

doi:10.3969/j.issn.1000-9760.2010.06.010

胃癌患者肠道细菌的探讨

高冉¹ 李亮² 高海燕³(1 济宁医学院继续教育学院, 山东 济宁 272067; ² 济宁医学院附属第一人民医院, 济宁 272011; ³ 济宁医学院附属医院, 济宁 272029)

摘要 目的 利用 PCR-DGGE 基因指纹技术, 建立一种新的胃癌患者肠道细菌鉴定方法。研究胃癌患者肠道菌群多样性, 比较肠道微生物种群的差异, 进一步找到肠内某些细菌与胃癌发生的关系。**方法** 运用无需分离培养的 16S rDNA PCR-DGGE 基因指纹技术, 对济宁医学院附属第一人民医院胃癌患者肠道细菌进行测序鉴定。**结果** 提取的肠道菌群 DNA PCR 产物为 16S rDNA 片段。经 DGGE 指纹图聚类分析研究, 胃癌患者不同个体之间肠道菌群组成差异性较大。**结论** 建立基于 16S rDNA PCR-DGGE 基因指纹的胃癌患者肠道菌群组成揭示方法, 对于探讨胃癌患者肠道菌群谱的结构组成具有重要意义。

关键词 胃癌患者; PCR-DGGE 基因指纹技术; 肠道菌群

中图分类号: R735.2 **文献标志码**: B **文章编号**: 1000-9760(2011)03-178-03

胃癌是常见恶性肿瘤之一, 在我国, 胃癌死亡人数居各类癌症之首, 占消化道肿瘤死亡人数的 1/2。胃癌任何年龄均可发生, 以 50~60 岁多发, 但青年人胃癌并不罕见, 且有增加趋势。胃癌发病率和病死率迅速上升, 发病年龄逐渐提前已引起普遍关注^[1-2]。近年来兴起的基于 PCR-DGGE 基因指纹技术可用于鉴定胃肠道细菌群落的多样性, 也可提供分类法来预测种系发育关系^[3]。本实验从分子生物学角度, 应用变性梯度胶电泳 (denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE) 技术, 以济宁医学院附属第一人民医院胃癌患者为对象, 直接从胃癌患者粪便标本中提取细菌总 DNA, PCR 扩增, 获取肠道细菌结构特征的 DNA 指纹图谱。通过研究肠道菌群结构特征, 分析肠道微生物种群的差异, 进一步找到肠内某些与肿瘤有重要关系的菌群, 从而进一步认识何细菌种属有益于胃癌的诊断。

1 对象与方法

1.1 研究对象

选择 2009 年 5 月至 2010 年 5 月在济宁医学院附属第一人民医院接受治疗的胃癌患者 42 例, 其中男 28 例, 女 14 例, 年龄 35~72 岁, 平均 58.5 岁, 均为志愿者。

1.2 方法

1.2.1 标本采集 胃癌患者清晨空腹留取粪便 1g, 装入无菌采样管, 放入冰盒内, 1 h 内送回实验室, -70℃ 冰箱备用。

1.2.2 肠道菌群基因组总 DNA 的提取 细菌基因组总 DNA 的提取采用北京天根生物技术有限公司生产的粪便基因组 DNA 快速提取试剂盒, 按说明书使用操作。

1.2.3 基因组 DNA 的 PCR 扩增 在 16S rDNA 的可变序列区间设计 1 对细菌通用引物, 用于引导 16S rDNA 第 V3 可变区的 PCR 反应^[4]。引物由上海生工生物有限公司合成。引物 F968f-GC: 5'-CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAACGC GAA GAA CCT TAC-3'; R1401: 5'-CGG TGT GTA CAA GAC CC-3'。体系为 50μl, 其中 dNtp 4μl, Buffer 5μl, Taq 酶 0.2μl, ddH₂O 37.8μl, 上、下游引物及模板各 1μl。PCR 反应条件: 94℃ 预变性 5min; 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 1min 共 30 个循环; 最后 72℃ 延伸 5min。1.0% 琼脂糖凝胶 (含 0.5mg/ml 溴化乙锭) 电泳检测扩增产物, Uvi 凝胶成像系统照相。目的片段长度约 490bp。

1.2.4 修复 PCR 扩增 引物及序列^[5] 同上。PCR 反应: 94℃ 预变性 5min; 94℃ 30s, 55℃ 30s, 72℃ 1min 共 30 个循环; 最后 72℃ 延伸 5min。PCR 体系为 50μl, 其中上述 PCR 产物 5 μl, dNtp 4μl, Buffer 5μl, Taq 酶 0.2μl, ddH₂O 37.8μl, 上、下游引物各 1μl。

1.2.5 DGGE 电泳 预热缓冲液为 7L 1×TAE 缓冲液。上样前将缓冲液加热至 60℃, 取 40 μl PCR 纯化产物与 10μl 加样缓冲液混合, 注入加样孔中, 进行 DGGE 电泳。电泳采用 35%~50% 变

性剂浓度,电压 210V,电泳时间 180min。采用银染色。

2 结果

2.1 胃癌患者肠道菌群基因组总 DNA 的提取

对胃癌患者粪便标本提取肠道细菌菌群基因组总 DNA,其中对 1~13 号标本的总 DNA 进行 1.0%琼脂糖凝胶电泳,均见有 490bp 的 DNA 条带(图 1)。余 29 份样品检测未成功。

2.2 16S rDNA DNA 的 PCR 扩增

以提取的肠道细菌总 DNA 为模板,PCR 扩增出相应的 16S rDNA 片段(图 2)。

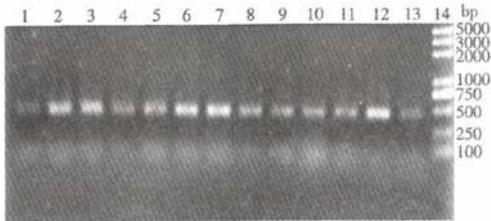


图 1 肠道菌群基因组总 DNA 提取物 1%琼脂糖凝胶电泳图
1~13:16S rDNA v6-8 区片段的 PCR 产物
14:DNAMark ark 5000

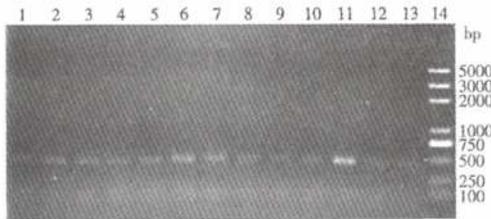


图 2 条带回收 PCR 产物琼脂糖电泳图
1~13:16S rDNA v6-8 区片段的 PCR 产物
14:DNAMark ark 5000

2.3 DGGE 电泳

肠道菌 DNA PCR 产物 DGGE 电泳后发现,每一条带显示一种来源的肠道细菌样品的 DGGE 指纹图,不同部位的条带代表不一样的优势细菌,亮度的强度反映细菌相对量的大小,10 个泳道均有条带存在,每个泳道中的条带数目、位置和亮度各不相同,表明每个患者体内的肠道细菌都有着丰富的多样性,细菌种类基本不相同。有些条带是某一个样品所特有的,也有共同的条带存在于不同的样品中(图 3)。

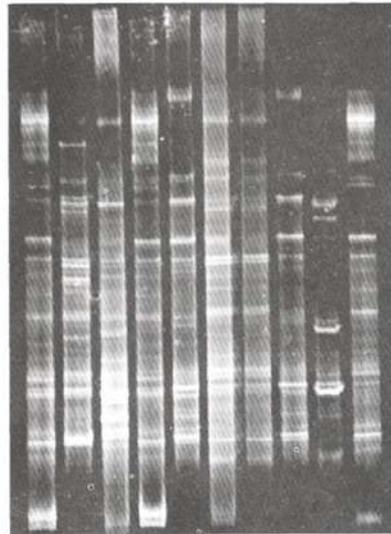


图 3 肠道菌群 DNA PCR 产物 DGGE 电泳图

3 讨论

近年来,随着分子生物学的快速发展,一些新的分子生物学技术不断出现,为检测和分析胃肠道微生物菌群的分布特点及阐明其中不同微生物菌群间的相互关系提供了必要的手段。肠道微生物群落是指在宿主消化道部位,并随宿主长期进化过程形成的,它们与宿主及环境形成相互依赖、相互制约的统一体。肠道微生物与人类的健康和疾病关系密切,但肠道菌群其庞大、复杂,一方面丰富了肠道微生物研究的内容,另一方面也阻碍了人类对肠道菌群的认识。随着对其研究的认识和深入,人类已经认识到肠道微生物对宿主的消化、营养、代谢、免疫等诸多方面影响着人体的健康状况^[6-8]。

PCR-DGGE 技术是近年来应用于多种生态环境微生物区系研究的主要分子生物学手段之一,其优势在于这种技术无需平板培养就可直接反映环境样品中细菌种类的多样性^[9]。胃癌是目前病死率较高的一类消化系统恶性肿瘤,其形成因素较复杂,一般与饮食结构、吸烟、饮酒及遗传因素有关^[10]。本实验采用 PCR-DGGE 技术研究了胃癌患者肠道菌群的结构特征,显示不同个体间肠道菌群呈多样性,表明 PCR-DGGE 在研究胃癌患者粪样微生物区系变化规律上是一种非常有效的技术手段。胃癌患者肠道菌群的组成结构至今未见报道,相信随着实验方法和分子生物学技术的完善,人们将会进一步认识到胃癌患者肠道菌群的多样性。而且,在对群落菌群结构分析(下转第 182 页)

- 自体干细胞移植学习班”讲义。北京,2005,67.
- [2] 杨晓凤,王红梅,许忆峰,等. 经动脉骨髓干细胞移植治疗股骨头坏死63例[J]. 中国临床康复,2006,10(13):3.
- [3] 李铭辉,顾翔,陈勇,等. 自体干细胞移植治疗老年心肌梗死后心力衰竭[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2007,11(37):7349.
- [4] 吴雁翔,杨晓凤,王红梅,等. 自体外周血干细胞治疗糖尿病下肢血管病疗效观察[J]. 中国糖尿病杂志,2008,16(9):557.
- [5] 袁凌霄,廖二元. 糖尿病治疗的新靶点:胰岛B细胞量[J]. 中华内分泌代谢杂志,2009,25(3):增录3a-1-3.

(收稿日期 2011-05-15)

(上接第179页)

的基础上进行微观研究,进一步了解环境因素及神经递质等与微生物之间的相互关系。不远的未来,分子生物学在肠道菌群领域的应用对菌群功能和活性的研究会更加迅速,该研究将会向人们展示体内菌群的功能与作用。

虽然迄今尚未发现特异的细菌与胃癌的发病有关,亦未发现胃癌患者特征性的肠道菌群变化,但胃癌患者粪便菌群和肠黏膜菌群的组成的确与健康个体存在差异,故认为肠道细菌在胃癌的发病机制中起重要作用,可能是参与胃癌发病的始动和持续因素。随着实验方法和技术的不断发展和应用,以及对肠道微生态在胃癌发病中作用研究的深入,将有可能对胃癌患者进行微生态的靶向治疗,从而为胃癌的治疗提供新的途径。

参考文献:

- [1] 李岩. 血清胃肿瘤标志物的临床价值[J]. 胃肠病学杂志,2006,11(6):323-326.
- [2] 蔡方,赵文丽,武彤彤. 胃癌患者血清 β -2微球蛋白含量变化的临床意义[J]. 实用医学杂志,2006,22(11):1255-1256.
- [3] Martin A P. Phylogenetic approaches for describing and comparing the diversity of microbial communities[J]. Appl Environ Microbiol,2002,68:3673-3682.
- [4] Chung E, Aldom JE, Carreno RA, et al. PCR-based quantitation of *Cryptosporidium parvum* in municipal water samples [J]. Journal of Microbiological Methods, 1999, 38(1-2): 119-130.
- [5] 于涛,德力夏提·依米提,买买提·牙森,等. 新疆维吾尔族长寿老人肠道菌群多样性分析[J]. 中国病原生物学杂志,2009,4(4):271-274.
- [6] Bajzer M, Seeley RJ. Physiology: obesity and gut flora [J]. Nature, 2006, 444: 1009-1010.
- [7] Hooper LV, Gordon JI. Commensal host bacterial relationships in the gut [J]. Science, 2001, 292: 1115-1118.
- [8] Xu J, Gordon JI. Honor thy symbionts [J]. P Natl Acad Sci USA, 2003, 100: 10452-10459.
- [9] Darfeuille MA, Boudeau J, Bulois P, et al. High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease [J]. Nature, 2004, 427: 412-421.
- [10] Simpson JM, McCracken VJ, Gaskins HR, et al. Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of 16S ribosomal DNA amplicons to monitor changes in fecal bacterial populations of weaning pigs after introduction of *Lactobacillus reuteri* strain MM53 [J]. Appl Environ Microbiol, 2000, 66(11): 4705-4714.

(收稿日期 2011-05-10)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

作者书写参考文献须知

作者论文中引用的参考文献应为亲自阅读过的主要文章;按照文中首次出现的次序编写,在引文句末右上角用方括号注明,如^[1]、^[3,6]。论著的引用文献择其主要者,一般不超过10篇;综述不超过25篇。应引用公开发行的新的研究著作,勿引译文、文摘、转载、内部资料等。尽量不引用教科书。

引用参考文献的题录及外语拼写和著录符号容易出现错误,请按下列顺序及格式仔细核对,如有错误,将退回作者修正。格式如下:

1. 期刊文章

[序号] 作者姓名(3位作者姓名,之间用逗号隔开;3位作者以上者,只写前3位作者,后加“等”或“et al”)。题目[J]。刊名(外文刊名缩写按Index Medicus格式)。年,卷(期):起页-止页。

2. 专著

[序号] 作者姓名. 书名[M]. 版次(第1版略). 出版地:出版社,出版年:起页-止页。

3. 专著中析出文献

[序号] 作者姓名. 题目[M]. 主编姓名. 书名. 版次. 出版地:出版社,出版年:起页-止页。