

· 论 著 ·

维吾尔医学异常黑胆质体液结肠癌患者肠道菌群的分布情况研究*

阿孜尔古丽·阿布都克日木¹, 阿布都哈巴尔·阿布都克日木², 马兰英³,艾力江·买买提明⁴, 孙玉萍¹, 陈 锋¹, 王红英¹, 德力夏提·依米提^{1△}

- (1. 新疆医科大学病原生物学教研室, 新疆乌鲁木齐 830011; 2. 和田师范专科学校理学院生物教研室, 新疆和田 848000; 3. 新疆医科大学附属肿瘤医院消化内科, 新疆乌鲁木齐 830011; 4. 新疆维吾尔医学专科学校医疗系内科教研室, 新疆和田 848000)

摘要:目的 通过先进的分子生物学方法分析维吾尔医学异常黑胆质结肠癌患者肠道菌群分布情况及多样性。方法 对结肠癌患者进行维吾尔医学体液分型并挑取其中异常黑胆质患者, 采集患者粪便样品, 提取细菌总 DNA 并设计一对通用引物扩增 16S rDNA 的 V6~V8 可变区进行变形梯度凝胶电泳 (DGGE), 从 DGGE 指纹图谱中比较各个结肠癌患者肠道菌群分布情况。结果 通过试验得到了维吾尔族异常黑胆质结肠癌患者肠道菌群结构特征的 DNA 指纹图谱, 从指纹图谱上选择一些特异性条带切下来回收, 测序, 测序出来的序列在基因库进行比对做出进化树了解菌群之间的亲缘性。结论 异常黑胆质结肠癌患者肠道菌群基因序列的亲缘性结果显示肠道菌群的多样性明显少其中肠道优势菌比例低。

关键词: 维吾尔医学; 异常黑胆质; 结肠癌; 肠道菌群

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2016.04.003

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2016)04-0438-03

Analysis of intestinal bacterial diversity in abnormal sawda hilit people of colon cancer in traditional uighur medicine*

Azierguli · Abudoukerimu¹, Abudouhabaer · Abudoukerimu², Ma Lanying³, Ailijiang · Maimaitiming⁴, Sun Yuping¹,Chen Feng¹, Wang Hongying¹, Delixiati · Yimiti^{1△}

(1. Department of Microbiology, Xinjiang Medical University, Wulumuqi, Xinjiang 830011, China;

2. Biology Department of Science Institute, Hotan Teacher's College, Hetian, Xinjiang 848000, China; 3. Department of Gastroenterology, Affiliated Tumor Hospital of Xinjiang Medical University, Wulumuqi, Xinjiang 830011, China;

4. Department of Internal Medicine, Xinjiang Uygur Medical College, Hetian, Xinjiang 848000, China)

Abstract: Objective To analyze the traditional uighur medicine abnormal sawda hilit people of colon cancer intestinal flora diversity by advanced molecular biology methods. **Methods** Choice the colon cancer abnormal sawda hilit by uighur medicine and stool samples were collected from these groups and total genomic DNA was extracted. Extraction of total DNA designed a pair of universal primers to amplify the 16S rDNA V6 to V8 variable regions. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of the amplified sequences was performed then cloned the DGGE bands and sequencing. **Results** Obtained by experiment reflect structural features of intestinal flora DNA fingerprinting, from sequence specific band sequencing out in the Genbank database on the blast program to compare, and make the evolutionary tree understanding of the relationship between intestinal microflora. **Conclusion** Colon cancer abnormal sawda hilit intestinal microbial gene sequence showed bacteria have rarefaction state and Dominant bacteria are significantly lower.

Key words: uighur medicine; abnormal sawda hilit; colon cancer; intestinal microflora

维吾尔医学理论体系中, 异常体液分型是治疗疾病的主要因素, 在治疗疾病的过程中起着非常重要的作用^[1-2], 健康人体的体液在结构和功能上处于平衡状态, 体液异常变化会导致体液失调, 进而引发各种疾病, 尤其是异常黑胆质的出现是导致疾病的主要原因之一^[3-4], 维吾尔医学临床研究发现 80% 以上的肿瘤是由异常黑胆质性体液产生的, 可见异常黑胆质性体液与肿瘤是密切相关的。与其他异常体液质相比, 它的致病性、危险性、恶性程度最高, 在难治性疾病的发生、发展过程中也起主导作用。肠道菌群与人类的健康、疾病状况息息相关, 它不仅能降解食物中不可消化的营养成分, 提供宿主维生素等营养物质, 还能促进肠上皮细胞的分化与成熟, 激活肠道免疫系统以及调节宿主能量存储与代谢。正常情况下肠道菌群保持着共生和拮抗关系, 从消化、营养吸收、能量供应、脂肪代谢、

免疫调节、药物代谢和毒性等诸多方面影响人和动物的健康状况^[5-7]。目前越来越多的研究者认识到维吾尔医学治疗体系结合到肠道微生态研究的重要意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 在新疆维吾尔自治区肿瘤医院选择 18 例结肠癌患者, 并按照体液分型诊断标准诊断为异常黑胆质型体液^[8]。异常黑胆质型体液为面色萎白而发干, 唇色淡白而枯燥, 舌质淡红之涩, 舌形瘦, 舌涎少, 舌苔薄白而不润, 大便干结而色淡不臭, 小便清而短少。纳入标准: (1) 年龄 18~75 岁; (2) 维吾尔族; (3) 对本研究知情同意者; (4) 性别不限; (5) 临床诊断为结肠癌术前患者。排除标准: (1) 有脑血管疾病、高血压、糖尿病、肝脏疾病、传染病; (2) 未化疗、放疗患者; (3) 术后患者; (4) 近期 (6 周内) 接受抗菌药物及微生态制剂治疗者。

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30860385); 新疆医科大学创新基金项目 (XJ201301)。 作者简介: 阿孜尔古丽·阿布都克日木, 女, 讲师, 主要从事肠道菌群微生态研究。 △ 通讯作者, E-mail: 2316yimit@163.com。

1.2 仪器与试剂 QIAamp DNA Stool Mini Kit 试剂盒购自 Qiagen 生物科技有限公司, $2 \times$ Taq PCR MasterMix; $2 \times$ Taq PCR MasterMix 购自上海生物科技有限公司; PCR 纯化试剂盒购自上海生物科技有限公司; 丙烯酰胺、去离子甲酰胺、甲叉双丙烯酰胺、尿素购自 Sigma; 四甲基乙二胺 (TEMED) 购自 Promega; SYBR Green I、100% 甘油、2% 二甲苯酚、2% 溴芬兰、冰醋酸购自北京百泰克生物科技有限公司。PCR 引物委托上海生工生物技术有限公司合成, 主要仪器: 凝胶成像系统 (GelDoc2000 型)、紫外可见分光光度计、DCodeTM System (美国 Bio-Rad 有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 总 DNA 的提取 参照 QIAamp DNA Stool Mini Kit 试剂盒说明, 提取粪便标本细菌总 DNA 并测定浓度后稀释为 $40 \text{ ng}/\mu\text{L}$, -20°C 保存为后续试验做准备。

1.3.2 6SrDNA V6-V8 区 PCR 扩增 粪便细菌的 V6-V8 区通用引物 F968f-GC(5'-CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAA CGC GAA GAA CCT TAC-3') 和 R1401(5'-CGG TGT GTA CAA GAC CC-3')^[9-10] 委托上海生工生物公司合成。PCR 扩增反应体系 ($25 \mu\text{L}$): 引物各 $1 \mu\text{L}$ (10 mmol/L), DNA 模板 $3 \mu\text{L}$, $2 \times$ PCR TaqMix $12.5 \mu\text{L}$, 加 ddH_2O 至 $25 \mu\text{L}$ 。反应程序: 95°C 预变性 3 min; 94°C 变性 30 s; 62.5°C 退火 30 s; 72°C 延伸 1 min, 共 30 个循环; 72°C 延伸 5 min。在第 1 轮 PCR 之后为了减少 PCR 过程中异源 DNA 产物影响后续的 DGGE 指纹图谱的质量, 将 PCR 产物稀释 10 倍后, 将其作为模板再进行第 2 轮只有 5 个循环的修复 PCR 扩增, 用 2.0% 琼脂糖凝胶电泳 30 min, 用凝胶成像系统照相。

1.3.3 DGGE 指纹图谱分析 使用美国 Bio-Rad 有限公司的 DCodeTM System 进行变性梯度凝胶电泳, 采用浓度为 8% 聚丙烯酰胺、乙二胺四乙酸 (EDTA)、变性浓度梯度范围 25%~75% (100% 变性溶液对应 20 mL 40% 聚丙烯酰胺/甲叉双丙烯酰胺, 42 g 尿素, 40 mL 去离子甲酰胺) 取改良后的 PCR 产物 300 ng 等体积与凝胶载样品染液混匀, 放入加样孔后放入电泳槽中 50 V 电压电泳 30 min 后改为 150 V 电泳 240 min 然后用 0.01% SYBR Green 1 染色胶 45 min, 每次 15 min 分三次染色胶然后在 UVI 成像仪照相。

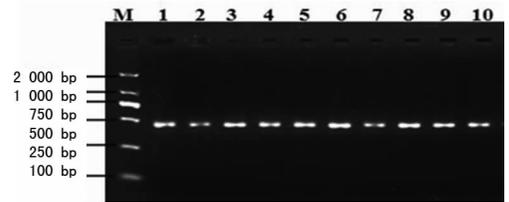
1.3.4 切胶回收纯化及测序 在 DGGE 指纹图谱胶中选择一些共有的和差异性明显的条带用无菌刀片切下来, 切下来的 DNA 条带放在无菌、干燥的 1.5 mL Ep 管中, 再用双氧水反复清洗再用无菌牙签捣碎使胶中的 DNA 完全释放出来, 加 $20 \mu\text{L}$ 双氧水放置 4°C 冰箱 16 h 左右, 以上述提出来的 DNA 作为模板将原带 GC 夹子的反向引物去除 GC 夹子, 引物序列分别为 F968f 5'-GAA CGC GAA GAA CCT TAC-3', R1401(5'-CGG TGT GTA CAA GAC CC-3') PCR 的反应体系和程序同上述进行 PCR 扩增。使用凝胶回收试剂盒回收、将回收的 PCR 产物送北京天根生化科技有限公司进行序列测定。测序出来的序列利用基因库中 BLAST 进行比对, 并将相似性大于 95% 以上的序列用 MEGA4 软件构建系统进化树, 揭示亲缘关系并找出优势细菌序列。

2 结果

2.1 肠道菌群 16SrDNA V6-V8 区 PCR 产物鉴定 利用 2% 琼脂糖凝胶电泳以提取的 DNA 稀释作为模板, PCR 扩增目的基因, 图 1 显示, 鉴定 1~10 号标本的 PCR 产物, 扩增产物片

段大小约为 480 bp 左右, 未见到非特异性扩增, DNA 样品完整性好。

2.2 肠道菌群 DGGE 电泳图与测序结果 每一个样品的 PCR 扩增产物重复多次进行变性梯度凝胶电泳, 经相互比较, 结果基本一致, 证实本试验的重复性和准确性良好, 异常黑胆质型结肠癌患者肠道菌群结构 DGGE 指纹图谱见图 2 所示 (见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”), 均表现出个体的条带数量稀少, 而且每个条带的亮度也有区别, 有共同的条带, 也有相互有差异的条带, 这表明在患者肠道中存在量和种类不一样的细菌。图谱中每一个条带都代表一种细菌, 而且条带的亮度表明细菌量的多少, 图谱中可以看到每一个研究对象肠道中细菌的种类、数量和优势菌的分布都不一样, 有些个体出现的优势菌在别的个体的肠道中没有出现或者量比较少, 有些细菌在个体中分布去向一致, 因此在图谱中选择具有代表性的, 差异性大的一些条带进行切胶回收, 纯化进行测序。测序显示维吾尔族异常黑胆质型结肠癌患者肠道菌群中拟杆菌属和梭杆菌属数量较多。所得的序列在 GeneBank 数据库中比对测序结果, 基因文库比对相似性。



M: DNA 标记物; 1~10 号: PCR 扩增目的基因产物。

图 1 PCR 产物电泳图

2.3 异常黑胆质型结肠癌患者肠道总菌群 DGGE 图谱的相似性聚类分析 目的片段经基因测序后进行 BLAST 序列比对, 同源性大于 95% 的用 MEGA4 软件构建维吾尔族异常黑胆质型结肠癌患者肠道菌群进化树, 结果见图 3 (见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

3 讨论

人的肠道中存在着大约 10^{14} 个肠道菌群, 由 1 000 多种微生物组成, 占机体细胞总量的 10 倍, 是人和动物体最庞大而复杂的生物群落, 肠道菌群又被称为“超级生物体”^[11], 正常情况下肠道菌群保持着良好的动态平衡, 一旦破坏动态平衡可能与很多疾病的发生、发展有关, 比如肥胖、肠道各种炎症疾病、造血功能障碍、肝硬化合并肠功能紊乱、抗菌药物相关性腹泻、习惯性便秘、肠易激综合征等^[12], 因此肠道菌群很多方面影响人和动物的健康状况, 现在已经把肠道菌群看作为宿主的一个重要组成部分。

DGGE 最初是应用在 DNA 片段中的出现点突变的鉴定研究中, 此后该技术被广泛用于各种微生物种群检测的研究, 目前已经发展成为研究微生物种类、数量、分类等的一种重要的分子生物学方法。有研究者则分别应用此技术分析 4 位受试者结肠中双歧杆菌、乳酸杆菌及其他乳酸菌的分布和中老年人粪便菌群多样性研究。DGGE 技术多年以来一直用于肠道菌群多样性研究中, 是一种比较成熟、先进的分子生物学方法。

本研究采用 DGGE 技术针对维吾尔族异常黑胆质型结肠癌患者肠道菌群 16SrDNA V6-V8 可变区进行菌群分布情况、多样性、个体之间细菌差异性、检测出来的细菌序列相似性等整体相关性研究。更为全面地探讨维吾尔族异常黑胆质结

肠癌患者肠道菌群的变化趋势,同时为维吾尔医学体液质理论以及维吾尔医学疾病诊断提供了一些线索。在 PCR-DGGE 图谱上能够直观地表现出个体差异,同时肠道总菌群 UPGMA 相似性聚类分析显示出肠道总菌群的同源性存在差异,研究中获得维吾尔医学异常黑胆质结肠癌患者肠道细菌分布情况及肠道细菌指纹图谱,此图谱显示异常黑胆质结肠癌患者肠道菌群多样化,并且个体之间具有相似性,肠道中存在不同种类的细菌,再从图谱中把每一种条带切下来纯化克隆检测基因序列的相似性对比,并用相似性大于 95% 以上的基因序列做树状图分析及鉴定异常黑胆质结肠癌患者中具有丰富的拟杆菌属和梭杆菌属。试验还发现很多不可培养的细菌属,并对其种属亲缘程度进行了分析,这些不可培养的肠道细菌与优势细菌亲缘性比较近,也有个别的细菌亲缘性比较远,将加大样本量进一步研究异常黑胆质结肠癌患者肠道菌群中的其他优势菌并与这些优势菌的分布与体液质的关系,是细菌引起了这些体液的分布还是体液决定了这些优势菌的分布,这些因果关系还有待进一步鉴定。

参考文献

[1] 易沙克江. 中国医学百科全书:维吾尔医分卷(维文)[M]. 乌鲁木齐:新疆科技卫生出版社,1995:17-33.
 [2] 买买提明·沙比尔. 维吾尔医学诊断学[M]. 乌鲁木齐:新疆科技卫生出版社,1993:135-148.
 [3] 哈木拉提·吾甫尔. 维吾尔医学气质体液论及其现代研究[M]. 乌鲁木齐:新疆科技卫生出版社,2003:44-52.
 [4] 阿不都热依木·玉苏甫,李林,哈木拉提·吾甫尔,等. 维吾尔医学常体液分型及其与氧化-抗氧化系统关系的研究[J]. 中国基础医学杂志,2004,10(8):61-63.
 [5] Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunencko T, et al. A core gut mi-

crobiome in obese and lean twins[J]. Nature, 2009, 457(7228): 480-484.
 [6] Maia MR, Chaudhary LC, Bestwick CS, et al. Toxicity of unsaturated fatty acids to the biohydrogenating ruminal bacterium, *Butyrivibrio fibrisolvens*[J]. BMC Microbiol, 2010, 18(1): 10-52.
 [7] Gill SR, Pop M, Deboy RT, et al. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiom [J]. Science, 2006, 312(5778): 1355-1359.
 [8] Upur Halmurat. Theory of MIZAJ and HILIT in Uighur medicine and its modern study [M]. Urumqi: Xinjiang Science, Technology and Sanitation Press, 2003.
 [9] Backhed F, Sonnenburg JL, Peterson DA, et al. Host-bacteria mutualism in the human intestine [J]. Science, 2005, 307(5717): 1915-1920.
 [10] Fillon M, Novinscak A, Decoste NJ. Characterization of bacterial and fungal communities in composted biosolids over a year period using denaturing gradient gel electrophoresis [J]. Can J Microbiol, 2009, 387(1): 375-387.
 [11] 曾波, 钟荣珍, 谭支良, 等. 肠道微生物多样性与能量代谢调控及肥胖关系的研究进展 [J]. 中国微生态学杂志, 2008, 20(8): 415-417.
 [12] 吴晓康, 徐纪茹, 张旭燕, 等. 2 型糖尿病患者肠道拟类菌属和双歧杆菌属多样性的 PCR-DGGE 指纹图谱分析 [J]. 西安交通大学学报: 医学版, 2010, 31(4): 475-480.

(收稿日期: 2015-10-24)



(上接第 437 页)

Boswellia ovalifoliolata abrogates ROS mediated NF- κ B activation, causes apoptosis and chemosensitization in triple negative breast cancer cells [J]. Environ Toxicol Pharmacol, 2014, 38(1): 58-70.
 [4] Jimenez X, Lu D, Brennan L, et al. A recombinant, fully human, bispecific antibody neutralizes the biological activities mediated by both vascular endothelial growth factor receptors 2 and 3 [J]. Mol Cancer Ther, 2005, 4(3): 427-434.
 [5] Ahn KS, Sethi G, Aggarwal BB. Nuclear factor-kappa B: from clone to clinic [J]. Curr Mol Med, 2007, 7(7): 619-637.
 [6] Kalaitzidis D, Gilmore TD. Transcription factor cross-talk: the estrogen receptor and NF-kappaB [J]. Trends Endocrinol Metab, 2005, 16(2): 46-52.
 [7] Karin M, Greten FR. NF-kappaB: linking inflammation and immunity to Cancer development and progression [J]. Nat Rev Immunol, 2005, 5(10): 749-759.
 [8] Biswas DK, Shi Q, Baily S, et al. NF-kappa B activation in human breast Cancer specimens and its role in cell proliferation and apoptosis [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101(27): 10137-10142.
 [9] Pacifico F, Mauro C, Barone C, et al. Oncogenic and anti-apoptotic activity of NF-kappa B in human thyroid carcinomas [J]. J Biol Chem, 2004, 279(52): 54610-54619.
 [10] Sun L, Yu DH, Sun SY, et al. Expressions of ER, PR, HER-2,

COX-2, and VEGF in primary and relapsed/metastatic breast cancers [J]. Cell Biochem Biophys, 2014, 68(3): 511-516.
 [11] Ho MY, Liang SM, Hung SW, et al. MIG-7 controls COX-2/PGE2-mediated lung Cancer metastasis [J]. Cancer Res, 2013, 73(1): 439-449.
 [12] Okuda H, Xing F, Pandey PR, et al. miR-7 suppresses brain metastasis of breast Cancer stem-like cells by modulating KLF4 [J]. Cancer Res, 2013, 73(4): 1434-1444.
 [13] Valdehita A, Carmena MJ, Bajo AM, et al. RNA interference-directed silencing of VPAC1 receptor inhibits VIP effects on both EGFR and HER2 transactivation and VEGF secretion in human breast Cancer cells [J]. Mol Cell Endocrinol, 2012, 348(1): 241-246.
 [14] Vidaurreta M, Sánchez-Munoz R, Veganzones S, et al. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms in patients with colorectal cancer [J]. Rev Esp Enferm Dig, 2010, 102(1): 20-31.
 [15] Foulkes WD, Smith IE, Reis-Filho JS. Triple-negative breast cancer [J]. N Engl J Med, 2010, 363(20): 1938-1948.

(收稿日期: 2015-11-28)

