

# 肠道疾病患者粪便中的产甲烷菌

许宝孝

(上海技术师范学院,上海)

张达荣 苏皖文 肖树东

(上海市消化疾病研究所,上海)

检查了10例结肠直肠癌,1例十二指肠憩室患者和2名正常人的粪样。9个粪便富集培养物中有甲烷短杆菌。产甲烷菌阳性者比例为69%。从4例结肠直肠癌和1例十二指肠憩室患者的粪便富集物中分离出甲烷短杆菌。结肠直肠癌患者中,呼气甲烷阳性者比例和产甲烷量明显增高。呼气末气体标本中的甲烷量有望成为监护癌前状态发生结肠或直肠癌和监护癌肿切除者复发的一种快速、简便和非侵入性的方法。

**关键词** 甲烷短杆菌;结肠直肠癌;十二指肠憩室;呼气中甲烷量

人肠道是厌氧生态系统。甲烷是人肠道中有机物质厌氧发酵的主要产物之一<sup>[1,2]</sup>。有关人肠道甲烷形成和产甲烷菌的研究指出,人群中30—61%成人的呼气中有甲烷排出<sup>[3—11]</sup>,人肠道中的优势产甲烷菌是甲烷短杆菌<sup>[2,4,5,12—14]</sup>。

Weaver等检查了属于结肠正常,憩室,炎症性肠病,结肠息肉和结肠癌这5个结肠类群的130人的粪便,结果是,72%(94人)有产甲烷菌,优势产甲烷菌都是甲烷短杆菌<sup>[14]</sup>。

临床报道,结肠癌患者中呼气甲烷阳性者的比例可高达80—90%<sup>[15,9]</sup>;有些结肠癌患者呼气中排出的甲烷量明显增高<sup>[15,10]</sup>。

结肠直肠癌是我国常见的恶性肿瘤之一。随着生活水平的提高,食品结构和质量的改变,我国结肠直肠癌发病率有渐增的趋势。结肠直肠癌的发病与肠道内环境有关。包括产甲烷菌在内的肠道厌氧菌群可能与发病有关。所以,研究结肠直肠癌和其它肠道疾病患者的产甲烷菌在生态学和医学上都具有重要意义。

本文报道我国结肠直肠癌和十二指肠憩室患者的产甲烷菌和产甲烷量,并探讨产甲烷菌,甲烷量与结肠直肠癌的可能关系。

## 材料和方 法

### (一) 粪便来源

粪便来自10例结肠直肠癌,1例十二指肠憩室患者和2名健康人。用无菌竹签将上述受检者自然排出的新鲜粪便放入无菌小瓶内,立即置于厌氧条件下还原。

### (二) 粪样制备

用无菌的无氧水制成10%的粪便悬浮液。

### (三) 培养基

富集和分离用Balch 1号培养基<sup>[16—18]</sup>。纯度试验培养基用肉汁蛋白胨琼脂培养基,葡萄糖琼脂培养基和无产甲烷基质的Balch 1号培养基<sup>[17,18]</sup>。

基质利用试验用磷酸缓冲培养基<sup>[17,18]</sup>。

本文于1991年1月8日收到。

营养试验用 Balch 2 号和 3 号培养基<sup>[5,16-18]</sup>。

测验胆盐敏感性用文献[5], [17] 和 [18]中所述的胆盐培养基。

将分装好的上述培养基于 121℃ 高压蒸汽灭菌 20 分钟, 加入 0.05%  $\text{Na}_2\text{S}$  和 0.5%  $\text{NaHCO}_3$  后, 培养基的 pH 约 7.4。

#### (四) 厌氧技术

培养基的配制、分装和消毒, 粪便悬浮液的制备, 粪样接种和富集培养, 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>[5,16-20]</sup>。

#### (五) 富集分离

取 4.5ml 粪便悬浮液, 接入盛有 45ml Balch 1 号培养基的 100ml 血清瓶中, 通入 1 大气压的  $\text{H}_2/\text{CO}_2$  (4:1, V/V), 37℃ 富集培养。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[17] 和 [18] 中所述。选取产甲烷的粪便富集物, 用滚管法分离纯化产甲烷菌。经过用含克林达霉素的 Balch 1 号琼脂培养基<sup>[17,18]</sup> 反复地滚管分离后, 得到形态一致的甲烷短杆菌分离物。单菌落的涂片检查以及挑取单菌落到肉汁蛋白胨琼脂培养基、葡萄糖琼脂培养基和无产甲烷基质的 Balch 1 号培养基中进行厌氧、好氧培养均不生长的结果, 进一步证实所得的分离物为甲烷短杆菌的纯培养物。

#### (六) 呼气中甲烷检测

受检者清晨空腹, 检查前忌烟 4 小时, 2 周内未用过灌肠, 泻剂和抗生素<sup>[21]</sup>。取呼气末气体标本, 贮于用金属箔包裹的样品袋中, 然后从样品袋中采得气样<sup>[22]</sup>, 用日本岛津公司 GC-RIA 型气相色谱仪检测。检测用氢火焰离子化检定器。色谱柱: 3mm × 2m 的玻璃柱。填充剂: 5g 分子筛 (60-80 目)。柱温: 50℃。载气:  $\text{N}_2$

(50ml/min)。助燃气:  $\text{H}_2$  (35ml/min), 空气 (450ml/min)。每个呼气标本的甲烷浓度为两次测得的平均值减去本底值(环境大气中甲烷浓度)的 ppm 值。所产甲烷较室内空气中高 1ppm 以上者为产甲烷阳性者。

结肠直肠癌患者手术后呼气甲烷量为手术后 1 个月所取呼气末标本的甲烷量。

## 结 果

### (一) 甲烷短杆菌的分离及其生理特性

检查了 10 例结肠直肠癌, 1 例十二指肠憩室和 2 名正常人的粪便样品。产甲烷菌阳性者的比例为 69%。9 个产甲烷菌富集培养物中都有甲烷短杆菌。

从 4 例结肠直肠癌和 1 例十二指肠憩室患者的富集物中分离得到甲烷短杆菌的纯培养。它们是革兰氏阳性、不形成芽孢、柳叶刀形到卵圆形的短杆菌,  $0.5-0.8 \times 1-1.5 \mu\text{m}$ , 不运动。单个或成对存在。但有时候菌体连接成长短不一的链。

滚管菌落很小, 棕黄色, 隆起, 圆形, 边缘完整。反射荧光显微镜下呈蓝绿色荧光, 但很快就消失。在液体培养基中, 起初呈均匀混浊生长, 后来形成沉淀。

测验了分离物利用  $\text{H}_2/\text{CO}_2$ 、甲酸、三甲胺和甲醇生长的能力。此外还测验了它们利用  $\text{H}_2$  还原甲醇的能力。测验是在装有 4.5ml 磷酸缓冲培养液的厌氧试管中进行的。 $\text{H}_2/\text{CO}_2$  为 4:1(V/V), 甲酸、甲醇和三甲胺的浓度均为 0.5%。接入 0.5ml 菌液, 置于 37℃ 培养。2 星期后测定生长。生长情况用产甲烷量表示。

5 个分离物的生理特性见表 1。它们都能利用  $\text{H}_2/\text{CO}_2$  或者甲酸生长。不过, 利用甲酸时, 生长得没有利用  $\text{H}_2/\text{CO}_2$  时的好。不利用甲醇和三甲胺生长。也没有

表 1 中国结肠直肠癌和十二指肠憩室患者粪便中甲烷短杆菌的特性

Table 1 Characteristics of *Methanobrevibacter* isolates from feces of colorectal cancer and duodenum diverticulosis Chinese patients

特 性 Character	分离物 Isolate				
	CC-1	CC-2	CC-3	CC-4	DD-1
粪便来源 Fecal source	结肠直肠癌 <sup>a</sup>	结肠直肠癌 cc	结肠直肠癌 cc	结肠直肠癌 cc	十二指肠憩室 dd <sup>b</sup>
革蓝氏反应 G reaction	+	+	+	+	+
基质: Substrate:					
H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	29.2 <sup>c</sup>	40.4	35.4	28.6	46.6
甲酸 Formate	18.4 <sup>c</sup>	28.2	30.2	23.0	40.8
甲醇 Methanol	0 <sup>c</sup>	0	0	0	0
三甲胺 TMA <sup>d</sup>	0 <sup>c</sup>	0	0	0	0
营养: Nutrition:					
Balch 2	0 <sup>c</sup>	0	0	0	0
Balch 3	17.5 <sup>c</sup>	26.4	28.2	20.6	37.4
胆盐培养基 Bile medium	0 <sup>c</sup>	0	0	0	0

a. Colorectal cancer

b. Duodenum diverticulosis

c. 甲烷产量 ( $\mu\text{mol}/\text{试管}$ ) Methane production ( $\mu\text{mol}/\text{tube}$ )

d. Trimethylamine

表 2 结肠直肠癌患者癌肿切除前后呼气中甲烷含量的比较

Table 2 Comparison of breath methane excretion in patients with unresected and resected colorectal cancer

病例序号 Case number	甲烷量 (ppm) Methane production	
	切除前 Unresected	切除后 Resected
1	63.40	3.93
2	10.90	0.90
3	17.40	1.00
4	2.68	1.02
5	12.00	1.10
6	24.20	2.30

一个分离物利用 H<sub>2</sub>还原甲醇生长。各分离物能不加辅酶M和2-甲基丁酸的 Balch 1号培养基中生长这一点表明, 它们的生

长都不需要外加辅酶M和2-甲基丁酸。没有一个分离物在 Balch 2号培养基中生长这一点表明, 它们都需要乙酸和/或胰解酪

蛋白或酵母膏中的一种或几种组分生长。5个分离物都能在含1.8% NaCl的Balch 3号培养基中生长。分离物对胆盐都是敏感的。

## (二) 呼气中的甲烷含量

6例结肠直肠癌患者手术前后呼气中的甲烷含量如表2所示。癌肿切除前呼气中甲烷值为 $21.76 \pm 21.62$ ppm,癌肿切除后呼气中甲烷值为 $1.708 \pm 1.207$ ppm。P < 0.001。癌肿切除后呼气中甲烷量显著降低。因此,术后甲烷值增高可能成为结肠直肠癌复发的标记。

# 讨 论

## (一) 产甲烷阳性者的比例

我们检查了属于结肠正常,结肠直肠癌和十二指肠憩室的13人的粪便。产甲烷菌阳性者比例为69%。Weaver等检查了属于结肠正常,憩室,炎症性肠病,结肠息肉和结肠癌的130人的粪便,72%受检者有产甲烷菌<sup>[14]</sup>。这两个研究产甲烷菌阳性者比例的差异与受检样本的大小有关。也可能与受检者有遗传和环境上的差异有关。基因和环境会影响人肠道细菌(其中包括产甲烷菌)的种类、数量以及它们的气体产物的种类和数量。宿主提供的内源基质的量可能也有遗传和环境的差异。本研究的产甲烷菌阳性者比例较低或许还有技术上的原因。Weaver等是在厌氧操作箱中用平皿法分离产甲烷菌的,分离效率较高。而我们用的滚管法分离效率较低。此外,由于产甲烷菌严格厌氧,一部分样品在运送过程中可能接触氧气死亡,另一部分样品可能因培养条件(如氧化还原电位)不合适而不生长。

## (二) 产甲烷菌种类

迄今为止的研究表明,在受检的外国人中,优势产甲烷菌都是甲烷短杆

菌<sup>[2,4,5,12-14]</sup>。在西方人中都是史氏甲烷短杆菌(*Methanobrevibacter smithii*)<sup>[2,4,5,12,14]</sup>。在日本人中是一种在形态和生理特性上类似甲烷短杆菌,而在抗原性上与史氏甲烷短杆菌无亲缘关系的产甲烷菌<sup>[13]</sup>。

我们的研究证明,13个中国受检者的粪样中,9个有甲烷短杆菌,而且从4例结肠直肠癌和1例十二指肠憩室患者的粪样中分离出甲烷短杆菌。

由此看来,甲烷短杆菌也是中国人肠道中的优势产甲烷菌。

## (三) 产甲烷菌与结肠直肠癌的可能关系

近年来,虽然有人在探索人肠道产甲烷菌与结肠癌以及憩室之间的关系<sup>[10,14,15]</sup>,但尚无提供它们之间相关的直接证据的资料。Haines等<sup>[15]</sup>和Pique等<sup>[10]</sup>只是指出,结肠癌病人中,呼气甲烷阳性者比例有增高的趋势。Weaver等的研究指出,憩室患者中高浓度产甲烷菌者的比例较高<sup>[14]</sup>。本研究证明,分离自1例十二指肠憩室的甲烷短杆菌的甲烷产量较高(见表1)。张达荣等测定了属于健康者(104),结肠直肠癌(32),结肠直肠癌切除(18),肠道易激综合症(19),溃疡性结肠炎(9),大肠息肉(12)和抗生素治疗(20)这7个组的214例呼气标本中甲烷含量。结果表明,结肠直肠癌组的甲烷阳性者比例和产甲烷量均显著高于其它组。我们从上述的结肠直肠癌组中选取10例作产甲烷菌的分离,结果从4例中分离出甲烷短杆菌。这些研究表明,结肠(直肠)癌的存在导致产甲烷菌的增多,甲烷阳性者比例和产甲烷量的增高。其可能机理是:(1)肿瘤内存在着某种化学性质尚不清楚的产甲烷基质。(2)肿瘤生长时大肠分泌物组成的变化,为产甲烷菌提供了产甲烷基质。(3)肿瘤和憩室使大肠部分阻塞,延长了H<sub>2</sub>等气体产物在肠

中的滞留时间。(4) 肿瘤和憩室提供了一个保护产甲烷菌免受扫除的小生态环境, 那里产甲烷菌可以与产氢菌建立起良好的共生关系。总之, 肿瘤和憩室为产甲烷菌生长提供了特别适宜的环境。

具有临床意义的是, 结肠或直肠癌手术切除后, 甲烷阳性者比例和产甲烷量均显著降低(见表 2)。这一结果与 Pique<sup>[10]</sup>等的研究相一致。它表示着, 手术后呼气标本中甲烷量的增高可能是癌肿复发的标记。这从另一方面证明, 结肠直肠癌提供给产甲烷菌适宜的生长环境。呼气末气体标本中甲烷量的检测有望成为监护癌前状态结肠或直肠癌的发生和监护癌肿切除者复发的一种快速、简便和非侵入性的方法。

### 参 考 文 献

- [1] Wolin, M. J.: *Science*, 213: 1463—1468, 1981.
- [2] Miller, T. L. and M. J. Wolin: *System. Appl. Microbiol.*, 7: 223—229, 1986.
- [3] Bond, J. H. et al.: *J. Exp. Med.*, 133: 572—578, 1971.
- [4] Miller, T. L. and M. J. Wolin: *Arch. Microbiol.*, 131: 14—18, 1982.
- [5] Miller, T. L. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 43: 227—232, 1982.
- [6] Miller, T. L. and M. J. Wolin: *ibid.*, 45: 317—318, 1983.
- [7] McKay, L. F. et al.: *Am. J. Clin. Nutr.*, 34: 2728—2733, 1981.
- [8] Bjarneklett, A. and E. Jenssen: *Scand. J. Gastroenterol.*, 17: 985—992, 1982.
- [9] Pitt, P. et al.: *Gut*, 21: 951—959, 1980.
- [10] Pique, J. M. et al.: *Gastroenterology*, 84: 601—605, 1984.
- [11] McKay, L. F. et al.: *Gut*, 26: 69—74, 1985.
- [12] Miller, T. L. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 48: 449—450, 1984.
- [13] Misawa, H. et al.: *ibid.*, 51: 429—431, 1986.
- [14] Weaver, G. A. et al.: *Gut*, 27: 698—704, 1986.
- [15] Haines, A. et al.: *Lancet*, 2: 481—483, 1977.
- [16] Balch, W. E. et al.: *Microbiol. Rev.*, 43: 260—296, 1979.
- [17] 许宝孝等: *微生物学报*, 25: 283—288, 1985.
- [18] 许宝孝等: *微生物学报*, 30: 400—402, 1990.
- [19] 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.
- [20] Bryant, M. P.: *Am. J. Clin. Nutr.*, 25: 1324—1328, 1972.
- [21] Gilat, T. et al.: *Gut*, 19: 602—608, 1978.
- [22] Tadesse, K. et al.: *J. Chromatography*, 171: 416—420, 1979.

## METHANOGENS FROM FECES OF PATIENTS WITH INTESTINE DISORDER

Xu Baoxiao

(Shanghai Technical Teacher's College, Shanghai)

Zhang Darong Su Wanwen Xiao Shudong

(Shanghai Institute of Digestive Disease, Shanghai)

Fecal specimens from 10 colorectal cancer, 1 duodenum diverticulosis and 2 healthy adults were examined. Nine fecal enrichments contained *Methanobrevibacter*. The percentage of methanogen positive individuals was 69%. *Methanobrevibacter* were isolated from fecal enrichments of 4 colorectal cancer and 1 duodenum diverticulosis. The percentage of breath methane positive individuals and methane production had significantly increased in colorectal cancer patients. It will be hopeful

that methane production in breath samples at the end of exhalation will become a rapid, simple and non-penetrative method for monitoring precancerous colonic or rectal carcinogenesis and monitoring the relapse of individuals with carcinosectomy.

### Key words

*Methanobrevibacter*; Colorectal cancer; Duodenum diverticulosis; Methane in the breath