

Research  
Gut Microbiota and Disease—Article

## 肝硬化患者胃黏膜微生物菌群特征及其与胃肠道症状的相关性分析

陈燕飞<sup>a</sup>, 郭静<sup>a</sup>, 陈春雷<sup>a</sup>, 石鼎<sup>a</sup>, 方戴琼<sup>a</sup>, 季峰<sup>b,\*</sup>, 李兰娟<sup>a,\*</sup><sup>a</sup> State Key Laboratory for Diagnosis and Treatment of Infectious Disease, National Clinical Research Center for Infectious Disease, Collaborative Innovation Center for Diagnosis and Treatment of Infectious Diseases, The First Affiliated Hospital, College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310003, China<sup>b</sup> Department of Gastroenterology, The First Affiliated Hospital, College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310003, China

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 18 December 2019

Revised 1 April 2020

Accepted 7 April 2020

Available online 25 September 2020

## 关键词

微生物组  
肝硬化  
症状  
静脉曲张  
胃镜

## 摘要

研究表明,肝硬化患者的口腔和肠道微生物群与健康人群存在差异。胃位于口腔和肠道之间,关于其黏膜微生物群结构所知甚少。本研究采用16S rRNA焦磷酸测序技术分析肝硬化患者和对照组的胃黏膜微生物群。研究发现,组织学和测序法均证实肝硬化患者幽门螺杆菌感染率显著降低。在幽门螺杆菌阴性人群中,可按细菌组成结构将胃黏膜微生物群分为4个聚类,其中聚类1和2主要是肝硬化患者,聚类3主要是健康人群,而聚类4中肝硬化患者和健康人群各占一半左右。这些不同聚类间的成分和功能存在显著差异。在属的水平上,聚类1和2分别富集奈瑟菌和链球菌。在功能基因分类上,相对而言,聚类2缺乏涉及遗传信息处理以及与聚糖生物合成和代谢相关的功能基因。胃黏膜菌群结构表现为聚类2的患者胃肠道症状更严重,既往内镜下曲张静脉的治疗率显著高于其他组。我们的研究表明,在肝硬化中,幽门螺杆菌和非幽门螺杆菌的定植都受到影响。虽然幽门螺杆菌阴性的胃黏膜微生物结构表现出相当大的异质性,但特定的胃微生物群与临床特征之间仍然存在相关性。既往内镜下静脉曲张治疗会引起胃黏膜菌群结构明显改变,从而加重幽门螺杆菌阴性肝硬化患者的胃肠道症状。

© 2021 THE AUTHORS. Published by Elsevier LTD on behalf of Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

## 1. 引言

研究表明,肠道菌群失衡在肝硬化的发生发展中起重要作用[1]。此外,越来越多的证据表明,肝硬化患者肠道中存在口腔常驻菌群过度定植的情况[2]。多项研究也发现肠道和口腔微生物失调与机体炎症状态和肝硬化进展密切相关[2–6]。然而,胃作为连接口腔和肠道的中间器官,人们对肝硬化时其黏膜的微生物结构状态尚缺乏深入的了解。本研究拟深入解析胃黏膜菌群在肝硬化状态下的状态及其与疾病的相关性。

由于其极酸的环境和其他抗菌因素存在,人类的胃黏膜一直被认为仅有幽门螺杆菌(*H. pylori*)定植。随着高通量测序技术的发展,胃黏膜菌群分析得到了极大的发展。除了幽门螺杆菌外,胃黏膜上还有许多其他微生物定植,构成群落结构。

胃细菌中最主要的是变形菌门(Proteobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)、放线菌门(Actinobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)和梭杆菌门(Fusobacteria)[7,8]。各种证据表明,胃微生物群落在胃病的发生发展中起着关键作用[9,10]。此外,胃微生物群定植与病理、免疫

\* Corresponding author.

E-mail addresses: [jifeng1126@sina.com](mailto:jifeng1126@sina.com) (F. Ji), [ljlj@zju.edu.cn](mailto:ljlj@zju.edu.cn) (L. Li).

反应以及促炎和癌相关基因的mRNA表达相关[11]。非幽门螺杆菌在胃内定植也与胃癌、胃息肉等疾病有关[12]。从浅表性胃炎、萎缩性胃炎、肠上皮化生到肠型胃癌，不同的胃病中存在不同的胃微生物群[10,13-15]。

肝硬化患者很多合并消化道症状，具体病理生理机制相对复杂，可能涉及结构改变、心理困扰、胃对膨胀的敏感性增加以及肠道转运延迟等多种因素[16-19]。内镜下肝硬化主要表现为黏膜改变和静脉曲张[20]。肝硬化的胃黏膜改变包括慢性胃炎、糜烂性胃炎、胃溃疡等[21]。静脉曲张在食管和（或）胃底最常见。大多数肝硬化患者存在胃排空延迟或小肠蠕动功能受损[17]。胃内微环境包括pH值、供氧、营养物质、离子和理化环境在肝硬化中明显异常，这可能对于一些特定菌株的定植有利。而特定黏膜细菌也可能通过诱导黏膜炎症而导致胃症状。

本研究旨在以正常健康人群为对照，采用16S rRNA高通量测序和聚类分析肝硬化患者胃黏膜微生物群的特征及其与胃部症状的相关性。我们的研究结果显示，肝硬化患者幽门螺杆菌定植率降低。幽门螺杆菌阴性受试者的胃黏膜微生物菌群表现出相当大的异质性。某些胃微生物结构与之前内镜下静脉曲张套扎治疗和胃肠道症状严重程度有关。

## 2. 方法

### 2.1. 研究对象

研究对象均来自浙江大学附属第一医院。患者组包括29例肝硬化患者，均在医院接受了上消化道内镜检查。肝硬化的诊断是基于肝活检或超声支持的临床和实验室数据共同确认。肝硬化病因包括乙肝相关性24例（82.8%），原发性胆汁性肝硬化3例（10.3%），酒精性肝硬化两例（6.9%）。采用Child-Pugh评分评价肝硬化患者的肝功能状态。Child-Pugh A级为代偿期，B级为功能损害，C级为失代偿性疾病[22]。病例组中肝硬化组Child-Pugh A 25例（86.2%），Child-Pugh B 3例（10.3%），Child-Pugh C 1例（3.4%）。另外召集了31例接受胃镜体检，而且内镜检查结果基本正常的健康个体作为对照。肝硬化患者组和对照组在年龄和性别比例上匹配。本研究排除了在过去两个月内接受过抗生素或质子泵抑制剂（PPI）治疗的个体。所有受试者在进行胃镜检查前接受（PAGI-SYM）问卷调查，对其胃肠道疾病症状严重程度指数进行评分[23]。

在进入研究前，所有研究对象均已充分了解研究目的及方案，提供了书面的知情同意书。本研究完全遵循1975年《赫尔辛基宣言》的伦理准则。研究方案于2013年12月11日通过浙江大学第一附属医院机构评审委员会批准。

### 2.2. 胃镜检查及取样

所有胃镜检查操作均由同一位胃肠科医生（季峰医生）进行。正常对照组的内镜检查结果基本正常。每位研究对象获取胃窦活检组织两块。一块组织用于常规病理分析。另一块组织活检样本放置在无菌生理盐水中，在-80 °C保存，用于后续16S rRNA微生物高通量测序。

### 2.3. 黏膜组织 DNA 抽提

黏膜组织DNA抽提采用QIAamp DNA分离试剂盒（Qiagen, Valencia, CA, USA）结合打珠法进行。简单地说，活检组织在180 μL QIAamp ATL缓冲液中加入20 μL蛋白酶K，在56 °C下孵育1 h。然后，加入不同直径的玻璃微珠（0.1 mm, 0.5 mm, 1 mm, Sigma, St. Louis, MO, USA）。然后，使用FastPrep FP120打珠机（Bio 101, Morgan Irvine, CA, USA）以4 m·s<sup>-1</sup>的速度进行样品均质30 s。然后，在56 °C下再孵育1 h。将裂解液加入RNase A 4 mL（100 mg·mL<sup>-1</sup>）和AL缓冲液200 μL中，70 °C孵育30 min。在加入200 μL无水乙醇后，在制造商指定的QIAamp柱上纯化裂解物。用AE缓冲液共200 μL洗脱。

### 2.4. 16S rRNA 焦磷酸测序

用通用PCR引物（27F 5'-AGAGTTTGATCCTGGC TCAG-3', 533R 5'-TTACCGCGGCTGCTGGCAC-3'）扩增16S rRNA基因（V1-3区），如前所述[24]。16S rRNA基因的焦磷酸测序是在454 GS FLX Titanium测序仪上进行的，使用罗氏/454的软件工具。

### 2.5. 生物信息学和统计学分析

使用QIIME软件（1.7.0）用于处理和比较16S rRNA序列[25]。最小读取长度为200 bp，平均质量分数为25。剔除引物序列有两次以上错配的序列。均聚物在序列中授权数量的上限设置为6。生成高质量序列数量484 105条，每个样本平均包含8068条（最低5491、最高13 957），平均序列长度为464 bp。为平衡测序深度，从每个样本中随机抽取5491条序列，进行后续α/β多样性和分类群比较。操作分类单元（operational

taxonomic unit, OTU)的相似性阈值设置为97%。选取序列最丰富的OTU作为代表性序列。使用Greengene数据库(gg\_13\_8\_otus)对代表性序列进行物种分类。使用USEARCH进行嵌合体识别[26]。用R包系统序列分析QIIME结果[27]。功能基因含量的预测是基于群落系统发育调查的PICRUST软件[28]。

肝硬化患者与对照组的差异性及临床参数的显著性检验采用双侧学生t检验法。鉴别幽门螺杆菌阴性的四种聚类的细菌分类、功能模块和临床特征的差异,采用单因素方差分析、Tukey's检验或卡方检验。上述分析方法用R中的语句包“mixOmics”“plyr”和“reshape2”完成。

### 3. 结果

#### 3.1. 临床特点及内镜检查结果

本研究共纳入60名研究对象(31例对照组和29例肝硬化患者)。表1总结了研究对象的临床特征。肝硬化患者的PAGI-SYM评分明显高于对照组(6.7±4.8 vs 3.2±2.7,  $p = 0.001$ )。其他临床特征(年龄、体重指数和性别)在疾病组和对照组中基本一致。

29例肝硬化患者的内镜检查结果汇总在补充材料中的表S1中。所有肝硬化患者均表现为食管或胃底静脉曲张[29]。根据新意大利内镜协会标准,有15例(51.7%)患者患有门脉高压性胃病。胃十二指肠溃疡3例(10.3%),其中胃溃疡两例,十二指肠溃疡一例。4例(13.8%)为糜烂性胃炎。两例(6.9%)为萎缩性胃炎。31例对照组的内镜检查结果基本正常。

#### 3.2. 肝硬化患者胃内幽门螺杆菌感染率低

32.3%(10/31)的健康对照者组织学检出幽门螺杆菌,而仅6.9%(2/29)的肝硬化患者*H. pylori*阳性。肝硬化患者的*H. pylori*感染率显著降低( $p = 0.03$ ) (表1)。基于16S rRNA基因序列的微生物谱分析也显示,*H. pylori*阳性个体与阴性个体之间的幽门螺杆菌属相对丰度存在显著差异。*H. pylori*阳性样本的平均幽门螺杆菌属序列占有所有序列的97.1%(范围为90.1%~99.9%),*H. pylori*阴性样本的平均幽门螺杆菌属序列占有所有序列的0.7%(范围为0.0%~8.5%,见补充材料中的表S2)。幽门螺杆菌阳性和阴性的胃微生物群之间的细菌丰度显著降低,以观察到的OTU个数相比,*H. pylori*阳性对照为76±45,*H. pylori*阴性对照为203±35 ( $p < 0.001$ ),

Shannon指数在幽门螺杆菌阳性对照组为0.37±0.01,而幽门螺杆菌阴性对照组为3.5±0.47 ( $p < 0.001$ ) (表1)。

#### 3.3. 幽门螺杆菌阴性胃黏膜菌群的4个聚类

*H. pylori*阳性样本黏膜菌群以*H. pylori*序列为主。为了更好地发掘胃内除幽门螺杆菌外的其他菌属改变,我们对*H. pylori*阴性样本的黏膜菌群进行了深度分析。肝硬化组和对照组胃黏膜微生物群落在Bray-Curtis聚类分析表现出很大的相似性(见补充材料中的图S1)。进而我们采用了另一种探索性的非监督数据分析方法聚类,探讨这些胃微生物菌群是否存在自然分组。为了确定最优的聚类数量,计算基于OTU水平相对丰度的Jensen-Shannon距离矩阵。发现4个聚类是最优方案,4个聚类的Silhouette指数为1.83,表明4个聚类具有较强的可靠性。类间分析显示4个聚类之间有明显的差异[图1(a)]。此外,4个聚类的Calinski-Harabasz值最高,也支持4个聚类作为最佳聚类数[图1(b)]。然而,4个聚类之间的微生物多样性比较无显著差异(表2)。

48例幽门螺杆菌阴性患者中,聚类1和2各为10例(21%),聚类3为15例(31%),聚类4为13例(27%)。各聚类的临床特征汇总见表2。虽然每个聚类中都有肝

表1 研究对象的临床特征和α多样性

Clinical characteristic	HC (n = 31)	LC (n = 29)	p value
Age	52.0 ± 10.5	48.5 ± 7.8	0.150
Gender (Male/female)	22/9	22/7	0.890
Body mass index	20.1 ± 2.1	19.8 ± 1.9	0.640
PAGI-SYM score	3.2 ± 2.7	6.7 ± 4.8	0.001
<i>H. pylori</i> -positive rate	32.20%	6.80%	0.030
Observed OTU	195 ± 48	152 ± 81	0.016
Chao 1	236 ± 52	194 ± 86	0.024
Shannon index	3.29 ± 0.93	2.55 ± 1.72	0.043
<i>H. pylori</i> -positive subject			
Counts	10	2	0.030
PAGI-SYM score	2.1 ± 2.1	3.5 ± 0.7	0.150
Observed OTU	76 ± 45	50 ± 30	0.560
Chao 1	118 ± 75	88 ± 43	0.570
Shannon index	0.37 ± 0.01	0.17 ± 0.2	0.010
<i>H. pylori</i> -negative subject			
Counts	21	27	0.030
PAGI-SYM score	3.7 ± 2.8	7.0 ± 4.9	0.006
Observed OTU	203 ± 35	201 ± 42	0.850
Chao 1	245 ± 40	244 ± 43	0.950
Shannon index	3.50 ± 0.47	3.68 ± 0.47	0.190

HC: healthy control; LC: liver cirrhosis.

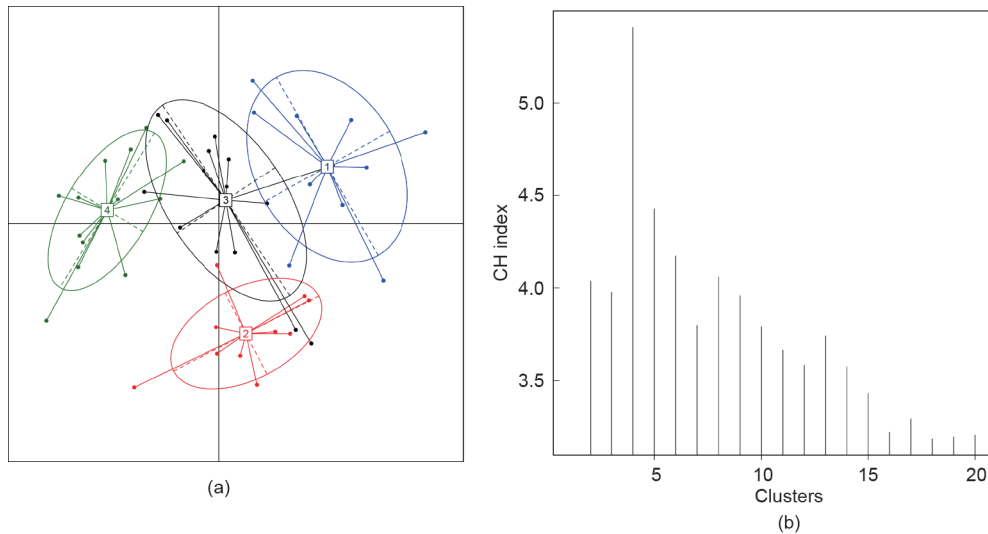


图1. 幽门螺杆菌阴性患者胃黏膜菌群可以被分为4个聚类。(a) 基于OTU水平的Jensen-Shannon距离主成分分析。图标颜色代表聚类分组: 聚类1 (蓝色); 聚类2 (红色); 聚类3 (黑色); 聚类4 (绿色)。(b) 分为4个聚类获得了最高的Calinski-Harabasz (CH)值, 是最佳分类数。

表2 幽门螺杆菌阴性胃黏膜菌群的4个聚类的临床特征及 $\alpha$ 多样性比较

Clinical characteristic	Cluster_1 ( $n = 10$ )	Cluster_2 ( $n = 10$ )	Cluster_3 ( $n = 15$ )	Cluster_4 ( $n = 13$ )	$p$ value
Age	49.2 $\pm$ 6.9	49.8 $\pm$ 7.2	50.6 $\pm$ 13.2	50.2 $\pm$ 6.8	0.990
Gender (Male/female)	9/1	6/4	11/4	9/4	0.490
Ratio of cirrhosis patients	80% <sup>H</sup>	80% <sup>H</sup>	20% <sup>L</sup>	61% <sup>HL</sup>	0.019
PAGI-SYM score	6.1 $\pm$ 4.0 <sup>HL</sup>	9.6 $\pm$ 4.6 <sup>H</sup>	3.0 $\pm$ 2.9 <sup>L</sup>	4.9 $\pm$ 3.8 <sup>L</sup>	0.001
Observed OTU	202 $\pm$ 51	213 $\pm$ 32	206 $\pm$ 40	190 $\pm$ 26	0.490
Chao 1	244 $\pm$ 54	247 $\pm$ 36	253 $\pm$ 38	235 $\pm$ 40	0.720
Shannon index	3.49 $\pm$ 0.75	3.57 $\pm$ 0.41	3.69 $\pm$ 0.38	3.53 $\pm$ 0.37	0.740
Cirrhosis patients					
Counts	8	8	3	8	
Child-Pugh score (A/B/C)	7/1/00	8/0/0	1/2/00	7/0/1	0.810
Gravity of varices 3/2/1 <sup>a</sup>	4/2/2	2/3/3	2/1/0	3/2/3	0.560
Hypertensive gastropathy	50%	50%	33%	63%	0.850
Previous bleeding	62.5%	75.0%	66.7%	75.0%	0.930
Propranolol using	25.0%	25.0%	66.7%	37.5%	0.560
PAGI-SYM score	6.3 $\pm$ 4.5	10.0 $\pm$ 5.2	4.3 $\pm$ 4.5	5.6 $\pm$ 4.4	0.001
EVL rate	25.0%	62.5%	33.3%	12.5%	0.180

Different letters (H, L, HL) indicate statistical difference at  $p < 0.05$  among groups by one-way ANOVA and Tukey's test. H: the highest value among groups; L: the lowest value among groups; HL: no significant difference between neither the highest nor the lowest group.

<sup>a</sup>Gravity of varices 3/2/1 indicate the severity of varices was diagnosed as severe, moderate or mild according to the New Italian Endoscopy Club criteria.

硬化患者和对照组, 但各个聚类中肝硬化患者的比例是不同的。聚类1和2中的肝硬化患者比例为80%, 聚类3中仅20% ( $p = 0.02$ )。采用PAGI-SYM评分比较各组上消化道症状的严重程度。PAGI-SYM评分在聚类2组(9.6 $\pm$ 4.6)最高, 聚类1组(6.1 $\pm$ 4.0)和聚类4组(4.9 $\pm$ 3.8)次之, 聚类3组(3 $\pm$ 2.9)评分最低 ( $p = 0.001$ )。此外, 经内镜下静脉曲张套扎(EVL)治疗的患者比例在聚类2组(62.5%)高于聚类1组(25%), 但差异无统计学意

义 ( $p = 0.18$ )。在每组患者中, 既往静脉曲张出血、存在静脉曲张或肝硬化严重程度(Child-Pugh)、使用心得安和存在门脉高压性胃病的情况无显著差异。

### 3.4. 幽门螺杆菌阴性的胃菌群分析

对相对丰度大于1%的菌类丰度进行分析, 以确定各个聚类的特征菌群(图2)。发现四个聚类之间菌群结构存在显著差异。在门水平[图2(a)], 聚类2中拟杆

菌门的相对丰度显著低于聚类3和聚类4 ( $p = 0.0007$ )。聚类1中变形菌门的相对丰度显著高于其他集群 ( $p = 0.00002$ )。厚壁菌门在聚类2中含量较高, 在聚类1中含量较低, 在聚类3和聚类4中含量中等 ( $p = 0.015$ )。放线菌门的相对丰度在聚类4中显著高于聚类1 ( $p = 0.002$ )。

在科的水平[图2 (b)], 聚类2的拟杆菌科细菌相对丰度显著低于聚类3和聚类4 ( $p = 0.0002$ )。聚类2中拟杆菌科 (*Bacilli*) 的相对丰度最高 ( $p = 1 \times 10^{-7}$ )。聚类1中 $\beta$ -变形菌科 (*Betaproteobacteria*) 比例最高 ( $p = 1 \times 10^{-6}$ )。 $\alpha$ -变形菌门 (*Alphaproteobacteria*) 在聚类2中的含量明显高于其他聚类 ( $p = 1 \times 10^{-5}$ )。

在属水平上[图2 (c)], 与其他聚类相比,  $\beta$ -变形菌科的奈瑟菌属 (*Neisseria*) 在聚类1中比例增加 ( $p = 1 \times 10^{-5}$ )。4个聚类中, 链球菌属 (*Streptococcus*) 在聚类2中的比例最高 ( $p = 1 \times 10^{-8}$ )。普雷沃菌属 (*Prevotella*) 在聚类4中的相对丰度显著高于聚类1和聚类2 ( $p = 0.002$ )。梭杆菌属 (*Fusobacterium*) 的相对丰度在聚类1中明显高于聚类2和聚类4 ( $p = 0.002$ )。

### 3.5. 幽门螺杆菌阴性的胃菌群功能基因分型

我们进而通过PICRUST分析获得胃黏膜菌群京都基

因和基因组百科全书 (KEGG) 模块的预测功能基因图谱。当比较1级KEGG途径[图3 (a)]时, 发现聚类2中涉及遗传信息处理的功能基因显著低于其他3个聚类 ( $p = 0.0005$ )。在KEGG途径水平2和水平3, 遗传信息处理下降涉及的功能分类主要包括核糖体和翻译核糖体生物发生、折叠分类和降解途径[图3 (b)]。在聚类2中, 涉及模块折叠、分选和降解的功能基因相对丰度最低 ( $p = 1 \times 10^{-5}$ )。途径翻译核糖体模块在聚类2中的比例显著低于聚类1和聚类3 ( $p = 0.006$ )。另一个途径翻译模块核糖体合成在聚类2中显著低于聚类3和聚类4 ( $p = 0.001$ )。与聚类3和聚类4相比, 聚类1的氨基糖和核苷酸糖模块的相对丰度显著降低, 聚类2介于中间 ( $p = 0.001$ )。聚类2糖原合成和代谢模块功能基因水平低于其他组 ( $p = 0.0005$ )。

## 4. 讨论

肠道菌群失衡在肝硬化并发症发生发展中起着重要作用。然而, 以前的大多数研究都在分析粪便菌群。我们首次描述了肝硬化患者胃黏膜菌群的特征。研究发现肝硬化患者的幽门螺杆菌感染率明显低于对照组。在幽门螺杆菌阴性患者中, 胃微生物群聚成4个不同的聚类:

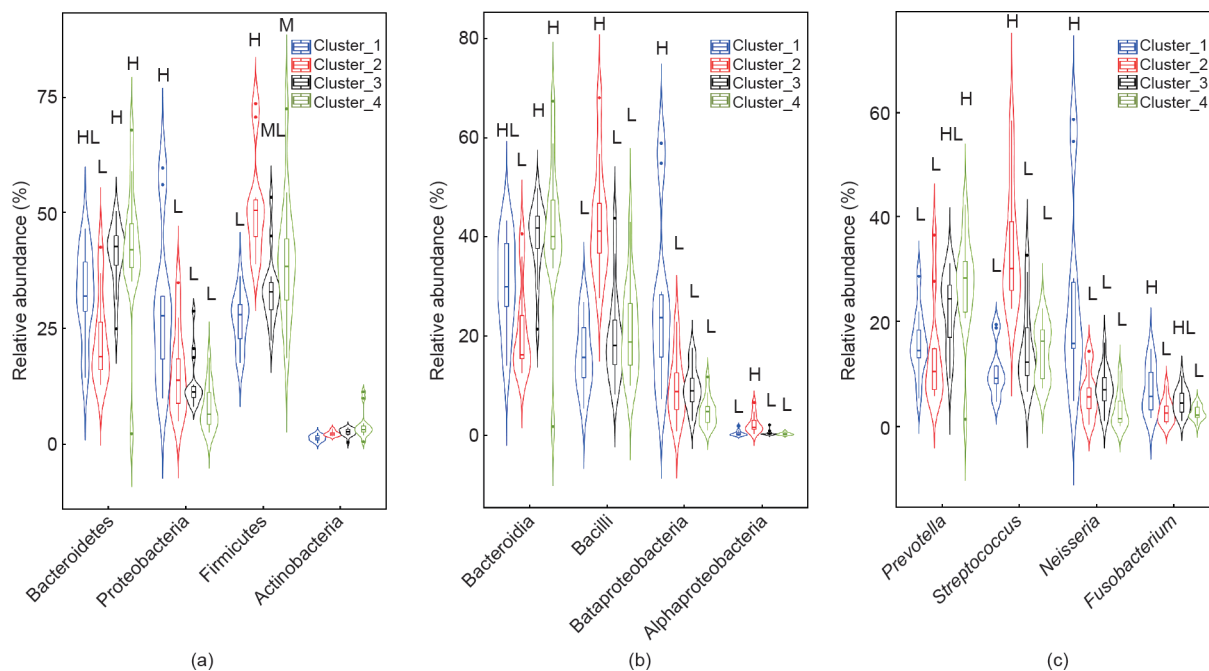


图2. 聚类间不同分类层面差异显著的细菌相对丰度。(a) 门水平; (b) 纲水平; (c) 属水平。数据用小提琴图可视化, 其中中间的线是中值, 方框代表四分位数范围。从框延伸出来的细线表示数据中的上(最大值)和下(最小值)相邻值。不同颜色的图表示不同的簇。M: 组间中等水平, 显著高于最低, 显著低于最高; ML: 最高和中间组之间无显著性差异。

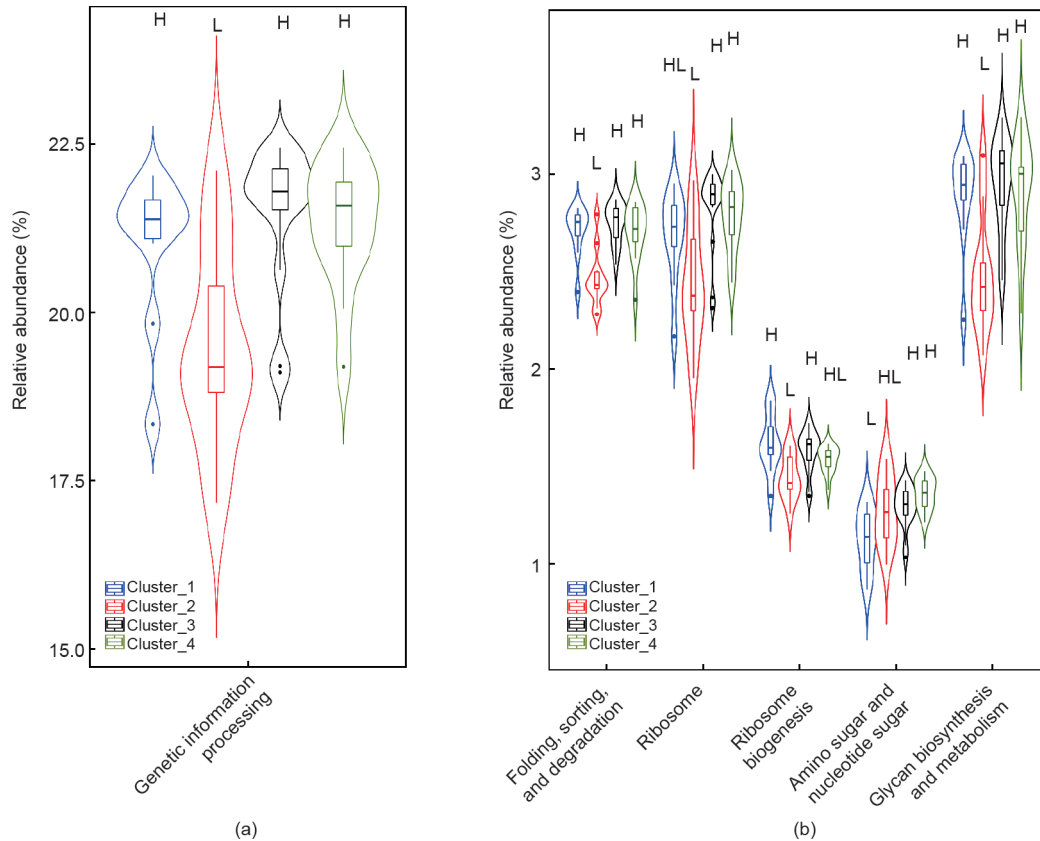


图3. 聚类间差异显著的细菌不同层级功能模块。(a) 1级；(b) 第2和第3级。数据用小提琴图进行可视化，其中中间的线是中值，方框代表四分位数范围。从框中延伸来的细线表示数据中上部（最大值）和下部（最小值）的相邻值。不同颜色的图表示不同的簇。

聚类1和聚类2（主要是肝硬化患者），聚类3（主要是健康对照）和聚类4（肝硬化和健康对照各占一半）。这些聚类在菌群组成和功能上存在显著差异，尤其是聚类2。从临床特征来看，聚类2中大多数肝硬化患者既往有EVL治疗史和严重的上消化道症状，这表明在肝硬化中胃微生物群、EVL和上消化道症状之间可能存在关联。

幽门螺杆菌是胃定植菌中研究最多的细菌。本研究显示肝硬化患者幽门螺杆菌感染率较低。近期Chang和Hu [30]报道，在台湾人群中，失代偿期肝硬化和消化性溃疡代偿期肝硬化患者与非肝硬化患者相比，幽门螺杆菌感染率更低。与之前的研究一致，我们的结果再次证实了幽门螺旋杆菌不是肝硬化患者胃十二指肠病变的主要病因[31]。肝硬化导致胃幽门螺杆菌定植减少的机制尚不清楚，可能有以下几个原因。首先，肝硬化患者胃pH值高于对照组，有较大比例的肝硬化患者出现胃酸过少的情况[32]。其次，在肝硬化患者中，胃萎缩和肠上皮化生发生频率明显高于健康对照组[33]。萎缩性胃炎的发生会伴随幽门螺杆菌的定植减少或消除[34]。肝硬化患者常因恶心、呕吐和消化道出血等症状而服用

制酸剂。肝硬化患者幽门螺杆菌发病率低也可能与频繁服用PPI有关。这些结果与最近一项关于PPI对健康犬胃肠道微生物群的影响的研究一致，发现奥美拉唑给药期间，胃内幽门螺杆菌有所减少[35]。长期以来胃黏膜幽门螺杆菌的存在被认为与包括消化性溃疡、胃癌和胃黏膜相关淋巴组织（MALT）淋巴瘤等多种胃病有关[36]。然而，最近有一些数据表明幽门螺杆菌对自身免疫和变应性疾病有保护作用[37]。幽门螺杆菌的下降是否参与肝硬化的并发症发生发展需要未来的研究加以证实。

胃微生物群的组成受饮食习惯、药物、胃黏膜炎症、疾病、遗传背景等多种因素的影响[38]。对于幽门螺杆菌阴性个体，通过直接比较肝硬化患者和对照组患者并不能观察到很多特征性的差异（见补充材料中的图S1）。这一结果表明肝硬化本身可能并不是胃微生物群的主要塑造者。然后，对所有幽门螺杆菌阴性研究对象，根据微生物组成将人群分为4个聚类。聚类1和聚类2中肝硬化患者明显增多，提示有一定的疾病相关的菌群状态。

肝硬化常伴有胃肠道症状。一般认为与肝脏疾病的严重程度、肠道功能障碍（如胃对膨胀的敏感性增加

和肠道转运延迟)和心理压力相关的因素[39]。PAGI-SYM是广泛用于疾病相关的胃肠道症状评估指标[23]。本研究中,肝硬化患者的平均PAGI-SYM评分明显高于对照组。根据PAGI-SYM评分,聚类2组的上消化道症状最严重。从分类上看,聚类2的特征是Bacilli增加,而拟杆菌纲(Bacterodia)相对下降。近来有多个研究提出胃肠道症状与胃微生物群之间存在相关性。Han等[40]报道胃中幽门螺杆菌的相对丰度与组织学及内镜下胃炎密切相关,但与症状性胃炎无显著相关性。PAGI-SYM评分与下列菌种*Corynebacterium segmentosum*, *Prevotella nanceiensis*, *Neisseria elongata*, *Pantoea* sp.和*Actinobacillus parahaemolyticus*的相对丰度呈正相关,而与*Prevotella pallens*, *Propionibacterium acnes*和*Staphylococcus epidermidis*等的相对丰度呈负相关[40]。最近, Fukui和他的研究小组发现功能性消化不良的胃黏膜肠链球菌明显增多,而且链球菌的相对丰度与上消化道症状呈正相关[41]。微生物群可能通过神经源性炎症过程和肠神经系统调节来改变症状敏感性[42]。虽然很少有研究探索胃微生物群和胃肠道症状之间的关系,但人们对脑-肠道微生物组(BGM)轴内的双向相互作用越来越感兴趣[43]。BGM轴的改变不仅与功能性肠疾病如肠易激综合征有关[44],也与胃肠道共病的精神和神经疾病有关[45]。胃肠道症状与胃黏膜微生物菌群相关性的发现应是BGM轴的一部分,有待进一步研究阐明。

曲张静脉出血是肝硬化最常见的并发症之一。EVL是目前在肝硬化患者中应用最广泛的治疗方法。它不仅是曲张静脉出血急性发作的首选,也是二级预防的首选[46]。目前还没有研究系统评估EVL对肠道微生物群的影响。但有报道提示EVL与包括吞咽困难、食管溃疡、胸骨后、吞咽痛、胃灼热、咽喉痛和发热等多种不良事件相关[47]。EVL后患者经常出现上消化道运动障碍[48]。聚类1和聚类2均包含较高的肝硬化患者比例。然而,与聚类1相比,聚类2中有更多的患者曾经历EVL。我们的结果提示EVL可以诱导胃内链球菌属的增加。虽然证据有限,但人们一直担心EVL后的细菌感染风险。接受侵入性治疗的患者,革兰氏阳性球菌引起的感染率较高[49]。链球菌是肝硬化感染的主要原因之一。既往研究在肝硬化患者的粪便样本中发现了更多的链球菌[6]。两例EVL患者的血液标本中分离出脓链球菌和表皮葡萄球菌,但未出现细菌感染[50]。链球菌属于正常的口腔微生物群,可引起牙齿和牙周感染。我们在这里的结果表明,EVL可能增加细菌从口腔转移到胃

的风险。

在我们的研究中,微生物组的功能基因分析揭示了聚类中功能基因丰度变化。我们发现,与其他3个聚类相比,聚类2中涉及糖基生物合成、代谢和遗传信息处理的基因丰度显著降低。栖息在人体肠道中的共生微生物以分解多糖和聚糖,包括宿主黏液分泌的内源性聚糖和膳食聚糖获取能量为生[51]。对于胃黏液微生物来说,内源性聚糖是其主要的营养来源。内源性多糖的化学多样性要求黏膜微生物产生各种不同的降解酶,以利用这些多相聚合物[51]。从生态学的角度来看,聚类2中聚糖生物合成和代谢基因的下降可能表明该菌群不是一个长期进化的稳定群落。EVL等侵入性操作会干扰微生物群,将微生物引入口腔等上游。细菌生活在不断变化的环境中。为了快速适应,它们进化出了多种机制来调节从转录起始到蛋白质失活和降解的每一个细胞过程[52]。利用PICRUST进行的生物信息学分析显示,重金属暴露等恶劣环境对环境和遗传信息处理的富集功能有强烈影响[53]。聚类2中与遗传信息处理相关的功能基因丰度相对较低,也说明该菌群不是适应恶劣环境的原始成员。

本研究仍存在一定的局限性。首先,大多数来就诊的人都有上消化道不适。虽然健康对照组的内镜检查结果基本正常,但他们可能不是严格意义上的健康对照。其次,胃微生物群的组成也可能受到饮食环境和药物等其他因素的影响[38]。本研究没有记录和比较饮食环境。尽管,我们排除了胃镜取样前4周服用过PPI、抗生素和益生菌的患者来降低药物的影响。然而,长期来看,肝硬化患者经常服用药物,因此可能会影响微生物群。这些因素的影响有待于在今后大样本研究中分析。再次,基于Picrust的功能基因预测并不是真正的宏基因组结果。在未来,基于鸟枪法的宏基因组分析应得到应用。此外,本研究的结果还不足以探讨幽门螺杆菌在肝硬化中的潜在作用。具体机制有待进一步增加样本量研究。

总之,本研究对肝硬化患者胃黏膜微生物群与健康对照组进行了比较。在肝硬化患者中幽门螺杆菌定植下降。对于幽门螺杆菌阴性个体,直接比较肝硬化和对照组并不能观察到很多差异。然而,*H. pylori*阴性个体的胃微生物可聚为4个聚类,其中两个聚类(聚类1和聚类2)的肝硬化患者较多。在结构和功能上差异最明显的聚类2中,经历过EVL治疗和具有严重胃肠症状的患者相对较多。我们的研究表明,胃微生物群、上消化道症状和肝硬化患者的侵入性治疗(如EVL)之间可能存

在联系。需要进一步的大队列研究来证实。此外，微生物靶向治疗改善上消化道症状的具体机制也有待进一步探索。

## 致谢

本研究受国家自然科学基金资助项目（No.81790631）和浙江省自然科学基金资助项目（LY15H030012）资助。

## Compliance with ethics guidelines

Yanfei Chen, Jing Guo, Chunlei Chen, Ding Shi, Dai-qiong Fang, Feng Ji, and Lanjuan Li declare that they have no conflict of interest or financial conflicts to disclose.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.eng.2020.04.014>.

## References

- [1] Tilg H, Cani PD, Mayer EA. Gut microbiome and liver diseases. *Gut* 2016;65(12):2035–44.
- [2] Qin N, Yang F, Li A, Prifti E, Chen Y, Shao L, et al. Alterations of the human gut microbiome in liver cirrhosis. *Nature* 2014;513(7516):59–64.
- [3] Acharya C, Sahingur SE, Bajaj JS. Microbiota, cirrhosis, and the emerging oral–gut–liver axis. *JCI Insight* 2017;2(19):94416.
- [4] Jensen A, Groenkjaer LL, Holmstrup P, Vilstrup H, Kilian M. Unique subgingival microbiota associated with periodontitis in cirrhosis patients. *Sci Rep* 2018;8(1):10718.
- [5] Bajaj JS, Betrapally N, Hylemon PB, Heuman DM, Daita K, White MB, et al. Salivary microbiota reflects changes in gut microbiota in cirrhosis with hepatic encephalopathy. *Hepatology* 2015;62(4):1260–71.
- [6] Chen YF, Yang F, Lu H, Wang B, Chen Y, Lei D, et al. Characterization of fecal microbial communities in patients with liver cirrhosis. *Hepatology* 2011;54(2):562–72.
- [7] Bik EM, Eckburg PB, Gill SR, Nelson KE, Purdom EA, Francois F, et al. Molecular analysis of the bacterial microbiota in the human stomach. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103(3):732–7.
- [8] von Rosenvinge EC, Song Y, White JR, Maddox C, Blanchard T, Fricke WF. Immune status, antibiotic medication and pH are associated with changes in the stomach fluid microbiota. *ISME J* 2013;7(7):1354–66.
- [9] Wu WM, Yang YS, Peng LH. Microbiota in the stomach: new insights. *J Dig Dis* 2014;15(2):54–61.
- [10] Liu X, Shao L, Liu X, Ji F, Mei Y, Cheng Y, et al. Alterations of gastric mucosal microbiota across different stomach microhabitats in a cohort of 276 patients with gastric cancer. *EBioMedicine* 2019;40:336–48.
- [11] Lertpiriyapong K, Whary MT, Muthupalani S, Lofgren JL GER, Feng Y, et al. Gastric colonisation with a restricted commensal microbiota replicates the promotion of neoplastic lesions by diverse intestinal microbiota in the *Helicobacter pylori* INS-GAS mouse model of gastric carcinogenesis. *Gut* 2014;63(1):54–63.
- [12] Maldonado-Contreras A, Goldfarb KC, Godoy-Vitorino F, Karaoz U, Contreras M, Blaser MJ, et al. Structure of the human gastric bacterial community in relation to *Helicobacter pylori* status. *ISME J* 2011;5(4):574–9.
- [13] Aviles-Jimenez F, Vazquez-Jimenez F, Medrano-Guzman R, Mantilla A. Stomach microbiota composition varies between patients with non-atrophic gastritis and patients with intestinal type of gastric cancer. *Sci Rep* 2014;4:4202.
- [14] Yu GQ, Gail MH, Shi J, Klepac-Ceraj V, Paster BJ, Dye BA, et al. Association between upper digestive tract microbiota and cancer-predisposing states in the esophagus and stomach. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2014;23(5):735–41.
- [15] Yu G, Torres J, Hu NY, Medrano-Guzman R, Herrera-Goepfert R, Humphrys MS, et al. Molecular characterization of the human stomach microbiota in gastric cancer patients. *Front Cell Infect Microbiol* 2017;7:302.
- [16] Kalaitzakis E. Gastrointestinal dysfunction in liver cirrhosis. *World J Gastroenterol* 2014;20(40):14686–95.
- [17] Kalaitzakis E, Sadik R, Holst JJ, Ohman L, Björnsson ES. Gut transit is associated with gastrointestinal symptoms and gut hormone profile in patients with cirrhosis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2009;7(3):346–52.
- [18] Kalaitzakis E, Simren M, Abrahamsson H, Björnsson ES. Role of gastric sensorimotor dysfunction in gastrointestinal symptoms and energy intake in liver cirrhosis. *Scand J Gastroenterol* 2007;42(2):237–46.
- [19] Verne GN, Soldevia-Pico C, Robinson ME, McRae Spicer K, Reuben A. Autonomic dysfunction and gastroparesis in cirrhosis. *J Clin Gastroenterol* 2004;38(1):72–6.
- [20] Norman K, Pirlich M. Gastrointestinal tract in liver disease: which organ is sick? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2008;11(5):613–9.
- [21] Karki L, Gorkhaly MP, Karki BB. Study of upper gastrointestinal tract endoscopic findings in portal hypertension. *JNMA J Nepal Med Assoc* 2013;52(190):337–42.
- [22] Pugh RN, Murray-Lyon IM, Dawson JL, Pietroni MC, Williams R. Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices. *Br J Surg* 1973;60(8):646–9.
- [23] Rentz AM, Kahrilas PJ, Stanghellini V, Tack J, Talley N, de la Loge C, et al. Development and psychometric evaluation of the patient assessment of upper gastrointestinal symptom severity index (PAGI-SYM) in patients with upper gastrointestinal disorders. *Qual Life Res* 2004;13(10):1737–49.
- [24] Chen W, Liu F, Ling Z, Tong X, Xiang C. Human intestinal lumen and mucosa-associated microbiota in patients with colorectal cancer. *PLoS One* 2012;7(6): e39743.
- [25] Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods* 2010;7(5):335–6.
- [26] Edgar RC. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 2010;26(19):2460–1.
- [27] McMurdie PJ, Holmes S. PhyloSeq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS One* 2013;8(4):e61217.
- [28] Langille MG, Zaneveld J, Caporaso JG, McDonald D, Knights D, Reyes JA, et al. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nat Biotechnol* 2013;31(9):814–21.
- [29] Jalan R, Hayes PC. UK guidelines on the management of variceal haemorrhage in cirrhotic patients. *Gut* 2000;46(Suppl 3–4):III1–15.
- [30] Chang SS, Hu HY. *Helicobacter pylori* is not the predominant etiology for liver cirrhosis patients with peptic ulcer disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2013;25(2):159–65.
- [31] Kirchner GI, Beil W, Bleck JS, Manns MP, Wagner S. Prevalence of *Helicobacter pylori* and occurrence of gastroduodenal lesions in patients with liver cirrhosis. *Int J Clin Exp Med* 2011;4(1):26–31.
- [32] Nam YJ, Kim SJ, Shin WC, Lee JH, Choi WC, Kim KY, et al. Gastric pH and *Helicobacter pylori* infection in patients with liver cirrhosis. *Korean J Hepatol* 2004;10(3):216–22.
- [33] Ibrsım D, Cevikbas U, Akyüz F, Poturoglu S, Ahishali E, Gulluoglu M, et al. Intestinal metaplasia in portal hypertensive gastropathy: a frequent pathology. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2008;20(9):874–80.
- [34] Karnes WE, Samloff IM, Siurala M, Kekki M, Sipponen P, Kim SWR, et al. Positive serum antibody and negative tissue staining for *Helicobacter pylori* in subjects with atrophic body gastritis. *Gastroenterology* 1991;101(1): 167–74.
- [35] Garcia-Mazcorro JF, Suchodolski JS, Jones KR, Clark-Price SC, Dowd SE, Minamoto Y, et al. Effect of the proton pump inhibitor omeprazole on the gastrointestinal bacterial microbiota of healthy dogs. *FEMS Microbiol Ecol* 2012;80(3):624–36.
- [36] Cover TL, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* in health and disease. *Gastroenterology* 2009;136(6):1863–73.
- [37] Hasni SA. Role of *Helicobacter pylori* infection in autoimmune diseases. *Curr Opin Rheumatol* 2012;24(4):429–34.
- [38] Nardone G, Compare D. The human gastric microbiota: is it time to rethink the pathogenesis of stomach diseases? *United Eur Gastroenterol J* 2015;3(3):255–60.
- [39] Fritz E, Hammer J. Gastrointestinal symptoms in patients with liver cirrhosis are linked to impaired quality of life and psychological distress. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2009;21(4):460–5.
- [40] Han HS, Lee SY, Oh SY, Moon HW, Cho H, Kim JH. Correlations of the gastric and duodenal microbiota with histological, endoscopic, and symptomatic gastritis. *J Clin Med* 2019;8(3):312.
- [41] Fukui A, Takagi T, Naito Y, Inoue R, Kashiwagi S, Mizushima K, et al. Higher levels of streptococcus in upper gastrointestinal mucosa associated with symptoms in patients with functional dyspepsia. *Digestion* 2020;101(1):38–45.
- [42] Budzynski J, Klopfack M. Brain-gut axis in the pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *World J Gastroenterol* 2014;20(18):5212–25.
- [43] Rhee SH, Pothoulakis C, Mayer EA. Principles and clinical implications of the brain–gut–enteric microbiota axis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2009;6



- (5):306–14.
- [44] Simren M, Barbara G, Flint HJ, Spiegel B, Spiller R, Vanner S, et al. Intestinal microbiota in functional bowel disorders: a Rome foundation report. *Gut* 2013;62(1):159–76.
- [45] Cryan JF, Dinan TG. Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour. *Nat Rev Neurosci* 2012;13(10):701–12.
- [46] De Franchis R, Fac BV. Expanding consensus in portal hypertension: report of the Baveno VI Consensus Workshop: stratifying risk and individualizing care for portal hypertension. *J Hepatology* 2015;63(3):743–52.
- [47] Vadera S, Yang C, Morgan MY, Gluud L. Band ligation versus no intervention for primary prevention of upper gastrointestinal bleeding in adults with cirrhosis and oesophageal varices. *Cochrane Database Syst Rev* 2019;(6):CD012673.
- [48] Narawane NM, Bhatia S, Sheth M, Dherai AJ, Abraham P, Paranjape AY, et al. Early changes in esophageal motility after endoscopic variceal sclerotherapy or ligation. *Indian J Gastroenterol* 1999;18(1):11–4.
- [49] Fernandez J, Navasa M, Gómez J, Colmenero J, Vila J, Arroyo V, et al. Bacterial infections in cirrhosis: epidemiological changes with invasive procedures and norfloxacin prophylaxis. *Hepatology* 2002;35(1):140–8.
- [50] Maimone S, Saffioti F, Filomia R, Filomia G, Saitta C, Pallio S, et al. Elective endoscopic variceal ligation is not a risk factor for bacterial infection in patients with liver cirrhosis. *Dig Liver Dis* 2018;50(4):366–9.
- [51] Koropatkin NM, Cameron EA, Martens EC. How glycan metabolism shapes the human gut microbiota. *Nat Rev Microbiol* 2012;10(5):323–35.
- [52] Kaczanowska M, Ryden-Aulin M. Ribosome biogenesis and the translation process in *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev* 2007;71(3):477–94.
- [53] Epelde L, Lanzén A, Blanco F, Urich T, Garbisu C. Adaptation of soil microbial community structure and function to chronic metal contamination at an abandoned Pb–Zn mine. *FEMS Microbiol Ecol* 2015;91(1):1–11.