

宏基因组测序技术分析原发性肝癌患者肠道菌群特征

郑微¹ 赵鹏² 张永宏² 赵艳¹

【摘要】目的 宏基因组测序技术分析原发性肝癌患者肠道菌群的分布特征。**方法** 收集2019年3月~6月于首都医科大学附属北京佑安医院就诊的10例原发性肝癌患者(原发性肝癌组)和10例健康体检(健康对照组)者的粪便标本并记录一般资料。行宏基因组测序并根据测序获得的数据利用主成分分析和多样性分析方法分析两组菌群的结构并比较物种丰度差异。采用Spearman相关分析法分析副血链球菌、唾液链球菌、变形链球菌、嗜热链球菌、副流感嗜血杆菌、韦荣球菌、殊异韦荣球菌、艾克曼菌、嗜黏蛋白艾克曼菌、普雷沃菌、另枝菌的丰度与血清中丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、谷氨酰转氨酶(GGT)、总蛋白、总胆红素、甲胎蛋白(AFP)水平间的相关性。**结果** 基于bray、jsd距离衡量的Beta多样性分析显示,原发性肝癌组患者粪便菌群多样性较健康对照组显著降低,差异有统计学意义($t = 5.402$ 、 $P < 0.001$, $t = 5.248$ 、 $P < 0.001$)。属水平方面丰度最高为拟杆菌属,其次为普雷沃菌属,相对丰度分别为[34.94 (11.76, 56.02)]%和[11.99 (1.29, 27.82)]%;物种水平方面丰度最高的分别为普通拟杆菌和普拉梭菌,相对丰度分别为[1.55 (0.63, 3.90)]%和[1.54 (0.53, 2.84)]%。在细菌分类学的种水平进行丰度比较,137种细菌在健康对照组和原发性肝癌组中的分布差异有统计学意义($P < 0.05$),原发性肝癌组患者副血链球菌、唾液链球菌、变形链球菌、嗜热链球菌、副流感嗜血杆菌、韦荣球菌、殊异韦荣球菌丰度显著增加($P < 0.05$),而艾克曼菌、嗜黏蛋白艾克曼菌、普雷沃菌、另枝菌丰度显著降低($P < 0.05$)。相关性分析发现唾液链球菌($r = 0.733$ 、 $P = 0.020$)、嗜热链球菌($r = 0.867$ 、 $P = 0.002$)、副流感嗜血杆菌($r = 0.721$ 、 $P = 0.023$)与血清ALT水平呈显著正相关;嗜黏蛋白艾克曼菌与AST($r = 0.646$ 、 $P = 0.049$)、GGT($r = 0.762$ 、 $P = 0.037$)、总蛋白($r = -0.788$ 、 $P = 0.010$)有显著相关性。**结论** 原发性肝癌患者的肠道菌群多样性显著降低,物种丰度发生改变,存在显著的肠道菌群失衡,肠道菌群中特定差异的细菌种类可能作为一种生物标志物用于原发性肝癌的早期诊断。

【关键词】 肝细胞癌; 肠道菌群; 宏基因组

Metagenomic analysis on characteristics of intestinal flora of patients with primary liver cancer Zheng Wei¹, Zhao Peng², Zhang Yonghong², Zhao Yan¹. ¹Department of Clinical Laboratory Center, ²Interventional Therapy Center for Oncology, Beijing Youan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100069, China
Corresponding author: Zhao Yan, Email: zhaoyan@ccmu.edu.cn

【Abstract】Objective To investigate the distribution characteristics of intestinal flora of patients with primary liver cancer by metagenome sequencing. **Methods** Fecal samples of 10 patients with primary liver cancer (primary liver cancer group) and 10 healthy people (healthy control group) were collected from March to June 2019 in Beijing Youan Hospital, Capital Medical University and the general clinical information was recorded. According to the metagenome sequencing data, principal component analysis and diversity analysis were used to analyze the flora structure and species differences of the two groups of bacteria were

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2021.03.002

基金项目: 北京市医院管理局重点医学专业发展计划建设(No. ZYLX201711); 北京市医院管理局“登峰”人才培养计划(No. DFL20181701); 北京市自然科学基金(No. 7191004, No. 7202069); 北京市科学技术委员会(No. Z171100001017078); 首都卫生发展科研专项(No. 2020-2-1153, No. 2020-1-2182); 传染病相关疾病生物标志物北京市重点实验室(BZ0373)

作者单位: 100069 北京, 首都医科大学附属北京佑安医院临检中心¹、肿瘤介入治疗中心²

通信作者: 赵艳, Email: zhaoyan@ccmu.edu.cn

also compared. Spearman correlation analysis was used to analyze the correlation between the abundance of *Streptococcus parahaemolyticus*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus thermophilus*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Veillonella sp._DORA_A_3_16_22*, *Veillonella dispar*, *Akkermansia sp._CAG.344*, *Akkermansia muciniphila_CAG.154*, *Prevotella sp._CAG.924* and *Alistipes sp._CAG.268* and serum alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), glutamyl transpeptidase (GGT), total protein, total bilirubin and alpha fetoprotein (AFP). **Results** The analysis of beta diversity based on bray and jsd distance showed that the intestinal flora diversity of the two groups of subjects was statistically significant. The diversities of fecal flora in patients of primary liver cancer group were significantly lower than those of healthy control group, with significant differences ($t = 5.402, P < 0.001$; $t = 5.248, P < 0.001$). At genus level, the highest abundance was *Bacteroides*, followed by *Prevotella*, and the relative abundance were [34.94 (11.76, 56.02)]% and [11.99 (1.29, 27.82)]%, respectively; at species level, the highest abundance was *Bacteroides vulgatus* and *Faecalibacterium prausnitzii*, and the relative abundance were [1.55 (0.63, 3.90)]% and [1.54 (0.53, 2.84)]%, respectively. The abundance comparison at the species level of bacterial taxonomy showed that the distribution of 137 species in the healthy control group and the primary liver cancer group was statistically significant (all $P < 0.05$). In the primary liver cancer group, the abundance of *Streptococcus parasanguinis*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus thermophilus*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Veillonella sp._DORA_A_3_16_22* and *Veillonella dispar* were significantly increased, while the abundance of *Akkermansia sp._CAG.344*, *Akkermansia muciniphila_CAG.154*, *Prevotella sp._CAG.924* and *Alistipes sp._CAG.268* were significantly decreased. Correlation analysis found that *Streptococcus salivarius* ($r = 0.733, P = 0.020$), *Streptococcus thermophilus* ($r = 0.867, P = 0.002$) and *Haemophilus parainfluenzae* ($r = 0.721, P = 0.023$) were significantly and positively correlated with serum ALT level. *Akkermansia muciniphila* was significantly correlated with serum AST ($r = 0.646, P = 0.049$), GGT ($r = 0.762, P = 0.037$) and total protein ($r = -0.788, P = 0.010$). **Conclusions** The diversity of intestinal flora in patients with primary liver cancer was significantly decreased, and the species abundance changed. There was a significant imbalance of intestinal flora. Specific differences in intestinal flora may be used as biomarkers for the early diagnosis of primary liver cancer.

【Key words】 Hepatocellular carcinoma; Intestinal flora; Metagenome

原发性肝癌是目前我国第4位常见恶性肿瘤及第2位肿瘤致死病因,严重威胁我国人民的生命和健康^[1-3]。原发性肝癌主要包括肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)、肝内胆管癌(intrahepatic cholangiocarcinoma, ICC)和HCC-ICC混合型3种不同病理学类型,其中HCC占85%~90%,因此本研究中的“肝癌”指HCC。因肝癌患者早期临床症状不明显,故多数患者被诊断时多为进展期肝癌。因此,寻找到原发性肝癌的特异性标志物对肝癌的诊断有重要作用。肠道和肝脏均为人体营养吸收的重要器官,肠道菌群可通过“肠-肝轴”与肝脏相互作用,菌群失调和肠黏膜通透性增加会导致细菌及细菌成分异位,如脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)和DNA,统称为病原体相关分子模式(pathogen-associated molecular patterns, PAMPs)^[4]。PAMPs被肝脏Kupffer细胞和肝星状细胞上的免疫受体识别,启动并维持炎症级联反应,导致肝脏纤维化损伤,持续损伤最终转

变为肝癌^[4-5]。本研究以原发性肝癌患者为研究对象,以健康体检者为对照,应用宏基因组测序技术探索原发性肝癌患者肠道菌群的分布特征,现报道如下。

资料与方法

一、研究对象

以2019年3月~6月首都医科大学附属北京佑安医院收治的10例原发性肝癌患者(原发性肝癌组)和10例健康体检者(健康对照组)为研究对象。本研究经本院医学伦理委员会审批通过(批号:京佑科伦字[2019]097号)。

原发性肝癌确诊标准参照2019年更新的原发性肝癌诊疗规范^[6],健康体检者身体状况良好,无饮酒嗜好,性别、年龄与原发性肝癌患者相匹配。入选标准:①男性身体质量指数(body mass index, BMI)为20~30,女性BMI为19~34;②肝

功能、生化、肿瘤血清学指标检查以及影像学检查资料完备；③无自身免疫性疾病、无糖尿病史；④近8周无抗菌药物和治疗性益生菌使用史；⑤否认其他传染病史；⑥不合并肠道疾病和其他系统疾病；⑦无特殊饮食癖好（如素食等）；⑧非孕期或哺乳期妇女。

二、研究方法

1. 肠道菌群检测：样品采集及粪便DNA提取：健康对照组与原发性肝癌组患者均留取首次入院并确诊的粪便标本，标本留取选用华大智造提供的粪便标本采集套装，样本送至北京华大基因股份有限公司进行DNA提取：标本离心后的沉淀进行研磨、裂解、孵育；高速离心后，洗涤、孵育、洗脱得到样本中总的DNA。

宏基因组DNA文库构建与测序：①采用Covaris聚焦超声仪对合格DNA样品进行打断和末端修复后，纯化DNA片段；②在DNA片段两端连接上测序接头，并进行PCR扩增，回收目标片段；③对样品文库进行质控与定量。合格文库采用Illumina平台进行测序。

2. 生物信息学分析：相似性分析：主成分分析（principal components analysis, PCA）利用线性变换，将数据变换到1个新的坐标系统中；然后再利用降维思想，使任何数据投影的第1大方差在第1个坐标（称为第1主成分）上，第2大方差在第2个坐标（第2主成分）上。PCA能减少数据集的维数，同时还保持数据集的对方差贡献最大的特征，最终使数据直观呈现在二维坐标系。

多样性分析：Beta多样性利用各样本序列间的进化关系及丰度信息来计算样本间距离，反映样本组间是否具有显著的微生物群落差异。宏基因组项目通常采用Bray-Curtis距离、Jaccard距离来衡量组间差异。

物种丰度分析：使用MEGAN^[7]（4.6版本）对nr比对结果进行处理。MEGAN根据1种名为最近公共祖先（least common ancestor, LCA）的算法，对基本局部比对搜索工具（basic local alignment search tool, BLAST）比对结果根据NCBI物种分类树进行重新梳理。从而得到每条序列的物种注释信息。将同一物种注释的基因丰度累加起来，得到该物种在样品中的物种丰度。

3. 临床指标：健康对照组和原发性肝癌患者入组时检测BMI、丙氨酸氨基转移酶（alanine

aminotransferase, ALT）、天冬氨酸氨基转移酶（aspartate aminotransferase, AST）、谷氨酰转肽酶（ γ -glutamyl transferase, GGT）、总蛋白、总胆红素、甲胎蛋白（alpha-fetoprotein, AFP）和腹部超声等。询问并记录患者入组前8周饮食习惯及用药史，均衡饮食为素食和肉食均食用。

三、统计学处理

采用SPSS 22.0和GraphPad Prism 7.0软件进行数据分析，绘图使用R 3.6.0软件完成。年龄、BMI、ALT、AST、总蛋白、总胆红素水平均为正态分布的计量资料，采用 $\bar{x} \pm s$ 表示，两组比较采用独立样本 t 检验；GGT、AFP、肿瘤大小为非正态分布的计量资料，采用中位数（四分位数）表示，组间比较采用非参数Mann-Whitney U 检验；性别分布为计数资料，两组比较采用Fisher确切概率法检验。副血链球菌、唾液链球菌、变形链球菌、嗜热链球菌、副流感嗜血杆菌、韦荣球菌、殊异韦荣菌、艾克曼菌、嗜黏蛋白艾克曼菌、普雷沃菌和另枝菌丰度分别与血清中ALT、AST、GGT、总胆红素、总蛋白和AFP水平的相关性采用Spearman相关分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、入组研究对象的基线资料

共收集20例研究对象的粪便样本，包括10例健康对照组和10例原发性肝癌组患者的样本；其中原发性肝癌组中男性9例，女性1例，平均年龄（ 53.9 ± 6.9 ）岁。健康对照组中男性9例，女性1例，平均年龄（ 56.4 ± 13.2 ）岁，两组性别和年龄差异无统计学意义（ P 均 > 0.05 ），具有可比性。与健康对照组相比，原发性肝癌组患者GGT和AFP水平显著升高，差异有统计学意义（ $Z = 2.937$ 、 $P = 0.002$ ， $Z = 2.531$ 、 $P = 0.010$ ），见表1。

二、原发性肝癌组和健康对照组研究对象肠道菌群相似性

PCA采用降维思想从多维数据中提取出最主要的元素和结构，两组样品在图上距离越近，表示样品的组成结构越相似：本研究PCA中，每1个点代表一个标本，可看出两组菌群结构有所不同，健康对照组菌群分布较分散，而原发性肝癌组菌群分布较集中，但两组在PC1和PC2方向上并未完全分开，提示两组菌群的组成结构具有一定的相似性。

见图1。

三、原发性肝癌组和健康对照组研究对象肠道菌群多样性分析

Beta多样性分析是用来比较样本组间在物种多样性方面的差异，根据丰度矩阵计算样品的bray、jsd距离衡量Beta多样性。本研究结果提示，原发性肝癌组和健康对照组基于bray距离的距离值分别为 (0.29 ± 0.06) 和 (0.40 ± 0.13) ，两组bray距离值差异有统计学意义 $(t = 5.402, P < 0.001)$ ；原发性肝癌组和健康对照组基于jsd距离的距离值分别为 (0.45 ± 0.07) 和 (0.56 ± 0.13) ，

两组jsd距离值差异有统计学意义 $(t = 5.248, P < 0.001)$ ，健康对照组和原发性肝癌组患者物种水平Beta多样性分析差异有统计学意义，与健康对照组相比，原发性肝癌组患者的粪便微生物多样性降低，见图2。

四、原发性肝癌患者肠道菌群的丰度分析

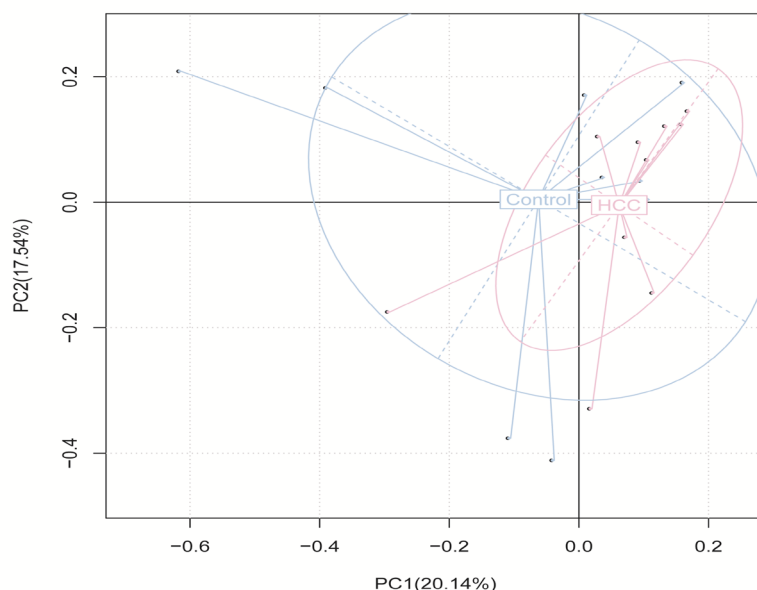
本研究20例标本共鉴定出956种菌属和3 436个物种。在属水平，丰度最高的是拟杆菌属(*Bacteroides*)，相对丰度为34.94% (11.76%，56.02%)，其次为普雷沃菌属(*Prevotella*)，相对丰度为11.99% (1.29%，27.82%)；在物种水平，丰

表1 健康对照组和原发性肝癌组患者的一般资料

一般资料	健康对照组 (10例)	原发性肝癌组 (10例)	统计量	P值
性别 (男/女, 例)	9/1	9/1	—	1.000 ^a
年龄 ($\bar{x} \pm s$, 岁)	56.4 \pm 13.2	53.9 \pm 6.9	$t = 0.532$	0.601
BMI ($\bar{x} \pm s$)	22.2 \pm 1.1	24.4 \pm 3.0	$t = 1.330$	0.066
ALT ($\bar{x} \pm s$, U/L)	18.0 \pm 8.4	27.6 \pm 12.1	$t = 2.065$	0.053
AST ($\bar{x} \pm s$, U/L)	21.2 \pm 5.0	28.5 \pm 10.3	$t = 1.997$	0.061
GGT [M (P25, P75), U/L]	14.0 (11.8, 19.0)	38.8 (22.8, 60.6)	$Z = 2.937$	0.002
总蛋白 ($\bar{x} \pm s$, g/L)	71.1 \pm 6.0	69.6 \pm 6.0	$t = 0.566$	0.579
总胆红素 ($\bar{x} \pm s$, μ mol/L)	17.0 \pm 6.2	18.6 \pm 8.5	$t = 0.470$	0.644
AFP [M (P25, P75), ng/ml]	2.7 (1.8, 5.8)	10.9 (3.5, 507.1)	$Z = 2.531$	0.010
肿瘤大小 [M (P25, P75), mm]	—	18.5 (17, 77.2)	—	—
饮食习惯	均衡饮食	均衡饮食	—	—

注：“—”：无相关数据；BMI：身体质量指数，ALT：丙氨酸氨基转移酶，AST：天冬氨酸氨基转移酶，GGT：谷氨酰转肽酶，AFP：甲胎蛋白；

^a：Fisher 确切概率法



注：横、纵坐标轴的刻度是相对距离，无实际意义；HCC：指原发性肝癌组，Control：指健康对照组

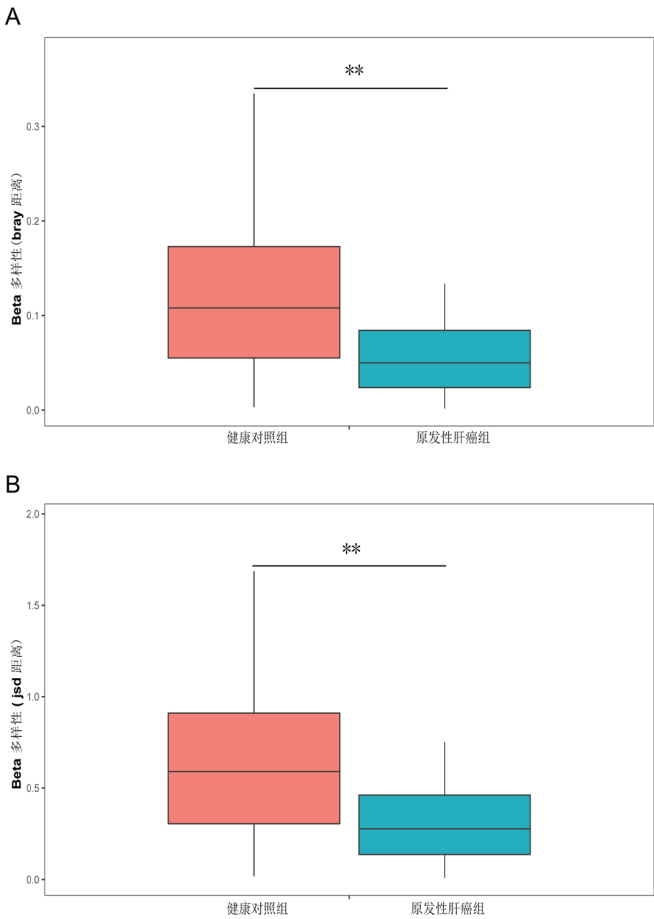
图1 健康对照组和原发性肝癌组患者粪便微生物群相似性变化

度最高的分别为普通拟杆菌 (*Bacteroides vulgatus*) 和普拉梭菌 (*Faecalibacterium prausnitzii*)，相对丰度分别为1.55% (0.63%, 3.90%) 和1.54% (0.53%, 2.84%)。结果显示，137种物种在健康对照组和原发性肝癌组的分布差异有统计学意义 (P 均 < 0.05)，经过聚类分析发现，原发性肝癌组患者副血链球菌、唾液链球菌、变形链球菌、嗜热链球菌、

副流感嗜血杆菌、韦荣球菌、殊异韦荣菌丰度显著增加，艾克曼菌、嗜黏蛋白艾克曼菌、普雷沃菌、另枝菌丰度显著降低，见图3和表2。

五、物种丰度与临床指标间的相关性

将原发性肝癌组和健康对照组研究对象间差异物种经聚类分析得到的11个物种的丰度与血清中ALT、AST、GGT、总胆红素、总蛋白和AFP



注：箱线图中部的黑线表示中值，箱的上界和下界分别表示上四分位数 (Q3) 和下四分位数 (Q1)；**： $P < 0.001$

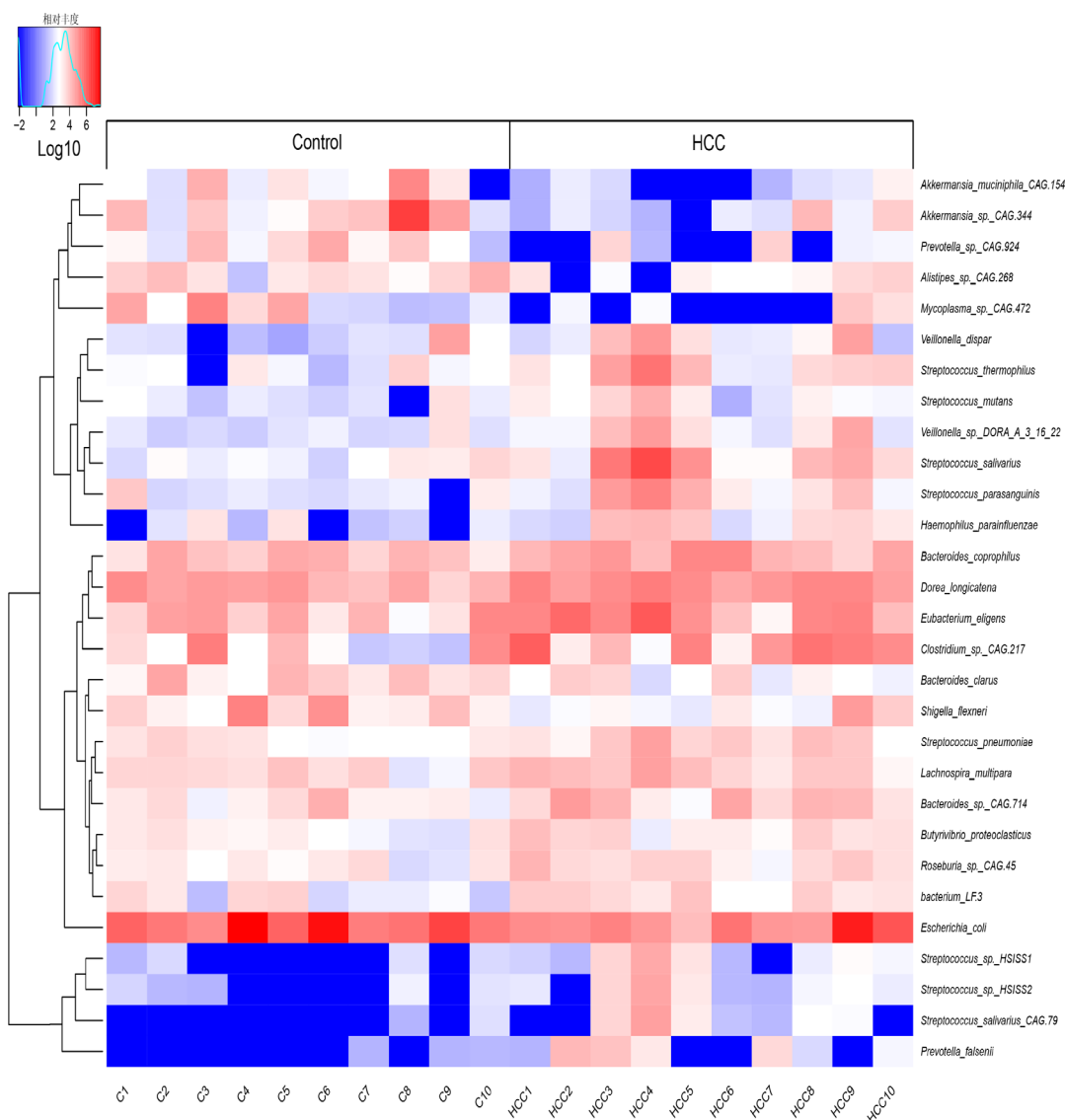
图2 健康对照组和原发性肝癌组患者粪便微生物群物种水平多样性变化

表 2 健康对照组和原发性肝癌组患者肠道菌种相对丰度 (%)

细菌	健康对照组 (10例)	原发性肝癌组 (10例)	统计量	P值
副血链球菌	0.01 (0.01, 0.05)	0.21 (0.03, 3.83)	$Z = 2.797$	0.005
唾液链球菌	0.05 (0.02, 0.17)	1.19 (0.08, 15.78)	$Z = 2.495$	0.013
变形链球菌	0.02 (0.00, 0.03)	0.09 (0.03, 0.25)	$Z = 2.041$	0.041
嗜热链球菌	0.04 (0.01, 0.09)	0.45 (0.05, 2.65)	$Z = 2.192$	0.028
副流感嗜血杆菌	0.00 (0.00, 0.07)	0.26 (0.01, 1.09)	$Z = 2.574$	0.010
韦荣球菌	0.01 (0.01, 0.02)	0.12 (0.03, 2.18)	$Z = 2.873$	0.004
殊异韦荣菌	0.01 (0.00, 0.02)	0.06 (0.01, 2.35)	$Z = 2.041$	0.041
艾克曼菌	0.78 (0.02, 2.59)	0.01 (0.00, 0.22)	$Z = 2.268$	0.023
嗜黏蛋白艾克曼菌	0.05 (0.02, 0.95)	0.00 (0.00, 0.02)	$Z = 2.542$	0.011
普雷沃菌	0.10 (0.03, 1.07)	0.00 (0.00, 0.13)	$Z = 2.361$	0.018
另枝菌	0.31 (0.18, 0.74)	0.08 (0.03, 0.27)	$Z = 2.042$	0.041

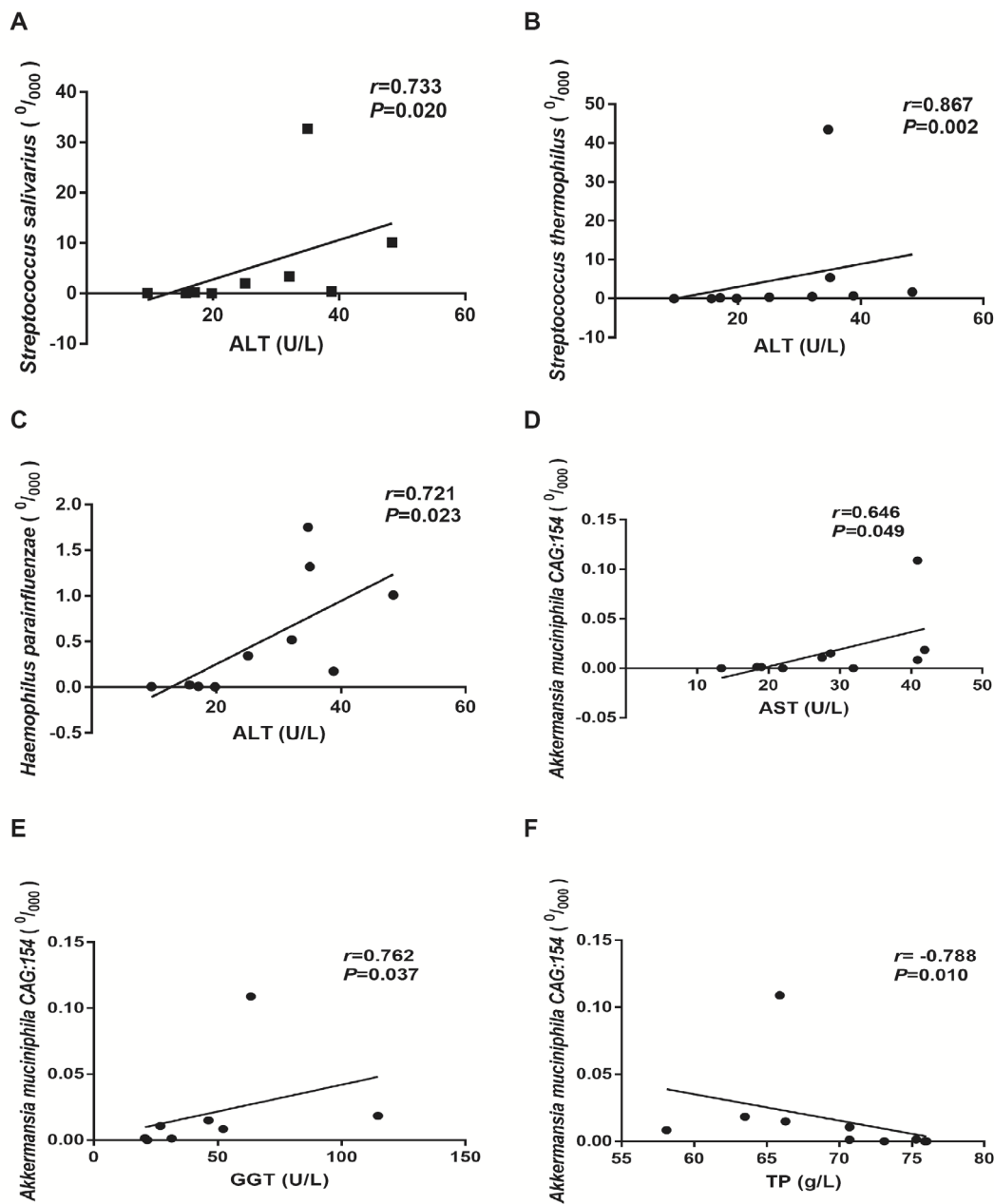
水平进行Spearman相关性分析,结果显示唾液链球菌($r = 0.733$ 、 $P = 0.020$)、嗜热链球菌($r = 0.867$ 、 $P = 0.002$)、副流感嗜血杆菌($r = 0.721$ 、 $P = 0.023$)与血清ALT水平呈显著正相关;嗜黏蛋白艾克曼菌与AST($r = 0.646$ 、 $P = 0.049$)、GGT

($r = 0.762$ 、 $P = 0.037$)、总蛋白($r = -0.788$ 、 $P = 0.010$)间有显著相关性。结果表明,原发性肝癌患者肠道菌群与血清ALT、AST、GGT及总蛋白水平具有相关性,肠道菌群可能与肝癌发生和发展关系密切。



注: HCC: 原发性肝癌组, Control: 健康对照组; *Akkermansia_muciniphila_CAG.154*: 嗜黏蛋白艾克曼菌, *Akkermansia_sp._CAG.344*: 艾克曼菌, *Prevotella_sp._CAG.924*: 普雷沃菌, *Alistipes_sp._CAG.268*: 另枝菌, *Mycoplasma_sp._CAG.472*: 支原体, *Veillonella_dispar*: 殊异韦荣菌, *Streptococcus_thermophilus*: 嗜热链球菌, *Streptococcus_mutans*: 变形链球菌, *Veillonella_sp._DORA_A_3_16_22*: 韦荣球菌, *Streptococcus_salivarius*: 唾液链球菌, *Streptococcus_parasanguinis*: 副血链球菌, *Haemophilus_parainfluenzae*: 副流感嗜血杆菌, *Bacteroides_coprophius*: 粪类拟杆菌, *Dorea_longicatena*: 多尔长链菌, *Eubacterium_eligens*: 挑剔真杆菌, *Clostridium_sp._CAG.217*: 梭菌, *Bacteroides_clarus*: 克拉斯拟杆菌, *Shigella_flexneri*: 福氏志贺菌, *Streptococcus_pneumoniae*: 肺炎链球菌, *Lachnospira_multipara*: 多对毛螺菌, *Bacteroides_sp._CAG.714*: 拟杆菌, *Butyrivibrio_proteoclasticus*: 丁酸弧菌, *Roseburia_sp._CAG.45*: 罗斯拜瑞菌, *bacterium_LF3*: LF3细菌, *Escherichia_coli*: 大肠埃希菌, *Streptococcus_sp._HSISS1*: 链球菌, *Streptococcus_sp._HSISS2*: 链球菌, *Streptococcus_salivarius_CAG.79*: 唾液链球菌, *Prevotella_falsenii*: 假食杆菌

图3 健康对照组和原发性肝癌组患者差异物种聚类分析



注：纵坐标为物种相对丰度；*Streptococcus_salivarius*：唾液链球菌，*Streptococcus_thermophilus*：嗜热链球菌，*Haemophilus_parainfluenzae*：副流感嗜血杆菌，*Akkermansia_muciniphila_CAG.154*：嗜黏蛋白阿克曼菌；ALT：丙氨酸氨基转移酶，AST：天冬氨酸氨基转移酶，GGT：谷氨酰转肽酶，TP：总蛋白

图4 原发性肝癌组患者粪便微生物物种丰度与临床指标间的Spearman相关性分析

讨 论

原发性肝癌患者早期症状不明显，缺乏特异的早期诊断标志物，大部分肝癌患者确诊时已是晚期，且预后差^[8]。肠道微生物与肝脏间通过“肠-肝轴”的相互作用使肠道微生物作为肝癌诊断标志物成为可能^[9]。常用肠道菌群研究方法有16S扩增测序和宏基因组测序。16S测序只针对16S rDNA的

可变区序列多态性进行序列区分，对细菌进行种属鉴定；而宏基因组是对所有微生物进行全基因组测序^[10]。16S测序得到的序列大部分注释不到种的水平，而宏基因组测序则能鉴定微生物到种水平甚至菌株水平。故在物种鉴定过程中，宏基因组测序具有较高的优势。

本研究共收集20例标本进行宏基因组测序分析，通过PCA分析和多样性分析发现原发性肝癌患

者的肠道菌群的群落结构发生改变且菌群多样性降低,可将健康人群和原发性肝癌患者分开。将原发性肝癌组和健康对照组的差异物种进行聚类分析,提示两组物种组成及丰度存在差异,原发性肝癌组患者存在菌群失衡,可能是有害菌群过度增长,有益菌群丰度降低。且与对照组相比,原发性肝癌组患者肠道菌群与肝功能指标关系密切。这些结果表明,以肠道微生物为标志物有望成为肝癌诊断的一种重要方法。

近期研究显示,动物模型中肠道菌群可通过“肠-肝轴”促进肝癌的发展^[11-12],益生菌可通过调节小鼠的肠道菌群来抑制肝癌生长^[13],而且肝癌患者肠道菌群多样性降低^[14]。本研究发现原发性肝癌患者的粪便中微生物多样性降低,与报道一致^[14];结果表明,肠道菌群在从健康人发生肝癌的过程中发生显著变化,微生物群落的改变可能在肝癌发生和发展过程中发挥重要作用。肝脏与肠道在解剖上具有密切联系,肝脏不仅通过门静脉吸收来自肠道的血液,同时也是肠道微生物、PAMPs和微生物代谢产物最先接触的器官^[12]。肠道黏膜屏障能够减少促炎性PAMPs对肝脏的损害,PAMPs能与肝脏Kupffer细胞、肝星状细胞、内皮细胞和肝细胞上的模式识别受体(pattern-recognition receptors, PRRs)相互识别,如Toll样受体4(Toll-like receptor, TLR4),启动炎症反应和免疫信号通路^[15-16]。慢性肝病患者肠道菌群失调和肠道渗漏导致肠道屏障破坏,细菌异位、PAMPs以及促癌和促进细胞衰老的代谢产物进入肝脏(如脱氧胆酸和LPS),促进肝脏炎症反应、纤维化、肝细胞增殖和抗凋亡信号激活(如LPS-TLR4/NF- κ B信号通路)^[11],增加原发性肝细胞癌的发生风险^[11, 15-17]。

肠道菌群不仅与肝癌发生有关,其他疾病也常表现出特有的肠道微生物特征,如2型糖尿病^[18-19]、炎症性肠病^[20-21]、大肠腺瘤(癌)^[22]。本研究原发性肝癌患者中,人体口腔常见的定植菌属,包括厚壁菌门链球菌、韦荣球菌及变形菌门嗜血杆菌的丰度显著增加,而人体中的有益菌属丰度显著降低,包括普雷沃菌和另枝菌。嗜血杆菌是引起感染的常见致病菌,链球菌和韦荣球菌有协同促进作用,相互促进生长,链球菌可产生侵袭性酶、外毒素及溶血素等并诱发炎症反应^[23]。而本研究发现疣微菌门(*Verrucomicrobia*)中艾克曼菌丰度降低,嗜黏蛋白艾克曼菌是革兰阴性厌氧菌,其利用宿主产生

的黏蛋白作为碳源和氮源^[24-25],其降解黏蛋白的特性使其成为维持肠道黏膜屏障的关键微生物。菌群失调导致的肠道黏膜屏障破坏与肠道渗漏及细菌异位有密切联系^[11],保护肠道黏膜和屏障功能的细菌减少可能与原发性肝癌的发生密切相关。表明通过“肠-肝轴”的作用,可能利用肠道菌群的改变进而影响肠道黏膜免疫调节作用,实现监测和预防原发性肝癌发生目的。

临床上原发性肝癌患者常伴随血清ALT、AST和GGT水平升高,总蛋白水平降低,故本研究针对肠道菌群与肝功能指标间关系行相关性分析。研究发现,唾液链球菌、嗜热链球菌、副流感嗜血杆菌与ALT,嗜黏蛋白艾克曼菌与AST、GGT、总蛋白水平呈显著相关,提示肠道菌群与原发性肝癌关系密切,二者存在共同的发病途径,肠道菌群在肝癌发病机制中起到重要作用,但具体机制还不明确。

综上,本研究通过宏基因组测序探究原发性肝癌患者肠道菌群的特征变化,鉴定了特定的差异物种,表明其可能作为肝癌发生的标志物。故肠道菌群可能作为一种生物标志物用于原发性肝癌的早期诊断。肠道微生物作为一种标志物结合当前对肝癌的诊断方法可能进一步实现原发性肝癌的早期诊断和早期治疗。另外,基于原发性肝癌患者肠道菌群的特征,菌群失衡涉及的差异菌能否为今后微生态制剂研发提供新思路;嗜黏蛋白艾克曼菌是否与肝癌进展相关,对肝癌的影响机制如何;是否存在高效能的微生态指标预测进展,均可作为今后研究方向。

参 考 文 献

- [1] Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2): 87-108.
- [2] GBD 2017 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017[J]. Lancet (London, England), 2018, 392(10159): 1789-1858.
- [3] Zhou M, Wang H, Zeng X, et al. Mortality, morbidity, and risk factors in China and its provinces, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017[J]. Lancet (London, England), 2019, 394(10204): 1145-1158.
- [4] Tripathi A, Debelius J, Brenner DA, et al. The gut-liver axis and the intersection with the microbiome [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2018, 15(7): 397-411.
- [5] Milosevic I, Vujovic A, Barac A, et al. Gut-liver axis, gut microbiota,

- and its modulation in the management of liver diseases: A review of the literature [J]. *Int J Mol Sci*,2019,20(2):395.
- [6] 中华人民共和国国家卫生健康委员会医政医管局. 原发性肝癌诊疗规范(2019年版). *临床肝胆病杂志*,2020,36(2):277-292.
- [7] Huson DH, Auch AF, Qi J, et al. MEGAN analysis of metagenomic data[J]. *Genome Res*,2007,17(3):377-386.
- [8] 傅毅振, 徐立. 肝细胞癌综合治疗进展[J]. *临床肝胆病杂志*, 2020,36(10):2179-2183.
- [9] Gupta H, Youn GS, Shin MJ, et al. Role of gut microbiota in hepatocarcinogenesis[J]. *Microorganisms*,2019,7(5):121.
- [10] Gu W, Miller S, Chiu CY. Clinical Metagenomic next-generation sequencing for pathogen detection[J]. *Annu Rev of Pathol*,2019,14:319-338.
- [11] Ohtani N, Kawada N. Role of the gut-liver axis in liver inflammation, fibrosis, and cancer: A special focus on the gut microbiota relationship[J]. *Hepatol Commun*,2019,3(4):456-470.
- [12] Yu LX, Schwabe RF. The gut microbiome and liver cancer: mechanisms and clinical translation [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*,2017,14(9):527-539.
- [13] Li J, Sung CY, Lee N, et al. Probiotics modulated gut microbiota suppresses hepatocellular carcinoma growth in mice[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*,2016,113(9):E1306-E1315.
- [14] Cho EJ, Leem S, Kim SA, et al. Circulating microbiota-based metagenomic signature for detection of hepatocellular carcinoma[J]. *Sci Rep*,2019,9(1):7536.
- [15] Elshaer AM, El-Kharashi OA, Hamam GG, et al. Involvement of TLR4/CXCL9/PREX-2 pathway in the development of hepatocellular carcinoma (HCC) and the promising role of early administration of lactobacillus plantarum in Wistar rats[J]. *Tissue Cell*,2019,60:38-47.
- [16] Yu LX, Yan HX, Liu Q, et al. Endotoxin accumulation prevents carcinogen-induced apoptosis and promotes liver tumorigenesis in rodents[J]. *Hepatology*,2010,52(4):1322-1333.
- [17] Loo TM, Kamachi F, Watanabe Y, et al. Gut microbiota promotes obesity-associated liver cancer through PGE(2)-mediated suppression of antitumor immunity [J]. *Cancer Discov*,2017,7(5):522-538.
- [18] Forslund K, Hildebrand F, Nielsen T, et al. Disentangling type 2 diabetes and metformin treatment signatures in the human gut microbiota[J]. *Nature*,2015,528(7581):262-266.
- [19] Muñoz-Garach A, Diaz-Perdigones C, Tinahones FJ. Gut microbiota and type 2 diabetes mellitus[J]. *Endocrinol Nutr*,2016,63(10):560-568.
- [20] Vich Vila A, Imhann F, Collij V, et al. Gut microbiota composition and functional changes in inflammatory bowel disease and irritable bowel syndrome[J]. *Sci Transl Med*,2018,10(472):eaap8914.
- [21] Imhann F, Vich Vila A, Bonder MJ, et al. Interplay of host genetics and gut microbiota underlying the onset and clinical presentation of inflammatory bowel disease [J]. *Gut*,2018,67(1):108-119.
- [22] Coker OO, Nakatsu G, Dai RZ, et al. Enteric fungal microbiota dysbiosis and ecological alterations in colorectal cancer[J]. *Gut*,2019,68(4):654-662.
- [23] Mashima I, Nakazawa F. The influence of oral *Veillonella species* on biofilms formed by *Streptococcus species*[J]. *Anaerobe*,2014,28:54-61.
- [24] Derrien M, Belzer C, De Vos WM. Akkermansia muciniphila and its role in regulating host functions[J]. *Microb Pathog*,2017,106:171-181.
- [25] Plovier H, Everard A, Druart C, et al. A purified membrane protein from Akkermansia muciniphila or the pasteurized bacterium improves metabolism in obese and diabetic mice[J]. *Nat Med*,2017,23(1):107-113.
- (收稿日期: 2020-06-21)
(本文编辑: 孙荣华)

郑微, 赵鹏, 张永宏, 等. 宏基因组测序技术分析原发性肝癌患者肠道菌群特征[J/CD]. *中华实验和临床感染病杂志 (电子版)*, 2021,15(3):149-157.