

## 中国结肠癌病人中有甲烷短杆菌的证明

许宝孝 奚明权

(上海技术师范学院, 上海)

王悦治 陆德源

(上海第二医科大学, 上海)

肖树东

(上海消化疾病研究所, 上海)

人肠道是厌氧生态系统, 其中有产甲烷菌栖居着。在健康美国人中, 优势产甲烷菌是史氏甲烷短杆菌 (*Methanobrevibacter smithii*)<sup>[1,2]</sup>, 此外, 还有浓度较低的斯氏甲烷球形菌 (*Methanosphaera stadsmaniae*)<sup>[3,4]</sup>。在一名做过左结肠部分切除, 末端结肠造口和粘液瘻的美国妇女身上留下的一段结肠的内含物中也有浓度相当高的史氏甲烷短杆菌<sup>[5]</sup>。在健康日本人中有一种在形态和生理特征上像甲烷短杆菌, 而在抗原性上与甲烷短杆菌属的已知成员无亲缘关系的产甲烷菌<sup>[6]</sup>。

临床报道, 有些结肠癌患者呼气中排出的甲烷量较高<sup>[7,8]</sup>。为阐明人肠道产甲烷菌与结肠癌的可能联系, 我们开始研究结肠癌患者的产甲烷菌。结果证明, 我国结肠癌病人粪便中也有甲烷短杆菌。现将初步结果报道如下:

### 材料与 方法

#### (一) 厌氧操作

培养基的配制、分装和消毒, 粪便匀浆的制备, 粪样的接种和富集培养, 以及产甲烷菌分离都是在充氮的严格厌氧条件下, 按改良的 Hungate 氏操作步骤进行的<sup>[1,9-12]</sup>。

#### (二) 培养基

富集分离均用 Balch 1号培养基<sup>[11]</sup>。

纯度试验采用肉汁蛋白胨琼脂、葡萄糖琼脂培养基和无产甲烷基质的 Balch 1号培养基<sup>[1,12]</sup>。

基质利用试验用磷酸缓冲培养基<sup>[13,14]</sup>。

测验胆盐敏感性用如文献 [1] 和 [12] 中所述的胆盐培养基。

将分装好的上述培养基于 121°C 高压蒸汽灭菌 20min, 加入 0.05% Na<sub>2</sub>S 和 0.5% NaHCO<sub>3</sub> 后, 培养基的 pH 约 7.4。

#### (三) 粪样

新鲜粪样取自上海仁济医院一个 85 岁的男性结肠癌病人。先使粪样悬浮于无氧灭菌水中, 用玻璃珠打成粪浆, 然后接入盛有 45ml Balch 1号培养基的 100ml 血清瓶富集培养。

#### (四) 富集分离

在血清瓶中接入 4.5ml 粪浆, 通入 1 大气压的 H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (4:1, V/V), 37°C 富集培养。每隔 3 天用气相层析仪分析瓶内上面空间中的气体。分析方法和条件如文献 [12] 中所述。选取产甲烷富集物, 在装有 4.5ml 含 2% 琼脂的 Balch 1号培养基的厌氧试管中作 10 倍系列稀释, 滚管。再通入 1 大气压的 H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (4:1, V/V) 37°C 培养。选取有甲烷产生的最高稀释度的滚管, 用 Olympus Vanox AHB-LB-2 型万能显微镜的反射荧光系统于 420nm 观察, 挑取有荧光的单个菌落。再作系列稀释, 滚管。一直到滚管中长出形态一致的荧光菌落为止。

#### (五) 电子显微镜检查

细胞用 2% 磷钨酸染 5min, 用日立牌 H-500 型电子显微镜观察照相。

### 结果与 讨论

粪便富集物于 37°C 培养 18 天后产甲烷。用产甲烷的富集物在含克林达霉素<sup>[12,13]</sup>的 Balch 1

本文于 1989 年 1 月 9 日收到。

号培养基中作 10 倍系列稀释, 滚管。于 37°C 培养 12 天后, 在  $10^{-1}$  滚管中检出甲烷, 再培养 21d, 在  $10^{-3}$  和  $10^{-4}$  滚管中也有甲烷产生。反射荧光显微镜检查表明, 在产甲烷的滚管中有许多圆形的荧光菌落。再挑取荧光菌落到含有克林达霉素的 Balch 1 号培养基中, 滚管。经过这样 4 次滚管和挑菌落, 得到在甲烷阳性的滚管中长有一致的圆形荧光菌落的纯培养物。

细胞为革兰氏阳性、不形成芽孢、不运动、柳叶刀形到卵圆形的短杆菌,  $0.5-0.8 \times 0.9-1.4 \mu\text{m}$ , 单个或成对存在(图 1)。但有时菌体连接成长短不一的链。图 2 为一条由 5 个菌体连成的链。在较老的培养物中, 链常绕成一团。

滚管菌落棕黄色, 隆起, 圆形, 边缘完整。反射荧光显微镜下呈鲜艳的蓝绿色荧光。在液体培养基中, 起初呈均匀混浊生长, 后来形成沉淀。



图 1 从结肠癌病人粪便中分离出的甲烷短杆菌的相差显微镜照片( $\times 600$ )

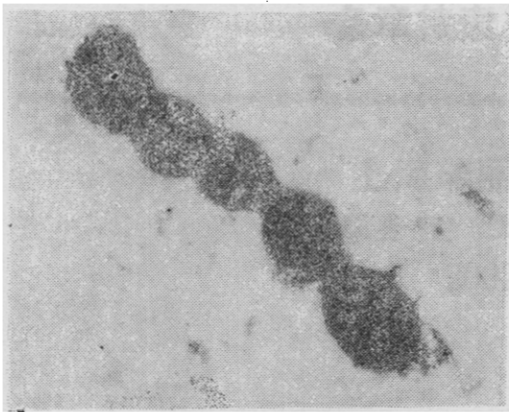


图 2 从结肠癌病人粪便中分离出的甲烷短杆菌的电子显微镜照片( $\times 15000$ )

分离物利用  $\text{H}_2/\text{CO}_2$  或者甲酸生长和产甲

烷, 不需要外加 2-甲基丁酸、辅酶 M 或者氨基酸。分离物的形态和生理特征与美国人的史氏甲烷短杆菌极其相似, 只是健康美国人的史氏甲烷短杆菌能在胆盐培养基中生长<sup>[1]</sup>, 而中国结肠癌病人的甲烷短杆菌对胆盐是敏感的。

虽然人结肠中栖居着产甲烷菌<sup>[1,3,14,17]</sup>, 但对于产甲烷菌的来源和作用, 它们与宿主的生理关系, 以及有无致病性等了解甚少。不过, 已有人肠道产甲烷菌与结肠癌<sup>[7,8]</sup>, 以及与憩室病 (diverticulosis)<sup>[2]</sup> 的关系的报道。

我国结肠癌发病率有渐增的趋势。结肠癌的发生似乎与结肠内环境有关。我们尝试先弄清楚健康人和结肠癌患者肠道中产甲烷菌的种类与数量, 然后, 通过对结肠微生物区系中细菌发酵产物的分析来揭示肠道细菌(包括肠道产甲烷菌)与结肠癌的可能联系。

## 参 考 文 献

- [1] Miller, T. L. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 43: 227-232, 1982.
- [2] Weaver, G. A. et al.: *Gut*, 27: 698-704, 1986.
- [3] Miller, T. L. et al.: *J. Bacteriol.*, 153: 1051-1055, 1983.
- [4] Miller, T. L. and M. J. Wolin: *Arch. Microbiol.*, 141: 116-122, 1985.
- [5] Miller, T. L. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 48: 449-450, 1984.
- [6] Misawa, H. et al.: *ibid.*, 51: 429-431, 1986.
- [7] Haines, A. G. et al.: *Lancet*, 2: 481-483, 1977.
- [8] Pique, J. M. et al.: *Gastroenterology*, 84: 601-605, 1984.
- [9] Hungate, R. E.: A Roll Tube Method for Cultivation of Strict Anaerobes. In "Method of Microbiology", Vol.3B, Academic Press Inc., New York, pp. 117-132, 1969.
- [10] Bryant, M. P.: *Am. J. Clin. Nutr.*, 25: 1324-1328, 1972.
- [11] Balch, W. E. et al.: *Microbiol. Rev.*, 43: 260-296, 1979.
- [12] 许宝孝等: *微生物学报*, 25: 283-288, 1985.
- [13] 钱泽澍: *微生物学报*, 24: 105-110, 1984.
- [14] Zeikus, J. G. and D. L. Henning: *Antonie Van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol.*, 41: 543-552, 1975.
- [15] 许宝孝等: *微生物学报*, 23: 189-192, 1988.
- [16] Nottingham, P. M. and R. E. Hungate: *J. Bacteriol.*, 96: 2176-2179, 1968.
- [17] Levitt, M. D.: *N. Engl. J. Med.*, 302: 1474-1475, 1980.

## DEMONSTRATION OF THE PRESENCE OF *METHANOBREVI- IBACTER* IN A COLON CANCER CHINESE PATIENT

Xu Baoxiao Xi Mingquan

(*Shanghai Technical Teacher's College, Shanghai*)

Wang Yuezhi Lu Deyuan

(*Shanghai Second Medical University, Shanghai*)

Xiao Shudong

(*Shanghai Institute of Digestive Diseases, Shanghai*)

A fecal specimen from a Chinese patient (85-year-old man) suffering from colonic cancer was examined for the presence of methane-producing bacteria. As a result, a *Methanobrevibacter* organism was isolated. Our isolate did not grow in the presence of bile salts, a result different from *Methano-*

*brevibacter* from healthy Americans' feces by Miller et al.

### Key words

Human intestinal methanogens; *Methanobrevibacter*; Colon cancer