

DOI:10.13350/j.cjpb.250403

• 论著 •

基于多肿瘤标志物表达的肝癌患者肠道微生物组特征分析

吕振选¹, 吕朝凤², 田国防¹, 李春青^{1*}

(1. 新乡市中心医院/新乡医学院第四临床学院肿瘤内科, 河南新乡 2022300;

2. 新乡市中心医院/新乡医学院第四临床学院健康管理部)

【摘要】 **目的** 探讨肝细胞癌患者的肠道微生物组特征, 分析其与多种肿瘤标志物水平的关联性, 为肝细胞癌的早期诊断和治疗提供临床思路。 **方法** 收集2023年10月至2024年10月于医院就诊的60例肝细胞癌患者(病例组)和60例健康志愿者(对照组)的粪便和血清样本。采用16S rRNA基因测序技术分析肠道微生物组组成, 检测血清中甲胎蛋白(AFP)、AFP-L3、异常凝血酶原(DCP)、糖蛋白3(GPC3)和TF(TF)水平。比较2组间菌群多样性和组成差异, 应用Spearman相关分析和多元线性回归模型评估菌群与肿瘤标志物间的关联。 **结果** 与对照组相比, 病例组肠道菌群的Chao1指数显著降低(320.45 ± 35.28 vs 350.62 ± 30.15 , $P < 0.001$), Shannon指数显著降低(3.85 ± 0.42 vs 4.20 ± 0.38 , $P < 0.001$), Simpson指数也显著降低(0.918 ± 0.025 vs 0.940 ± 0.022 , $P < 0.001$)。在属水平上, 病例组致病菌属大肠埃希菌属($12.5\% \pm 2.2\%$ vs $4.0\% \pm 1.0\%$, $P < 0.001$)、肠杆菌属($5.8\% \pm 1.5\%$ vs $2.0\% \pm 0.8\%$, $P < 0.001$)相对丰度显著升高, 益生菌属拟杆菌属($18.0\% \pm 3.5\%$ vs $22.5\% \pm 4.0\%$, $P < 0.001$)、毛螺菌属($3.2\% \pm 1.0\%$ vs $6.5\% \pm 1.5\%$, $P < 0.001$)显著降低。Spearman相关分析显示, AFP水平与大肠埃希菌属相对丰度呈正相关($\rho = 0.582$, $P < 0.001$), 与拟杆菌属呈负相关($\rho = -0.568$, $P < 0.001$)。多元线性回归分析表明, 大肠埃希菌属增加与AFP升高独立相关($\beta = 0.425$, $P < 0.001$)。 **结论** 肝细胞癌患者的肠道微生物组多样性降低, 菌群组成显著改变, 致病菌增多、益生菌减少。肿瘤标志物水平与特定菌属的丰度密切相关。肠道菌群失调可能在肝细胞癌的发生发展中发挥重要作用, 调节肠道微生态或可成为肝细胞癌防治的新策略。

【关键词】 肝细胞癌; 肠道微生物组; 肿瘤标志物; 菌群多样性; 相关性分析

【文献标识码】 A **【文章编号】** 1673-5234(2025)04-0421-07

[Journal of Pathogen Biology. 2025 Apr.; 20(04):421-427, 433.]

Analysis of intestinal microbiome characteristics in patients with liver cancer based on the expression of multiple tumor markers

LV Zhenxuan¹, LV Chaofeng², TIAN Guofang¹ (1. Xinxiang Central Hospital/Department of Oncology, Fourth Clinical College, Xinxiang Medical College, Xinxiang 2022300, Henan, China; 2. Xinxiang Central Hospital/Health Management Department of the Fourth Clinical College of Xinxiang Medical College)***

【Abstract】 **Objective** To explore the characteristics of the intestinal microbiome in patients with hepatocellular carcinoma, analyze its correlation with the levels of multiple tumor markers, and provide clinical ideas for the early diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma. **Methods** Fecal and serum samples of 60 hepatocellular carcinoma patients (case group) and 60 healthy volunteers (control group) who visited the hospital from October 2023 to October 2024 were collected. 16S rRNA gene sequencing technology was used to analyze the composition of the intestinal microbiome, and serum alpha-fetoprotein (AFP), AFP-L3, abnormal prothrombin (DCP), glycoprotein 3 (GPC3) and TF (TF) levels were detected. The diversity and composition of the bacterial flora between the two groups were compared, and Spearman correlation analysis and multiple linear regression models were used to evaluate the association between the bacterial flora and tumor markers. **Results** Compared with the control group, the Chao1 index of the intestinal flora in the case group was significantly lower (320.45 ± 35.28 vs 350.62 ± 30.15 , $P < 0.001$), and the Shannon index was significantly lower (3.85 ± 0.42 vs 4.20 ± 0.38 , $P < 0.001$), Simpson index was also significantly reduced (0.918 ± 0.025 vs 0.940 ± 0.022 , $P < 0.001$). At the genus level, the pathogenic bacteria in the case group were *Escherichia coli* ($12.5\% \pm 2.2\%$ vs $4.0\% \pm 1.0\%$, $P < 0.001$), *Enterobacter* ($5.8\% \pm 1.5\%$ vs $2.0\% \pm 0.8\%$, $P < 0.001$) the relative

* **【基金项目】** 河南省医学科技攻关计划项目(LHGJ20210919)。

** **【通信作者】** 李春青, E-mail: 13598606759@139.com

【作者简介】 吕振选(1979-), 男, 河南新乡人, 硕士, 主治医师, 主要从事常见多发恶性肿瘤相关研究。E-mail: 18336089830@139.com

abundance increased significantly, the probiotic genera *Bacteroidetes* ($18.0\% \pm 3.5\%$ vs $22.5\% \pm 4.0\%$, $P < 0.001$), *Lachnospira* ($3.2\% \pm 1.0\%$ vs $6.5\% \pm 1.5\%$, $P < 0.001$) was significantly reduced. Spearman correlation analysis showed that AFP levels were positively correlated with the relative abundance of *Escherichia coli* ($\rho = 0.582$, $P < 0.001$) and negatively correlated with *Bacteroidetes* ($\rho = -0.568$, $P < 0.001$). Multiple linear regression analysis showed that the increase in *Escherichia coli* was independently related to the increase in AFP ($\beta = 0.425$, $P < 0.001$). **Conclusion** The diversity of the intestinal microbiome of patients with hepatocellular carcinoma is reduced, and the composition of the bacterial flora is significantly changed, with an increase in pathogenic bacteria and a decrease in probiotics. Tumor marker levels are closely related to the abundance of specific bacterial genera. Intestinal flora imbalance may play an important role in the occurrence and development of hepatocellular carcinoma, and regulating intestinal microecology may become a new strategy for the prevention and treatment of hepatocellular carcinoma.

【Keywords】 hepatocellular carcinoma; intestinal microbiome; tumor markers; flora diversity; correlation analysis

肝细胞癌 (Hepatocellular carcinoma, HCC) 是全球范围内发病率和致死率均位居前列的恶性肿瘤^[1]。据统计,肝癌每年导致超过 80 万例死亡,严重威胁人类健康^[2]。虽然近年来诊疗技术有所进步,但 HCC 的早期诊断在临床实践中仍是难点,导致患者预后不佳。因此,探索 HCC 的发病机制并寻找新的诊断标志物具有重要的临床意义。传统的肝癌标志物如甲胎蛋白 (AFP) 等虽被广泛应用,但其敏感性和特异性仍有待提高^[3]。肿瘤标志物在肝癌的诊断、预后评估和疗效监测中发挥着重要作用,寻找新的肿瘤标志物或联合多种标志物以提高诊断的准确性目前依然是研究热点,但单纯依靠血清肿瘤标志物的检测,尚无法完全满足临床需求^[4]。

肠道微生物组作为人体最大的微生物生态系统,与宿主的健康和疾病状态密切相关。已有研究表明,肠道菌群失调与多种疾病的发生发展有关,包括肥胖、糖尿病、炎症性肠病以及多种肿瘤^[5]。在肝脏疾病研究领域,许多研究基于“肠-肝轴”理论强调了肠道微生物及其代谢产物在肝脏疾病中的作用^[6]。肠道屏障功能受损、细菌移位和肠道炎症等因素可通过门静脉系统影响肝脏,促进肝纤维化和肝癌的发生^[7]。一些研究发现,HCC 患者的肠道菌群组成与健康人群存在显著差异,特定菌群的丰度变化可能与肝癌的发生密切相关^[8]。但针对不同肿瘤标志物表达水平的肝癌患者,其肠道微生物组特征是否存在差异,以及这些差异是否可用于肝癌的诊断和治疗,尚缺乏系统性的研究。

本研究通过检测肝癌患者多种肿瘤标志物的表达水平,并结合肠道微生物组的高通量测序,深入分析二者之间的关联。不同肿瘤标志物表达水平的肝癌患者,其肠道微生物组特征可能存在显著差异,且这些差异可能与肿瘤的发生发展相关。本研究期望揭示肠道微生物组在 HCC 中的潜在作用机制,为肝癌的早期诊断和个体化治疗提供新的思路和科学依据。

对象与方法

1 研究对象

本研究为前瞻性病例对照研究,招募了自 2023 年 10 月至 2024 年 10 月于新乡市中心医院肿瘤科就诊的肝细胞癌患者及健康志愿者。病例组共纳入 60 例经临床和影像学确诊为原发性肝细胞癌的患者,年龄 18~75 岁,未接受过手术、放疗、化疗或免疫治疗等抗肿瘤治疗,无严重心血管、呼吸、肾脏等系统性疾病。健康对照组共招募 60 例同期体检的健康志愿者,与病例组在年龄、性别和体质指数 (Body Mass Index, BMI) 等方面匹配,无肝脏疾病史、肿瘤史及其他严重慢性疾病。纳入标准包括:(1) 受试者自愿参与本研究,签署知情同意书;(2) 近 3 个月内未使用抗生素、益生菌或其他可能影响肠道菌群的药物;(3) 无严重感染、自身免疫性疾病、炎症性肠病、消化道肿瘤等可能影响肠道微生物组的疾病;(4) 非孕妇或哺乳期女性;(5) 无酗酒或药物滥用史。

本研究已获得医院伦理委员会批准同意,且所有受试者均知晓研究目的和内容,并自愿签署了书面知情同意书。研究过程严格遵循《赫尔辛基宣言》及相关伦理规范。

2 临床数据收集

基本临床信息包括年龄、性别、身高、体重、BMI、饮食习惯(高脂、高蛋白饮食摄入情况)、吸烟史、饮酒史(饮酒频率、酒精摄入量)等生活方式因素。对于病例组,进一步收集患者的肿瘤分期(依据巴塞罗那临床肝癌分期系统 BCLC 分期)、肿瘤大小、肿瘤数目、有无血管侵犯或远处转移等影像学特征,以及实验室检查结果,包括肝功能指标(丙氨酸氨基转移酶 ALT、天冬氨酸氨基转移酶 AST、总胆红素 TBil、白蛋白 Alb)、凝血功能、乙型肝炎病毒 (HBV) 和丙型肝炎病毒 (HCV) 感染状态等。饮食信息通过标准化的食物频率问卷 (Food Frequency Questionnaire, FFQ) 进行评估。

3 样本采集与处理

包括血液和粪便样本。所有样本的采集均在晨间

受试者空腹状态下进行,且统一于晨间完成。血液样本采集外周血 5 mL,置于无抗凝剂的真空采血管中。血样室温静置 30 min,以 3 000 r/min 离心 10 min,分离血清并分装至无菌离心管,每管 500 μ L,迅速置于一 80 $^{\circ}$ C 冰箱中保存,备用于肿瘤标志物的检测分析。粪便样本采集时提供统一的无菌取样容器和详细的取样说明,指导其于当天清晨自行收集新鲜粪便样本约 5 g。样本采集后立即送至实验室分装 200 mg 至无菌冻存管,液氮速冻后转移至一 80 $^{\circ}$ C 冰箱中保存,以备后续的微生物组 DNA 提取和测序分析。

4 肿瘤标志物检测

采用酶联免疫吸附试验 (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA) 方法,对所有受试者的血清样本进行多种肿瘤标志物的定量检测,包括甲胎蛋白 (AFP)、AFP-L3、异常凝血酶原 (DCP)、糖蛋白 3 (GPC3) 和 TF (TF)。

将一 80 $^{\circ}$ C 冻存的血清样本于一 4 $^{\circ}$ C 条件下缓慢解冻后,将血清样本、标准品和质控品分别加入酶标板的对应孔中,孵育后进行洗涤处理。随后加入酶标二抗,再次孵育和洗涤。加入显色底物,酶促反应生成有色产物,最终通过加入终止液停止反应。使用酶标仪在 450 nm 波长处测定各孔的光密度 (Optical Density, OD) 值。依据标准品的 OD 值绘制标准曲线,采用四参数逻辑回归模型 (Four-Parameter Logistic, 4PL) 拟合,计算样本中各肿瘤标志物的浓度。每个样本重复检测 1 次,取平均值。

5 肠道微生物组分析

5.1 DNA 提取 使用 Qiagen QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit 试剂盒提取粪便样本 DNA。提取的 DNA 质量通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, DNA 浓度和纯度使用 NanoDrop 2000 分光光度计测定,要求 OD_{260/280} 比值在 1.8 至 2.0 之间,浓度不低于 20 ng/ μ L。

5.2 16S rRNA 基因测序 针对细菌 16S rRNA 基因的 V3-V4 高变区,采用 PCR 对提取的 DNA 进行扩增。PCR 反应体系 25 μ L,包括 2.5 μ L 10 \times 缓冲液、2 μ L dNTPs (2.5 mmol/L)、1 μ L 正反向引物 (10 μ mol/L)、0.25 μ L 高保真 Taq 酶、1 μ L 模板 DNA 和适量超纯水。反应条件为:98 $^{\circ}$ C 预变性 3 min,随后进行 30 个循环 (98 $^{\circ}$ C 变性 30 s,55 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s),最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。每个样本进行 3 次技术重复。PCR 产物通过 2% 琼脂糖凝胶电泳检测,目标片段大小约为 465 bp。将重复的 PCR 产物混合后,使用 AMPure XP 磁珠纯化,去除引物二聚体和小分子杂质。纯化后的产物使用 Qubit 2.0 荧光计进行定量,根据浓度等量混合,构建测序文库。文库质量经

Agilent 2100 生物分析仪检测。测序在 Illumina MiSeq 平台上进行,采用 MiSeq Reagent Kit v3 试剂盒,进行 2 \times 300 bp 的双端测序。

5.3 测序数据分析 使用 Trimmomatic 软件去除接头序列和低质量读段,筛选质量值大于 20 的高质量序列。随后,利用 FLASH 软件将双端读长拼接成完整的标签序列 (Tags)。在 QIIME2 软件平台中,应用 DADA2 插件对序列进行去噪处理,识别并去除嵌合体,生成高精度的扩增子序列变异 (Amplicon Sequence Variants, ASVs)。将所得的 ASV 序列与 SILVA 138 数据库进行比对,采用朴素贝叶斯分类器 (Naive Bayes Classifier) 进行物种注释。按照 99% 的相似性阈值,将序列精确注释到属和种的分类水平。

6 统计学分析

所有数据分析使用 SPSS 22.0 和 R 4.0.3 进行。连续变量符合正态分布的数据组间比较采用独立样本 t 检验,不符合正态分布的数据组间比较采用非参数 Mann-Whitney U 检验。分类变量以频数和百分比表示,组间比较采用卡方检验。

对于肠道微生物组分析, α 多样性指数 (Chao1 指数、Shannon 指数、Simpson 指数) 用于评估物种丰富度和多样性,组间比较采用 Wilcoxon 秩和检验。 β 多样性分析基于 Bray-Curtis 距离矩阵,采用主坐标分析 (Principal Coordinates Analysis, PCoA) 和非度量多维尺度分析 (Non-metric Multidimensional Scaling, NMDS) 进行可视化,使用 Adonis 检验 (Permutational Multivariate Analysis of Variance) 评估组间菌群结构差异的显著性。采用线性判别分析效应量 (Linear Discriminant Analysis Effect Size, LEfSe) 方法识别在病例组和对照组之间具有显著差异的菌群,线性判别分析 (LDA) 得分阈值设定为 2。

采用 Spearman 秩相关系数分析肿瘤标志物水平与肠道菌群相对丰度之间的相关性。为控制潜在的混杂因素,如年龄、性别、BMI 等,建立多元线性回归模型,评估肿瘤标志物与菌群特征之间的独立关联性。模型中肿瘤标志物水平作为因变量,肠道菌群相对丰度和协变量作为自变量。检验结果以偏回归系数 (β) 和 95% 置信区间 (95% CI) 表示。

所有统计检验均为双侧检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 一般资料

2 组受试者的人口学特征和临床参数见表 1。2 组受试者在性别、年龄、BMI、吸烟史、饮酒史以及饮食习惯等方面差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$)。病例

组患者的肿瘤分期按照 BCLC 分期系统进行评估: A 期 22 例(36.67%), B 期 18 例(30.00%), C 期 15 例(25.00%), D 期 5 例(8.33%)。肿瘤平均直径为 5.85 ± 2.47 cm, 单发肿瘤 43 例(71.67%), 多发肿瘤 17 例(28.33%)。在肝功能指标方面, 病例组的 ALT ($68.50 [45.00, 92.75]$ vs $22.00 [18.00, 26.75]$ U/L, $\chi^2 = -9.182$)、AST ($72.00 [50.25, 95.00]$ vs $24.50 [20.00, 28.75]$ U/L, $\chi^2 = -9.141$) 水平显著升高(均 $P < 0.001$), 而 Alb 水平显著低于对照组 (38.25 ± 4.12 vs 44.10 ± 3.85 g/L, $t = -8.524$, $P < 0.001$)。HBV 感染率在病例组为 66.67% (40/60), 显著高于对照组 5.00% (3/60) ($\chi^2 = 58.971$, $P < 0.001$)。

表 1 病例组与对照组一般特征比较
Table 1 Comparison of general characteristics between the Case group and the Control group

特征	病例组 (n=60)	对照组 (n=60)	t/ χ^2	P
性别(男性, n, %)	50(83.33%)	48(80.00%)	0.218	0.641
年龄(岁, Mean \pm SD)	55.20 \pm 9.45	54.35 \pm 8.88	0.520	0.604
BMI(kg/m ² , Mean \pm SD)	23.85 \pm 2.47	24.10 \pm 2.36	-0.593	0.554
吸烟史(是, n, %)	28(46.67%)	24(40.00%)	0.529	0.467
饮酒史(是, n, %)	31(51.67%)	28(46.67%)	0.277	0.599
HBV 感染(是, n, %)	40(66.67%)	3(5.00%)	58.971	<0.001
ALT (U/L, Median [IQR])	68.50 [45.00, 92.75]	22.00 [18.00, 26.75]	-9.182	<0.001
AST (U/L, Median [IQR])	72.00 [50.25, 95.00]	24.50 [20.00, 28.75]	-9.141	<0.001
Alb (g/L, Mean \pm SD)	38.25 \pm 4.12	44.10 \pm 3.85	-8.524	<0.001

2 肿瘤标志物水平比较

病例组患者的 AFP 水平显著高于对照组 (125.35 ± 45.20 ng/mL vs 7.25 ± 2.15 ng/mL, $t = 18.652$, $P < 0.001$)。AFP-L3 水平同样显著高于对照组 (12.50 ± 4.26 % vs 1.81 ± 0.93 %, $t = 17.145$, $P < 0.001$)。DCP 水平在病例组为 $945.50 [720.25, 1180.75]$ mAU/mL, 对照组为 $28.50 [22.00, 35.75]$ mAU/mL, 差异具有统计学意义 ($Z = -9.182$, $P < 0.001$)。GPC3 水平在病例组和对照组分别为 58.25 ± 15.75 ng/mL 和 5.20 ± 1.85 ng/mL, 差异有统计学意义 ($Z = 23.254$, $P < 0.001$)。病例组的 TF 水平显著高于对照组 (310.50 ± 50.75 mg/dL vs 240.25 ± 35.80 mg/dL, $t = 8.452$, $P < 0.001$)。见表 2。

3 16s rRNA 测序数据情况

对 2 组受试者的粪便样本进行高通量 16S rRNA 基因测序, 共获得原始序列读数 (Raw Reads) 9 623 492 条。经过质量控制、去除接头序列和低质量读段后, 获得高质量的清洁序列 (Clean Reads) 8 760 721 条, 平均序列长度为 450 bp。利用 DADA2 算法进行去噪和嵌合体去除, 最终获得 11 505 个高精

度的扩增子序列变异 (ASVs)。在所有样本中, 相对丰度排名前 5 的细菌门为厚壁菌门 (*Firmicutes*)、拟杆菌门 (*Bacteroidetes*)、放线菌门 (*Actinobacteria*)、变形菌门 (*Proteobacteria*) 和疣微菌门 (*Verrucomicrobia*), 其相对丰度分别为 40.5%、35.2%、10.8%、8.7% 和 2.5%。与对照组相比, 病例组中厚壁菌门的相对丰度显著降低 ($P = 0.032$), 而变形菌门的相对丰度显著升高 ($P = 0.021$)。

表 2 病例组与对照组肿瘤标志物水平比较
Table 2 Comparison of tumor marker levels between HCC group and Control group

肿瘤标志物	病例组 (n=60)	对照组 (n=60)	统计值	P
AFP(ng/mL)	125.35 \pm 45.20	7.25 \pm 2.15	$t = 18.652$	<0.001
AFP-L3(%)	12.50 \pm 4.26	1.81 \pm 0.93	$t = 17.145$	<0.001
DCP(mAU/mL)	945.50 [720.25, 1180.75]	28.50 [22.00, 35.75]	$Z = -9.182$	<0.001
GPC3(ng/mL)	58.25 \pm 15.75	5.20 \pm 1.85	$t = 23.254$	<0.001
TF(mg/dL)	310.50 \pm 50.75	240.25 \pm 35.80	$t = 8.452$	<0.001

4 肠道微生物群 α 多样性分析

病例组的 Chao1 指数显著低于对照组 (320.45 ± 35.28 vs 350.62 ± 30.15 , $t = -5.117$, $P < 0.001$), 提示病例组的物种丰富度降低。病例组的 Shannon 指数与对照组相比也显著减少 (3.85 ± 0.42 vs 4.20 ± 0.38 , $t = -5.020$, $P < 0.001$), 表明病例组的物种多样性显著降低。Simpson 指数在病例组略低于对照组 (0.918 ± 0.025 vs 0.940 ± 0.022) 为, 差异有统计学意义 ($t = -5.107$, $P < 0.001$), 进一步证实了病例组肠道菌群多样性的下降。

5 肠道微生物群 β 多样性分析

5.1 主坐标分析 (PCoA) 结果 基于 Bray-Curtis 距离矩阵, 病例组和对照组的肠道微生物群进行主坐标分析 (Principal Coordinates Analysis, PCoA) 的结果表明, PCoA 的前 2 个主坐标轴 (PC1 和 PC2) 累计解释了样本间总变异的 42.5% (PC1: 28.32%, PC2: 14.25%)。图 1 示病例组样本与对照组样本在 PC1 和 PC2 轴上显示出明显的分离, 表明 2 组肠道菌群结构存在显著差异。

5.2 非度量多维尺度分析 (NMDS) 结果 采用 NMDS 对 2 组样本的菌群结构进行可视化的结果见图 1。NMDS 分析的应力值 (Stress) 为 0.089, 低于 0.1, 表明模型拟合良好。病例组样本和对照组样本分别聚集成群, 并在空间上明显分离, 进一步支持了两组菌群结构的差异。

5.3 组间菌群结构差异的统计学检验 采用 Adonis 检验 (Permutational Multivariate Analysis of Variance) 和 ANOSIM 检验 (Analysis of Similarities)

定量评估病例组与对照组之间肠道菌群结构的差异。结果显示, Adonis 检验的 R^2 值为 0.152, $P=0.001$, 表明组间差异显著。ANOSIM 检验的 R 值为 0.638, $P=0.001$, 同样支持组间菌群结构存在显著差异。

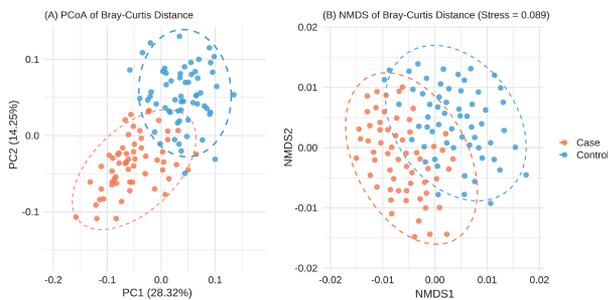


图 1 (A) 基于 Bray-Curtis 距离的主坐标分析 (PCoA); (B) 基于 Bray-Curtis 距离的非度量多维尺度分析 (NMDS)
Fig. 1 (A) Principal coordinates analysis (PCoA) based on Bray-Curtis distance; (B) Non-metric multidimensional scaling (NMDS) based on Bray-Curtis distance

6 肠道菌群组成差异分析

6.1 各分类水平的相对丰度比较 在门水平, 主要细菌门的相对丰度见表 3。2 组共同的主要细菌门为厚壁菌门 (*Firmicutes*)、拟杆菌门 (*Bacteroidetes*)、变形菌门 (*Proteobacteria*) 和放线菌门 (*Actinobacteria*)。病例组中, 变形菌门的相对丰度显著升高 (18.5% vs. 8.7%, $P<0.001$), 而厚壁菌门的相对丰度显著降低 (32.0% vs. 40.5%, $t=-8.029$, $P=0.005$)。病例组的拟杆菌门相对丰度略有降低 (33.0% vs. 35.2%), 但差异无统计学意义 ($t=-1.725$, $P=0.087$)。

表 3 HCC 病例组与对照组主要细菌门的相对丰度比较 (%)
Table 3 Comparison of relative abundance of major bacterial phyla between HCC case group and control group (%)

细菌门	病例组 (n=60)	对照组 (n=60)	t	P
厚壁菌门	32.0±5.5	40.5±6.0	-8.029	0.005
拟杆菌门	33.0±4.2	35.2±4.8	-1.725	0.087
变形菌门	18.5±3.8	8.7±2.5	15.256	<0.001
放线菌门	10.2±2.0	10.8±1.8	-1.740	0.084
疣微菌门	2.8±0.5	2.5±0.4	3.526	0.062

在属水平, 相比于对照组, HCC 病例组中大肠埃希菌属 (*Escherichia/Shigella*)、肠杆菌属 (*Enterobacter*) 和肠球菌属 (*Enterococcus*) 的相对丰度显著升高 (均 $P<0.05$, 见表 4)。此外, 拟杆菌属 (*Bacteroides*)、毛螺菌属 (*Faecalibacterium*) 和双歧杆菌属 (*Bifidobacterium*) 等益生菌属在病例组中相对丰度显著降低 (均 $P<0.05$, 见表 4)。

6.2 差异菌群的识别 (LEfSe 分析) 采用 LEfSe 差异分析进一步识别 2 组间具有显著差异的菌群, 线性判别分析 (LDA) 得分阈值设定为 2.0。结果显示 (图 2), 共有 16 个分类单元在病例组和对照组之间存在显

著差异 ($LDA>2.0$, 均 $P<0.05$), 其中病例组富集的菌群包括变形菌门 (主要包括大肠埃希菌属、肠杆菌属和肠球菌属)、韦荣球菌属 (*Veillonella*) 和链球菌属 (*Streptococcus*)。对照组富集的菌群包括厚壁菌门 (主要包括毛螺菌属、鲁氏菌属和粪杆菌属)、拟杆菌门 (主要包括拟杆菌属和普雷沃菌属) 和歧杆菌属。

表 4 病例组与对照组主要菌属的相对丰度比较 (%)
Table 4 Comparison of relative abundance of main bacterial genera between case group and control group (%)

菌属	病例组 (n=60)	对照组 (n=60)	t	P
大肠埃希菌属	12.5±2.2	4.0±1.0	23.281	<0.001
肠杆菌属	5.8±1.5	2.0±0.8	15.691	<0.001
肠球菌属	4.5±1.2	1.5±0.7	16.881	<0.001
拟杆菌属	18.0±3.5	22.5±4.0	-6.565	<0.001
毛螺菌属	3.2±1.0	6.5±1.5	-14.043	<0.001
双歧杆菌属	2.0±0.7	4.5±1.2	-13.811	<0.001

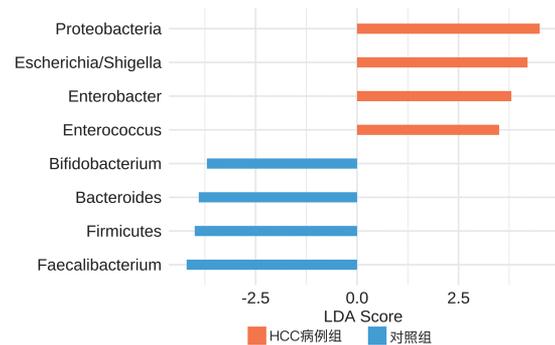


图 2 LEfSe 分析识别的差异菌群 ($LDA>2.0$, $P<0.05$)
Fig. 2 Differential bacterial communities identified by LEfSe analysis ($LDA>2.0$, $P<0.05$)

6.3 差异菌群在 2 组间的分布特征 采用进一步分析发现, 病例组肠道菌群中致病性或条件致病性菌群的相对丰度显著升高 (图 3), 大肠埃希菌属 (包含多种致病性大肠埃希菌, 可能导致内毒素水平升高, 诱发慢性炎症, 有助于肝癌的发生发展)、肠杆菌属 (与肠道黏膜屏障功能受损有关, 可能促进炎症反应和肿瘤形成)。相反, 病例组中一些益生菌属的相对丰度显著降低, 如毛螺菌属 (具有抗炎作用, 其减少可能导致肠道炎症加重)、双歧杆菌属 (参与维持肠道微生态平衡, 其减少可能破坏肠道屏障功能)。这些结果表明, 肝癌患者的肠道菌群发生了失调, 表现为有益菌减少和有害菌增多。这种微生物群的变化可能通过影响机体代谢、免疫和炎症反应, 参与肝癌的发生和进展。

7 肿瘤标志物水平与肠道菌群的相关性分析

7.1 Spearman 相关性分析 为探讨肿瘤标志物水平与肠道菌群相对丰度之间的关联, 采用 Spearman 秩相关分析对病例组 ($n=60$) 的肿瘤标志物水平与前述差异显著的菌属相对丰度进行分析。结果显示, 肿瘤标志物 AFP、AFP_L3、DCP、GPC3 和 TF (TF) 水平与

特定菌属的相对丰度存在显著相关性。肝细胞癌患者的肿瘤标志物水平与特定菌属的相对丰度存在显著相关性。其中,AFP水平与大肠埃希菌属($\rho=0.582, P<0.001$)、肠杆菌属($\rho=0.540, P<0.001$)、肠球菌属($\rho=0.512, P<0.001$)呈显著正相关,与拟杆菌属($\rho=-0.568, P<0.001$)、毛螺菌属($\rho=-0.590, P<0.001$)、双歧杆菌属($\rho=-0.555, P<0.001$)呈显著负相关。其他肿瘤标志物与上述菌属的关系也表现出类似的趋势(表5)。

7.2 多元回归分析 多元线性回归分析结果见表6和表7,在调整了年龄、性别、BMI等混杂因素后,大肠埃希菌属相对丰度的增加仍然与AFP水平的升高显著相关($\beta=0.425, P<0.001$),拟杆菌属相对丰度的降低与AFP水平的升高显著相关($\beta=-0.395, P<0.001$)。类似地,肠杆菌属相对丰度的增加与AFP_L3水平的升高显著相关($\beta=0.380, P<0.001$),毛螺菌属相对丰度的降低与AFP_L3水平的升高显著相关($\beta=-0.358, P<0.001$)。

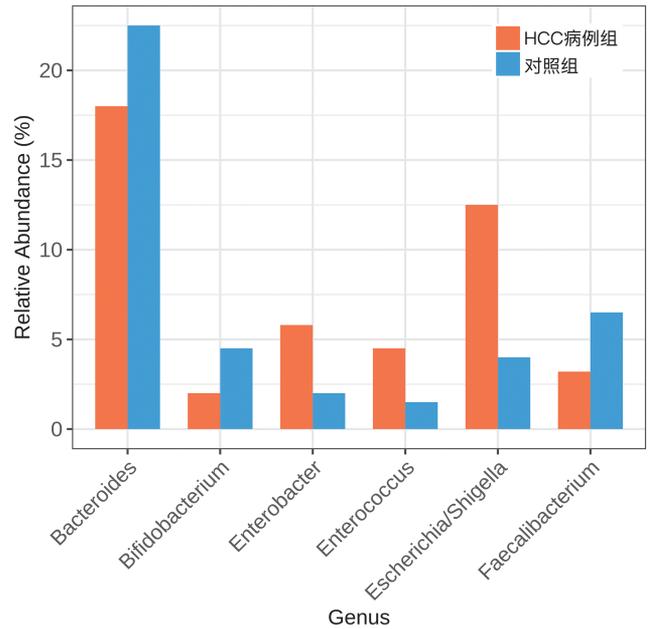


图3 差异菌属在病例组和对照组中的相对丰度分布
Fig.3 Relative abundance distribution of different bacterial genera in the case group and the control group

表5 肿瘤标志物水平与差异菌属相对丰度的Spearman相关性分析
Table 5 Spearman correlation analysis between tumor marker levels and relative abundance of differential bacterial genera

肿瘤标志物	大肠埃希菌属		肠杆菌属		肠球菌属		拟杆菌属		毛螺菌属		双歧杆菌属	
	ρ	P										
AFP	0.582	<0.001	0.540	<0.001	0.512	<0.001	-0.568	<0.001	-0.590	<0.001	-0.555	<0.001
AFP_L3	0.465	<0.001	0.432	0.001	0.408	0.002	-0.475	<0.001	-0.498	<0.001	-0.470	<0.001
DCP	0.438	0.001	0.405	0.002	0.382	0.003	-0.450	<0.001	-0.472	<0.001	-0.445	<0.001
GPC3	0.410	0.002	0.388	0.003	0.360	0.005	-0.428	0.001	-0.450	<0.001	-0.425	0.001
TF	0.498	<0.001	0.465	<0.001	0.438	0.001	-0.475	<0.001	-0.495	<0.001	-0.470	<0.001

表6 AFP水平与菌属相对丰度的多元线性回归分析
Table 6 Multiple linear regression analysis of AFP levels and relative abundance of bacterial genus

自变量	β	95% CI	P
大肠埃希菌属	0.425	0.275~0.575	<0.001*
拟杆菌属	-0.395	-0.545~-0.245	<0.001*
年龄	0.015	-0.085~0.115	0.768
性别	-0.028	-0.285~0.229	0.827
BMI	0.022	-0.088~0.132	0.694

表7 AFP_L3水平与菌属相对丰度的多元线性回归分析
Table 7 Multiple linear regression analysis of AFP_L3 levels and relative abundance of bacterial genus

自变量	β	95% CI	P
肠杆菌属	0.380	0.230~0.530	<0.001*
毛螺菌属	-0.358	-0.508~-0.208	<0.001*
年龄	0.018	-0.082~0.118	0.722
性别	-0.031	-0.288~0.226	0.806
BMI	0.025	-0.085~0.135	0.659

讨论

肝细胞癌是全球主要的癌症死亡原因之一,其发病机制复杂,早期诊断和治疗仍然具有挑战性。近年

来,肠道微生物组在HCC的发生发展中的作用受到越来越多的关注。研究表明,肠道菌群失调与HCC的发生、进展和治疗反应密切相关,但关于肠道微生物组与HCC肿瘤标志物之间关系的研究仍然有限。本次研究探讨了HCC患者肠道微生物组的特征,并分析了其与多种肿瘤标志物水平的关联性。

本研究通过对肝细胞癌患者和健康对照者的肠道微生物组进行高通量测序,并检测多种血清肿瘤标志物水平,探讨了肝细胞癌患者肠道菌群失调的特点及其与肿瘤标志物的关联性。我们的研究结果显示,肝细胞癌患者的肠道微生物多样性显著降低,菌群组成发生了明显的变化,特别是益生菌属减少和致病菌属增多。同时,肿瘤标志物水平与特定菌群的相对丰度存在显著相关性。本研究发现肝细胞癌患者的肠道菌群 α 多样性显著降低,Chao1指数($t=-5.117, P<0.001$)、Shannon指数($t=-5.020, P<0.001$)和Simpson指数($t=5.107, P<0.01$)均明显低于健康对照组。这表明肝细胞癌患者的肠道菌群在物种丰富度和多样性方面受到破坏。类似的结果在其他研究中

也有所报道,研究发现肝硬化和肝癌患者的肠道菌群多样性均有不同程度的降低^[9-11]。这种多样性的下降可能导致肠道生态平衡的破坏,进而影响肠道屏障功能和免疫调节^[12-14]。 β 多样性分析显示肝细胞癌患者的肠道菌群结构与健康对照者存在显著差异,病例组样本在 PCoA 和 NMDS 分析中与对照组呈明显分离 ($R^2=0.152, P=0.001$)。这表明肝细胞癌患者的菌群组成发生了系统性的改变。在门水平上,变形菌门 (Proteobacteria) 的相对丰度在病例组中显著升高 ($t=15.265, P<0.001$), 而厚壁菌门 (Firmicutes) 显著降低 ($t=-8.029, P<0.001$)。这一结果与既往研究一致,其在肝癌患者中也观察到了变形菌门的富集^[15-16]。变形菌门的增加常被认为是肠道菌群失调和炎症状态的标志^[17-18],可能通过其产生的内毒素 (lipopolysaccharide, LPS) 激活炎症反应,促进肿瘤发生^[19-20]。在属水平上,病例组中致病菌属如大肠埃希菌属 ($t=23.281, P<0.001$)、肠杆菌属 ($t=15.691, P<0.001$) 和肠球菌属 ($t=16.881, P<0.001$) 的相对丰度显著升高。这些菌属的增加可能导致肠道通透性增加,促进细菌产物进入门静脉循环,引发肝脏炎症和免疫反应^[21-22]。同时,益生菌属如拟杆菌属、毛螺菌属和双歧杆菌属在病例组中显著减少。这些益生菌在维持肠道屏障完整性、调节免疫响应和抗炎作用中发挥重要作用^[23-24]。其减少可能加重肠道微生态失衡,进一步促进肝癌的发生发展。另外,我们的研究表明,肿瘤标志物水平与特定菌属的相对丰度之间存在显著相关性。结果显示 AFP、AFP_L3 等肿瘤标志物水平与大肠埃希菌属 ($\rho=0.582, P<0.001$)、肠杆菌属 ($\rho=0.540, P<0.001$)、肠球菌属 ($\rho=0.512, P<0.001$) 等致病菌属呈正相关,与拟杆菌属 ($\rho=-0.568, P<0.001$)、毛螺菌属 ($\rho=-0.590, P<0.001$)、双歧杆菌属 ($\rho=-0.555, P<0.001$) 等益生菌属呈负相关,表明肠道菌群的变化可能影响肿瘤标志物的表达,反映了菌群失调与肿瘤进展之间的联系。一些研究表明,致病菌属的增加可促进炎症因子和致癌物质的产生,激活信号通路,促进肿瘤细胞的增殖和侵袭^[25-26]。而益生菌属的减少可能削弱对有害菌的抑制作用,降低抗肿瘤免疫功能^[27-28]。

本次研究的结果支持了“肠-肝轴”在肝细胞癌发生发展中的作用机制,肠道菌群失调导致肠黏膜屏障功能受损,细菌及其产物易位至肝脏,激活 Kupffer 细胞和星状细胞,引发慢性炎症和纤维化,最终促进癌变^[29]。调节肠道菌群,恢复微生态平衡,可能成为肝细胞癌防治的新策略。既往研究已报道益生元、益生菌或粪菌移植等干预手段已在一些研究中展现出潜力^[30-31]。我们此次研究的局限性为样本代表性有限,

需在更大规模、多中心的研究中验证。同时,肠道菌群的变化可能受多种因素影响,如饮食、药物、生活方式等,虽然在纳入标准中进行了控制,但仍可能存在潜在的混杂因素。此外,本研究为横断面研究,无法确定菌群变化与肿瘤发生之间的因果关系,需进一步开展纵向研究和机制研究予以证实。

【参考文献】

- [1] Vogel A, Meyer T, Sapisochin G, et al. Hepatocellular carcinoma [J]. *Lancet*, 2022, 400(10360):1345-1362.
- [2] Brown ZJ, Tsilimigras DI, Ruff SM, et al. Management of hepatocellular carcinoma: A review [J]. *JAMA Surg*, 2023, 158(4):410-420.
- [3] Lee TK, Guan XY, Ma S. Cancer stem cells in hepatocellular carcinoma-from origin to clinical implications [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2022, 19(1):26-44.
- [4] Cheng K, Cai N, Zhu J, et al. Tumor-associated macrophages in liver cancer: From mechanisms to therapy [J]. *Cancer Commun (Lond)*, 2022, 42(11):1112-1140.
- [5] 卢宏全, 时彩艳, 林明利, 等. 二乙基亚硝胺诱导的大鼠肝癌前期病变肠道微生物组-短链脂肪酸代谢途径的动态变化及益生菌干预效应[J]. *中国病原生物学杂志*, 2024, 19(7):761-767.
- [6] Liu S, Yang X. Intestinal flora plays a role in the progression of hepatitis-cirrhosis-liver cancer [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2023, 13(1):1140126.
- [7] Maslennikov R, Poluektova E, Zolnikova O, et al. Gut microbiota and bacterial translocation in the pathogenesis of liver fibrosis [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(22):16502.
- [8] 吕昌富. 宏基因组筛选 HAIC 联合靶向免疫治疗肝癌患者肠道菌群的研究[D]. 广东医科大学, 2024.
- [9] Hu C, Xu B, Wang X, et al. Gut microbiota-derived short-chain fatty acids regulate group 3 innate lymphoid cells in HCC [J]. *Hepatology*, 2023, 77(1):48-64.
- [10] Eom JA, Jeong JJ, Han SH, et al. Gut-microbiota prompt activation of natural killer cell on alcoholic liver disease [J]. *Gut Microbes*, 2023, 15(2):2281014.
- [11] 任宏涛, 王玉婷, 尹佳锋, 等. 原发性肝癌根治术联合 TACE 术后肠道菌群变化特征观察[J]. *肝脏*, 2023, 28(12):1450-1454.
- [12] Lee PC, Wu CJ, Hung YW, et al. Gut microbiota and metabolites associate with outcomes of immune checkpoint inhibitor-treated unresectable hepatocellular carcinoma [J]. *J Immunother Cancer*, 2022, 10(6):e004779.
- [13] Rajapakse J, Khatiwada S, Akon AC, et al. Unveiling the complex relationship between gut microbiota and liver cancer: opportunities for novel therapeutic interventions [J]. *Gut Microbes*, 2023, 15(2):2240031.
- [14] Shen Y, Wu SD, Chen Y, et al. Alterations in gut microbiome and metabolomics in chronic hepatitis B infection-associated liver disease and their impact on peripheral immune response [J]. *Gut Microbes*, 2023, 15(1):2155018.
- [15] Chen P, Wang Y, Zhu X, et al. siRNA-HIF-1 α delivered by attenuated *Salmonella* enhances the efficacy of Lenvatinib against hepatocellular carcinoma [J]. *Int Immunopharmacol*, 2024, 130(1):111728.

- homocysteine concentrations with a 10-year risk of all-cause and cardiovascular mortality in a community-based chinese population [J]. *Nutrients*,2024,16(12):1945.
- [16] 田英杰,吴广,王洪桂,等. 益生菌干预高脂血症研究的新进展 [J]. *中华高血压杂志*,2022,30(5):420-424.
- [17] Catena C,Colussi G,Nait F,et al. Elevated homocysteine levels are associated with the metabolic syndrome and cardiovascular events in hypertensive patients [J]. *Am J Hypertens*,2015,28(7):943-950.
- [18] Yuan W,Shao Y,Zhao D,et al. Correlation analysis of lipid accumulation index, triglyceride-glucose index and H-type hypertension and coronary artery disease [J]. *PeerJ*,2023,11:e16069.
- [19] Jia X,Xu W,Zhang L,et al. Impact of gut microbiota and microbiota-related metabolites on hyperlipidemia [J]. *Front Cell Infect Microbiol*,2021,11:634780.
- [20] Verhaar BJH,Prodan A,Nieuwdorp M,et al. Gut microbiota in hypertension and atherosclerosis: A review [J]. *Nutrients*,2020,12(10):2982.
- [21] Xu Z,Chen P,Wang L,et al. Relationship between TyG index and the degree of coronary artery lesions in patients with H-type hypertension [J]. *Cardiovasc Diabetol*,2024,23(1):23.
- [22] 马晓聪,熊兴江,莫毅,等. 基于16S rDNA测序技术的自发性高血压大鼠肠道菌群结构变化及中药干预作用[J]. *中华中医药学刊*,2020,38(8):71-74.
- [23] Chen Y,Liu W,Xue J,et al. Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of *Lactobacillus helveticus* strains from traditional fermented dairy foods and antihypertensive effect of fermented milk of strain H9 [J]. *J Dairy Sci*,2014,97(11):6680-6692.
- [24] Sun L,Liu J,He Z,et al. Plant-derived as alternatives to animal-derived bioactive peptides: A review of the preparation, bioactivities, structure-activity relationships, and applications in chronic diseases [J]. *Nutrients*,2024,16(19):3277.
- [25] Michael DR, Moss JW, Calvente DL, et al. *Lactobacillus plantarum* CUL66 can impact cholesterol homeostasis in Caco-2 enterocytes [J]. *Benef Microbes*,2016,7(3):443-451.
- [26] 崔嘉琪. 益生菌 Probio-X 辅助治疗老年高血压及调节其肠道菌群的研究[D]. 内蒙古医科大学,2023.
- [27] Wang J,Li C,Xue J,et al. Fermentation characteristics and angiotensin I-converting enzyme-inhibitory activity of *Lactobacillus helveticus* isolate H9 in cow milk, soy milk, and mare milk [J]. *J Dairy Sci*,2015,98(6):3655-3664.
- [28] Jiang J,Wu C,Zhang C,et al. Strain-specific effects of *Bifidobacterium longum* on hypercholesterolemic rats and potential mechanisms [J]. *Int J Mol Sci*,2021,22(3):1305.
- [29] Robles-Vera I,De LA Visitacion N,Toral M,et al. Probiotic *Bifidobacterium breve* prevents DOCA-salt hypertension [J]. *Faseb J*,2020,34(10):13626-13640.
- [30] Huang J,Huang J,Yin T,et al. *Enterococcus faecium* R0026 combined with *Bacillus subtilis* R0179 prevent obesity-associated hyperlipidemia and modulate gut microbiota in C57BL/6 mice [J]. *J Microbiol Biotechnol*,2021,31(2):181-188.

【收稿日期】 2024-11-21 【修回日期】 2025-02-10

(上接 427 页)

- [16] 郑微,赵鹏,张永宏,等. 宏基因组测序技术分析原发性肝癌患者肠道菌群特征[J]. *中华实验和临床感染病杂志(电子版)*,2021(3):149-157.
- [17] Zhao C,Hu X,Bao L,et al. Gut dysbiosis induces the development of mastitis through a reduction in host anti-inflammatory enzyme activity by endotoxemia [J]. *Microbiome*,2022,10(1):205.
- [18] Shen S,Ren F,Qin H,et al. *Lactobacillus acidophilus* NCFM and *Lactiplantibacillus plantarum* Lp-115 inhibit *Helicobacter pylori* colonization and gastric inflammation in a murine model [J]. *Front Cell Infect Microbiol*,2023,13(1):1196084.
- [19] Zhong W,Wu K,Long Z,et al. Gut dysbiosis promotes prostate cancer progression and docetaxel resistance via activating NF-kappaB-IL6-STAT3 axis [J]. *Microbiome*,2022,10(1):94.
- [20] Szczesna M,Huang Y,Lacoursiere RE,et al. Bacterial esterases reverse lipopolysaccharide ubiquitylation to block host immunity [J]. *Cell Host Microbe*,2024,32(6):913-924,e917.
- [21] Zhou C,Yang S,Ka W,et al. Association of gut microbiota with metabolism in rainbow trout under acute heat stress [J]. *Front Microbiol*,2022,13(1):846336.
- [22] Wang Y,Xiao J,Wei S,et al. Protective effect of zinc gluconate on intestinal mucosal barrier injury in antibiotics and LPS-induced mice [J]. *Front Microbiol*,2024,15(1):1407091.
- [23] Hashemi B,Abdollahi M,Abbaspour-Aghdam S,et al. The effect of probiotics on immune responses and their therapeutic application; A new treatment option for multiple sclerosis [J]. *Biomed Pharmacother*,2023,159(1):114195.
- [24] Mazziotta C,Tognon M,Martini F,et al. Probiotics mechanism of action on immune cells and beneficial effects on human health [J]. *Cells*,2023,12(1):184.
- [25] You M,Xie Z,Zhang N,et al. Signaling pathways in cancer metabolism: mechanisms and therapeutic targets [J]. *Signal Transduct Target Ther*,2023,8(1):196.
- [26] Zhao H,Wu L,Yan G,et al. Inflammation and tumor progression: signaling pathways and targeted intervention [J]. *Signal Transduct Target Ther*,2021,6(1):263.
- [27] Zhao J,Liao Y,Wei C,et al. Potential Ability of Probiotics in the Prevention and Treatment of Colorectal Cancer [J]. *Clin Med Insights Oncol*,2023,17(1):11795549231188225.
- [28] Jiang S, Ma W, Ma C, et al. An emerging strategy: probiotics enhance the effectiveness of tumor immunotherapy via mediating the gut microbiome [J]. *Gut Microbes*,2024,16(1):2341717.
- [29] Chen D,Le TH,Shahidipour H,et al. The role of gut-derived microbial antigens on liver fibrosis initiation and progression [J]. *Cells*,2019,8(11):1324.
- [30] Porcari S,Benech N,Valles-Colomer M,et al. Key determinants of success in fecal microbiota transplantation: From microbiome to clinic [J]. *Cell Host Microbe*,2023,31(5):712-733.
- [31] Routy B,Lenahan JG,Miller WH,et al. Fecal microbiota transplantation plus anti-PD-1 immunotherapy in advanced melanoma: a phase I trial [J]. *Nat Med*,2023,29(8):2121-2132.

【收稿日期】 2024-11-06 【修回日期】 2025-01-30