

腹泻型肠易激综合征患者肠道目标菌群的分析

李小萍¹, 王巧民¹, 褚源¹, 宋继中¹, 沈佐君²

摘要 目的 研究腹泻型肠易激综合征(IBS-D) 患者与正常对照者的肠道菌群差异。方法 实时荧光定量 PCR 法检测 50 例 IBS-D 患者及 25 例正常对照者粪便中长双歧杆菌属、乳酸杆菌属、脆弱拟杆菌、产气荚膜梭菌、大肠杆菌和粪肠球菌属的数量, 并对各组的菌群数量进行比较, 计算肠道定植抗性, 肠道定植抗性(CR) 是指肠道内需氧的潜在致病菌群被肠道内源性厌氧菌抑制的能力, 双歧杆菌数值与肠杆菌数值之比作为肠道微生物定植抗力的指标, 即 B/E 值。结果 与正常对照者比较, IBS-D 患者粪便中大肠埃希菌、产气荚膜梭菌的数量明显增多($P < 0.05$), 而乳酸及双歧杆菌属的数量明显减少($P < 0.05$), 粪肠球菌、脆弱拟杆菌在两组之间比较差异无统计学意义。IBS-D 患者 B/E 值 < 1 , 与正常对照者比较明显降低($P < 0.05$)。结论 IBS-D 患者肠道菌群平衡被打破, 表现为 B/E 值降低, 且粪便中肠杆菌及产气荚膜梭菌数量增加, 双歧杆菌、乳酸杆菌的数量明显减少。

关键词 肠易激综合征; 肠道菌群; 实时荧光定量 PCR

中图分类号 R 574.4

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2014)05-0653-06

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS) 是胃肠道功能紊乱的一种常见病, 其特征是病因不明的腹痛伴随排便习惯及大便性状的改变。尽管 IBS 不会带来严重的疾病, 但它却降低了患者的生活质量^[1]。传统研究肠道菌群的分离培养方法对培养条件要求较高、费时费力, 且大部分肠道共生菌为专性厌氧菌, 在体外无法培养。近年来研究者开始应用分子生物学方法研究肠道菌群。该研究应用实时荧光定量 PCR 法对腹泻型(IBS-D) 患者及正常对照者粪便内目标菌群进行分析, 比较两组间粪便菌群的差异。

1 材料与方法

1.1 病例资料 根据罗马 III 诊断标准^[2], 收集

2013-12-12 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¹ 消化内科、² 检验科, 合肥 230001

作者简介: 李小萍, 女, 硕士研究生;

王巧民, 女, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: wqmin928@163.com

2013 年 1 月~7 月于安徽医科大学附属省立医院门诊就诊的 IBS-D 患者 50 例(男 30 例, 女 20 例); 年龄 18~70 (44.82 ± 13.50) 岁。有下列情况的 IBS-D 患者将被排除在外: ① 年龄 < 18 岁; ② 怀孕、哺乳期或无法合作者; ③ 在过去的 4 周内使用过抗生素; ④ 曾有重大的或复杂的腹部手术史者; ⑤ 存在严重系统性疾病或子宫内膜异位症, 或被诊断患有老年痴呆症。所有参与实验组的研究对象均有临床及内镜下胃肠检查或近 1 年内有钡剂灌肠检查。正常对照组的粪便标本选自年龄、性别与患者组匹配的 25 例正常对照者, 男 15 例, 女 10 例; 年龄 18~70 (38.76 ± 9.33) 岁。要求两组留取粪便标本前 4 周内没有消化道不适症状, 且没有使用过抗生素或微生态制剂。

1.2 试剂与仪器

1.2.1 主要试剂 血平板、营养琼脂平板、TPY 琼脂平板及改良 MRS (实验室自备); DNA 提取试剂盒(德国 Qiagen 公司); DNA 切胶回收试剂盒、 $2 \times$ Taq PCR Master Mix (美国 Axygen 公司); $2 \times$ SYBR[®] Premix^{Ex} Taq[™] (北京康为世纪生物科技有限公司)。

1.2.2 主要仪器 YQX-II 手套式厌氧培养箱(上海新苗医疗器械制造有限公司); -80°C 冰箱; 7500 型实时荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司)。

1.2.3 6 种标准菌株 从广东环凯微生物科技有限公司购买大肠埃希菌(*Escherichia coli*, 8379)、粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*, 29212)、嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*, 1.1878)、长双歧杆菌(*Bifidobacteria longum*, 15701)、产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*, 13124)、脆弱拟杆菌(*Bacteroides fragilis*, 25285)的冻干粉 $4 \sim 8^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.3 方法

1.3.1 6 种标准菌株的复苏、培养 取适量脑心浸液与标准菌株冻干粉充分混匀, 长双歧杆菌(接种于 TPY 琼脂平板)、嗜酸乳杆菌(接种于改良 MRS)、产气荚膜梭菌(接种于血平板)及脆弱拟杆菌(接种于血平板)置入 YQX-II 手套式厌氧培养箱中, 大肠埃希菌(接种于营养琼脂平板)及粪肠球菌(接种于营养琼脂平板)置于恒温培养箱, 37°C 恒温培养 24~72 h 后挑单一菌落, 接种于相应的培养基

中连续培养 1 代(条件同上),培养完成后放置 4 ℃ 保存。

1.3.2 6 种标准菌株 DNA 的提取 挑取单一菌落的细菌菌落,用比浊法使浓度控制在 2×10^{12} cfu/L,再提取 DNA,测其浓度后于 -20 ℃ 保存。

1.3.3 粪便标本收集、DNA 提取 排便后迅速收集粪便标本于无菌的培养皿中,并于 2 h 内置于 -80 ℃ 保存。提取 DNA,测其浓度后于 -20 ℃ 保存。

1.3.4 6 种细菌 PCR 引物设计 参照文献^[3-4],根据大肠埃希菌、粪肠球菌、脆弱拟杆菌、产气荚膜梭菌、乳酸杆菌及长双歧杆菌 16S rDNA 基因序列设计各菌种特异性 PCR 引物,见表 1。

表 1 靶基因 PCR 扩增引物序列

项目	PCR 扩增片段 长度(bp)	引物序列(5'→3')
大肠埃希菌	340	F: GTTAATACCTTTGCTCATGTA R: ACCAGGGTATCTTAATCCTGTT
粪链球菌	144	F: CCCITATTGTTAGTTGCCATCATT R: ACTCGTTGTACTTCCCATTTGT
嗜酸乳杆菌	341	F: AGCAGTAGGGAATCTTCCA R: CACCGCTACACATGGAG
脆弱拟杆菌	175	F: GCG GGCATGCCGACCGACA AT R: TAGCGG GCCGAGGGGAACTA
产气荚膜梭菌	260	F: TGAAAG ATGGCATCATCATTCAAC R: GGTACCGTCATTATCTTC CCCAA
长双歧杆菌	243	F: TCGCGTC(C/T)GGTGTGAAAG R: CCACATCCAGC(A/G)TCCAC

1.3.5 6 种引物的特异性检测 分别取 6 种标准菌株基因组 DNA 与 1 个正常对照者的粪便基因组 DNA 行普通 PCR 实验。20 μl 的反应体系,反应条件: 94 ℃ 预变性 3 min; 94 ℃ 变性 30 s、T ℃ (大肠埃希菌 53 ℃,粪链球菌 51.8 ℃,嗜酸乳杆菌 52 ℃,长双歧杆菌 53.5 ℃,脆弱拟杆菌 52 ℃,产气荚膜梭菌 51.8 ℃) 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 1 min, 共 35 个循环, 72 ℃ 复性 5 min。以 2 000 bp DNA Ladder 为 Marker,扩增产物在 1.2% 琼脂糖凝胶中电泳。

1.3.6 6 种细菌标准品的制备 取 6 种标准菌株的 DNA 进行普通 PCR 实验(反应体系和条件同上),接着在 1.2% 琼脂糖凝胶中电泳,然后在紫外分光光度计下尽量完全切下含目的基因产物的条带,按 DNA 切胶、回收试剂盒行标准菌株 DNA 扩增产物的纯化、回收,测其浓度后于 -20 ℃ 保存。

1.3.7 6 种细菌标准曲线制作 用上述纯化、回收后的标准菌株 DNA 作为荧光定量 PCR 的标准品,按照测定的浓度,换算成各标准品 1 μl 的拷贝数

(大肠埃希菌 5.36×10^9 、粪肠球菌 1.27×10^{10} 、嗜酸乳杆菌 5.34×10^9 、长双歧杆菌 7.51×10^9 、脆弱拟杆菌 1.04×10^{10} 、产气荚膜梭菌 7.02×10^9) 用于制作标准曲线。将各菌株稀释成为 $1 \times 10^{10} \sim 1 \times 10^3$ copies/ml 作为标准品,进行 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 反应,20 μl 反应体系: 2 × SYBR® Premix^{Ex} TaqTM 10 μl, DNA 模板 2 μl, ddH₂O 7 μl, 20 μmol/L 上下游引物各 0.5 μl; 反应步骤: 95 ℃ 预变性 3 min; 95 ℃ 变性 10 s, T ℃ (大肠埃希菌 61 ℃,粪肠球菌 60 ℃,嗜酸乳杆菌属 58 ℃,双歧杆菌属 57.5 ℃,脆弱拟杆菌 58 ℃,产气荚膜梭菌 55 ℃),退火 30 s, 65 ℃ 延伸 10 s, 共 40 个循环。反应完毕后读取荧光定量 PCR 数据,分析溶解曲线。根据读取的荧光数据,由系统软件自动分析 Ct 值,同时生成标准曲线。

1.3.8 检测粪便标本 两组粪便提取的 DNA 分别进行 6 种细菌的 16S rDNA 荧光定量 PCR 反应,反应体系和条件与制备标准曲线时一致。所有标本实时荧光定量 PCR 反应均同时做 3 个平行复孔。将每个粪便标本检测得到的结果转换为靶细菌的基因组在 1 g 粪便中的平均估计值(湿重)。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 20.0 统计软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两独立样本比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 PCR 产物鉴定 用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳,分别分析 6 种标准菌株、正常对照者及 IBS-D 患者粪便中的普通 PCR 产物,可见 6 种标准菌株 PCR 扩增产物均为单一的条带,与预期的 DNA 片段长度一致,能够用于定量 PCR 反应。见图 1。

2.2 6 种细菌的扩增图谱分析 各标准品被 10 倍稀释后行实时荧光定量 PCR 反应,可得模板循环数(Ct 值)与荧光强度的关系图,6 种细菌的定量分析在指数扩增期进行。见图 2。

2.3 6 种细菌的标准曲线分析 以实时荧光定量 PCR 反应过程中达到荧光阈值的初始循环数(Ct)作为横坐标,不同拷贝数的标准品的对数作为纵坐标,为待测样本的定量分析提供了参考标准,见图 3。

2.4 6 种细菌的溶解曲线分析 溶解曲线分析是在 PCR 从 95 ~ 60 ℃ (0.3 ℃/循环) 缓慢冷却过程中进行的,同时检测 SYBR Green I 信号强度,6 种细菌的溶解曲线均为单一峰,说明与定量 PCR 荧光染料结合的为单一的目的片段 DNA,见图 4。

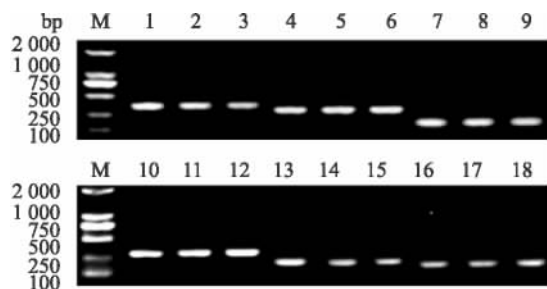


图1 6种细菌PCR产物凝胶电泳图

M:Marker;1:嗜酸乳杆菌标准品(341 bp);2:正常对照者粪便标本(341 bp);3:IBS-D患者粪便标本(341 bp);4:大肠埃希菌标准品(340 bp);5:正常对照者粪便标本(340 bp);6:IBS-D患者粪便标本(340 bp);7:脆弱拟杆菌标准品(175 bp);8:正常对照者粪便标本(175 bp);9:IBS-D患者粪便标本(175 bp);10:产气荚膜梭菌标准品(260 bp);11:正常对照者粪便标本(260 bp);12:IBS-D患者粪便标本(260 bp);13:长双歧杆菌标准品(243 bp);14:正常对照者粪便标本(243 bp);15:IBS-D患者粪便标本(243 bp);16:粪肠球菌标准品(144 bp);17:正常对照者粪便标本(144 bp);18:IBS-D患者粪便标本(144 bp)

2.5 实验组与正常对照组粪便细菌的定量检测及定值抗力(B/E)值的比较 与正常对照组比较,实验组粪便中大肠埃希菌、产气荚膜梭菌的数量明显增多($P < 0.05$),而乳酸及双歧杆菌属的数量明显减少($P < 0.05$),肠道定值力 B/E < 1 ,与正常对照组比较明显减低($P < 0.05$),但粪肠球菌、脆弱拟杆

菌在两组之间比较差异无统计学意义,见表2。

表2 粪便标本目标细菌定量结果

($\log_{10} \bar{x} \pm s$, $\log_{10} \bar{x}$ 对数平均目标基因组拷贝数/克湿便)

项目	实验组 ($n = 50$)	正常对照组 ($n = 25$)	t 值
大肠杆菌	$9.89 \pm 0.59^{**}$	8.33 ± 0.27	12.551
粪肠球菌	9.33 ± 0.91	9.04 ± 0.81	1.351
产气荚膜梭菌	$11.40 \pm 0.42^{**}$	10.83 ± 0.33	5.876
嗜酸乳杆菌	$8.85 \pm 0.29^*$	9.10 ± 3.56	-3.226
长双歧杆菌	$9.35 \pm 0.36^{**}$	9.95 ± 1.15	-3.403
脆弱拟杆菌	6.00 ± 0.76	5.61 ± 0.42	2.365
B/E 值	$0.95 \pm 0.06^{**}$	1.20 ± 0.16	-10.031

与正常对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3 讨论

肠道正常菌群对于宿主个体来说非常重要。然而,属于正常菌群的细菌似乎也能够某些个体或情况下引起疾病。实验^[5-7]表明肠道正常菌群的变化在IBS发生发展中起着主要作用。本研究与国内部分报道^[8-10]的菌群变化趋势一致,通过对IBS-D患者肠道微生态菌群分析发现,相对于正常对照者腹泻型IBS患者粪便中的双歧杆菌、乳酸杆菌比例明显降低,肠杆菌、产气荚膜梭菌比例明显升高;双歧杆菌/肠杆菌(B/E) < 1 ,这反映了微生物抗移

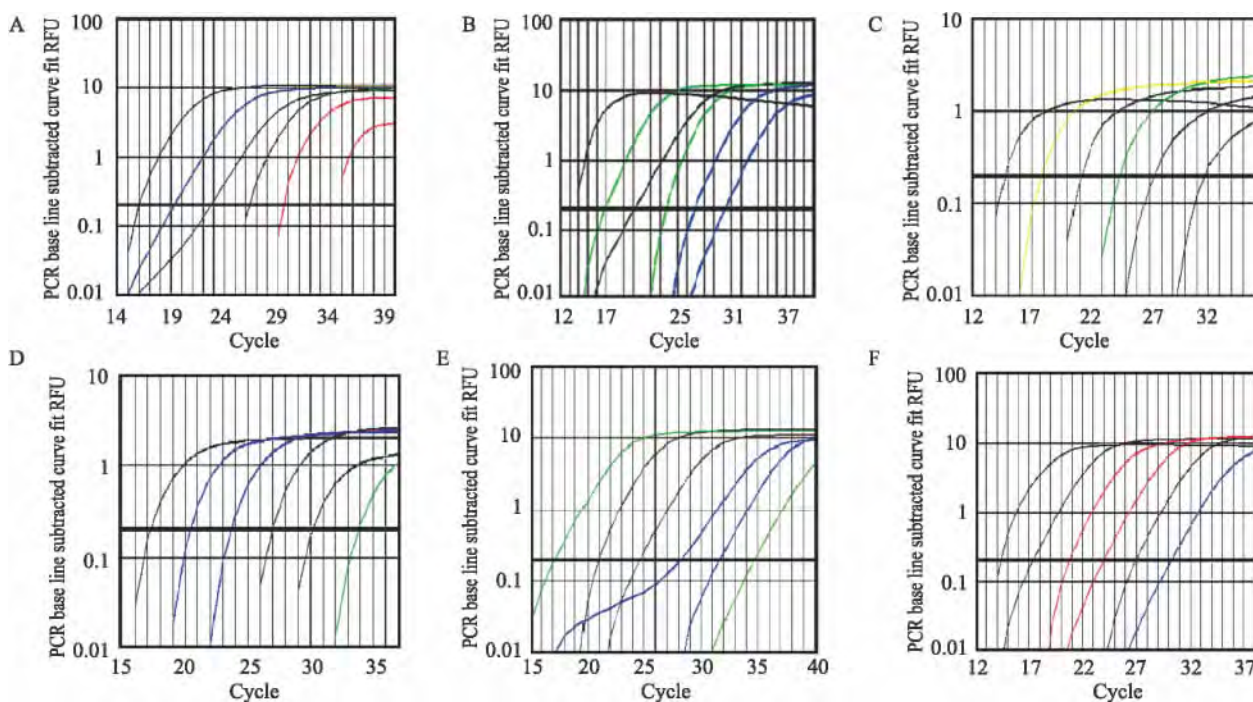


图2 6种标准品实时荧光定量PCR扩增图谱

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

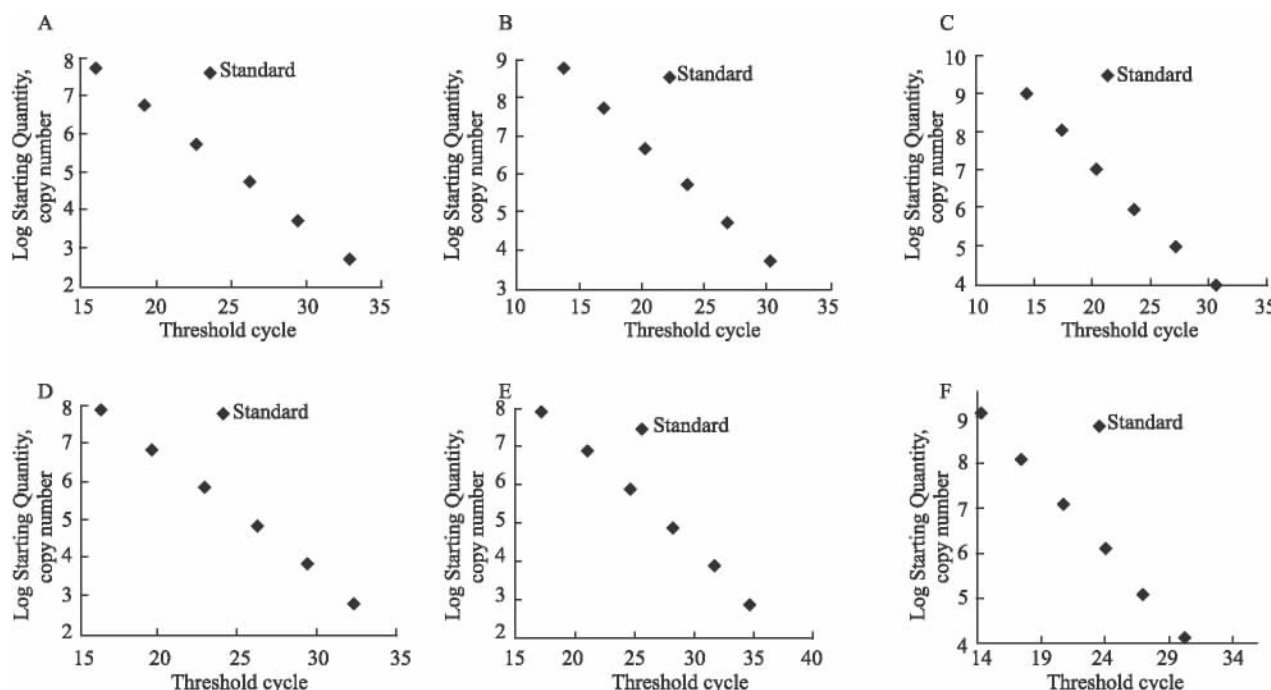


图3 6种细菌的标准曲线

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

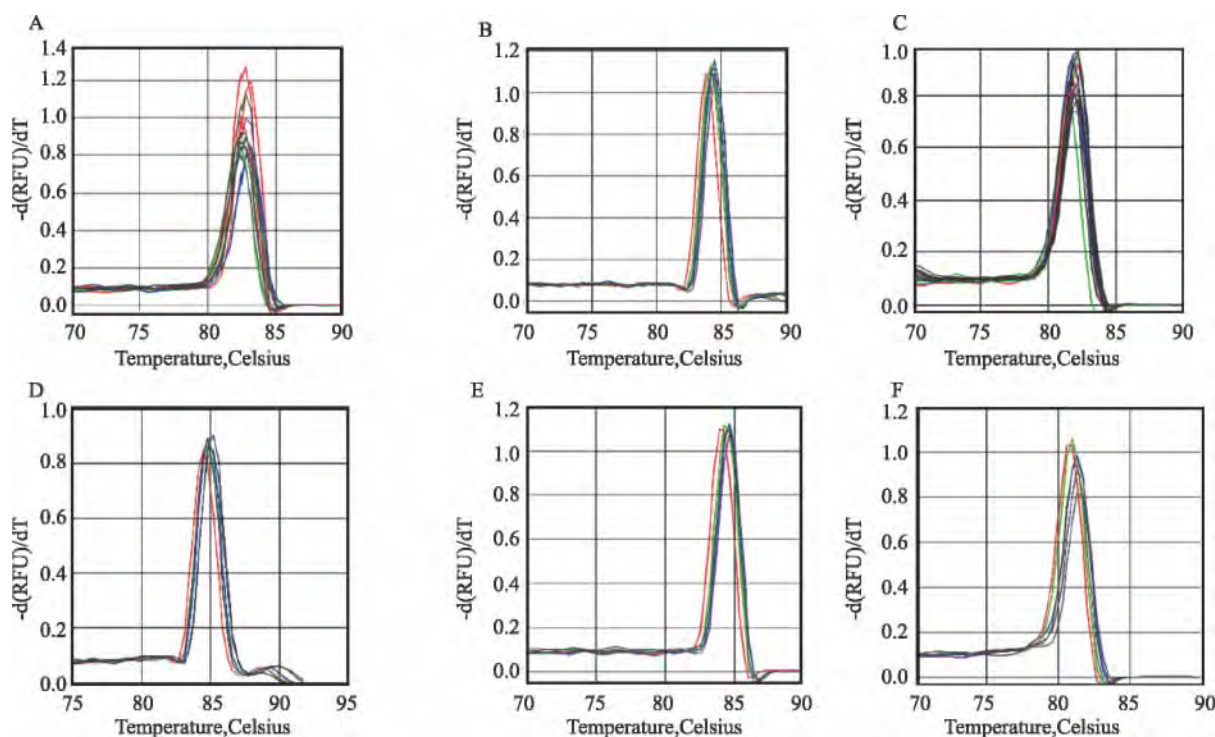


图4 6种细菌产物的溶解曲线

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

植性降低,易使潜在性致病菌及外来致病菌生长^[1]。结果显示 IBS-D 患者存在肠道菌群数量的增减和比例失调以及菌种性质的变化,表明 IBS-D 与肠道菌群失调有一定的相关性。

人体肠道菌群在肠腔内形成 3 个生物层:深层的紧贴黏膜表面并与黏膜上皮细胞粘连形成细菌生物膜,该菌群称为膜菌群,主要由双歧杆菌和乳酸杆菌组成,这两类菌是肠共生菌,是肠道菌中最具

生理意义的两种细菌,对机体有益无害;中层为粪杆菌、消化链球菌、韦荣球菌和优杆菌等厌氧菌;表层的细菌可游动称为腔菌群,主要是大肠埃希菌、肠球菌等好氧和兼性好氧菌。IBS 患者肠道菌群包括腔腔内菌群即粪便菌群和黏膜相关菌群,目前的研究主要集中于粪便菌群,但肠道膜菌群亦在维持肠道功能中发挥重要作用,菌群与肠黏膜黏附、嵌合形成膜菌是产生肠道微生物 B/E 的重要因素,构成肠黏膜生物屏障,防止肠道上皮与致病菌接触,维持肠道正常生理功能。Carroll et al^[2] 对 10 例 IBS-D 患者和 10 例健康自愿者的粪便和远端结肠黏膜细菌进行比较,结果表明结肠黏膜上皮和腔内微生态环境有所差异。Kerckhoffs et al^[3] 采用 PCR 和变性梯度凝胶电泳法(DGGE)分析 37 例 IBS 患者和 20 例健康受试者的十二指肠黏膜刷片和粪便标本,结果显示 IBS 患者的十二指肠黏膜刷片和粪便标本所含铜绿假单胞菌较健康受试者显著升高。

由于肠道细菌的组成复杂,且肠道黏膜层的细菌与肠腔内和肠道细胞表面的细菌有很大不同,所以粪便菌群是否能代表结肠菌群的情况以及肠道菌群改变与 IBS 的关系尚有待更深入的研究。

参考文献

- [1] Talley N J. Functional gastrointestinal disorders as a public health problem [J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2008, 20(Suppl 1):121-9.
- [2] 陆再英,钟南山,谢毅,等. 内科学[M]. 7 版. 北京:人民卫生出版社,2008:426-7.
- [3] Kanseng B, Kaldhusdal M, Rudi K. Comparison of chicken gut colonisation by the pathogens *Campylobacter jejuni* and *Clostridium perfringens* by real-time quantitative PCR [J]. *Mol Cell Probes*, 2006, 20(5): 269-79.
- [4] Rinttil 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.
- [5] Parkes G C, Brostoff J, Whelan K, et al. Gastrointestinal microbiota in irritable bowel syndrome: their role in its pathogenesis and treatment [J]. *Am J Gastroenterol*, 2008, 103(6):1557-67.
- [6] Gece K, Róka R, Ferrier L, et al. Increased faecal serine protease activity in diarrhoeic IBS patients: a colonic luminal factor impairing colonic permeability and sensitivity [J]. *Gut*, 2008, 57(5):591-9.
- [7] Tana C, Umesaki Y, Imaoka A, et al. Altered profiles of intestinal microbiota and organic acids may be the origin of symptoms in irritable bowel syndrome [J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2010, 22(5):512-9.
- [8] 崔舒晨,胡颖. 培菲康治疗前后肠易激综合征患者相关肠道益生菌群变化分析 [J]. *徐州医学院学报*, 2010, 30(1):45-8.
- [9] Carroll I M, Ringel-kulka T, Siddle J P, et al. Alterations in composition and diversity of the intestinal microbiota in patients with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome [J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2012, 24(6): 521-30, e248.
- [10] Krogius-Kurikka L, Lyra A, Malinen E, et al. Microbial community analysis reveals high level phylogenetic alterations in the overall gastrointestinal microbiota of diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome sufferers [J]. *BMC Gastroenterol*, 2009, 9(1): 1-11.
- [11] 吴仲文,李兰娟,马伟航,等. 肠道微生物定值抗力的新指标 B/E 值 [J]. *浙江预防医学*, 2000, 2(7):4-5.
- [12] Carroll I M, Chang Y H, Park J, et al. Luminal and mucosal-associated intestinal microbiota in patients with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome [J]. *Gut Pathogens*, 2010, 2(1): 19.
- [13] Kerckhoffs A P, Ben-Amor K, Samsom M, et al. Molecular analysis of faecal and duodenal samples reveals significantly higher prevalence and numbers of *Pseudomonas aeruginosa* in irritable bowel syndrome [J]. *J Med Microbiol*, 2011, 60(2): 236-45.

Analysis of patients with intestinal target bacteria diarrhea type irritable bowel syndrome

Li Xiaoping, Wang Qiaomin, Chu Yuan, et al

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

Abstract Objective To study on intestinal flora in diarrhea predominant irritable bowel syndrome (IBS-D) with differences between normal people. **Methods** The real-time fluorescence quantitative PCR assay was used in 50 patients with diarrhea predominant IBS and 25 normal control subjects in feces to detect *Bifidobacteria longum*, *Lactobacillus*, *Bacteroides*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis* number. The target bacteria in the number in each group were compared, and calculated intestinal colonization resistance. Intestinal resistance value (colonization resistance, CR) was a potential aerobic intestine by intestinal pathogens in anaerobic inhibition ability of endogenous bifidobacteria value and the value as the ratio of intestinal Enterobacteriaceae micro-

Fascin_1 在肺癌中的表达及其临床意义

汪睿^{1,2}, 虞红珍¹, 王弦¹, 吴强¹

摘要 目的 观察 Fascin_1 在人类肺癌及癌旁组织中的表达及其与肺癌患者临床病理特征之间的关系,并研究 Fascin_1 表达与肺癌的临床生物学行为的关系。方法 采用免疫组化 MaxVision 两步法检测 84 例肺癌及癌旁组织中 Fascin_1 蛋白的表达。用 Fascin_1 在血管内皮细胞中的表达作为阳性对照,使用 PBS 代替一抗作为阴性对照。结果 Fascin_1 蛋白在 84 例肺癌组织及癌旁组织中分别为 78 例 (92.9%) 阳性与 27 例 (32.1%) Fascin_1 蛋白阳性,两者差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。Fascin_1 表达在不同年龄、临床分期以及区域淋巴结转移间差异有统计学意义 ($P < 0.05$),但是在不同性别、T 分期以及病理类型间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。肺癌组织中 Fascin_1 蛋白阳性表达强度不同的患者的生存时间差异有统计学意义 ($P < 0.05$),而癌旁组织中 Fascin_1 蛋白阳性表达强度不同患者的生存时间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论 在肺癌中,Fascin_1 的表达同肿瘤的侵袭和转移密切相关,同时癌组织中 Fascin_1 的不同表达对患者的生存时间有明显影响。因此考虑 Fascin_1 有望成为肺癌潜在生物学标志物。

关键词 肺癌;Fascin_1;免疫组织化学;生存时间

中图分类号 R 73-3

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2014)05-0658-04

2014-02-25 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81101597、81172533);安徽高校省级科学研究(编号:KJ2012z142);安徽医科大学校基金及追加基金(编号:2012xkj001zj)

作者单位:¹安徽医科大学病理学教研室,合肥 230032

²安徽省胸科医院肿瘤科,合肥 230022

作者简介:汪睿,男,主治医师,硕士研究生;

吴强,男,教授,博士生导师,责任作者,E-mail:aydjohn@yahoo.com

Fascin_1 蛋白是一种细胞骨架蛋白,目前发现在人类多个上皮性肿瘤中表达上调,并且与临床病理学和预后不良相关。该基因主要是与 F-肌动蛋白结合,并将其组装成平行排列的肌动蛋白束,是调节细胞运动的关键基因之一^[1]。该研究采用免疫组化方法 MaxVision 两步法检测人肺癌及癌旁组织中 Fascin_1 的表达,分析其与患者临床病理特征之间的关系,并研究 Fascin_1 表达与肺癌的临床生物学行为的关系。

1 材料与方法

1.1 材料 收集安徽医科大学第一附属医院病理科 2007 年 2 月~2008 年 4 月病理资料齐全的肺癌手术石蜡标本 84 例,肿瘤组织切缘周边经病理学判断未见癌组织的部分为癌旁组织,作为参考对照。所取标本的患者年龄为 38~80 (60.77 ± 9.44) 岁。按 WHO (2012 年) 肺癌中的标准进行分期。TNM 分期:Ⅰ期 37 例、Ⅱ期 32 例、Ⅲ期 15 例。2013 年 3 月进行生存期随访,其中 40 例患者获得随访,44 例失访。标本均使用常规 10% 福尔马林溶液固定,然后石蜡包埋及 4 μm 厚切片。并采用 HE 和免疫组化法进行染色。

1.2 试剂 免疫组化试剂使用免疫组化浓缩型鼠抗人 Fascin_1 单克隆抗体 (SPM133) 购自美国 Santa Cruz 公司;免疫组化检测试剂盒为即用型快捷免疫组化 MaxVision 试剂盒和 DAB 显色试剂盒均购自福州迈新公司。

1.3 方法 免疫组化染色方法参照使用说明书操

bial resistance value of the index, namely B/E values. **Results** Compared with the normal control group, feces of patients with diarrhea predominant IBS in numbers of *Escherichia coli* and *Clostridium perfringens* increased significantly ($P < 0.05$), while the number of *Lactobacillus* and *Bifidobacteria* decreased significantly ($P < 0.05$), no statistically significant difference between the two groups in *Enterococcus faecalis* and *Bacteroides fragilis*. Patients with intestinal diarrhea predominant IBS constant force B/E < 1, compared with the control group decreased significantly ($P < 0.05$). **Conclusion** Diarrhea predominant IBS patients of intestinal flora balance is broken, for gut setting value is reduced, and the feces of *Escherichia coli* and *Clostridium perfringens* increase in number, number of *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* decreased.

Key words irritable bowel syndrome; intestinal flora; real-time fluorescence quantitative PCR