DOI:10.16016/j.2097-0927.202309122

肝硬化患者 TIPS 术后肠道菌群特征性改变及其与临床指标的相关性研究

李胜鹏,肖 续,周 安,谢 卓,赵泳冰,徐征国,杨仕明,唐 波 400037 重庆,陆军军医大学第二附属医院消化内科

［**摘要**］ **目的** 比较既往行颈静脉肝内门体分流术(transjugular intrahepat portosystemic stent-shunt, TIPS)手术的肝硬化患者与未经 TIPS 手术的肝硬化患者的肠道菌群,探索在肝硬化患者中,TIPS 手术与肠道菌群的关系,为基于肠道菌群干预改善肝硬化 TIPS 手术预后提供新思路。**方法** 行 TIPS 手术的肝硬化患者为手术组,未经 TIPS 手术的肝硬化患者为对照组,收集患者大便标本行 16S rRNA 测序分析,并分析肠道菌群与临床指标相关性。**结果** 两组患者在性别、年龄、体重指数(BMI)、病因等基线资料上均无显著差异($P>0.05$),但临床血清学指标(如 HGB,RBC,ALP,ALB,TBIL,PT,INR,APTT,UREA 等)有显著差异($P<0.05$)。手术组与对照组相比,α 多样性无统计学差异($P>0.05$),β 多样性差异明显($P<0.01$),手术组 *Bacteroides*(拟杆菌属)明显增多($P<0.01$),而对照组 *Bifidobacterium*(双歧杆菌属)明显增多($P<0.05$)。肠道菌群功能预测分析显示,手术组较对照组 D-谷氨酰胺和 D-谷氨酸代谢显著上升($P<0.05$),次级胆汁酸生物合成($P<0.05$)也显著上升。临床指标与菌群相关性分析中发现,总胆红素(TBIL)及直接胆红素(DBIL)与 *Bacteroides*(拟杆菌属)、次级胆汁酸代谢通路显著相关。**结论** 肝硬化 TIPS 术后患者肝硬化对照者相比,肠道菌群存在特征性改变,*Bacteroides*(拟杆菌属)可能参与胆汁酸代谢调控进而影响 TIPS 术后血胆红素水平升高。

［**关键词**］ TIPS 手术;肠道菌群;16S rRNA;拟杆菌属;双歧杆菌属
［**中图法分类号**］ R372; R446.112; R657.31 ［**文献标志码**］ A

Changes in characteristics of gut microbiota and their correlation with clinical indicators in cirrhosis patients after transjugular intrahepatic portosystemic shunt

LI Shengpeng, XIAO Xu, ZHOU An, XIE Zhuo, ZHAO Yongbing, XU Zhengguo, YANG Shiming, TANG Bo
Department of Gastroenterology, Second Affiliated Hospital, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400037, China

［**Abstract**］ **Objective** To compare the differences in gut microbiota between cirrhosis patients receiving transjugular intrahepatic portosystemic shunt (TIPS) and those not, and explore the relationship between TIPS surgery and gut microbiota in order to provide new ideas for improving the prognosis of cirrhosis patients after TIPS surgery based on gut microbiota. **Methods** Those who had received TIPS surgery previously were assigned into the operation group, and those without the surgery served as the control group. Their stool samples were collected for 16S rRNA sequencing, and the correlation between gut microbiota and clinical indicators was analyzed. **Results** There were no significant differences in gender, age, body mass index (BMI), etiology and other baseline data between the 2 groups ($P>0.05$), but obvious differences were observed in clinical serological indicators between them, including INR, APTT, RBC and PT counts, and HGB, ALP, ALB, total bilirubin (TBIL), and URE levels ($P<0.05$). No statistical difference in alpha diversity was observed between the operation group and the control group ($P>0.05$), but beta diversity was obviously different ($P<0.01$), among which *Bacteroides* was increased in the operation group ($P<0.01$) and

［**通信作者**］ 唐 波,E-mail: botangxq@tmmu.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/)

Bifidobacterium was increased in the control group ($P<0.05$). The function prediction analysis of gut microbiota showed that the metabolism of D-glutamine and D-glutamate ($P<0.05$) and biosynthesis with secondary bile acids ($P<0.05$) were up-regulated in the operation group compared with the control group. Correlation analysis between clinical indicators and flora indicated that TBIL and direct bilirubin (DBIL) were significantly correlated with the metabolic pathways of *Bacteroides* and Secondary bile acids biosynthesis. **Conclusion** Characteristic changes in gut microbiota are found in cirrhosis patients with and without TIPS surgery. *Bacteroides* may be involved in the regulation of metabolism of bile acids and thus increase bilirubin level.

[**Key words**] transjugular intrahepatic portosystemic shunt; gut microbiota; 16S rRNA; *Bacteroides*; *Bifidobacterium*

Corresponding author: TANG Bo, E-mail: botangxq@tmmu.edu.cn

肝硬化在世界范围内流行,肥胖、非酒精性脂肪性肝病、乙型或丙型肝炎感染、自身免疫性疾病、胆汁淤积性疾病以及铁或铜超负荷等均可以引起肝硬化[1]。肝脏的健康肝实质组织由于长期慢性炎症,被纤维化组织和再生结节取代,导致了肝硬化后门静脉高压的形成。而经颈静脉肝内门体分流术(transjugular intrahepatic portosystem stent-shunt, TIPS)经颈静脉入路,建立肝内的位于肝静脉及门静脉主要分支之间的人工分流通道。其最常见的适应证是食管静脉曲张引起的不受控制的出血和难治性腹水。同时,对于食管静脉曲张出血、腹水、布加综合征或非肝硬化性门静脉高压症患者,也可考虑使用 TIPS 手术[2]。但 TIPS 术后可能出现诸多不可忽视的不良事件,例如肝功能障碍、肝性脑病、心功能不全、肾功能障碍等[3]。

人体内细菌群落数量远超人类细胞数量,其数量大致为人总细胞数量的十倍[4]。这些微生物中的绝大多数居住在我们的胃肠道中,尤其在远端肠道富集[5]。最近的研究表明,微生物组对健康和疾病有巨大影响。它们的数量、构成等都是时刻变化的,这些变化与许多疾病的发生、发展和治疗密切相关[6]。有研究人员提出,肠道微生物群与肝硬化结局之间存在密切联系。例如,与健康受试者相比,肝硬化患者病情的进展与宏基因组物种丰富度显著降低有关[7-8];肝硬化失代偿后自发性细菌性腹膜炎患者肠壁没有物理损伤,致病菌多数为肠杆菌科细菌[9];肝硬化后肝性脑病患者,特定的肠道微生物与肝硬化相关脑功能障碍有关[10]。所以,肠道微生物群组成和功能改变常常随着肝硬化程度的进展而进展,甚至独立于临床生物标志物与疾病预后相关[11]。但肝硬化患者 TIPS 术后临床生物标志物与肠道菌群的关系未有进一步探索,所以明确肝硬化病人 TIPS 手术对肠道微生态的影响,同时解析菌群失调及其导致的代谢异常,构建菌群联合生化指标的 TIPS 术后并发症预测模型,评估微生物群移植是否可预防手术并发症及改善临床结局,这对于肝硬化病人 TIPS 术后并发症的防治具有重要意义。

1 材料方法

1.1 研究对象

以 2019 年 7 月-2020 年 7 月期间,在陆军军医大学第二附属医院就诊的肝硬化患者为研究对象来源。纳入标准:年龄 18-75 岁;符合 2019 年中华医学会肝病学分会《肝硬化诊治指南》的失代偿期肝硬化门静脉高压征患者。排除标准:年龄<18 岁或>75 岁;有以下任意一项者:1、胃肠道手术史;患炎症性肠病;患恶性肿瘤或其他重大疾病者 2、接受口服抗生素、益生菌制剂、质子泵抑制剂,或肠外抗生素治疗的患者;3、严重肝功能损害、重度黄疸(总胆红素>171 mmol/L),SGPT 显著升高(>500 U),PT 明显延长(>20 秒);4、严重肝性脑病患者。最终根据纳入排除标准共纳入患者 82 例患者,其中既往行 TIPS 手术者为手术组,合计 43 例,符合 TIPS 手术指征但拒绝 TIPS 手术者为对照组,共 39 例,见表 1。所有研究对象及其家属对本次研究知情同意。本研究获得陆军军医大学第二附属医院伦理委员会批准,于中国临床试验注册中心注册(ChiCTR1900027886)。

1.2 资料收集

患者就诊时,收集性别、年龄、体重、身高、病因,于洁净环境中采集就诊患者新鲜大便样本,分别转移至无菌 EP 管中,于-80 ℃环境保存待检。采集患者入院时血液样本,送检血白细胞(WBC)计数、红细胞(RBC)计数、血小板(PLT)计数、血红蛋白(HGB)、谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、γ-谷氨酰转移酶(GGT)、碱性磷酸酶(ALP)、凝血酶原时间(TP)、白蛋白(ALB)、总胆红素(TBIL)、直接胆红素(DBIL)、凝血酶原时间(PT)、国际标准化比值(INR)、活化部分凝血活酶时间(APTT)、尿素氮(UREA)、肌酐。

1.3 16SrRNA 测序分析

将冻存的大便样本使用粪便基因组 DNA 提取试剂盒(北京天根生物技术有限公司)提取总 DNA,定容至 50 μL 后使用紫外分光光度仪检测浓度及纯度,PCR 扩增后送北京诺禾致源科技有限公司进行 Miseq 文库构建合 Miseq 测序。

1.4 KEGG 功能预测

根据已测微生物基因组的 16SrRNA 基因全长序列,通过 OUT 聚类分析与 Greengenes 数据库比对,使用 R package 进行功能预测并依据丰度表信息对具有显著性差异的代谢通路信息可视化结果展示。

1.5 统计方法

本研究采用现况研究方案。符合正态分布的计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 来表示,不符合正态分布的计量资料采用 $M(Q_L\sim Q_U)$ 表示。数据处理及分析采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行。两组符合正态分布方差齐性的计量资料采用独立样本 t 检验;不符合正态分布或方差齐性的计量资料采用非参数检验。对每个样本的测序数量和 OTU 数目进行统计,通过 Ace、Chao1 和 Shannon 指数评估菌群 Alpha 多样性,通过主坐标分析(PCoA)图及非度量多维尺度分析(NMDS)图对菌群 Beta 多样性进行比较,用线性判别分析(Lefse)确定指定类群之间丰度差异显著的物种,并用线性回归分析(LDA)来估算每个组分(物种)丰度对差异效果影响的大小。

2 结果

2.1 一般情况

两组患者的一般情况见表 1,对照组共计 39 名患者(男性 24 名,女性 15 名),年龄(53.80±7.85)岁,体质量指数(BMI)(22.8±3.2)kg/m^2。手术组共计 43 例患者(男性 27 名,女性 16 名),年龄(51.4±11.4)岁,体质量指数(BMI)(23.20±3.17)kg/m^2。两组患者在性别、年龄 BMI、病因上均无显著差异(P>0.05),但临床血清学指标有显著差异(P<0.05)。

表 1 研究对象基线资料

	手术组(n=43)	对照组(n=39)	P
男/女	27/16	24/15	>0.999
年龄/岁	51.40±11.40	53.80±7.85	0.271
体重/kg	60.2±9.01	59.7±9.50	0.816
身高/m	1.61±0.0664	1.62±0.0773	0.588
BMI/kg/m^2	23.20±3.17	22.8±3.20	0.629
病因			
酒精性肝硬化	8	5	0.225
病毒性肝硬化	21	25	
免疫性肝硬化	2	1	
淤胆性肝硬化	4	0	
原因不明	8	8	
WBC	3.61±1.10	3.93±2.21	0.416
HGB	113±23.3	92.0±29.0	<0.001
RBC	3.91±0.646	3.39±0.903	0.004
PLT	79.7±87.2	66.2±33.3	0.35
ALT	36.2±17.0	41.6±67.8	0.634
AST	52.9±24.3	44.3±49.1	0.329
GGT	54.0±53.7	53.6±59.3	0.976
ALP	149±78.3	84.6±33.8	<0.001
TP	68.7±9.78	69.4±11.8	0.778
ALB	35.6±4.15	39.7±7.88	0.005
TBIL	40.9±20.8	19.7±5.33	<0.001
DBIL	9.85±6.84	5.34±2.54	<0.001
PT	15.2±2.79	13.2±1.78	<0.001
INR	1.38±0.252	1.20±0.158	<0.001
PTA	60.2±17.3	77.3±16.0	<0.001
APTT	36.3±5.42	31.0±4.18	<0.001
UREA	4.18±1.12	5.71±3.03	0.005
肌酐	64.9±10.1	71.1±19.9	0.086
Child 评分	6.93±1.28	5.69±0.977	<0.001
Child 等级			
A	21	33	0.002
B	20	6	
C	2	0	
MELD 评分	12.7±2.92	9.31±1.84	<0.001
MELD 等级			
1	2	16	<0.001
2	41	23	

2.2 组间肠道菌群差异分析

2.2.1 多样性分析 采用 Ace、Chao1、Shannon 和 Simpson 指数估计样本内的物种数量,通过 Braycurtis、Jaccard 和 Unweighted unifrac 算法计算菌群多样性。结果表明,手术组与对照组在 Alpha 多样性(反映物种真实数量)上无显著性差异(P>0.05)(图 1A),但主坐标分析(PCoA)显示两组患者肠道菌群组成明显分群,表明 Beta 多样性(反映菌群组成)差异明显(P<0.01)(图 1B)。

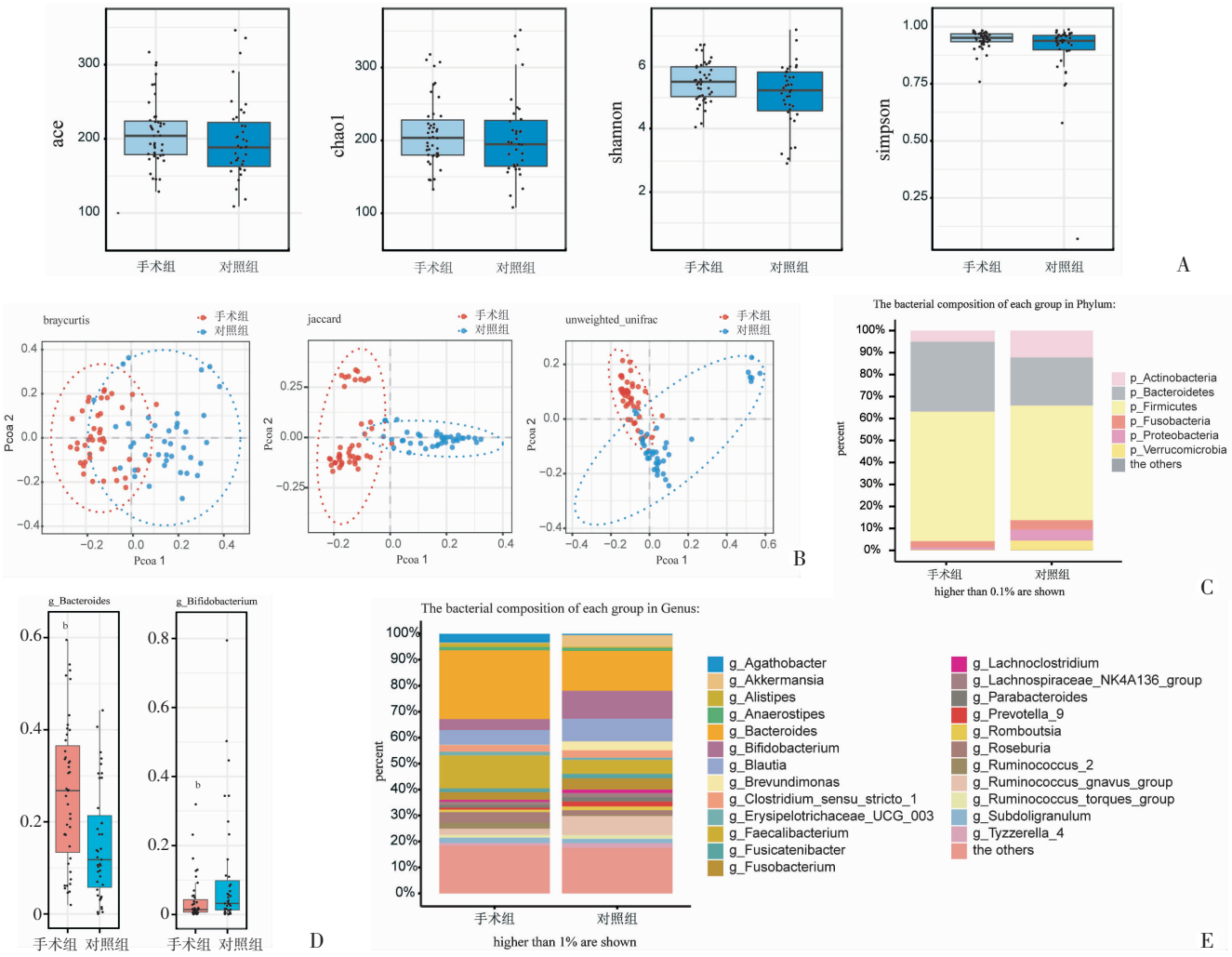
2.2.2 菌群组成分析 在门水平上,手术组和对照组丰度前三的细菌依次为,*Firmicutes*(厚壁菌门)58.9%、52.1%,*Bacteroidetes*(拟杆菌门)31.7%、21.8%,*Actinobacteria*(放线菌门)5%、12.2%(图 1C)。其中 *Actinobacteria*(放线菌门)数量差异具有统计学意义(P<0.05),*Bacteroidetes*(拟杆菌门)数量有显著性差异(P<0.01),见表 2。在相对丰度大于 1%的属水平中,有 24 种菌属被富集出来(图 1E),其中手术组 *Bacteroides*(拟杆菌属)(图 1D)、*Agathobacter*(琼脂杆菌属)、*Roseburia*(罗氏菌属)、*Faecalibacterium*(粪杆菌属)等相对丰度明显增高,有显著差异(P<0.01),而在对照组中可见 *Ruminococcus gnavus group*(活泼瘤胃球

菌属)、*Akkermansia*(阿克曼菌属)等菌属富集,此外,*Bifidobacterium*(双歧杆菌属)($P<0.05$)(图 1D)及 *Fusobacterium*(梭杆菌属)也在对照组相对丰度中有所升高。

2.2.3　肠道菌群结构分析　　为进一步观察手术组和对照组肠道菌群情况,我们进行了线性判别分析(LEFSe 分析),以 LDA 评分(log10)= 3.5 为截断值筛选重要菌群生物标记。结果显示在手术组具有明显差异的物种有 2 种,其中关键菌群在门水平上以 *Bacteroidetes*(拟杆菌门)为主,纲水平以 Bacteroidia(拟杆菌纲)为主,目水平主要集中在 *Bacteroidales*(拟杆菌目),科水平主要集中于 *Bacteroidaceae*(拟杆菌科)及 *Ruminococcaceae*(瘤胃球菌科),但在属水平以 *Faecalibacterium*(普拉梭菌属)和 Bacteroides(拟杆菌属)为主。对照组具有明显差异的物种有 3 种,其中门水平主要集中于 *Actinobacteria*(放线菌门)及 *Verrucomicrobia*(疣微菌门),纲水平以 *Verrucomicrobiae*(疣微菌纲)为主,目水平主要集中在 *Bifidobacteriales*(双歧杆菌目)及 *Verrucomicrobiales*(疣微菌目),科水平以 *Bifidobacteriaceae*(双歧杆菌科)及 *Akkermansiaceae*(疣微菌科)为主,属水平以 *Bifidobacterium*(双歧杆菌属)、*Ruminococcus gnavus group*(活泼瘤胃球菌属)及 *Akkermansia*(阿克曼菌属)为主(图 2A,B)。

表 2　手术组与对照组菌群门类分布比较

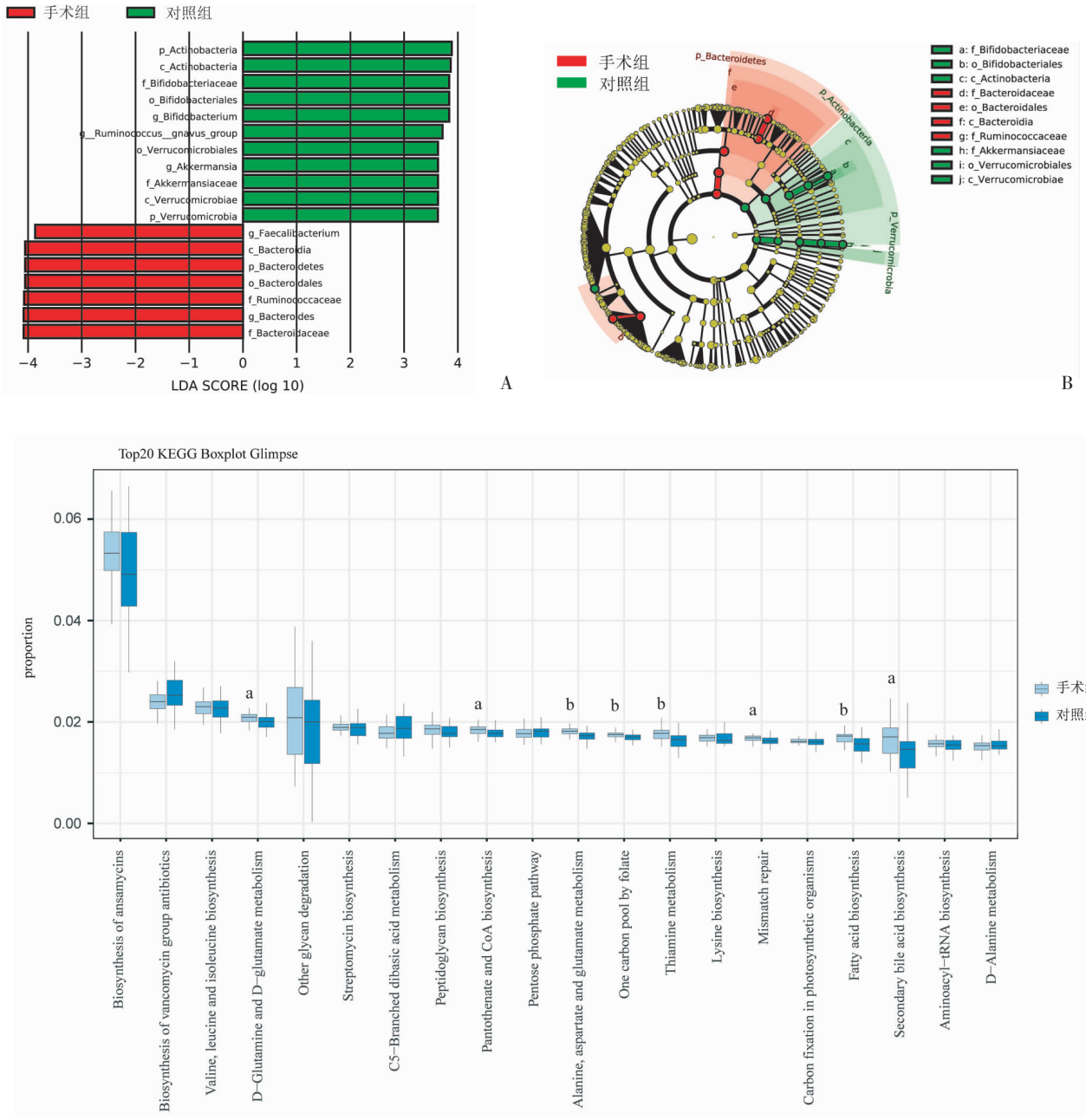
	手术组	对照组	*P*
Actinobacteria	0.050973837	0.122283127	0.0191
Bacteroidetes	0.317465116	0.218339356	0.0093
Firmicutes	0.589212209	0.521643334	0.1542
Fusobacteria	0.028866279	0.042439135	0.4971
Proteobacteria	0.010383721	0.050481932	0.0989
Verrucomicrobia	0.002633721	0.043905128	0.0531
the others	0.000465116	0.000907989	0.1491
F/B	3.873±5.039	8.423±16.692	0.0488



A:由 Ace、Chao1、Shannon 及 Simpson 指数表示 α 多样性;B:由 Braycurtis、Jaccard 及 Unweighted_unifrac 表示 β 多样性;C:门水平组成分析;D:Bacteroides(拟杆菌属)及 Bifidobacterium(双歧杆菌属)的相对丰度,b:$P<0.01$,与对照组比较。;E:属水平组成分析

图 1　组间肠道菌群差异分析

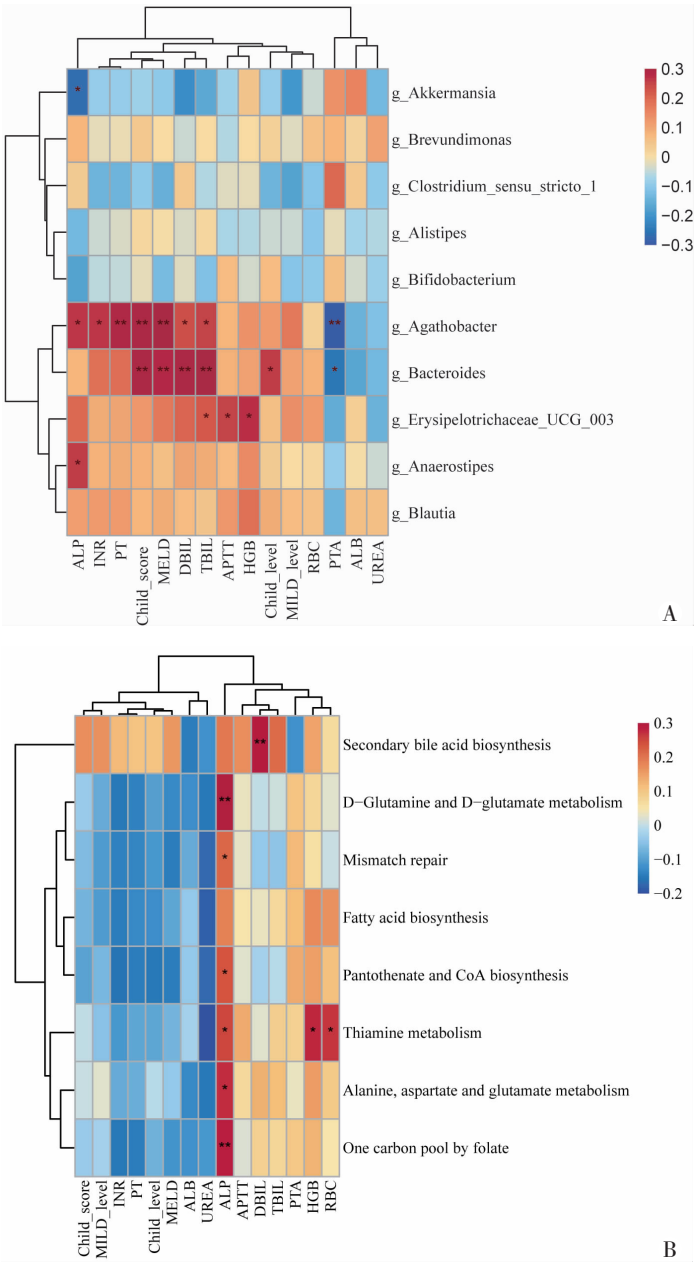
2.2.4　肠道菌群功能分析　　肠道菌群组成差异常常导致肠道菌群功能差异,为进一步探索肠道菌群在两组病人之间的差异,我们基于 16S rRNA 数据对肠道菌群功能做了进一步分析预测。结果显示,在排名前 20 的物质代谢功能中,有 8 个功能存在统计学差异。其中,在手术组中 D-谷氨酰胺和 D-谷氨酸代谢(D-Glutamine and D-glutamate metabolism,$P<0.05$)、泛酸和辅酶 A 生物合成(Pantothenate and CoA biosynthesis,$P<0.05$)、丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢(Alanine, aspartate and glutamate metabolism,$P<0.01$)、硫胺素代谢(Thiamine metabolism,$P<0.01$)、错配修复(mismatch repair,$P<0.05$)、次级胆汁酸生物合成(Secondary bile acid biosynthesis,$P<0.05$)、脂肪酸生物合成(Fatty acid biosynthesis,$P<0.01$)等代谢通路显著升高,差异有统计学意义(图 2C)。



A:分类线性判别分析(LDA)效应量分布,X 轴表示 LDA SCORE(log 10),Y 轴表示显著差异菌属,截断值为 LDA SCORE(log 10)= 3.5;);B:两组中具有显著差异的分类进化枝弧形图,从内而外依次表现差异菌属从属关系,节点大小对应差异菌属的平均相对丰度,红色区域为手术组差异菌属分布区域,绿色区域为对照组差异菌属分布区域;C:肠道菌群功能预测分析(显示前 20),a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与对照组比较。

图 2　肠道菌群 LEFSe 分析及 KEGG 功能分析

2.2.5 肠道菌群与临床参数相关性分析 为探求肠道菌群是否与临床血清学指标具有相关性,本研究对肝硬化病人肠道菌群与临床血清学指标进一步完成了 Pearson 相关系数分析,我们发现 *Bacteroides*(拟杆菌属)与 Child 评分(P<0.01)、MELD 评分(P<0.01)、TBIL(P<0.01)、DBIL(P<0.01)、Child 等级(P<0.05)等强正相关,与 PTA(P<0.05)呈负相关。此外,*Agathobacter*(琼脂杆菌属)与 ALP(P<0.05)、INR(P<0.05)、PT(P<0.01)、Child 评分(P<0.01)、MELD 评分(P<0.01)、TBIL(P<0.05)强正相关,与 PTA(P<0.01)负相关。*Erysipelotrichaceae*(丹毒丝菌属)与 TBIL(P<0.05)、APTT(P<0.05)、HGB(P<0.05)强正相关。见图 3 A。在肠道菌群预测代谢通路与临床指标相关性中我们发现,次级胆汁酸生物合成通路与 DBIL(P<0.01)强正相关,硫胺素代谢与 ALP(P<0.05)、HGB(P<0.05)、RBC(P<0.05)强正相关,见图 3B。



A:肠道菌群属水平丰度前十的菌属与临床血清学指标相关性,红色代表正相关,蓝色代表负相关,颜色深度代表相关性,颜色越深相关性数值越大;B:肠道菌群 KEGG 功能预测差异通路与临床血清学指标相关性,红色代表正相关,蓝色代表负相关,颜色深度代表相关性,颜色越深相关性数值越大。

图 3 肠道菌群与临床参数间的相关性

3 讨论

我们的肠道系统蕴藏着大量的非致病性细菌、真核微生物、古细菌、病毒和噬菌体,构成了一个统称为肠道微生物群的群落。细菌占这些微生物的大多数,它们在人体肠道中的总数估计为 10^{14} 个[12]。起初,基于 16S rRNA 序列对代表不同种族、生活在相似(或不同环境中)的选定人群的肠道菌群进行全面的计数,探索正常人群与患病人群之间的菌群差异[13],意图使用肠道菌群作为胃肠道内(或外)即将发生(或完全显现)的疾病的生物标志物或治疗监测指标[14]。随着研究的发展,研究者发现微生物群生态失调对人体有不良的健康影响,会导致各种疾病[15],如炎症性肠病、哮喘、肥胖、代谢综合征、心血管疾病及免疫介导的疾病和自闭症谱系障碍等神经发育疾病[16]。又有研究表明,人类的肠道菌群结构并不是随机组合,而有很大的相似性,其中正常人的肠型可大致分为拟杆菌型、普氏菌型和瘤胃球菌型等 3 种类型,而依据肠道菌群分型可用于许多人类疾病的诊断甚至预后工具[17]。

本研究中,我们采用了 16S rRNA 高通量测序方法,检测了肝硬化患者 TIPS 手术组和肝硬化患者拒绝 TIPS 手术组(对照组)的肠道菌群。结果发现,两组间 Alpha 多样性无统计学差异($P>0.05$),而 Beta 多样性存在显著性差异($P<0.01$),提示 TIPS 手术对肝硬化患者的肠道菌群组成有显著影响,导致了该组患者肠道菌群构成的改变。通过各水平相对丰富度比较及 LEfSe 分析,我们发现两组菌群大部分属于 *Firmicutes*(厚壁菌门)、*Bacteroidetes*(拟杆菌门)、*Actinobacteria*(放线菌门),与肝硬化病人对照组相比,肝硬化手术组中 *Firmicutes*(厚壁菌门)、*Bacteroidetes*(拟杆菌门)的占比更大,但 *Actinobacteria*(放线菌门)减少。有研究显示,改变的厚壁菌与拟杆菌的比率与微生物生态失调相关,并且 *Firmicutes*(厚壁菌门)与 *Bacteroidetes*(拟杆菌门)比率降低可能表明炎症性肠道状态增加[18-19],而比值升高与肥胖、哮喘和肠易激综合征相关[20-21],也与危重患者的死亡率相关。值得注意的是,在属水平上,肝硬化手术组病人的 *Bacteroides*(拟杆菌属)明显富集,而肝硬化对照组病人的 *Bifidobacterium*(双歧杆菌属)占比更大,既往文献报道,肝硬化患者表现出革兰氏阴性分类群的富集,包括肠杆菌科和拟杆菌属[22],同时拟杆菌属的富集与严重门静脉高压有关[23]。*Bifidobacterium*(双歧杆菌属)是放线菌门严格厌氧的革兰氏阳性多形性杆状细菌,是人和动物肠道的重要核心菌群和有益生理菌群,有助于抗炎、改善血糖控制,表现出抗氧化活性,在患者中显著减少[22-24],特异性补充乳杆菌联合双歧杆菌或单独使用双歧杆菌,可以减少血氨和肝性脑病的发病率[25-26]。因此 TIPS 术后补充 *Bifidobacterium*(双歧杆菌属)或许可作为改善肝硬化病人 TIPS 手术预后的潜在靶点,但具体机制还需进一步研究。

此外,慢性肝病中,氨基酸代谢会改变[27],在本研究肠道菌群功能预测分析中,肝硬化病人手术组 D-谷氨酰胺和 D-谷氨酸代谢显著上升($P<0.05$),丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢($P<0.01$)显著上升,尽管所有氨基酸都具有产生氨的潜力,但在肝硬化的情况下,一些氨基酸(谷氨酰胺和模拟血红蛋白)会增加氨并造成肝性脑病,而其他氨基酸(支链氨基酸、鸟氨酸等)对疾病进展有益处并减少氨的产生[28]。

胆汁酸主要由肝脏和肠道微生物群代谢。初级胆汁酸由胆固醇在肝脏中产生,次级胆汁酸则由肠道细菌转化初级胆汁酸而来[29-30]。我们观察到,相较于对照组,手术组次级胆汁酸生物合成通路明显上调。这一通路以初级胆汁酸为原料,通过去结合、氧化和酯化过程,生成次级胆汁酸。既往文献报道,胆盐水解酶(BSH)能够在回肠末端和结肠上段肠道将结合型胆汁酸去结合形成游离型胆汁酸[31]。这一效应被认为是肥胖相关代谢疾病的潜在药物靶标,同时最新研究发现这一机制同时可增强结直肠炎症性肠癌的发生发展[32]。代谢通路的上调提示在手术组人群肠道中的次级胆汁酸水平可能增加。

此外,在本研究肠道菌群与临床指标相关性分析中,我们发现 *Bacteroides*(拟杆菌属)与胆红素水平升高显著相关,据报道大多数 BSH 存在于 *Bacteroides*(拟杆菌属)、*Blautia*(经黏液真杆菌属)、*Eubacterium*(真杆菌属)、*Clostridium*(梭菌属)和 *Roseburia*(罗氏菌属)等五个属中,约占人类肠道宏基因组中 BSH 总丰度的 71.31%[33]。此外,拟杆菌以及来自拟杆菌的细胞提取物可以增强 7α-脱羟基化,与初级胆汁酸体外共培养中产生大量的次级胆汁酸[34]。

同时,次级胆汁酸代谢也与胆红素水平升高有关显著相关。既往报道,次级胆汁酸生物合成通路生成的次级胆汁酸已被发现促进肠道通透性和结直肠癌变相关[35]。最新的研究表明,DCA 减少了肠屏障相关基因的表达,包括紧密连接基因,局灶黏附基因,间隙连接基因和黏附连接基因等,此外,DCA 可通过抑制 ERK 活化,破坏紧密连接完整性的稳定性,降低紧密连接和细胞核处的闭塞素蛋白水平,以增强肠道通透性[36]。而肠道通透性的增加导致从肝脏合成得的直接胆红素从肠道扩散入血增多,进而导致血总胆红素及直接胆红素增加。

综上所述,结合本研究两组间菌群结构、功能差异

和临床指标,我们推测肠道菌群参与肝硬化病人 TIPS 术后病情发展。肝硬化病人 TIPS 手术后的 *Bacteroides*(拟杆菌属)富集,次级胆汁酸生物合成通路上调,可能通过提高肠道内次级胆汁酸浓度,进而诱导肠道黏膜表面黏液脱落、黏蛋白分泌并引起黏膜损伤[37],使得从肝脏合成得的直接胆红素从肠道扩散入血增多,导致血总胆红素及直接胆红素增加。这提示着 *Bacteroides*(拟杆菌属)的相对高丰度或许可以作为评价肝硬化病人 TIPS 术后胆红素水平的潜在生物标记点。

参考文献:

[1] GINES P, KRAG A, ABRALDES J G, *et al*. Liver cirrhosis [J]. Lancet, 2021, 398(10308): 1359-1376. DOI: 10.1016/s0140-6736(21)01374-x.

[2] LEE H L, LEE S W. The role of transjugular intrahepatic portosystemic shunt in patients with portal hypertension: advantages and pitfalls[J]. Clin Mol Hepatol, 2022, 28(2): 121-134. DOI: 10.3350/cmh.2021.0239.

[3] PATIDAR K R, SYDNOR M, SANYAL A J. Transjugular intrahepatic portosystemic shunt[J]. Clin Liver Dis, 2014, 18(4): 853-876. DOI: 10.1016/j.cld.2014.07.006.

[4] PFLUGHOEFT K, VERSALOVIC J. Human microbiome in health and disease[J]. Annu Rev Pathol. 2012;7:99-122. doi: 10.1146/annurev-pathol-011811-132421.

[5] GILL S R, POP M, DEBOY R T, *et al*. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome[J]. Science, 2006, 312(5778): 1355-1359. DOI: 10.1126/science.1124234.

[6] EL-SAYED A, ALEYA L, KAMEL M. Microbiota's role in health and diseases[J]. Environ Sci Pollut Res Int, 2021, 28(28): 36967-36983. DOI: 10.1007/s11356-021-14593-z.

[7] SOLE 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.

[8] QIN N, YANG F L, LI A, *et al*. Alterations of the human gut microbiome in liver cirrhosis[J]. Nature, 2014, 513(7516): 59-64. DOI: 10.1038/nature13568.

[9] ACHARYA C, SAHINGUR S E, BAJAJ J S. Microbiota, cirrhosis, and the emerging oral-gut-liver axis[J]. JCI Insight, 2017, 2(19): e94416. DOI: 10.1172/jci.insight.94416.

[10] AHLUWALIA V, BETRAPALLY N S, HYLEMON P B, *et al*. Impaired gut-liver-brain axis in patients with cirrhosis[J]. Sci Rep, 2016, 6(1): 1-11. DOI: 10.1038/srep26800.

[11] BAJAJ J, KHORUTS A. Microbiota changes and intestinal microbiota transplantation in liver diseases and cirrhosis[J]. J Hepatol. 2020 May;72(5):1003-1027. doi: 10.1016/j.jhep.2020.01.017.

[12] LUPP C, FINLAY B B. Intestinal microbiota[J]. Curr Biol, 2005,15(7):R235-6. doi: 10.1016/j.cub.2005.03.032.

[13] CHACON O, BERMUDEZ L E, BARLETTA R G. Johne's disease, inflammatory bowel disease, and *Mycobacterium paratuberculosis*[J]. Annu Rev Microbiol, 2004, 58: 329-363. DOI: 10.1146/annurev.micro.58.030603.123726.

[14] BACKHED F, LEY R E, SONNENBURG J L, *et al*. Host-bacterial mutualism in the human intestine[J]. Science, 2005, 307(5717): 1915-1920. DOI: 10.1126/science.1104816.

[15] CHEN Y, ZHOU J, WANG L. Role and mechanism of gut microbiota in human disease[J], Front Cell Infect Microbiol [J]. 2021 (11): 625913. doi: 10.3389/fcimb.2021.625913

[16] BARKO P, MCMICHAEL M A, SWANSON K, *et al*. The gastrointestinal microbiome: a review[J]. J Vet Intern Med, 2017, 32: 9-25. DOI: 10.1111/jvim.14875.

[17] ARUMUGAM M, RAES J, PELLETIER E, *et al*. Enterotypes of the human gut microbiome[J]. Nature, 2011, 473(7346): 174-180. DOI: 10.1038/nature09944.

[18] STOJANOV S, BERLEC A, STRUKELJ B. The influence of probiotics on the firmicutes/bacteroidetes ratio in the treatment of obesity and inflammatory bowel disease[J]. Microorganisms, 2020, 8(11): 1715. DOI: 10.3390/microorganisms8111715.

[19] LANKELMA J M, VAN VUGHT L A, BELZER C, *et al*. Critically ill patients demonstrate large interpersonal variation in intestinal microbiota dysregulation: a pilot study[J]. Intens Care Med, 2017, 43(1): 59-68. DOI: 10.1007/s00134-016-4613-z.

[20] DE VOS W M, DE VOS E A. Role of the intestinal microbiome in health and disease: from correlation to causation[J]. Nutr Rev, 2012, 70(suppl_1): S45-S56. DOI: 10.1111/j.1753-4887.2012.00505.x.

[21] LEY R E, TURNBAUGH P J, KLEIN S, *et al*. Human gut microbes associated with obesity[J]. Nature, 2006, 444(7122): 1022-1023. DOI: 10.1038/4441022a.

[22] PONZIANI F R, BHOORI S, CASTELLI C, *et al*. Hepatocellular carcinoma is associated with gut microbiota profile and inflammation in nonalcoholic fatty liver disease[J]. Hepatology, 2018, 69(1): 107-120. DOI: 10.1002/hep.30036.

[23] GEDGAUDAS R, BAJAJ J S, SKIECEVICIENE J, *et al*. Circulating microbiome in patients with portal hypertension[J]. Gut Microbes, 2022, 14(1): 2029674. DOI: 10.1080/19490976.2022.2029674.

[24] LIU J J, WU D C, AHMED A, *et al*. Comparison of the gut

microbe profiles and numbers between patients with liver cirrhosis and healthy individuals[J]. Curr Microbiol, 2012, 65(1): 7-13. DOI: 10.1007/s00284-012-0105-8.

[25] HUANG L, YU Q, PENG H, *et al*. Alterations of gut microbiome and effects of probiotic therapy in patients with liver cirrhosis: A systematic review and meta-analysis[J]. Medicine (Baltimore). 2022;101(51):e32335. doi: 10.1097/MD.0000000000032335.

[26] EREG D, KOTLIROFF A, GADOTH N, *et al*. Probiotics for patients with compensated liver cirrhosis: a double-blind placebo-controlled study[J]. Nutrition. 2011,27(2):177-181. doi: 10.1016/j.nut.2010.01.006. Epub 2010 May 10.

[27] JIN R, BANTON S, TRAN V T, *et al*. Amino acid metabolism is altered in adolescents with nonalcoholic fatty liver disease—an untargeted, high resolution metabolomics study[J]. J Pediatr, 2016, 172: 14-19. e5. DOI: 10.1016/j.jpeds.2016.01.026.

[28] KROUPINA K, BEMEUR C, ROSE C. Amino acids, ammonia, and hepatic encephalopathy[J]. Anal Biochem. 2022(15);649:114696. doi: 10.1016/j.ab.2022.114696

[29] RIDLON J M, KANG D J, HYLEMON P B. Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria[J]. J Lipid Res, 2006, 47(2): 241-259. DOI: 10.1194/jlr.r500013-jlr200.

[30] RIDLON J M, KANG D J, HYLEMON P B, *et al*. Bile acids and the gut microbiome[J]. Curr Opin Gastroenterol, 2014, 30(3): 332-338. DOI: 10.1097/MOG.0000000000000057.

[31] TANG B, TANG L, LI S P, *et al*. Gut microbiota alters host bile acid metabolism to contribute to intrahepatic cholestasis of pregnancy[J]. Nat Commun, 2023, 14(1): 1-17. DOI: 10.1038/s41467-023-36981-4.

[32] SUN L L, ZHANG Y, CAI J, *et al*. Bile salt hydrolase in non-enterotoxigenic *Bacteroides* potentiates colorectal cancer [J]. Nat Commun, 2023, 14(1): 755. DOI: 10.1038/s41467-023-36089-9.

[33] SONG Z W, CAI Y Y, LAO X Z, *et al*. Taxonomic profiling and populational patterns of bacterial bile salt hydrolase (*BSH*) genes based on worldwide human gut microbiome [J]. Microbiome, 2019, 7(1): 1-16. DOI: 10.1186/s40168-019-0628-3.

[34] HIRANO S, MASUDA N. Enhancement of the 7 alpha-dehydroxylase activity of a gram-positive intestinal anaerobe by *Bacteroides* and its significance in the 7-dehydroxylation of ursodeoxycholic acid [J]. J Lipid Res, 1982, 23(8): 1152-1158.

[35] BERNSTEIN C, BERNSTEIN H, GAREWAL H, *et al*. A bile acid-induced apoptosis assay for colon cancer risk and associated quality control studies[J]. Cancer Res, 1999, 59(10): 2353-2357.

[36] ZENG H W, SAFRATOWICH B D, CHENG W H, *et al*. Deoxycholic acid modulates cell-junction gene expression and increases intestinal barrier dysfunction [J]. Molecules, 2022, 27(3): 723. DOI: 10.3390/molecules27030723.

[37] CAMILLERI M. Bile acid detergency: permeability, inflammation, and effects of sulfation[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2022, 322(5): G480-G488. DOI: 10.1152/ajpgi.00011.2022.

(收稿:2023-09-20;修回:2023-10-18)

(编辑 邓强庭)