

# 结肠癌、结肠息肉患者粪便及黏膜中普拉梭菌变化的定量研究

周仪琳,于成功\*

(南京医科大学鼓楼临床医学院,南京大学医学院附属鼓楼医院消化科,江苏 南京 210008)

**[摘要]** 目的:观察普拉梭菌(*Faecalibacterium prausnitzii*, *F.prausnitzii*)在结肠息肉和结肠癌患者粪便和肠黏膜中的含量变化。方法:收集结肠癌患者( $n=47$ )、结肠息肉患者( $n=33$ )及健康人( $n=30$ )粪便及肠黏膜样品,提取细菌基因组 DNA,利用实时荧光定量 PCR 技术定量检测 3 组样品中 *F.prausnitzii* 基因的拷贝数,然后比较 3 组样品中 *F.prausnitzii* 含量的差异。结果:结肠癌组粪便样品的 *F.prausnitzii* 含量显著低于健康组( $P<0.01$ ),与息肉组相比并无明显差异,息肉组粪便样本 *F.prausnitzii* 含量低于健康组( $P<0.01$ );肠黏膜样本结果与粪便样本一致。结论:与健康人的粪便或肠黏膜样品相比,结肠息肉及结肠癌患者的样品中 *F.prausnitzii* 数量均显著下降,而 *F.prausnitzii* 数量在结肠息肉与结肠癌两组间却并无显著差异;*F.prausnitzii* 数量上的变化提示它可能与结肠息肉及结肠癌的发生密切相关。

**[关键词]** *F.prausnitzii*;结肠癌;结肠息肉;肠黏膜菌群;实时荧光定量 PCR

**[中图分类号]** R735.3

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2017)04-458-03

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20170415

根据 GLOBOCAN 2012 的统计数据,在全球范围内结直肠癌发病率位居第二、死亡率居第四,在我国结直肠癌发病率位居第四<sup>[1]</sup>;而以国家癌症中心公布的 2015 年癌症统计数据来看,我国结肠癌发病率虽位列第五,但发病总数与之前统计数据相比却呈上升趋势<sup>[2]</sup>。结直肠息肉作为肠道疾病的一种,有研究统计其癌变率最高可达 20.8%<sup>[3]</sup>,其中结肠腺瘤为重要的癌前病变这一观点,基本得到公认。影响结直肠息肉与结直肠癌的发病因素有很多,环境因素明显影响结直肠癌的发生率,其中一个因素就是结直肠菌群改变,但其作用机制尚不清楚。

有研究发现,丁酸盐具有抑制癌细胞增殖及诱导肠癌细胞凋亡的作用<sup>[4-5]</sup>,而普拉梭菌(*Faecalibacterium prausnitzii*, *F.prausnitzii*)作为产丁酸盐菌,又是肠道益生菌群中的优势菌种,其在肠道中的含量变化与肠道疾病的关系如何尚不明确。一直以来肠道菌群的研究多以粪便样本为主,然而在病时,结肠黏膜菌群可能直接与宿主肠上皮细胞接触,导致组织生物学变化或炎症产生<sup>[6]</sup>,因而本研究通过观察 *F.prausnitzii* 在粪便及肠黏膜中的变化,旨在了解 *F.prausnitzii* 与肿瘤发生发展的关系及意义。

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81470819)

\*通信作者(Corresponding author),E-mail:chenggong-yu@nju.edu.cn

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

粪便基因组 DNA 提取试剂盒(TIANamp Stool DNA Kit)、微量样品基因组 DNA 提取试剂盒(TIANamp Micro DNA Kit)(北京天根生化科技有限公司);通用型 DNA 纯化回收试剂盒(Universal DNA Purification Kit)、PCR 混合试剂(2×Taq MasterMix)、DNA Marker(北京康为世纪生物科技有限公司);荧光定量混合试剂 TaKaRa SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> (Tli RNaseH Plus,大连宝生物工程股份有限公司);反应所需引物由上海生工生物工程股份有限公司合成。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 样品收集和基因组 DNA 提取

本研究所涉健康人粪便及对应肠黏膜样品( $n=30$ )、结肠癌患者粪便以及对应肠黏膜样品( $n=47$ )、结肠息肉患者粪便及对应肠黏膜样品( $n=33$ )均来自南京鼓楼医院。结肠息肉组及结肠癌组样品均经病理确诊再行纳入,3 组对象排除慢性肠道疾病史、结直肠癌家族史,近 4 个月内未服用抗菌药物。新鲜的粪便和黏膜样品采集放入 1.5 mL EP 管中,尽快冻存于 $-80^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。

称取 180 mg 粪便样品采用粪便基因组 DNA 提取试剂盒 TIANamp Stool DNA Kit 提取细菌基因

组。称取 10 mg 肠黏膜样品采用微量样品基因组 DNA 提取试剂盒 TIANamp Micro DNA Kit 提取细菌基因组。

### 1.2.2 PCR 扩增及标准曲线的建立

研究所用引物为 F:5'-GATGGCCTCGCGTCC GATTAG-3'、R:5'-CCGAAGACCTTCTCCTCC-3',目的基因片段长度为 199 bp。PCR 反应体系 20  $\mu$ L: Taq MasterMix 10  $\mu$ L, 上下游引物各 1  $\mu$ L (10  $\mu$ mol/L), 模板 2  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 6  $\mu$ L。反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 30 s; 72 $^{\circ}$ C 1 min, 35 个循环, 72 $^{\circ}$ C 5 min。2% 琼脂糖凝胶电泳检测引物特异性。将特异性条带切胶回收, 纯化的扩增产物作为标准品, 测定其浓度, 计算具体拷贝数(copies/ $\mu$ L)。标准品 10 倍梯度稀释 7 个梯度, 通过 qPCR 反应建立标准曲线。

### 1.2.3 qRT-PCR 定量分析

qRT-PCR 反应体系 20  $\mu$ L: TaKaRa SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> (Tli RNaseH Plus) 10  $\mu$ L, 上下游引物各 0.8  $\mu$ L (10  $\mu$ mol/L), 模板 DNA 2  $\mu$ L, ROX Reference Dye 0.4  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 6  $\mu$ L。反应条件: 预变性 95 $^{\circ}$ C 30 s; PCR 反应 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环; 熔解曲线 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 95 $^{\circ}$ C 15 s。使用 Applied Biosystems StepOnePlus Real-Time PCR System (Life Technologies 公司, 美国) 进行反应, 将 qRT-PCR 所得 C<sub>T</sub> 值转换成每克湿重粪便/黏膜样品中 *F.prausnitzii* 的 16S rRNA 基因拷贝数, 对数转换后分析反应结果。

### 1.3 统计学方法

用 SPSS21.0 统计软件进行统计分析, 数据以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示, 非正态分布数据的两组间比较采用秩和检验,  $P\leq 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 引物特异性的鉴定

2% 琼脂糖凝胶电泳分析普通粪便样品常规 PCR 产物, 比对 DNA 分子标准, 可见 PCR 产物显示出单一的特异性条带, 与预期 DNA 片段长度吻合, 认为引物特异性良好, 可用于后续 qRT-PCR 反应。

### 2.2 标准曲线的建立

以不同拷贝数的标准品经对数转换后的拷贝数为横坐标, 以 qRT-PCR 过程中达到荧光阈值的循环数(C<sub>T</sub> 值)为纵坐标得到 *F.prausnitzii* 标准曲线。该标准曲线的 R<sup>2</sup> 值=0.999, 斜率为-3.203, 扩增效

率较好。标准品的溶解曲线均为单峰, 说明扩增产物单一, 引物特异性高。

### 2.3 粪便样品定量结果

每克湿重粪便样品中 *F.prausnitzii* 基因拷贝数对数的平均值如表 1 所示。可以看出在 3 组人群中, *F.prausnitzii* 的含量由高到低依次为健康组、息肉组、癌症组, 其中结肠癌组和结肠息肉组粪便样本 *F.prausnitzii* 含量均低于健康组 ( $P<0.01$ ), 癌症和息肉组含量并无明显差异。

### 2.4 肠黏膜样品定量结果

每克肠黏膜样品中 *F.prausnitzii* 基因拷贝数对数之间的差别如表 1 所示。结肠癌组及结肠息肉组肠黏膜中 *F.prausnitzii* 总含量均显著低于健康组 ( $P<0.01$ ), 但在结肠癌及结肠息肉肠黏膜 2 组样品间并没有显著差异。

表 1 3 组患者每克粪便/肠黏膜中 *F.prausnitzii* 基因拷贝数的对数值 ( $\bar{x}\pm s$ )

样品	健康组(n=30)	结肠息肉组(n=33)	结肠癌组(n=47)
粪便	7.84 $\pm$ 0.22	6.56 $\pm$ 0.33*	5.87 $\pm$ 1.30*
肠黏膜	6.43 $\pm$ 0.23	3.26 $\pm$ 0.97*	3.10 $\pm$ 0.34*

与健康组比较, \* $P<0.01$ 。

## 3 讨论

肠道微生态作为人体的一个复杂系统, 其稳定维系着人体对部分营养物质的正常消化吸收、机体免疫反应等功能, 其中肠黏膜上共生菌形成的一道防护可以抵御致病菌的侵入及增殖<sup>[7]</sup>。一旦这种稳态失衡, 正常生理功能遭到破坏, 便有可能导致肠道疾病如炎症性肠病等的发生<sup>[8]</sup>。近年来国内外对肠道微生态异常变化及其与肠癌关系的多项研究均提示肠道菌群结构的改变可能在结直肠癌发生发展中起着一定的作用<sup>[9]</sup>, 而肿瘤微环境可能引起致病微生物的富集、益生菌群减少<sup>[10]</sup>, *F.prausnitzii* 作为肠道菌群中最为丰富的种群之一, 其潜在的重要保护作用得到了广泛关注。

本实验通过对结肠癌及结肠息肉患者粪便和病变处肠黏膜中的 *F.prausnitzii* 定量分析发现, 在粪便样本中, *F.prausnitzii* 含量水平由高至低依次为健康组、息肉组、癌症组, 且两种病变组 *F.prausnitzii* 含量明显低于健康组; 但息肉组与癌症组的结果并无显著差异。Wang 等<sup>[11]</sup>发现与健康受试者相比, 结直肠癌患者粪便中 *F.prausnitzii* 的含量明显降低。结肠慢性炎症性疾病是结肠癌的一个危险因素, 有研究证明了 *F.prausnitzii* 在肠道中的作用类似益生菌, 具有

抗炎的功效,这与其产物丁酸盐可以抑制 Th17 分化从而直接抑制 IL-17 的分泌有关<sup>[12]</sup>,丁酸盐还可以通过抑制组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylase, HDAC)的活性调控巨噬细胞作用从而控制肠道炎症状态<sup>[13]</sup>,因此 *F.prausnitzii* 数量的减少将不利于炎症的缓解,从而导致结肠癌发生。

一般认为,结肠癌由良性的腺瘤性息肉逐渐转变为浸润癌,其发展是个循序渐进的过程<sup>[14]</sup>。本实验发现无论在粪便还是黏膜中,结肠息肉组 *F.prausnitzii* 均出现明显下降,在实验后期追踪患者病理时发现息肉组中的结肠腺瘤患者 *F.prausnitzii* 数量低于癌症组,但两者差别并无统计学意义。有研究证明丁酸盐可调控相关蛋白如锌指蛋白的表达,促进 COX-2 mRNA 降解,抑制肿瘤细胞的增殖<sup>[15]</sup>,体外模型显示丁酸在 0.6~5.0 mmol/L 的浓度下,通过下调 p53 mRNA 和蛋白质的表达,加快 p53 靶基因的表达以达到诱导细胞周期阻滞和凋亡的目的<sup>[16]</sup>。因此产丁酸盐菌 *F.prausnitzii* 的减少有可能直接影响结肠癌的发生发展。本实验这项结果可能提示,在结肠癌演变初期,*F.prausnitzii* 已经出现了减少,甚至有可能在高危腺瘤阶段达到最低,这种变化可能直接导致致病菌入侵、丁酸盐的缺失使癌细胞生长所受到的抑制减少及凋亡减少,最终使疾病向癌症演变。

综上所述,本研究通过对粪便及黏膜样品中 *F.prausnitzii* 的实时定量 PCR 检测,发现 *F.prausnitzii* 在肠道息肉及癌症患者中显著减少,提示 *F.prausnitzii* 改变可能与结肠癌发生发展密切相关,建立 *F.prausnitzii* 的常规检测方法和 *F.prausnitzii* 相关微生物制剂的研制,有可能给结肠癌的早期诊断及预防治疗提供一方向。

#### [参考文献]

- [1] Globocan 2012: Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012 [EB/OL]. [2016-11-08]. <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>
- [2] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66 (2): 115-132
- [3] Sakamoto T, Mitsuzaki K, Utsunomiya DA, et al. Detection of flat colorectal polyps at screening CT colonography in comparison with conventional polypoid lesions [J]. Acta Radiol, 2012, 53 (7): 714-719
- [4] Zeng H, Claycombe KJ, Reindl KM. Butyrate and deoxycholic acid play common and distinct roles in HCT116 human colon cell proliferation [J]. J Nutr Biochem, 2015, 26 (10): 1022-1028
- [5] Bultman SJ. Molecular pathways: Gene-environment interactions regulating dietary fiber induction of proliferation and apoptosis via butyrate for cancer prevention [J]. Clin Cancer Res, 2014, 20 (4): 799-803
- [6] Johansson ME, Gustafsson JK, Holmén-Larsson J, et al. Bacteria penetrate the normally impenetrable inner colon mucus layer in both murine colitis models and patients with ulcerative colitis [J]. Gut, 2014, 63 (2): 281-291
- [7] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012 [J]. CA Cancer J Clin, 2012, 62 (1): 10-29
- [8] Abraham BP. Cancer surveillance in ulcerative colitis and Crohn's disease: new strategies [J]. Curr Opin Gastroenterol, 2016, 32 (1): 32-37
- [9] Lévy J, Romagnolo BA. Microbiota and intestinal oncogenesis [J]. Oncotarget, 2015, 6 (33): 34067-34068
- [10] Dalmasso G, Cougnoux A, Delmas J, et al. The bacterial genotoxin colibactin promotes colon tumor growth by modifying the tumor microenvironment [J]. Gut Microbes, 2014, 5 (5): 675-680
- [11] Wang T, Cai G, Qiu Y, et al. Structural segregation of gut microbiota between colorectal cancer patients and healthy volunteers [J]. ISME J, 2012, 6 (2): 320-329
- [12] 张明明, 杨晓彤, 邱新运, 等. 共生菌普拉梭菌对大鼠实验性结肠炎的保护作用及机制研究 [J]. 中华消化杂志, 2012, 32 (8): 549-554
- [13] Chang PV, Hao LM, Offermanns S, et al. The microbial metabolite butyrate regulates intestinal macrophage function via histone deacetylase inhibition [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014, 111 (6): 2247-2252
- [14] Worthley DL, Whitehall VL, Spring KJ. Colorectal carcinogenesis: Road maps to cancer [J]. World J Gastroenterol, 2007, 13 (28): 3784-3791
- [15] Sobolewski C, Sanduja S, Blanco FF, et al. Histone deacetylase inhibitors activate tristetrapiolin expression through induction of early growth response protein 1 (E-GR1) in colorectal cancer cells [J]. Biomolecules, 2015, 5 (3): 2035-2055
- [16] Janson W, Brandner G, Siegel J. Butyrate modulates DNA-damage-induced p53 response by induction of p53-independent differentiation and apoptosis [J]. Oncogene, 1997, 15 (12): 1395-1406

[收稿日期] 2016-03-21