化试剂盒进行切胶、回收,得到各标准菌株目的 DNA 片段,作为标准品。用紫外分光光度计测定浓度。根据每毫升所含目的 DNA 片段拷贝数 =  $6.02 \times 10^{23} \times \text{浓度}(\text{g/ml}) / \text{分子量}(\text{g/mol})$ , 换算出各标准品每微升所含目的片段的拷贝

数。将各标准品做 10 倍系列稀释,使之成为  $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^2$  copies,进行 SYBR Green I 实时定量 PCR 反应。反应体系(20 μl):UltraSYBR Mixture 10 μl、Forward primer 0.4 μl、Reverse primer 0.4 μl、模板 2 μl、ddH<sub>2</sub>O 7.2 μl。反应条件:95 °C 预变性 10 min、95 °C 变性 15 s、退火延伸温度 60 °C 1 min、共 40 个循环。反应完毕后由系统自动分析循环阈值(Cycle threshold, Ct),根据不同拷贝梯度标准品的 Ct 值,计算并绘制标准曲线。用于待测样品定量。

**1.2.5 实时荧光定量 PCR 反应** 活动期组、缓解期组及对照组黏膜 DNA 分别进行 6 种细菌的 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 反应,每个样品均重复一次,反应结束后由 PCR 仪自动计算 Ct 值,根据标准曲线,进行样品定量。所有样品反应结束后均由 PCR 仪自动进行融解曲线分析,确定产物特异性。所有 DNA 标本检测 6 种细菌的实时荧光定量 PCR 反应融解曲线均为单峰,且出峰的温度与预测的产物 T<sub>m</sub> 值(T<sub>m</sub>:DNA 双链解链 50% 的温度)相似,说明扩增产物单一,与 SYBR Green I 荧光染料结合 DNA 片段为目的 DNA 片段,实验结果可靠。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS 20.0 统计软件对所有样品定量结果的对数值进行分析,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。比较活动期组、缓解期组和对照组黏膜相关菌群定量结果及双歧杆菌/大肠杆菌(B/E)值,采用方差分析,两两比较采用 Duncan 检验。检验标准设定为 0.05。

## 2 结果

**2.1 标准曲线** 以标准品拷贝数的对数值作为纵坐标,以不同拷贝数的标准品在荧光定量 PCR 反应过程中 Ct 值作为横坐标,可得各细菌的标准曲线,用于待测样品的定量。见图 1。

**2.2 UC 患者与健康志愿者黏膜菌群定量和 B/E 值的比较** 与对照组比较,活动期组黏膜标本中大肠杆菌含量增加( $P < 0.05$ ),双歧杆菌属、拟杆菌属、乳酸杆菌属、梭菌属含量减少( $P < 0.05$ ),但肠球菌属含量无明显变化;缓解期组拟杆菌属及双歧杆菌含量较活动期组升高( $P < 0.05$ ),但仍低于对照组( $P < 0.05$ ),大肠杆菌、乳酸杆菌属、梭菌属、肠球菌属含量较对照组无明显变化。活动期组患者 B/E 值为  $(0.84 \pm 0.05) < 1$ ,小于缓解期组及对照组( $P < 0.05$ ),缓解期组及对照组 B/E 值均  $> 1$ ,两组之间差异无统计学意义。见表 2。

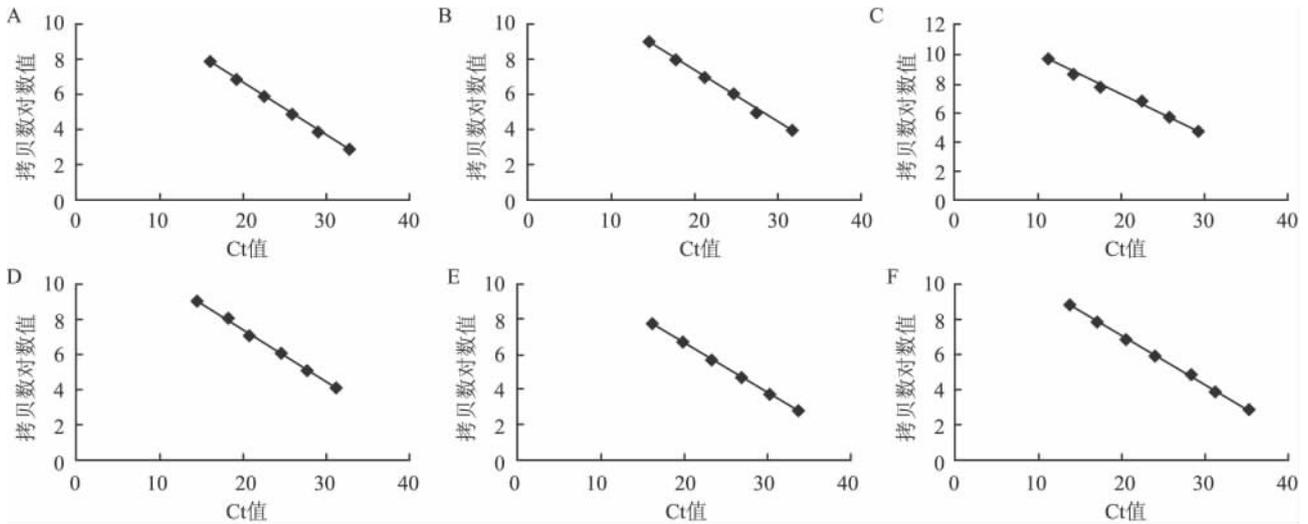


图1 各细菌标准曲线

A: 产气荚膜梭菌; B: 脆弱拟杆菌; C: 大肠杆菌; D: 粪肠球菌; E: 嗜酸乳杆菌; F: 双歧杆菌

表2 UC患者和健康志愿者  
黏膜菌群定量结果及B/E值(log copies/g  $\bar{x} \pm s$ )

项目	活动期组 (n=20)	缓解期组 (n=15)	对照组 (n=20)	F值
梭菌属	8.52 ± 0.30	9.63 ± 0.79 <sup>△</sup>	9.36 ± 0.66 <sup>△</sup>	16.99
拟杆菌属	8.34 ± 0.29	9.42 ± 0.48 <sup>△#</sup>	9.88 ± 0.82 <sup>△</sup>	35.98
大肠杆菌	9.68 ± 0.56	8.70 ± 0.90 <sup>△</sup>	8.91 ± 0.52 <sup>△</sup>	11.19
肠球菌属	7.19 ± 0.32	7.83 ± 1.12	7.70 ± 1.17	2.40
乳酸杆菌属	6.29 ± 0.52	7.52 ± 1.22 <sup>△</sup>	7.96 ± 0.68 <sup>△</sup>	22.28
双歧杆菌属	8.06 ± 0.21	8.87 ± 0.89 <sup>△#</sup>	9.42 ± 0.78 <sup>△</sup>	16.08
B/E值	0.84 ± 0.05	1.02 ± 0.04 <sup>△</sup>	1.06 ± 0.08 <sup>△</sup>	76.20

与活动期组比较: <sup>△</sup>P < 0.05; 与对照组比较: <sup>#</sup>P < 0.05

### 3 讨论

肠道菌群包括腔菌群及黏膜相关菌群, 目前针对UC与肠道菌群关系的研究普遍集中在粪便标本, 但粪便标本只能代表腔菌群。研究<sup>[6]</sup>显示粪便标本不能完全代表肠道微生物群落特征性, 腔菌群与黏膜菌群组成成分存在差异。黏膜菌群与宿主上皮直接接触, 可能对宿主的病理生理、免疫功能影响更为直接。本研究对UC患者及健康志愿者黏膜菌群进行分析, 结果显示活动期组大肠杆菌含量较对照组增加, 双歧杆菌属、拟杆菌属、乳酸杆菌属、梭菌属较对照组下降; 缓解期组双歧杆菌属及拟杆菌属较活动期组增多, 但仍低于对照组。提示活动期与缓解期UC患者肠道黏膜菌群变化并不相同, 活动期患者肠道菌群失调有加重趋势, 缓解期UC患者也存在一定的黏膜菌群改变。这种菌群变化是UC的发病原因, 还是病变破坏肠道黏膜导致继发性菌

群改变目前尚不确定。白鹏等<sup>[7]</sup>应用粪便标本观察到活动期UC患者双歧杆菌属和乳酸杆菌属含量减少, 大肠杆菌和肠球菌属无明显变化, 缓解期双歧杆菌属、乳酸杆菌属、大肠杆菌、肠球菌属均无明显变化, 与本研究结果不同。这种黏膜菌群和腔菌群的差异可能由于结肠上皮细胞表面与腔内微环境的不同, 粪便与肠腔黏膜的黏附性较低等因素有关。

肠道定植抗力是反映肠道内源性厌氧菌抑制肠道内需养菌的潜在致病菌群数量的能力, 用B/E值表示, 高B/E值能反映人体良好的肠道环境<sup>[8]</sup>。本研究结果显示活动期组B/E值较对照组下降, 提示活动期UC患者肠道定植抗力显著受损, 这可能导致UC患者肠上皮细胞损伤, 黏膜屏障破坏, 上皮通透性增高, 肠道内细菌和产物发生移位。缓解期组虽然双歧杆菌较对照组含量降低, 但B/E值 > 1, 较活动期组增高, 与对照组比较无明显变化, 可能与UC疾病的恢复相关。这为应用抗生素及益生菌治疗UC以及用药时机选择上提供理论依据。

本研究显示UC患者肠道黏膜附着的乳酸杆菌属、双歧杆菌属、梭菌属降低, 与Fite et al<sup>[9]</sup>研究一致; 刘伟等<sup>[10]</sup>对UC患者病变肠段的黏膜菌群研究也发现病变肠段双歧杆菌、乳酸杆菌减少, 大肠杆菌增加。而Macfarlane et al<sup>[11]</sup>对直肠上皮细胞黏附的72类细菌进行检测, 结果只有双歧杆菌的数量在UC组和对照组之间存在差异, 与本研究结果不一致, 其原因可能与肠道菌群结构复杂, 受种族、饮食及排便习惯等影响相关。此外, 本研究进行标本采集前需要清洁肠道, 也可能对肠道菌群产生影响, 需

要进一步扩大样本进行研究。

### 参考文献

- [1] Round J L, Mazmanian S K. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease [J]. *Nat Rev Immunol*, 2009, 9(5): 313–23.
- [2] 中华医学会消化病分会炎症性肠病学组. 炎症性肠病诊断与治疗的共识意见(2012年广州) [J]. *中华内科杂志*, 2012, 51(10): 818–31.
- [3] Rinttilä T, Kassinen A, Malinen E, et al. Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR [J]. *J Appl Microbiol*, 2004, 97(6): 1166–77.
- [4] Skånseng B, Kaldhusdal M, Rudi K. Comparison of hiken gut colonisation by the pathogens campylobacter jejuni and clostridium perfringens by real-time quantitative PCR [J]. *Mol Cell Probes*, 2006, 20(5): 269–79.
- [5] 郭世奎, 包维民, 龚昆梅, 等. 实时荧光定量 PCR 法研究结肠癌患者肠道拟杆菌属、梭杆菌属和梭菌属量的变化 [J]. *中国微生态学杂志*, 2010, 22(1): 24–8.
- [6] Durbán A, Abellán J J, Jiménez-Hernández N. Assessing gut microbial diversity from feces and rectal mucosa [J]. *Microb Ecol*, 2011, 61(1): 123–33.
- [7] 白 鹏, 吕愈敏, 顾 芳. 细菌 16SrDNA 荧光定量 PCR 法分析溃疡性结肠炎患者肠道菌群变化 [J]. *胃肠病和肝病杂志*, 2008, 17(7): 566–71.
- [8] 沈定树, 陈素云. 肠道微生态与定植抗力 [J]. *中国微生态学杂志*, 2012, 24(12): 1150–2.
- [9] Fite A, Macfarlane S, Furrie E, et al. Longitudinal analyses of gut mucosal microbiotas in ulcerative colitis in relation to patient age and disease severity and duration [J]. *J Clin Microbiol*, 2013, 51(3): 849–56.
- [10] 刘 伟, 刘 翔, 林漫鹏. 溃疡性结肠炎患者正常与病变肠段肠道菌群比较 [J]. *湖北民族学院学报(医学版)*, 2011, 28(1): 4–6.
- [11] Macfarlane S, Furrie E, Cummings J H, et al. Chemotax on omic analysis of bacterial populations colonizing the rectal mucosa in patients with ulcerative colitis [J]. *Clin Infect Dis*, 2004, 38(12): 1690–9.

## Changes of mucosa associated bacterial flora in patients with ulcerative colitis at different stages and its significance

Chu Yuan, Wang Qiaomin

(Dept of Gastroenterology, The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001)

**Abstract Objective** Sigmoid mucosa specimens of the patients with ulcerative colitis (UC) at active stage and remission stage were respectively detected by real-time PCR for the contents of the six kinds of bacterial floras including fusobacterium, enterococcus, lactobacillus, bifidobacterium, bacteroides, and escherichia coli. So the possible roles and significance of the changes of intestinal mucosa associated bacterial flora in the pathogenesis of UC were discussed. **Methods** Sigmoid biopsy tissues were collected from 35 UC patients (20 cases were activities group while 15 cases were remission group) and 20 healthy cases (control group). Specific primers were set according to the bacterial 16 SrDNA sequences. Bacterial DNA of the intestinal mucosa specimens was extracted, and real-time PCR was used to detect the numbers of different bacterial colonies. **Results** In sigmoid mucosa specimens of the UC group at activities group, escherichia coli colony was increased, while bifidobacterium, bacteroides, lactobacillus and fusobacterium, were reduced compared to the control group ( $P < 0.05$ ). But for enterococcus, there was no significant change ( $P > 0.05$ ). And in remission group, bacteroides and bifidobacterium were reduced compared with the control group ( $P < 0.05$ ), while no significant changes were found in escherichia coli, lactobacillus, fusobacterium and enterococcus ( $P > 0.05$ ). The ration of bifidobacterium to escherichia coli (B/E) in UC patients at active stage was less than 1, which was lower than the control group. While B/E values in UC patients at remission stage and the control group were both larger than 1, with no statistically significant difference between them. **Conclusion** There were obvious changes of intestinal bacterial flora in UC patients, and the change is more obvious in the UC patients at active stage, showing that there is a close relationship between intestinal mucosa associated bacterial flora and the development of UC.

**Key words** ulcerative colitis; mucosa associated bacterial flora; real-time PCR