

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
54 (10) :1228 - 1234; 4 October 2014
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.10.016

结直肠腺瘤及结直肠癌患者肠道中梭杆菌属与产丁酸菌的定量研究

苗慧芳^{1,2}, 武娜³, 栾春光², 杨犀², 张瑞芬², 律娜², 朱宝利^{2*}

¹安徽大学生命科学学院, 安徽 合肥 230039

²中国科学院微生物研究所, 北京 100101

³北京大学人民医院, 北京 100044

摘要:【目的】通过观察梭杆菌属 (*Fusobacterium* spp.) 和两株产丁酸菌 (*Eubacterium rectale*、*Faecalibacterium prausnitzii*) 在结直肠癌患者及结直肠腺瘤患者粪便样品中的丰度差异, 研究梭杆菌属和产丁酸菌数量变化在结直肠腺瘤和结直肠癌发生发展中的作用和意义。【方法】收集结直肠癌患者 (n = 19)、结直肠腺瘤患者 (n = 12) 及健康人 (n = 19) 3 组粪便样品, 提取细菌基因组 DNA, 利用实时荧光定量 PCR 技术定量检测 3 组样品中梭杆菌属 (*Fusobacterium* spp.)、直肠真杆菌 (*Eubacterium rectale*)、普拉梭菌 (*Faecalibacterium prausnitzii*) 以及总菌的 16S rRNA 基因的拷贝数, 然后利用秩和检验两两比较 3 组样品中目标菌群的数量和丰度差异。【结果】结直肠癌组的梭杆菌属丰度显著高于结直肠腺瘤组 ($P = 0.013$) 和健康组 ($P = 0.000$), 结直肠腺瘤组的梭杆菌属丰度显著高于健康组 ($P = 0.002$); 结直肠腺瘤组普拉梭菌的丰度显著低于健康组 ($P = 0.033$); 结直肠腺瘤组的总菌 16S rRNA 基因拷贝数也显著低于健康组 ($P = 0.002$); 直肠真杆菌的水平在 3 组样品间没有显著差异。【结论】与健康人的粪便样品相比, 结直肠腺瘤病人的粪便中产丁酸菌普拉梭菌数量下降, 而结直肠腺瘤和结直肠癌病人的粪便样品中梭杆菌属数量增加; 梭杆菌属和产丁酸菌数量上的变化提示它们可能与结直肠腺瘤和结直肠癌的发生密切相关。

关键词: 结直肠癌, 结直肠腺瘤, 梭杆菌属, 产丁酸菌, 实时荧光定量 PCR

中图分类号: R37 文章编号: 0001-6209 (2014) 10-1228-07

结直肠癌 (colorectal cancer) 是常见的恶性肿瘤, 其发病率在欧美等发达国家居第二位^[1]; 在我国居第三位, 并有不断上升的趋势^[2]。结直肠癌发病因素分为两类: 家族遗传性和散发性结直肠癌, 散发性结直肠癌约占结直肠癌总数的 95%^[3]。而散发性的结直肠癌 80% 以上是由结直肠腺瘤 (colorectal adenoma) 转化而来^[4-6]。然而, 结直肠腺瘤和结直肠癌的病因学还不明确。

肠道微生物组被称为人类第二基因组, 含有有

500 - 1000 种微生物, 聚集多于人类 100 倍的基因组^[7-8]。肠道微生物与人体免疫系统共同进化, 在维持肠道健康水平起着举足轻重的作用^[8]。研究表明肠道菌群失调与结直肠癌形成有关^[9-11], 尤其是梭杆菌属 (*Fusobacterium*) 与结直肠癌密切相关^[9,12]。梭杆菌属 (*Fusobacterium*) 是口腔、上呼吸道、胃肠道、阴道粘膜的正常菌群^[13], 能引起牙周炎、扁桃体炎、雷米尔氏综合征 (Lemierre's syndrome) 等疾病。近年来, Amber 等证实腺瘤病人直肠粘膜组织梭杆菌属数

* 通信作者。Tel: +86-40-64807362; E-mail: zhubaoli@im.ac.cn

作者简介: 苗慧芳 (1988 -), 女, 河南新乡人, 硕士研究生, 研究方向为微生物学。E-mail: hfmiao3@126.com

收稿日期: 2014-01-03; 修回日期: 2014-03-07

量显著增加^[14]。Aleksandar 等通过高通量测序发现梭杆菌属在结直肠癌患者肠粘膜中明显富集^[9]。Mauro Castellarin 等通过 RNA-seq 进一步发现梭杆菌属在结直肠癌粘膜样品中普遍存在^[12]。近年来产丁酸菌在结直肠癌发生发展中的作用也是相关研究的热点之一^[10,15]。产丁酸菌的命名源于其在代谢过程可产生丁酸,丁酸可为结肠上皮细胞提供能量^[16],并具有抑制炎症^[17],调节基因表达,防止癌变^[18]等保护作用。肠道中产丁酸菌主要包括直肠真杆菌 (*Eubacterium rectale*) 和普拉梭菌 (*Faecalibacterium prausnitzii*)^[19],都属于厚壁菌门。直肠真杆菌在肠道中的相对丰度可随着饮食的改变而发生变化^[20]。要素饮食 (elemental diet) 能够增加直肠真杆菌数量,从而可以缓解慢性结肠炎的症状^[21]。研究表明普拉梭菌在克罗恩病 (Crohn's disease, CD) 患者肠道中的数量显著低于健康人^[22]。虽然梭杆菌属分别富集于结直肠癌和结直肠腺瘤组织中^[9,14],而产丁酸菌在克罗恩^[22]和结直肠癌病人^[15]肠道中相对缺乏,但梭杆菌属和产丁酸菌在粪便样品中数量的变化与结直肠腺瘤和结直肠癌的发展关系还尚未有报道。本研究拟通过实时荧光定量 PCR 方法定量检测健康人、结直肠腺瘤和结直肠癌患者的粪便样品中梭杆菌属和两种产丁酸菌的数量差异,探讨其在结直肠癌发生发展中的作用。这将对揭示结直肠癌的发病机制具有一定的意义,并可为结直肠癌的早期诊断提供新的检测方法。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器

肠道粪便细菌元基因组 DNA 提取试剂盒

QIAamp DNA Stool Mini kit 购于德国 QIAGEN 公司; TaqDNA 聚合酶购于宝生物工程 (大连) 有限公司; PCR 产物纯化试剂盒 MinElute Gel Extraction Kit 购于德国 QIAGEN 公司; TA 克隆试剂盒 pEASY-T3 Cloning Kit 购于北京全式金生物技术有限公司; 荧光定量混合试剂 KAPA SYBR® FAST qPCR Kit Master Mix (2 ×) ABI Prism™ 购于 KAPA BIOSYSTEMS 公司; 引物合成于生工生物工程 (上海) 股份有限公司, HPLC 纯化合成方法; 荧光定量八连管 (MicroAmp™ Optical 8-Tube Strip) 和八连管盖 (MicroAmp™ Optical 8-Cap Strip) 均购自 Applied Biosystems 公司; 高速冷冻离心机 (Z216MK 型) 购自德国 HERMLE 公司; 微量核酸定量仪 (ND-1000 型) 购自美国 Nanodrop Technologies 公司; 电泳仪 PowerPac Basic 购自 BIO-RAD 公司; 凝胶成像系统 Alphamager® EC 购自美国 Alpha Innotech 公司; PCR 仪 2720 Thermal cycler 购自 Applied Biosystems 公司; 实时荧光定量 PCR 仪 7300 Real Time PCR System 购自 Applied Biosystems 公司。

1.2 研究对象

结直肠癌 (Colorectal cancer, C) 患者粪便样品 (n = 19) 来自中国医学科学院肿瘤医院, 结直肠腺瘤 (colorectal adenomas, A) 患者粪便样品 (n = 12) 来自北京大学人民医院, 健康人 (Healthy People, H) 粪便样品 (n = 19) 来自北京中老年志愿者。3 组人群的基本统计资料如表 1 所示。所有病人都确诊为结直肠腺瘤或结直肠癌, 已排除糖尿病、高脂血症等代谢性疾病史以及结直肠癌家族史, 近 3 个月内无服用抗生素史。新鲜的粪便样品采集放入冻存管, 迅速冻存于 -80℃ 冰箱。

表 1. 研究人群的统计资料

Table 1. Characteristics of the subjects

final cohort	age	male: female	height	weight	BMI ^d
group H ^a (n = 19) Median (Min to Max)	54.0 (41 to 62)	11:08	1.65 (1.54 to 1.75)	65 (45 to 93)	24.2 (19.0 to 31.8)
group A ^b (n = 12) Median (Min to Max)	55.5 (48 to 65)	9:03	1.67 (1.58 to 1.80)	69.5 (49 to 85)	23.9 (19.1 to 28.4)
group C ^c (n = 19) Median (Min to Max)	58.0 (43 to 76)	9:10	1.62 (1.47 to 1.76)	67 (49 to 85)	24.3 (19.5 to 34.9)

^a: H represents healthy people; ^b: A represents colorectal adenomas patients; ^c: C represents colorectal cancer patients; ^d: BMI represents Body Mass Index.

1.3 肠道菌群细菌元基因组 DNA 的提取

称取 200 mg 样品采用 QIAamp DNA Stool Mini kit 提取细菌元基因组, 微量核酸定量仪检测 DNA 浓度。

1.4 引物及 PCR 扩增

研究所用的 4 对引物信息如表 2 所示。采用这 4 对引物分别进行梭杆菌属, 直肠真杆菌, 普拉梭菌

和总菌的 16S rRNA 基因的特异性 PCR 扩增。PCR 的反应体系 20 μL : TaKaRa Premix Taq 10 μL , 上下游引物各 1 μL (10 $\mu\text{mol/L}$), 模板 50 - 100 ng。

PCR 反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 退火 30 s (不同引物退火温度见表 2), 72 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 7 min。PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。

表 2. 引物序列

Table 2. Primer sets used in this study

primer set	sequence (5'→3')	product size/bp	annealing temp/ $^{\circ}\text{C}$	reference
<i>Fusobacterium</i> spp.	F: C (A/T) AACGCGATAAGTAATC	274	54	[23]
	R: TGGTAA CATA CGA (A/T) AGGG			
<i>Eubacterium rectal</i>	F: AAGGGAAGCAAAGCTGTG AA	203	61	[24]
	R: TCG GTTAGTCACTGGCTTC			
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	F: GGA GGATTG ACCCCTTCAGT	204	61	[24]
	R: CTGGTCCCCGAAGAAACACAT			
total bacteria	F: TCCTACGGGAGGCAGCAGT	463	60	[25]
	R: GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT			

1.5 标准曲线的建立

纯化的扩增产物通过 TA 克隆与 pEASY-T3 载体连接, 随后将其转入 *Trans1-T1* Phage Resistant 化学感受态细胞。随机挑取克隆, 分别采用 4 对相应的特异引物进行阳性克隆筛选, 接种到氨苄-LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇菌过夜。送华大基因 (BGI) 进行测序, 测序结果与 NCBI 的 16S ribosomal RNA sequences 数据库进行比对。利用鉴定正确序列的克隆提取质粒 DNA, 测定其浓度, 计算具体拷贝数 (copies/ μL)。将 10 倍梯度稀释的质粒 DNA 作为标准品 ($10^2 - 10^8$), real-time PCR 反应建立标准曲线。

1.6 Real-time PCR 定量分析菌群变化

Real-time PCR 反应体系 20 μL : 上下游引物均为 1 μL (10 $\mu\text{mol/L}$), 模板 DNA 为 1 μL (10 ng/ μL), KAPA SYBR[®] FAST qPCR Kit Master Mix (2 \times) ABI Prism[™] 10 μL , 双蒸水为 7 μL 。Real-time PCR 反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$, 10 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min (总菌的退火和延伸步骤分为两步: 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 45 s), 35 个循环; 熔解曲线: 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s。使用 7300 system software 软件对反应结果进行分析。

1.7 数据分析

将定量得到的数值转换成每个样品每 1 g 湿重粪便样品中目标菌群的 16S rRNA 基因拷贝数, 取以 10 为底的对数值 (lgX), 并分别计算梭杆菌属、直肠真杆菌、普拉梭菌在总菌中的相对丰度, 计算每组平均数、标准离差、中位数、最大值和最小值。采用 SPSS 软件 (version 13.0) 进行统计分析, 组间比较采

用秩和检验 (Mann - Whitney U test)。

2 结果

2.1 克隆质粒鉴定

克隆测序结果的目标产物长度见表 2, 经 BLAST 比对, 检索结果与梭杆菌属中的 *F. necrophorum* strain ATCC 25286、*F. canifelinum* strain RMA 12708、*F. simiae* 和 *F. ulcerans* strain NCTC 12111 的同源性均达到 99%, 与 *E. rectale* ATCC 33656 strain ATCC 33656 和 *F. prausnitzii* strain ATCC 27768 的同源性分别达到 100% 和 99%。结果表明引物特异性良好, 重组质粒可作为模板用于标准曲线的建立。

2.2 标准曲线建立

梯度稀释的标准品 ($10^2 - 10^8$) 经实时荧光定量后标准曲线的 R^2 值分别为: 0.997736, 0.997559, 0.988071, 0.995127; 斜率分别为: -3.478778, -3.268145, -3.429358, -3.425498。所有标准曲线的 R^2 值均 > 0.980, 斜率均接近 -3.32, 扩增效率均介于 93% - 103% 之间。结果说明所建立的标准曲线具有较强的参考价值。而且标准品的熔解曲线均为单峰, 说明扩增产物单一, 几乎没有引物二聚体的干扰。

2.3 肠道菌群 real-time PCR 定量结果

每克湿重粪便样品中目标菌群 16S rRNA 基因拷贝数对数的平均值如表 3 所示。结直肠腺瘤组 (10.9) 及结直肠癌组 (11.4) 的总菌数量均低于健康对照组 (11.5), 尤其是结直肠腺瘤组的总菌数量比健康组显著降低 ($P = 0.002 < 0.01$); 结直肠腺瘤

组的梭杆菌属数量(7.3)略高于健康组(7.2), 结直肠癌组的梭杆菌属数量(9.1)显著高于健康组(7.2), 平均高出将近两个数量级; 结直肠癌组(9.2)的直肠真杆菌数量与另两组相比没有显著差

异; 普拉梭菌在3组人群中的数量由高到底依次为健康组(9.6)、结直肠癌组(8.9)、结直肠腺瘤组(8.2), 其中结直肠腺瘤组的普拉梭菌数量显著低于健康组($P = 0.032 < 0.05$)。

表3. 三组人群(每1克湿重)粪便中不同菌群16S rRNA基因拷贝数的对数值

Table 3. Real-time PCR quantitation of lg16S rRNA gene copies (per gram of wet weight) in feces of different subjects

target bacteria	group H ^a (n = 19)		group A ^b (n = 12)		group C ^c (n = 19)	
	M ± SD ^d	M ± SD	P (H vs. A) ^e	M ± SD	P (H vs. C)	P (A vs. C)
<i>Fusobacterium</i> spp.	7.2 ± 1.5	7.3 ± 1.1	0.649	9.1 ± 1.4	0.002**	0.023*
<i>Eubacterium rectale</i>	9.2 ± 1.3	9.0 ± 1.2	0.703	9.2 ± 1.2	0.840	0.899
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	9.6 ± 0.9	8.2 ± 1.6	0.023*	8.9 ± 1.7	0.234	0.350
total bacteria	11.5 ± 0.5	10.9 ± 0.4	0.002**	11.4 ± 0.8	0.954	0.023*

^a: H represents healthy people; ^b: A represents colorectal adenomas patients; ^c: C represents colorectal cancer patients; ^d: M ± SD represents Mean ± Standard deviation; ^e: P represents P-value. Mann-Whitney U test was used for pairwise comparison of the subject groups; *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

2.4 三组样本中目标菌16S rRNA基因的相对丰度比较

将梭杆菌属、直肠真杆菌和普拉梭菌的16S rRNA基因拷贝数与总菌的16S rRNA基因拷贝数相比作为3个目标菌的相对丰度, 其丰度在3组人群中的比较结果(图1)显示, 结直肠腺瘤组($P = 0.002 < 0.01$)和结直肠癌组($P = 0.000 < 0.01$)中的梭杆菌属丰度显著高于健康组。另外, 结直肠癌组中的梭杆菌属丰度显著高于结直肠腺瘤组($P = 0.013 < 0.05$)。直肠真杆菌的丰度在结直肠腺瘤组中较高, 但与健康组($P = 0.714 > 0.05$)及结直肠癌组($P = 0.595 > 0.05$)相比都没有显著差异。结直肠腺瘤组中的普拉梭菌丰度显著低于健康组($P = 0.033 < 0.05$), 结直肠癌组中的普拉梭菌丰度比健康组低($P = 0.257 > 0.05$), 结直肠腺瘤组的普拉梭菌丰度低于结直肠癌组, 但差异不显著($P = 0.251 > 0.05$)。

3 讨论

肠道微生物与人的健康密切相关。它们在促进营养物质的消化与吸收, 促进宿主免疫器官的成熟, 调节肠上皮细胞的损伤反应中发挥着重要作用, 其中的益生菌和/或共生菌在肠粘膜上的定植还可以抵制病原菌的入侵^[8]。但当肠道菌群组成结构发生改变, 便有可能导致肥胖^[26]、炎症性肠病^[4, 27]、糖尿病^[28]等疾病。近年来的研究表明肠道菌群结构的改变可能在结直肠癌发生和发展中发挥着重要

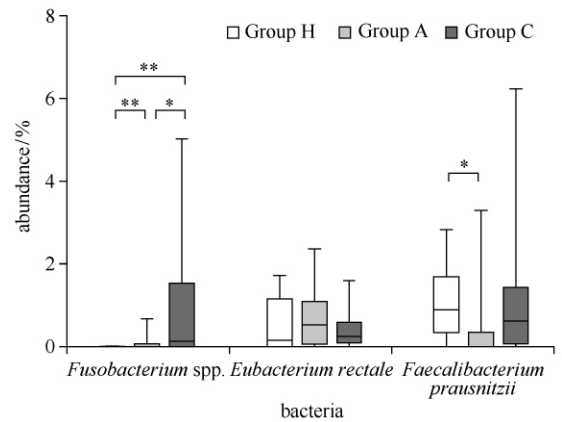


图1. 健康样品、结直肠腺瘤样品和结直肠癌样品中目标菌群的相对丰度

Figure 1. The relative abundance of 16S rRNA gene of the target bacteria in healthy subjects (H), colorectal adenomas subjects (A) and colorectal cancer subjects (C). The value was calculated for each individual, and the median was determined for each subject group. A nonparametric Mann-Whitney U test was used for pairwise comparison of the subject groups. H represents healthy people; A represents colorectal adenomas patients; C represents colorectal cancer patients; The median and error bar are plotted. The highest and lowest points of the error bar represent maximum and minimum respectively. Different asterisks (*) indicate significant differences (*, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$).

的作用^[9, 11-12, 29]。而肿瘤发展过程中引起的微环境改变可能会导致某种条件致病菌在肠道中的过量富集^[9]和益生菌丰度的降低^[10]。

本研究对结直肠癌患者及结直肠腺瘤患者粪便中的梭杆菌属、产丁酸菌和总菌进行定量分析, 发现结直肠腺瘤患者的总菌数量明显低于健康人(表

3) ;梭杆菌属的丰度在健康人、结直肠腺瘤患者、结直肠癌患者的粪便样品中呈逐渐增高的趋势(图1),且在结直肠癌形成前期的结直肠腺瘤组其丰度已经显著高于健康组,在结直肠癌组中其丰度又显著高于结直肠腺瘤组;相反,主要的产丁酸菌普拉梭菌的丰度在结直肠腺瘤样品中显著低于健康人(图1)。研究结果提示,在结直肠癌发展的初级阶段即结直肠腺瘤阶段,肠道菌群数量和结构已经发生了变化。这种变化可能引起肠道微生态的失衡,导致病原菌或肠道条件致病菌的侵入,进而促发肠粘膜炎症反应^[30-31]。梭杆菌属作为一种与结直肠癌发病密切相关的肠道微生物近年来引起了广泛的重视^[9,12,14]。本研究结果与 Aleksandar^[9] 和 Amber^[14] 的研究结果类似,他们发现结直肠癌和结直肠腺瘤患者肠粘膜组织中梭杆菌属丰度明显增加。Mauro Castellarin 等通过免疫荧光技术发现梭杆菌属的 *Fusobacterium nucleatum* 对于结肠癌细胞系 Caco-2 具有侵袭性^[12]; Aleksandar 等证实喂食 *F. nucleatum* 的 Apc^{Min/+} 小鼠可促进其结肠肿瘤的发生,这与 *F. nucleatum* 可刺激增加 CD11b⁺ 髓样细胞(促进肿瘤发展和血管形成)数量,以及促进 *Ptgs2*, *Scyb1*, *Il6*, *Tnf*, *Mmp* 等促炎因子的表达有关。然而这些促炎因子都属于 NF- κ B 信号通路,是粘膜上皮细胞炎症和癌变的中心环节^[32]。以上研究结果提示,梭杆菌属在结直肠腺瘤和结直肠癌患者肠道中的逐渐富集,对结直肠癌的发生发展可能起到了促进作用。

本研究的另一主要发现,产丁酸菌普拉梭菌丰度在结直肠腺瘤样品中显著低于健康人(图1)。普拉梭菌具有抗炎的功效,这与促进 IL-10 分泌和抑制 TNF- α -IL-12 分泌有关^[33]。研究表明结直肠癌的发生发展与炎症相关^[29],结直肠腺瘤样品中普拉梭菌数量及丰度的减少将不利于炎症的缓解。赵立平课题组通过焦磷酸测序及丁酰-C₀A 转移酶基因的定量研究也观察到产丁酸菌在结直肠癌患者肠道菌群中的丰度降低^[10]。产丁酸菌的减少有可能增加条件致病菌的侵入进而导致肠道菌群紊乱、促成结直肠癌的发生发展。Daniel Scharlau 总结了丁酸在结肠癌发展过程中可能起到的作用,即丁酸可降低正常肠道上皮细胞的基因突变,从而降低癌症发生的风险;丁酸还能抑制结肠癌细胞的生长并诱导其凋亡^[18]。因此产丁酸菌普拉梭菌的减少有可能

诱发结直肠癌的发生发展。

本研究中,作为另一种肠道内的主要产丁酸菌,直肠真杆菌的丰度在3组中没有明显差异。研究提示直肠真杆菌的丰度水平容易受饮食的影响^[20-21]。这也许与选取人群的饮食习惯相关,具体机制值得进一步探讨。

综上所述,本研究建立了粪便样品梭杆菌属及两种产丁酸菌的实时荧光定量 PCR 检测技术,发现梭杆菌属的丰度在结直肠癌和结直肠腺瘤患者肠道中显著增加,普拉梭菌丰度在结直肠腺瘤患者肠道中显著下降;提示肠道菌群的改变可能与结直肠癌发生发展密切相关。进一步建立并完善梭杆菌属及产丁酸菌快速高效的分子学检测方法,有可能用于结直肠癌的早期诊断。

参考文献

- [1] Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 2011, 61 (2): 69-90.
- [2] Dai Z, Zheng RS, Zou XN, Zhang SW, Zeng HM, Li N, Chen WQ. Analysis and prediction of colorectal cancer incidence trend in China. *Chinese Journal of Preventive Medicine*, 2012, 46 (7): 598-603. (in Chinese)
代珍, 郑荣寿, 邹小农, 张思维, 曾红梅, 李霓, 陈万青. 中国结直肠癌发病趋势分析和预测. *中华预防医学杂志*, 2012, 46 (7): 598-603.
- [3] Carroll C, Cooper K, Papaioannou, Hind D, Pilgrim H, Tappenden P. Supplemental calcium in the chemoprevention of colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Clinical Therapeutics*, 2010, 32 (5): 789-803.
- [4] Ullman TA, Itzkowitz SH. Intestinal Inflammation and Cancer. *Gastroenterology*, 2011, 140: 1807-1816.
- [5] Leslie A, Carey FA, Pratt NR, Steele RJC. The colorectal adenoma-carcinoma sequence. *British Journal of Surgery*, 2002, 89: 845-860.
- [6] Hoff G, Sauar J, Vatn MH, Larsen S, Langmark F, Moen IE, Foerster A, Thiis-Evensen E. Polypectomy of adenomas in the prevention of colorectal cancer: 10 years' follow-up of the Telemark Polyp Study I. A prospective, controlled population study. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 1996, 31 (10): 1006-1010.
- [7] Gill SR, Pop M, DeBoy RT, Eckburg PB, Turnbaugh PJ, Samuel BS, Gordon JI, Relman DA, Fraser-Liggett CM, Nelson KE. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science*, 2006, 312 (5778): 1355-1359.
- [8] Sekirov I, Russell SL, Antunes LCM, Finlay BR. Gut

- Microbiota in Health and Disease. *Physiological Review*, 2010, 90: 859-904.
- [9] Kostic AD, Gevers D, Pedamallu CS, Michaud M, Duke F, Earl AM, Ojesina AI, Jung J, Bass AJ, Taberero J, Baselga J, Liu C, Shivdasani RA, Ogino S, Birren BW, Huttenhower C, Garrett WS, Meyerson M. Genomic analysis identifies association of *Fusobacterium* with colorectal carcinoma. *Genome Research*, 2012, 22 (2): 292-298.
- [10] Wang TT, Cai GX, Qiu YP, Fei N, Zhang MH, Pang XY, Jia W, Cai SJ, Zhao LP. Structure segregation of gut microbiota between colorectal cancer patients and healthy volunteers. *The ISME Journal*, 2012, 6: 320-329.
- [11] Sobhani I, Tap J, Roudot-Thoraval F, Roperch JP, Letulle S, Langella P, Corthier G, Nhieu JTV, Furet JP. Microbial Dysbiosis in Colorectal Cancer (CRC) Patients. *PLoS One*, 2011, 6 (1): e16393.
- [12] Castellarin M, Warren RL, Freeman JD, Dreolini L, Krzywinski M, Strauss J, Barnes R, Watson P, Allen-Vercoe E, Moore RA, Holt RA. *Fusobacterium nucleatum* infection is prevalent in human colorectal carcinoma. *Genome Research*, 2012, 22 (2): 299-306.
- [13] Goldberg EA, Venket-Ramani T, Hewit M, Bonilla HF. Epidemiology and clinical outcomes of patients with *Fusobacterium* bacteraemia. *Epidemiology and Infection*, 2013, 141: 325-329.
- [14] McCoy AN, Araujo-Perez F, Azcarate-Peril A, Yeh JJ, Sandler RS, Keku TO. *Fusobacterium* Is Associated with Colorectal Adenomas. *PLoS One*, 2013, 8 (1): e53653.
- [15] Balamurugan R, Rajendiran E, George S, Samuel GV, Ramakrishna BS. Real-time polymerase chain reaction quantification of specific butyrate-producing bacteria, *Desulfovibrio* and *Enterococcus faecalis* in the feces of patients with colorectal cancer. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2008, 23: 1298-1303.
- [16] Tremaroli V, Backhed F. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature*, 2012, 489 (7415): 242-249.
- [17] Maslowski KM, Vieira AT, Ng A, Kranich J, Sierro F, Yu D, Schilter HC, Rolph MS, Mackay F, Artis D, Xavier RJ, Teixeira MM, Mackay CR. Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. *Nature*, 2009, 461 (7268): 1282-1286.
- [18] Scharlau D, Borowicki A, Habermann N, Hofmann T, Klenow S, Miene C, Munjal U, Stein K, Gleit M. Mechanisms of primary cancer prevention by butyrate and other products formed during gut flora-mediated fermentation of dietary fibre. *Mutation Research*, 2009, 682 (1): 39-53.
- [19] Duncan SH, Louis P, Flint HJ. Lactate-Utilizing Bacteria, Isolated from Human Feces, That Produce Butyrate as a Major Fermentation Product. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70 (10): 5810-5817.
- [20] Brüssow H. Microbiota and healthy ageing: observational and nutritional intervention studies. *Microbial Biotechnology*, 2013, 6 (4): 1-9.
- [21] McLaughlin SD, Culkun A, Cole J, Clark SK, Tekkis PP, Ciclitira PJ, Nicholls RJ, Whelan K. Exclusive elemental diet impacts on the gastrointestinal microbiota and improves symptoms in patients with chronic pouchitis. *Journal of Crohn's and Colitis*, 2013, 7: 460-466.
- [22] Fujimoto T, Imaeda H, Takahashi K, Kasumi E, Bamba S, Fujiyama Y, Andoh A. Decreased abundance of *Faecalibacterium prausnitzii* in the gut microbiota of Crohn's disease. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2013, 28: 613-619.
- [23] Rinttilä T, Kassinen A, Malinen E, Krogius L, Palva A. Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR. *Journal of Applied Microbiology*, 2004, 97 (6): 1166-1177.
- [24] Balamurugan R, Janardhan HP, George S, Raghava MV, Muliyl J, Ramakrishna BS. Molecular Studies of Fecal Anaerobic Commensal Bacteria in Acute Diarrhea in Children. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 2008, 46: 514-519.
- [25] Nadkarni MA, Martin FE, Jacques NA, Hunter N. Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. *Microbiology*, 2002, 148: 257-266.
- [26] Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JL. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*, 2006, 444 (7122): 1027-1031.
- [27] Grivennikov SI. Inflammation and colorectal cancer: colitis-associated neoplasia. *Seminars in Immunopathology*, 2013, 35 (2): 229-244.
- [28] Qin J, Li YR, Cai ZM, Li SH, Zhu JF, Zhang F, Liang SS, Zhang WW, Guan YL, Shen DQ, Peng YQ, Zhang DY, Jie ZY, Wu WX, Qin YW, Xue WB, Li JH, Han LC, Lu DH, Wu PX, Dai YL, Sun XJ, Li ZS, Tang AF, Zhong SL, Li XP, Chen WN, Xu R, Wang MB, Feng Q, Gong MH, Yu J, Zhang YY, Zhang M, Hansen T, Sanchez G, Raes J, Falon G, Okuda S, Almeida M, LeChatelier E, Renault P, Pons N, Batto JM, Zhang ZX, Chen H, Yang RF, Zheng WM, Li SG, Yang HM, Wang J, Ehrlich SD, Nielsen R, Pedersen O, Kristiansen K, Wang J. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature*, 2012, 490 (7418): 55-60.
- [29] Yang LY, Pei ZH. Bacteria, inflammation, and colon cancer. *World Journal of Gastroenterology*, 2006, 12

(42) :6741-6746.

- [30] Round JL, Mazmanian SK. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nature Reviews Immunology*, 2009, 9 (5) :313-323.
- [31] DuPont AW, DuPont HL. The intestinal microbiota and chronic disorders of the gut. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 2011, 8 :523-531.
- [32] Kostic AD, Chun EY, Robertson L, Glickman JN, Gallini CA, Michaud M, Clancy TE, Chung DC, Lochhead P, Hold GL, El-Omar EM, Brenner D, Fuchs CS, Meyerson M, Garrett WS. *Fusobacterium nucleatum* Potentiates Intestinal Tumorigenesis and Modulates the Tumor-Immune Microenvironment. *Cell Host & Microbe*, 2013, 14 :207-215.
- [33] Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, Lakhdari O, Bermudez-Humaran LG, Gratadoux JJ, Blugeon S, Bridonneau C, Furet JP, Corthier G, Grangette C, Vasquez N, Pochart P, Trugnan G, Thomas G, Blottiere HM, Dore J, Marteau P, Seksik P, Langella P. *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proceedings of the National Academy of the Sciences of the United States of America*, 2008, 105 (43) :16731-16736.

Quantitation of intestinal *Fusobacterium* and butyrate-producing bacteria in patients with colorectal adenomas and colorectal cancer

Huifang Miao^{1,2}, Na Wu³, Chunguang Luan², Xi Yang², Ruifen Zhang², Na Lv², Baoli Zhu*

¹The department of Life Sciences, Anhui University, Hefei 230039, Anhui Province, China

²Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

³Beijing University People's Hospital, Beijing 100044, China

Abstract: [Objective] To compare the abundance of 16S rRNA gene of intestinal *Fusobacterium* and butyrate-producing bacteria in patients with colorectal adenomas patients and colorectal cancer and to reveal the correlation between the target bacteria and the development of colorectal cancer. [Methods] Feces were collected from colorectal cancer patients (n = 19), colorectal adenomas patients (n = 12) and healthy subjects (n = 19). Bacteria genome DNA from the fecal samples was used to quantitate the *Fusobacterium*, two butyrate-producing bacteria *Eubacterium rectal*, *Faecalibacterium prausnitzii* and total bacteria by real-time polymerase chain reaction. Then the variation of the target bacteria among different groups were assayed using Mann-Whitney U test. [Results] The abundance of *Fusobacterium* was significantly higher in colorectal cancer patients than that in healthy subjects ($P = 0.000$) and colorectal adenomas patients ($P = 0.013$), and it was significantly higher in colorectal cancer patients than that in colorectal adenomas patients ($P = 0.002$). *F. prausnitzii* was significantly lower in colorectal adenomas patients compared to healthy subjects ($P = 0.033$). The total bacteria count was significantly lower in the colorectal adenomas samples than that in the healthy samples ($P = 0.002$). There was no significantly difference of *E. rectal* between the three groups. [Conclusions] The shifts in the colonic bacterial population may potentially contribute to the development of colorectal cancer.

Keywords: colorectal cancer, colorectal adenomas, *Fusobacterium*, butyrate-producing bacteria, real-time PCR

(本文责编:张晓丽)

* Corresponding author. Tel: +86-40-64807362; E-mail: zhubaoli@im.ac.cn

Received: 3 January 2014/Revised: 7 March 2014