



基于概率话题模型的轻微型肝性脑病患者肠道菌群结构研究

王侠林¹, 左赞^{1,2}, 范红^{1,2}, 孔祥阳¹, 贺建峰^{1*}

¹昆明理工大学信息工程与自动化学院, 云南 昆明 650500

²昆明理工大学附属医院, 云南省第一人民医院消化科, 云南 昆明 650532

摘要:【目的】利用 LDA (Latent Dirichlet Allocation) 概率话题模型分析轻微型肝性脑病(MHE)患者服用利福昔明联合益生菌对其肠道菌群结构异质性和临床疗效的影响。【方法】采用 R 语言包中的 LDA 概率话题模型的折叠 Gibbs 抽样蒙特卡洛算法, 对 MHE 患者肠道菌群结构的时间异质性 OTUs (operational taxonomic unit) 数据集进行分析。【结果】LDA 模型将 MHE 患者的 42 份粪便样本分成 3 个主题(topic), 并能鉴定出影响 MHE 患者肠道菌群异质性结构最大的 OTUs 菌属, 分别为埃希菌属(*Escherichia*)、类杆菌属(*Bacteroides*)和链球菌属(*Streptococcus*)。对比治疗前后, 这 3 种菌属在组内的变异模式为同类型菌属的转变次数和频率均高于不同类型的菌属。利福昔明联合益生菌治疗组和单独利福昔明治疗组治疗后, MHE 患者的肠道菌群结构均有所改变($P < 0.05$)。此外, 根据临床疗效指标, 对比两组患者治疗后血清 IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、TNF- α 、TBIL、ALT、CRP、NCT-A、 γ -GGT 及血氨水平, 观察组明显优于对照组, 差异显著, 有统计学意义($P < 0.05$)。治疗组总有效率 88.8%, 不良反应总发生率 22.2%, 对照组总有效率 75%, 不良反应总发生率 38.5% ($P < 0.05$)。【结论】LDA 模型不仅能有效地量化菌群结构的异质性, 还能鉴定出相对应影响异质性最大的 OTUs。利福昔明联合益生菌疗法能明显改善 MHE 患者的血氨水平和血清炎症因子水平, 且对 MHE 患者的肠道菌群结构也有一定的改变, 具体表现为致病菌数量减少, 有益菌数量增加, 具有较好的临床应用价值。

关键词: LDA 模型, Gibbs 采样, 轻微型肝性脑病, 利福昔明, 利福昔明联合益生菌

轻微型肝性脑病 (minimal hepatic encephalopathy, MHE) 也称为亚临床肝性脑病 (subclinical hepatic encephalopathy, SHE), 由严重肝病引起, 是肝硬化患者产生严重并发症和死亡的主

要原因之一^[1-3]。近年来, 很多研究者发现, MHE 的发生与肠道微生态失衡有密切联系^[4-5]。利福昔明、乳果糖、益生菌、门冬氨酸鸟氨酸等是肝性脑病肠道微生态治疗的有效手段^[6-8]。其相关主要作

基金项目: 国家自然科学基金(11265007)

*通信作者。E-mail: jfenghe@qq.com

收稿日期: 2017-08-16; 修回日期: 2017-11-05; 网络出版日期: 2018-01-25

用是减少肠道毒素的产生,抑制肠道产尿素酶类细菌的生长,修复肝性脑病肠道相关的微生态失调,促进肝脏毒性物质的代谢,防止氨和有毒物质的产生与吸收。

目前,临床主要采用利福昔明、乳果糖和益生菌对 MHE 患者进行治疗。利福昔明是一种从利福霉素衍生而来的非氨基糖苷类半合成抗菌药物,具有抗菌谱广、抗菌活性强等特性^[9-11]。相关研究报道,利福昔明对肝性脑病的治疗作用,其中大部分是通过对比利福昔明与乳果糖的治疗疗效从而肯定利福昔明的有效性^[12-13]。利福昔明可有效抑制肠道产尿素酶的细菌,减少氨的生成,但临床效果会产生不良反应。而益生菌制剂是一种活菌制剂^[14-15],主要功能为通过调节宿主肠道微生物菌群生态平衡并且抑制肠道内毒素的产生以及吸收。此外,该制剂还可直接补充人体有益菌群,改善肠道微生态,调节肠道内的菌群紊乱,降低致病菌含量,从而使内毒素的生成减少。因此,益生菌可以降低肠道 pH 值和血氨生成,防止产生尿素酶细菌的生长以及抑制炎症细胞因子等多种作用,由于益生菌是厌氧菌,进食时随唾液吞入的氧气到达胃肠后可抑制厌氧菌的活性,所以临床疗效不是很显著^[16-17]。乳果糖是由于消化道的不良反应从而限制了乳果糖的长期应用^[18]。

关于利福昔明、乳果糖和益生菌、利福昔明联合乳果糖治疗 MHE 已有相关研究^[19-21],但是利福昔明联合益生菌疗法对 MHE 患者的肠道菌群结构影响的相关研究尚未见报道。利福昔明、乳果糖、益生菌单独使用其临床疗效不是很好,再加上由于菌群数据的特性与文本分析的变化模式相类似,因此,本文采用 LDA (Latent Dirichlet Allocation) 概率话题模型^[22-23]对服用利福昔明联合益生菌疗法的时间动态变化的 MHE 患者肠道微生物菌群结构进

行研究。研究结果表明,LDA 模型不仅能有效地量化 MHE 患者菌群结构的异质性,还能鉴定出相对影响异质性结构最大的 OTUs (operational taxonomic unit,即操作分类单元,通过一定的距离度量方法计算两两不同序列之间的距离度量或相似性,继而设置特定的分类阈值,获得同一阈值下的距离矩阵,进行聚类操作,形成不同的分类单元)。此外,利福昔明和利福昔明联合益生菌疗法均能明显改善 MHE 患者的认知功能、血氨水平及血清炎症因子水平,利福昔明联合益生菌的不良反应的发生率显著低于利福昔明,比利福昔明具有更好的疗效。两种治疗方法对 MHE 患者的肠道菌群结构也有一定的改变,具体表现为致病菌数量减少,有益菌数量增加,具有较好的临床应用价值。

1 材料和方法

1.1 LDA 概率话题模型

Latent Dirichlet Allocation (LDA) 概率话题模型是当前最流行的主题模型,是 Blei 等^[24]于 2003 年提出的一种基于文本分析的非监督学习算法的主题模型。LDA 可以用来识别大规模文档集或语料库中潜在隐藏的主题信息。在本文中,大规模文档集或语料库对应 LDA 模型的 OTUs 数据集,单词 (words) 和文档 (documents) 分别对应 LDA 模型的 OTU 单元和样本数,主题 (topic) 表示最终被分为几个主题模型。LDA 模型的基本原理生成过程如下:

(1) 选择合适的主题数 k 和合适的超参数向量 $\vec{\alpha}$, $\vec{\beta}$ 。 $\vec{\alpha}$ 和 $\vec{\beta}$ 分别服从 $\theta_i \sim Dir(\vec{\alpha})$, $i=1,2,\dots,S$ 和 $\varphi_k \sim Dir(\vec{\beta})$, $k=1,2,\dots,K$ 多项式分布。

(2) 对应 OTUs 数据集中每一个样本的每一个 OTU 单元 W_{ij} , $i=\{1,\dots,M\}$, $j=\{1,\dots,N_i\}$, 随机的赋予一个主题编号 Z 。

(3) 重新扫描 OTUs 数据集，对于每一个词 (OTU)，利用 Gibbs 采样算法更新 Topic 编号，并更新 OTUs 数据集中 OTU 单元的编号。

(4) 重复第 3 步的基于坐标轴轮换的 Gibbs 采样，直到 Gibbs 采样收敛。

(5) 统计 OTUs 数据集中的各个样本各个 OTU 单元的主题，得到样本主题分布 $Z_{i,j} \sim Multinomial(\theta_j)$ ，统计 OTUs 数据集中各个主题 OTU 单元的分布，得到 LDA 的主题与 OTU 单元的分布 $W_{i,j} \sim Multinomial(\phi_{Z_{i,j}})$ 。并根据抽样产生的模块分配值来预测参数 $\theta_{s,k}$ 和 $\phi_{k,n}$ 。

由于 LDA 模型最重要的是对其参数的估计，因此本文采用折叠 Gibbs 抽样法的蒙特卡洛算法^[26-27]来对模型参数 $\theta_{s,k}$ 和 $\phi_{k,n}$ 进行估计。

Gibbs Sampling 算法步骤：

1，随机初始化： $\{X_i : i = 1, 2, \dots, n\}$ ；

2，for $i = 0$ to $N - 1$ do { // 第 i 个 sample 点为 $X_{(i)}$ ， X 的下标 j 为 X 的第 j 维

(1) sample $X_1^{(i+1)} \sim p(X_1 | X_2^{(i)}, X_3^{(i)}, \dots, X_n^{(i)})$

(2) sample $X_2^{(i+1)} \sim p(X_2 | X_1^{(i+1)}, X_3^{(i)}, \dots, X_n^{(i)})$

...

(3) sample $X_j^{(i+1)} \sim p(X_j | X_1^{(i+1)}, X_2^{(i+1)}, \dots, X_{j-1}^{(i+1)}, X_{j+1}^{(i+1)}, \dots, X_n^{(i)})$

...

(4) sample $X_n^{(i+1)} \sim p(X_n | X_1^{(i+1)}, X_2^{(i+1)}, \dots,$

$X_{n-1}^{(i+1)})$

得到模型参数 $\theta_{s,k}$ 和 $\phi_{k,n}$ 后，就可以计算出 LDA 模型。

1.2 数据集

本次数据集来源于云南省第一人民医院消化科收治的 21 例肝硬化 MHE 患者，男性 14 例，女性 7 例，年龄(51±13)岁。样品采集使用云南省第一人民医院痰培养盒，留取粪便后在 2 h 内放入液氮储存，随后-80 °C 冰箱保存；同时用无热源的抗凝管抽取 5 mL 受试者外周静脉血，进行 IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、TNF- α 、TBIL、ALT、CRP、NCT-A、 γ -GGT 和血氨等检查。分组方法如表 1，治疗前后对患者进行数字连接试验 A (NCT-A)和数字符号试验(DST)测试，总共为 42 个样本。

2 结果和分析

2.1 LDA 模型对 MHE 患者治疗前后肠道微生物菌群的结构分析

参与本项目课题的肝硬化 MHE 患者共计 21 名，随机分为 2 组，性别和年龄两组分别比较无统计学意义。采集患者治疗前后的粪便样本，共得到 42 份粪便样本。对 42 份粪便样本进行 DNA 提取，采取靶向扩增 16S V4 区(引物对为 515F-806R)的方法，制备扩增子。基于 Illumina HiSeq 2500 测序仪，对扩增子进行高通量测序。共计得到 1625975 条

表 1. 实验分组方法

Table 1. Experimental grouping method

| Group | Case | Taking medicine | Dosage | Taking time |
|--|------|--|---|------------------|
| The observation group (RP) before and after treatment (RPre/RPost) | 9 | Rifaximin+Bacillus subtilis/Enterococcus two viable capsules group | Oral rifaximin 0.4 g orally 2 times/day, Bacillus subtilis/enterococci enteric-coated capsules 0.5 g orally 3 times/day | Oral for 4 weeks |
| The control group (R) before and after treatment (Rpre/Rpost) | 12 | Rifaximin | Oral rifaximin 0.4 g orally 2 times/day | Oral for 4 weeks |

高质量的读序列, 平均每份样本的读序列数为 38714 ± 812 (SEM)。以 97% 的序列相似性作为种水平的分类标准, 共鉴定 1684 个 OTUs, 每份样本平均含有 317 ± 29 (SEM) 个 OTUs。整个数据集的 1684 个 OTUs 属于 29 个门的 243 个属。整个序列数据集的测序覆盖度为 $99.69\% \pm 0.03\%$ (SEM)。

LDA 模型将 MHE 患者的 42 份粪便样本分成

了 3 个 Topic, 如表 2 所示。其中, Topic 1 中含有 18 个样本, Topic 2 中含有 12 个样本, Topic 3 中含有 12 个样本。另外, 根据权重值可以判定不同样本在 Topic 中占的权重大小, 权值越大, 代表该样本越显著。在 Topic 1 中, RP06pre 样本的权重值达到最大为 $6.09E-02$; Topic 2 中, R10post 样本达到最大为 $6.14E-02$; Topic 3 中, R05post

表 2. LDA 模型所发现的重要 OTUs 菌和对应的 3 个主题模型

Table 2. Important OTUs discovered by the LDA model and corresponding 3 themed models

| Topic ID | Samples ID | Weights | Important OTUs bacteria |
|----------|------------|----------|--|
| Topic 1 | RP01pre | 3.74E-02 | OTU_1 (<i>Escherichia</i>), OTU_18 (<i>Escherichia</i>), OTU_29 (<i>Escherichia</i>), OTU_33 (<i>Faecalibacterium</i>), OTU_46 (<i>Haemophilus</i>), OTU_66 (<i>Escherichia</i>), OTU_89 (<i>Oscillospira</i>), OTU_95 (<i>Morganella</i>), OTU_130 (<i>Escherichia</i>), OTU_148 (<i>Escherichia</i>), OTU_169 (<i>Escherichia</i>), OTU_239 (<i>Escherichia</i>), OTU_293 (<i>Sutterella</i>), OTU_322 (<i>Phormidium</i>), OTU_464 (<i>Escherichia</i>), OTU_551 (<i>Escherichia</i>), OTU_1020 (<i>Escherichia</i>), OTU_1094 (<i>Buchnera</i>), OTU_1348 (<i>Escherichia</i>) |
| | RP01post | 4.15E-02 | |
| | R01pre | 3.73E-02 | |
| | R01post | 3.96E-02 | |
| | R02pre | 3.69E-02 | |
| | RP02pre | 4.11E-02 | |
| | RP02post | 4.26E-02 | |
| | RP03pre | 4.33E-02 | |
| | RP03post | 4.12E-02 | |
| | RP04pre | 3.94E-02 | |
| | RP04post | 2.95E-02 | |
| | RP05pre | 4.04E-02 | |
| | RP05post | 3.57E-02 | |
| | R03pre | 4.04E-02 | |
| | R03post | 4.24E-02 | |
| | R04pre | 3.48E-02 | |
| | R04post | 4.18E-02 | |
| | Topic 2 | RP06pre | |
| R02post | | 2.72E-02 | |
| RP06post | | 1.24E-01 | |
| R05post | | 1.25E-01 | |
| RP07pre | | 1.02E-02 | |
| RP07post | | 1.59E-02 | |
| R07pre | | 2.43E-03 | |
| R07post | | 1.32E-02 | |
| RP08pre | | 4.12E-03 | |
| RP08post | | 9.50E-03 | |
| RP09pre | | 9.63E-02 | |
| R11pre | | 8.14E-02 | |
| Topic 3 | R11post | 1.13E-01 | OTU_6 (<i>Streptococcus</i>), OTU_31 (<i>Streptococcus</i>), OTU_85 (<i>Streptococcus</i>), OTU_99 (<i>Ruminococcaceae</i>), OTU_118 (<i>Oscillospira</i>), OTU_132 (<i>Streptococcus</i>), OTU_133 (<i>Streptococcus</i>), OTU_136 (<i>Streptococcus</i>), OTU_151 (<i>Streptococcus</i>), OTU_365 (<i>Butyricimonas</i>), OTU_1365 (<i>Bacteroides</i>), OTU_1456 (<i>Streptococcus</i>) |
| | R05pre | 4.58E-02 | |
| | R06pre | 5.87E-02 | |
| | R06post | 5.86E-02 | |
| | R08pre | 3.82E-02 | |
| | R08post | 3.02E-02 | |
| | R09pre | 3.26E-02 | |
| | R09post | 3.25E-02 | |
| | RP09post | 5.14E-02 | |
| | R10pre | 5.67E-02 | |
| | R10post | 6.14E-02 | |
| | R12pre | 5.60E-02 | |
| R12post | 5.34E-02 | | |

样本达到最大为 $1.25E-01$ 。说明样本 RP06pr、R10post 和 R05post 分别对 Topic 1、Topic 2 和 Topic 3 贡献最大。上述结果表明, LDA 模型能够区分样本间的相似性。更为重要的是, 从中发现 LDA 模型还能提取影响样本最大的 OTUs 菌。其中, OTU_1(*Escherichia*)、OTU_18(*Faecalibacterium*)、OTU_551(*Escherichia*)等菌对 Topic 1 中的样本 RP01pre、RP01post、R01pre、R01post、R02pre 和 RP02pre 等影响最大; OTU_4(*Bacteroides*)、OTU_23(*Bacteroides*)、OTU_34(*Bacteroides*)、OTU_37(*Bacteroides*)、OTU_48(*Bacteroides*)、OTU_87(*Bacteroides*)等菌对 Topic 2 的样本 R02post、RP06post、R05post、RP07pre、RP07post 和 R07pre 影响最大; OTU_6(*Streptococcus*)、OTU_31(*Streptococcus*)、OTU_85(*Streptococcus*)、OTU_99(*Ruminococcaceae*)等菌对 Topic 3 的样本 R05pre、R06pre、R06post、R08pre、R08post、R09pre 和 R09post 影响最大; 这些代表性 OTUs 可能是 MHE 患者肠道菌群核心的 OTUs。

得到 LDA 模型后, 构建 LDA 主题模型最小生成树 Minimum Spanning Tree (MST)和骨干树 (Backbone.tree)。图 1 反映 LDA 模型对 MHE 患者的 OTUs 数据集的分类结果以及分类聚集程度。

图 1-A 最小生成树(MST), 左边图根据单元节点的主题分布着色, 右边图以采样时间(以天为单位)着色。每个点代表 OTU 单元, Topic 中点的颜色表示 3 个不同的主题, Group 中表示不同的采样时间。图 1-B 骨干树(Backbone.tree-b.tree), 分别显示 Topic 和 Group 骨干树的两相轨迹, 且具有 OTU 单元小分支, 沿着树轨迹的排序遵循期望的时间序列。图 1-C 骨干树(Backbone.tree-b.tree2), 较大的节点表示骨干 OTU, 而较小的节点表示仅与它们连接的骨干略微变化的 OTU。OTU 节点根

据图 1-C 分布主题和采样时间着色。

图 1-A 可以看出, 最小生成树(MST)将 MHE 数据集分为 3 个 Topic, 且每个 Topic 用 3 种不同的颜色表示, 以此证明 LDA 能够区分样本间的相似性。通过 Compute.Backbone.tree 主干树的 b.tree 生成骨干树, 反映这 3 个 Topic 的聚集程度, 从中可以看出, 出现了两相轨迹(图 1-B)。为使聚集效果更好, 在此基础上添加能够动态地调整距离阈值的尺度因子(Width.scale.factor)。最终发现, 图 1-C 中骨干树由分支结构变成了线性结构, 证明了尺度因子的变化会导致骨干树形状的变化。图 1-C 表明, 距离阈值尺度因子在一定范围内值越高, 骨干树的聚集效果会更好。也就是说, 图 1-C 的聚集程度比图 1-B 的聚集程度效果好。

(1) 通过对 LDA 模型鉴定出的重要 OTUs 菌(表 2)进行分析, 发现 LDA 模型根据划分的 3 个主题模型, 鉴定出了 3 种主要影响 MHE 患者肠道微生物群落结构的菌群类型(图 2)。分别为 3 种颜色表示的埃希菌属(*Escherichia*)、类杆菌属(*Bacteroides*)和链球菌属(*Streptococcus*)。这 3 种肠道菌群类型分别命名为 Cluster-E、Cluster-B 和 Cluster-S, 3 种肠道菌群类型在 42 份粪便样品 OTUs 数据集中的分布为 18 (42.8%)、12 (28.6%)和 12 (28.6%)。

(2) 通过比较这 3 种菌属在两种治疗方法下治疗前后其组内肠道菌群结构的变异模式(图 3), 我们发现利福昔明治疗组(图 3-A)和利福昔明联合益生菌治疗组(图 3-B)在同类型菌属的转变过程中, 转变次数和频率均高于不同类型菌属的转变。

(3) 根据 LDA 模型鉴定出所有 OTUs 菌。运用 LEfSe 分析方法, 在不同的分类水平上(门, 纲, 目, 科, 属, 种)鉴定这两种治疗方法在治疗前后 MHE 患者的肠道菌群分类单元的相对丰度是否呈显著性差异(图 4)。结果表明, 单独服用利福昔明的

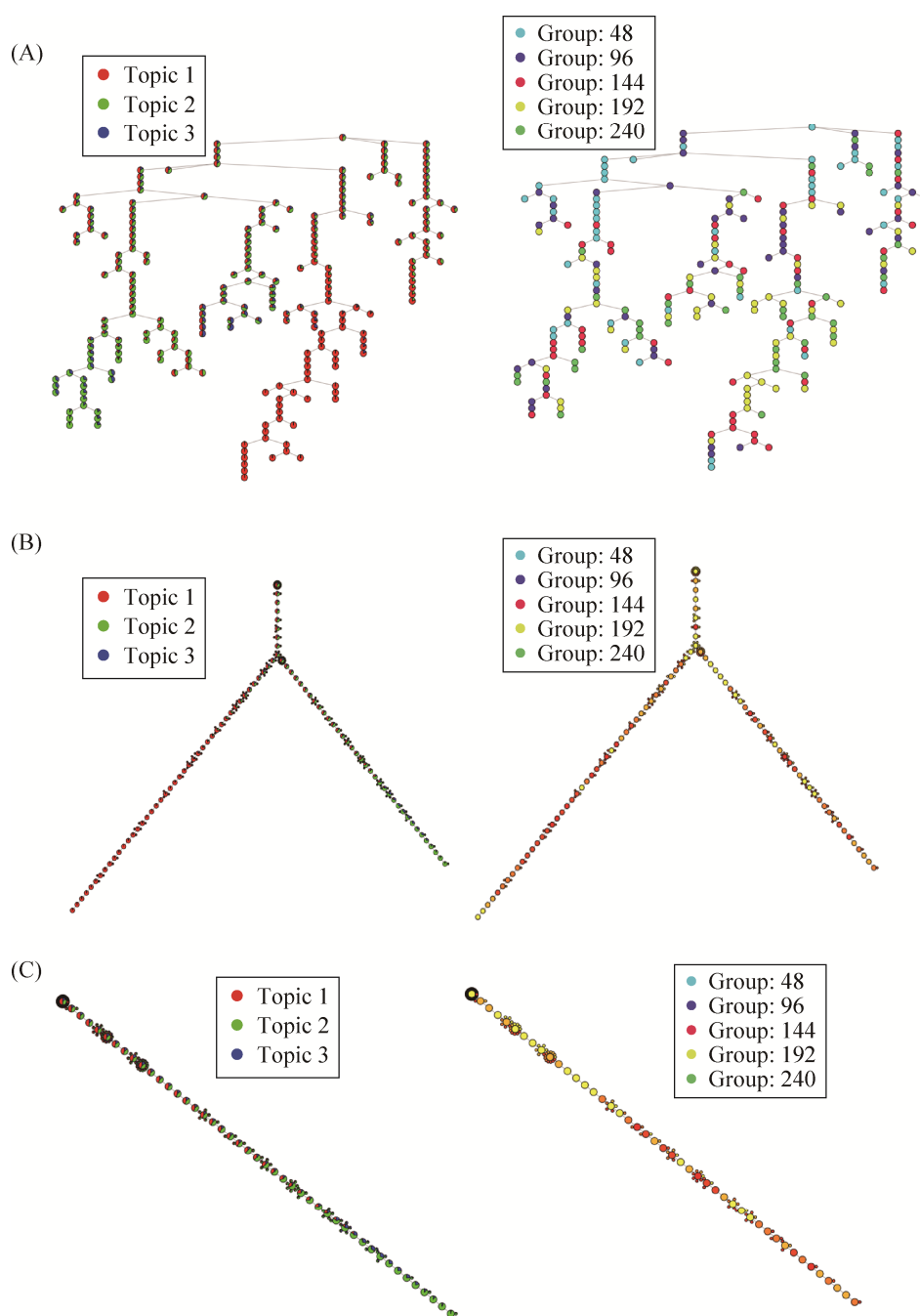


图 1. OTUs 的 Topic 和 Group 最小生成树(MST) (A)和骨干树(Backbone.tree) (B, C)

Figure 1. OTUs Topic and Group Minimum Spanning Tree (MST) (A) and Backbone Tree (B, C). A: Minimum spanning tree (MST), the left graph is colored according to the theme distribution of the cell nodes and the right graph is colored with the sample time (in days). Each point represents an OTU cell, the color of the Topic midpoint represents three different topics, and the Group represents a different sampling time. B: Backbone.tree-b.tree, which shows the two-phase trajectories of the Topic and Group backbone trees, respectively, with small branches of the OTU unit. The order along the tree trajectories follows a desired time series. C: Backbone.tree-b.tree2, with larger nodes representing backbone OTUs and smaller nodes representing only slightly varying OTUs with the backbone to which they are attached.

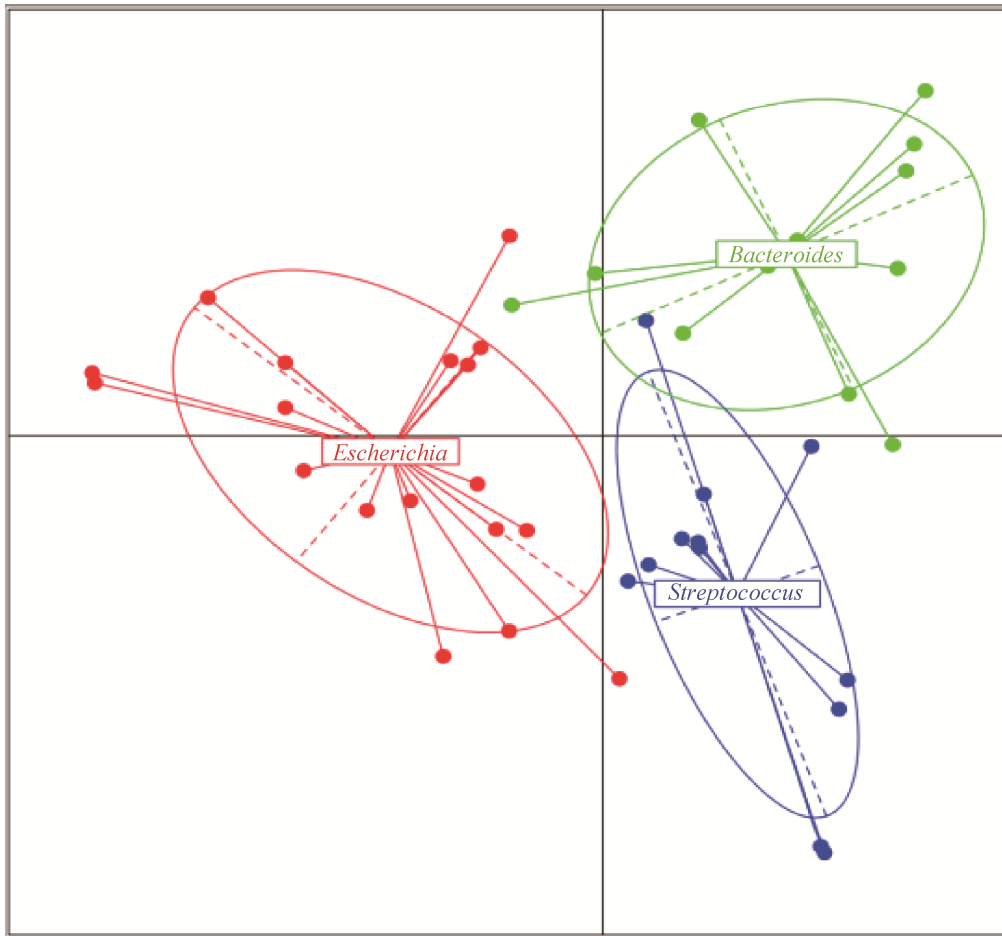


图 2. LDA 模型鉴定出的 MHE 患者 3 种肠道菌群类型

Figure 2. Three types of intestinal microflora identified in the LDA model for MHE patients.

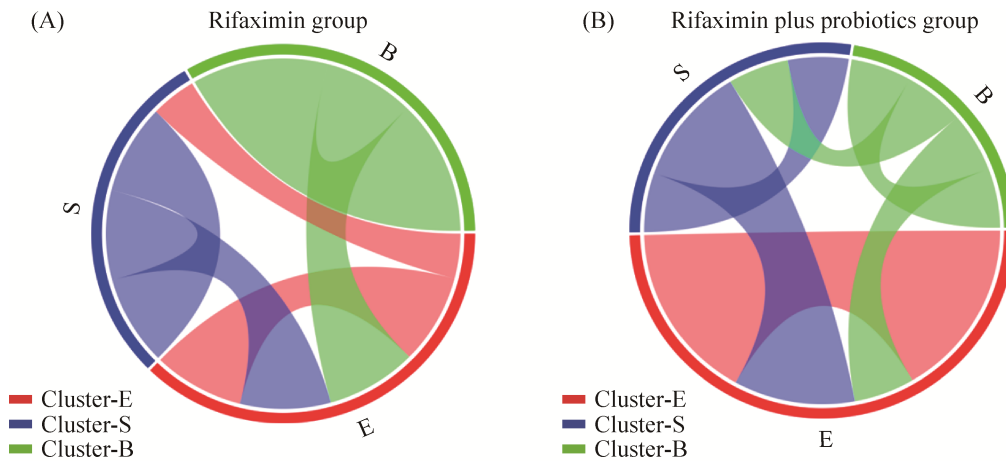


图 3. 利福昔明治疗组(A)和利福昔明联合益生菌治疗组(B)治疗前后 MHE 患者组内肠道菌群类型的转变

Figure 3. Changes in intestinal microflora within MHE patients before and after treatment with rifaximin (A) and rifaximin plus probiotics (B). Red for Cluster-E, blue for Cluster-S, green for Cluster-B, a circle composed of three parts, each part corresponds to a semicircle, the same type of color represents more conversion.

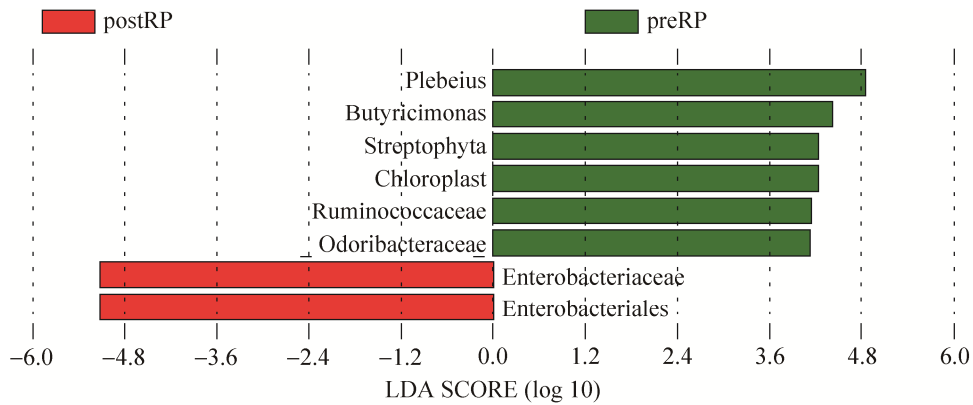


图 4. LefSe 分析 MHE 患者的菌群分类单元在治疗前后其相对丰度的显著性差异

Figure 4. LefSe analysis of MHE patients with taxonomic units before and after treatment, the relative abundance of significant differences. Green means lower than before treatment, red means higher after treatment than before treatment.

MHE 患者, 各个分类水平的菌群分类单元(Taxa)在治疗前后其相对丰度无显著性差异。利福昔明联合益生菌疗法的 MHE 患者, 其 Plebeius、Butyricimonas、Streptophyta、Chloroplast、Ruminococcaceae、Odoribacteraceae 在治疗后相对丰度显著性低于治

疗前。相反, 肠杆菌科(Enterobacteriaceae)和肠杆菌目(Enterobacteriales)在治疗后相对丰度显著高于治疗前。

(4) 此外, 结合 MHE 患者肠道微生物群落的生理数据 α 多样性和序列覆盖率(图 5), 比较(R 组和

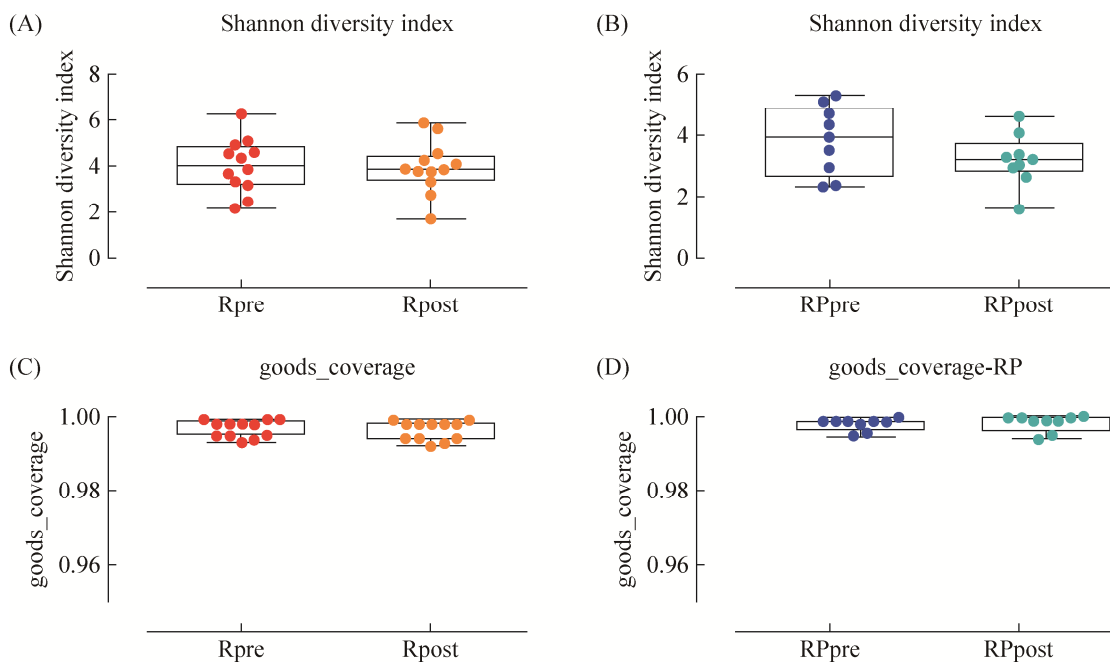


图 5. 基于 Wilcoxon Matched-pairs Signed Rank 检验, 比较(R 组和 RP 组)两种治疗方法治疗前后对 MHE 患者肠道微生物群落 α 多样性(A、B)和覆盖率(C、D)的影响

Figure 5. Based on the Wilcoxon Matched-pairs Signed Rank test, comparing the effects of two treatments on the Shannon diversity index (A, B) and good coverage (C, D) of intestinal microbiota in patients with MHE before and after treatment (group R and group RP).

RP 组)两种治疗方法治疗前后对 MHE 患者肠道微生物群落 α 多样性和覆盖度的影响。基于 Wilcoxon Matched-pairs Signed Rank 检验,我们发现,单独服用利福昔明组(图 5-A 和图 5-B)和利福昔明联合益生菌疗法组(图 5-C 和图 5-D)对 MHE 患者肠道菌群的 α 多样性和覆盖度均有下降趋势,但无显著性影响。

(5) 比较(R 组和 RP 组)两种治疗方法治疗前后对 MHE 患者肠道微生物群落结构的影响。发现单独服用利福昔明组治疗 4 周后 MHE 患者肠道菌群结构中的埃希菌和类杆菌明显降低[(8.92±0.91) vs (8.15±0.65), (8.75±0.63) vs (8.35±0.86), $P<0.05$], 链球菌明显增加 [(6.15±1.08) vs (6.58±0.67), $P>0.05$], 但无统计学意义。利福昔明联合益生菌疗法组治疗 4 周后 MHE 患者肠道菌群中的埃希菌明显减少[(8.53±0.99) vs (7.93±0.94), $P<0.05$], 链球菌明显增加[(7.23±1.03) vs (7.53±0.88), $P<0.05$], 类杆菌明显降低[(8.71±0.57) vs (8.03±0.78), $P>0.05$], 但无统计学意义。另外,根据观察组与对照组比较(表 3), 3 种肠道菌群治疗后均有所改变,有统计学意义($P<0.05$),且观察组低于对照组。说明治疗后观察组的治疗疗效比对照组的疗效好。

上述结果表明,单独服用利福昔明和利福昔明联合益生菌疗法两种治疗方法治疗前后对 MHE 患者肠道菌群结构短时期均有所改变,具体表现为致病菌链球菌属数量减少,有益菌埃希菌属和类杆菌属数量增加。

2.2 RP 组和 R 组两种疗法在治疗前后临床疗效、血清炎性因子、神经心理学指标和血氨水平的变化情况

2.2.1 临床疗效对比:治疗后,观察组显效 5 例,有效 3 例,无效 1 例,总有效率为 88.8%;对照组显效 5 例,有效 4 例,无效 3 例,总有效率为 75%;对比两组的总有效率,差异显著,有统计

学意义($P<0.05$),详见表 4。

2.2.2 不良反应情况对比:观察组出现腹泻 1 例,腹痛 1 例,不良反应总发生率为 22.2%;对照组出现腹泻 1 例,腹痛 3 例,恶心 1 例,不良反应总发生率为 38.5%;对比两组的不良反应发生率,差异显著,有统计学意义($P<0.05$),详见表 5。

根据治疗前后临床指标的统计结果,我们发现 MHE 患者在单独服用利福昔明和利福昔明联合枯草杆菌/肠球菌二联活菌疗法中,治疗前后血清炎性因子、神经心理学指标和血氨水平均有明显改善,且观察组的治疗效果比对照组的疗效好,如表 6 所示。

表 3. 治疗后观察组(RP)和对照组(P)肠道菌群数量的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 3. Comparison of intestinal microflora in observed Group RP and control group P after treatment ($\bar{x} \pm s$)

| Intestinal flora bacteria | After treatment (n=9) | Control group (n=12) | P value |
|---------------------------|-----------------------|----------------------|---------|
| <i>Escherichia</i> | 7.93±0.94 | 8.15±0.65 | 0.03 |
| <i>Bacteroides</i> | 8.03±0.78 | 8.35±0.86 | 0.01 |
| <i>Streptococcus</i> | 7.53±0.88 | 6.58±0.67 | 0.04 |

表 4. 对比两组治疗患者治疗后的临床疗效

Table 4. Compares the clinical efficacy of two treatment groups after treatment

| Group | Case | Markedly | Effective |
|----------------------|-------|----------|-----------|
| Observation group RP | 9 | 5 | 3 |
| Control group R | 12 | 5 | 4 |
| P value | <0.05 | | |

表 5. 对比两组患者的不良反应情况

Table 5. Comparison of two groups of patients adverse reactions

| Group | Case | Diarrhea | Stomach ache |
|----------------------|-------|----------|--------------|
| Observation group RP | 9 | 1 | 1 |
| Control group R | 12 | 1 | 3 |
| P value | <0.05 | | |

表 6. 利福昔明和利福昔明联合枯草杆菌/肠球菌二联活菌疗法的 MHE 患者治疗前后临床指标统计结果
Table 6. Statistical results of clinical indicators before and after treatment of rifaximin and rifaximin combined with *B. subtilis* / enterococci live viable combination therapy in MHE patients

| Treatment method | Clinical indicators | Before treatment (means) | After treatment (means) | Rise and fall | P value |
|--|---------------------|--------------------------|-------------------------|---------------|---------|
| Observation group rifaximin combined probiotics (group RP) | IL-2 | 15.067 | 13.033 | -2.033 | 0.170 |
| | IL-4 | 8.500 | 5.611 | -2.889 | 0.003 |
| | IL-6 | 27.689 | 21.611 | -6.078 | 0.000 |
| | IL-10 | 4.067 | 3.256 | -0.811 | 0.004 |
| | TNF-1 | 15.289 | 14.089 | -1.200 | 0.001 |
| | CRP | 7.378 | 6.111 | -1.267 | 0.025 |
| | BA | 106.000 | 66.667 | -39.333 | 0.003 |
| | NCT-A | 88.778 | 62.333 | -26.444 | 0.000 |
| | DST | 36.556 | 46.444 | 9.889 | 0.002 |
| | TBIL | 62.456 | 42.233 | -20.222 | 0.005 |
| | ALB | 31.778 | 32.222 | 0.444 | 1.000 |
| | AST | 60.333 | 47.778 | -12.556 | 0.004 |
| | ALT | 52.111 | 39.667 | -12.444 | 0.005 |
| | γ -GGT | 107.556 | 70.333 | -37.222 | 0.002 |
| | PT | 16.689 | 25.722 | 9.033 | 0.003 |
| | INR | 1.197 | 1.211 | 0.014 | 0.254 |
| | Crea | 84.778 | 51.778 | -33.000 | 0.002 |
| The control group rifaximin (group R) | IL-2 | 14.383 | 12.917 | -1.467 | 0.170 |
| | IL-4 | 7.408 | 4.800 | -2.608 | 0.003 |
| | IL-6 | 24.675 | 17.733 | -6.942 | 0.000 |
| | IL-10 | 4.425 | 3.325 | -1.100 | 0.019 |
| | TNF-1 | 14.975 | 10.508 | -4.467 | 0.001 |
| | CRP | 12.217 | 8.142 | -4.075 | 0.037 |
| | BA | 100.250 | 58.917 | -41.333 | 0.003 |
| | NCT-A | 95.750 | 64.500 | -31.250 | 0.000 |
| | DST | 32.667 | 45.333 | 12.667 | 0.002 |
| | TBIL | 51.617 | 36.108 | -15.508 | 0.005 |

从表 6 可知, 利福昔明组和利福昔明联合益生菌疗法组相比较, 治疗前 2 组患者血清 IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、TNF- α 、TBIL、ALT、CRP、NCT-A、 γ -GGT 及血氨水平, 差异均无统计学意义($P>0.05$); 治疗后两组患者血清 IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、TNF- α 、TBIL, ALT、CRP、NCT-A、 γ -GGT 及血氨水平均低于治疗前, 且观察组低于对照组, 差异均有统计学意义($P<0.05$)。另外, NCT-A 和 DST 均较治疗前也有改善($P<0.05$)。NCT-A 均呈现下降趋势, DST 均呈现上升趋势, 两项实验结果均为异常, 说明患者为 MHE 患者。

上述结果表明, 利福昔明联合益生菌疗法能明显改善 MHE 患者的血氨水平和血清炎症因子水平, 且比单独服用利福昔明组治疗效果好。

3 讨论

肝性脑病是肝硬化的严重并发症, MHE 在临床较容易被忽略, 其对患者生活质量的潜在影响不可忽视。目前, 在轻微型肝性脑病的治疗上, 常用的药物主要有天冬氨酸鸟氨酸、乳果糖、利福昔明、益生菌等。益生菌是一种通过调节宿主肠道微生物群生态平衡而发挥生理作用的活菌制

剂,可直接补充人体正常生理菌,调节肠道菌群平衡,抑制肠道中的致病菌,减少肠源性内毒素的产生,合成机体所需的维生素,激发机体免疫力,从而有效维持肠道黏膜屏障,减少细菌移位和内毒素产生,以保护肝及神经系统,减少肝性脑病的发生^[25]。利福昔明是一种吸收率非常小的口服肠道选择性抗生素,抗菌作用强,可在肠道内形成较高的血药浓度,且治疗过程中的不良反应发生率较低^[26]。

本研究为了观察利福昔明联合益生菌治疗轻微型肝性脑病的临床疗效,采用 LDA 模型分别对服用利福昔明联合益生菌和利福昔明的 MHE 患者治疗前后的肠道菌群的时间异质性结构进行了量化比较分析。研究结果表明,LDA 模型能够有效地区分 MHE 患者样本间的相似性。更为重要的是,从中发现 LDA 模型还能鉴定出影响菌群结构异质性最大的 OTUs 菌。通过对这些重要 OTUs 菌进行分析,发现 LDA 鉴定出了 3 种主要影响 MHE 患者的肠道结构微生物菌属,分别为埃希菌属(*Escherichia*)、类杆菌属(*Bacteroides*)和链球菌属(*Streptococcus*)。根据治疗前后其组内微生物群落结构的变化,发现 3 种菌属在治疗后其肠道菌群结构均有所改变($P<0.05$)。根据临床治疗结果显示,两组患者的血清 IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、TNF- α 、TBIL,ALT、CRP、NCT-A、 γ -GGT 均有所下降,血氨浓度较低,不良反应发生率较低,与国内研究结果一致^[27-28]。

综上所述,LDA 模型是一个比较有价值的模型。相比于传统 PCA、PCoA、K-Means 等聚类方法,LDA 模型最大的优点在于能够鉴定出对样本影响最大的 OTUs^[29]。相比于临床实验者,LDA 模型可以自动选取对样本贡献最大的 OTUs 菌,而临床实验者则必须对 MHE 患者的粪便进行提

取,然后进行选择性的定量培养需氧型和厌氧型的菌群。此外,通过对 LDA 模型结果进行分析,发现利福昔明和利福昔明联合益生菌疗法均能明显改善 MHE 患者的血氨水平和血清炎性因子水平,但是利福昔明联合益生菌疗法的不良反应发生率显著低于利福昔明组,具有更好的治疗效果。两种治疗方法治疗前后对 MHE 患者的肠道菌群结构也有一定的改变,具体表现为致病菌链球菌数量减少,有益菌埃希菌属和类杆菌数量增加,具有较好的临床应用价值,值得推广与应用。

然而本研究也存在一些局限性:(1)目前临床研究病例有限,能够采集的样本数量不够多;(2)文中使用的利福昔明和益生菌制剂的剂型(单一或复合剂型)、样本自身差异、使用剂量等偏差,可能造成临床试验之间异质性;(3)本文的质量有待进一步提高。上述不足之处使本文结论的可靠性受到一定程度的影响,期待有更多大规模、多中心随机临床试验来全面评价利福昔明和益生菌制剂治疗 MHE 的有效性与安全性,为其临床应用取得可靠的循证医学证据。

参 考 文 献

- [1] Nardone R, Taylor AC, Höller Y, Brigo F, Lochner P, Trinkaus E. Minimal hepatic encephalopathy: A review. *Neuroscience Research*, 2016, 111: 1–12.
- [2] de Rui M, Montagnese S, Amodio P. Recent developments in the diagnosis and treatment of covert/minimal hepatic encephalopathy. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*, 2016, 10(4): 443–450.
- [3] Stawicka A, Zbrzeźniak J, Świdorska A, Kilisińska N, Świdorska M, Jaroszewicz J, Flisiak R. Clinical importance and diagnostic methods of minimal hepatic encephalopathy. *Pol Merkur Lekarski*, 2016, 40(236): 117–121.
- [4] Ortiz M, Jacas C, Córdoba J. Minimal hepatic encephalopathy: diagnosis, clinical significance and recommendations. *Journal of Hepatology*, 2005, 42 Suppl(1): S45–S53.
- [5] Allampati S, Duarte-Rojo A, Thacker LR, Patidar KR, White MB, Klair JS, John B, Heuman DM, Wade JB, Flud C, O'Shea R, Gavis EA, Unser AB, Bajaj JS. Diagnosis of minimal

- hepatic encephalopathy using Stroop Encephal App: A multicenter US-based, norm-based study. *The American Journal of Gastroenterology*, 2016, 111(1): 78–86.
- [6] Viramontes HD, Avery A, Stow R. The effects of probiotics and symbiotics on risk factors for hepatic encephalopathy: A systematic review. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 2017, 51(4): 312–323.
- [7] Sidhu SS, Goyal O, Parker RA, Kishore H, Sood A. Rifaximin vs. lactulose in treatment of minimal hepatic encephalopathy. *Liver International*, 2016, 36(3): 378–385.
- [8] Singh J, Sharma BC, Puri V, Sachdeva S, Srivastava S. Sleep disturbances in patients of liver cirrhosis with minimal hepatic encephalopathy before and after lactulose therapy. *Metabolic Brain Disease*, 2017, 32(2): 595–605.
- [9] Schulz C, Schütte K, Kropf S, Schmitt F, Vasapolli R, Kliegis L, Riegger A, Malfertheiner P. RiMINI – the influence of rifaximin on minimal hepatic encephalopathy (MHE) and on the intestinal microbiome in patients with liver cirrhosis: study protocol for a randomized controlled trial. *Trials*, 2016, 17(1): 111.
- [10] Lockwood AH, Yap EWH, Wong WH. Cerebral ammonia metabolism in patients with severe liver disease and minimal hepatic encephalopathy. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 1991, 11(2): 337–341.
- [11] Felipo V, Urios A, Montesinos E, Molina I, Garcia-Torres ML, Civera M, Olmo JA, Ortega J, Martinez-Valls J, Serra MA, Cassinello N, Wassel A, Jordá E, Montoliu C. Contribution of hyperammonemia and inflammatory factors to cognitive impairment in minimal hepatic encephalopathy. *Metabolic Brain Disease*, 2012, 27(1): 51–58.
- [12] Liu Q, Duan ZP, Ha DK, Bengmark S, Kurtovic J, Riordan SM. Synbiotic modulation of gut flora: effect on minimal hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis. *Hepatology*, 2004, 39(5): 1441–1449.
- [13] Gong JS, Zhang YL, Chen H. Safety and efficacy of rifaximin versus nonabsorbable disaccharides in treatment of hepatic encephalopathy: a meta analysis. *Clinical Focus*, 2015, 30(2): 191–195. (in Chinese)
龚家顺, 张艳翎, 陈浩. 利福昔明与乳果糖、拉克替醇治疗肝性脑病疗效和安全性的 Meta 分析. *临床荟萃*, 2015, 30(2): 191–195.
- [14] Zuberi BF, Alvi H, Zuberi FF, Rasheed T, Nawaz Z, Fatima-Tuz-Zohra. Frequency of minimal hepatic encephalopathy in illiterate patients with compensated cirrhosis. *Pakistan Journal of Medical Sciences*, 2016, 32(3): 595–598.
- [15] Kabeshova A, Ben Hariz S, Tsakeu E, Benamouzig R, Launois R. Cost-effectiveness analysis of rifaximin- α administration for the reduction of episodes of overt hepatic encephalopathy in recurrence compared with standard treatment in France. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*, 2016, 9(4): 473–482.
- [16] Fang H, Feng HR, Yang ZD. Therapeutic value of probiotics in minimal hepatic encephalopathy. *Liver*, 2016, 21(6): 521–522. (in Chinese)
方皓, 冯海然, 杨正德. 益生菌在轻微肝性脑病中的治疗价值. *肝脏*, 2016, 21(6): 521–522.
- [17] Jepsen P, Christensen J, Weissenborn K, Watson H, Vilstrup H. Epilepsy as a risk factor for hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis: a cohort study. *BMC Gastroenterology*, 2016, 16(1): 77.
- [18] Naderian M, Akbari H, Saeedi M, Sohrabpour AA. Polyethylene glycol and lactulose versus lactulose alone in the treatment of hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis: A non-inferiority randomized controlled trial. *Middle East Journal of Digestive Diseases*, 2017, 9(1): 12–19.
- [19] Sharma BC, Singh J, Srivastava S, Sangam A, Mantri AK, Trehanpati N, Sarin SK. Randomized controlled trial comparing lactulose plus albumin versus lactulose alone for treatment of hepatic encephalopathy. *Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 2017, 32(6): 1234–1239.
- [20] Mantry PS, Mehta A, Graydon R. Efficacy and tolerability of rifaximin in combination with lactulose in end-stage liver disease patients with MELD greater than 20: A single center experience. *Transplantation Proceedings*, 2014, 46(10): 3481–3486.
- [21] Sharma P, Sharma BC. Disaccharides in the treatment of hepatic encephalopathy. *Metabolic Brain Disease*, 2013, 28(2): 313–320.
- [22] Feuerriegel S, Ratku A, Neumann D. Analysis of how underlying topics in financial news affect stock prices using Latent Dirichlet Allocation//2016 49th Hawaii International Conference on System Sciences. Koloa, HI: IEEE, 2016: 1072–1081.
- [23] Xu Z, Raschid L. Probabilistic financial community models with Latent Dirichlet Allocation for financial supply chains// Proceedings of the 2nd International Workshop on Data Science for Macro-Modeling. San Francisco, CA, USA: ACM, 2016: Article No. 8.
- [24] Blei DM, Ng AY, Jordan MI. Latent dirichlet allocation. *J Machine Learning Research Archive*, 2003, 3:993–1022.
- [25] Rackayova V, Braissant O, Berset C, Grosse J, Capobianco D, Mastromarino P, McLin VA, Cudalbu C. Probiotic treatment improves outcome of chronic hepatic encephalopathy in BDL rats, an *in vivo* longitudinal 1H MRS study. *Journal of Clinical & Experimental Hepatology*, 2017, 7(S1): S8–S9.
- [26] Tan VP, Liu KS, Lam FY, Hung IF, Yuen MF, Leung WK. Randomised clinical trial: rifaximin versus placebo for the treatment of functional dyspepsia. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 2017, 45(6): 767.
- [27] Tamaoki S, Suzuki H, Okada M, Fukui N, Isobe M, Saito T. Development of an experimental rat model of hyperammonemic encephalopathy and evaluation of the effects of rifaximin. *European Journal of Pharmacology*, 2016, 779: 168–176.
- [28] Bajaj JS. Review article: potential mechanisms of action of

rifaximin in the management of hepatic encephalopathy and other complications of cirrhosis. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 2016, 43(S1): 11–26.

[29] Bhutada S, Balaram VVSS, Bulusu VV. Semantic latent dirichlet allocation for automatic topic extraction. *Journal of Information & Optimization Sciences*, 2016, 37(3): 449–469.

Study of the structure of intestinal microflora in patients with mild hepatic encephalopathy based on probability topic model

Xialin Wang¹, Zan Zuo^{1,2}, Hong Fan^{1,2}, Xiangyang Kong¹, Jianfeng He^{1*}

¹ School of Information Engineering and Automation, Kunming University of Science and Engineering, Kunming 650500, Yunnan Province, China

² Digestive Department of the First People's Hospital of Yunnan Province, Medical Faculty of Kunming University of Science and Technology, Kunming 650532, Yunnan Province, China

Abstract: **[Objective]** We used Latent Dirichlet Allocation (LDA) probabilistic topic model to analyze the effect of rifaximin combined with probiotics orally taken by patients with mild hepatic encephalopathy (MHE) on structural heterogeneity and clinical efficacy of intestinal microflora. **[Methods]** We adopted Monte Carlo algorithm for folding Gibbs sampling of LDA probabilistic topic model included in R language to analyze the OTUs (operational taxonomic unit) data set with temporal heterogeneity of MHE patients' intestinal microflora structure. **[Results]** Using LDA model we divided MHE patients' 42 fecal samples into 3 topics and determined OTUs genus with largest impact on MHE patients' heterostructure of intestinal microflora. They were *Escherichia*, *Bacteroides* and *Streptococcus*. Compared conditions before and after treatment, the variation patterns of 3 species in the group were the genus of the same type. Their variation times and frequency were higher than those of different types of bacteria. Both MHE patients in Rifaximin combined with probiotics treatment group and rifaximin alone treatment group changed the intestinal microflora structure after treatment ($P<0.05$). In addition, according to the clinical curative effect index: comparing serum IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , TBIL, ALT, CRP, NCT-A, γ -GGT and blood ammonia level after treatment, the observation group was obviously superior to the control group with significant differences and the difference has statistical significance ($P<0.05$). Total effective rate for treatment group was 88.8%, with 22.2% total incidence of adverse reactions; Total effective rate for control group was 75%, with 38.5% total incidence of adverse reactions ($P<0.05$). **[Conclusion]** LDA model can effectively quantifying the heterogeneity of flora structure and identify the OTUs with the greatest impact on heterogeneity. Rifaximin combined with probiotics treatment can significantly improve the level of blood ammonia and serum inflammatory factors in patients with MHE. It can also change intestinal microflora structure in MHE patients, which is mainly represented by the reduction of pathogens and the increase of probiotics. As a result, it has good clinical application value.

Keywords: Latent Dirichlet Allocation model, Gibbs sampling, minimal hepatic encephalopathy, rifaximin, rifaximin combined with probiotics

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (11265007)

*Corresponding author. E-mail: jfenghe@qq.com

Received: 16 August 2017; Revised: 5 November 2017; Published online: 25 January 2018