论著

文章编号:1000-5404(2010)05-0450-04

幽门螺杆菌感染对胃内正常菌群结构的影响

蒲瑞雪[1],郭 红[2],廖亚玲[1],邹全明[1], 郭 刚[1] (400038 重庆,第三军医大学医学检验系临床微生物学及免疫学教研室[1];400037 重庆,第三军医大学新桥医院消化内科[2])

[摘要] **目的** 比较分析不同人群胃内菌群的特点,探讨幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)感染对胃内菌群结构的影响,探讨胃内菌群与Hp相关疾病的关系。**方法** 分别采集Hp阴性者、Hp正常携带者和Hp感染患者的胃黏膜标本220例,采用多种选择性培养基分别在需氧、微需氧、厌氧情况下分离培养细菌,结合Hp感染情况,分析胃内主要菌群的结构组成及定植数量。**结果** 220例胃镜受检者中,Hp阴性82例,Hp阳性138例,Hp检出率为62.73%;乳杆菌检出率在Hp阴性者(59.76%)和Hp感染患者(27.84%)比较,差异有统计学意义($P<0.05$),其余细菌在3类人群中检出率差异无统计学意义($P>0.05$);细菌总量在Hp阴性者胃内的定植量显著高于Hp正常携带者和Hp感染患者($P<0.05$);Hp阴性者中的乳杆菌、肠杆菌、链球菌所占比例分别为41.39%、16.90%、18.28%,检出数量和所占比例明显均高于Hp感染患者($P<0.05$);厌氧菌在Hp感染患者的检出率最高,所占比例为43.77%,显著高于Hp阴性者($P<0.05$)。**结论** Hp感染严重影响胃内菌群变化,胃内菌群(特别是乳杆菌与厌氧菌)与Hp致病性密切相关。

[关键词] 幽门螺杆菌;胃;正常菌群;乳杆菌属; 链球菌属; 肠杆菌科

[中图法分类号] R516.9;R322.44;R378 **[文献标志码]** A

Correlation of normal flora in human stomach with *Helicobacter pylori* pathogenicity

Pu Ruixue[1], Guo Hong[2], Liao Yaling[1], Zou Quanming[1], Guo Gang[1] ([1]Department of Clinical Microbiology and Immunology, College of Laboratory Medicine, Third Military Medical University, Chongqing, 400038; [2]Department of Gastroenterology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

[Abstract] **Objective** To evaluate the impact of *Helicobacter pylori* (Hp) infection on the subpopulation of normal flora in human stomach, and to further understand the contribution of gastric normal flora to Hp-related diseases. **Methods** Totally 220 specimens of gastric mucous were collected from the health individuals, Hp carriers and patients with Hp associated diseases. Colonized bacteria were cultivated on selective media in different conditions as needed, and the amount of bacteria was calculated according to the visible colony on plates. **Results** Hp detection results showed that 62.73% of the 220 investigated people were colonized with Hp. The total number of bacteria investigated in the stomach of the health individuals was significantly higher than that of the patients and the normal carriers ($P<0.05$). Significant difference of the lactobacillus positive rates was only observed between the health individuals and the patients ($P<0.05$). The percentage of *Lactobacillus*, *Enterobacteriaceae* and *Streptococcus* from the health individuals was 41.39%, 16.90% and 18.28%, respectively, and any of them was higher that from the patient group ($P<0.05$). The percentage of anaerobic bacteria in the patient group was 43.77%, which accounting for the highest proportion when compared with the other groups ($P<0.05$). **Conclusion** The subpopulation of normal flora in the stomach is closely associated with Hp colonization and the clinical outcome.

[Key words] *Helicobacter pylori*; stomach; normal flora; *Lactobacillus*; *Streptococcus*; *Enterobacteriaceae*

Corresponding author: Guo Gang, Tel: 86-23-68752315, E-mail: guogang7001@163.com

自澳大利亚学者Warren和Marshall首次从人胃黏膜中培养出幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)以来,经过20余年不断深入研究,Hp已被确定为慢性活动性胃炎和消化性溃疡的重要病原菌,与胃癌也密切相关[1,2]。但是,人体感染Hp后出现不同临床转归,其机制尚不清楚[3]。胃是胃肠道系统中一个重要的微生态区。大量研究[4,5]已证实人的胃内存在多种微生物定植包含厌氧菌、兼性厌氧菌和需氧菌等,其中乳杆菌是重要组成部分。保持胃内微生态平衡对维持胃的正常生理功能具有重要作用。Hp感染引起不同临床表现,是否与Hp定植后使胃内正常菌群结构发生异常变化,从而导致胃内微生态失衡有关亟待研究。

[通信作者] 郭 刚,电话:(023)68752315,E-mail:guogang7001@163.com

本实验拟通过比较分析胃内菌群在非Hp感染者、Hp正常携带者和Hp感染患者中的差异，探讨Hp感染对胃内正常菌群的影响，为进一步探明菌群变化与Hp相关的胃部疾病的关系奠定基础。

1 材料与方法

1.1 标本来源

选取第三军医大学新桥医院、西南医院消化内科胃镜患者共220例。其中浅表性胃炎137例，胃溃疡31例，慢性胃炎伴肠化生18例，十二指肠球部溃疡32例，胃癌2例；年龄最大73岁，最小16岁。

1.2 主要试剂

各种生化鉴定试剂购自杭州天和微生物试剂有限公司，*Taq* DNA polymerase、10×Buffer、$MgCl_2$、dNTP及DNA Marker均购自于上海生工生物工程技术服务有限公司，组织DNA抽提试剂盒购自Queengen公司，快速尿素酶试剂条购自深圳养和生物科技有限公司。

1.3 培养基

Hp培养基：脑心浸液血琼脂平板（自配），乳杆菌培养基：MRS培养基（自配），肠杆菌培养基：伊红美蓝培养基（上海天辰生物技术公司），厌氧菌培养基：厌氧菌琼脂培养基（上海楷洋生物技术有限公司），酵母菌培养基：马铃薯葡萄糖琼脂培养基（北京友康基业生物科技有限公司），链球菌培养基、COBA培养基（广州市辉康生物科技有限公司）。

1.4 方法

1.4.1 标本的采集和处理　分别采集胃镜检查者胃窦、胃体、胃底的胃黏膜组织各1块，称量后加入0.5 ml无菌生理盐水，匀浆器匀浆后待检。

1.4.2 Hp检查

1.4.2.1 Hp感染诊断标准　细菌培养、快速尿素酶试验、PCR鉴定中任两项阳性诊断为Hp感染[6]。

1.4.2.2 Hp培养　取胃黏膜活检组织匀浆液100 μl，接种于脑心浸液血琼脂平板上，37 ℃微需氧环境（85% N_2、10% CO_2、5% O_2）培养3 d，对可疑菌落按常规方法进行鉴定。

1.4.2.3 快速尿素酶实验　按试剂说明书进行。

1.4.2.4 聚合酶链式反应（PCR）鉴定　使用DNA提取试剂盒提取Hp细菌基因组DNA，上游引物：5′-GTTAGAGAA-GATAATGACGGTATCTAAC-3′，下游引物：5′-ATAGGATTTCA-CACCTGACTGACTATC-3′[7]，由上海生工生物技术服务有限公司合成。PCR反应体系（25 μl）：10×PCR缓冲液2.5 μl，脱氧核苷三磷酸（dNTP）2 μl，引物（25 μmol/L）各0.5 μl，*Taq*酶0.25 μl，模板DNA 2 μl，去离子水15.75 μl。PCR反应条件：94 ℃变性5 min，循环30次；94 ℃变性30 s，56 ℃退火30 s，72 ℃延伸2 min；再72 ℃延伸7 min，琼脂糖凝胶电泳检测目的条带。

1.4.3 胃内菌群检查　组织匀浆后，取100 μl涂于各培养基上。将厌氧菌、乳杆菌培养基置于厌氧培养箱中，37 ℃孵育培养48 h；将链球菌、酵母菌、肠杆菌培养基在37 ℃有氧环境培养24 h。培养后，将选择性培养基上特异性菌落分别进行革兰染色镜检，按照《伯杰氏细菌鉴定手册》进行人工生化鉴定。

1.4.4 菌落计数方法　根据平板上的活菌计数和稀释度，按活菌计数公式计数，细菌含量（cfu/g）=菌落数×{[稀释液量（ml）+标本质量（g）]/标本质量（g）}×稀释倍数，结果以cfu/g表示。

1.4.5 统计学方法　将收集到的数据输入计算机建立Excel数据库，用SPSS 13.0统计软件进行整理和分析。3类人群之间比较用Kruskal-Wallis *H*检验，数据两两比较用Mann-Whitney *U*检验。

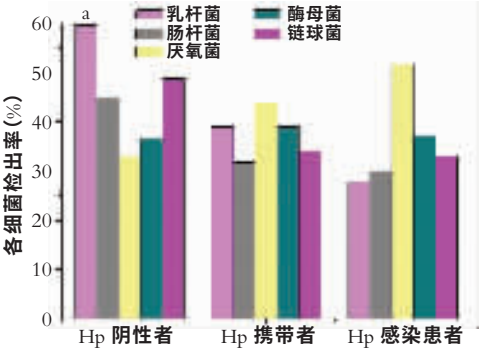
2 结果

2.1 Hp感染情况分析

220例临床标本，Hp阴性者82例，Hp正常携带者41例，Hp感染患者97例，Hp感染率为138/220（62.73%）。本组研究各种常见的消化道疾病中，以胃溃疡的检出率最高，为24/31（77.42%），其次是十二指肠球部溃疡，检出率为23/32（71.88%），浅表性胃炎和慢性胃炎伴肠化生的检出率分别为80/137（58.39%）、10/18（55.56%）。

2.2 不同人群胃内各细菌种群的检出率

乳杆菌的检出率在Hp阴性者中为49/82（59.76%），明显高于Hp感染患者27/97（27.83%，$P<0.05$）；厌氧菌在Hp阳性患者中检出率最高为50/97（51.55%），和Hp阴性者厌氧菌的检出率27/82（32.93%）相比，有明显上升趋势。其余细菌检出率两两比较差异无统计学意义（$P>0.05$）。具体见图1。



a：$P<0.05$，与Hp感染患者比较

图1 不同人群胃内各细菌检出率

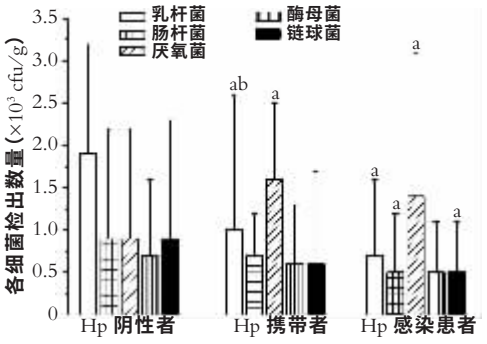
2.3 不同人群胃内细菌总量的差异

每个患者各细菌数量相加之和为对应的细菌总量。Hp阴性者胃内细菌总量[$(1.375\pm0.75)\times10^3$ cfu/g]明显高于Hp携带者[$(1.20\pm0.85)\times10^3$ cfu/g]和Hp感染患者[$(0.80\pm0.70)\times10^3$ cfu/g]（$P<0.05$）；Hp携带者细菌总量明显高于Hp感染患者（$P<0.05$）。

2.4 不同人群胃内各类细菌组成的变化

如图2、表1所示，乳杆菌在Hp阴性患者中检出数量最多，所占比例最高，显著高于Hp携带者和感染者；厌氧菌检出数量在Hp感染患者中最高，所占比例和数量明显高于Hp阴性者（$P<0.05$），细菌数量和携带者相比差异无统计学意义（$P>0.05$），细菌比例差异显著（$P<0.05$）；肠杆菌和链球菌在Hp阴性者中所占比例和数量较Hp感染者差异有统计学意义

($P<0.05$),细菌数量较携带者相比差异无统计学意义($P>0.05$),细菌比例差异显著($P<0.05$)。Hp 携带者和 Hp 感染患者相比:乳杆菌检出数量和所占比例差异有统计学意义($P<0.05$);厌氧菌、链球菌、肠杆菌检出数量比较,差异无统计学意义($P>0.05$),但厌氧菌所占比例差异有统计学意义($P<0.05$);酵母菌检出数量在3种人群间无明显差异,但 Hp 感染患者中酵母菌所占比例高于其他2种人群。



a:$P<0.05$,与 Hp 阴性者比较;b:$P<0.05$,与 Hp 感染患者比较

图2 不同人群胃内各细菌数量的差异

表1 不同人群各细菌所占比例差异(%)

组别	例数	乳杆菌	肠杆菌	厌氧菌	酵母菌	链球菌
Hp 阴性者	82	41.39^{ab}	16.90^{ab}	11.02^{ab}	12.40	18.29^{ab}
Hp 携带者	41	26.23^{b}	12.00	34.30^{b}	13.34	14.13
Hp 感染患者	97	15.69	12.96	43.77	13.89	13.70

a:$P<0.05$,与 Hp 携带者比较;b:$P<0.05$,与 Hp 感染患者比较

3 讨论

目前,胃肠道菌群检测方法大致上包括3大类:直接涂片法、平板活菌计数法、分子生物学方法。平板活菌技术法主要是通过定量称取标本,然后以生理盐水10倍稀释法呈系列稀释,再在各种选择性培养基上接种培养,采集标本定位,选择性平板活菌计数,基本能做到定性、定位、定量,平板活菌计数法是目前世界上公认的菌群失调标准的检测方法,其方法规范,可比性强[8]。正常胃内环境因有大量胃酸的分泌而呈酸性,此环境抑制了大多数细菌的生长,因此与肠道相比,胃内细菌少得多。已有研究表明,胃内长驻菌为革兰阳性菌、肠杆菌和厌氧菌,人体胃内的正常菌群保持相对稳定比例状态,维持胃内微环境稳定方面起着重要作用[4,5,9]。

Hp 与慢性胃炎、消化性溃疡、十二指肠球部溃疡等疾病发病密切相关,国内流行病学调查发现我国是 Hp 耐感染的高发区,多数地区成人 Hp 平均感染率为50%左右。本实验结果显示不同胃病中,Hp 在胃溃疡和十二指肠球部溃疡的感染率明显高于浅表性胃炎。有研究[10]表明,根除 Hp 会使胃炎、胃溃疡的严重程度和活动性均显著性降低,反向证实了这一观点。乳杆菌的检出率在 Hp 阴性者和 Hp 感染患者间有显著差异;其他细菌检出率两两相比差异不明显。

Hp 导致的胃肠疾病不仅与 Hp 菌株的菌型毒力、宿主的遗传背景有关,更与胃部微环境的作用有密切关系[11]。本研究发现 Hp 阳性感染患者原籍菌总量较 Hp 阴性者有显著下降($P<0.05$);其中,乳杆菌、肠杆菌和链球菌数量下降明显,以乳杆菌最为显著($P<0.05$),乳杆菌检出数量在 Hp 阴性者中最高,较携带者显著下降,Hp 感染患者数量最低;厌氧菌在 Hp 感染患者中数量最多,显著高于 Hp 阴性者($P<0.05$)。分析其原因可能是因为随着 Hp 在胃内的定植,改变了胃内 pH,菌群之间相互竞争,相互抑制,使正常人胃内的优势菌乳杆菌数量显著降低,原来健康人胃内的弱势菌厌氧菌数量显著增高,成为 Hp 感染患者胃内的优势菌。Hp 定植后可能产生许多与炎症和免疫损伤有关的毒性因子将激活免疫反应,通过多种途径协同作用,引起局部充血、水肿、渗出及微循环障碍,原籍菌数量下降,主要是乳杆菌的减少,它的减少意味着胃内生物屏障功能的降低,导致胃内微生态平衡破坏,加快疾病的发生。乳杆菌本身极耐酸,它是人体胃内正常菌群且是优势菌群。Isogai 等[12]研究发现 Hp 感染后,小鼠胃内存在链球菌、乳杆菌等正常菌群,乳杆菌数量会有变化,这与我们的研究结果相符。

从本研究结果可以看出,细菌比例在不同人群也存在很大差异,Hp 感染后,厌氧菌比例显著增高($P<0.05$),乳杆菌、肠杆菌、链球菌比例显著下降($P<0.05$),酵母菌数量较 Hp 阴性者没有明显变化,但由于胃内原籍菌数量减少,故比例也增高,造成菌群紊乱。主要原因可能是由于胃内正常菌所占比例下降,对胃黏膜的保护作用降低,Hp 定植后,大大抑制益生菌的生长,从而引起一系列的病理改变使胃内正常菌群所栖居的生物环境和微环境改变,即微生态系统空间结构的改变,使劣势种群优势化。本研究还发现,Hp 携带者与其他两种人群相比,肠杆菌和链球菌在数量上没有差异,但所占比例却明显变化;同是 Hp 阳性者,Hp 携带者中乳杆菌的数量和比例都显著高于 Hp 感染患者($P<0.05$),这说明对于感染 Hp 但无明显临床症状的患者来说,虽然随着 Hp 在胃内定植,益生菌数量有整体下降的趋势,菌群比例也发生变化,但乳杆菌仍然作为胃内优势菌群对胃黏膜起着保护作用,抑制其他细菌增长。

以上研究均提示 Hp 在人体胃内的定植与胃内菌群状态(特别是乳杆菌和厌氧菌)关系密切,并影响 Hp 相关的疾病的发生。随着微生态学的兴起和微生态疗法的应用,近年来,益生菌的应用越来越广泛。乳杆菌作为胃内的优势菌也越来越被人们重视,乳杆菌

是人体胃内重要的生理细菌,具有维护肠道微生态平衡,防止菌群失调,减少外源性细菌入侵的作用[13,14]。因此从微生态的角度着手,将研究重点放在重建胃内微生态环境、抑制 Hp 的生长从而治疗 Hp 相关疾病上,将具有良好应用前景。

参考文献:

[1] Konturek P C, Konturek S J, Brzozowski T. *Helicobacter pylori* infection in gastric cancerogenesis[J]. J Physiol Pharmacol, 2009, 60(3): 3-21.

[2] Wong B L, Zhu S L, Huang X R, *et al*. Essential role for macrophage migration inhibitory factor in gastritis induced by *Helicobacter pylori* [J]. Am J Pathol, 2009, 174(4): 1319-1328.

[3] 郭刚,童文德,邹全明, 等. HP0318 基因在幽门螺杆菌适应性定植中的作用研究[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(11): 1006-1009.

[4] Reid G, Burton J. Use of Lactobacillus to prevent infection by pathogenic bacteria[J]. Microbes Infect, 2002, 4(3): 319-324.

[5] 张刚. 乳酸细菌——基础、技术和应用[M]. 北京:化学工业出版, 2007: 80.

[6] 张万岱,徐智民. 幽门螺杆菌感染诊断方法的评价与诊断标准[J]. 中华全科医师杂志, 2004, 3(6): 351-353.

[7] Roussel Y, Wilks M, Harris A, *et al*. Evaluation of DNA extraction methods from mouse stomachs for the quantification of *H. pylori* by real-time PCR[J]. J Microbiol Methods, 2005, 62(1): 71-81.

[8] Mitsuoka T, Morishita Y, Terada A, *et al*. A simple method ("plate-in-bottle method") for the cultivation of fastidious anaerobes[J]. Jpn J Microbiol, 1969, 13(4): 383-385.

[9] Eaves-Pyles T D, Wong H R, Odoms K, *et al*. Salmonella flagellin-dependent proinflammatory responses are localized to the conserved amino and carboxyl regions of the protein[J]. J Immunol, 2001, 167(12): 7009-7016.

[10] Zhou L, Sung J J, Lin S, *et al*. A five-year follow-up study on the pathological changes of gastric mucosa after *H. pylori* eradication[J]. Chin Med J (Engl), 2003, 116(1): 11-14.

[11] 王志英, 汤净, 莫青, 等. 海南汉区就诊患者幽门螺杆菌感染现状分析[J]. 中国热带医学, 2007, 7(11): 2035-2036,2034.

[12] Isogai H, Isogai E, Hayashi S, *et al*. Experimental *Helicobacter pylori* infection in association with other bacteria[J]. Microbiol Immunol, 1997, 41(4): 361-365.

[13] Ryan K A, Jayaraman T, Daly P, *et al*. Isolation of *lactobacilli* with probiotic properties from the human stomach[J]. Lett Appl Microbiol, 2008, 47(4): 269-274.

[14] Kleerebezem M, Vaughan E E. Probiotic and gut *lactobacilli* and *bifidobacteria*: molecular approaches to study diversity and activity [J]. Annu Rev Microbiol, 2009, 63: 269-290.

(**收稿**:2009-11-22;**修回**:2009-12-03)

(编辑 张 维)

文章编号:1000-5404(2010)05-0453-01

个案与短篇

原发性睾丸非霍奇金淋巴瘤1例

陈泽林[1],王祥卫[2],康 俊[2] (400038 重庆,第三军医大学学员旅1队[1];400037 重庆,第三军医大学新桥医院泌尿外科[2])

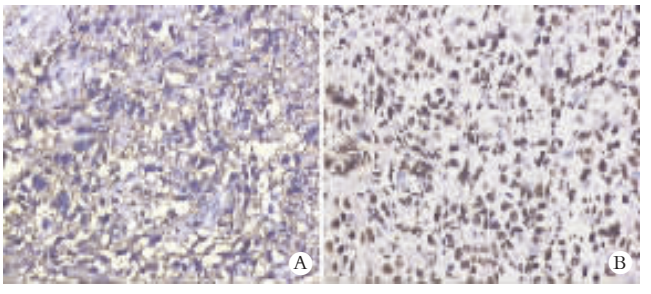
[关键词] 睾丸肿瘤;淋巴瘤, B 细胞;原发

[中图法分类号] R737.21 **[文献标志码]** B

睾丸肿瘤比较少见,占全身恶性肿瘤的1%[1]。原发性睾丸非霍奇金淋巴瘤更为少见,仅占睾丸肿瘤的1% ~9%,占非霍奇金淋巴瘤的1%[2]。第三军医大学新桥医院泌尿外科于2009年10月收治1例,现报告如下。

1 临床资料

患者,男,61岁,发现左侧阴囊包块1年,增大1月。1年前发现左侧睾丸壁1个黄豆大小包块,1月前无明显诱因增大。33年前行绝育手术。查体:全身浅表淋巴结未见明显肿大,心肺未发现异常,腹部未触及包块,肝脾无肿大,双肾区无叩击痛。左侧阴囊内可触及大小约为9 cm×8 cm×5 cm包块,质硬、表面光滑、活动度差,与阴囊壁部分黏连,有轻度压痛,与睾丸界限不清。右侧附睾可触及一蚕豆大小的包块,质中,表面光滑,活动度可,与周围组织无黏连,无压痛。实验室检查:血、尿、大便常规无异常,肝肾功能、电解质、凝血四项、肿瘤标记物无异常。辅助检查:睾丸及腹部B超:①左侧睾丸减弱回声占位,②右侧附睾头囊肿,③腹腔淋巴结未见肿大。入院后行左侧睾丸占位活检术,病理结果提示:考虑睾丸恶性肿瘤,免疫组化结果支持非霍奇金淋巴瘤(B细胞型):CK(-),CD45(++),Ki-67(++),PLAP(-),CD68(+),CD45RO(-),CD3(-),BCL-2(++),CD20(+++~++++),CD79a(+~++)(图1)。行左侧精索高位结扎睾丸切除术。术后病理诊断:睾丸非霍奇金淋巴瘤(弥漫大B细胞型)。术后转入肿瘤科用CHOP方案(C-环磷酰胺、H-阿霉素、O-长春新碱、P-泼尼松)化疗。因患者经济原因,仅行了第1周期化疗。化疗后1月患者复查,腹腔淋巴结及对侧睾丸暂无转移,期间患者未诉不适。现仍在随访中,预后差。



A:肿瘤细胞CD20表达;B:肿瘤细胞Ki-67增殖指数为60%

图1 原发性睾丸非霍奇金淋巴瘤组织学观察 (S-P ×400)

[通信作者] 王祥卫,电话:(023)68774419,E-mail: wxw0324@21cn.com

(下转461页)