

doi: 10.3969/j.issn.0490-6756.2020.02.030

奥狄氏括约肌松弛胆结石患者的胆汁细菌多样性

李 洋¹, 刘永康², 刘 保¹, 张国建^{1,3},
梁鹏宽¹, 刘 维¹, 崔学文⁴, 孙 群¹

(1. 四川大学生命科学学院 生物资源与生态环境教育部重点实验室, 成都 610065;
2. 西部战区空军医院普通外科, 成都 610021; 3. 四川大学轻纺与食品学院, 成都 610065;
4. 四川省食品药品检验检测院, 成都 611731)

摘 要: 为临床治疗奥狄氏括约肌松弛(the Sphincter of Oddi laxity, SOL)患者胆结石复发寻找依据,本文研究了患有 SOL 的胆结石患者的胆汁细菌组成和多样性. 分析了 SOL 与非 SOL 胆结石患者术前肝功、肾功和血常规等临床指标差异,基于 Illumina MiSeq 平台对患者胆汁细菌进行 16S rRNA 基因高通量测序. 结果发现,SOL 患者的总胆红素(TBIL)、直接胆红素(DBIL)、间接胆红素(IBIL)水平显著高于非 SOL 患者,而腺苷脱氨酶(ADA)则显著低于后者($P < 0.05$). 两组患者之间胆汁细菌 α 多样性指数除均匀度外无显著差异($P > 0.05$); Wilcoxon 秩和检验显示 SOL 患者胆汁中细菌丰度前四的菌门依次为变形菌门(Proteobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)、放线菌门(Actinobacteria)和拟杆菌门(Bacteroidete),其中变形菌门、肠球菌属(*Enterococcus*)和 *Lachnoclostridium*s 属细菌在 SOL 患者胆汁中含量显著高于非 SOL 患者($P < 0.05$),而 SOL 患者中其他优势菌属如克雷伯菌(*Klebsiella*)、马赛菌属(*Massilia*)和假单胞杆菌(*Pseudomonas*)丰度则无显著增高($P > 0.05$). 因此,SOL 患者的部分临床指标如胆红素、ADA 水平和胆汁细菌组成与非 SOL 患者存在显著差异,这为临床治疗 SOL 患者胆结石复发提供相关依据.

关键词: 奥狄氏括约肌;高通量测序;细菌群落;胆红素;胆汁

中图分类号: Q938 **文献标识码:** A **文章编号:** 0490-6756(2020)02-0400-09

Bile bacterial diversity in patients with cholelithiasis
and sphincter of Oddi laxity

LI Yang¹, LIU Yong-Kang², LIU Bao¹, ZHANG Guo-Jian^{1,3},
LIANG Peng-Kuan¹, LIU Wei¹, CUI Xue-Wen⁴, SUN Qun¹

(1. Key Laboratory of Bio-Resource and Eco-Environment of Ministry of Education, College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610065, China; 2. Air Force Hospital of Western Theater Command, Chengdu 610021, China;
3. College of Light Industry, Textile and Food Engineering, Sichuan University, Chengdu 610065, China;
4. Sichuan Institute of Food and Drug Control, Chengdu 611731, China)

Abstract: To study the composition and diversity of bile bacteria in patients with the sphincter of Oddi laxity (SOL), to provide basis for clinical treatment of cholelithiasis recurrence in patients with SOL, this study analyzed the differences of clinical indexes before operation, including liver and kidney func-

收稿日期: 2019-05-30
基金项目: 四川省国际科技合作与交流研发项目(18GJHZ0137)
作者简介: 李洋(1993—), 男, 四川广元人, 硕士生, 主要研究领域为微生物学. E-mail: 569830926@qq.com
通讯作者: 孙群. E-mail: qunsun@139.com

tion and blood routine index between control (non-SOL patients with cholelithiasis) and SOL group. The high-throughput 16S rRNA gene sequencing of biliary bacteria was performed based on the Illumina MiSeq platform. The results showed that the level of total bilirubin, direct bilirubin and indirect bilirubin in cholelithiasis patients with the SOL were significantly higher than those in the non-SOL group, while adenosine deaminase (ADA) was lower than that in control ($P < 0.05$). There was no significant difference in bacterial alpha diversity between SOL and non-SOL patients except for evenness ($P > 0.05$), and Wilcoxon rank-sum test showed that the top four abundant bacterial phyla in SOL patients bile were Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria and Bacteroidete in turn, among which the abundance of Proteobacteria, *Enterococcus* and *Lachnoclostridium* was significantly higher in SOL patients than in control ($P < 0.05$), so did *Klebsiella*, *Massilia* and *Pseudomonas* ($P > 0.05$). Therefore, there are significant differences in some clinical indexes such as bilirubin, ADA level and bile bacterial composition between patients with SOL and those without SOL, which provide relevant basis for the clinical treatment of cholelithiasis recurrence in patients with SOL.

Keywords: Oddi sphincter; High-throughput sequencing; Microbial community; Bilirubin; Bile

1 引言

胆结石在亚洲地区是一种流行的进行性胆道疾病. 与西方胆结石患者不同, 其特点是弥漫性胆道扩张和细菌性胆管炎反复发作^[1], 正常情况下, 健康人的胆汁内无细菌生长, 在胆结石患者的胆汁中通常可培养出一种或多种致病菌株^[2], 这些致病菌多直接或间接来源于肠道, 经奥狄氏括约肌 (Sphincter of Oddi) 逆行侵入胆道, 在小肠肠壁黏膜受损的情况下也可通过门静脉血液循环系统入侵胆囊及胆道导致细菌感染^[3]. 1887 年 Oddi 首先报告了胆管末端在十二指肠的开口处存在有括约肌样结构, 即被称之为奥狄氏括约肌, 认为它具有抗十二指肠液返流的“阀门”作用, 负责胆胰液分泌的调控与排泄^[4], 也是胆管隔绝肠道细菌入侵的一道屏障, 是胆道无菌环境的看门人. 在医院治疗胆道结石病人的过程中, 发现有一部分患者奥狄氏括约肌出现松弛 (Sphincter of Oddi laxity, SOL), 在临床上如果外径为 5.5 mm 的胆道镜 PENTAX 能顺利通过无扩张程序 Oddi 括约肌到达十二指肠, 则被诊断为 SOL^[5]. 目前关于奥狄氏括约肌松弛的流行病学研究和相关致松弛生化因子的研究已经很多, 又有大量文献证明胆汁细菌与胆结石成石密不可分, 但关于 SOL 胆结石病人的胆汁细菌组成和多样性的研究少见报道. SOL 与胆汁微环境存在相互作用关系, 可能是由于胆结石患者胆汁中 SOL 相关差异菌属通过某些代谢途径如细菌一氧化氮合酶 (NOS) 生成 SOL 松弛因子一氧化氮 (NO) 或者细菌某些炎症因子对患者胆红素等代

谢产生影响, 从而影响了奥狄氏括约肌的运动功能, 导致肠内容物回流改变了胆道微环境^[6], 破坏胆汁中胆固醇、胆汁酸与磷脂的平衡, 进而造成胆结石形成和复发. 研究奥狄氏括约肌松弛与非松弛胆结石患者的临床指标差异和胆汁细菌组成以及多样性差异, 可以分析探索细菌、奥狄氏括约肌与胆结石形成之间的关系.

第二代 16S rRNA 基因高通量测序技术^[7]凭借其较低成本、通量高和测序的自动化以及快速准确全面获得样品细菌群落组成的优势, 在如食品^[8]、人体肠道^[9]、胆道^[10-11]、尿道^[12]、皮肤^[13-14]和口腔^[15]等样品细菌群落研究中得到了广泛应用. 目前患有 SOL 胆结石患者的胆汁细菌组成和多样性少见研究报道, 本研究基于 Illumina MiSeq 平台高通量测序研究胆结石患者胆汁细菌群落, 分析比较了奥狄氏括约肌松弛与非松弛胆结石患者临床指标的差异以及胆汁细菌的组成、丰度和多样性的差异, 找出与 SOL 相关的胆汁细菌, 可能对临床诊断和治疗具有一定的指导意义并为研究 SOL 的细菌学致病机理打下了基础.

2 材料与方法

2.1 材料

2017 年 5 月至 2018 年 9 月期间, 在排除肝胆肿瘤、先天性胆道畸形、肝硬化、胰腺炎和有奥狄氏括约肌切开术 (EST) 等既往肝胆手术史的患者条件下, 从解放军第 452 医院一共取得 30 个符合研究标准的原发性胆结石患者胆汁样品, 其中取自奥狄氏括约肌松弛患者 14 个, 奥狄氏括约肌正常

患者 16 个,收集并记录患者术前肝肾功能和血常规等临床指标数据. 所有患者均知情并同意胆汁样本采集和临床指标收集.

2.2 方 法

2.2.1 临床指标采集处理 在对胆管进行任何入侵性手术操作之前,用 5 mL 无菌注射器从胆总管上端提取胆汁样本,并立即盖好针帽装入洁净冰盒中,保证 1 h 内进入实验室,于无菌操作间将取得的胆汁样品分装于 3~4 管(视胆汁样品量而定)无菌冻存管,一部分用于 DNA 提取和细菌分离培养,另一部分在液氮中速冻后储存于-80 ℃冰箱,用于后续实验备用.

2.2.2 DNA 提取和 PCR 扩增 将胆汁样品从-80 ℃冰箱取出解冻,分装 500 μL 胆汁样品于 1.5 mL 的 Eppendorf 管中,然后采用 E. Z. N. A. © Stool DNA Kit(50)D4015-01(Omega Bio-tek, Norcross,GA, USA)提取患者胆汁细菌基因组 DNA,胆汁细菌基因组 DNA 提取后,使用 Nano Drop 2000 紫外-可见分光光度计测定 DNA 的浓度和纯度,然后利用 1%琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 条带大小. 使用通用引物 338F(5'-ACTC-CTACGGGAGGCAGCAG-3') 和 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') 对 16S r RNA 基因的 V3-V4 区在热循环 PCR 仪(Gene Amp 9700,ABI,USA)内进行 PCR 扩增. 每个样本三个重复加入不同标签序列(Barcode-index)后,使用 Fast Pfu Polymerase 聚合酶进行 PCR 扩增. 扩增程序为 95 ℃ 3 min;95 ℃ 30 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 45 s,27 个循环,循环结束后 72 ℃最终延伸 10 min. 然后用 2%琼脂糖凝胶电泳检测,使用 Axy Prep DNA 凝胶回收试剂盒(Axy Prep DNA Gel ExtractionKit, Axygen Biosciences, Union City,California,USA)切胶回收纯化 PCR 产物,将 PCR 产物用 Quanti Fluor™-ST 荧光定量系统(Promega,USA)进行检测定量.

2.2.3 Illumina Miseq 高通量测序 扩增子以等摩尔浓度混合,送上海美吉生物医药科技有限公司 Illumina Miseq PE300(Illumina, San Diego, California,USA)平台进行配对末端高通量测序.

2.2.4 数据质控和统计方法 使用软件 FLASH (v1.2.7)处理 MiSeq 测序得的双端序列数据. 首先根据 PE reads 之间的 overlap 关系,将成对的 reads 拼接(merge)成一条序列,使用软件 FLASH (v1.2.7)和 Trimmomatic(v0.03)对拼接得到的

RawTags 进行过滤,过滤质控后长度小于 Tags 长度 75%的 Tags,得到高质量的 Tags 数据,使用 UCHIME v4.2 软件鉴定并去除嵌合体得到优化序列. 然后使用软件 UPARSE(version7.1 <http://drive5.com/uparse/>)按照 97%相似性将优化序列划分可操作分类单元(Operational Taxonomic Units, OTU);使用 Qiime 平台和 RDP Classifier(version 2.2)利用 RDP classifier 贝叶斯算法对照 Silva(Release128)数据库对 97%相似水平的 OTU 代表序列以 0.7 置信度阈值进行分类学分析并在各个分类水平统计各样本的群落组成. 为避免各样本序列差异,以最小样本序列数进行样本序列抽平,得到标准化 OTU 表进行后续统计分析. 使用单因素方差分析(IBM SPSS Statistics 22)对奥狄氏括约肌松弛和非松弛患者临床指标进行显著性检验(显著性水平 $\alpha = 0.05$). 基于抽平后的 OTU 表格,计算样本 α 和 β 多样性指数,利用 R 语言工具进行统计作 Venn 图,利用 R 语言工具 vegan 包进行群落热点作图. 利用 STAMP 软件进行基于 Wilcoxon 秩和检验(95%置信区间,bootstrap 算法)物种差异两组比较分析找出组间差异物种(fdr 多重检验校正 P 值). PLS-DA(Partial Least Squares Discriminant Analysis)即偏最小二乘法判别分析使用 R 语言 mixOmics 包中 plsda 进行分析和作图. PCoA 分析,即主坐标分析(Principal Co-ordinates Analysis)使用 R 语言 PCoA 统计分析和作图.

3 结果和分析

3.1 胆结石患者临床指标差异

取得的 30 个原发性胆结石患者胆汁样品中,SOL 胆结石患者(S 组)胆汁样品 14 个,非松弛胆结石患者(C 组)胆汁样品 16 个. C 组和 S 组临床指标(包括性别、年龄)的单因素方差分析结果如表 1 所示,S 组患者平均年龄 64 岁,C 组患者平均年龄 63 岁,两组患者年龄并无显著性差异($P>0.05$). 两组患者性别组成也无显著性差异($P>0.05$). S 组的胆结石患者其总胆红素 TBIL($49.55 \pm 7.95 \mu\text{mol/L}$)、直接胆红素 DBIL($30.2 \pm 6.71 \mu\text{mol/L}$)、间接胆红素 IBIL($23.64 \pm 1.50 \mu\text{mol/L}$)显著($P<0.05$)高于 C 组非 SOL 患者的 TBIL($27.27 \pm 4.20 \mu\text{mol/L}$)、DBIL($11.99 \pm 3.05 \mu\text{mol/L}$)、IBIL($14.68 \pm 1.40 \mu\text{mol/L}$),其中 IBIL 差异更是达到了极显著水平($P<0.001$). 而 S 组腺苷脱氨

酶 ADA 水平(12.15 ± 1.11 U/L)则显著低于 C 组(20.45 ± 2.41 U/L). 同时 C 组和 S 组 TBIL、DBIL 水平均高于指标正常范围(TBIL $3.4 \sim 26 \mu\text{mol/L}$ 、DBIL $0 \sim 8 \mu\text{mol/L}$),S 组 IBIL 指标高于正常范围($0 \sim 18 \mu\text{mol/L}$)而 C 组在正常范围内,ADA 水平两组均在正常参考值范围内($0 \sim 25$ U/L),但 S 组极显著($P < 0.001$)低于 C 组,这表明 S 组患者有着较高的肝功能损伤和阻塞性黄疸发生率,可以推测 SOL 会加重患者肝功能损伤并可能会对胆汁感染细菌的种类和含量产生影响,这些待研究的差异菌属则可能进一步影响肝胆代谢和奥狄氏括约肌功能,加重患者病情.

表 1 胆结石患者的临床指标差异分析

Tab.1 Differences in clinical indexes of cholelithiasis patients

Index	Non-SOL Patients	SOL Patients	Reference value	P
年龄 Year,y	64.19 ± 3.95	62.79 ± 4.17	空白	0.809
性别 Gender,male/female	5/11	3/11	空白	0.689
总蛋白 TP/(g/L)	67.14 ± 1.98	67.86 ± 2.01	65~85	0.801
白蛋白 ALB/(g/L)	38.04 ± 1.76	38.99 ± 1.53	40~55	0.692
球蛋白 GLB/(g/L)	29.10 ± 1.19	28.87 ± 1.08	20~40	0.889
A/G	1.34 ± 0.09	1.36 ± 0.07	1.2~2.4	0.818
丙氨酸氨基转移酶 ALT/(U/L)	74.25 ± 28.05	144.93 ± 56.34	7~40	0.253
天门冬氨酸转氨酶 AST/(U/L)	73.63 ± 22.99	86.71 ± 28.98	13~35	0.723
γ-谷氨酰基转移酶 GGT/(U/L)	272.56 ± 71.07	344.43 ± 82.05	7~45	0.511
碱性磷酸酶 ALP/(U/L)	161.19 ± 27.71	211.29 ± 54.01	40~150	0.399
总胆红素 TBIL/(μmol/L)	27.27 ± 4.20	49.55 ± 7.95	3.4~26	0.016 *
直接胆红素 DBIL/(μmol/L)	11.99 ± 3.05	30.2 ± 6.71	0~6.8	0.015 *
间接胆红素 IBIL/(μmol/L)	14.68 ± 1.40	23.64 ± 1.50	0~18	0.000 * *
前白蛋白 PA/(mg/L)	207.94 ± 16.64	187.71 ± 20.92	150~400	0.451
总胆汁酸 TBA/(μmol/L)	19.26 ± 11.69	37.56 ± 16.06	0~10	0.357
腺苷脱氨酶 ADA/(U/L)	20.45 ± 2.41	12.15 ± 1.11	0~25	0.006 * *
乳酸脱氢酶 LDH/(U/L)	200.00 ± 27.17	202.43 ± 15.96	109~245	0.941
葡萄糖 GLU/(mmol/L)	5.87 ± 0.40	5.97 ± 0.47	3.9~6.1	0.873
钾 K/(mmol/L)	3.94 ± 0.10	4.09 ± 0.17	3.5~5.3	0.418
钠 Na/(mmol/L)	139.45 ± 0.78	137.64 ± 1.03	135~145	0.166
氯 Cl/(mmol/L)	102.88 ± 0.77	104.25+1.11	96~108	0.310
血清钙 Ca/(mmol/L)	2.21 ± 0.04	2.20 ± 0.03	2~2.5	0.759
血清镁 Mg/(mmol/L)	0.87 ± 0.03	0.90 ± 0.02	0.65~1.25	0.397
无机磷 IP/(mmol/L)	1.02 ± 0.04	0.98 ± 0.04	0.9~1.34	0.589
白细胞 WBC/(10 ⁹ /L)	5.90 ± 0.63	7.80 ± 0.79	3.69~9.16	0.067
中性粒细胞百分比 NEUT%	69.88 ± 4.10	76.99 ± 3.38	50~70	0.199
淋巴细胞百分比 LYMPH%	22.73 ± 3.34	15.65 ± 2.89	20~40	0.126
单核细胞百分率 MONO%	6.26 ± 0.69	5.69 ± 0.46	3~10	0.510
嗜酸性粒细胞百分比 EO%	1.38 ± 0.28	1.31 ± 0.36	0.5~5	0.870
嗜碱性粒细胞百分比 BASO%	0.26 ± 0.05	0.36 ± 0.11	0~1	0.386
红细胞计数 RBC/(10 ¹² /L)	4.11 ± 0.14	4.31 ± 0.18	3.68~5.13	0.361
血红蛋白 HGB/(g/L)	125.00 ± 4.45	124.86 ± 5.16	113~151	0.983
血小板计数 PLT/(10 ⁹ /L)	163.06 ± 17.59	181.50 ± 20.01	101~320	0.493

* * indicates that the difference is extremely significant at the level of alpha=0.01, and * indicates that the difference is significant at the level of alpha=0.05.

可以看到两组患者总胆汁酸 TBA($\mu\text{mol/L}$)水平均升高超过参考值,S 组 TBA 水平高于 C 组但没有显著性差异,这说明 SOL 患者的肝胆功能受到了更大的损伤. 两组患者 TBA 升高表明由于患者胆结石的阻塞,导致患者胆汁淤积肝胆代谢功能异常从而直接引起患者胆红素水平升高,而 SOL 患者由于奥狄氏括约肌不能正常排泄胆汁造成更严重的炎症和胆汁淤积,导致其总胆汁酸、胆

红素水平显著高于非 SOL 患者($P < 0.05$). 这些临床数据的非显著性差异指标如年龄、性别、总蛋白、葡萄糖等对于患者 SOL 没有显著性影响,而差异指标如胆红素水平和 ADA 水平与 SOL、胆汁细菌组成与多样性之间的关系则值得进一步探索.

3.2 胆结石患者细菌组成

本次高通量测序一共得到 1 821 条 OTUs,属于 33 个门 687 个属,如图 a 所示 C 组含有 1 196 条 OTU,S 组含有 1 387 条 OTU,C 组独占 434 条 OTU,S 组独占 625 条 OTU,两组共含有 762 条

OTU. 由此可以知道 S 组有着更多的 OTU 数目和独有 OTU 数目,且 S 组独有的细菌 OTU 数目比 C 组多 191 条,两组共有的细菌 OTU 数目是 C 组独有 OTU 数目的 1.75 倍,通过这些 OTU 分布可以推测 S 组患者胆汁细菌有着更大的物种组成和多样性. 由图 b 可知所有样本中丰度前 5 的 OTU 依次为 OTU147 (11.70%)、OTU178 (8.36%)、OTU1174 (6.55%)、OTU177 (5.86%)、OTU1311 (4.88%),other 为合并丰度小于 1% 的 OTU 占 23.1%. 由 OTU 百分占比可以知道此次胆汁细菌高通量测序的物种覆盖度广、测序深度高.

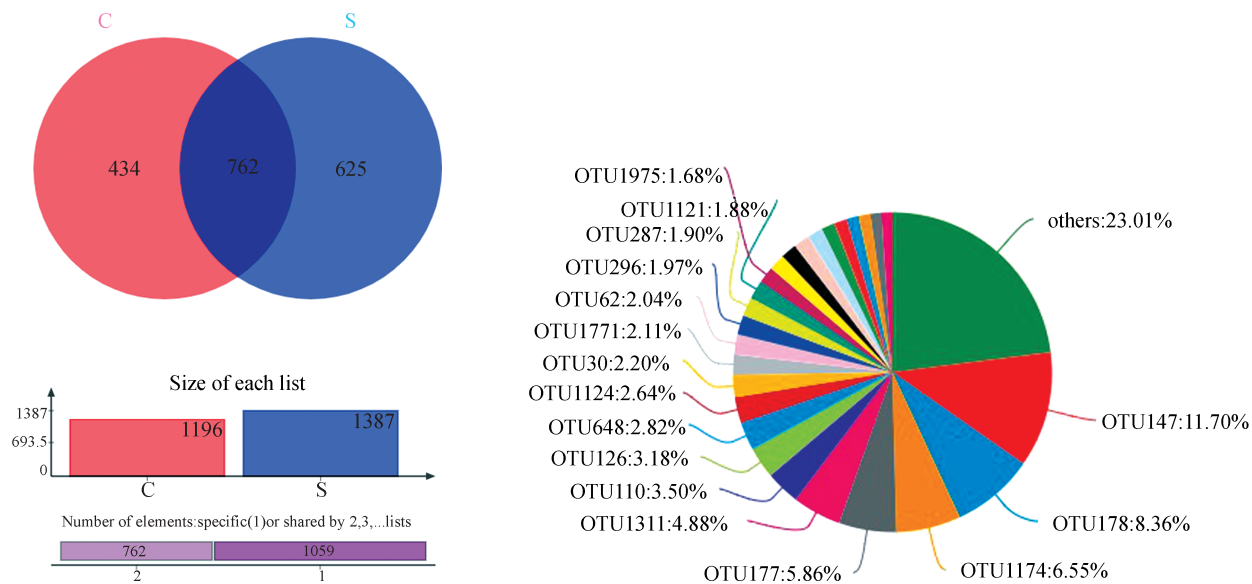


图 1 胆结石患者细菌组成分析
a. Venn 作图分析 OTU 组间分布; b. 所有患者 OTU 组成百分比
Fig. 1 Analysis of bacterial composition in patients with cholelithiasis
a. Venn chart of OTU distribution between groups; b. Percentage of OTU composition in all patients.

图 2 为门水平和属水平群落组成柱状图,由图 a 可知门水平丰度最高的是变形菌门(Proteobacteria, 48.24%),其次是厚壁菌门(Firmicutes, 34.49%)、放线菌门(Actinobacteria, 8.42%)、拟杆菌门(Bacteroidetes, 6.91%)和蓝藻菌门(Cyanobacteria, 0.53%), other 为合并丰度小于 0.05% 的门,占 1.40%. Proteobacteria、Firmicutes、Actinobacteria 和 Bacteroidetes 这四个门占所有样本的 97.88%,是患者胆汁细菌中的优势种群,可以看到在正常人肠道中含量很低的变形菌门和放线菌门在胆结石患者胆汁中大幅增加,分别超过了优势菌门厚壁菌门和拟杆菌门,可见其变形菌门和放线菌门在患者胆汁感染中起着不可忽视的作用. 由图 b 可知胆汁细菌中属水平丰度最高的细菌属为 *Escherichia-Shigella* (11.36%),其次为

Enterobacter (8.11%), *Anoxybacillus* (6.55%), *Klebsiella* (5.69%), *Serratia* (5.18%), *Enterococcus* (4.79%), *Streptomyces* (4.74%), *Lachnospirillum* (3.43%), *Massilia* (3.32%) 和 *Bacillus* (3.31%), other 为合并丰度小于 1% 的属,占 18.33%. 这些丰度前 10 的细菌加起来占胆汁细菌的 56.48%,可见其感染细菌的种类分布很广. 胆汁中含量丰富的大肠埃希菌(*Escherichia-Shigella*)、肠杆菌(*Escherichia-Shigella*)、克雷伯菌(*Klebsiella*)都是肠道正常定植菌,在胆汁中含量与在肠道类似,当这些条件致病菌通过松弛的奥狄氏括约肌或者肠壁黏膜感染胆道便成了不可忽视的病原菌,另外厌氧病原菌厌氧芽孢杆菌属(*Anoxybacillus*)含量在胆汁细菌中排第三,其有可能加重胆结石患者胆汁细菌感染. 值得注意的是健康

人肠道中含量很少的的肠球菌(*Enterococcus*)和*Lachnoclostridium*显著增加。附着肠壁黏膜中的肠球菌是一种重要的医院病原菌,其极易获得耐药性,耐药肠球菌通过肠壁黏膜容易引发患者尿路感

染、腹腔感染、败血症等感染,对患者的临床诊治产生不利影响。这些在门水平和属水平上的菌属组成分布情况为下面继续深入挖掘寻找相关差异致病菌属打下了基础。

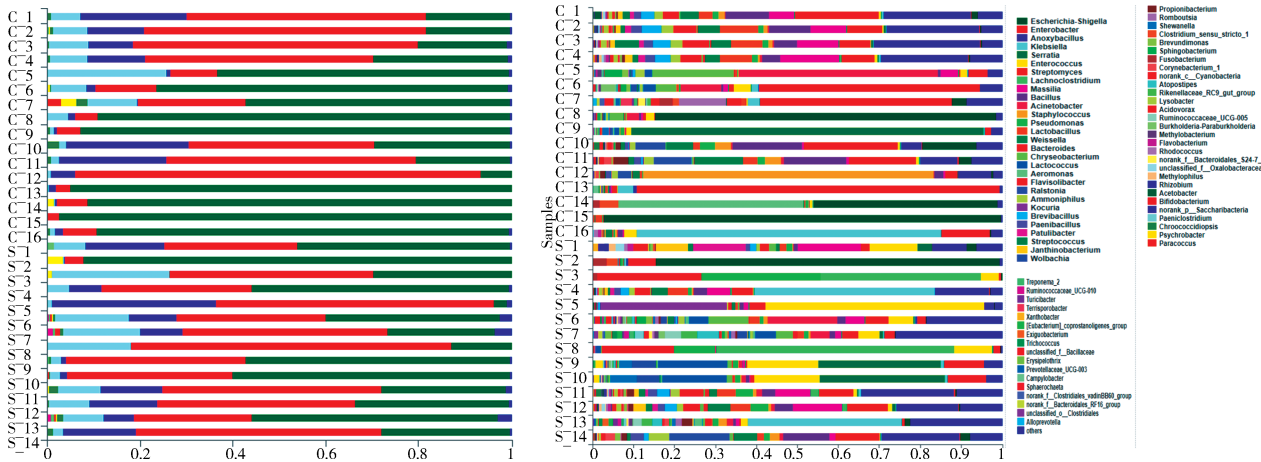


图 2 患者胆汁在门水平(a)和属水平(b)的细菌群落分布
Fig.2 Microbiota of bile at the phylum (a) and genus (b) level

3.3 患者胆汁细菌多样性

30 个胆汁样品的高通量测序共得到 1 340 273 条高质量有效序列,单个样品序列长度为 206~555,其序列平均长度为 444.58 bp,按最小样本序列数抽平后其单个样品有效序列数为 30 328,以 97%相似度划分,得到 1 821 条 OTUs。如表 2 组间 α 多样性指数差异检验表所示各样本文库的覆盖率(coverage)范围均在 99.7%以上,说明测序数据能够代表各样本细菌的真实情况。S 组样本反应细菌物种丰富度的 Sobs、Chao、ace 指数和反应

样本 α 多样性的 Shannon、Simpson 指数均高于 C 组但没有显著性差异,S 组物种均匀度指数 Shannoneven 和 Simpstoneven 指数显著高于 C 组($P<0.05$)。除了 Simpson 指数(Simpson 指数值越大,群落多样性越低)S 组小于 C 组外,其余指数 S 组均大于 C 组。这说明了 SOL 患者比起非 SOL 患者其胆汁细菌群落含有更多物种,更大的物种多样性,更均匀的物种分布,这表明了患有 SOL 的胆结石患者往往有着更严重的细菌感染,更严重的细菌感染也就意味着更严重的肝胆功能损伤

表 2 α 多样性指数组间差异 T 检验

Tab.2 Student's t test of α Diversity Index for the difference between groups

Estimators	C~Mean \pm Sd	S~Mean \pm Sd	P
coverage	0.999 \pm 0.000 35	0.999 4 \pm 0.000 31	0.740
Sobs	144.940 \pm 46.837	157.360 \pm 72.494	0.577
Chao	157.980 \pm 50.166	175.070 \pm 68.742	0.439
ace	157.780 \pm 49.763	175.560 \pm 61.995	0.391
Shannoneven	0.383 \pm 0.185	0.519 \pm 0.177	0.050 *
Simpstoneven	0.033 3 \pm 0.021 2	0.060 \pm 0.037	0.019 *
Shannon	1.936 \pm 0.997	2.634 \pm 1.106	0.080
Simpson	0.381 \pm 0.291	0.205 \pm 0.188	0.063

** indicates that the difference is extremely significant at the level of $\alpha = 0.01$, and * indicates that the difference is significant at the level of $\alpha = 0.05$.

根据图 3-A 的 PLS-DA(Partial Least Squares Discriminant Analysis),即偏最小二乘法判别分析结果显示,除了 S 组的 S6、S7 和 S13 样品,C 组和 S 组的其余样本在 SOL 分组条件下差异明显,SOL 患者与非 SOL 患者的胆汁菌群组成存在明显差异,这说明 SOL 会影响胆汁感染细菌的种类。Fig 3-B 是基于 Weighted-unifrac 算法 OTU 水平的主成分(PCoA)分析,可以看到 PCoA 分析两组样品同样差异明显且 S 组样品更为分散,PC1 是解释 C 组和 S 组细菌分布差异的主要成分,两组分布差异明显。这些差异表明特定的胆汁细菌与胆结石患者括奥狄氏约肌松弛有着密切的相关性。

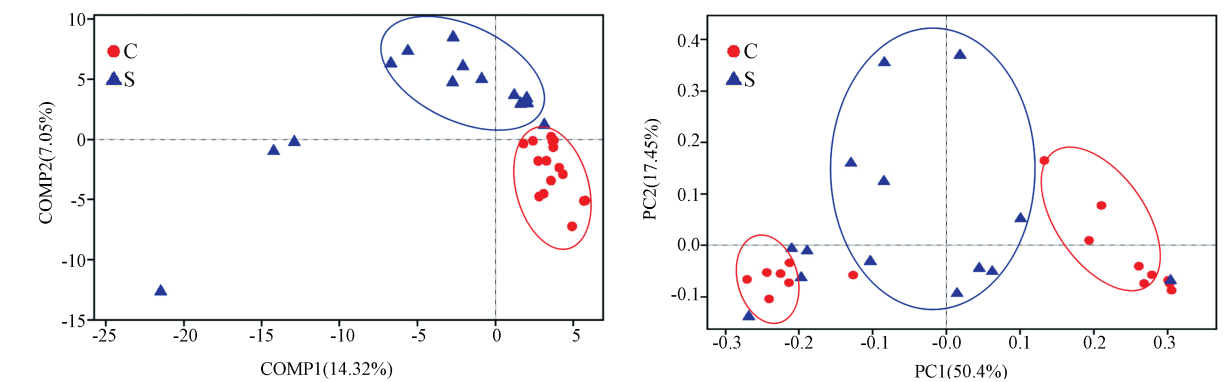


图 3 A. 组间 OTU 水平的 PLS-DA 分析; B. 组间 OTU 水平主坐标(PCoA)分析(基于 Weighted-unifrac 算法)
Fig. 3 A. PLS-DA analysis between groups on OTU level; B. Principal co-ordinates analysis (PCoA) based on Weighted-unifrac algorithm between groups on OTU level

3.4 患者胆汁菌属差异

根据 Fig 4-A 门水平和 Fig 4-B 属水平基于 Wilcoxon 秩和检验的 C、S 两组物种差异比较分析结果图显示,丰度最高的 Proteobacteria 门 S 组含量低于 C 组,而 Firmicutes、Actinobacteria 和 Bacteroidetes 三个胆汁细菌主要构成门在 S 组丰度高于 C 组。属水平 S 组肠球菌属 *Enterococcus* 和 *Lachnoclostridium* 显著多于 C 组,S 组葡萄球菌属 *Staphylococcus* 丰度高于 C 组但没有显著性,丰度最高的 *Escherichia-Shigella*、*Enterobacter*、*Anoxybacillus* 三个属 C 组高于 S 组但没有显著性差异。S 组与 C 组相比 *Enterococcus*、*Lachnoclostrid-*

ium 两个肠道机会致病菌属丰度增加,*Escherichia-Shigella*、*Enterobacter*、*Anoxybacillus* 三个菌属丰度下降,这说明了 SOL 胆结石患者的胆汁与非 SOL 患者的胆汁相比感染了更多的肠道致病菌,这些感染细菌的差异可能是奥狄氏括约肌松弛引起的,而肠球菌等 S 组高丰度菌则可能通过分泌炎症因子等细菌代谢产物影响肝胆细胞代谢功能,从而影响胆红素代谢和胆汁平衡,然后对奥狄氏括约肌功能造成影响。这些细菌的感染也可能通过刺激肠道免疫淋巴细胞和影响奥狄氏括约肌细胞内源性 NOS 酶的活性来对奥狄氏括约肌功能造成影响,进一步加重胆结石患者感染病情并引起胆结石的复发。

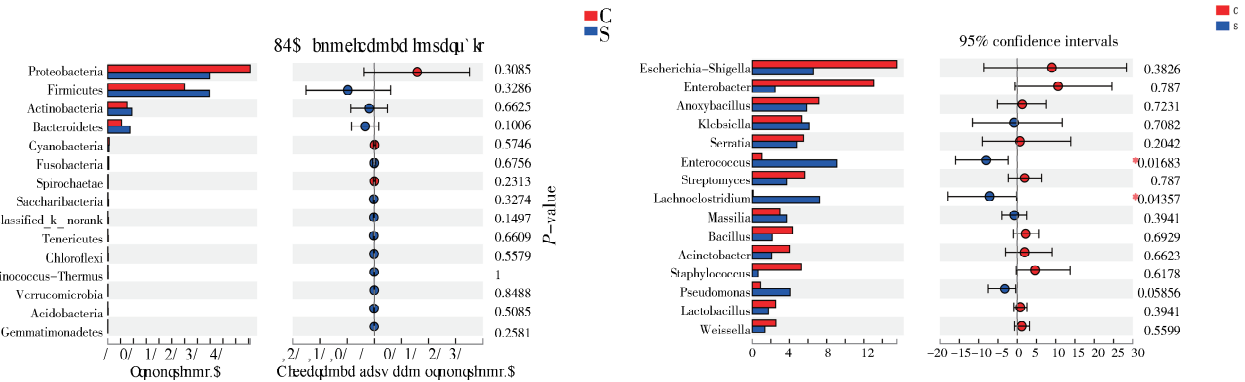


图 4 基于 Wilcoxon 秩和检验比较分析 C、S 两组物种差异
A. 门水平差异;B. 属水平差异
Fig4. Comparative analysis of species differences between C and S groups based on Wilcoxon rank-sum test
A. Species difference on phylum level ;B. Species difference on genus level

4 讨 论

本研究发现胆结石患者中奥狄氏括约肌松弛组的总胆红素 TBIL、直接胆红素 DBIL、间接胆红素 IBIL 显著 ($P < 0.05$) 高于奥狄氏括约肌正常组,而腺苷脱氨酶 ADA 水平则显著 ($P < 0.05$) 低

于非 SOL 患者。目前有文献报道胆红素与人体疾病如糖尿病^[16]、精神分裂症^[17]、直肠癌^[18]、胆结石^[19]等有着密切联系。胆红素的代谢过程是 IBIL 在血液中白蛋白结合后运输到肝脏并转化为 DBIL 并由胆汁分泌进入肠道,然后 DBIL 被大肠细胞和大肠杆菌等分泌的 β -葡萄糖醛酸糖苷酶水解成

IBIL,大部分再由厌氧细菌还原和氧化后形成尿胆素,其大部分随粪便排除,小部分被重新吸收利用^[20]。SOL患者TBIL的显著升高可能意味着因为奥狄氏括约肌的松弛患者胆汁排泄功能受到影响,且其胆肠道缺乏分解代谢胆红素的细菌种属,从而导致其胆红素水平过高。ADA水平在临床上常用于判断肝炎,罗秋红^[21]研究指出血清ADA对鉴别黄疸具有重要的临床意义,且肝细胞性黄疸患者组的血清ADA水平为(30.55 ± 12.79 U/L)显著高于阻塞性黄疸患者组的血清ADA水平(12.15 ± 5.28 U/L)($P < 0.01$),其阻塞性黄疸血清ADA水平与本研究一致也是在正常范围,本研究胆结石患者中SOL组ADA水平较非松弛组显著下降意味着SOL有利于患者梗阻性黄疸的缓解。值得一提的是患者总胆汁酸TBA($\mu\text{mol/L}$)水平均升高超过参考值,S组TBA水平高于C组但没有显著性差异。这表明由于患者胆结石的阻塞,导致患者胆汁淤积肝胆代谢功能异常从而直接引起患者胆红素水平升高,而SOL患者由于奥狄氏括约肌不能正常排泄胆汁造成更严重的炎症和胆汁淤积,从而导致其总胆汁酸、胆红素水平显著高于奥狄氏括约肌正常患者。另有文章报道^[22],胆红素水平升高会显著影响内皮型一氧化氮合酶NOS3,而NOS产物NO作为神经递质^[23]参与奥狄氏括约肌调控,结合本研究可以推测胆结石患者胆汁中细菌的NOS酶对奥狄氏括约肌松弛和胆红素水平的升高可能存在一定影响。

目前研究胆结石患者奥狄氏松弛与胆汁细菌群落结构相关性的文章很少,Liang等人^[5]研究发现与非SOL的患者相比,SOL患者表现出更严重的炎症,变形杆菌门和厚壁菌门是患者胆汁中分布最广的细菌类群,尤其是肠杆菌科,同时发现SOL患者具有更多的菌群,其*Bilophila*、*Shewanella algae*等病原菌群落较丰富,无害菌减少。本研究16S rRNA基因高通量测序结果则显示患者胆汁细菌 α 多样性除了均匀度都没有显著性差异,患者胆汁优势菌为变形菌门、厚壁菌门和放线菌门。SOL松弛组丰度显著高于($P < 0.05$)奥狄氏括约肌非松弛组的菌属为肠球菌属和*Lachnospirillum*属。对于本研究发现的奥狄氏括约肌松弛影响的差异菌株,其相关作用机制文献报道较少。Golińska等人^[24]研究发现肠球菌强粘附于肠上皮,形成生物膜,具有抗氧化防御机制,对炎症过程影响最大。Llorente等^[25]研究发现肠道肠球菌数

量的增加和转移,会促进小鼠酒精性肝病、非酒精性脂肪性肝病和非酒精性脂肪性肝炎的进展,加重实验小鼠乙醇诱导的肝部炎症。由此可以推测SOL患者胆汁肠球菌的丰度的显著增加会导致病人更加严重的炎症反应,加重患者病情,肠球菌对奥狄氏括约肌的松弛、ADA水平和胆红素代谢也可能存在潜在的影响。对于*Lachnospirillum*属,除了近几年有文献报道从肠道^[26]和尿道^[27]分离培养出*Lachnospirillum*菌株之外,其他关于此菌属的文献研究报道较少,对于其可能的致病机制还有待进一步研究。

本研究基于Illumina MiSeq平台高通量测序研究胆结石患者胆汁细菌群落,统计发现SOL与非SOL胆结石患者在胆红素水平和ADA水平上差异显著,奥狄氏括约肌松弛与非松弛胆结石患者胆汁中的细菌组成和多样性也存在着显著差异,差异菌属如*Enterococcus*和*Lachnospirillum*可能对SOL有潜在影响。这些差异同时也可能与胆结石患者胆红素代谢、腺苷脱氨酶水平的异常存在潜在联系,这为SOL胆结石患者的临床治疗和研究SOL的细菌学致病机理打下了基础。

参考文献:

- [1] Al-Sukhni W, Gallinger S, Pratzner A, *et al.* Recurrent pyogenic cholangitis with hepatolithiasis-the role of surgical therapy in North America [J]. J Gastrointest Surg, 2008, 12: 496.
- [2] Stewart L, Griffiss J M, Jarvis G A, *et al.* Biliary bacterial factors determine the path of gallstone formation [J]. Am J Surg, 2006, 192: 598.
- [3] Sung J, Costerton J, Shaffer E. Defense system in the biliary tract against bacterial infection [J]. Dig Dis Sci, 1992, 37: 689.
- [4] Afghani E, Lo S K, Covington P S, *et al.* Sphincter of Oddi Function and Risk Factors for Dysfunction [J]. Front Nutr, 2017, 4:1.
- [5] Liang T, Su W, Zhang Q, *et al.* Roles of sphincter of Oddi laxity in bile duct microenvironment in patients with cholangiolithiasis: From the perspective of the microbiome and metabolome [J]. Am Coll Surg, 2016, 222: 269.
- [6] Simula M E, Brookes S J H, Meedeniya A C B, *et al.* Distribution of nitric oxide synthase and vasoactive intestinal polypeptide immunoreactivity in the sphincter of Oddi and duodenum of the possum [J]. J Cell Tissue Res, 2001, 304: 31.

[7] Ju F, Zhang T. 16S rRNA gene high-throughput sequencing data mining of microbial diversity and interactions[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2015, 99: 4119.

[8] 刘筱雪,袁文娟,丁涛. 基于高通量测序对四川怀远特色发酵食品微生物群落结构分析[J]. 四川大学学报:自然科学版, 2019, 56: 537.

[9] Qin J, Li R, Raes J, *et al.* A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing [J]. Nature, 2010, 464: 59.

[10] Schrupf E, Kummel M, Valestrand L, *et al.* The gut microbiota contributes to a mouse model of spontaneous bile duct inflammation [J]. J Hepatol, 2017, 66: 382.

[11] Pereira P, Aho V, Arola J, *et al.* Bile microbiota in primary sclerosing cholangitis: impact on disease progression and development of biliary dysplasia [J]. PLoS One, 2017, 12: e0182924.

[12] Gottschick C, Deng Z L, Vital M, *et al.* The urinary microbiota of men and women and its changes in women during bacterial vaginosis and antibiotic treatment [J]. Microbiome, 2017, 5: 99.

[13] Dréno B, Araviiskaia E, Berardesca E, *et al.* Microbiome in healthy skin, update for dermatologists [J]. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2016, 30: 2038.

[14] Dreno B, Martin R, Moyal D, *et al.* Skin microbiome and acne vulgaris: staphylococcus, a new actor in acne [J]. Exp Dermatol, 2017, 26: 798.

[15] Jiang B, Liang X, Chen Y, *et al.* Integrating next-generation sequencing and traditional tongue diagnosis to determine tongue coating microbiome [J]. Sci Rep, 2012, 2: 936.

[16] Liu M, Li Y, Li J, *et al.* Elevated serum total bilirubin levels are negatively associated with major diabetic complications among Chinese senile diabetic patients[J]. J Diabetes complicat, 2017, 31: 213.

[17] Yin X L, Jia Q F, Zhang G Y, *et al.* Association between decreased serum TBIL concentration and immediate memory impairment in schizophrenia patients [J]. Sci Rep, 2019, 9: 1622.

[18] Yang L, Ge L Y, Yu T, *et al.* The prognostic impact of serum bilirubin in stage IV colorectal cancer patients [J]. J Clin Lab Anal, 2018, 32:2.

[19] Kuzu U B, Ödemiş B, Dişibeyaz S, *et al.* Management of suspected common bile duct stone: diagnostic yield of current guidelines [J]. HPB (Oxford), 2017, 19: 126.

[20] 林佳媛,马国. 胆红素代谢及其调节的研究进展[J]. 复旦学报:医学版, 2014, 41: 405.

[21] 罗秋红. 黄疸阳黄患者血清腺苷脱氨酶变化及临床意义[D]. 福州:福建中医药大学, 2011.

[22] Yao Y, Fang Z, Yang S, *et al.* Evaluation of genetic effect of NOS3 and G×E interaction on the variability of serum bilirubin in a Han Chinese population [J]. Nitric Oxide, 2017, 70: 25.

[23] Förstermann U, Sessa W C. Nitric oxide synthases: regulation and function [J]. Eur Heart J, 2012, 33: 829, 837a.

[24] Golińska E, Tomusiak A, Gosiewski T, *et al.* Virulence factors of Enterococcus strains isolated from patients with inflammatory bowel disease [J]. World J Gastroenterol, 2013, 19: 3562.

[25] Llorente C, Jepsen P, Inamine T, *et al.* Gastric acid suppression promotes alcoholic liver disease by inducing overgrowth of intestinal Enterococcus [J]. Nat Commun, 2017, 8: 837.

[26] Brahimi S, Cadoret F, Fournier P E, *et al.* ‘Lachnoclostridium urinimassiliense’ sp. nov. and ‘Lachnoclostridium phocaense’ sp. nov, two new bacterial species isolated from human urine after kidney transplantation [R]. New Microbes New Infect, 2017, 16: 73.

[27] Tidjani Alou M, Lagier J C, La Scola B, *et al.* ‘Lachnoclostridium massiliosenegalense’, a new bacterial species isolated from the human gut microbiota [R]. New Microbes New Infect, 2016, 14: 4.

引用本文格式:

中文: 李洋, 刘永康, 刘保, 等. 奥狄氏括约肌松弛胆结石患者的胆汁细菌多样性[J]. 四川大学学报: 自然科学版, 2020, 57: 400.

英文: Li Y, Liu Y K, Liu B, *et al.* Bile bacterial diversity in patients with cholelithiasis and sphincter of Oddi laxity [J]. J Sichuan Univ: Nat Sci Ed, 2020, 57: 400.