

慢性乙型肝炎患者肠道菌群与肝脏生化指标的相关性

赵志方^{1,3,4}, 秦松^{1,3}, 王莉², 李莉莉^{1,3}, 刘友德², 邓丽霞², 邹志强²

1 中国科学院烟台海岸带研究所, 山东 烟台 264003

2 山东省烟台市奇山医院, 山东 烟台 264001

3 中国科学院海洋大科学研究中心, 山东 青岛 266071

4 中国科学院大学, 北京 101407

赵志方, 秦松, 王莉, 等. 慢性乙型肝炎患者肠道菌群与肝脏生化指标的相关性. 生物工程学报, 2021, 37(1): 301-311.

Zhao ZF, Qin S, Wang L, et al. Correlation between gut microbiota and liver biochemical indicators in patients with chronic hepatitis B. Chin J Biotech, 2021, 37(1): 301-311.

摘要: 乙型肝炎病毒感染引起的慢性乙型肝炎 (Chronic hepatitis B, CHB) 是一种全球性流行疾病, 严重时可引起肝功能衰竭, 甚至发展成肝硬化和肝癌。也已发现 CHB 的发生和发展与肠道菌群的组成和结构的变化密切相关。为进一步探究肠道菌群结构与肝脏生化指标之间的联系, 文中随机纳入 14 名 CHB 患者和 11 名健康对照者 (Control group, CN), 分析其肝脏生化指标和肠道菌群的结构以及两者的相关性。结果发现 CHB 患者肝脏生化指标丙氨酸转氨酶 (Alanine transaminase, ALT)、总胆红素 (Total bilirubin, TBIL) 和 γ -谷氨酰转氨酶 (Gamma glutamyl transferase, GGT) 等的水平发生显著变化; 普雷沃氏菌属 *Prevotella*、劳特氏菌属 *Blautia*、瘤胃球菌属 *Ruminococcus*、*Eubacterium eligens* group 等菌属失调; 单形拟杆菌 *Bacteroides uniformis* 和 *Ruminococcus* sp. 5_1_39BFAA 可能与 CHB 患者的肝损伤相关, 提示这些菌可能成为治疗 CHB 的新“切入点”。

关键词: 慢性乙型肝炎, 肠道菌群, 16S rRNA, 肝脏生化指标

Received: May 18, 2020; **Accepted:** August 10, 2020

Supported by: Youth Innovation Promotion Association CAS (No. 2018246).

Corresponding authors: Lili Li. Tel: +86-535-2109077; E-mail: lili@yic.ac.cn

Zhiqiang Zou. Tel: +86-535-6606100; E-mail: zhiqiangzou@126.com

中国科学院青年创新促进会 (No. 2018246) 资助。

网络出版时间: 2020-09-03

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20200902.1517.002.html>

Correlation between gut microbiota and liver biochemical indicators in patients with chronic hepatitis B

Zhifang Zhao^{1,3,4}, Song Qin^{1,3}, Li Wang², Lili Li^{1,3}, Youde Liu², Lixia Deng², and Zhiqiang Zou²

1 Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, Yantai 264003, Shandong, China

2 Yantai City Hospital for infectious Diseases, Yantai 264001, Shandong, China

3 Center for Ocean Mega-Science, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, Shandong, China

4 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 101407, China

Abstract: Chronic hepatitis B (CHB) is a global epidemic disease caused by hepatitis B virus that can lead to hepatic failure, even liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. The occurrence and development of CHB are closely related to the changes in the gut microbiota communities. To explore the relationship between the structure of gut microbiota and liver biochemical indicators, 14 CHB patients (the CHB group) and 11 healthy people (the CN group) were randomly enrolled in this study. Our results demonstrate that CHB caused changes in the gut microbiota communities and biochemical indicators, such as alanine transaminase, total bilirubin and gamma glutamyl transferase. Furthermore, CHB induced imbalance of the gut microbiota. *Prevotella*, *Blautia*, *Ruminococcus*, *Eubacterium eligens* group, *Bacteroides uniformis* and *Ruminococcus* sp. 5_1_39BFAA were associated with the critical biochemical indicators and liver injury, suggesting a new approach to CHB treatment.

Keywords: chronic hepatitis B, gut microbiota, 16S rRNA, liver biochemical indicators

慢性乙型肝炎病毒 (Hepatitis B virus, HBV) 感染是威胁人类健康的全球性问题。HBV 感染容易导致一些严重的并发症, 如肝功能衰竭和肝硬化, 甚至肝细胞癌^[1]。肠道是一个庞大而充满活力的细菌群落的自然栖息地, 它影响宿主的新陈代谢并保护宿主的健康。肠道菌群结构的变化与肝病的发生和发展关系密切, 随着科学家对肝-肠轴机制的深入研究, 慢性肝病与肠道菌群之间的联系成为研究的焦点。据报道, 肠道菌群的变化对肝脏疾病的发生具有重要的诱导和促进作用, 肠道菌群的多样性与 CHB、酒精性肝病、自身免疫性肝病、肝硬化和肝癌相关^[2]。

肠道菌群领域的研究为 HBV 感染的防治提供了新的靶点。中国台湾学者指出肠道菌群可能决定急性乙型肝炎和 CHB 的发病。特别是肠道菌群的组成和结构影响宿主对 HBV 的免疫应答, 当肠道菌群处于异常状态时, 急性乙型肝炎易转化为慢性感染^[3]。因此, 肠道菌群结构改变引起的免疫损伤对 HBV 感染的发展具有重要的影响。研究发现, 与健康对照组相比, CHB 患

者肠中普拉梭菌 *Faecalibacterium prausnitzii*、粪肠球菌 *Enterococcus faecalis* 和肠杆菌科 *Enterobacteriaceae* 细菌丰度显著增高^[4-5]。最新研究表明肝硬化患者体内的肠杆菌科细菌丰度异常增高, 其大量增殖产生的内毒素分泌到肠腔中, 抑制上皮细胞中蛋白质的合成, 从而破坏肠道屏障, 出现肠道菌群失调^[5]。Rios-Covian 等^[6]发现 CHB 患者的粪便胆汁酸水平明显较低, 且与普拉梭菌、双歧杆菌 *Bifidobacterium* 和产乳酸的细菌丰度呈正相关, 与肠杆菌科细菌丰度呈负相关。

研究发现, CHB 患者的肝功能受损后, 可以通过肝-肠轴减少肠道的蠕动和血液供应、影响胆汁的分泌, 从而破坏肠道的黏膜, 导致肠道菌群失调^[7]。而肠道菌群的紊乱可造成促炎菌属和抗炎菌属的失衡, 进而导致促炎物质, 比如脂多糖 (Lipopolysaccharide, LPS)、菌毛蛋白等增多, 抗炎物质, 比如乙酸、丁酸等短链脂肪酸减少, 然后这些物质通过肠-肝轴和全身循环系统导致肝脏炎症。因此, 肠道菌群与肝脏的作用是相互的, 肠道菌群的改变可导致肝脏炎症, 而肝脏炎症反过来也

可以影响肠道菌群的结构和功能。

本研究共收集了 25 份来自烟台市传染病医院的粪便样本, 进行 16S rRNA 基因测序分析; 另外收集了他们的血液样本进行肝脏生化指标的测定; 对 14 名 CHB 患者和 11 名 CN 组的肠道菌群结构进行了特征描述, 研究 CHB 患者和 CN 组肠道菌群结构的差异和肝脏生化指标的差异, 进而发现肠道菌群与肝功能之间的关系。

1 材料与方法

1.1 研究对象

本研究从 2018 年 3 月至 2019 年 12 月招募了 14 例 CHB 患者和 11 名没有慢性疾病或胃肠道疾病史的健康受试者。CHB 患者的诊断标准以 HBV 感染为依据。排除标准包括: 过去 3–6 个月内使用抗生素或饮酒, 有胃肠手术史, 有其他肝营养性病毒或有艾滋病病毒 (Human immunodeficiency virus, HIV) 感染史和生活方式不健康的人。本研究方案符合 1975 年“赫尔辛基宣言”的伦理标准, 经烟台市传染病医院人类伦理委员会批准, 并获得所有受试者的书面知情同意。

1.2 肝脏生化指标测定

取受试者 5 mL 清晨空腹静脉血, 凝固后以 3 000 r/min 的转速离心 10 min, 分离后的血清于 -20°C 保存。使用自动生化分析仪 (Model LX-20; Beckman, Fullerton, USA) 测量丙氨酸转氨酶 (Alanine transaminase, ALT), 天冬氨酸转氨酶 (Aspartate aminotransferase, AST)、谷氨酰转氨酶 (Gamma glutamyl transferase, GGT)、碱性磷酸酶 (Alkaline phosphatase, ALP)、总胆红素 (Total bilirubin, TBIL)、总胆汁酸 (Total bile acid, TBA)、血糖 (Glucose, GLU)、甘油三酯 (Triglyceride, TG)、极低密度脂蛋白胆固醇 (Very low density lipoprotein, VLDL)、低密度脂蛋白胆固醇 (Low density lipoprotein-cholesterol, LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇 (High density lipoprotein-cholesterol,

HDL-C)、高敏 C 反应蛋白 (High-sensitivity C-reactive protein, HsCRP)、乙型肝炎表面抗原 (Hepatitis B surface antigen, HBsAg)、国际标准化比率 (International normalized ratio, INR)、白蛋白 (Albumin, ALB)、总胆固醇 (Cholesterol, CHOL) 和白细胞计数 (White blood cell count, WBC) 的血清水平。

1.3 粪便样本的采集及基因组 DNA 的提取和扩增

采集新鲜粪便时使用一次性采样勺, 并将新鲜粪便放入冰盒, 立即转运至实验室。在实验室称取约 200–250 mg, 分装于 EP 管中, 迅速转移至 -80°C 冰箱保存。样品中的总基因组 DNA 的提取使用 CTAB/SDS 方法。采用琼脂糖凝胶电泳分析 DNA 浓度和纯度, 使用无菌水将 DNA 浓度调至 $1\text{ ng}/\mu\text{L}$ 。使用特异性引物 (16S V4: 515F-806R) 扩增出不同区域的 16S rRNA 基因 (V3–V4/16S)。所有 PCR 反应均在 Phusion[®] 高保真 PCR 预混液进行, 最后一个文库在 Illumina HiSeq 2500 平台上测序, 并生成末端配对序列, 大小 250 bp。

1.4 高通量测序分析

对测序结果进行多路解编和筛选。以相似性临界值为 97% 选择操作分类单位 (Operational taxonomic units, OTU), 然后使用 Greengenes 数据库 (V.13.8) 对已识别的 OTU 进行比对。鉴定并删除嵌合序列。从 OTU 表中删除序列数量少于序列总数的 0.005% 的 OTU。使用对应于序列最少的样品的序列号标准对 OTU 的丰度信息进行归一化处理。随后基于该输出的标准化数据进行 α 多样性和 β 多样性的分析。对于每个代表序列, 均根据 RDP 分类器算法 (<http://sourceforge.net/projects/rdp-classifier/>) 使用 GreenGene 数据库来注释分类信息。使用 PICRUSt 从 16S rRNA 序列推导出肠道微生物组的元基因组。接下来, 通过 16S rRNA 基因拷贝数对所得的 OTU 表进行标准化, 预测每个个体的基因含量。预测的概况和功能基因被归类于京都基因与基因组百科全书

(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)。在 Majorbio I-Sanger Cloud 的免费在线平台 (www.i-sanger.com) 上进行数据分析。

1.5 统计学方法

使用 SPSS 进行数据分析。CHB 组和 CN 组之间的差异采用单因素方差分析, 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。各组数据间比较采用样本均数 t 检验分析, P 值小于 0.05 被视为具有统计学意义 (*: $0.01 < P \leq 0.05$; **: $0.001 < P \leq 0.01$; ***: $P \leq 0.001$)。Spearman's rank 测试用于相关性分析。

2 结果与分析

2.1 CHB 患者的肝脏生化指标分析

在 CHB 患者中, TBIL、GGT、INR 和 ALT 含量显著性增高 (图 1A), HDL-C 含量显著性降低 (图 1B), 差异具有统计学意义 ($P \leq 0.05$)。以上均为肝功能检查的常规项目, 对于判断肝脏病变情况有较大的临床意义。

2.2 CHB 患者和 CN 组肠道菌群的 OTUs 差异分析

共获得 1 613 861 条有效序列 (总长 599 420 384 bp), 平均长度为 371.42 bp。随后, 对测序有效数据进行 OTUs 聚类 and 丰度统计。为了分析 CHB 患者和 CN 组肠道菌群 OTUs 组成的差异程度, 我们进行了基于 Bray-Curtis 距离的非度量多维尺度分析 (Non-metric multidimensional scaling, NMDS) (图 2)。结果显示, CHB 患者和 CN 组之间的样本分为两个簇集且 $\text{Stress} < 0.2$, 说明 CHB 患者和 CN 组肠道菌群的结构存在显著差异。

2.3 CHB 患者和 CN 组肠道菌群的结构差异分析

门水平上, 变形菌门 Proteobacteria、厚壁菌门 Firmicutes 和拟杆菌门 Bacteroidetes 是两个组中的优势种 (图 3)。科水平上, 毛螺菌科 Lachnospiraceae、拟杆菌科 Bacteroidaceae 和疣微

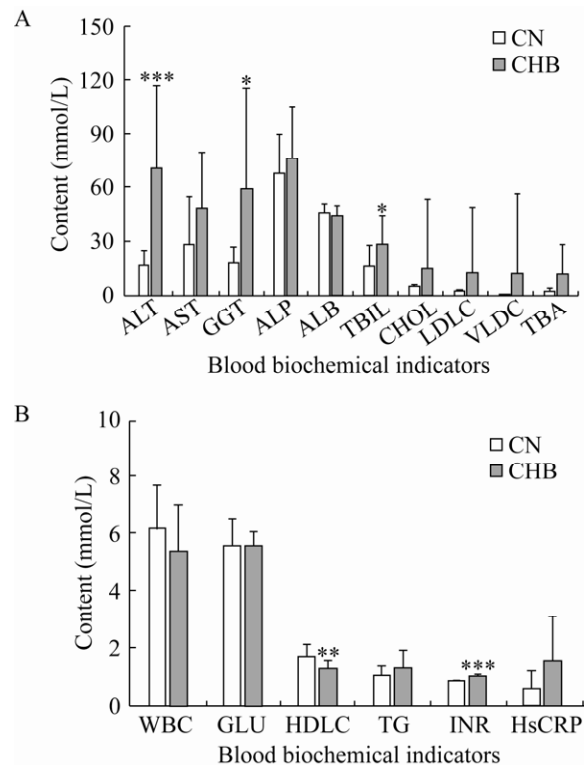


图 1 慢性乙肝患者 (CHB) 与健康对照组 (CN) 血液生化因子差异

Fig. 1 Differences in blood biochemical indicators between patients with chronic hepatitis B (CHB) and controls (CN). *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

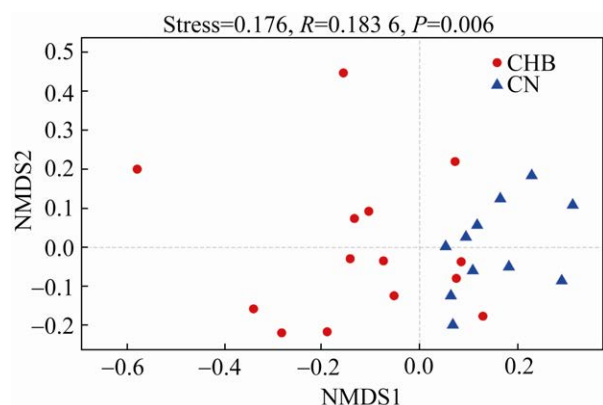


图 2 OUT 水平上的 NMDS 分析

Fig. 2 NMDS analysis at the OTU level. Stress value reflects the pros and cons of NMDS analysis results. It is generally considered that when $\text{stress} < 0.2$, it can be represented by a two-dimensional dot plot of NMDS, and its graph has an explanatory meaning.

菌科 Ruminococcaceae 是两个组的优势种 (图 4)。图 4 可知 CHB 患者中普雷沃氏菌科 Prevotellaceae 丰度显著增高, 而疣微菌科丰度显著降低。

我们对 CHB 患者与 CN 组各样本中物种相对丰度排名前 15 的属和种水平的物种丰度进行了差异分析。根据群落丰度数据, 进行组间差异显著性检验并评估观察到的差异的显著性 (图 5 和图 6)。CHB 患者中丰度高于 CN 组的属有 6 个 (图 5), 包

括普雷沃氏菌属、巨单胞菌属 *Megamonas*、*Roseburia*, 其中普雷沃氏菌属、巨单胞菌属和 *Eubacterium eligens* group 丰度显著增高, 差异具有统计学意义 ($P \leq 0.05$)。CHB 患者中丰度低于 CN 组的属有 9 个 (图 5), 包括拟杆菌属 *Bacteroides*、粪杆菌属 *Faecalibacterium* 和劳特氏菌属等, 其中劳特氏菌属、瘤胃球菌属和 *Fusicatenibacter* 丰度显著降低, 差异具有统计学意义 ($P \leq 0.05$)。CHB 患者

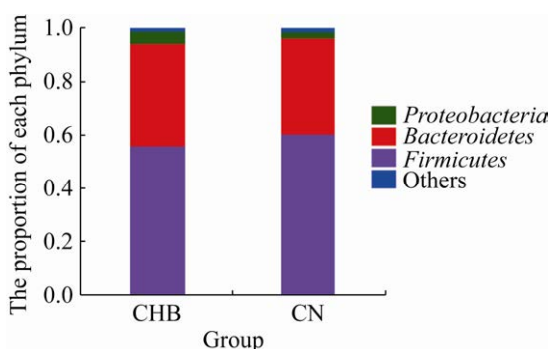


图 3 门水平上的肠道菌群结构

Fig. 3 Construction of gut microbiota at the phylum level. Others: less than 0.01% of the phylum were merged into others.

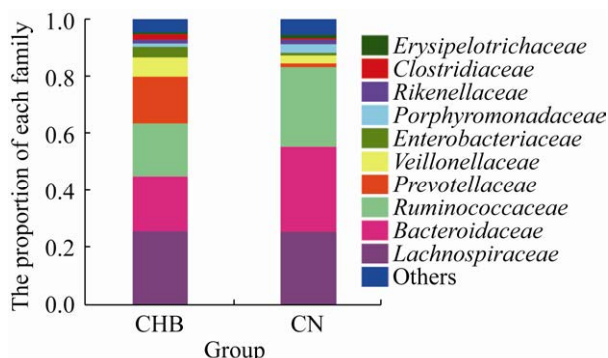


图 4 科水平上的肠道菌群结构

Fig. 4 Construction of gut microbiota at the family level. Others: less than 0.01% of the family were merged into others.

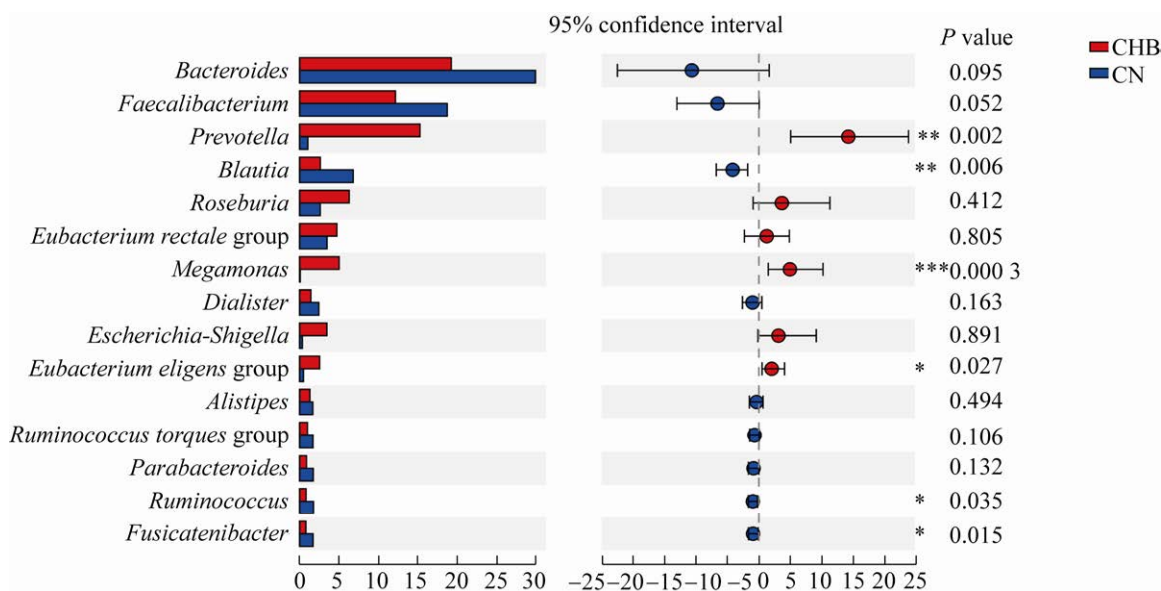


图 5 属水平上的物种间丰度差异分析

Fig. 5 Analysis of interspecies abundance differences at the genus level. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

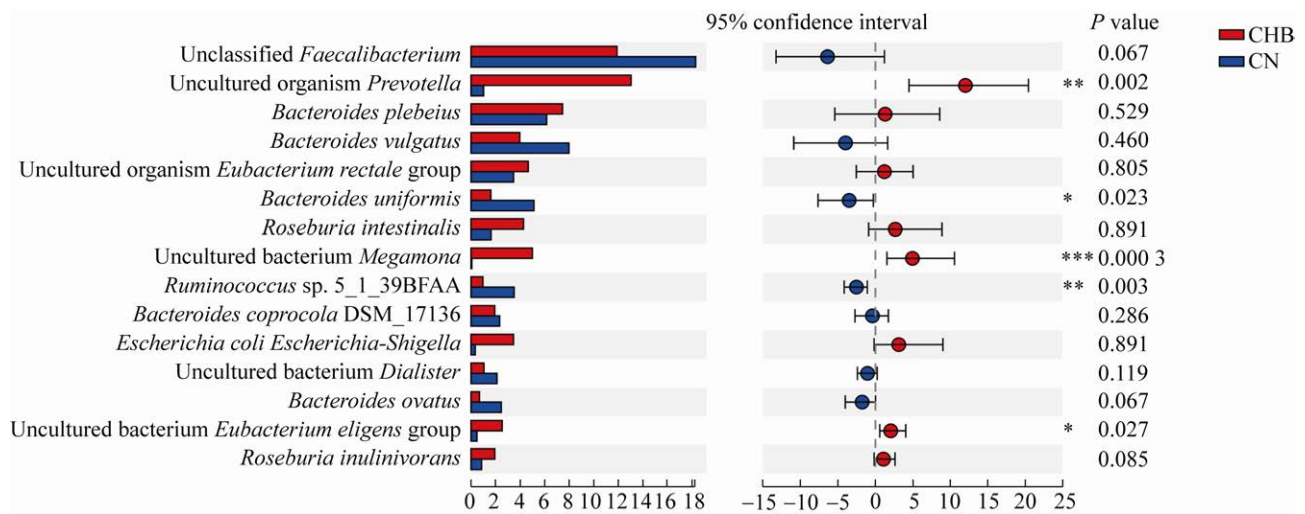


图 6 种水平上的物种间丰度差异分析

Fig. 6 Analysis of interspecies abundance differences at the species level. *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$.

中丰度高于 CN 组的种有 8 个 (图 6)。CHB 患者中丰度低于 CN 组的种有 7 个 (图 6), 其中单形拟杆菌和瘤胃球菌属的 *Ruminococcus* sp. 5_1_39BFAA 丰度显著降低, 差异具有统计学意义 ($P \leq 0.05$)。

2.4 肠道菌群与 CHB 患者肝脏生化指标的相关性分析

肝脏生化指标与肠道菌属的相关性分析 (图 7) 显示, 普雷沃氏菌属与 Hepatitis B surface antigen, HBsAg、INR、TBA 水平呈显著正相关 ($r > 0$, $P \leq 0.05$); *Eubacterium eligens* group 与 HBsAg、INR、GGT 水平呈显著正相关 ($r > 0$, $P \leq 0.05$), 与 ALB 水平呈显著负相关 ($r = -0.48$, $P = 0.01$); 巨单胞菌属与 AST、TBIL、HBsAg、INR、ALT、TBA 和 HsCRP 水平呈显著正相关 ($r > 0$, $P \leq 0.05$); 拟杆菌属与 LDLC 水平呈显著负相关 ($r = -0.41$, $P = 0.04$); 劳特氏菌属与 HBsAg、INR、ALT 和 HsCRP 水平呈显著负相关 ($r < 0$, $P \leq 0.01$); 瘤胃球菌属与 HBsAg、INR 和 TBA 水平呈显著负相关 ($r < 0$, $P \leq 0.05$)。

肝脏生化指标与肠道菌种的相关性分析 (表 1), *Ruminococcus* sp. 5_1_39BFAA 与 ALT、

HsCRP 和 INR 水平呈显著负相关 ($r < 0$, $P \leq 0.05$); 单形拟杆菌与 TBA 和 GGT 水平呈显著负相关 ($r < 0$, $P \leq 0.05$); 罗氏弧菌 *Roseburia intestinalis* 与 ALT 水平呈显著负相关 ($r = -0.42$, $P = 0.02$); 普通拟杆菌 *Bacteroides vulgatus* 与 LDLC 水平呈显著负相关 ($r = -0.51$, $P = 0.01$); 罗氏菌 *Roseburia inulinivorans* 与 HsCRP 和 INR 水平呈显著正相关 ($r > 0$, $P \leq 0.05$), 与 LDLC 水平呈显著负相关 ($r = -0.46$, $P = 0.02$); *Bacteroides coprocola* DSM_17136 与 ALT 水平呈显著正相关 ($r = 0.46$, $P = 0.02$)。

3 讨论

ALT 反映了肝细胞的损害程度, 被视为肝脏损伤的敏感标志物。肝细胞受损越严重, ALT 排放到血液中的量就越多^[8]。各种病毒性肝炎都可能引起 ALT 升高。GGT 反映了胆管细胞的损伤程度, 并与肝纤维化程度有关。在急性肝炎期间, 如果 GGT 持续升高, 则提示肝炎慢性化; 在 CHB 患者中, GGT 检测值常常高于正常值 1-2 倍, 如长期升高, 可能是病变活动或病情恶化。TBIL 能够反映胆红素代谢是否发生障碍。如果肝细胞受

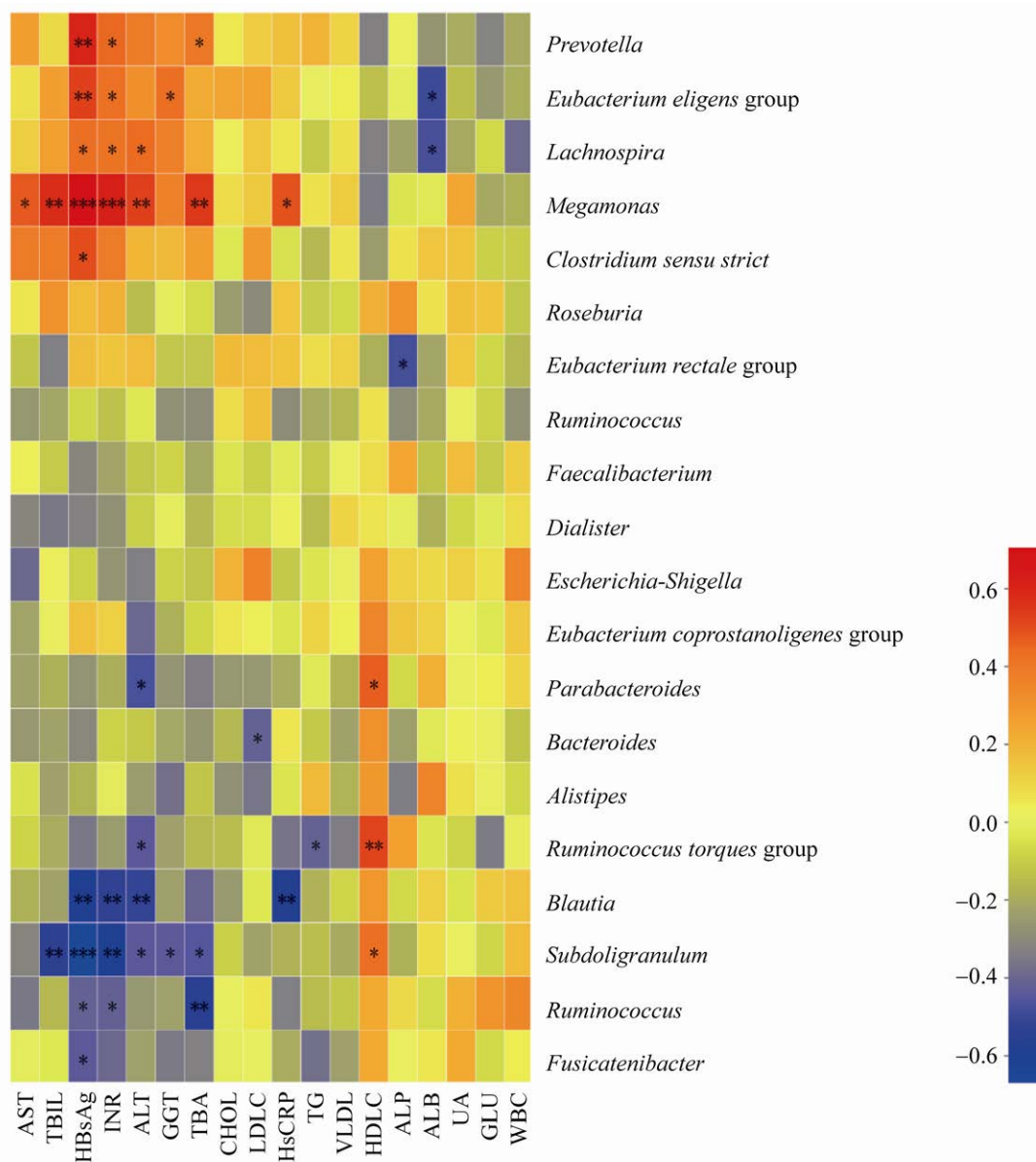


图7 慢性乙肝 (CHB) 与对照组 (CN) 属水平肠道菌群与肝脏生化指标相关性分析

Fig. 7 Correlation analysis of gut microbiota and liver biochemical indicators in chronic hepatitis B (CHB) and control (CN) at the genus level. UA: Uric acid; HBsAg: Hepatitis B surface antigen. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

损, 肝脏将间接胆红素转化为直接胆红素的能力下降, 这时会引起直接胆红素和间接胆红素同时偏高的现象, 且总胆红素也偏高。我们的研究表明 CHB 会导致 TBIL、GGT、INR 和 ALT 含量显著增高, 这与 Rebert、Sherman 等^[9-10]的研究结果一致。HDLC 是通过血脂反映肝脏功能的指标。

王延君等^[11]发现, HDLC 含量与 TBIL、ALT 含量呈负相关, 且与 TBIL 的相关性较 ALT 高。研究发现 CHB 会导致 HDLC 含量显著降低, 这与 Ramcharran 等^[12]的研究结果一致。总之, TBIL、GGT、INR、ALT 和 HDLC 是肝功能强弱的重要反映指标。

表 1 慢性乙肝 (CHB) 与对照组 (CN) 种水平肠道菌群与肝脏生化指标相关性分析

Table 1 Correlation analysis of gut microbiota and liver biochemical indicators in chronic hepatitis B (CHB) and control (CN) at the species level

Species	TBA		ALT		HsCRP		GGT		INR		TBIL		LDLC		HDLc	
	R value	P value	R value	P value	R value	P value	R value	P value	R value	P value	R value	P value	R value	P value	R value	P value
<i>Bacteroides stercoris</i> ATCC_43183	-0.04	0.85	-0.32	0.12	-0.08	0.70	-0.28	0.17	-0.16	0.46	-0.43	0.03	-0.13	0.55	0.60	0.001
<i>Ruminococcus</i> sp. 5_1_39BFAA	-0.33	0.11	-0.49	0.01	-0.48	0.01	-0.19	0.37	-0.48	0.02	-0.17	0.43	-0.16	0.46	0.35	0.08
<i>Bacteroides ovatus</i>	-0.46	0.02	-0.42	0.04	-0.19	0.37	-0.33	0.11	-0.30	0.15	-0.35	0.09	-0.42	0.04	0.37	0.07
<i>Bacteroides uniformis</i>	-0.45	0.02	-0.39	0.06	0.005	0.98	-0.54	0.005	-0.35	0.09	-0.19	0.36	-0.19	0.35	0.39	0.055
<i>Roseburia intestinalis</i>	-0.36	0.08	-0.47	0.02	-0.17	0.42	-0.28	0.17	0.04	0.85	0.15	0.47	-0.14	0.51	0.33	0.10
<i>Bacteroides vulgatus</i>	-0.12	0.56	-0.03	0.90	0.12	0.58	-0.06	0.77	0.03	0.88	-0.12	0.55	-0.51	0.01	0.24	0.25
<i>Roseburia inulinivorans</i>	0.33	0.11	0.17	0.42	0.40	0.05	0.20	0.33	0.42	0.04	0.35	0.08	-0.46	0.02	-0.02	0.93
<i>Bacteroides coprocola</i> DSM_17136	0.18	0.39	0.46	0.02	0.13	0.54	0.19	0.35	0.23	0.27	0.08	0.71	0.22	0.30	-0.24	0.25

瘤胃球菌能够发酵复杂的碳水化合物, 如纤维素、果胶和抗性淀粉^[13], 是乙酸和丙酸的生产者^[14], 它很好地适应了肠道环境, 是存在于 90% 的人类消化道中的“57 种核心微生物”之一^[15]。Bajaj 等^[16]在探究肠道微生态失衡与肝性脑病之间关系时, 发现患者肠道中瘤胃球菌属丰度显著降低。此外, 相关性分析显示瘤胃球菌属与炎症呈负相关。有研究报道三氯蔗糖能够降低肠道中的瘤胃球菌属的丰度^[17]。瘤胃球菌属产生的乙酸和丙酸等短链脂肪酸, 可以减少致炎因子一氧化氮 (NO)、肿瘤坏死因子 (TNF- α)、白细胞介素 (IL-1 β 、IL-6) 的产生, 同时可以刺激抗炎因子 IL-10 的增多^[18]。当肠道中瘤胃球菌属丰度显著降低时, 它抑制 NO、TNF- α 等致炎因子的能力下降, 同时促进抗炎因子分泌的能力也下降, 导致致炎因子增多, 抗炎因子减少, 可能会诱导肝脏等炎症的发生。研究发现 CHB 患者粪便中瘤胃球菌属丰度显著降低, 与 Gou 等^[19]的研究结果一致。由此推测, CHB 患者体内瘤胃球菌属丰度显

著降低可能与肝脏炎症增加有关。而长时间的肝脏炎症会诱发肝损伤, 导致 INR 水平升高, 与瘤胃球菌呈显著负相关, 进一步说明粪便中瘤胃球菌属与 CHB 患者的肝损伤可能存在一定的相关性。

Ridlon 等^[20]研究发现, 普雷沃氏菌表面的 LPS 可诱导促炎基因 IL-8 的表达, 增加炎症反应。并且已有 20 种普雷沃氏菌属的细菌被发现会引起人体多部位炎症^[21]。研究表明粘膜部位的普雷沃氏菌种类增多与局部和全身性疾病有关, 包括牙周炎、细菌性阴道炎、类风湿关节炎、代谢紊乱和低度系统炎症等。这是因为普雷沃氏菌属丰度的增加能够增强 Th17 介导的粘膜炎症^[22]。当肠道中普雷沃氏菌属丰度显著增高时, 可能会促进促炎基因的表达, 比如 IL-8。促炎基因过度表达, 一些免疫细胞, 比如 Th17, 产生促炎因子, 就可能诱导肝炎的发生。研究发现 CHB 患者粪便中普雷沃氏菌属丰度显著增高, 与 Gou 等^[19]的研究结果一致。由此推测, CHB 患者体内普雷沃氏菌属丰度显著增高可能与肝脏炎症增加有

关。而长时间的肝脏炎症会诱导肝脏生化指标 INR 水平升高,与普雷沃氏菌属呈显著正相关,进一步说明粪便中普雷沃氏菌属与 CHB 患者的肝损伤可能存在一定的相关性。

拟杆菌属于革兰氏阴性菌,当其死亡溶解后会释放出细胞壁中的 LPS^[23]。LPS 是一种来自革兰氏阴性细菌外膜的内毒素,可以导致促炎细胞因子(IL-6 和 TNF- α)的分泌增多,诱导炎症反应。研究显示 CHB 患者粪便中拟杆菌属丰度低于 CN 组,这与 Lu 等^[5]的结果一致。这可能说明 CHB 患者中拟杆菌属的降低与肝脏炎症有关。Arumugam 等^[24]曾对 22 个人的肠道菌群宏基因组进行测序对比,发现人体的肠道菌群可以分为普雷沃氏菌属、瘤胃球菌属和拟杆菌属 3 个类型。后来对更大规模的人群(154 名美国人和 85 名丹麦人)进行调查也得到了同样的结论。2018 年,29 位研究肠道菌群的世界顶级科学家,提出了肠道分型的统一标准,并制作了肠型在线分类器,但肠型分类仍以 3 个菌属为流行分类方法^[25]。本研究中,CN 组中拟杆菌属丰度较高,CHB 患者的普雷沃氏菌属丰度增高而拟杆菌属丰度降低。我们的结果表明 CN 组的肠道菌群属于 1 类肠型,而 CHB 患者的菌群属于 2 类肠型。分析 CHB 与肠型之间的联系,可以为 CHB 的预防和诊治提供一定的依据。

有研究发现 *Eubacterium eligens* DSM3376 能够利用苹果果胶并编码广泛的果胶水解酶,裂解低聚糖,从而发挥抗炎作用^[26]。当肝脏炎症导致人体肝脏组织受损,肝脏生化指标 GGT 和 INR 含量显著增高,诱导 *Eubacterium eligens* group 属丰度也显著增高,裂解低聚糖,发挥抗炎作用,说明 *Eubacterium eligens* group 与 CHB 患者的肝损伤可能存在一定的相关性。此外,有研究发现与 CHB 患者相比,肝癌患者粪便中劳特氏菌属的丰度进一步降低^[27]。劳特氏菌属是一种抗炎性菌属^[27],能够产生丁酸,通过降低过氧化物酶和环

氧合酶等减轻炎症反应^[28],具有抗炎和免疫调节功能,且抗炎特性比乙酸和丙酸更强。当肠道中劳特氏菌属丰度显著降低时,人体肠道菌群甚至肝脏抵抗病原体入侵的能力也随之下落,从而使肠道和肝脏发生炎症反应的可能性增加,导致 CHB 甚至肝硬化的发生。我们的结果发现 CHB 患者粪便中劳特氏菌属丰度显著降低。CHB 的发展会导致人体肝脏组织受损,INR 和 ALT 含量显著增高,与劳特氏菌属呈显著负相关,这与 Guo 等^[29]的研究结果一致。故粪便中劳特氏菌属与 CHB 患者的肝损伤可能存在一定的相关性。

赵少倩等^[30]研究发现单形拟杆菌能够减少肝脏和肌肉组织的脂质异位沉积和内质网应激,从而改善小鼠的脂肪代谢,并且该菌株丰度在肥胖人群中普遍降低。Cano 等^[31]发现单形拟杆菌可改善高脂饮食诱导的肥胖小鼠的脂肪代谢,缓解其免疫失衡状态。我们的结果发现 CHB 患者粪便中单形拟杆菌丰度显著降低。当肠道中单形拟杆菌丰度显著降低时,可能导致肝脏脂肪代谢受阻,引起脂肪肝的同时合并 CHB,导致进一步的肝脏受损,GGT 水平升高。其水平与单形拟杆菌呈显著负相关。故粪便中单形拟杆菌与 CHB 患者的肝损伤可能存在一定的相关性。关于 *Ruminococcus* sp. 5_1_39BFAA 研究得较少,蒋兴宇等^[32]发现适度的运动可以增加这种菌种的丰度,为改善 CHB 提供了一种新思路。*Ruminococcus* sp. 5_1_39BFAA 属于瘤胃球菌属,是一种可产生短链脂肪酸的益生菌。且该菌能够产生 D-阿洛酮糖 3-差向异构酶,将 D-果糖转化为 D-阿洛酮糖,在不受信号肽的引导下将其分泌到细胞外。研究发现 D-阿洛酮糖能够促进脂肪的代谢,能够降低脂肪合成相关的 PPAR-7、C/EBP α 基因表达量,同时降低与炎症反应相关的基因 TNF- α 及 IL-6 的表达量^[33]。我们的结果发现 CHB 患者粪便中 *Ruminococcus* sp. 5_1_39BFAA 丰度显著降低。当肠道中 *Ruminococcus* sp. 5_1_39BFAA 丰度显著

下降时,就可能会导致肝脏等炎症的发生,ALT和INR水平升高,与*Ruminococcus* sp. 5_1_39BFAA呈显著负相关,故粪便中*Ruminococcus* sp. 5_1_39BFAA与CHB患者的肝损伤和炎症可能存在一定的相关性。

关于肠道菌群中的某个属或者种在调节肝脏疾病上的具体作用机制目前并没有阐明,这是因为肠道菌群是一个相互作用的调节网络,在共同调节人体的新陈代谢以及某些器官的功能方面相互影响、密不可分。目前关于肠道菌群对肝脏炎症的作用机制,主要包括促炎菌属和抗炎菌属两个方面。

总之,CHB会导致肠道菌群结构以及肝脏生化指标的水平发生显著变化;失调菌属,比如普雷沃氏菌属、劳特氏菌属、瘤胃球菌属、*Eubacterium eligens* group,单形拟杆菌和*Ruminococcus* sp. 5_1_39BFAA可能与CHB患者的肝损伤有关,这些关联微生物的发现可为CHB患者肠道菌群的研究和诊治提供一定的参考。

REFERENCES

- [1] Beckebaum S, Malagó M, Dirsch O, et al. Efficacy of combined lamivudine and adefovir dipivoxil treatment for severe HBV graft reinfection after living donor liver transplantation. *Clin Transplant*, 2003, 17(6): 554-559.
- [2] Castelnau C, Gal FL, Ripault MP, et al. Efficacy of peginterferon alpha-2b in chronic hepatitis delta: relevance of quantitative RT-PCR for follow-up. *Hepatology*, 2006, 44(3): 728-735.
- [3] Chou HH, Chien WH, Wu LL, et al. Age-related immune clearance of hepatitis B virus infection requires the establishment of gut microbiota. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(7): 2175-2180.
- [4] Pan C, Gu Y, Zhang W, et al. Dynamic changes of lipopolysaccharide levels in different phases of acute on chronic hepatitis B liver failure. *PLoS ONE*, 2012, 7(11): e49460.
- [5] Lu HF, Wu ZW, Xu W, et al. Intestinal microbiota was assessed in cirrhotic patients with hepatitis B virus infection. *Intestinal microbiota of HBV cirrhotic patients. Microb Ecol*, 2011, 61(3): 693-703.
- [6] Ríos-Covián D, Ruas-Madiedo P, Margolles A, et al. Intestinal short chain fatty acids and their link with diet and human health. *Front Microbiol*, 2016, 7: 185.
- [7] Othman M, Agfiero R, Lin HC. Alterations in intestinal microbial flora and human disease. *Curr Opin Gastroenterol*, 2008, 24(1): 6-11.
- [8] Yun Y, Chang Y, Kim HN, et al. Alterations of the gut microbiome in chronic hepatitis B virus infection associated with alanine aminotransferase level. *J Clin Med*, 2019, 8(2): 173.
- [9] Robert PM, Tainturier MH, Ratzu V, et al. Prediction of liver histological lesions with biochemical markers in patients with chronic hepatitis B. *J Hepatol*, 2003, 39(2): 222-230.
- [10] Sherman M, Yurdaydin C, Simsek H, et al. Entecavir therapy for lamivudine-refractory chronic hepatitis B: improved virologic, biochemical, and serology outcomes through 96 weeks. *Hepatology*, 2008, 48(1): 99-108.
- [11] 王延君, 李群, 杨丽敏. 慢性乙型肝炎患者血脂相关指标检测与临床意义. *潍坊医学院学报*, 2015, 37(2): 138-140.
Wang YJ, Li Q, Yang LM. Detection and clinical significance of blood lipid related indexes in patients with chronic hepatitis B. *Acta Academ Med Weifang*, 2015, 37(2): 138-140 (in Chinese).
- [12] Ramcharran D, Wahed AS, Conjeevaram HS, et al. Associations between serum lipids and hepatitis C antiviral treatment efficacy. *Hepatology*, 2010, 52(3): 854-863.
- [13] Ze XL, Duncan SH, Louis P, et al. *Ruminococcus bromii* is a keystone species for the degradation of resistant starch in the human colon. *ISME J*, 2012, 6(8): 1535-1543.
- [14] Christopherson MR, Dawson JA, Stevenson DM, et al. Unique aspects of fiber degradation by the ruminal ethanologen *Ruminococcus albus* 7 revealed by physiological and transcriptomic analysis. *BMC Genomics*, 2014, 15: 1066.
- [15] Hattori M, Taylor TD. The human intestinal microbiome: a new frontier of human biology. *DNA*

- Res, 2009, 16(1): 1-12.
- [16] Bajaj JS, Hylemon PB, Ridlon JM, et al. Colonic mucosal microbiome differs from stool microbiome in cirrhosis and hepatic encephalopathy and is linked to cognition and inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2012, 303(6): G675-G685.
- [17] Bian XM, Chi L, Gao B, et al. Gut microbiome response to sucralose and its potential role in inducing liver inflammation in mice. *Front Physiol*, 2017, 8: 487.
- [18] Vinolo MAR, Rodrigues HG, Hatanaka E, et al. Short-chain fatty acids stimulate the migration of neutrophils to inflammatory sites. *Clin Sci*, 2009, 117(9): 331-338.
- [19] Guo RY, Chen ZJ, Chen N, et al. Quantitative real-time PCR analysis of intestinal regular fungal species in fecal samples from patients with chronic hepatitis B virus infection. *Lab Med*, 2010, 41(10): 591-596.
- [20] Ridlon JM, Kang DJ, Hylemon PB. Isolation and characterization of a bile acid inducible 7 α -dehydroxylating operon in *Clostridium hylemonae* TN271. *Anaerobe*, 2010, 16(2): 137-146.
- [21] Shan HN, Collins DM. NOTES: *Prevotella*, a new genus to include *Bacteroides melaninogenicus* and related species formerly classified in the genus bacteroides. *Inter J Systemat Bacteriol*, 1990, 40(2): 205-208.
- [22] Larsen JM. The immune response to *Prevotella* bacteria in chronic inflammatory disease. *Immunology*, 2017, 151(4): 363-374.
- [23] Han DW. Intestinal endotoxemia as a pathogenetic mechanism in liver failure. *World J Gastroenterol*, 2002, 8(6): 961-965.
- [24] Arumugam M, Raes J, Pelletier E, et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*, 2011, 473(7346): 174-180.
- [25] Costea PI, Hildebrand F, Arumugam M, et al. Enterotypes in the landscape of gut microbial community composition. *Nat Microbiol*, 2018, 3(1): 8-16.
- [26] Chung WSF, Meijerink M, Zeuner B, et al. Prebiotic potential of pectin and pectic oligosaccharides to promote anti-inflammatory commensal bacteria in the human colon. *FEMS Microbiol Ecol*, 2017, 93(11), DOI: 10.1093/femsec/fix127.
- [27] Ponziani FR, Bboori SB, Castelli C, et al. Hepatocellular carcinoma is associated with gut microbiota profile and inflammation in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 2019, 69(1): 107-120.
- [28] Leonel AJ, Alvarez-Leite JJ. Butyrate: implications for intestinal function. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2012, 15(5): 474-479.
- [29] Guo C, Li YH, Wang PP, et al. Alterations of gut microbiota in cholestatic infants and their correlation with hepatic function. *Front Microbiol*, 2018, 9: 2682.
- [30] 赵少倩, 刘文, 石娟, 等. 单形拟杆菌减轻组织脂质沉积及内质网应激改善小鼠葡萄糖代谢. *诊断学理论与实践*, 2016, 15(3): 263-267.
Zhao SQ, Liu W, Shi J, et al. *Bacteroides uniformis* supplementation improves glucose homeostasis by alleviating lipid accumulation and endoplasmic reticulum stress in liver/muscle in chow-diet mice. *J Diagnost Concepts Pract*, 2016, 15(3): 263-267 (in Chinese).
- [31] Cano PG, Santacruz A, Moya Á, et al. *Bacteroides uniformis* CECT 7771 ameliorates metabolic and immunological dysfunction in mice with high-fat-diet induced obesity. *PLoS ONE*, 2012, 7(7): e41079.
- [32] 蒋兴宇, 赵霞, 邹凌云, 等. 适度运动对人体肠道菌群结构的影响. *第三军医大学学报*, 2017, 39(18): 1824-1831.
Jiang XY, Zhao X, Zou LY, et al. Moderate exercise induces shift in the composition of human gut microbiota. *J Third Military Medic Univ*, 2017, 39(18): 1824-1831 (in Chinese).
- [33] 沈雪梅, 王靖, 张媛, 等. D-阿洛酮糖的功能及其生物合成研究进展. *生物工程学报*, 2018, 34(9): 1419-1431.
Shen XM, Wang J, Zhang Y, et al. Research progress of D-psicose: function and its biosynthesis. *Chin J Biotech*, 2018, 34(9): 1419-1431 (in Chinese).

(本文责编 陈宏宇)