

· 临床检验研究论著 ·

# 不同月龄轮状病毒性腹泻患儿肠道菌群变化的研究

叶萍, 贺锐<sup>△</sup>

(甘肃省妇幼保健院检验科, 甘肃兰州 730050)

**摘要:**目的 运用荧光定量聚合酶链反应(PCR)技术检测不同月龄轮状病毒性腹泻患儿肠道 4 种主要细菌含量, 评价患儿肠道菌群的变化, 为临床合理治疗提供依据。方法 运用荧光定量 PCR 技术检测肠道细菌的 16S rRNA, 检测不同月龄健康婴儿和轮状病毒腹泻患儿粪便中双歧杆菌、乳酸杆菌、大肠埃希菌与肠球菌的含量。结果 轮状病毒腹泻组婴儿粪便双歧杆菌和乳酸杆菌含量低于健康对照组( $P < 0.05$ ), 大肠埃希菌和肠球菌含量与对照组比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ ); 轮状病毒性腹泻组患儿粪便双歧杆菌和乳酸杆菌含量在不同月龄阶段都低于健康对照组( $P < 0.05$ ), 大肠杆菌和肠球菌含量仅在 3 月龄阶段低于健康对照组婴儿( $P < 0.05$ )。结论 轮状病毒性腹泻对肠道双歧杆菌和乳酸杆菌数量的影响较大, 不同月龄患儿腹泻对双歧杆菌和乳酸杆菌数量的影响也不同。

**关键词:**轮状病毒感染; 聚合酶链反应; 腹泻, 婴儿

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2014.01.018

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2014)01-0044-03

## The changes of intestinal flora in infant in different months with rotavirus diarrhea

Ye Ping, He Rui

(Department of Clinical Laboratory, Maternal and Child Health Hospital of Gansu Province, Lan Zhou, Gansu 730050, China)

**Abstract:** **Objective** Using quantitative polymerase chain reaction to detect the levels of four bacterials in infant in different months with rotavirus diarrhea, to evaluate the changes of intestinal flora in infant and to provide a basis for clinical rational treatment. **Methods** The contents of bifidobacterium, lactobacillus, Escherichia coli and enterococci of fecal were detected in healthy and rotavirus diarrhea infants in different months by 16SrRNA-targeted PCR. **Results** The bifidobacteria and lactobacilli contents of fecal in rotavirus diarrhea infants were significantly lower than that in healthy infants. Escherichia coli and enterococci contents were slightly lower than that of the control group, with no significant difference ( $p > 0.05$ ). The bifidobacteria and lactobacillus contents of fecal in rotavirus diarrhea group in different months were significantly lower than those of the healthy control group. Escherichia coli and enterococcus contents were significantly lower than that of healthy control infants only in the three months of age. **Conclusion** Rotavirus diarrhea can impact on the number of bifidobacteria and lactobacilli, and the number of bifidobacteria and lactobacilli have different changes in infants with rotavirus diarrhea in different months.

**Key words:** rotavirus infections; polymerase chain reaction; diarrhea, infantile

轮状病毒感染是导致全球婴幼儿急重症腹泻的重要原因, 每年约有 60 万婴幼儿因感染轮状病毒而死亡<sup>[1]</sup>。轮状病毒性腹泻可致患儿肠道微生态失衡, 且月龄越小对影响越大。

因肠道微生态的失衡而导致迁延性、难治性腹泻会造成患儿营养缺乏, 对其生长发育带来严重的不良影响。因此, 治疗同时需及时调整患儿肠道微生态以恢复其平衡。然而, 对于不同月龄婴儿肠道菌群状况和菌群失调的评判国内外鲜有报道, 本研究对不同月龄轮状病毒腹泻患儿肠道 4 种主要菌群变化进行了分析, 旨在为临床合理使用调整肠道微生态的制剂提供一定的实验数据。

### 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 本研究中的健康对照组的纳入对象为 2011 年 7 月至 2013 年 3 月在甘肃省妇幼保健院儿保科体检的健康婴儿, 无其他基础疾病, 进行体检的 4 周内未使用抗菌药物、微生态制剂, 无胃肠道症状。纳入对象包括母乳喂养的 3 月龄婴儿、混合喂养的 6 月龄及 10 月龄的健康婴儿各 30 例。病例组的纳入对象为 2 名儿科主任医师依据《感染性腹泻诊断标准》诊断为轮状病毒性腹泻病的 3 月龄、6 月龄及 10 月龄的患儿各 30 例。

### 1.2 方法

**1.2.1 标本的采集与存储** 获取自然排出的新鲜粪便 10 g 左右, 置无菌杯内立即送检。取新鲜标本进行轮状病毒抗原检测(采用德国拜耳胶体金检测试纸), 剩余标本用无菌干燥管储存, 于 -80 °C 冰箱保存备用。

**1.2.2 肠道细菌 DNA 的提取** 取复融粪便 1 g 加 1 mL 的 PBS(0.05 mol/L, pH7.4) 充分颠倒混匀 5~10 min 后低速离心(2 000 r/min)5 min, 取上清液。上述过程重复 3 次后, 收集上清液高速离心(13 000 r/min)3 min 后取沉渣, 沉淀的细菌用 PBS 液洗 4 次, 并用双蒸水洗 1 次, 加 50 μL 蒸馏水悬浮细菌及 50 μL 1% TritonX-100 破碎菌体, 100 °C 煮沸 5 min 后立即放入冰水中冷却。

**1.2.3 PCR 引物** 采用文献中所用的引物序列, 对所选用引物序列分别与 4 种细菌 16S rRNA 的全序列在 BLAST 数据库进行了比较验证, 4 种细菌上、下游引物分别如下: 双歧杆菌<sup>[2]</sup> CTC CTG GAA ACG GGT GG; GGT GTT CTT CCC GAT ATC TAC A, 扩增片段长度为 550 bp。乳酸杆菌<sup>[3]</sup> AGC AGT AGG GAA TCT TCC A; ATT TCA CCG CTA CAC ATG, 扩增片段长度为 380 bp。肠球菌<sup>[4]</sup> TCC ACG CCG TAA ACG

ATG AG;GAC ACG AGC TGA CGA CAA CC, 扩增片段长度为 274 bp。大肠埃希菌<sup>[4]</sup> GGA GCA AAC AGG ATT AGA TAC CC;CCC AAC ATT TCA CAA CAC G, 扩增片段长度为 317 bp。

**1.2.4 荧光定量 PCR 反应体系** 反应体系为 25  $\mu$ L, 包括 10  $\times$  Buffer 2.5  $\mu$ L, 4  $\times$  dNTP(0.25 mmol/L) 2  $\mu$ L, MgCl<sub>2</sub> (25 mmol/L) 2.5  $\mu$ L, 上、下游引物(0.25  $\mu$ mol/L)各 0.25  $\mu$ L, Taq 酶(1 U/ $\mu$ L) 0.75  $\mu$ L, DNA 模板 3  $\mu$ L, 荧光染料 SYBR green 2.5  $\mu$ L, 双蒸水 11.25  $\mu$ L。应用 Mx3000p 型荧光定量 PCR 仪进行扩增与分析。

**1.2.5 PCR 反应条件如下** 95  $^{\circ}$ C 变性 5 min; 95  $^{\circ}$ C 15 s, 60  $^{\circ}$ C 1 min, 72  $^{\circ}$ C 45 s, 87  $^{\circ}$ C 5 s 共 40 个循环; 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min 后结束; 60~95  $^{\circ}$ C 作溶解曲线。

**1.2.6 标准曲线制作** 分别纯化上述 PCR 反应过程中得到的 4 种细菌 PCR 产物, 具体步骤如下: 在 DNA 溶液中加入 1/10 溶液体积 3 mol/L、pH 5.2 的乙酸钠, 在旋涡混合器上稍加振荡或用手指轻弹离心管壁几次使之混匀后, 加入 2~2.5 倍体积的无水乙醇, 振荡混匀并置于冰上 30 min, 离心 5 min 弃上清液, 加入 1 mL 70% 的乙醇, 颠倒混匀并离心, 弃上清液, 干燥沉淀。将干燥沉淀物溶于适当体积的无菌水或 TE 缓冲液即可。在分光光度计上测定出 4 种细菌纯化产物的吸光度(A)值。按 1A 的双链 DNA 片段(1 kb)相当于  $4.74 \times 10^{13}$  copies/mL, 计算出每毫升 PCR 产物中所含的拷贝数, 然后做 10 倍系列稀释, 使其形成  $10^4 \sim 10^8$  copies/mL 系列浓度, 按上述条件进行荧光定量 PCR, 形成标准曲线。

**1.2.7 细菌产物的验证** 对 4 种细菌标准菌株做荧光定量 PCR, 利用溶解曲线比较产物解链温度(T<sub>m</sub>)值与标准菌株 T<sub>m</sub> 值, 经验证, 肠道菌群 PCR 扩增产物为双歧杆菌、乳酸杆菌、大肠杆菌和肠球菌的特异性产物。

**1.2.8 检测灵敏度分析** 通过对上述 4 种标准菌株菌落做系列稀释( $10^8 \sim 10^2$  个细菌)后行荧光定量 PCR, 证明 100 个细菌仍有特征性曲线生长, 说明用上述引物对这 4 种细菌进行荧光定量 PCR 检测有较好的检测灵敏度。

**1.3 统计学处理** 应用 SPSS11.0 软件进行统计学分析, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用成组 *t* 检验, 相关性分析用 Pearson 相关分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 轮状病毒性腹泻组与健康对照组肠道菌群的比较** 采用成组 *t* 检验比较健康对照组与轮状病毒性腹泻组肠道 4 种主要细菌含量的差异, 见表 1。轮状病毒腹泻组婴儿粪便双歧杆菌和乳酸杆菌含量低于健康对照组婴儿, 其差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ); 大肠杆菌和肠球菌含量与健康对照组比较, 差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

表 1 轮状病毒性腹泻组与健康对照组肠道 4 种细菌含量的比较(log copies/g)

细菌	健康对照组(n=90)	轮状病毒性腹泻组(n=90)	<i>t</i>	<i>P</i>
双歧杆菌	6.41 $\pm$ 2.75	2.58 $\pm$ 0.98	3.47	0.003
乳酸杆菌	3.79 $\pm$ 1.72	3.02 $\pm$ 1.12	1.98	0.039
大肠埃希菌	4.87 $\pm$ 1.79	4.60 $\pm$ 1.88	1.35	0.076
肠球菌	4.72 $\pm$ 1.95	4.12 $\pm$ 1.69	1.42	0.065

**2.2 不同月龄轮状病毒性腹泻组肠道菌群的变化情况** 采

用成组 *t* 检验进一步分析不同月龄轮状病毒性腹泻组婴儿与相应月龄健康对照组婴儿肠道 4 种主要菌群的差异, 见表 2。轮状病毒性腹泻组粪便双歧杆菌和乳酸杆菌含量在不同月龄阶段都明显低于健康对照组, 其差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。轮状病毒性腹泻组婴儿粪便大肠埃希菌和肠球菌含量仅在 3 月龄阶段低于健康对照组婴儿, 其差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); 在 6 月龄和 10 月龄阶段与健康对照组比较, 差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

表 2 不同月龄阶段轮状病毒性腹泻组和健康对照组肠道 4 种细菌含量比较(log copies/g)

细菌	组别	3 月龄	6 月龄	10 月龄
双歧杆菌	病例组	1.02 $\pm$ 1.34	2.72 $\pm$ 1.57	3.01 $\pm$ 2.54
	对照组	5.79 $\pm$ 2.67**	6.36 $\pm$ 2.72**	6.84 $\pm$ 2.92**
乳酸杆菌	病例组	2.85 $\pm$ 1.48	3.00 $\pm$ 1.98	3.21 $\pm$ 1.50
	对照组	3.67 $\pm$ 1.54**	3.89 $\pm$ 1.74*	3.67 $\pm$ 1.77*
大肠埃希菌	病例组	3.37 $\pm$ 1.81	4.99 $\pm$ 1.81	4.52 $\pm$ 1.95
	对照组	4.67 $\pm$ 1.78*	5.25 $\pm$ 1.67	4.75 $\pm$ 1.95
肠球菌	病例组	3.08 $\pm$ 2.52	4.64 $\pm$ 1.87	4.39 $\pm$ 1.99
	对照组	3.87 $\pm$ 2.67*	4.84 $\pm$ 1.87	4.97 $\pm$ 1.73

\*\* :  $P < 0.01$ ; \* :  $P < 0.05$ , 与同种细胞的病例组比较。

## 3 讨 论

腹泻是小儿常见病、多发病, 是一个全球性公共卫生问题, 尤以发展中国家最为突出。据 WHO 不完全统计, 发展中国家 5 岁以下住院的腹泻患儿中有 20%~50% 是轮状病毒肠炎患者<sup>[5]</sup>, 每年约有 450 万 5 岁以下儿童死于腹泻<sup>[6-7]</sup>。

轮状病毒性腹泻除了可导致患儿电解质失衡外, 其导致的肠道微生态的失衡也是不容忽视的。最近的研究表明, 肠道菌群失调不仅影响肠道内的营养吸收, 也可导致肠道外临床症状的出现<sup>[8-9]</sup>。本研究比较了健康婴儿与轮状病毒性腹泻患儿粪便中 4 种主要细菌含量。轮状病毒性腹泻主要引起肠道双歧杆菌和乳酸杆菌含量的大幅降低, 而肠道大肠杆菌和肠球菌的含量变化不大, 笔者认为可能与以下因素有关。当患儿感染轮状病毒时, 肠蠕动的增强使肠道内气体增加, 破坏了厌氧环境, 有利于需氧菌的繁殖而不利于厌氧菌的繁殖; 双歧杆菌和乳酸杆菌属于益生菌位于肠道菌群的最深层, 均黏附于肠上皮形成保护性菌膜, 而肠球菌与大肠埃希菌属于共生菌, 均附着于肠黏膜的表面, 可以游动<sup>[9]</sup>。轮状病毒感染后期严重的细胞损害减弱了益生菌与肠上皮的黏附能力, 破坏了益生菌的生存环境, 从而导致以上结果。

婴幼儿肠道微生态的演替需要 2~3 年的时间才能完成<sup>[10]</sup>。婴儿期肠道微生态最易受到外部因素以及内在因素的影响, 而月龄是一个不容忽视的内在因素<sup>[11]</sup>。因此, 本研究进一步对不同月龄轮状病毒性腹泻组 4 种菌群进行了分析。结果显示, 不论月龄大小, 轮状病毒感染均可引起以双歧杆菌和乳酸杆菌减少为主要表现的肠道微生态失衡, 而大肠埃希菌与肠球菌的数量变化不大。值得注意的是不同于其他两个月龄组, 3 月龄组患儿轮状病毒性腹泻时不仅双歧杆菌和乳酸杆菌含量降低, 大肠埃希菌和肠球菌也较健康婴儿明显减少, 其可能的原因是月龄较小的婴儿其肠道的长度以及黏膜皱褶不及年长者, 不利于肠道菌的“隐藏”。因此, 更应关注年龄较小的轮状病毒相关腹泻患儿的肠道微生态变化, 及时纠正其肠道菌

群失衡状态,以免造成不良后果。

随着人们对微生物学认识的加深,临床医生对疾病治疗理念的转变,感染性疾病以杀灭病原菌为主的传统治疗方法得以改变,以恢复人体微生态平衡为最终目的的治疗理念被初步树立,从而使微生态制剂在临床治疗中得到广泛的使用。2010 年的《微生态制剂儿科应用专家共识》中指出微生态制剂具有菌株特异性和剂量依赖性,也就是说某一菌株具有治疗效果但并不代表本属或种的细菌均具有这一作用,对于同一菌株治疗不同疾病所需的剂量也不同,因此在众多的微生态制剂选择时应注意其所含菌株的种类和剂量<sup>[12]</sup>。然而在调整轮状病毒腹泻患儿肠道微生态时如何选用合理高效的微生态制剂国内还缺乏相关标准。本研究通过荧光定量 PCR 技术检测不同月龄婴儿肠道细菌 16S rRNA,明确其肠道菌群构成及数量,为临床合理选择微生态制剂提供了相关的实验室数据,同时通过该方法也可望为临床个体化治疗提供相应的技术支持。

参考文献

[1] Lynch M. Rotavirus and central nervous system symptoms: cause or contaminant? Case reports and review [J]. Clin Infect Dis, 2001, 33(7):932-938.

[2] Matsuki T, Watanabe K, Fujimoto J, et al. Use of 16S rRNA gene-targeted group-specific primers for real-time PCR analysis of predominant bacteria in human feces [J]. Appl Environ Microbiol, 2004, 70(12):7220-7228.

[3] Gill SR, Pop M, Deboy RT, et al. Metagenomic analysis of the hu-

man distal gut microbiome [J]. Science, 2006, 312:1355-1359.

[4] 张小贤,钱香,楼正青,等. 16SrRNA 实时荧光定量 PCR 检测肠道菌群的研究 [J]. 中国高等医学教育, 2010, 6:128-144.

[5] Hyser JM, Estes MK. Rotavirus vaccines and pathogenesis: 2008 [J]. Curr Opin Gastroenterol, 2009, 25(1):36-43.

[6] De Zoysa I, Feachem RG. Interventions for the control of diarrhoeal diseases among young children: Rotaviruses and Cholera immunization [J]. Bull WHO, 2008, 78:569-583.

[7] Bern C, Martinez J, Zoysa I, et al. The magnitude of the global problem of diarrhoeal disease: a ten-year update [J]. Bull WHO, 2008, 86:705-714.

[8] Raming RF. Pathogenesis of intestinal and systemic rotavirus infection [J]. J Virol, 2004, 78(19):10213-10220.

[9] Duffy LC, Leavens A, Griffiths E, et al. Perspectives on bifidobacteria as biotherapeutic agents in gastrointestinal health [J]. Dig Dis Sic, 2007, 60:1499-1505.

[10] 毛萌, 儿童肠道微生态系统的特点与疾病 [J]. 临床儿科杂志, 2005, 23(10):679-682.

[11] Unicomb LE, Kilgore PE, Faruque ASG, et al. Anticipating rotavirus vaccines: hospital-based surveillance for rotavirus diarrhea and estimates of disease burden in Bangladesh [J]. Pediatr Infect Dis J, 2009, 28(10):947-951.

[12] 郑跃杰, 黄志华, 刘作义, 等. 微生态制剂儿科应用专家共识 [J]. 中国实用儿科杂志, 2011, 26(1):20-23.

(收稿日期:2013-08-08)

(上接第 43 页)

产生影响<sup>[9]</sup>。分析脂肪细胞因子水平与细胞因子相关性,血清内脂素水平与 IGF-1、VEGF 呈负相关,与 IL-6 无相关性。血清抵抗素水平与 IGF-1、VEGF 呈正相关,与 IL-6 无相关性。血清瘦素水平与 IL-6、IGF-1 水平呈正相关,与 VEGF 水平无相关性,这也进一步明确了肥胖导致的脂肪细胞因子代谢紊乱,与血清细胞因子水平密切相关,而细胞因子网络的紊乱最终导致子宫肌瘤的发生及发展,这对于判断病情进展也有着重要的意义<sup>[10]</sup>。因此,维持体内脂代谢在一个相对正常的水平,在一定意义上可延缓子宫肌瘤的发生,肥胖患者脂代谢紊乱是其子宫肌瘤的发生率高于非肥胖者的重要原因。同时,脂肪细胞因子代谢的紊乱,也是患者出现代谢综合征及代谢综合征发展的一个重要因素<sup>[11]</sup>,加强对此类患者的密切关注,对于减轻胰岛素抵抗、手术的心血管疾病风险也有着积极意义。

综上所述,肥胖的子宫肌瘤患者脂肪细胞因子与细胞因子水平的异常改变对解释肥胖在子宫肌瘤发生及发展中的作用具有重要意义,且二者具有较好的相关性。同时,有必要进行该方面的前瞻性研究,动态观察脂肪细胞因子及细胞因子代谢与子宫肌瘤生长的关系,明确体质量控制于子宫肌瘤治疗中的意义,为子宫肌瘤的基础及临床研究提供理论依据。

参考文献

[1] Carbonell JL, Acosta R, Perez Y, et al. Safety and effectiveness of different dosage of mifepristone for the treatment of uterine fibroids: a double-blind randomized clinical trial [J]. Int J Womens Health, 2013, 5(3):115-124.

[2] Liu Y, Song CY, Wu SS, et al. Novel adipokines and bone metabolism [J]. Int J Endocrinol, 2013, 20(1):895-901.

[3] Persad R, Huynh HQ, Hao L, et al. Angiogenic remodeling in pediatric EoE is associated with increased levels of VEGF-A, angiogenin, IL-8, and activation of the TNF-alpha-NFkappaB pathway [J]. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2012, 55(3):251-260.

[4] Fletcher HM, Wharfe G, Williams NP, et al. Renal impairment as a complication of uterine fibroids: A retrospective hospital-based study [J]. J Obstet Gynaecol, 2013, 33(4):394-398.

[5] Santamaria X, Massasa EE, Taylor HS. Migration of cells from experimental endometriosis to the uterine endometrium [J]. Endocrinology, 2012, 14(2):112-118.

[6] Nair SA, Al-Hendy A. Adipocytes enhance the proliferation of human leiomyoma cells via TNF-alpha proinflammatory cytokine [J]. Reprod Sci, 2011, 18(12):1186-1192.

[7] Shveiky D. The effect of uterine fibroid embolization on lower urinary tract symptoms [J]. Int Urogynecol J, 2013, 24(8):1341-1345.

[8] Van den Bosch T, Coosemans A, Morina M, et al. Screening for uterine tumours [J]. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2012, 26(2):257-266.

[9] Penzias AS. Recurrent IVF failure; other factors [J]. Fertil Steril, 2012, 97(5):1033-1038.

[10] Pitter MC, Garjiulo AR, Bonaventura LM, et al. Pregnancy outcomes following robot-assisted myomectomy [J]. Hum Reprod, 2013, 28(1):99-108.

[11] Kishore TA. Laparoscopic donor nephrectomy with transvaginal extraction: initial experience of 30 cases [J]. J Endourol, 2013, 27(11):1361-1365.

(收稿日期:2013-09-05)