

• 论 著 •

应用 16S rRNA 荧光定量 PCR 技术研究 β -内酰胺类抗菌药物对婴儿肠道菌群的影响

贺 锐, 张 钧, 章国平, 赵翠生[△]

(甘肃省妇幼保健医院检验科, 兰州 730050)

摘要:目的 探讨 β -内酰胺类抗菌药物对婴儿肠道菌群的影响。方法 选取 0~1 岁婴儿, 应用 16S rRNA 荧光定量 PCR 技术, 分别测定 β -内酰胺类抗菌药物使用前, 使用第 3 d、5 天时, 及治愈后第 7 天粪便中双歧杆菌、乳酸杆菌、肠球菌、大肠杆菌的水平。结果 使用过 β -内酰胺类抗菌药物者粪便中双歧杆菌、乳酸杆菌、大肠杆菌和肠球菌的数量与未使用者比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。粪便双歧杆菌、乳酸杆菌含量随治疗时间的延长而增加, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。未使用抗菌药物的患儿肠道双歧杆菌和乳酸杆菌的恢复明显快于使用过抗菌药物的患儿, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。结论 β -内酰胺类抗菌药物对婴儿肠道菌群有普遍的杀灭作用, 对婴儿肠道菌群改变的影响是轻微的。 β -内酰胺类抗菌药物的使用会延迟患儿肠道微生态的恢复, 但若合理使用对疾病的治疗有积极作用。

关键词: 肠道菌群; 抗菌药物; 16S rRNA; 婴儿

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2015.03.030

文献标识码:A

文章编号: 1673-4130(2015)03-0357-03

The impact of β -lactam antibiotics on infants' intestinal flora detected by using 16S rRNA quantitative PCR technique

He Rui, Zhang Chong, Zhang Guoping, Zhao Cuisheng[△]

(Department of Clinical Laboratory, Maternal and Child Health Care Hospital, Lanzhou, Gansu 730050, China)

Abstract: **Objective** To investigate the influence of β -lactam antimicrobial drugs on infants' intestinal flora. **Methods** Infants from 0 to 1 years old were enrolled in the study, who's feces samples were tested for *Bacillus bifidus*, *lactobacillus*, *enterococcus* and *E. coli* by using 16S rRNA quantitative PCR technique before using antibiotics, on the third and fifth day during β -lactam antibiotics treatment and the seventh day after treatment. **Results** The numbers of *Bacillus bifidus*, *lactobacillus*, *E. coli* and *enterococci* detected in using β -lactam antibiotics group were not statistically different from those in not using antibiotics group ($P>0.05$). The numbers of *Bacillus bifidus* and *lactobacillus* increased with the treatment process, the differences was statistically significant ($P<0.05$). The recovery of the numbers of intestinal *Bacillus bifidus* and *lactobacillus* in not using antibiotics group was significantly faster than using antibiotics group, the difference was statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** β -lactam antibiotics have general killing effect on the intestinal flora in infants, which could recover to normal. The recovery of intestinal flora could be delayed if antibiotics are used, however, reasonable antibiotics treatment would be very helpful in the treatment of primary diseases.

Key words: intestinal flora; antibiotics; 16S rRNA; infant

肠道菌群是人体重要的微生态系统之一, 直接参与人体的消化、营养吸收、能量供应、脂肪代谢、免疫调节等多种生理功能, 相当于人体的一个重要“器官”^[1]。婴儿时期, 肠道微生态环境初步建立, 对代谢、免疫系统的发育和成熟等起着十分重要的作用^[2]。 β -内酰胺类抗菌药物的使用对婴儿肠道菌群的影响一直以来备受关注。本研究采用病例对照研究, 运用细菌涂片、细菌培养、16S rRNA 荧光定量 PCR 分析等检测手段, 对 β -内酰胺类抗菌药物的使用对婴儿肠道菌群的影响进行了初步探讨。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2011 年 7 月至 2013 年 3 月于本院就诊的婴儿作为研究对象。健康婴儿组: 4 周内未使用过 β -内酰胺类抗菌药物、微生态制剂且无胃肠道症状, 健康体检合格的 0~1 岁婴儿, 共 50 例。对照组: 未使用抗菌药物, 以支持治疗为主的 0~1 岁婴儿。研究组: 合并细菌感染性疾病, 以 β -内酰胺类抗菌药物治疗为主的 0~1 岁婴儿。

1.2 方法

1.2.1 标本的采集与处理 对照组取入院第 3、5 天及愈后第 7 天粪便标本各 10 g, 研究组留取使用抗菌药物前, 使用抗菌药物第 3、5 天和愈后第 7 天的粪便标本各 10 g。标本置无菌杯内立即送检, 进行培养、接种、涂片, 剩余标本用无菌干燥管储存, -80°C 冰箱保存备用。

1.2.2 肠道细菌 DNA 的提取 取冻存的粪便标本复融, 每 1 g 加 1 mL 的 PBS (0.05 mol/L, pH 7.4) 充分颠倒混匀 5~10 min, 然后低速离心 (2 000 r/min) 5 min, 取上清, 上述过程重复 3 次, 收集上清高速离心 (13 000 r/min) 3 min 后取沉渣, 沉淀物用 PBS 液洗 4 次, 水洗 1 次, 后加 50 μL 蒸馏水悬浮, 50 μL 1% Triton X-100 破碎菌体, 100°C 煮沸 5 min 立即放入冰水中冷却^[3]。

1.2.3 PCR 引物 对所选用引物序列分别与 4 种细菌的 16S rRNA 全序列在 BLAST 数据库进行比较验证, 4 种细菌上、下游引物如下: 双歧杆菌 CTC CTG GAA ACG GGT GG^[4],

GGT GTT CTT CCC GAT ATC TAC A,扩增片段为550 bp;乳酸杆菌 AGC AGT AGG GAA TCT TCC A, ATT TCA CCG CTA CAC ATG^[5],扩增片段为380 bp;肠球菌 TCC ACG CCG TAA ACG ATG AG, GAC ACG AGC TGA CGA CAA CC,扩增片段274 bp^[6];大肠埃希菌 GGA GCA AAC AGG ATT AGA TAC CC, CCC AAC ATT TCA CAA CAC G^[7],扩增片段317 bp。

1.2.4 荧光定量PCR反应体系 采用25 μL反应体系,包括10×Buffer 2.5 μL,4×dNTP(0.25 mmol/L)2 μL,MgCl₂(25 mmol/L)2.5 μL,上下游引物(0.25 μmol/L)各0.25 μL,Taq酶(1 U/μL)0.75 μL,DNA模板3 μL,荧光染料SYBR green 2.5 μL,双蒸水11.25 μL。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 95 ℃变性5 min;95 ℃15 s,60 ℃1 min,72 ℃45 s,87 ℃5 s共40个循环;72 ℃延伸10 min后结束。60~95 ℃作熔解曲线,各细菌的熔解曲线见附图1~4(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)

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,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,加入1 mL 70%的乙醇,颠倒混匀离心弃上清,干燥沉淀。将干燥沉淀物溶于适当体积的无菌水或TE缓冲液即成。在分光光度仪上测定4种细菌纯化产物的吸光度值。参照1个吸光度值双链DNA片段(1 kb)相当于4.74×10¹³ copies/mL的标准,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104~108 copies/mL的系列浓度的溶液,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 通过对4种细菌标准菌株做荧光定量PCR,利用熔解曲线比较产物解链温度(TM)与标准菌株TM值的差异,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种细菌标准菌株菌液做系列稀释(10²~10⁸ cfu/mL)后行荧光定量PCR,证明100 cfu/mL细菌的检测标本仍能呈现特征性熔解曲线,说明用上述引物通过荧光定量PCR检测上述4种细菌有较好的检测灵敏度。

1.3 统计学处理 采用SPSS19.0软件对数据进行处理,对PCR定量检测数据进行对数处理后(log copies/g)以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间两两比较采用t检验,三组及以上计量资料的比较采用方差分析,若P<0.05为差异有统计学意义。

2 结 果

研究组粪便双歧杆菌、乳酸杆菌、大肠杆菌和肠球菌水平都较对照组患儿略低,但差异均无统计学意义(P>0.05),见表1。分析婴儿肠道中双歧杆菌、乳酸杆菌在使用β-内酰胺类抗菌药物治疗不同时期粪便中含量的变化,随治疗时间的延长,双歧杆菌、乳酸杆菌逐步增加,差异有统计学意义(P<0.05),见表2。采用成组t检验比较研究组与对照组愈后一周肠道微生物的恢复情况,见表3,对照组患儿肠道双歧杆菌和乳酸杆菌的恢复明显快于研究组,差异有统计学意义(P<

0.05)。健康婴儿粪便双歧杆菌、乳酸杆菌的水平见表4。

表1 β-内酰胺类抗菌药物使用3天对肠道菌群的影响(log copies/g)

分组	n	双歧杆菌	乳酸杆菌	大肠杆菌	肠球菌
研究组	30	2.57±1.33	3.00±1.92	4.49±2.18	4.09±1.56
对照组	30	2.61±1.28	3.07±1.33	4.63±1.49	4.18±1.59
t	—	1.25	1.27	1.44	1.38
P	—	0.098	0.094	0.076	0.085

:无数据。

表2 研究组治疗前后双歧杆菌、乳酸杆菌含量的变化(log copies/g)

检测时间	n	双歧杆菌	乳酸杆菌
使用前	30	2.30±1.22	2.78±1.92
使用3天	30	2.57±1.33	3.00±1.92
使用5天	30	3.35±1.78	3.66±1.76
愈后7天	30	4.99±1.35	4.54±1.83
F	—	24.77	13.34
P	—	0.001	0.003

:无数据。

表3 研究组停用药物7天后与对照组愈后7天双歧杆菌、乳酸杆菌含量比较(log copies/g)

分组	n	双歧杆菌	乳酸杆菌
研究组	30	4.99±1.35	4.54±1.83
对照组	30	5.42±1.35	5.01±1.33
t	—	3.15	2.87
P	—	0.008	0.014

:无数据。

表4 健康婴儿粪便中4种细菌的含量(log copies/g)

细菌种类	健康婴儿粪便中含量
双歧杆菌	6.41±2.75
乳酸杆菌	5.79±1.72
大肠杆菌	4.87±1.79
肠球菌	4.72±1.95

3 讨 论

β-内酰胺类抗菌药物在控制婴幼儿感染性疾病中起着举足轻重的作用,由于耐药菌株的不断产生,临床β-内酰胺类抗菌药物应用日益广谱化、高档化。广谱抗菌药物大量应用导致医源性菌群失调的问题也日益凸显^[8~9],尤其是β-内酰胺类抗菌药物在婴幼儿疾病中的使用。

肠道微生态是由肠道菌群在肠道内形成的一个庞大而复杂的系统,由自身的专性厌氧菌和部分外籍菌及环境菌群构成^[10]。在局部环境改变、机体免疫力下降、或广谱抗菌药物使用等条件下,正常菌群发生数量或性质的异常变化,以数量的变化为主,即肠道菌群比例失调^[11]。而本研究显示,抗菌药物

对肠道菌群有普遍的杀灭作用,但对合并细菌感染性疾病的婴儿肠道菌群改变的影响是有限的。感染性腹泻患儿因感染导致肠道生物屏障的破坏,抵抗细菌肠道定植的能力减弱,肠道正常的菌群结构被扰乱。合理的使用 β -内酰胺类抗菌药物在治疗感染的同时可以使临床症状得到缓解,让肠道环境逐步改善。本研究显示,合并细菌感染性疾病的患儿治愈后 7 天肠道中益生菌的数量已经与健康婴儿已基本接近。同时,未使用 β -内酰胺类抗菌药物的患儿,肠道微生态环境的恢复明显快于使用了 β -内酰胺类抗菌药物的患儿,这也提示临床治疗中,应积极考虑调整患儿肠道微生态环境,以利于疾病的恢复。

婴儿疾病治疗中广谱抗菌药物 β -内酰胺类抗菌药物的使用存在诸多争议,在治疗中应尽可能以病原学和药敏试验为基础,严格掌握 β -内酰胺类抗菌药物的应用指标,结合婴儿肠道微生态特点,及时、合理应用微生态制剂,改善 β -内酰胺类抗菌药物造成的菌群失调,增强宿主适应性,在确保抗感染疗效的同时及时纠正肠道微生态失衡对婴儿的生长发育带来的不良影响。

参考文献

- [1] Kelly P. Nutrition, intestinal defence and the microbiome[J]. Proc Nutr Soc, 2010, 69(2): 261-268.
- [2] van der Waaij D. Colonization pattern of the digestive tract by potentially pathogenic microorganisms: colonization-controlling mechanisms and consequences for antibiotic treatment[J]. Infection, 1983, 11(Suppl 2): S90-92.

(上接第 356 页)

丹参酮是中药丹参的主要有效成分,丹参对改善心脑血管循环具有确切的疗效,临床大量使用丹参制成的各种中成药治疗心脑血管疾病,最为广泛应用的是丹参注射液、香丹注射液、丹参滴丸等^[8]。叶勇等^[9]研究了丹参酮对 CaM 血管生成影响实验,结果显示,丹参酮可促进 CaM 血管增生,具有一定的促血管新生作用。

本研究从在体、心肌组织块、离体心肌单细胞水平三个角度分析了 CaM 传导系统在心肌梗死后恶性心律失常发生中的作用,结果表明,无干预组和干预组家兔的 CaM 蛋白水平分别是对照组的 1.483 倍和 1.321 倍,差异有统计学意义($P < 0.05$),无干预组 CaM 水平高于干预组($P < 0.05$);无干预组血清 Ca^{2+} 水平高于对照组和干预组($P < 0.05$),对照组低于干预组($P < 0.05$);干预组 TDR 低于无干预组家兔,两者 TDR 均高于对照组($P < 0.05$);干预组梗死心肌单细胞水平胞内钙浓度低于无干预组($P < 0.05$),说明 CaM 可作为预防心肌梗死后恶性心律失常新靶点。丹参酮以 CaM 信号传导系统为靶点,可有效预防心肌梗死后恶性心律失常的发生,为开发传统中药的新用途和减少心肌梗死后心律失常的发生奠定理论基础^[10]。

综上所述,CaM 信号传导系统中信号因子的改变对心肌梗死后恶性心律失常有提示作用。丹参酮可以通过抑制 CaM 信号传导系统,在预防心肌梗死后恶性心律失常中发挥重要作用。

参考文献

- [1] 王文广,张存泰,吴杰,等. 钙调蛋白抑制剂对陈旧性心肌梗死免

- [3] 杨美芬,王玉明,黄永坤,等. 用细菌 16S rRNA 荧光定量 PCR 法检测肠道菌群的变化[J]. 中国微生态学杂志, 2006, 18(4): 266-269.
- [4] Behar A, Yuval B, Jurkevitch E. Enterobacteria-mediated Nitrogen fixation in natural populations of the fruit fly Ceratitis capitata [J]. Mol Ecol, 2005, 14(9): 2637-2643.
- [5] 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.
- [6] Gill SR, Pop M, Deboy RT, et al. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome[J]. Science, 2006, 312(5778): 1355-1359.
- [7] 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, 24(6): 128.
- [8] 贾志红,吕秀美. 肠道优势耐药菌造成肠源性感染的实验结果讨论[J]. 中华医院感染学杂志, 1999, 9(3): 63-64.
- [9] 张延霞,袁康,陆龙. 难辨梭菌性腹泻分析及预防措施[J]. 中华医院感染学杂志, 2000, 10(2): 39-40.
- [10] 王凤科. 广谱抗生素对感染性疾病患者肠道微生态的影响[J]. 吉林医学, 2010, 31(32): 5726-5728.
- [11] 康白. 双歧杆菌的微生态学及临床意义[J]. 中华儿科杂志, 1999, 37(5): 54-56.

(收稿日期:2014-11-10)

- 室性心律失常的影响[J]. 中国心脏起搏与心电生理杂志, 2005, 19(1): 60-62.
- [2] 肖志超,张存泰,马业新,等. 厄贝沙坦对兔肥厚心肌钙调蛋白激酶活性及室性心律失常发生的影响[J]. 临床心血管病杂志, 2006, 22(8): 478-480.
- [3] 王文广,吴杰,张存泰,等. 心肌缺血时钙调蛋白信号转导途径的变化与对心脏的影响[J]. 中国心脏起搏与心电生理杂志, 2005, 19(4): 313-315.
- [4] 黄鑫,李莉. 钙调蛋白/钙调蛋白依赖性蛋白激酶Ⅱ和心律失常的关系[J]. 中国医师进修杂志, 2006, 29(15): 76-78.
- [5] 王湛,李东阳,曹宇,等. 钙调蛋白与肥厚心肌的心律失常[J]. 解剖科学进展, 2010, 16(4): 364-366.
- [6] 刘善红,李景东. Ca^{2+} /钙调蛋白依赖性蛋白激酶Ⅱ在心脏重构中的信号转导作用[J]. 心血管病学进展, 2009, 30(4): 685-689.
- [7] 李喆. 缺血再灌注致心律失常大鼠模型钙调蛋白介导的 L 型离子通道电流的变化[J]. 海南医学院学报, 2013, 19(12): 1627-1630.
- [8] 赵妍. 钙/钙调蛋白激酶Ⅱ信号系统与心血管疾病[J]. 国际病理科学与临床杂志, 2011, 31(4): 310-314.
- [9] 叶勇,杨丹丹,涂乾. 丹参酮ⅡA 对 CAM 血管生成影响的实验研究[J]. 现代中西医结合杂志, 2010, 2(2): 61-67.
- [10] 吴蔚,张存泰. 钙调蛋白激酶和心律失常[J]. 中华心律失常学杂志, 2006, 10(4): 301-302.

(收稿日期:2014-12-10)