

RT-PCR技术定量检测新疆溃疡性结肠炎患者肠道菌群的变化

蒋曼, 高鸿亮, 姚萍

■背景资料

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC) 在我国的发病率呈逐年增长趋势, 病因和发病机制尚不明确。目前认为, UC的发病涉及遗传、环境、肠道菌群失调和免疫异常等多种因素, 而肠道菌群失调可能是该病发病的触发点, 也是近年来消化领域的研究热点。

蒋曼, 高鸿亮, 姚萍, 新疆医科大学第一附属医院 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830054

蒋曼, 硕士, 主要从事肠道菌群与溃疡性结肠炎相关性的研究。
作者贡献分布: 方法研究、数据整理、统计分析及文章起草由蒋曼完成; 设计、论文修改及审阅由姚萍与高鸿亮完成。

通讯作者: 姚萍, 教授, 主任医师, 830054, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市新市区鲤鱼山南路137号, 新疆医科大学第一附属医院消化科。pingyaozh@sina.com

收稿日期: 2013-11-27 修回日期: 2013-12-11

接受日期: 2013-12-15 在线出版日期: 2014-02-08

Quantification of intestinal microflora in ulcerative colitis patients using real-time PCR

Man Jiang, Hong-Liang Gao, Ping Yao

Man Jiang, Hong-Liang Gao, Ping Yao, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Correspondence to: Ping Yao, Professor, Chief Physician, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, 137 Liyushan South Road, Xinshe District, Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China. pingyaozh@sina.com

Received: 2013-11-27 Revised: 2013-12-11

Accepted: 2013-12-15 Published online: 2014-02-08

Abstract

AIM: To analyze the variation of intestinal microflora in patients with ulcerative colitis in Xinjiang by real-time fluorescence quantitative PCR to reveal the role and significance of intestinal microflora in the pathogenesis of ulcerative colitis.

METHODS: Specific primers for 16s rDNA of *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Clostridium*, *Bifidobacterium* spp and *Faecalibacterium prausnitzii* were designed. The feces of ulcerative colitis patients and normal controls in Xinjiang were collected. Bacterial genomic DNA was extracted from fecal samples and used to quantify the above five bacteria by real-time fluorescence quantitative PCR.

RESULTS: The level of *Bacteroides* in ulcerative colitis patients was significantly higher than that

in healthy controls (3.05 ± 0.22 vs 2.81 ± 0.21 , $P < 0.05$), whereas those of *Clostridium* (3.14 ± 0.17 vs 3.35 ± 0.12), *Bifidobacterium* spp (2.92 ± 0.16 vs 3.20 ± 0.13) and *Faecalibacterium prausnitzii* (2.77 ± 0.16 vs 2.95 ± 0.19) were significantly lower in ulcerative colitis patients than in healthy controls ($P < 0.05$ for all). The level of *Fusobacterium* showed no significant difference (3.20 ± 0.13 vs 3.15 ± 0.17 , $P > 0.05$) between the two groups.

CONCLUSION: The changes in the levels of *Bacteroides*, *Clostridium*, *Bifidobacterium* spp and *Faecalibacterium prausnitzii* may be associated with the pathogenesis of UC.

© 2014 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

Key Words: Ulcerative colitis; Intestinal microflora; Real-time fluorescence quantitative PCR

Jiang M, Gao HL, Yao P. Quantification of intestinal microflora in ulcerative colitis patients using real-time PCR. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(4): 596-600
URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/596.asp>
DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i4.596>

摘要

目的: 应用SYBR Green I 实时荧光定量PCR法分析新疆溃疡性结肠炎患者肠道菌群的变化, 探讨肠道菌群在溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)发病中的作用及意义。

方法: 根据细菌的16s DNA基因序列设计拟杆菌属、梭杆菌属、梭菌属、双歧杆菌属及柔嫩梭菌属的特异性引物。收集新疆溃疡性结肠炎患者及正常对照者粪便, 提取细菌基因组DNA, 应用SYBR Green I 实时荧光定量PCR反应测定5种细菌的数量。

结果: UC患者组拟杆菌属的数量(3.05 ± 0.22)较正常对照(2.81 ± 0.21)明显增多; 梭菌属(3.14 ± 0.17)、双歧杆菌属(2.92 ± 0.16)、柔嫩梭菌属(2.77 ± 0.16)的数量较正常对照(3.35 ± 0.12 , 3.08 ± 0.14 , 2.95 ± 0.19)的数量明显减少,

■同行评议者

江学良, 教授, 主任医师, 中国人民解放军济南军区总医院消化科

差异有统计学意义($P<0.05$), 梭杆菌属在两组间差异无统计学意义($P>0.05$).

结论: 拟杆菌属、梭菌属、双歧杆菌属及柔嫩梭菌属数量的改变可能与新疆UC的发病相关.

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有.

关键词: 溃疡性结肠炎; 肠道菌群; 实时荧光定量PCR

核心提示: 本文研究发现与正常对照相比, 溃疡性结肠炎患者粪便菌群中拟杆菌属的数量明显增多, 而梭菌属、双歧杆菌属、柔嫩梭菌属的数量明显减少, 提示溃疡性结肠炎患者的肠道菌群发生了改变, 可能与其发病相关. 本研究结果为探索溃疡性结肠炎的病因及发病机制提供了一定的线索.

蒋曼, 高鸿亮, 姚萍. RT-PCR技术定量检测新疆溃疡性结肠炎患者肠道菌群的变化. 世界华人消化杂志 2014; 22(4): 596-600 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/596.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i4.596>

0 引言

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是一种病因不明的直肠和结肠的慢性非特异性炎症性疾病. 病变局限在大肠黏膜及黏膜下层, 以溃疡为主, 多累及直肠和远端结肠. 临床主要表现为腹痛、腹泻、黏液脓血便, 病程迁延, 轻重不等且容易复发. 目前大多研究认为UC的发病涉及遗传、环境、肠道菌群失调和免疫异常等多种因素, 而肠道菌群失调可能是该病发病的触发点^[1-3], 因此肠道菌群与UC之间的关系成为近年来消化领域的研究热点, 但肠道菌群失调对于UC的发病机制究竟有何意义尚不完全清楚. 有研究发现不同地区的UC发病率不相同, 可能与患者的居住地理环境、生活水平及饮食习惯相关^[4,5], 因此, 本研究尝试通过实时荧光定量PCR技术对新疆地区UC患者及其正常对照者粪便中拟杆菌属、梭杆菌属、梭菌属、双歧杆菌属及柔嫩梭菌属进行定量, 探讨肠道菌群与UC的相关性.

1 材料和方法

1.1 材料 粪便标本取自新疆医科大学第一附属医院消化科及体检中心, 正常对照者30例, 男14例, 女16例, 平均36.67岁±11.64岁, 无消化道慢性病史, 常规体检及粪便常规检查均未见异常. UC患者30例, 男14例, 女16例, 平均38.33岁

表1 入选溃疡性结肠炎患者及对照组临床特征

临床特征	病例组	对照组
性别(男/女)	14/16	14/16
年龄(mean ± SD, 岁)	38.33 ± 10.04	36.67 ± 11.64
临床分期		
活动期	18	—
缓解期	12	—
病变范围		
全结肠型	3	—
直肠型	8	—
左半结肠型	4	—
广泛结肠型	3	—
直肠乙状结肠型	12	—
用药情况		
水杨酸类药物	6	—
糖皮质激素	0	—
抗生素	0	—
未用任何药物	24	—

±10.04岁, 经结肠镜及病理组织学检查, 均符合2007年《对我国炎症性肠病诊断治疗规范的共识意见》的诊断标准^[6]. 所有研究对象均为长期居住在新疆的患者(居住年限>10年). 所有研究对象留取粪便标本前4 wk内均未应用抗生素或微生态制剂. 所选取的两组基线资料比较差异均无统计学意义($P>0.05$)(表1). 主要仪器及试剂: QIAamp DNA Stool MinKit试剂盒(德国Qiagen公司)、实时定量PCR试剂盒(德国Qiagen公司)、荧光定量PCR仪(iCycler Iq5)、琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒(离心柱型)(北京天根)、-80 °C超低温冰箱、电泳仪及凝胶成像分析系统等, 所用引物均参照GenBank提供的序列, 由上海生物工程公司合成.

1.2 方法

1.2.1 粪便标本采集及DNA提取: 所用研究标本均于排便后迅速收集于无菌培养皿内, 并迅速置于-80 °C超低温冰箱内保存. 称取0.2 g粪便按照QIAamp DNA Stool MinKit试剂盒操作说明提取粪便细菌基因组DNA, -20 °C保存.

1.2.2 常规PCR反应: 反应体系为20 μL: 2×Taq PCR Master Mix 10 μL, 上、下游引物各0.5 μL(表2), ddH₂O 7 μL, DNA模板2 μL; 反应条件: 95 °C预变性3 min; 95 °C变性30 s; 拟杆菌属62.8 °C、梭杆菌属50.8 °C、梭菌属51.2 °C、双歧杆菌属55 °C、柔嫩梭菌属57 °C退火30 s, 72 °C延伸1 min, 循环35次, 72 °C复性5 min, 4 °C保存. 取PCR反应产物10 μL与2 μL Loading Buf-

■ 创新盘点

研究显示新疆地区UC患者与健康对照者粪便菌群存在显著的差异, UC患者拟杆菌属的数量较正常对照明显增多, 梭菌属、双歧杆菌属及柔嫩梭菌属较正常对照明显减少, 提示UC患者肠道发生了微生物生态失衡, 肠道菌群与UC的发病密切相关.

■同行评价
本文具有一定指导意义。

表 2 16s rDNA基因PCR扩增引物序列

PCR模板	扩增片段长度(bp)	引物序列(5'-3')
拟杆菌属	200	F: 5'-CTGAACCAGCCAAGTAGCG-3' R: 5'-CCGCAAACCTTCACAACTGACTTA-3'
梭杆菌属	100	F: 5'-CGCAGAAGGTGAAAGTCCTGTAT-3' R: 5'-TGGTCCTCACTGATTACACAGA-3'
梭菌属	200	F: 5'-TGAAAGATGGCATCATCATTCAAC-3' R: 5'-GGTAACGTCATTATCTTCCCCAAA-3'
双歧杆菌属	243	F: 5'-TCGCGTC(C/T)GGTGTGAAAG-3' R: 5'-CCACATCCAGC(A/G)TCCAC-3'
柔嫩梭菌属	158	F: 5'-CCCTTCAGTGCCGCAGT-3' R: 5'-GTCGCAGGATGTCAAGAC-3'

表 3 粪便的细菌定量结果($\lg x \pm \lg x$ 拷贝数/克湿便)

分组	拟杆菌属	梭杆菌属	梭菌属	双歧杆菌属	柔嫩梭菌属
UC组	3.05 ± 0.22	3.20 ± 0.13	3.14 ± 0.17	2.92 ± 0.16	2.77 ± 0.16
正常组	2.81 ± 0.21	3.15 ± 0.17	3.35 ± 0.12	3.08 ± 0.14	2.95 ± 0.19
P值	0.001	0.17	0.001	0.001	0.001

UC: 溃疡性结肠炎。

fer混匀上样, 在2.0%琼脂糖凝胶中进行电泳, 电压120 V, 时间30 min, 电泳结束后用凝胶成像仪分析系统摄像。

1.2.3 实时荧光定量RT-PCR检测: (1)标准曲线的建立: 采用实时荧光定量RT-PCR方法, 反应体系20 μ L: 荧光染料10 μ L, 模板2 μ L, 上、下游引物各0.5 μ L(表2), ddH₂O 7 μ L, 以正常组中DNA样本为模板, 常规PCR引物扩增16s rDNA靶片段, 将PCR产物纯化后作为DNA标准品, 进行梯度稀释(浓度为 10^2 - 10^7 copies/ μ L)作为模板加入反应体系中。按照操作说明在荧光定量PCR仪Bio-rad IQ5 System中进行实时荧光定量RT-PCR反应。反应条件: 95 $^{\circ}$ C预变性3 min 95 $^{\circ}$ C变性10 s, T $^{\circ}$ C(拟杆菌属62.8 $^{\circ}$ C、梭杆菌属50.8 $^{\circ}$ C、梭菌属51.2 $^{\circ}$ C、双歧杆菌属55 $^{\circ}$ C、柔嫩梭菌属57 $^{\circ}$ C)退火30 s, 65 $^{\circ}$ C延伸10 s, 读取定量荧光数据, 共40个循环; 反应进行融解曲线分析, 并读取融解曲线荧光数据。根据读取的荧光数据, 由系统软件自动分析循环阈值(cycle threshold, Ct), 并生成标准曲线; (2)待测粪便样品定量分析: 提取所有研究标本粪便DNA分别进行5种细菌的SRBR Green I 实时荧光定量PCR反应, 反应体系及反应条件与标准品制备时相同。每次实验同时设标准品校正和ddH₂O为DNA模板的阴性对照, 所有样品均同

时做2个平行复孔。反应完毕后根据融解曲线分析PCR产物的特异性, 并由Ligyt Cyclor PCR仪分析定量结果。

统计学处理 应用SPSS17.0统计软件进行数据整理和统计分析, 样品定量数据经对数转换后以 $\lg x \pm \lg x$ 表示, 采用两样本t检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 引物特异性鉴定 用2.0%琼脂糖凝胶电泳分析正常对照粪便标本的16s rDNA常规PCR产物, 以100 bp DNA Ladder为标准。可见PCR产物均显示出特异性条带, 未见明显非特异扩增区带, 提示各细菌的引物特异性较好, 可用于实时荧光定量PCR反应(图1, 2)。

2.2 粪便细菌的定量检测 每份粪便标本所含的5种细菌的拷贝数可通过Ct值与标准曲线比较得到, 实时荧光定量PCR仪通过系统内置的软件iCycler Optical System Interface software处理后直接给出定量结果。溃疡性结肠炎患者粪便中拟杆菌属的数量较正常对照明显增多($P < 0.05$), 而梭菌属、双歧杆菌属及柔嫩梭菌属的数量均较正常对照明显减少($P < 0.05$), 梭杆菌属的数量在两组之间的差异无统计学意义($P > 0.05$)(表3)。

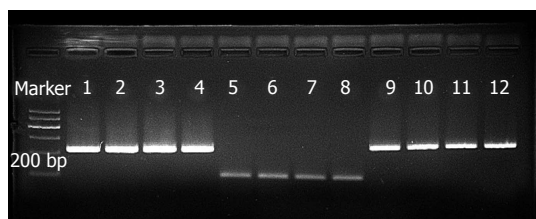


图1 拟杆菌属、梭杆菌属及梭菌属常规PCR反应结果. Marker: 从下到上100、200、300、400、500 bp; 1-4: 拟杆菌属(200 bp); 5-8: 梭杆菌属(100 bp); 9-12: 梭菌属(200 bp).

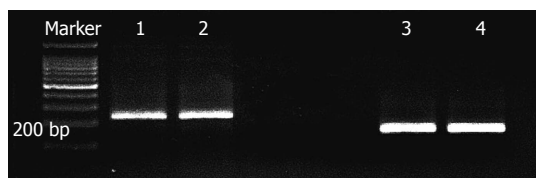


图2 双歧杆菌属及柔嫩梭菌属常规PCR反应结果. Marker: 从下到上100、200、300、400、500 bp; 1, 2: 双歧杆菌属(243 bp); 3, 4: 柔嫩梭菌属(158 bp).

3 讨论

近年来, 随着社会的不断发展, 人们生活水平的提高, UC的发病率在国内外都有逐渐增高趋势^[4,7-10], UC的病程长短不一, 且易反复发作, 严重影响人们的生活质量. 目前UC的病因和发病机制尚不十分明确, 多数研究认为免疫调节是其关键直接发病机制, 肠道菌群是这种免疫损伤过程的重要激发因素, 因此人们越来越关注肠腔内细菌与UC的关系. 肠道细菌的详细组成到目前为止尚未完全明确, 粪便标本常用于研究结肠菌群, 主要代表远端结肠的腔内环境^[11]. 对粪便标本进行肠道细菌培养只能对10%-40%的肠道细菌进行鉴别, 仍有部分细菌不能通过培养获得^[12,13]. 随着现代分子生物学理论和技术的迅速发展, 出现了许多非培养依赖的新方法用以检测肠道细菌, 实时荧光定量PCR技术就是其中的一种, 应用于肠道微生物研究, 具有灵敏度高、特异性强、定量准确等优点^[14].

研究发现不同地区UC的发病率不同, Priden等^[5]研究发现UC发病率和患病率在亚洲国家比西方国家低, 但近年来UC在亚洲国家的发病率及患病率迅速增加, 可能与亚洲国家加强与西方国家的联系, 西方化的饮食, 抗生素的滥用, 卫生条件的改善, 预防接种及肠道微生物菌群的改变相关. UC的发病率在西班牙的纳瓦拉较高^[15], 但在乌拉圭的一些地区却较低^[16], 这可能与患者居住的环境、卫生条件、生活水平、饮食习惯等相关. 新疆拥有独特的地理环境, 在

这里长期居住的居民所处的环境、生活习惯及饮食习惯都与中国其他地区不尽相同, 因此本研究尝试应用SYBR Green I 实时荧光定量PCR法定量检测新疆地区UC患者及正常对照者粪便中拟杆菌属、梭杆菌属、梭菌属、双歧杆菌属及柔嫩梭菌属的数量, 结果显示溃疡性结肠炎患者粪便中拟杆菌的数量较正常对照明显增多, 而梭菌属、双歧杆菌属、柔嫩梭菌属的数量较正常对照明显减少, 梭杆菌的数量在两组之间的差异没有统计学意义, 提示肠道菌群数量的改变可能与UC的发病有关. Machiels等^[17]研究也发现UC患者肠道菌群的组成与健康对照者存在明显的差异, 同属于厚壁菌门的能够产生丁酸盐的罗氏菌属及柔嫩梭菌属在UC患者中均减少. Rajilić-Stojanović等^[18]应用基因芯片技术分析溃疡性结肠炎患者与健康对照者粪便菌群发现UC患者粪便菌群中梭菌群IV及参与丁酸盐及丙酸盐代谢菌群数量减少, 而艰难梭状芽孢杆菌、弯曲杆菌、幽门螺杆菌、消化链球菌等机会致病菌增加, 提示UC患者肠道菌群生态失衡, 可能与其发病相关. 我国白鹏等^[19]研究发现UC活动期患者粪便双歧杆菌、乳酸杆菌数量较正常对照明显减少, 而UC缓解期患者粪便菌群与正常对照无明显差异. 提示肠道菌群失调可能是具有UC遗传易感性个体发病的触发因素. 但我国张静等^[20]应用ETIC-PCR技术研究UC和其他肠道疾病的肠道菌群发现UC可能存在较单一的肠道优势菌群, 推测其发病机制可能与特定的优势细菌感染有关. 但是目前并没有发现UC的特异性致病菌, 大多研究都支持生态失衡假说^[21,22], 即UC的发病可能是由肠道微生态发生紊乱引起的, 而不是由某一特定细菌引起的. 但是肠道微生态系统是一个庞大而复杂的系统, 其与UC发病的具体机制还有待进一步更明确的研究.

总之, 我们的研究显示新疆地区UC患者与健康对照者粪便菌群存在显著的差异, UC患者拟杆菌属的数量较正常对照明显增多, 梭菌属、双歧杆菌属及柔嫩梭菌属较正常对照明显减少, 提示UC患者肠道发生了微生态失衡, 肠道菌群与UC的发病密切相关. 由于研究方法不同或肠道微生态系统太复杂, 各项关于肠道菌群的研究结果不尽相同, 但目前仍无法阐明UC患者中的肠道菌群变化, 究竟是导致肠道炎症的原因还是结果, 因此肠道菌群与UC的相关性还有待更深入的研究.

4 参考文献

- 1 Gentschew L, Ferguson LR. Role of nutrition and microbiota in susceptibility to inflammatory bowel diseases. *Mol Nutr Food Res* 2012; 56: 524-535 [PMID: 22495981 DOI: 10.1002/mnfr.201100630]
- 2 Stephani J, Radulovic K, Niess JH. Gut microbiota, probiotics and inflammatory bowel disease. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2011; 59: 161-177 [PMID: 21445715 DOI: 10.1007/s00005-011-0122-5]
- 3 Khan MW, Kale AA, Bere P, Vajjala S, Gounaris E, Pakanati KC. Microbes, intestinal inflammation and probiotics. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2012; 6: 81-94 [PMID: 22149584 DOI: 10.1586/egh.11.94]
- 4 Molodecky NA, Soon IS, Rabi DM, Ghali WA, Ferris M, Chernoff G, Benchimol EI, Panaccione R, Ghosh S, Barkema HW, Kaplan GG. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology* 2012; 142: 46-54. e42; quiz e30 [PMID: 22001864 DOI: 10.1053/j.gastro.2011.10.001]
- 5 Prideaux L, Kamm MA, De Cruz PP, Chan FK, Ng SC. Inflammatory bowel disease in Asia: a systematic review. *J Gastroenterol Hepatol* 2012; 27: 1266-1280 [PMID: 22497584 DOI: 10.1111/j.1440-1746.2012.07150.x]
- 6 中华医学会消化病学分会炎症性肠病协作组, 欧阳钦, 胡品津, 钱家鸣, 郑家驹, 胡仁伟. 对我国炎症性肠病诊断治疗规范的共识意见(2007年, 济南). *中华消化杂志* 2007; 27: 545-550
- 7 Kappelman MD, Moore KR, Allen JK, Cook SF. Recent trends in the prevalence of Crohn's disease and ulcerative colitis in a commercially insured US population. *Dig Dis Sci* 2013; 58: 519-525 [PMID: 22926499 DOI: 10.1007/s10620-012-2371-5]
- 8 Hope B, Shahdadpuri R, Dunne C, Broderick AM, Grant T, Hamzawi M, O'Driscoll K, Quinn S, Hussey S, Bourke B. Rapid rise in incidence of Irish paediatric inflammatory bowel disease. *Arch Dis Child* 2012; 97: 590-594 [PMID: 22550323 DOI: 10.1136/archdischild-2011-300651]
- 9 中国炎症性肠病协作组, 王玉芳, 欧阳钦. 3100例溃疡性结肠炎住院病例回顾分析. *中华消化杂志* 2006; 26: 368-372
- 10 欧阳钦, Rakesh T, Kl G, 潘国宗, Km F, Claudio F, Sk L, 萧树东, 张虎, 梁红亮, 王玉芳. 亚太地区炎症性肠病处理共识意见(一). *胃肠病学* 2006; 11: 233-238
- 11 Hill MJ, Drasar BS. The normal colonic bacterial flora. *Gut* 1975; 16: 318-323 [PMID: 1093952]
- 12 Hugenholtz P, Goebel BM, Pace NR. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J Bacteriol* 1998; 180: 4765-4774 [PMID: 9733676]
- 13 Tannock GW. Molecular methods for exploring the intestinal ecosystem. *Br J Nutr* 2002; 87 Suppl 2: S199-S201 [PMID: 12088519 DOI: 10.1079/BJN-BJN/2002538]
- 14 Ott SJ, Musfeldt M, Ullmann U, Hampe J, Schreiber S. Quantification of intestinal bacterial populations by real-time PCR with a universal primer set and minor groove binder probes: a global approach to the enteric flora. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 2566-2572 [PMID: 15184435 DOI: 10.1128/JCM.42.6.2566-2572.2004]
- 15 Arin Letamendia A, Borda Celaya F, Burusco Pater-nain MJ, Prieto Martínez C, Martínez Echeverría A, Elizalde Apestegui I, Laiglesia Izquierdo M, Macias Mendizábal E, Tamburri Moso P, Sánchez Valverde F. [High incidence rates of inflammatory bowel disease in Navarra (Spain). Results of a prospective, population-based study]. *Gastroenterol Hepatol* 2008; 31: 111-116 [PMID: 18341841]
- 16 Buenavida G, Casañias A, Vázquez C, De Souza M, Martínez L, Gardil I, Silveira A, Iade B. Incidence of inflammatory bowel disease in five geographical areas of Uruguay in the biennial 2007-2008. *Acta Gastroenterol Latinoam* 2011; 41: 281-287 [PMID: 22292223]
- 17 Machiels K, Joossens M, Sabino J, De Preter V, Arijis I, Eeckhaut V, Ballet V, Claes K, Van Immerseel F, Verbeke K, Ferrante M, Verhaegen J, Rutgeerts P, Vermeire S. A decrease of the butyrate-producing species *Roseburia hominis* and *Faecalibacterium prausnitzii* defines dysbiosis in patients with ulcerative colitis. *Gut* 2013 Sep 10. [Epub ahead of print] [PMID: 24021287 DOI: 10.1136/gutjnl-2013-304833]
- 18 Rajilić-Stojanović M, Shanahan F, Guarner F, de Vos WM. Phylogenetic analysis of dysbiosis in ulcerative colitis during remission. *Inflamm Bowel Dis* 2013; 19: 481-488 [PMID: 23385241 DOI: 10.1097/MIB.0b013e31827fec6d]
- 19 白鹏, 吕愈敏, 顾芳. 细菌16SrDNA荧光定量PCR法分析溃疡性结肠炎患者肠道菌群变化. *胃肠病学和肝病杂志* 2008; 17: 566-571
- 20 张静, 韩英, 王继恒, 王志红. UC和其他肠道疾病肠道菌丛结构的ERIC-PCR指纹图谱分析. *胃肠病学和肝病杂志* 2007; 16: 430-433
- 21 Walker AW, Sanderson JD, Churcher C, Parkes GC, Hudspeth BN, Rayment N, Brostoff J, Parkhill J, Dougan G, Petrovska L. High-throughput clone library analysis of the mucosa-associated microbiota reveals dysbiosis and differences between inflamed and non-inflamed regions of the intestine in inflammatory bowel disease. *BMC Microbiol* 2011; 11: 7 [PMID: 21219646 DOI: 10.1186/1471-2180-11-7]
- 22 Takaishi H, Matsuki T, Nakazawa A, Takada T, Kado S, Asahara T, Kamada N, Sakuraba A, Yajima T, Higuchi H, Inoue N, Ogata H, Iwao Y, Nomoto K, Tanaka R, Hibi T. Imbalance in intestinal microflora constitution could be involved in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Int J Med Microbiol* 2008; 298: 463-472 [PMID: 17897884 DOI: 10.1016/j.ijmm.2007.07.016]

编辑 田滢 电编 闫晋利

