DOI:10.16016/j.2097-0927.202310041

异基因造血干细胞移植后患者口腔及肠道菌群与早期胃肠道急性移植物抗宿主病的关系

赖 静[1*],傅 鑫[2*],李成龙[1],杨 曦[1],周 杨[1],黄晓兵[1] 610072,成都,四川省医学科学院·四川省人民医院(电子科技大学医学院)血液内科[1];310012,杭州,浙江省立同德医院检验科[2]

[摘要] **目的** 初步探讨异基因造血干细胞移植(allogeneic hematopoietic stem cell transplantation,allo-HSCT)患者肠道菌群及口腔菌群的变化与早期胃肠道急性移植物抗宿主病(acute graft versus host disease,aGVHD)之间的关联,寻找可能有效的生物学标志物。**方法** 选取2021年9月至2023年6月在四川省人民医院血液内科接受allo-HSCT后1个月内发生胃肠道aGVHD的10例急性白血病患者,收集其aGVHD前后粪便样本与唾液样本,采用16S rRNA测序分析方法,研究早期胃肠道aGVHD发生前后肠道菌群、口腔菌群的差异性改变。**结果** ①肠道菌群中拟杆菌属减少、肠球菌属及肠杆菌科增加与早期上消化道aGVHD发生呈正相关($P<0.05$),而口腔菌群整体微生物多样性无显著差异($P>0.05$)。②胃肠道aGVHD前后肠道菌群LEfSe分析发现克雷伯杆菌属、肠球菌属增加,大肠埃希菌减少;口腔菌群LEfSe分析发现存在差异显著10个微生物标志物,其中γ-变形菌纲的差异较为显著。③肠道菌群β多样性差异显著($P=0.03$),而口腔菌群α、β多样性无显著差异。**结论** Allo-HSCT患者发生早期胃肠道aGVHD前后肠道菌群存在显著差异,可能与口腔菌群变化有关。

[关键词] 异基因造血干细胞移植;急性移植物抗宿主病;肠道菌群;口腔菌群
[中图法分类号] R372;R392.8;R574 [文献标志码] A

Association of intestinal and oral microbiota with acute graft versus host disease of the gastrointestinal tract in patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation

LAI Jing[1*], FU Xin[2*], LI Chenglong[1], YANG Xi[1], ZHOU Yang[1], HUANG Xiaobing[1] [1]Department of Hematology, Sichuan Academy of Medical Sciences-Sichuan Provincial People's Hospital (School of Medicine, University of Electronic Science and Technology), Chengdu, Sichuan Province, 610072; [2]Department of Clinical Laboratory, Zhejiang Tongde Hospital, Hangzhou, Zhejiang Province, 310012, China

[**Abstract**] **Objective** To preliminarily investigate the association between changes in intestinal microbiota and oral microbiota of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT) patients and early gastrointestinal acute graft versus host disease (aGVHD), and try to explore potentially effective biomarkers and provide theoretical basis for early prediction and intervention of gastrointestinal aGVHD. **Methods** Ten acute leukemia patients who developed gastrointestinal aGVHD within 1 month after receiving allo-HSCT in Department of Hematology of Sichuan Provincial People's Hospital from September 2021 to June 2023 were enrolled, and their fecal samples and saliva samples before and after the aGVHD were collected. 16S rRNA sequencing analysis was applied for the differential changes in intestinal and oral microbiota before and after the development of early gastrointestinal aGVHD. **Results** ① A decrease in *Bacteroides spp.* and

[基金项目] 成都市科技局技术创新项目(2019-YF05-00638-S1V)
*: 同等贡献者
[通信作者] 黄晓兵,E-mail:huangxiaobing@med.uestc.edu.cn

2097-0927/Copyright © 2024,陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循CC BY许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

an increase in *Enterococcus spp.* and *Enterobacteriaceae spp.* in the intestinal microbiota were positively correlated with the occurrence of early upper gastrointestinal aGVHD ($P<0.05$), whereas no significant difference was observed in the overall microbial diversity of the oral microbiota ($P>0.05$). ② LEfSe analysis of the intestinal microbiota before and after gastrointestinal aGVHD revealed an increase in *Klebsiella spp.* and *Enterococcus spp.* and a decrease in *Escherichia coli*; In the oral microbiota, LEfSe analysis revealed 10 microbial markers with significant difference, of which Gamma proteobacteria was the most significant. ③ The difference in β-diversity of the intestinal microbiota was significant ($P=0.03$), whereas there was no significant difference in the α- and β-diversity of the oral microbiota. **Conclusion** Significant differences are found in intestinal microbiota before and after the occurrence of early gastrointestinal aGVHD in patients after Allo-HSCT, and the occurrence may have a correlation with the chang in oral microbiota.

[**Key words**] allogeneic hematopoietic stem cell transplantation; acute graft versus host disease; intestinal microbiota; oral microbiota

Supported by the Technology Innovation Project of Chengdu Science and Technology Bureau (2019-YF05-00638-S1V). LAI Jing and FU Xin contributed equally to the article. Corresponding author: HUANG Xiaobing, E-mail: huangxiaobing@med.uestc.edu.cn

尽管异基因造血干细胞移植(allogeneic hematopoietic stem cell transplantation,allo-HSCT)技术不断改进,急性移植物抗宿主病(acute graft-versus-host disease,aGVHD)依然是移植后主要并发症及非复发死亡原因之一[1]。在多个 aGVHD 的靶器官中,胃肠道尤其容易受到同种异体免疫反应影响,是移植后近期并发症的主要来源和关键靶点[2]。近 10 年来用于表征微生物组的测序技术和组学技术得到了长足发展,推动了人体共生微生物群的研究。肠道菌群作为人体最大、最复杂的共生微生态系统,与 aGVHD 的相关性研究也有所突破。研究显示肠道菌群及代谢产物和 allo-HSCT 后 aGVHD 的发生发展有着密切联系,肠道菌群的结构组成或多样性变化可能预示 aGVHD 发生及预后[3-5]。这些研究多集中于探索肠道菌群与下消化道 aGVHD 的相关性,而一旦患者出现腹痛、腹泻等下消化道排异症状时治疗难度增大且预后欠佳。消化道 aGVHD 出现具有一定"时序性",即早期(移植后 30 d 内)aGVHD 往往表现为以恶心、呕吐为主的上消化道症状,若未能得到及时治疗,部分患者可进展成以腹痛、腹泻等为主的下消化道 aGVHD。因此,本研究初步探索肠道菌群与症状较轻早期上消化道 aGVHD 的相关性。

口腔微生物也是构成另一个影响人体健康的重要微生态系统,并且与肠道菌群相比,其菌群结构相对较稳定。近年来口腔微生物组与多种疾病间的关联性逐渐被证实,包括消化系统疾病、心血管疾病、肿瘤等[6]。最近研究表明,口腔内细菌可以转移到肠道导致肠道菌群失调[7-8]。在 allo-HSCT 研究领域口腔菌群的研究仍然有限。基于消化道 aGVHD 出现"时序性"的临床观察,本研究初步探讨 allo-HSCT 患者肠道菌群及口腔菌群的变化与早期胃肠道 aGVHD 之间关联,尝试寻找可能有效的生物学标志物,为早期预测及干预胃肠道 aGVHD 提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 研究对象

收集 2021 年 9 月至 2023 年 6 月在四川省人民医院血液内科接受异基因单倍体造血干细胞移植的急性白血病患者 10 例,将中性粒细胞植活后停用抗感染治疗 14 d 和移植后 1 个月内发生胃肠道 aGVHD 时的同一患者作为对照组和胃肠道 GVHD 组进行自身对照研究。研究对象的预处理方案均为氟达拉滨(Flu)+白消安(Bu)+环磷酰胺(CTX)+抗人 T 淋巴细胞兔免疫球蛋白-F(ATG-F)。GVHD 预防方案为环孢素(CsA)+吗替麦考酚酯(MMF)+环磷酰胺(CTX)+巴利昔单抗。若患者发生 GVHD,则使用 CsA、MMF、甲基泼尼松龙和他克莫司等进行治疗。移植过程中予以头孢唑肟钠预防细菌感染,复方磺胺甲恶唑预防肺孢子菌感染,卡泊芬净预防真菌感染。本研究经四川省人民医院伦理委员会批准[伦(研)2022 年第 282 号],获得研究对象知情同意。

纳入标准:①急性白血病患者,包括急性髓系白血病和急性淋巴细胞白血病。急性髓系白血病诊断标准参考成人急性髓系白血病(非急性早幼粒细胞白血病)中国诊疗指南(2023 年版),急性淋巴细胞白血病诊断标准参考中国成人急性淋巴白血病诊断与治疗指南(2021 年版);②年龄 18~50 岁;③接受单倍体 allo-HSCT 治疗;④在 allo-HSCT 治疗后的随访过程中出现早期胃肠道 aGVHD;⑤移植前微小残留病灶(minimal residual disease, MRD)阴性;⑥18.5 kg/m^2≤体质量指

数(BMI)<24.0 kg/m^2;⑦中性粒细胞植活后停用抗感染治疗14 d,中性粒细胞植活标准为连续3 d中性粒细胞绝对计数(ANC)≥0.5×10^9/L。

排除标准:①有消化系统疾病史,如消化性溃疡、炎症性肠病等;②合并有严重的心血管疾病、代谢性疾病或自身免疫性疾病,如高血压、糖尿病、高脂血症等;③在移植后至发生早期胃肠道aGVHD的随访过程中发生感染而使用抗生素、糖皮质激素治疗的患者;④采样前1个月内服用过益生元、益生菌类物质,如酸奶、双歧杆菌片等;⑤有消化系统疾病手术史;⑥其他原因不能配合的研究对象。

早期胃肠道aGVHD诊断标准参考aGVHD国际联盟(MAGIC)分级标准。主要诊断依据为恶心持续大于3 d或至少2 d呕吐>2次/d。如患者出现发热>37.3 ℃(排除感染相关发热)、肝功能异常(排除药物相关因素)、活动性GVHD皮疹则更加支持早期胃肠道aGVHD诊断。

1.2 方法

1.2.1 标本采集 粪便标本采集:同一患者采样2次,第1次采样于中性粒细胞植活后停用抗感染治疗第14天,第2次采样于发生胃肠道aGVHD时,采样时间段为7:00-9:00,在实验前告知患者排空膀胱,确保研究对象的粪便样本不受尿液污染,然后将粪便排入清洁、干燥的容器中,使用无菌采样管进行取样,质量约2 g(黄豆大小)。采样完毕后于管壁标记信息,放置于冰盒内暂存,在2 h之内将样本转移到-80 ℃的低温冰箱中进行冻存备用。唾液标本采集:与粪便样本采集同期进行,采样前3 min禁止研究对象刷牙、进食。采样时嘱其自然分泌唾液并保持于口腔中至少1 min,随后将唾液留取至5 mL无菌冻存管中,为3~4 mL。采样完毕后于管壁标记信息,放置于冰盒内暂存,在2 h内将样本转移到-80 ℃的低温冰箱中进行冻存备用。

1.2.2 样本总DNA提取 使用HiPure Stool DNA Mini Kit试剂盒从粪便样本和唾液样本中提取基因组DNA,并利用Qubit技术进行浓度测定。具体操作步骤见说明书。

1.2.3 PCR扩增 以基因组DNA为模板选取16S rDNA V3-V4区扩增引物,引物序列为338F:5′-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3′,806R:5′-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3′,使用TransGen Biotech公司的Transtart *Taq* DNA Polymerase试剂盒进行扩增。

1.2.4 文库构建和上机测序 采用DNA Library Prep Kitfor Illumina试剂盒构建文库,进行Qubit定量和检测,最后通过Illumina Miseq测序平台进行双端测序分析。

1.2.5 数据分析 将Illumina测序仪获得的原始数据进行拼接、去除嵌合体等一系列的质控工作后,以SILVA database(version 132)作为参考数据集,通过QIIME将质控后的序列聚类成操作分类单元(operational taxonomic unit,OTU),并按99%的相似度对样本序列进行OTU聚类。采用UCLUST分类器对OTU序列进行注释以获得分类学特征。统计分析各个样本的OTU特征及各个OTU中所含序列数。

1.2.6 菌群评估方法

1.2.6.1 菌群物种组成结构 菌群物种组成结构是指一个群落中包含的物种数目,通常由界(kingdom)、门(phylum)、纲(class)、目(order)、科(family)、属(genus)、种(species)7个分类单元组成。菌群的物种组成结构,主要用于描述样本中优势物种的丰度及其变化规律。通过对Illumina测序所得的OTU按99%的相似度进行OTU聚类得到OTU的分类学信息,并在门、纲、目、科、属、种水平进行统计分析,获得菌群的物种组成结构,以便直观体现优势微生物群在不同样本间的相对丰度变化情况。

1.2.6.2 Alpha多样性分析 Alpha多样性可以反映一个群落物种的丰富度和均匀度。Chao1、observed_species是衡量菌群丰富度常用的指标,指微生物种类的多少。当Chao1和observed_species值较高时,表明该群落中的OTU数量较多,该群落的物种丰富程度也较高。Shannon指数和Simpson指数是用来衡量菌群多样性的重要指标。Shannon指数用来评估微生物的多样性,Shannon值越大,说明微生物多样性越高。Simpson指数反映的是优势菌种在群落中的占比,若一个群落中优势菌种占比越大,其他非优势菌种占比则会减少。Simpson指数值越大,表明群落多样性越低。

1.2.6.3 Beta多样性分析 Beta多样性用于不同群落之间多样性的比较,也就是反映样本的组间差异。本研究采用ANOSIM分析。ANOSIM分析基于两样本之间的距离值排序获得的秩,以箱线图的形式展示组间与组内秩的分布,横坐标表示所有样本(Between)以及各分组,纵坐标表示距离(本研究使用Bray-Curtis距离)的秩,获得R值与P值2个重要统计指标,以便直观地判断组间差异是否显著不同于组内差异。通常$R>0$表示组间差异大于组内差异,$P<0.05$表示差异具有显著性。

1.2.6.4 显著差异分析 LEfSe是一种发现和解释高纬度数据生物标识的分析工具,可实现多个分组之间的菌群差异比较,用于发现组间具有统计学差异的生物标记物。该分析通过Kruskal-Wallis秩和检验来比较不同组间具有显著丰度差异的物种,并采用线性回归分析(LDA)来评估差异显著物种的影响力。

1.3 统计学分析

使用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,正态分布、方差齐的数据采用配对样本 t 检验,不符合正态分布、方差齐的数据采用 Wilcoxon 秩和检验,$P<0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般临床资料

收集 10 例患者发生早期胃肠道 aGVHD 前后的唾液样本及粪便样本。患者年龄 23~45(32.1±6.1)岁,其中男性 5 例,女性 5 例;AML 6 例,ALL 4 例。按照 aGVHD 国际联盟 MAGIC 分级标准,纳入研究对象均被诊断为早期胃肠道 aGVHD(上消化道 aGVHD Ⅰ级),研究对象发生早期胃肠道 aGVHD 的时间为移植后(22.9±4.4)d。见表 1。

2.2 测序分析

以中性粒细胞植活后停用抗感染治疗 14 d 时采集的样本作为对照组,发生早期胃肠道 aGVHD 时采集的样本作为胃肠道 GVHD 组进行测序并统计分析。两组粪便样本共获得 83 413 961 条有效序列,其中对照组粪便序列 41 606 844 条,胃肠道 GVHD 组粪便序列 41 807 117 条;两组唾液样本共获得 118 928 446 条有效序列,其中对照组唾液序列 60 280 707 条,胃肠道 GVHD 组唾液序列 58 647 739 条,用于构建 OTU。

2.3 物种注释及群落组成分析

对所有样本的优质序列按 99% 的相似度进行 OTU 聚类,采用 UCLUST 分类器对 OTU 代表序列进行注释,得到 allo-HSCT 患者在发生早期胃肠道 aGVHD 前后的肠道菌群、口腔菌群物种相对丰度信息。

2.3.1 肠道菌群群落组成分析 肠道菌群在门、科、属分类水平的物种相对丰度见图 1。

在门分类水平上,处于前 10 位的物种分别是:*Firmicutes*(厚壁菌门)、*Bacteroidetes*(拟杆菌门)、*Proteobacteria*(变形菌门)、*Actinobacteria*(放线菌门)、*Fusobacteria*(梭杆菌门)、*Patescibacteria*、*Verrucomicrobia*(疣微菌门)、*Tenericutes*(软壁菌门)、*Cyanobacteria*(蓝菌门)和 *Elusimicrobia*(迷踪菌门)。与对照组相比,早期胃肠道 aGVHD 组肠道菌群中 *Bacteroidetes*(拟杆菌门)的相对丰度减少,差异具有统计学意义($P<0.05$)。

在科分类水平上,处于前 10 位的物种分别是:*Bacteroidaceae*(拟杆菌科)、*Lachnospiraceae*(毛螺菌科)、*Enterobacteriaceae*(肠杆菌科)、*Enterococcaceae*(肠球菌科)、*Ruminococcaceae*(瘤胃球菌科)、*Erysipelotrichaceae*(丹毒丝菌科)、*Peptostreptococcaceae*(消化链球菌科)、*Veillonellaceae*(韦荣氏球菌科)、*Streptococcaceae*(链球菌科)和 *Pasteurellaceae*(巴斯德氏菌科)。与对照组相比,早期胃肠道 aGVHD 组肠道菌群中 *Enterococcaceae*(肠球菌科)的相对丰度增加,而 *Bacteroidaceae*(拟杆菌科)的相对丰度降低,差异具有统计学意义($P<0.05$)。

在属分类水平上,处于前 10 位的物种分别是:*Bacteroides*(拟杆菌属)、*Escherichia*(大肠杆菌属)、*Clostridioides*(梭菌属)、*Enterococcus*(肠球菌属)、*Erysipelatoclostridium*(丹毒丝梭菌属)、*Flavonifractor*、*Lachnoclostridium*、*hungatella*、*Veillonella*(韦荣球菌属)和 *Parabacteroides*(副杆菌属)。其中早期胃肠道 aGVHD 组肠道菌群中 *Bacteroides*(拟杆菌属)的相对丰度低于对照组,而 *Enterococcus*(肠球菌属)的相对丰度高于对照组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。

2.3.2 口腔菌群群落组成分析 分析 allo-HSCT 患者在发生早期胃肠道 aGVHD 前后的口腔菌群物种相对丰度信息。图 2 为口腔菌群在门、科、属水平分类的物种相对丰度图。结果显示早期胃肠道 aGVHD 时口腔菌群较对照组发生了改变,但各分类水平下两组物种差异均无统计学意义($P>0.05$)。

表 1 研究对象基本资料

病例	性别	年龄/岁	疾病	有无基础病	体质量指数/(kg/m^2)	aGVHD 发生时间及部位
病例 1	女	33	ALL	无	19.3	移植后+19 d(上消化道)
病例 2	女	45	AML	无	22.6	移植后+21 d(上消化道)
病例 3	男	31	ALL	无	22.1	移植后+32 d(上消化道)
病例 4	男	27	AML	无	20.4	移植后+23 d(上消化道、肝脏)
病例 5	女	25	AML	无	21.6	移植后+29 d(上消化道)
病例 6	女	23	ALL	无	23.3	移植后+25 d(上消化道、皮肤)
病例 7	男	34	AML	无	23.4	移植后+18 d(上消化道)
病例 8	男	33	ALL	无	21.9	移植后+21 d(上消化道)
病例 9	女	38	AML	无	22.8	移植后+18 d(上消化道、肝脏)
病例 10	男	32	AML	无	21.0	移植后+23 d(上消化道)

AML:急性髓系白血病;ALL:急性淋巴细胞白血病

2.4　微生物群落多样性分析

2.4.1　α多样性分析　　采用α多样性指数反映群落的丰富度和多样性。按照分组绘制箱线图,发现肠道菌群的Chao1、observed_species、Shannon指数、Simpson指数在胃肠道GVHD组与对照组中差异均无统计学意义($P>0.05$,图3)。同样,口腔菌群的多样性指数Chao1、observed_species、Shannon指数、Simpson指数在两组间差异也无统计学意义($P>0.05$,图4)。

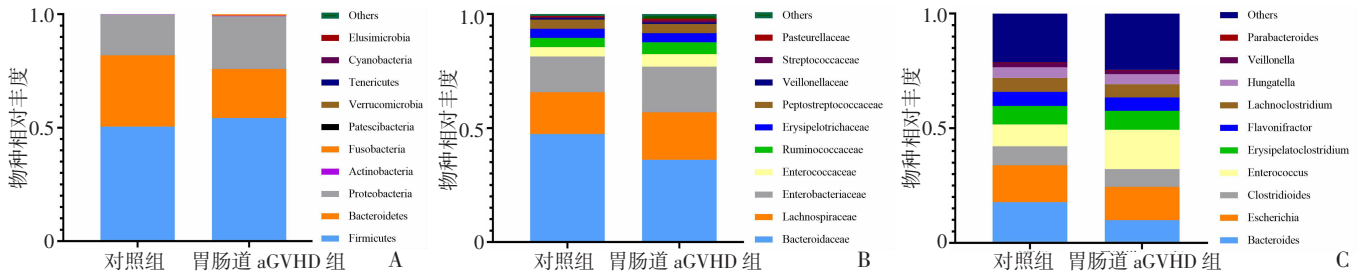


图1　肠道菌群在门(A)、科(B)、属(C)分类水平的物种相对丰度图

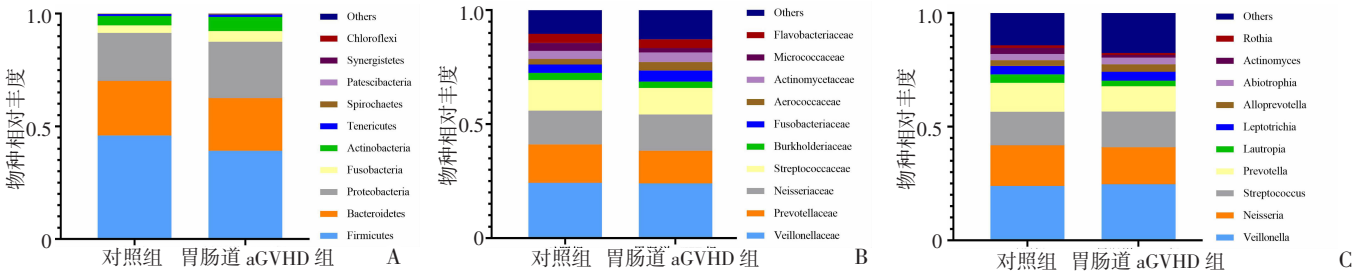
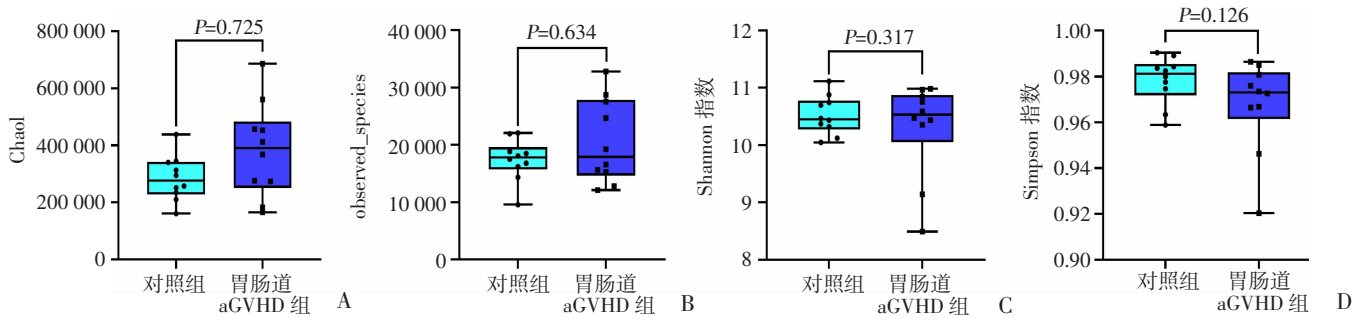
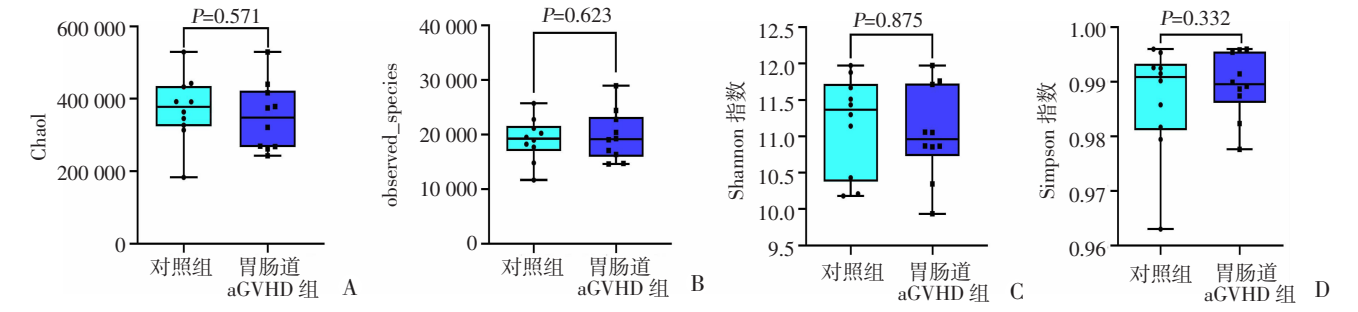


图2　口腔菌群在门(A)、科(B)、属(C)分类水平的物种相对丰度图



A:Chao1;B:observed_species;C:Shannon指数;D:Simpson指数

图3　肠道菌群α多样性分析



A:Chao1;B:observed_species;C:Shannon指数;D:Simpson指数

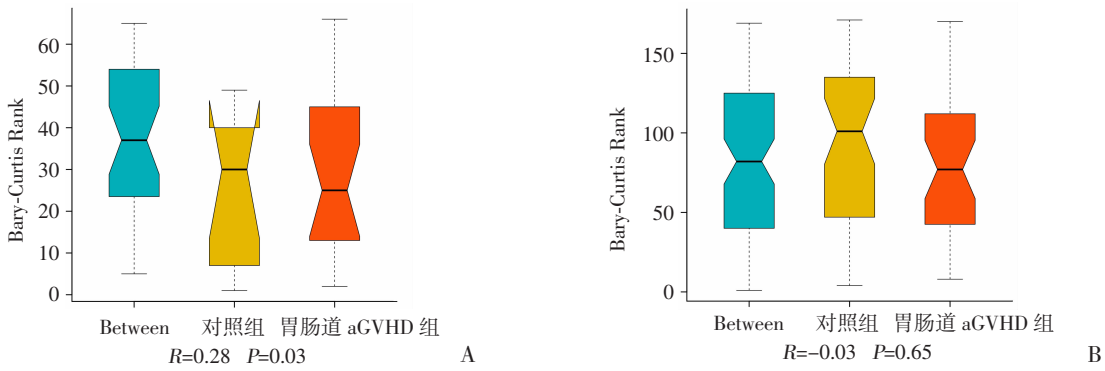
图4　口腔菌群α多样性分析

2.4.2 β多样性分析 采用ANOSIM分析胃肠道GVHD组与对照组之间肠道菌群是否有差异以及差异是否显著。从图5A中可以看出$R>0$($R=0.28$),说明胃肠道GVHD组与对照组的组间差异大于组内差异;$P<0.05$($P=0.03$),说明差异显著。

胃肠道GVHD组与对照组的口腔菌群ANOSIM分析结果显示,胃肠道GVHD组与对照组的口腔菌群组成结构差异无统计学意义($P>0.05$,图5B)。

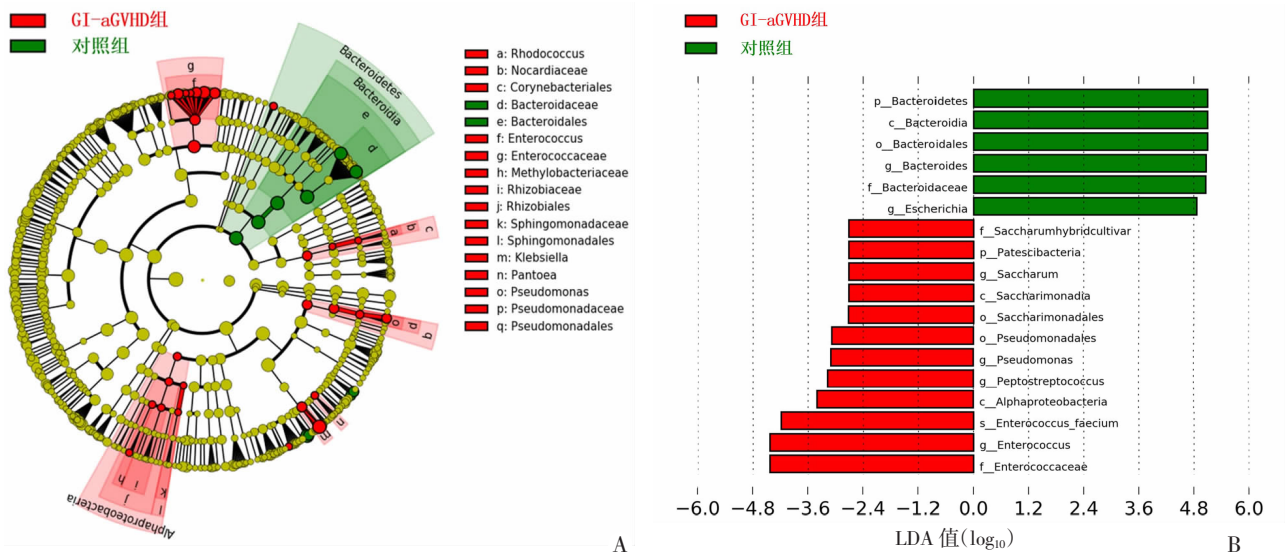
2.5 LEfSe分析

为了解早期胃肠道aGVHD前后肠道菌群差异物种结构,通过LEfSe分析对早期胃肠道aGVHD前后肠道菌群组成进行比较(图6)。发现胃肠道GVHD组肠道菌群组成结构与对照组不同。在门分类水平,*Bacteroidetes*(拟杆菌门)的相对丰度在胃肠道GVHD组更低。在纲分类水平,胃肠道GVHD组*Bacteroidia*(拟杆菌纲)的相对丰度明显低于对照组,而*Alphaproteobacteria*(变形菌纲)的相对丰度高于对照组。在目分类水平,胃肠道GVHD组*Bacteroidales*(拟杆菌目)的相对丰度低于对照组,而*Pseudomonadales*(假单胞菌目)、*Corynebacteriales*(棒杆菌目)、*Rhizobiales*(根瘤菌目)的相对丰度显著高于对照组。在科分类水平,胃肠道GVHD组*Bacteroidaceae*(拟杆菌科)的相对丰度低于对照组,而*Pseudomonadaceae*(假单胞菌科)、*Methylobacteriaceae*(甲基杆菌科)、*Rhizobiaceae*(根瘤菌科)、*Nocardiaceae*(诺卡氏菌科)、*Sphingomonadaceae*(鞘脂单胞菌科)和*Enterococcaceae*(肠球菌科)的相对丰度高于对照组。在属分类水平,胃肠道GVHD组较对照组含有较高的*Kebsiella*(克雷伯菌属)、*Enterococcus*(肠球菌属)、*Pseudomionas*(假单胞菌属)、*Pantoea*(泛菌属)和*Rhodococcus*(红球菌属)。此外,胃肠道GVHD组*Escherichia_coli*(大肠埃希菌)、*Bacteroides_vulgatus*(普通拟杆菌)、*Bacteroides_dorei*(多氏拟杆菌)、*Shigella-_boydii*(鲍氏志贺氏菌)、



A:肠道菌群ANOSIM分析;B:口腔菌群ANOSIM分析

图5 β多样性分析

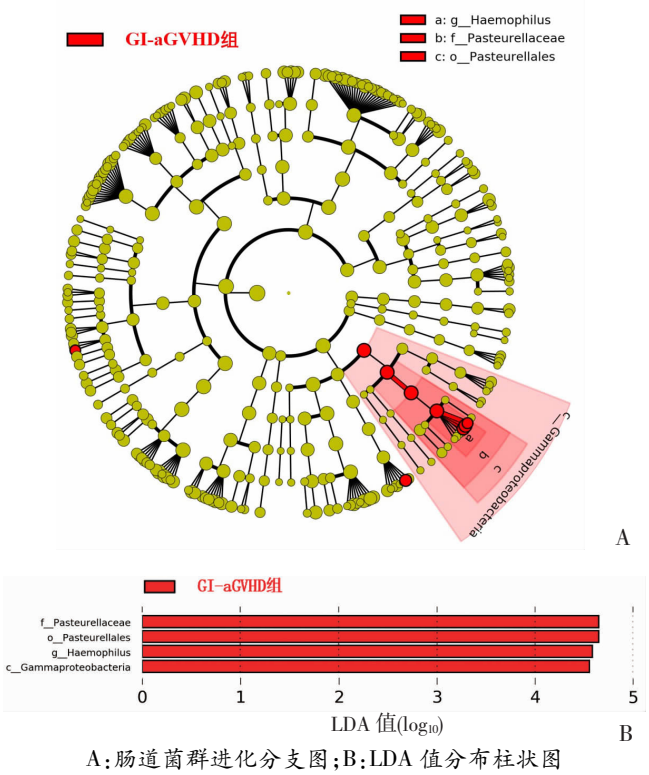


A:肠道菌群进化分支图;B:LDA值分布柱状图

图6 肠道菌群结构LEfSe分析

Shigella_sonnei(宋内志贺杆菌)、*Escherichia_albertii*(艾伯特埃希菌)和 *Escherichia_fergusonii*(弗格森埃希菌)的相对丰度低于对照组,而 *Enterococcus_Hirae*(海氏肠球菌)、*Fusarlum_poae*(梨孢镰刀菌)、*Enterococcus_rivorum*、*Enterobacter_aerogenes*(产气肠杆菌)、*Enterococcus_massiliensis*(马赛肠球菌)、*Methylobzacterium_dankookense*、*Klebsiella_oxytoca*(产酸克雷伯菌)、*Enterococcus_canintestini*、*Enterococcus_villorum*、*Sphingobacterium_faecium*(鞘氨醇杆菌)、*Enterococcus_olivae* 和 *Klebsiella_pneumoniae*(肺炎克雷伯菌)的相对丰度高于对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。

采用 LEfSe 分析比较胃肠道 GVHD 组与对照组口腔菌群的差异物种,结果见图 7,胃肠道 GVHD 组 *Pasteurellales*(巴斯德氏菌目)、*Pasteurellaceae*(巴斯德氏菌科)、*Gammaproteobacteria*(γ-变形菌纲)、*Haemophilus_pittmaniae*、*Emophilus_parainfluenzae*(流感嗜血菌)、*Campylobacter_curvus*(曲形弯曲菌)、*Haemophilus_simiae*、*Campylobacter_rectus*(直肠弯曲菌)、*Campylobacter_fetus*(胎儿弯曲菌)、*Oribacterium_sinus* 的丰度显著高于对照组($P<0.05$),其中 *Pasteurellales*(巴斯德氏菌目)、*Gammaproteobacteria*(γ-变形菌纲)的差异较为显著。



A:肠道菌群进化分支图;B:LDA 值分布柱状图

图 7 口腔菌群结构 LEfSe 分析

3 讨论

本研究通过分析 allo-HSCT 后患者肠道菌群物种结构发现,肠道菌群主要由 *Firmicutes*(厚壁菌门)、*Bacteroidetes*(拟杆菌门)和 *Proteobacteria*(变形杆菌门)组成,与既往研究[9]结果一致。通过早期胃肠道 aGVHD 组与对照组肠道菌群的物种相对丰度图发现,在门分类水平,发生早期胃肠道 aGVHD 患者肠道中 *Bacteroidetes*(拟杆菌门)相对丰度降低,与既往研究[10-11]认为拟杆菌门减少会促使 aGVHD 恶化相符。本研究在发生早期胃肠道 aGVHD 前后患者肠道菌群 α 多样性无明显改变。然而 BURGOS DA SILVA 等[12]研究提出,在胃肠道 aGVHD 发病前后的粪便样本中可以检测到菌群失调,胃肠道 aGVHD 患者肠道微生物 α 多样性减少。GRECO 等[13]也认为较低的肠道菌群 α 多样性与较高的 aGVHD 风险显著相关。本研究结果与其有所差异,我们推测主要原因有两点:一方面本研究对象是以恶心、呕吐等上消化道症状为主要表现的早期胃肠道 aGVHD 患者,根据目前最新推荐的 aGVHD MAGIC 分级标准,aGVHD 分级为 0~1 级。不同于以往研究按照西雅图标准,以腹痛、腹泻等下消化道症状诊断胃肠道 aGVHD。因此,相比于其他实验在发生下消化道 aGVHD 时采样,本研究在发生上消化道 aGVHD 时采样,在时间点上更为提前。因此,我们猜想在发生早期胃肠道 aGVHD 时肠道菌群的 α 多样性尚未发生改变;下一步的研究应增加多时间段粪便采样对比来进一步验证。另一方面本研究的样本量偏少,导致研究结论有一定的局限性,仍需进一步增加样本量加以验证。

本研究通过 LEfSe 分析发现,早期胃肠道 aGVHD 患者肠道中 *Bacteroidetes*(拟杆菌门)、*Bacteroidia*(拟杆菌纲)、*Bacteroidales*(拟杆菌目)和 *Bacteroidaceae*(拟杆菌科)的丰度较低,与从肠道菌群物种相对丰度图中得出的结果相同。在既往关于肠道菌群与下消化道 aGVHD 的研究中,肠道菌群中拟杆菌的减少预示着移植后发生下消化道 aGVHD 概率的增加[3]。拟杆菌是常见的产生短链脂肪酸的细菌之一,其产生的短链脂肪酸在介导保护胃肠道 GVHD 中具有核心作用,短链脂肪酸可以通过调节分子来诱导 Treg 细胞,Treg 细胞可抑制介导 GVHD 的同种反应性 T 细胞来抑制 GVHD 效应[14-15]。同时,短链脂肪酸也是微生物群本身以及

肠道上皮细胞的重要能量来源,可减轻肠上皮组织损伤,减轻 GVHD 的严重程度[16]。因此,我们认为拟杆菌丰度的减少可通过上述机制介导早期胃肠道 aGVHD,并且可作为早期预测和干预胃肠道 aGVHD 的生物学标记物用于临床实践。

本研究结果显示,早期胃肠道 aGVHD 组与对照组的口腔菌群在物种整体多样性方面没有显著差异。虽然 HEIDRICH 等[17]提出口腔菌群生态失调与 allo-HSCT 后 aGVHD 风险相关,但是作者没有单独阐述口腔菌群与胃肠道 aGVHD 的相关性。本研究显示口腔菌群整体多样性与早期胃肠道 aGVHD 无显著关联,可能与本研究的样本量较少等因素相关。本研究通过 LEfSe 分析发现两组间存在一些显著差异的微生物标志物,早期胃肠道 aGVHD 患者口腔中 *Gammaproteobacteria*(γ-变形菌纲)、*Pasteurellales*(巴斯德氏菌目)等 10 个物种相对富集。这些物种可能与早期胃肠道 aGVHD 的发生有关。然而口腔菌群与早期胃肠道 aGVHD 之间有何因果联系,还需要通过大规模、多中心的实验来进一步验证。

为进一步了解发生早期胃肠道 aGVHD 时口腔菌群与肠道菌群之间是否存在关联,本研究将肠道菌群 LEfSe 分析结果与口腔菌群 LEfSe 分析结果对比后发现,γ-变形菌纲同样在早期胃肠道 aGVHD 患者肠道中富集,差异具有显著性。既往研究认为,γ-变形菌是一类促炎细菌,其丰度升高与肠道上皮细胞功能障碍相关,可作为肠道上皮功能障碍的诊断特征[18]。因此,我们初步推测口腔菌群介导早期胃肠道 aGVHD 可能的作用机制:早期胃肠道 aGVHD 患者首先出现口腔菌群失调,口腔中 γ-变形杆菌丰度升高,通过唾液吞咽等途径导致肠道菌群失调,引起肠道炎症反应及肠道上皮细胞功能障碍,进而导致胃肠道 aGVHD 的发生发展。但这仅是我们提出的初步猜想,口腔菌群与早期胃肠道 aGVHD 之间的因果关系论证及未来能否作为早期预测或是干预胃肠道 aGVHD 的微生物靶点,仍需进一步扩大实验加以阐明。

综上所述,本研究尝试探索口腔菌群与早期胃肠道 aGVHD 之间的关联,同时将口腔菌群与肠道菌群结合起来分析,提出口腔菌群介导早期胃肠道 aGVHD 作用机制的推测。此外,本研究对象限定为单倍体 allo-HSCT 的急性白血病患者,纳入对象均接受相同的预处理化疗、相同的抗菌素抗感染,并通过自身前后对照的设计减少了潜在因素的干扰,提高了研究的可信度。但本研究仍存在一些局限和尚未解决的问题,如样本量偏少、研究不够深入。未来将通过大样本、前瞻性的实验研究以进一步验证人体不同部位共生微生物对异基因造血干细胞移植结局的影响。

参考文献:

[1] ZEISER R, BLAZAR B R. Acute graft-versus-host disease—biologic process, prevention, and therapy[J]. N Engl J Med, 2017, 377(22): 2167-2179. DOI: 10.1056/nejmra1609337.

[2] NAYMAGON S, NAYMAGON L, WONG S Y, *et al*. Acute graft-versus-host disease of the gut: considerations for the gastroenterologist[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2017, 14(12): 711-726. DOI: 10.1038/nrgastro.2017.126.

[3] SOFI M H, WU Y X, TICER T, *et al*. A single strain of *Bacteroides fragilis* protects gut integrity and reduces GVHD[J]. JCI Insight, 2021, 6(3): e136841. DOI: 10.1172/jci.insight.136841.

[4] FREDRICKS D N. The gut microbiota and graft-versus-host disease[J]. J Clin Investig, 2019, 129(5): 1808-1817. DOI: 10.1172/jci125797.

[5] SWIMM A, GIVER C R, DEFILIPP Z, *et al*. Indoles derived from intestinal microbiota act *via* type Ⅰ interferon signaling to limit graft-versus-host disease[J]. Blood, 2018, 132(23): 2506-2519. DOI: 10.1182/blood-2018-03-838193.

[6] TUGANBAEV T, YOSHIDA K, HONDA K. The effects of oral microbiota on health[J]. Science, 2022, 376(6596): 934-936. DOI: 10.1126/science.abn1890.

[7] OLSEN I, YAMAZAKI K. Can oral bacteria affect the microbiome of the gut?[J]. J Oral Microbiol, 2019, 11(1): 1586422. DOI:10.1080/20002297.2019.1586422.

[8] ATARASHI K, SUDA W, LUO C W, *et al*. Ectopic colonization of oral bacteria in the intestine drives T_H1 cell induction and inflammation[J]. Science, 2017, 358(6361): 359-365. DOI: 10.1126/science.aan4526.

[9] ILLIANO P, BRAMBILLA R, PAROLINI C. The mutual interplay of gut microbiota, diet and human disease[J]. FEBS J, 2020, 287(5): 833-855. DOI: 10.1111/febs.15217.

[10] HAYASE E, HAYASE T, JAMAL M A, *et al*. Mucus-degrading *Bacteroides* link carbapenems to aggravated graft-versus-host disease[J]. Cell, 2022, 185(20): 3705-

3719.e14. DOI: 10.1016/j.cell.2022.09.007.

[11] ILETT E E, JØRGENSEN M, NOGUERA-JULIAN M, *et al*. Associations of the gut microbiome and clinical factors with acute GVHD in allogeneic HSCT recipients[J]. Blood Adv, 2020, 4(22): 5797-5809. DOI: 10.1182/bloodadvances.2020002677.

[12] BURGOS DA SILVA M, PONCE D M, DAI A Q, *et al*. Preservation of the fecal microbiome is associated with reduced severity of graft-versus-host disease[J]. Blood, 2022, 140(22): 2385-2397. DOI: 10.1182/blood.2021015352.

[13] GRECO R, NITTI R, MANCINI N, *et al*. Microbiome markers are early predictors of acute GVHD in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients[J]. Blood, 2021, 137(11): 1556-1559. DOI: 10.1182/blood.2020007158.

[14] YAZDANDOUST E, HAJIFATHALI A, ROSHANDEL E, *et al*. Gut microbiota intervention by pre and probiotics can induce regulatory T cells and reduce the risk of severe acute GVHD following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation[J]. Transpl Immunol, 2023, 78: 101836. DOI: 10.1016/j.trim.2023.101836.

[15] PACAUD M, COLAS L, BROUARD S. Microbiota and immunoregulation: a focus on regulatory B lymphocytes and transplantation[J]. Am J Transplant, 2021, 21(7): 2341-2347. DOI:10.1111/ajt.16522.

[16] MATHEWSON N D, JENQ R, MATHEW A V, *et al*. Gut microbiome-derived metabolites modulate intestinal epithelial cell damage and mitigate graft-versus-host disease[J]. Nat Immunol, 2016, 17(5): 505-513. DOI: 10.1038/ni.3400.

[17] HEIDRICH V, BRUNO J S, KNEBEL F H, *et al*. Dental biofilm microbiota dysbiosis is associated with the risk of acute graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation [J]. Front Immunol, 2021, 12: 692225. DOI: 10.3389/fimmu.2021.692225.

[18] LITVAK Y, BYNDLOSS M X, TSOLIS R M, *et al*. Dysbiotic *Proteobacteria* expansion: a microbial signature of epithelial dysfunction[J]. Curr Opin Microbiol, 2017, 39: 1-6. DOI: 10.1016/j.mib.2017.07.003.

(**收稿**:2023-10-12;**修回**:2024-01-02)

(编辑 汪勤俭)