

· 论 著 ·

基于高通量测序技术的胃癌患者肠道菌群变化特点

黄迪, 李飞, 苏卓彬, 梁占东, 孙光源, 高建朝, 李曙光

河北北方学院附属第一医院胃肠肿瘤外科, 河北 张家口 075000

摘要: **目的** 使用高通量测序技术检测胃癌患者肠道菌群,探讨其分布及菌群功能的特点。**方法** 根据纳入排除标准,选取2019至2021年在河北北方学院附属第一医院胃肠肿瘤外科就诊的42例胃腺癌患者为研究对象,同时招募性别、年龄匹配的30例健康志愿者为对照组,收集两组粪便样本并提取DNA,使用16S核糖体DNA扩增子焦磷酸测序分析微生物种群, PICRUSt2 预测菌群功能差异。**结果** 与健康对照组相比,胃癌组患者拟杆菌门丰度减少,变形菌门和放线菌门丰度增加,差异均有统计学意义($t=4.491, 3.369, 2.790, P<0.05$); α 多样性分析结果显示,胃癌患者Chao1指数升高而Shannon指数减少,差异均有统计学意义($t=10.884, 9.953, P<0.01$);主坐标分析(PCoA)显示,胃癌组与对照组菌群结构存在差异。线性判别效应分析(LefSe)结果显示,在属水平上,胃癌患者大肠埃希菌-志贺菌属(*Escherichia-Shigella*)丰度显著高于对照组,而作为益生菌的拟杆菌属(*Bacteroides*)、乳酸杆菌(*Lactobacilli*)显著低于对照组,差异均有统计学意义(线性判别分析值=3, $P<0.05$)。京都基因和基因组百科全书(KEGG)结果显示,胃癌患者与健康对照组间的菌群代谢存在差异。**结论** 胃癌患者肠道菌群多样性和结构均与健康人群不同,提示肠道菌群可能参与胃癌发生。

关键词: 胃癌; 肠道菌群; 高通量测序; 埃希菌-志贺菌属; 拟杆菌属; 乳酸杆菌

中图分类号: R735.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-8182(2022)03-0303-04

Characteristics of intestinal flora in patients with gastric cancer based on high throughput sequencing technology

HUANG Di, LI Fei, SU Zhuo-bin, LIANG Zhan-dong, SUN Guang-yuan, GAO Jian-chao, LI Shu-guang

Department of Gastrointestinal Oncology Surgery, the First Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou, Hebei 075000, China

Corresponding author: LI Shu-guang, E-mail: shuguangli6688@126.com

Abstract: Objective By using high throughput sequencing to detect the intestinal flora of patients with gastric cancer, and to explore its distribution and the characteristics of flora function. **Methods** According to the inclusion and exclusion criteria, 42 patients with gastric adenocarcinoma admitted to the First Affiliated Hospital of Hebei North University from 2019 to 2021 were selected as the research subjects, and 30 gender- and age-matched healthy volunteers were recruited as the control group. Fecal samples were collected for extracting DNA in two groups. Microbial populations were analyzed using 16S ribosomal DNA amplicon pyrosequencing. PICRUSt2 (Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States) was used to identify functional differences of flora. **Results** Compared with control group, the abundance of Bacteroidetes decreased, while the abundance of Proteobacteria and Actinobacteria increased significantly in research group ($t=4.491, 1.491, 3.369, P<0.05$). The results of α diversity analysis showed that Chao1 index was increased, while Shannon diversity index was decreased in gastric cancer patients ($t=10.884, 9.953, P<0.01$). Principal co-ordinates analysis (PCoA) showed the differences in the structure of flora between two groups. Linear discriminant analysis (LDA) effect size (LefSe) analysis showed that the abundance of *Escherichia-Shigella* in gastric cancer patients was significantly higher than that in control group, while *Bacteroides* and *Lactobacilli* were significantly lower than those in control group (LDA=3, $P<0.05$). Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) showed the differences in gut microbiota metabolism between two groups. **Conclusion** The diversity and structure of intestinal flora in patients with gastric cancer are different from those in healthy people, suggesting that

DOI: 10.13429/j.cnki.cjcr.2022.03.002

基金项目: 河北省卫生厅科研基金项目(20180829); 张家口市科技计划项目(1521023D)

通信作者: 李曙光, E-mail: shuguangli6688@126.com

intestinal flora may be involved in the occurrence of gastric cancer.

Keywords: Gastric cancer; Intestinal flora; High throughput sequencing; *Escherichia-shigella*; *Bacteroides*; *Lactobacilli*

Fund program: Scientific Research Fund of Hebei Provincial Department of Health (20180829); Zhangjiakou Science and Technology Plan Project (1521023D)

胃癌是世界上发生率第五、致死率第三的恶性肿瘤,目前研究认为遗传易感性、环境、微生物因素共同作用导致胃癌的发生^[1]。随着高通量测序技术的开展,研究人员发现人类胃肠道寄居着数万亿的微生物^[2],可通过介导炎症反应、改变免疫应答、产生致癌代谢物和DNA损伤从而导致癌症的发生^[3]。胃部菌群如幽门螺旋杆菌、乳酸菌等菌群失调导致胃癌的发生已经得到广泛的关注^[4-5]。最近的研究表明,肠道菌群不仅通过调节肠上皮和诱导肠道免疫反应从而促进肠癌发生,与其他消化道肿瘤的发生也可能存在一定联系^[6]。然而,目前国内外对于肠道菌群在胃癌中的变化特点和潜在联系鲜有研究,因此本课题拟基于高通量测序技术分析胃癌患者肠道菌群特点,并基于未观测状态重建的群落系统发育研究(PICRUSt2)进行功能预测,旨在为后续研究肠道菌群与胃癌的相互作用奠定基础。

1 对象与方法

1.1 研究对象 选取2019年至2021年就诊于河北北方学院附属第一医院的胃癌患者42例(胃癌组),其中男性25例,女性17例,年龄为(52.30±11.27)岁;并招募30名性别和年龄匹配的健康志愿者作为对照组。收集两组对象的粪便样本至无菌试管中,保存于-80℃冰箱。纳入标准为:(1)所有入组人员在采集粪便样本1个月前均未接受抗生素、H2受体拮抗剂、质子泵抑制剂和益生菌治疗。(2)未接受既往胃肠道手术和放、化疗。(3)未患有其他胃肠道疾病。(4)胃癌组病理诊断为原发性胃腺癌且不伴有其他癌种。本研究通过河北北方学院附属第一医院伦理委员会审批(编号:W2019013),在研究开始前均获得了受试者书面知情同意。

1.2 16S核糖体DNA(16S rDNA)扩增子焦磷酸测序
采用DNA抽提试剂盒(OMEGA),提取粪便中细菌DNA。设计细菌基因组16S rDNA V3-V4区域的引物。336F和806R的引物序列分别为5'-GTA CTC CTA CGG GAG GCA GCA-3',5'-GTG GAC TAC HVG GGT WTC TAA T-3'。建立了特异性扩增16S rDNA V3-V4区域的PCR体系。将琼脂糖凝胶送到中国杭州的联川生物技术公司进行Miseq文库的构建,然后

在Illumina Miseq PE300平台上进行测序。

1.3 微生物分析 将同源率为97%的序列划分为操作分类单元,并生成稀疏曲线,计算丰富度和多样性指数。序列根据核糖体数据库项目(RDP)提供的工具进行分类。使用R软件评估不同样本之间的相似性,并根据OTU信息进行聚类分析和主坐标分析(principal co-ordinates analysis, PCoA),并绘制PCoA图。利用TAYC系数计算每个样本进化微生物群落之间的距离,表示为两组之间不显著的聚类树。算术平均法用于描述多个样本之间的差异(=1-相似度)。采用线性判别分析(linear discriminant analysis, LDA)效应大小(LDA effect size, LEfSe)方法筛选特异性菌群(默认线性判别值=3)。基于PICRUSt2进行差异菌群的京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)^[7]代谢途径功能预测。

1.4 统计学方法 采用SPSS 25.0软件进行统计分析。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用图基(Tukey's)检验分析肠道菌群多样性,采用LEfSe筛选不同组间特异物种。 $P < 0.05$ 表明差异有统计学意义。

2 结果

2.1 物种门水平结构分析 所有样本共检测出18种菌门。胃癌患者和对照组的优势菌门均为厚壁菌门(Firmicutes)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、变形菌门(Proteobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)。与健康对照组相比,胃癌患者的拟杆菌门相对丰度减少($t = 4.491, P < 0.05$),而变形菌门、放线菌门相对丰度增加,差异均有统计学意义($t = 3.369, 2.790, P < 0.05$)。胃癌患者厚壁菌门较对照组有减少趋势,但差异无统计学意义($t = 1.491, P > 0.05$)。见图1。

2.2 胃癌患者与对照组 α 多样性的比较 采用Chao1指数和Shannon指数评估微生物 α 多样性,Chao1指数越高代表菌群丰富度越高,Shannon指数越高代表物种多样性越高。胃癌患者的Chao1指数高于对照组(713.45 ± 127.19 vs $412.29 \pm 97.30, t = 10.884, P < 0.01$),Shannon指数低于对照组(1.72 ± 0.81 vs $4.21 \pm 1.31, t = 9.953, P < 0.01$),差异具有统计学意义。

2.3 胃癌患者与对照组 β 多样性的比较 本研究采用非加权 Unifra 的 PCoA 法分析胃癌患者和对照组的微生物结构差异,发现胃癌患者的肠道菌群结构与健康对照组存在显著差异,各自分布在两个相对独立的区域。见图 2。

2.4 LefSe 分析筛选差异菌属 LefSe 分析结果显示,胃癌患者大肠埃希菌-志贺菌属 (*Escherichia-Shigella*) 丰度显著高于对照组,而拟杆菌属 (*Bacteroides*)、乳酸杆菌 (*Lactobacill*) 丰度显著低于对照组,差异均有统计学意义(线性判别分析值 = 3, $P < 0.05$)。见图 3。

2.5 KEGG 功能预测 利用 PICRUST2 预测胃癌患者与健康人群微生物组之间的 KEGG 通路,共发现 73 条代谢通路差异,图 4 展示了 30 条差异最为显著的代谢通路:胃癌在 L-色氨酸生物合成 (L-tryptophan biosynthesis) 增强,腺苷酸降解 (adenylate unectide degradation)、鸟苷酸降解 (guanosine unectide degradation) 等代谢通路表达增强,而在淀粉降解 (starch degradation)、甲基赤藓醇磷酸合成 (methylerythritol phosphate) 等代谢通路表达减弱。

3 讨论

作为肠屏障组成的一部分,肠道微生物对于宿主代谢、营养吸收、肠道免疫等方面具有重要作用,因此许多肠道疾病(炎症性肠病,结直肠癌)均与肠道微生态紊乱相关^[8]。此外,一些研究表明,其他消化道肿瘤或其他疾病(如精神病)均伴随着肠道菌群失调^[6,9],这意味着肠道菌群可能具有更广泛的作用需要探索。对于胃癌而言,幽门螺旋杆菌可以改变胃部微生态环境,进而影响肠道微生物的组成。同时,也有研究报道,胃癌切除术后的肠道菌群会随之改变^[10]。因此,虽然肠道菌群与胃癌不处于同一空间结构,但两者可能存在一定的联系。

本研究发现,胃癌患者肠道菌群的 Shannon 多样

性和 Chao1 指数均低于健康对照组,与 Sarhadi 等^[11]的结果一致,而有部分研究发现胃癌患者 Chao1 指数较高^[12];但对于 α 多样性而言,Shannon 指数是描述微生物群落的丰富度和均匀度更全面的参数。因此胃癌患者 Shannon 指数的下降可能是疾病状态的标志。胃癌患者菌群结构与健康人群存在一定差异,通过 LefSe 筛选差异物种发现,在属水平上,大肠埃希菌-志贺菌属 (*Escherichia-Shigella*) 在胃癌患者中富集,而拟杆菌属 (*Bacteroides*) 和乳酸杆菌 (*Lactobacilli*) 则丰度降低。*Escherichia-Shigella* 属于肠杆菌科,一方面能诱发肠道炎症,另一方面在炎症环境中可通过分泌肠杆菌素 (Enterobactin) 获得更强的生存优

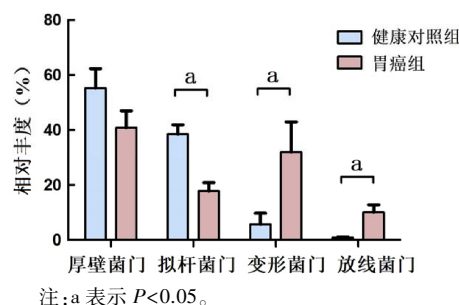


图 1 胃癌患者与健康对照组优势菌门的比较
Fig. 1 Comparison of dominant microphylla between gastric cancer patients and healthy controls

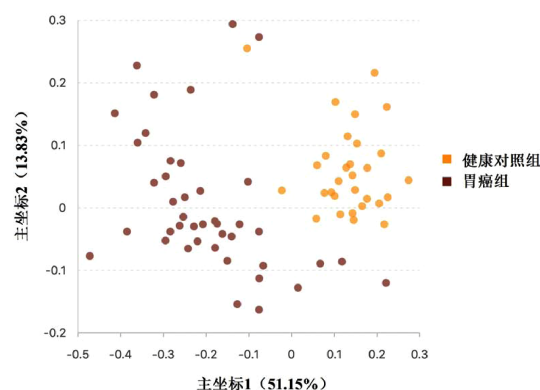
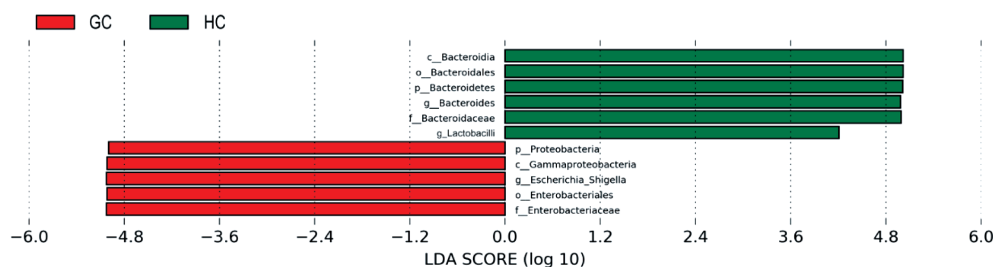
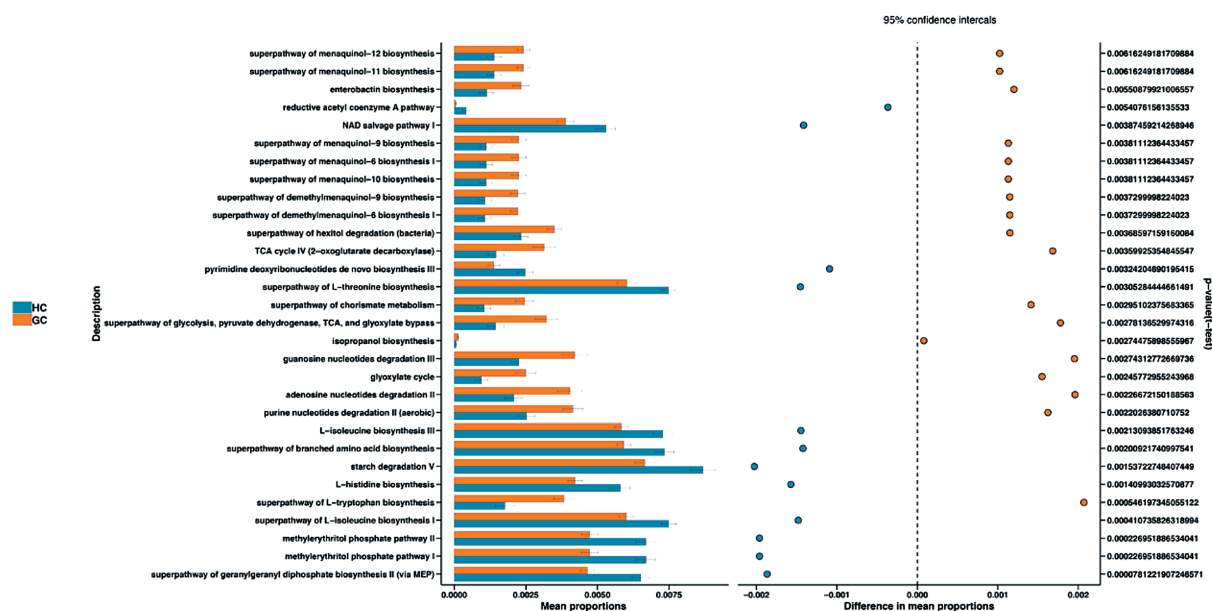


图 2 PCoA 法分析两组对象肠道菌群结构组成差异的散点图
Fig. 2 The difference of intestinal microbiota structure composition between the two groups based on PCoA



注:HC 为健康对照组;GC 为胃癌组;c、o、p、g、f 分别表示门、纲、目、科、属。

图 3 LefSe 分析两组对象各菌属的 LDA 值
Fig. 3 LefSe analysis of LDA values for each bacteria in the two groups



注:HC 为健康对照组;GC 为胃癌组。

图 4 KEGG 预测功能差异

Fig. 4 Function prediction based on KEGG methods

势从而加剧生态紊乱^[13]。有研究报道肠杆菌科的富集程度与胃癌分期相关,且可能伴随着更高的死亡风险^[14]。拟杆菌属和乳酸杆菌均属于益生菌,拟杆菌属产生维生素 K 并具有抗炎潜力^[15],乳酸杆菌可降低多种恶性肿瘤发生风险。KEGG 功能预测展示出差异菌群在代谢途径上潜在的作用,但进一步需要利用多组学探索肠道菌群及代谢物在胃癌发生发展中的作用。

综上所述,本研究发现胃癌患者和健康人群的肠道菌群组成存在一定差异性,表明肠道微生物群在胃癌发生时产生了进行性变化,未来需要利用多组学进一步探索胃癌与肠道微生物改变的内在机制,不仅有助于理解胃癌与胃肠道菌群的相互作用,也有助于探索开发新的微生物疗法。

参考文献

[1] Nasr R, Shamseddine A, Mukherji D, et al. The Crosstalk between microbiome and immune response in gastric cancer[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(18): 6586.
 [2] 孙瑞莲, 赵敏. 基于 16S rDNA 测序的多囊卵巢综合征患者肠道菌群特征[J]. 中国临床研究, 2021, 34(9): 1181-1184, 1189.
 Sun RL, Zhao M. Characteristics of intestinal flora in patients with polycystic ovary syndrome based on 16S rDNA sequencing[J]. Chin J Clin Res, 2021, 34(9): 1181-1184, 1189.
 [3] Meng C, Bai C, Brown TD, et al. Human gut microbiota and gastrointestinal cancer[J]. Genomics Proteomics Bioinformatics, 2018, 16(1): 33-49.
 [4] Malfertheiner P. *Helicobacter pylori* treatment for gastric cancer prevention[J]. N Engl J Med, 2018, 378(12): 1154-1156.
 [5] San-Millán I, Brooks GA. Reexamining cancer metabolism: lactate

production for carcinogenesis could be the purpose and explanation of the Warburg Effect[J]. Carcinogenesis, 2017, 38(2): 119-133.
 [6] Longhi G, van Sinderen D, Ventura M, et al. Microbiota and cancer: the emerging beneficial role of bifidobacteria in cancer immunotherapy[J]. Front Microbiol, 2020, 11: 575072.
 [7] Douglas GM, Maffei VJ, Zaneveld JR, et al. PICRUSt2 for prediction of metagenome functions[J]. Nat Biotechnol, 2020, 38(6): 685-688.
 [8] Jandhyala SM, Talukdar R, Subramanyam C, et al. Role of the normal gut microbiota[J]. World J Gastroenterol, 2015, 21(29): 8787-8803.
 [9] Li N, Yang J, Zhang J, et al. Correlation of gut microbiome between ASD children and mothers and potential biomarkers for risk assessment[J]. Genomics Proteomics Bioinformatics, 2019, 17(1): 26-38.
 [10] Erawijantari PP, Mizutani S, Shiroma H, et al. Influence of gastrectomy for gastric cancer treatment on faecal microbiome and metabolome profiles[J]. Gut, 2020, 69(8): 1404-1415
 [11] Sarhadi V, Mathew B, Kokkola A, et al. Gut microbiota of patients with different subtypes of gastric cancer and gastrointestinal stromal tumors[J]. Gut Pathog, 2021, 13(1): 11.
 [12] Liang W, Yang Y, Wang H, et al. Gut microbiota shifts in patients with gastric cancer in perioperative period [J]. Medicine (Baltimore), 2019, 98(35): e16626.
 [13] Singh V, Yeoh BS, Xiao X, et al. Interplay between enterobactin, myeloperoxidase and lipocalin 2 regulates *E. coli* survival in the inflamed gut[J]. Nat Commun, 2015, 6: 7113.
 [14] Salosensaari A, Laitinen V, Havulinna AS, et al. Taxonomic signatures of long-term mortality risk in human gut microbiota[J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 2671.
 [15] Zella GC, Hait EJ, Glavan T, et al. Distinct microbiome in pouchitis compared to healthy pouches in ulcerative colitis and familial adenomatous polyposis[J]. Inflamm Bowel Dis, 2011, 17(5): 1092-1100.
 收稿日期: 2021-08-09 修回日期: 2021-10-13 编辑: 石嘉莹