

· 论 著 ·

# 溃疡性结肠炎患者粪便中艰难梭菌毒素基因 A/B 携带情况的研究\*

牛 敏, 刘淑敏, 杜 艳<sup>△</sup>

(昆明医科大学第一附属医院检验科 650001)

**摘要:**目的 检测溃疡性结肠炎(UC)患者和健康体检者粪便标本中艰难梭菌毒素基因 A/B 携带情况,探讨艰难梭菌毒素基因携带情况与 UC 之间的关系。方法 收集 53 例 UC 确诊患者(活动期 32 例,静止期 21 例)和 45 例健康体检者的粪便标本,提取粪便总 DNA,采用荧光定量 PCR 方法分别检测粪便中艰难梭菌毒素 A(cdtA)基因及艰难梭菌毒素 B(cdtB)基因,扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳,并对扩增产物进行测序验证。结果 UC 组共检出 7 例 cdtA、4 例 cdtB,其中 UC 活动期组 5 例 cdtA、2 例 cdtB;静止期组 2 例 cdtA、2 例 cdtB;健康对照组共检出 5 例 cdtA、2 例 cdtB。UC 组 cdtA 和 cdtB 检出率与健康对照组比较差异无统计学意义( $P>0.05$ );活动期组 cdtA 和 cdtB 检出率与静止期组比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )。结论 粪便中 cdtA/B 的携带情况与 UC 发病、疾病分期无明显相关性。

**关键词:** 溃疡性结肠炎; 艰难梭菌; 毒素基因

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.04.002

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)04-0436-03

## Research on carrying situation of Clostridium difficile toxin gene cdtA/B in stool of patients with ulcerative colitis\*

NIU Min, LIU Shumin, DU Yan<sup>△</sup>

(Department of Clinical Laboratory, First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming, Yunnan 650001, China)

**Abstract:** Objective To detection the carrying situation of Clostridium difficile toxin gene A/B in stool specimens of the patients with ulcerative colitis(UC) and persons undergoing physical examination and to research the relationship between Clostridium difficile toxin gene carrying and UC. **Methods** The stool specimens were collected from 53 cases of UC(32 cases of active stage and 21 cases of resting stage) and 45 persons undergoing physical examination. Total DNA was extracted from stool specimens. The Clostridium difficile toxin gene cdtA and cdtB were detected by real-time PCR, then the PCR products were amplified and performed the agarose gel electrophoresis and gene sequencing for conducting the amplification products verification. **Results** 7 cases of cdtA and 4 cases of cdtB were checked out in the UC group, in which 5 cases of cdtA and 2 cases of cdtB were in the UC active stage group, 2 cases of cdtA and 2 cases of cdtB were in the UC resting stage group. In the healthy control group, 5 cases of cdtA and 2 cases of cdtB were checked out. The detection rate of cdtA and cdtB had no statistically significant difference between the UC group and healthy control group( $P>0.05$ ). There was no statistically significant difference between UC active group and inactive group ( $P>0.05$ ). **Conclusion** There is no apparent correlation between the carrying situation of cdtA and cdtB in stool with UC onset and UC stage.

**Key words:** ulcerative colitis; Clostridium difficile; toxin gene

溃疡性结肠炎(UC)是一种慢性非特异性结肠炎症,临床症状主要有腹痛、腹泻、黏液血便等,目前尚无法治愈<sup>[1]</sup>。UC 发病机制复杂,目前认为是免疫功能异常、遗传易感性、肠黏膜屏障功能障碍和肠道菌群失调共同作用的结果<sup>[2]</sup>。艰难梭菌是严格厌氧的革兰阳性芽孢杆菌,是医院内感染的常见条件致病菌,主要引起抗菌药物相关性腹泻、伪膜性肠炎等,严重时可引起患者死亡<sup>[3]</sup>。艰难梭菌的主要致病力为毒素 A 和毒素 B。其中,毒素 A 为肠毒素,毒素 B 为细胞毒素<sup>[4]</sup>。美国对于炎症性肠病(IBD)患者中艰难梭菌感染的流行病学调查发现,IBD 住院患者艰难梭菌感染率是普通住院患者的 8 倍,而 UC 患者的感染率又明显高于克罗恩病(CD)患者<sup>[5]</sup>。本研究收集本院 UC 患者与健康体检者的新鲜粪便标本,采用实时荧光定量 PCR 的方法检测艰难梭菌毒素基因 A/B 的携带情况,探讨艰难梭菌的感染与 UC 之间的关系。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选取 2012—2013 年于昆明医科大学第一附属医院消化科住院的 53 例 UC 患者(UC 组),男 31 例,女 22 例,平均(46.92±12.90)岁,经结肠镜及病理检查,符合 2012 年中华医学会消化病学分会炎症性肠病学组制定的《炎症性肠病诊断治疗的共识意见》相关诊断标准<sup>[6]</sup>。根据疾病活动指数分为活动期组 32 例,男 17 例,女 15 例,平均(47.71±12.98)岁和静止期组 21 例,男 14 例,女 7 例,平均(45.88±12.98)岁。另选取本院同期健康体检者 45 例作为健康对照组,男 27 例,女 18 例,平均(45.84±12.16)岁,健康对照组无消化道慢性疾病史,常规体检和粪便常规检查均未见异常。收集所有研究对象的新鲜粪便标本。

**1.2 仪器与试剂** ABI7300 型定量 PCR 仪(美国 ABI 公司), Power Pac3000 型电泳仪(美国 Bio-Rad 公司), Tannon 3500

\* 基金项目:云南省自然科学基金面上项目(2014FZ123)。

作者简介:牛敏,女,技师,主要从事临床微生物检验的研究。△ 通信作者,E-mail:duyan\_m@139.com。

紫外凝胶成像仪(上海天能科技有限公司),离心柱型粪便 DNA 组提取试剂盒、SuperReal 荧光定量预混试剂增强版 SYBR Green(北京天根生化)。引物合成由上海 invitrogen 公司完成。

1.3 方法

1.3.1 粪便总 DNA 的提取 采用提取试剂盒(离心柱型)抽提粪便总 DNA,具体方法按试剂盒说明书操作。提取的 DNA 于 -20 °C 保存。

1.3.2 扩增引物 艰难梭菌毒素 A(cdtA)基因、艰难梭菌毒素 B(cdtB)基因引物序列见表 1。扩增体系为混合试剂 12.5 μL,模板 DNA 1 μL,上、下游引物各 1 μL,水 9.5 μL。扩增条件为 95 °C 预变性 15 min,1 个循环;95 °C 变性 10 s,58~60 °C 退火,延伸 30 s,40 个循环。退火温度分别为 cdtA 60 °C,cdtB 58 °C。扩增产物用 2% 的琼脂糖凝胶电泳,用 100 bp 的标志物作为标尺。

表 1 基因引物

基因名称	引物序列(5'~3')	产物长度 (bp)
cdtA 上	GCA TGA TAA GGC AAC TTC AGT GG	630
cdtA 下	GAG TAA GTT CCT CCT GCT CCA TCA A	
cdtB 上	TGA TGC ACT ATG CGA TTT AAA ACA A	545
cdtB 下	GCT CTT TGA TTG CTG CAC CT	

1.3.3 扩增产物测序 扩增产物纯化后双向测序,测序结果与 BLAST 比对,验证扩增产物片段是否有缺失,与 Genbank 中的基因序列是否一致。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计学软件包,计数资料组间比较采用  $\chi^2$  检验。 $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

2 结果

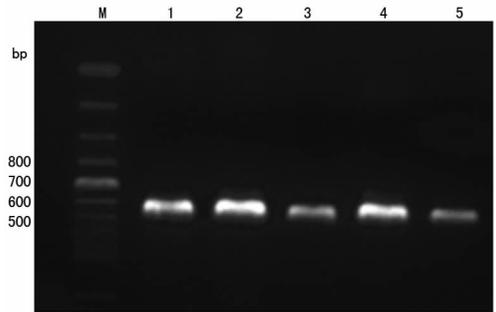
UC 组 53 例中,7 例检出 cdtA 基因,4 例检出 cdtB 基因;45 例健康对照组中,5 例检出 cdtA 基因,2 例检出 cdtB 基因, $\chi^2$  检验结果显示,UC 组和健康对照组间 cdtA 及 cdtB 检出率比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),见表 2。UC 活动期组 32 例中,5 例检出 cdtA,2 例检出 cdtB;UC 静止期组 21 例中,2 例检出 cdtA,2 例检出 cdtB,UC 活动期组和静止期组 cdtA/B 的检出率比较差异也无统计学意义( $P > 0.05$ ),见表 3。扩增产物经过琼脂糖凝胶电泳,电泳条带清楚,没有杂带,见图 1、2。扩增产物双向测序,测序结果经 BLAST 比对,发现所有扩增产物片段没有缺失,序列 100% 比对成功。

表 2 两组 cdtA/B 检出率比较[n(%)]

组别	n	cdtA	cdtB
健康对照组	45	5(11.11)	2(4.44)
UC 组	53	7(13.21)	4(7.55)
P		0.779	0.538

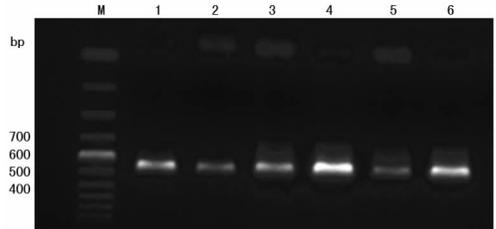
表 3 UC 活动期和静止期组 cdtA/B 检出率比较[n(%)]

组别	n	cdtA	cdtB
活动期组	32	5(15.63)	2(6.25)
静止期组	21	2(9.52)	2(9.52)
P		0.69	1.0



注:M 表示 DNA 标志物;1~5 表示 UC 患者和健康对照组样本中检出的 cdtA 基因。

图 1 cdtA 扩增产物电泳图



注:M 表示 DNA 标志物;1~6 表示 UC 患者和健康对照组样本中检出的 cdtB 基因。

图 2 cdtB 扩增产物电泳图

3 讨论

艰难梭菌是引起抗菌药物相关性腹泻最主要的病原菌,患者可发生严重腹泻、伪膜性肠炎、败血症及死亡。毒素 A 和毒素 B 是艰难梭菌主要的致病因子,是 UDP-葡萄糖水解酶类和葡萄糖转移酶类,在黏附上皮细胞后,通过受体介导的胞吞作用进入细胞,催化葡萄糖残基从 UDP-葡萄糖到 UDP-rho 蛋白的转移,rho 蛋白作为一种细胞内信号分子调节细胞支架结构和基因表达,反过来,rho 蛋白的糖基化会引起蛋白合成的终止、细胞的死亡<sup>[7]</sup>。艰难梭菌感染的危险因素包括抗菌药物暴露、免疫力低下、长期住院、老年等,但目前研究认为,IBD 已成为艰难梭菌感染最重要的危险因素,特别是 UC<sup>[8]</sup>。近年来,艰难梭菌被认为是与 UC 关系最密切的致病菌。艰难梭菌感染能使静止期 UC 患者病情复发,对感染的治疗能促进诱导 UC 的临床缓解。多项研究显示,UC 患者艰难梭菌毒素 A/B 基因检出率明显高于健康人群<sup>[8-10]</sup>。国外多项研究成果与本研究结果存在较大差异,可能的原因有样本例数少和研究对象纳入标准不够严格。由于本研究样本收集时间不够长,研究对象收集比较困难,纳入的研究对象例数较少,可能影响最终实验结果,在进一步研究中,应延长样本收集时间,扩大样本量。其次,本研究健康对照组纳入标准可能不够严格,在进一步的研究中,应对健康对照组纳入遵循更严格的标准,如健康对照组留取标本前 4 周内不得服用抗菌药物、益生菌制剂等影响肠道微生态的药物,应排除糖尿病等可能影响肠道菌群的慢性病,并排除标本留取过程中的污染等问题。

艰难梭菌感染使 UC 患者肠道炎症加重,诊断变得复杂,因此,进行艰难梭菌的检测有利于合并感染患者的合理治疗,预防严重并发症的发生<sup>[11]</sup>。目前,对于艰难梭菌感染的实验室诊断方法主要有免疫荧光法检测患者血清中艰难梭菌毒素 A 和毒素 B,以及患者粪便标本艰难梭菌的分离培养<sup>[12]</sup>。但是两种方法都存在灵敏度低的缺陷。随着对艰难梭菌认知程

度的深入和分子生物学检测手段的发展,采用实时荧光定量 PCR 方法检测艰难梭菌毒素 A/B 基因将大大提高艰难梭菌的检出率,并具有快速、灵敏度高、特异度好的优势,为艰难梭菌感染的临床诊断提供帮助。

#### 参考文献

- [1] 白爱平,欧阳钦,吕农华. 炎症性肠病发病机制的新观点[J]. 中华消化杂志, 2010, 30(3): 210-212.
  - [2] Hansen R, Thomson JM, El-Omar EM, et al. The role of infection in the aetiology of inflammatory bowel disease[J]. J Gast, 2010, 45(3): 266-276.
  - [3] Kaneko T, Matsuda R, Taguri M, et al. Clostridium difficile infection in patients with ulcerative colitis; investigations of risk factors and efficacy of antibiotics for steroid refractory patients[J]. Clin Res, 2011, 35(4): 315-320.
  - [4] Søren P, Joan N, Jensen K. Multiplex PCR method for detection of Clostridium difficile tcdA, tcdB, cdtA, and cdtB and internal in-frame deletion of tcdC[J]. J Clin Microbiol, 2011, 49(12): 4299-4300.
  - [5] Ricciardi R, Ogilvie Jr, Roberts PL, et al. Epidemiology of Clostridium difficile colitis in hospitalized patients with inflammatory bowel diseases[J]. Dis Colon Rectum, 2009, 52(1): 40.
  - [6] 中华医学会消化病学分会炎症性肠病学组. 炎症性肠病诊断与治疗的共识意见(2012 年)[J]. 中华消化杂志, 2012, 32(12): 796-813.
  - [7] Navaneethan U, Venkatesh PG, Shen B. Clostridium difficile infection and inflammatory bowel disease; understanding the evolving relationship[J]. World J Gast, 2010, 16(39): 4892-4904.
  - [8] Ananthakrishnan AN, McGinley EL, Saeian K, et al. Temporal trends in disease outcomes related to Clostridium difficile infection in patients with inflammatory bowel disease[J]. Inflamm Bowel Dis, 2011, 17(4): 976-983.
  - [9] Kim H, Jeong SH, Kim M, et al. Detection of Clostridium difficile toxin A/B genes by multiplex real-time PCR for the diagnosis of C. difficile infection[J]. J Med Mic, 2012, 61(2): 274-277.
  - [10] Geoffrey C, Gilaad G, Mary L, et al. A national survey of the prevalence and impact of clostridium difficile infection among hospitalized inflammatory bowel disease patients[J]. Am J Gast, 2008, 103(6): 1143-1150.
  - [11] Kariv R, Navaneethan U, Venkatesh PG, et al. Impact of Clostridium difficile infection in patients with ulcerative colitis[J]. J Croh Colitis, 2010, 5(1): 34-40.
  - [12] Wultanska D, Banaszkiwicz A, Radzikowski A, et al. Clostridium difficile infection in Polish pediatric outpatients with inflammatory bowel disease[J]. Eur J Clin Mic, 2010, 29(10): 1265-1270.
- (收稿日期: 2016-10-17 修回日期: 2016-12-08)
- 
- (上接第 435 页)
- [3] Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, et al. Surviving sepsis campaign; international guidelines for management of severe sepsis and septic shock[J]. Intensive Care Med, 2013, 39(2): 165-228.
  - [4] 杨超, 吴传新, 孙航, 等. 丙酮酸乙酯抑制脓毒症时 HMGB1 释放的分子机制[J]. 中山大学学报(医学科学版), 2014, 35(2): 187-193.
  - [5] 孙诚, 江稳强, 陈纯波, 等. 脓毒症患者血浆高迁移率族蛋白-1 的变化及意义[J]. 实用医学杂志, 2012, 28(11): 1806-1808.
  - [6] 谢刚银, 陈登伟, 李强. 谷氨酰胺对脓毒症休克患者高迁移率族蛋白 B1 的影响及临床意义[J]. 重庆医学, 2014, 43(23): 2994-2996.
  - [7] 江稳强, 黄伟平, 陈纯波, 等. 高迁移率族蛋白-1 浓度变化与脓毒症预后关系[C]. 中国医师协会中西医结合医师大会论文集, 2011.
  - [8] 邱英, 郑世翔, 丁国华, 等. 高迁移率族蛋白 1 对脓毒症及相关急性肾损伤的诊断和预后评估价值研究[J]. 中国全科医学, 2016, 19(8): 886-893.
  - [9] Xu H, Su Z, Wu J, et al. The alarmin cytokine, high mobility group box1, is produced by viable cardio myocytes and mediates the lipopoly saccaride-induced myocardial dysfunction via TLR4/phosphatidylinositol 3-kinase gamma pathway[J]. J Immunol, 2010, 184(3): 1492-1498.
  - [10] 陈国千, 胡志刚, 王春新, 陈文, 朱怡平. 外科手术患者血清高迁移率族蛋白 B1 水平的变化及其意义[J]. 中华临床医师杂志(电子版), 2009, 3(3): 74-75.
  - [11] 岳生玘, 董湘玉, 倪倩, 等. 高迁移率族蛋白 B1 mRNA 在脓毒症大鼠心肌组织的表达及意义[J]. 临床儿科杂志, 2012, 30(2): 175-178.
  - [12] Leelahavanichkul A, Huang Y, Hu X, et al. Chronic kidney disease worsens sepsis and sepsis-induced acute kidney injury by releasing high mobility group box protein-1[J]. Kidney Int, 2011, 80(11): 1198-1211.
  - [13] 许航, 彭心宇, 李锋. 脓毒症患者高迁移率族蛋白-1 变化与预后的相关性研究[J]. 农垦医学, 2011, 33(4): 309-312.
  - [14] Goto T, Hussein MH, Kato S, et al. Endothelin receptor antagonist attenuates inflammatory response and prolongs the survival time in a neonatal sepsis model[J]. Intensive Care Med, 2010, 36(12): 2132-2139.
  - [15] Shah BA, Padbury JF. Neonatal sepsis an old problem with new insights[J]. Virulence, 2014, 5(1): 170-178.
- (收稿日期: 2016-10-27 修回日期: 2016-12-18)