DOI:10.16016/j.2097-0927.202205060

肝硬化门脉高压症患者胃菌群特征分析

慕之勇,周银斌,肖 潇,王 军,文良志,陈东风 400042 重庆,陆军特色医学中心消化内科

[摘要] **目的** 分析肝硬化门脉高压症患者胃菌群的结构特征、影响因素及其与临床参数间的相关性。**方法** 收集2020年11月至2021年11月于陆军特色医学中心消化内科住院接受经颈静脉肝内门体分流术(transjugular intrahepatic portosystemic shunt, TIPS)治疗的肝硬化患者的术前胃黏膜与胃液标本,并采集住院期间相关临床参数。采用16S rRNA分析胃菌群的构成及多样性,运用LEfSe寻找差异菌,冗余分析(redundancy analysis, RDA)识别胃微生物群落结构变化的主要影响因素,Spearman相关分析探讨菌群丰度与临床参数间的相关性。**结果** 变形菌门(*Proteobacteria*)、放线菌门(*Actinobacteria*)、酸杆菌门(*Acidobacteria*)、绿弯菌门(*Chloroflexi*)等在胃黏膜中富集,而厚壁菌门(*Firmicutes*)、梭菌门(*Fusobacteria*)在胃液中富集。肝硬化门脉高压症患者胃黏膜物种Chao1指数显著高于胃液($P<0.01$),两者间Shannon指数差异无统计学意义($P>0.05$)。PCoA分析表明,胃黏膜与胃液间群落构成差异有统计学意义($P<0.05$)。对肝硬化门脉高压性胃病(portal hypertensive gastropathy, PHG)患者胃菌群分析显示,消化链球菌属(*Peptostreptococcus*)、二氧化碳噬纤维菌属(*Capnocytophaga*)在PHG患者胃黏膜中富集。肝硬化PHG与non-PHG患者间胃黏膜菌群α多样性与β多样性差异均无统计学意义($P>0.05$)。RDA分析表明,门静脉压力梯度(portal pressure gradient, PPG)是影响患者胃黏膜菌群结构变化的主要因素($r^2=0.683$, $P<0.001$)。哈马达菌属(*Hamadaea*)、艾肯氏菌属(*Eikenella*)丰度与PPG呈正相关性(r分别为0.633、0.618;$P<0.05$)。**结论** 肝硬化门脉高压症患者胃黏膜与胃液菌群结构存在差异,但两者间物种多样性无差异;肝硬化PHG患者胃黏膜菌群构成有特征性改变。PPG是影响胃黏膜菌群结构变化的主要因素,而胃黏膜哈马达菌属及艾肯氏菌属相对丰度的升高可能与肝硬化门静脉高压相关。

[关键词] 肝硬化;门脉高压;门脉高压性胃病;胃菌群;16s rRNA
[中图法分类号] R372; R573; R657.34 [文献标志码] A

Characteristics of gastric microbiota in cirrhotic patients with portal hypertension

MU Zhiyong, ZHOU Yinbin, XIAO Xiao, WANG Jun, WEN Liangzhi, CHEN Dongfeng Department of Gastroenterology, Army Medical Center of PLA, Chongqing, 400042, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the structure characteristics, influencing factors and the correlation with clinical parameters of gastric microbiota in cirrhotic patients with portal hypertension. **Methods** Preoperative gastric mucosa and gastric juice samples were collected from cirrhotic patients undergoing transjugular intrahepatic portosystemic shunt (TIPS) in our hospital from November 2020 to November 2021, and relevant clinical parameters during hospitalization were also obtained. The composition and diversity of gastric microbiota in the patients were analyzed by 16S rRNA high-throughput sequencing. LEfSe analysis was used to search for different bacteria; Redundancy analysis (RDA) was performed to identify the main factors affecting the gastric microbiota community structure; and Spearman correlation analysis was adopted to explore the correlation between the abundance of gastric microflora and clinical

[基金项目] 国家自然科学基金青年科学基金(81802459);重庆市自然科学基金基础研究与前沿探索项目(cstc2018jcyjAX0603);陆军军医大学学科技创新能力提升专项项目(2019XLC3045)

[通信作者] 陈东风,E-mail:chendf1981@126.com

2097-0927/Copyright © 2022, 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/)

parameters. **Results** *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Acidobacteria* and *Chloroflexi* were enriched in gastric mucosa, while *Firmicutes* and *Fusobacteria* in gastric juice. The Chao1 index of species in gastric mucosa was significantly higher than that in gastric fluid ($P<0.01$), however, the Shannon index of community between the 2 groups was not different ($P>0.05$). PCoA analysis showed that there was statistical difference in community composition between gastric mucosa and gastric juice ($P<0.05$). Further analysis of the gastric microbiota indicated that *Peptostreptococcus* and *Capnocytophaga* were abundant in the gastric mucosa of patients with portal hypertensive gastropathy (PHG), but the α diversity and β diversity of gastric mucosal flora had no significance between PHG and non-PHG patients ($P>0.05$). RDA analysis suggested that portal pressure gradient (PPG) was the main factor affecting the community structure of gastric mucosa flora ($r^2=0.683$, $P<0.001$), and the abundance of *Hamadaea* and *Eikenella* were positively correlated with PPG ($r=0.633$, 0.618, respectively; $P<0.05$). **Conclusion** The microflora structure between gastric mucosa and gastric juice is different in cirrhotic patients with portal hypertension, but there is no significant difference in the species diversity. The composition of gastric mucosal flora in patients with PHG has characteristic changes, and PPG plays an important role in the structure of gastric mucosa microbiota. The relatively increased abundance of *Hamadaea* and *Eikenella* in gastric mucosa may be associated with portal hypertension in cirrhosis.

[**Key words**] liver cirrhosis; portal hypertension; portal hypertensive gastropathy; gastric microbiota; 16s rRNA

Supported by the National Natural Science Foundation for Young Scholars of China (81802459), the Project of Basic Research and Frontier Exploration of Natural Science Foundation of Chongqing (cstc2018jcyjAX0603), and the Special Project of Science and Technology Innovation Capacity Promotion of Army Medical University (2019XLC3045). Corresponding author: CHEN Dongfeng, E-mail: chendf1981@126.com

肝硬化(liver cirrhosis, LC)是由一种或多种致病因素长期或反复作用导致的弥漫性肝损害。组织学上表现为肝脏假结节再生、纤维间隔形成、肝结构塌陷及肝血管扭曲[1],进而引起肝脏功能受损及门静脉高压。门脉高压症(portal hypertension, PH)是肝硬化的一种严重的且几乎不可避免的并发症,也是其病程和预后的重要决定因素[2-4]。门脉高压性胃病(portal hypertensive gastropathy, PHG)是门脉高压在胃镜下的特征性表现,发生率为20%~75%[5],也是引起肝硬化患者消化道出血的常见原因之一[6-7]。目前,PHG具体发病机制尚未完全阐明,可能与门脉高压引起胃黏膜微循环血流动力学改变,黏膜防御屏障受损等相关[8]。

因存在高酸性环境,胃既往被认为不适宜微生物生长,但随着高通量测序技术在菌群研究中的广泛应用,研究发现胃中存在丰富的微生物群落[9]。生理状态下,胃酸是抑制微生物过度生长的一种有效的胃杀菌屏障[10],而肠-唾液硝酸盐循环和胃移行性复合运动能够增强胃液的杀菌作用[11-12],以上机制有利于维持胃菌群的动态平衡。病理状态下,如萎缩性胃炎、门静脉高压等可引起胃酸分泌减弱[13],胃液pH升高,胃杀菌屏障功能损害,从而造成胃菌群生态失调。既往研究发现胃菌群失调与胃炎、胃溃疡、胃癌等多种胃疾病进展相关[14]。然而,目前关于肝硬化门静脉高压症患者胃菌群结构特征以及胃菌群与PHG发生发展的相关性尚不清楚。

本研究选择拟行经颈静脉肝内门体分流术(transjugular intrahepatic portosystemic shunt, TIPS)治疗的肝硬化门脉高压症患者为研究对象,胃镜下收集患者胃黏膜和胃液标本,应用16s rRNA高通量测序技术,探讨肝硬化门脉高压症患者胃菌群结构特征,分析胃菌群结构变化的影响因素以及菌群与临床参数之间的相关性,为临床提供思考。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2020年11月至2021年11月因肝硬化于陆军特色医学中心消化内科拟接受TIPS治疗的23例患者。肝硬化及门脉高压症诊断依据病史、临床表现及CT或B超等辅助检查确诊。排除标准:①不愿接受胃镜检查或存在胃镜检查禁忌;②住院前1个月内服用PPI、抗生素、益生菌及益生元等;③既往接受门体分流或断流术;④严重心、肺等大器官功能衰竭、严重感染及非肝脏恶性肿瘤;⑤主观不愿意继续完成临床研究;⑥研究者认为不适于参与的任何医学或非医学状况。本研究方案经陆军特色医学中心医学伦理委员会批准[医研伦审(2020)第135号],患者均签署临床研究知情同意书。

1.2 样本采集及处理

于TIPS术前1周采集患者胃液与胃黏膜标本。采集流程为:胃镜操作者严格按照胃镜操作规范穿戴

手术衣帽、戴无菌手套,顺利进镜后,抽取无菌生理盐水 50 mL 经胃镜活检通道注入,分别从胃底、胃体、胃窦三部位反复回抽冲洗 3 次,再留取 10 mL 作为模拟胃液样本送检,分别从胃窦、大弯中下段胃体钳取黏膜标本各 1 块。所有标本按照采集要求于 15 min 内经液氮速冻 5 min 后,放置-80 ℃冰箱保存备检。

1.3 DNA 提取及 Illumina 测序

使用 E.Z.N.A.® Stool DNA Kit 试剂盒(Omega Bio-Tek, America)根据说明操作从组织样本中提取细菌 DNA。采用细菌特异性引物对 16S rDNA V3-V4 高变区进行 PCR 扩增,上游引物 341F:5′-CCTAYGGG-RBGCASCAG-3′;下游引物 806R:5′-GGACTACNN-GGGTATCTAAT-3′。PCR 反应体系为:5×FastPfu Buffer 4 μL、2.5 mmol/L dNTPs 2 μL、上游引物(5 μmol/L)0.8 μL、下游引物(5 μmol/L)0.8 μL、FastPfu 聚合酶 0.4 μL、BSA 0.2 μL、DNA 模板 10 ng、补 ddH_2O 至 20 μL;反应参数设置:95 ℃ 5 min;27 个循环(95 ℃ 30 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s);72 ℃ 10 min,10 ℃至停止。使用 2%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,利用 AxyPrep DNA Gel Extraction Kit(Axygen, America)进行纯化。利用 Illumina 公司的 NovaSeq PE250 平台进行测序,根据 97%[15-16]的相似度对序列进行 OTU 聚类。以上操作均依托上海凌恩生物科技有限公司完成。

1.4 门静脉压力梯度测量

局麻下穿刺右侧颈内静脉成功后,置入 RUPS-100 肝穿刺装置(美国 Cook 公司),沿鞘送入导管至肝静脉出口下腔静脉作造影,并测量下腔静脉压(重复 3 次取均值),DSA 导引下穿刺肝内门静脉,当证实穿入门静脉后,测门静脉压力(方法同上),门静脉压力与下腔静脉压力差即为门静脉压力梯度(portal pressure gradient,PPG)[17]。以上操作均在 TIPS 手术过程中完成。

1.5 PHG 诊断标准

依据 McCormack 分级标准[18],采用胃镜检查评估 PHG 的严重程度。轻度:黏膜表面呈现细小粉红色斑点或猩红热样疹,条纹状胃黏膜皱襞上出现表浅红斑,红色或粉红色水肿多边形区域被白色网格状结构间隔,即蛇皮征或马赛克征;重度:弥漫性樱桃红斑和(或)弥漫性出血性胃炎。

1.6 统计学分析

采用 SPSS 26.0 软件进行一般资料统计分析,符合正态分布的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用独立样本 t 检验;不符合正态分布的计量资料用 $M(P_{25},P_{75})$ 表示,采用非参数独立样本 Mann-Whitney 秩和检验。生物信息学采用 R 4.1.2 软件进行分析。绘制 Shannon-Wiener 曲线反映测序数据的合理性和间接反映样品中物种丰度;物种累积曲线(species accumulation curves)判断测序样本量的充分性和预测样品中物种丰度。采用 Kruskal-Wallis 检验比较组间菌属相对丰度的差异。计算 α 多样性反映样本内观察到的物种丰度及多样性,采用 Mann-Whitney 秩和检验比较 α 多样性指数的差异。β 多样性采用主坐标分析(principal co-ordinates analysis, PCoA),通过 Adonis 检验比较样本间组成的相似性或差异性。利用 LEfSe(LDA Effect Size)工具比较组间差异菌群。通过冗余分析(redundancy analysis, RDA)探索在样本整体菌群结构变化过程中发挥主要作用的环境因子;将不同菌属的丰度与环境因子进行 Spearman 相关性分析,从而获得与环境因子相关的物种信息。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般资料

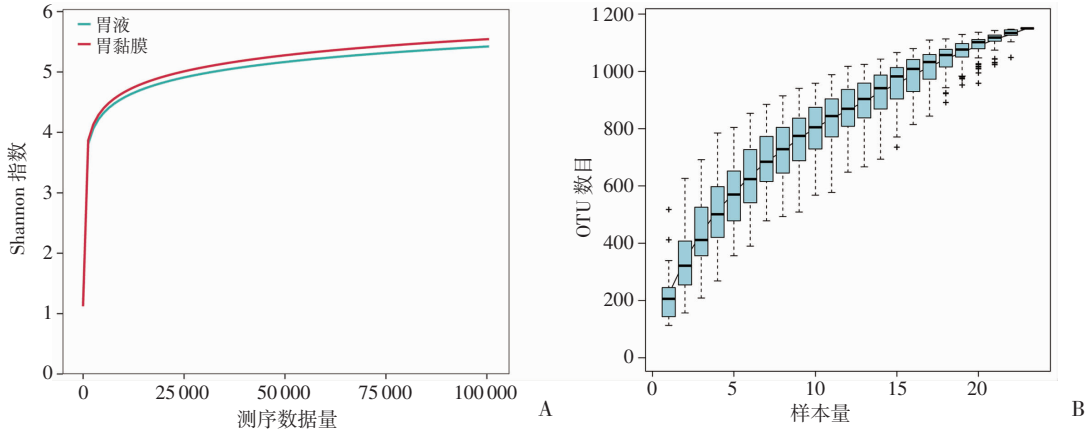
共收集 29 例肝硬化患者临床资料及生物样本,其中 6 例患者胃黏膜标本因 PCR 扩增结果不符合测序分析要求被剔除,最终纳入 23 例患者(男性 12 例,女性 11 例),年龄(54.4±10.8)岁,16 例为病毒性肝硬化,7 例为非病毒性肝硬化。PHG 与 non-PHG 患者间白细胞(white blood cells, WBC)、红细胞(redblood cell, RBC)、血红蛋白(hemoglobin, Hb)、血小板(platelet, PLT)、天冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)、丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、白蛋白(albumin, Alb)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)、γ-谷氨酰转肽酶(gamma-glutamyl transpeptidase, GGT)、总胆红素(total bilirubin, TBil)、凝血酶原时间(prothrombin time, PT)、国际标准化比值(international normalized ratio, INR)、血肌酐(serum creatinine,Scr)以及 PPG 等临床参数差异无统计学意义(P 均>0.05),见表 1。

2.2 测序质量评估

Shannon-Wiener 曲线是利用各样本的测序量在不同测序深度时的微生物多样性指数构建曲线,以此反映各样本在不同测序数量时的微生物多样性。结果显示,在一定范围内,随着测序量增加,Shannon 值急剧上升,而继续增加测序量时,曲线逐渐趋向平坦,说明本研究测序数据量足够大,可以反映样本中绝大多数的物种信息。同样地,物种聚类曲线随着样本量的加大,曲线逐渐趋于平坦,说明本研究样本量能够满足分析要求。此外,从 Shannon-Wiener 曲线可知胃黏膜物种丰度高于胃液(图 1)。

表 1　肝硬化患者临床参数特征[$\bar{x}\pm s$,例(%), $M(P_{25},P_{75})$]

参数	总计(n=23)	PHG(n=14)	non-PHG(n=9)	P 值
年龄/岁	54.4±10.8	53.1±13.0	56.2±6.4	0.516
性别				0.680
男	12(52.2)	8(57.1)	4(44.4)	
女	11(47.8)	6(42.9)	5(55.6)	
BMI/kg·m^{-2}	22.2±2.6	21.6±2.6	23.2±2.5	0.179
病因				0.999
病毒	16(69.6)	10(71.4)	6(66.7)	
非病毒	7(30.4)	4(28.6)	3(33.3)	
WBC/10^{9}·L^{-1}	3.24(2.15,3.88)	3.30(2.16,3.69)	3.01(2.01,4.08)	0.926
RBC/10^{12}·L^{-1}	2.73(2.34,3.32)	2.74(2.22,3.19)	2.67(2.44,3.68)	0.403
Hb/g·L^{-1}	67(74,82)	71(63,76)	68(82,104)	0.083
PLT/10^{9}·L^{-1}	68(45,81)	70(40,88)	67(48,71)	0.688
AST/U·L^{-1}	31.8(25.6,60.2)	28.3(24.1,56.8)	40.3(26.5,76.5)	0.277
ALT/U·L^{-1}	34.5(25.4,42.1)	34.0(26.2,38.3)	42.2(22.5,55.1)	0.250
Alb/g·L^{-1}	34.2±6.4	33.0±5.3	36.1±7.7	0.263
ALP/U·L^{-1}	79.7(64.2,116.0)	74.6(50.3,119.8)	87.2(76.1,101.8)	0.439
GGT/U·L^{-1}	34.2(17.4,58.9)	49.8(15.8,60.5)	28.1(17.7,50.8)	0.999
TBil/μmol·L^{-1}	22.8(15.9,31.9)	25.3(18.8,55.0)	20.4(13.7,24.0)	0.124
PT/s	13.7(12.6,15.9)	13.5(12.0,15.7)	13.7(12.7,16.0)	0.877
INR	1.20(1.11,1.39)	1.19(1.05,1.37)	1.20(1.12,1.40)	0.829
Scr/μmol·L^{-1}	67.6±15.3	69.6±14.4	64.6±17.1	0.462
PPG/mmHg	20.2±5.4	20.2±4.9	20.1±6.4	0.966



A:菌群 Shannon-Wiener 曲线;B:胃菌群物种累积曲线

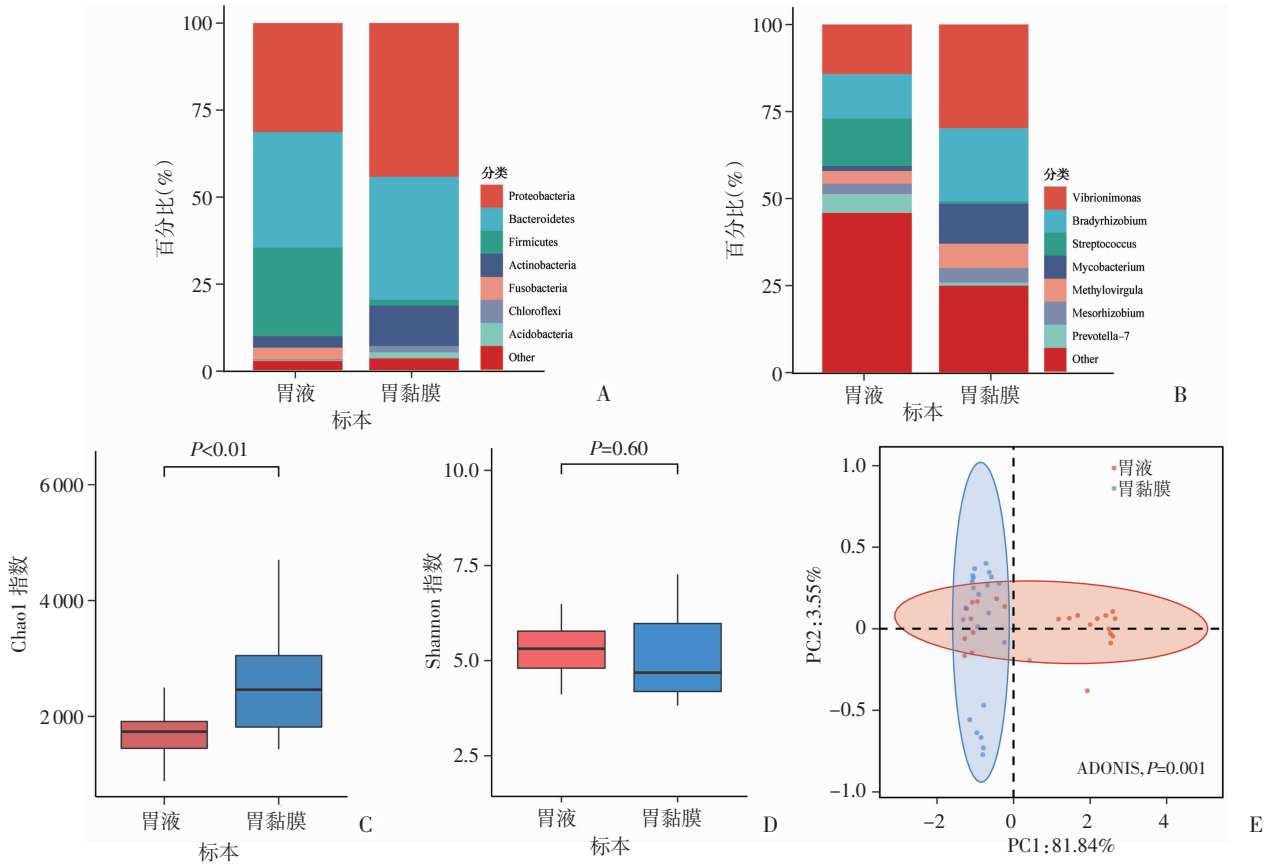
图 1　肝硬化患者胃菌群测序质量评估曲线

2.3　门脉高压症患者胃菌群特征

2.3.1　胃菌群组成分析　　对肝硬化门脉高压症患者胃黏膜与胃液菌群相对丰度分析发现,胃黏膜主要菌群在门分类水平上分别为变形菌门(44.2%)、拟杆菌门(35.3%)、放线菌门(11.6%)、绿弯菌门(1.78%)、酸杆菌门(1.75%)等;胃液主要菌门分别为拟杆菌门(33.2%)、变形菌门(31.4%)、厚壁菌门(25.4%)、放线菌门(3.33%)、梭菌门(3.31%)。经 Kruskal-Wallis 检验结果发现,除拟杆菌门外,变形菌门、放线菌门、绿弯菌门、酸杆菌门、厚壁菌门、梭菌门在两者间相对丰度存在统计学差异(P<0.05)。在属分类水平上分析发现,胃黏膜主要菌属为 *Vibrionimonas* 属(26.8%)、慢生根瘤菌属(18.9%)、分枝杆菌属(10.3%)、*Methylovirgula* 属(6.3%)等;胃液主要菌属为 *Vibrionimonas*(13.7%)、链球菌属(13.0%)、慢生根瘤菌属(12.3%)、普氏-7 菌属(5.2%),见图 2A、B。α 多样性分析结果表明,胃黏膜 Chao1 指数显著高于胃液(2 662 *vs* 1 760,P<0.01,图 2C),而 Shannon 指数

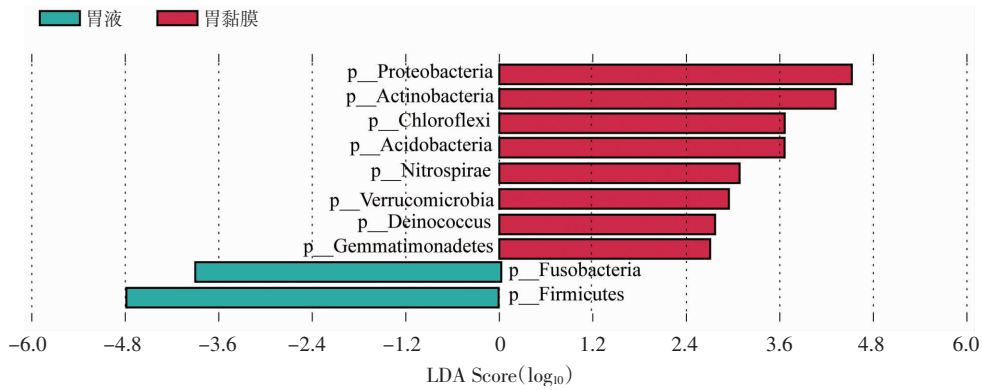
两组间差异无统计学意义($P>0.05$),提示胃黏膜物种丰度显著高于胃液,而物种多样性胃黏膜与胃液无显著差异。基于 Bray-Curtis 距离对胃黏膜与胃液菌群 β 多样性分析,PCoA 分析显示在 PC1 轴上两者菌群间能够相互区分,提示胃黏膜与胃液菌群结构不同,存在统计学差异($P<0.05$,图 2E)。

2.3.2　胃黏膜与胃液菌群差异分析　　LEfSe 分析是基于物种相对丰度表,通过非参数检验和线性判别分析的结合,用于群落丰度差异检验(本研究采用 LDA>2, $P<0.05$ 为检验水准)。LEfSe 分析显示,变形菌门(*Proteobacteria*)、放线菌门(*Actinobacteria*)、酸杆菌门(*Acidobacteria*)、绿弯菌门(*Chloroflexi*)等菌群在胃黏膜中富集,而厚壁菌门(*Firmicutes*)、梭菌门(*Fusobacteria*)在胃液中富集(图 3)。



A:门水平组成;B:属水平组成;C:Chao1 指数比较;D:Shannon 指数比较;E:PCoA 分析图　每个点代表一个不同的样本,PC1 可能是影响群落组成的潜在主成分

图 2　肝硬化患者胃菌群组成



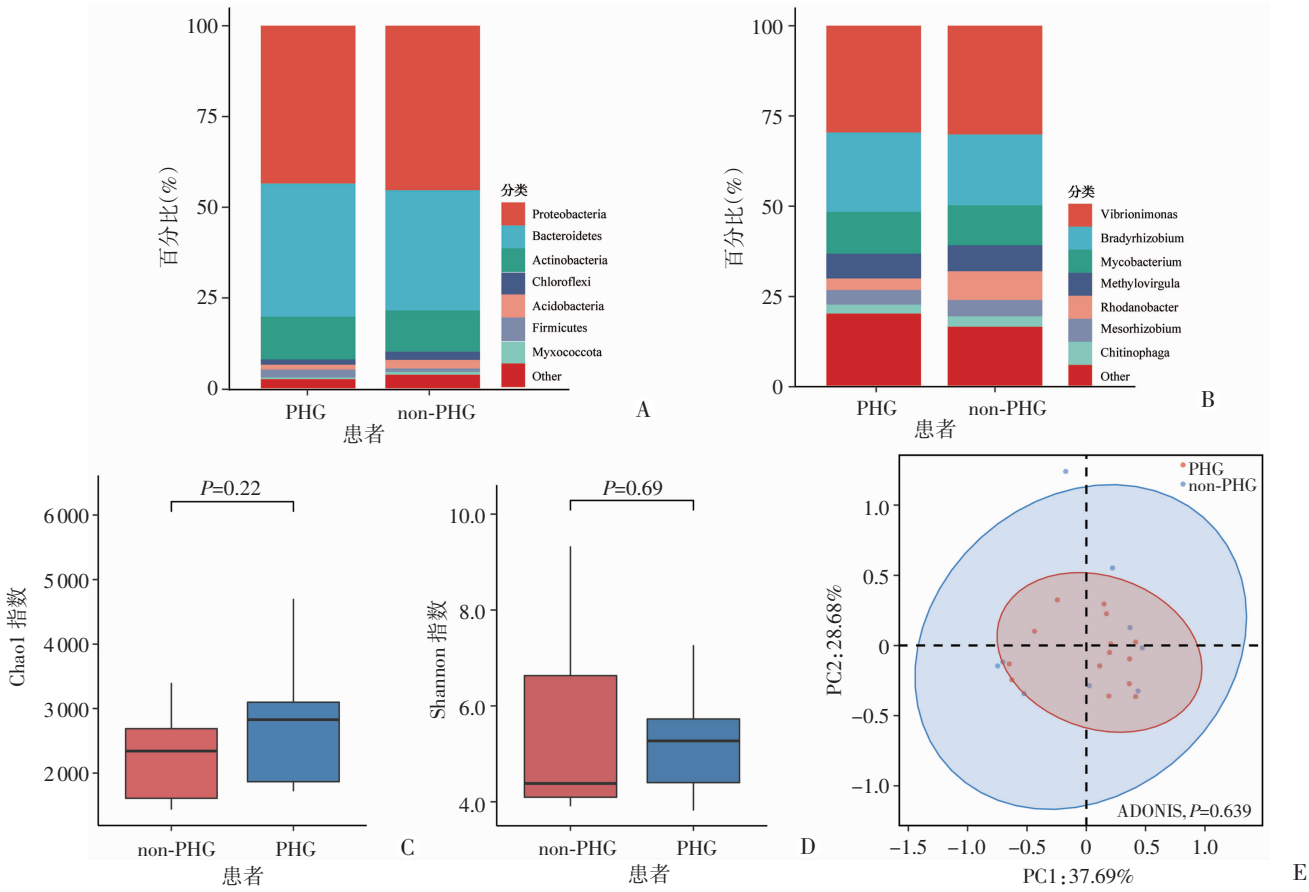
红色表示胃黏膜富集菌落;绿色表示胃液富集菌落

图 3　肝硬化患者胃黏膜与胃液菌群 LEfSe 分析

2.4　PHG 患者胃菌群特征

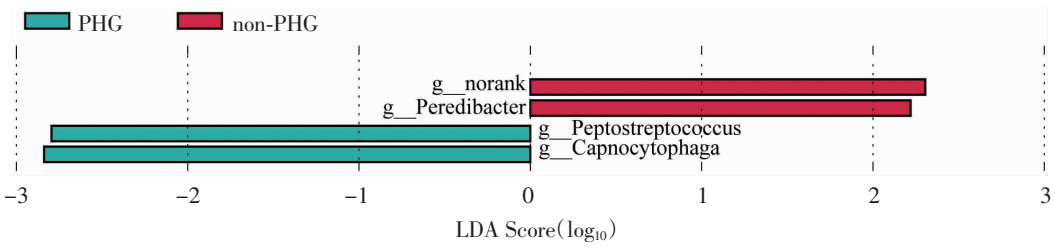
2.4.1　PHG 患者胃菌群组成特征　门水平上,PHG 与 non-PHG 患者胃黏膜主要群落分别为变形菌门(43.4%, 45.4%)、拟杆菌门(36.7%, 33.1%)、放线菌门(11.8%, 11.3%)等。属水平上,PHG 与 non-PHG 患者胃黏膜主要菌属分别为 *Vibrionimonas* 属(27.0%, 26.4%)、慢生根瘤菌属(20.0%, 17.3%)、分枝杆菌属(10.6%, 9.7%)等(图 4A、B)。α 多样性分析表明,PHG 与 non-PHG 患者胃黏膜 Chao1 指数(2 739 *vs* 2 543)、Shannon 指数(5.21 *vs* 5.32)两组间差异均无统计学意义($P>0.05$,图 4C、D)。β 多样性显示,基于 Bray-Curtis 距离的 PCoA 分析表明,PHG 与 non-PHG 患者胃黏膜菌群的相对丰度在整体上差异无统计学意义($P>0.05$,图 4E)。

2.4.2　PHG 患者胃黏膜差异菌群分析　PHG 患者胃黏膜菌群组成与 non-PHG 患者不同。LEfSe 分析显示,消化链球菌属(*Peptostreptococcus*)与二氧化碳噬纤维菌属(*Capnocytophaga*)在 PHG 患者胃黏膜中富集,而吞菌弧菌属(*Peredibacter*)在 non-PHG 患者胃黏膜中富集(图 5)。



A:门水平组成;B:属水平组成;C:Chao1 指数比较;D:Shannon 指数比较;E:PCoA 可视化图

图 4　PHG 与 non-PHG 患者胃黏膜菌群组成的比较



红色表示 non-PHG 胃黏膜富集菌属;绿色表示 PHG 胃黏膜富集菌属

图 5　PHG 患者胃黏膜菌群 LEfSe 分析

2.5　胃黏膜菌群与临床参数相关性分析

2.5.1　胃黏膜整体群落结构影响因素分析　　为获得在胃黏膜整体群落结构变化过程中发挥主要作用的临床参数,采用 RDA 分析患者临床参数与胃黏膜群落的相关性,以相关系数的平方(r^2)作为拟合优度的检验统计量,通过置换检验分析。结果表明,PPG 与胃黏膜群落结构变化具有显著相关性($r^2=0.683$, $P<0.001$),而 Hb、PLT 、ALT、Alb 与 TBil 与胃黏膜群落结构变化无明显相关性($P>0.05$,表 2)。RDA 分析可视化见图 6。

表 2　肝硬化患者临床参数与胃群落结构变化的相关性分析

临床参数	胃黏膜	
	r^2	P 值
Hb	0.123	0.226
PLT	0.133	0.272
ALT	0.009	0.911
Alb	0.062	0.580
TBil	0.307	0.069
PPG	0.683	<0.001

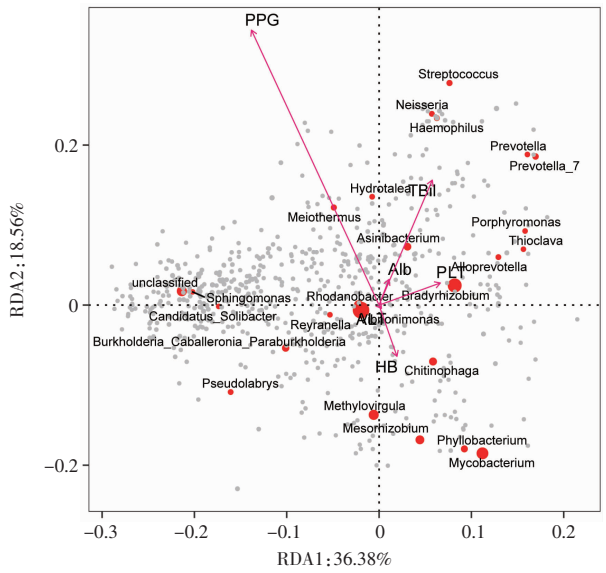
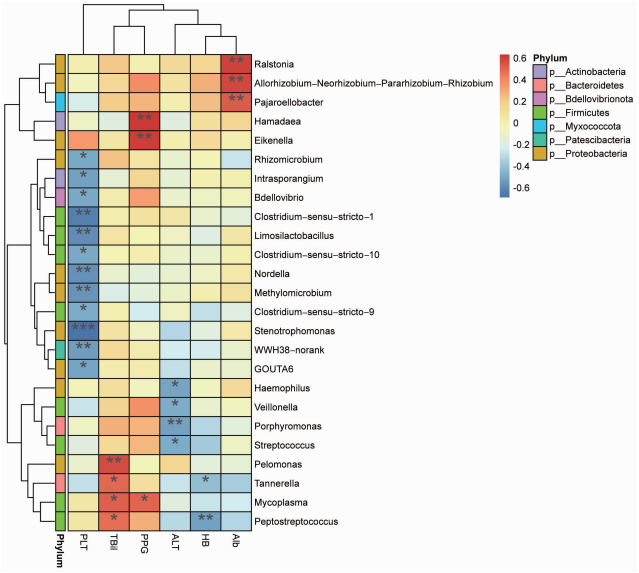


图 6　临床参数与胃黏膜群落结构变化 RDA 分析

2.5.2　菌群丰度与临床参数相关性分析　　在属水平上采用 Spearman 等级相关分析寻找与患者临床参数相关的物种信息。结果表明,胃黏膜哈马达菌属(*Hamadaea*)、艾肯氏菌属(*Eikenella*)丰度与 PPG 呈正相关(r 分别为 0.633、0.618,P 均<0.01);假单胞菌属(*Pelomonas*)丰度与 TBil 呈正相关($r=0.571$, $P<0.01$);*Allorhizobium-Neorhizobium-Pararhizobium-Rhizobium* 属、*Ralstonia* 属及 *Pajaroellobacter* 属丰度与 Alb 呈正相关(r 分别为 0.583、0.597、0.533,$P<0.01$);而寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*)丰度与 PLT 呈负相关($r=-0.698$,$P<0.001$,图 7)。



X 轴上为临床参数,Y 轴为菌属信息,Spearman 等级相关系数 R 值在热图中以不同颜色展示:红色表示正相关,蓝色表示负相关。右侧图例是不同 R 值的颜色区间,左边的色条标注了物种所属门分类。*:$P<0.05$;**:$P<0.01$;***:$P<0.001$

图 7　25 种细菌与肝硬化患者临床参数相关性热图

3　讨论

门静脉高压是慢性肝病患者的重要临床特征之一,PHG 是在门脉高压基础上形成的胃黏膜特征性改变,然而既往研究发现,门静脉压力与 PHG 的严重程度不具有显著相关性[19],提示在门静脉高压之外,可能存在其他因素参与 PHG 的发生发展。胃内因存在高酸性环境,曾被认为是无菌的,随着分子技术的发展与应用,目前发现胃内存在含量丰度高达 10^2 ~ 10^4 CFU/mL 的微生物群落[20]。胃肠道微生物群落对组织代谢、发育、炎症和免疫等均有影响[21]。胃微生物群落结构失调与胃溃疡、胃癌、胃 MALT 淋巴瘤等多种胃疾病发生发展密切相关[22],且在不同胃疾病中,胃菌群具有特征性改变[23]。然而肝硬化门脉高压症患者胃菌群特征及其影响因素尚未被重视,相关研究较少,对肝硬化 PHG 患者胃菌群特征更加缺乏认识。因此本研究利用 16S rRNA 技术对肝硬化门脉高压症患者胃菌群特征进行初步研究,进一步分析 PHG 胃黏膜菌群特征,并对影响门脉高压症患者胃菌群结构变化的相关因素进行探讨。

既往胃菌群研究主要基于胃液微生物培养,但胃液与胃黏膜上皮细胞间存在 pH 梯度[24],而 pH 是影响胃菌群特征的重要因素,因此有必要对胃黏膜与胃液菌群进行对比分析。本研究发现,肝硬化门脉高压症患者胃黏膜与胃液菌群在不同分类学水平上存在显著差异。门水平上,胃黏膜菌群主要由变形菌门、拟杆菌门、放线菌门、绿弯菌门、酸杆菌门组成;而胃液菌群则由拟杆菌门、变形菌门、厚壁菌门、放线菌门、梭菌门组成,与既往研究一致[25-26]。属水平上,胃黏膜菌群主要为弧菌属、慢生根瘤菌属、分枝杆菌属,而胃液主要菌属为弧菌属、链球菌属、慢生根瘤菌属。既往研究显示链球菌属、丙酸杆菌属和乳酸杆菌属在胃黏膜中富集,与本研究结果不同,提示门静脉高压可对胃菌群结构产生影响,引起胃黏膜菌群失调。α 多样性分析表明,胃黏膜 Chao1 指数显著高于胃液,提示胃黏膜物种丰度显著高于胃液,与 LI 等[27]研究结果一致,但与其他一些研究结果不同。SUNG 等[28]研究发现胃液菌群丰度显著高于胃黏膜,而 SUN 等[29]研究显示胃液中菌群多样性显著高于胃黏膜,但物种丰度上两者无显著差异。这可能与研究人群、疾病状态及其他因素(饮食、药物、生活习惯等)存在差异相关。β 多样性分析显示,胃黏膜与胃液菌群结构不同,与 SUN 等[29]研究结果一致。LEfSe 分析显示,变形菌门、放线菌门、酸杆菌门、绿弯菌门等在胃黏膜中相对丰度高于胃液,而厚壁菌门与梭菌门在胃黏膜中相对丰度低于胃液。这说明胃液中的菌群不等同于粘附在胃黏膜上的菌群。

PHG 是引起肝硬化患者消化道出血的常见原因之一,也是肝硬化患者生存预后的独立危险因素。PHG 的发生与门静脉高压、胃黏膜防御屏障破坏及细胞因子、炎性介质释放等有关,而胃肠道菌群失调与黏膜屏障功能受损及炎症介质释放密切相关。门静脉高压可对胃菌群结构产生影响,引起胃菌群失调,而胃菌群失调可能参与 PHG 的发生发展。本研究从胃菌群角度探索菌群与 PHG 发生的关系。结果显示 PHG 与 non-PHG 患者胃菌群整体结构在不同分类学水平上无显著差异;α 多样性与 β 多样性两者间差异无统计学意义。这可能与纳入样本量较少有关,但也可能提示 PHG 并不是影响患者胃菌群结构变化的主要因素。LEfSe 分析显示消化链球菌属(*Peptostreptococcus*)与二氧化碳噬纤维菌属(*Capnocytophaga*)在 PHG 患者胃黏膜中富集。消化链球菌属与二氧化碳噬纤维菌属均是人体口咽部的常驻菌,SUNG 等[30]研究发现在根治幽门螺旋杆菌后的人群中,胃内消化链球菌属丰度较根治前显著增加。消化链球菌属与胃黏膜慢性炎症、萎缩及肠化密切相关[30-31],肝硬化患者肠道消化链球菌属丰度增加与慢加急性肝衰竭发生相关[32]。与 non-PHG 患者相比,PHG 患者胃黏膜中消化链球菌属与二氧化碳噬纤维菌属相对丰度更高,提示胃菌群可能在 PHG 发生过程中发挥作用,为进一步探索 PHG 发病机制及防治策略提供有益参考。既往一项多中心随机对照试验表明,补充益生菌能够减少潜在病原微生物(potentially pathogenic microorganisms, PPMO)在重症患者胃内定植[33]。那么能否通过补充益生菌抑制口咽等外源菌群在胃中定植,调节肝硬化患者胃菌群,从而有益于 PHG 的防治值得进一步探讨。

RDA 分析显示,PPG 是影响胃黏膜菌群群落结构变化的主要因素。PPG 是反映门静脉高压的最直接的证据,可能通过以下途径影响胃菌群结构。一是门静脉高压引起胃黏膜微循环障碍,胃黏膜缺血、缺氧引起胃壁细胞数目减少和分泌功能障碍[13]。张民生等[34]曾报道,肝硬化患者胃液酸度随着门静脉压力升高而降低。细菌定植胃黏膜依赖于细菌的运动性及其对胃黏膜表面黏液降解能力。胃黏液层的黏度具有 pH 依赖性,随 pH 的增加而降低,因此当胃酸分泌降低时细菌更易在胃中定植[35-36]。二是门脉高压引起胃动力障碍[37-38],直接导致胃移行性复合运动增强及胃液杀菌的作用减弱,增加菌群在胃内定植风险。三是门脉高压引起小肠运动障碍及小肠细菌过度生长(small intestinal bacterial overgrowth, SIBO)[39],肠道菌群向胃内移位增多。Spearman 等级相关分析表明,哈马达菌属(*Hamadaea*)与艾肯氏菌属(*Eikenella*)丰度与 PPG 呈正相关($P<0.001$)。艾肯氏菌属是口腔及呼吸道正常菌群,提示随着 PPG 升高,随吞咽进入胃内的一些细菌可能更易在胃黏膜中定植。哈马达菌属是环境中的一种放线菌,但其在胃中定植尚未见报道。本研究还发现假单胞菌属(*Pelomonas*)丰度与 TBil 呈正相关($P<0.01$)。SHAO 等[40]曾报道 *Pelomonas* 在急性肝损伤模型小鼠肠道中丰度增加。SCHÄFFLER 等[41]对克罗恩患者肠道菌群研究发现,*Pelomonas* 丰度与疾病活动指数(Crohn's disease activity index, CDAI)增加相关。由此推测,*Pelomonas* 可能是一种促炎菌,能够促进肝脏炎症反应,加重肝损伤,从而显示与 TBil 相关性,但需进一步研究证实。

本研究是一项对肝硬化门脉高压症患者胃菌群特征的观察性研究,研究中也存在一些局限性。首先,纳入样本量偏少、人群地域局限。既往研究证实,胃内群落分布受环境、饮食、生活方式等因素影响,人群因素会导致研究存在人群选择偏倚。其次,研究中缺少健康人群以及肝硬化无门脉高压症人群作为对照,存在

设计上的不足。

综上所述,本研究发现肝硬化门脉高压症患者胃黏膜与胃液菌群结构存在差异,但两者间物种多样性无显著差异。与肝硬化 non-PHG 患者相比,PHG 患者胃黏膜菌群存在特征性改变,提示胃菌群可能参与 PHG 的发生。PPG 是影响胃黏膜菌群结构变化的主要因素,胃黏膜哈马达菌属、艾肯氏菌属相对丰度升高可能与肝硬化门静脉高压相关。这为从胃菌群角度研究门静高脉症提供了重要参考价值。

参考文献:

[1] SCHUPPAN D, AFDHAL N H. Liver cirrhosis[J]. Lancet, 2008, 371(9615): 838-851. DOI:10.1016/s0140-6736(08)60383-9.

[2] BOSCH J, ABRALDES J G, BERZIGOTTI A, *et al*. The clinical use of HVPG measurements in chronic liver disease[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2009, 6(10): 573-582. DOI:10.1038/nrgastro.2009.149.

[3] GARCIA-TSAO G, ABRALDES J G, BERZIGOTTI A, *et al*. Portal hypertensive bleeding in cirrhosis: risk stratification, diagnosis, and management: 2016 practice guidance by the American association for the study of liver diseases[J]. Hepatology, 2017, 65(1): 310-335. DOI:10.1002/hep.28906.

[4] D'AMICO G, GARCIA-TSAO G, PAGLIARO L. Natural history and prognostic indicators of survival in cirrhosis: a systematic review of 118 studies[J]. J Hepatol, 2006, 44(1): 217-231. DOI:10.1016/j.jhep.2005.10.013.

[5] GJEORGJIEVSKI M, CAPPELL M S. Portal hypertensive gastropathy: a systematic review of the pathophysiology, clinical presentation, natural history and therapy[J]. World J Hepatol, 2016, 8(4): 231-262. DOI:10.4254/wjh.v8.i4.231.

[6] MERLI M, NICOLINI G, ANGELONI S, *et al*. The natural history of portal hypertensive gastropathy in patients with liver cirrhosis and mild portal hypertension[J]. Am J Gastroenterol, 2004, 99(10): 1959-1965. DOI:10.1111/j.1572-0241.2004.40246.x.

[7] PATWARDHAN V R, CARDENAS A. Review article: the management of portal hypertensive gastropathy and gastric antral vascular ectasia in cirrhosis[J]. Aliment Pharmacol Ther, 2014, 40(4): 354-362. DOI:10.1111/apt.12824.

[8] YI Z Q, ZHANG M L, MA Z Y, *et al*. Role of the posterior mucosal defense barrier in portal hypertensive gastropathy[J]. Biomed Pharmacother, 2021, 144: 112258. DOI:10.1016/j.biopha.2021.112258.

[9] RAJILIC-STOJANOVIC M, FIGUEIREDO C, SMET A, *et al*. Systematic review: gastric microbiota in health and disease[J]. Aliment Pharmacol Ther, 2020, 51(6): 582-602. DOI:10.1111/apt.15650.

[10] GIANNELLA R A, BROITMAN S A, ZAMCHECK N. Gastric acid barrier to ingested microorganisms in man: studies *in vivo* and *in vitro*[J]. Gut, 1972, 13(4): 251-256. DOI:10.1136/gut.13.4.251.

[11] XU J, XU X, VERSTRAETE W. The bactericidal effect and chemical reactions of acidified nitrite under conditions simulating the stomach[J]. J Appl Microbiol, 2001, 90(4): 523-529. DOI:10.1046/j.1365-2672.2001.01278.x.

[12] ZHANG S Y, SHI D, LI M R, *et al*. The relationship between gastric microbiota and gastric disease[J]. Scand J Gastroenterol, 2019, 54(4): 391-396. DOI:10.1080/00365521.2019.1591499.

[13] 高萍, 张绍刚, 张美艳. 肝硬化患者胃内 24 h pH 监测结果分析[J]. 临床军医杂志, 2011, 39(6): 1267-1268.
GAO P, ZHANG S G, ZHANG M Y. Analysis of 24h pH monitoring results in the stomach of patients with liver cirrhosis[J]. Clin J Med Off, 2011, 39(6): 1267-1268.

[14] SJÖVALL H. Meaningful or redundant complexity—mechanisms behind cyclic changes in gastroduodenal pH in the fasting state[J]. Acta Physiol (Oxf), 2011, 201(1): 127-131. DOI:10.1111/j.1748-1716.2010.02155.x.

[15] EDGAR R C. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads[J]. Nat Methods, 2013, 10(10): 996-998. DOI:10.1038/nmeth.2604.

[16] STACKEBRANDT E, GOEBEL B M. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 1994, 44(4): 846-849. DOI:10.1099/00207713-44-4-846.

[17] RÖSSLE M. TIPS: 25 years later[J]. J Hepatol, 2013, 59(5): 1081-1093. DOI:10.1016/j.jhep.2013.06.014.

[18] MCCORMACK T T, SIMS J, EYRE-BROOK I, *et al*. Gastric lesions in portal hypertension: inflammatory gastritis or congestive gastropathy?[J]. Gut, 1985, 26(11): 1226-1232. DOI:10.1136/gut.26.11.1226.

[19] PERINI R F, CAMARA P R S, FERRAZ J G P. Pathogenesis of portal hypertensive gastropathy: translating basic research into clinical practice[J]. Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol, 2009, 6(3): 150-158. DOI:10.1038/ncpgasthep1356.

[20] DELGADO S, CABRERA-RUBIO R, MIRA A, *et al*. Microbiological survey of the human gastric ecosystem using culturing and pyrosequencing methods[J]. Microb Ecol, 2013, 65(3): 763-772. DOI:10.1007/s00248-013-0192-5.

[21] OHNO H, SATOH-TAKAYAMA N. Stomach microbiota, Helicobacter pylori, and group 2 innate lymphoid cells[J]. Exp Mol Med, 2020, 52(9): 1377-1382. DOI:10.1038/s12276-020-00485-8.

[22] LIU X S, SHAO L, LIU X, *et al*. Alterations of gastric

mucosal microbiota across different stomach microhabitats in a cohort of 276 patients with gastric cancer [J]. EBioMedicine, 2019, 40: 336-348. DOI: 10.1016/j.ebiom.2018.12.034.

[23] ZHANG X M, LI C, CAO W J, *et al*. Alterations of gastric microbiota in gastric cancer and precancerous stages [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2021, 11: 559148. DOI: 10.3389/fcimb.2021.559148.

[24] HUNT R H, YAGHOOBI M. The esophageal and gastric microbiome in health and disease[J]. Gastroenterol Clin N Am, 2017, 46(1): 121-141. DOI: 10.1016/j.gtc.2016.09.009.

[25] BASSIS C M, ERB-DOWNWARD J R, DICKSON R P, *et al*. Analysis of the upper respiratory tract microbiotas as the source of the lung and gastric microbiotas in healthy individuals[J]. mBio, 2015, 6(2): e00037. DOI: 10.1128/mBio.00037-15.

[26] SCHULZ C, SCHÜTTE K, KOCH N, *et al*. The active bacterial assemblages of the upper GI tract in individuals with and without Helicobacter infection[J]. Gut, 2018, 67(2): 216-225. DOI: 10.1136/gutjnl-2016-312904.

[27] LI M, SHAO D, ZHOU J, *et al*. Microbial diversity and composition in six different gastrointestinal sites among participants undergoing upper gastrointestinal endoscopy in Henan, China [J]. Microbiol Spectr, 2022, 10(3): e0064521. DOI: 10.1128/spectrum.00645-21.

[28] SUNG J, KIM N, KIM J, *et al*. Comparison of gastric microbiota between gastric juice and mucosa by next generation sequencing method[J]. J Cancer Prev, 2016, 21(1): 60-65. DOI: 10.15430/JCP.2016.21.1.60.

[29] SUN Q H, ZHANG J, SHI Y Y, *et al*. Microbiome changes in the gastric mucosa and gastric juice in different histological stages of Helicobacter pylori-negative gastric cancers[J]. World J Gastroenterol, 2022, 28(3): 365-380. DOI: 10.3748/wjg.v28.i3.365.

[30] SUNG J, COKER O, CHU E, *et al*. Gastric microbes associated with gastric inflammation, atrophy and intestinal Metaplasia 1 year after Helicobacter pylori eradication[J]. Gut, 2020, 69(9): gutjnl-2019. DOI: 10.1136/gutjnl-2019-319826.

[31] WU F, YANG L Y, HAO Y H, *et al*. Oral and gastric microbiome in relation to gastric intestinal metaplasia[J]. Int J Cancer, 2022, 150(6): 928-940. DOI: 10.1002/ijc.33848.

[32] SOLÉ C, GUILLY S, DA SILVA K, *et al*. Alterations in gut microbiome in cirrhosis as assessed by quantitative metagenomics: relationship with acute-on-chronic liver failure and prognosis[J]. Gastroenterology, 2021, 160(1): 206-218.e13. DOI: 10.1053/j.gastro.2020.08.054.

[33] ZENG J, WANG C T, ZHANG F S, *et al*. Effect of probiotics on the incidence of ventilator-associated pneumonia in critically ill patients: a randomized controlled multicenter trial[J]. Intensive Care Med, 2016, 42(6): 1018-1028. DOI: 10.1007/s00134-016-4303-x.

[34] 张民生, 冯燕, 江月萍, 等. 肝硬化非曲张静脉破裂出血与血清促胃液素、胃液酸度及门静脉内径关系探讨[J]. 青岛大学医学院学报, 2001, 37(4): 329-330. DOI: 10.3969/j.issn.1672-4488.2001.04.023.
ZHANG M S, FENG Y, JIANG Y P, *et al*. A study on relationship of nonvaricos-rupture hemorrhage of cirrhosis with serum gastrin, acidity of gastric juice and the inner diameter of portal vein[J]. J Qingdao Univ Med Sci, 2001, 37(4): 329-330. DOI: 10.3969/j.issn.1672-4488.2001.04.023.

[35] SWIDSINSKI A, SYDORA B C, DOERFFEL Y, *et al*. Viscosity gradient within the mucus layer determines the mucosal barrier function and the spatial organization of the intestinal microbiota [J]. Inflamm Bowel Dis, 2007, 13(8): 963-970. DOI: 10.1002/ibd.20163.

[36] GODDARD A F, SPILLER R C. The effect of omeprazole on gastric juice viscosity, pH and bacterial counts [J]. Aliment Pharmacol Ther, 1996, 10(1): 105-109. DOI: 10.1111/j.1365-2036.1996.tb00183.x.

[37] APRILE L R O, MENEGHELLI U G, MARTINELLI A L C, *et al*. Gastric motility in patients with presinusoidal portal hypertension[J]. Am J Gastroenterol, 2002, 97(12): 3038-3044. DOI: 10.1111/j.1572-0241.2002.07122.x.

[38] FAHMY M E, OSMAN M A, MAHMOUD R A, *et al*. Measuring of gastric emptying in Egyptian pediatric patients with portal hypertension by using real-time ultrasound[J]. Saudi J Gastroenterol, 2012, 18(1): 40-43. DOI: 10.4103/1319-3767.91739.

[39] GUNNARSDOTTIR S A, SADIK R, SHEV S, *et al*. Small intestinal motility disturbances and bacterial overgrowth in patients with liver cirrhosis and portal hypertension[J]. Am J Gastroenterol, 2003, 98(6): 1362-1370. DOI: 10.1111/j.1572-0241.2003.07475.x.

[40] SHAO Y, JIANG Y C, LI H, *et al*. Characteristics of mouse intestinal microbiota during acute liver injury and repair following 50% partial hepatectomy [J]. Exp Ther Med, 2021, 22(3): 953. DOI: 10.3892/etm.2021.10385.

[41] SCHÄFFLER H, HERLEMANN D P R, ALBERTS C, *et al*. Mucosa-attached bacterial community in Crohn's disease coheres with the clinical disease activity index[J]. Environ Microbiol Rep, 2016, 8(5): 614-621. DOI: 10.1111/1758-2229.12411.

(**收稿**:2022-05-12;**修回**:2022-05-23)

(编辑 邓强庭)