

胆道结石、肿瘤与微生物关系的研究进展

李 丹¹, 刘鹏飞^{1*}, 石 林¹, 牛 浪²

¹延安大学附属医院消化内科, 陕西 延安

²延安市人民医院肝胆外科, 陕西 延安

Email: *464027645@qq.com

收稿日期: 2021年2月8日; 录用日期: 2021年2月28日; 发布日期: 2021年3月9日

摘 要

胆道疾病临床中多见, 近年来随着宏基因组测序、扩增子测序、高通量测序等技术的应用, 对胆道微生物领域的研究逐步增多, 微生物与胆道疾病的关系正在被人们揭开。大量文献证实胆道结石与肿瘤的发生机制与微生物有关, 胆道结石与肿瘤的微生物菌群也存在差异。本文简要阐述了胆道结石与肿瘤与微生物关系的研究进展。

关键词

胆道微生物, 16S rRNA, 胆道结石, 胆道癌

Research Progress on the Relationship between Biliary Calculi, Tumor and Microorganism

Dan Li¹, Pengfei Liu^{1*}, Lin Shi¹, Lang Niu²

¹Gastroenterology Department, Yan'an University Affiliated Hospital, Yan'an Shaanxi

²Hepatobiliary Surgery Department, Yan'an People's Hospital, Yan'an Shaanxi

Email: *464027645@qq.com

Received: Feb. 8th, 2021; accepted: Feb. 28th, 2021; published: Mar. 9th, 2021

Abstract

Biliary tract diseases are common in clinical practice. In recent years, with the application of me-

*通讯作者。

文章引用: 李丹, 刘鹏飞, 石林, 牛浪. 胆道结石、肿瘤与微生物关系的研究进展[J]. 临床医学进展, 2021, 11(3): 912-917. DOI: 10.12677/acm.2021.113131

tagenomic sequencing, amplicon sequencing, high-throughput sequencing and other technologies, research in the field of biliary microbes has gradually increased, and the relationship between microbes and biliary diseases is being revealed. A large number of documents confirm that the pathogenesis of biliary stones and tumors is related to microorganisms. There are also differences in the microbial flora of biliary stones and tumors. This article briefly describes the research progress of the relationship between biliary stones, tumors and microorganisms.

Keywords

Biliary Microorganism, 16S rRNA, Biliary Stones, Biliary Cancer

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

胆道疾病是常见的消化系统疾病，主要包括胆结石、胆囊息肉、胆囊癌和胆管癌等。一般来说胆汁是富含脂质的无菌的溶液，是由肝脏产生的，但是在一些健康人体内发现了胆汁中有细菌定殖，由于胆汁流量是正常的，这些人没有临床症状。由于肿瘤、结石或增加胆道内压力的寄生虫阻碍胆汁的正常排泄，细菌可通过逆行侵入途径、或者通过血液和淋巴系统入侵进行增殖。此外，某些干预措施，如手术或内窥镜操作，可能对人类防御机制产生负面影响，使细菌移位进入循环，引起感染，可能导致严重脓毒症和脓毒症休克，甚至多器官功能障碍综合征，最终死亡[1]。然而临床中胆汁培养需要时间，且阳性率较低，微生物还表现出区域和时间的变化，因此关于胆道微生物区系的数据还不充分，大部分研究都是在几十年前进行的。近年来随着宏基因组测序、扩增子测序等高通量测序等技术的应用，关于胆道系统微生物作用的研究逐步增多。现有关的文献表明，胆道系统疾病与微生物菌群之间存在广泛的联系，其中胆道结石与胆道肿瘤之间微生物种类也存在明显差异，本文就胆管结石、胆管肿瘤与微生物的关系进行综述。

2. 胆道结石

胆结石是一种结晶性结石，主要由胆固醇、脂肪酸、糖蛋白和胆红素、磷酸盐、碳酸盐和棕榈酸钙组成，位于胆囊或胆道内[2]。目前已被报道在胆结石的形成中起重要作用的主要有：遗传和环境因素的相互作用，如致石基因、胆固醇和或胆红素分泌过多、胆汁淤滞、肠道因素、代谢因素、饮食因素、药物等[3]。尚有研究表明胆结石发病机制与胆汁细菌有关，但对其组成和来源缺乏详细的了解，此外，胆汁环境通常对大多数细菌怀有敌意。但胆汁环境对胆汁细菌的影响尚不清楚[4]。

很长一段时间，胆汁的生物被认为是无菌的，但是最近，通过 16S rRNA 基因分析证实了在人类完整的胆汁中存在可以改变胆道和胆囊的微生物群，这些微生物与胆道疾病密切相关[5]。颜学波等对原发性硬化性胆管炎患者与胆道梗阻患者进行 16S rRNA 测序研究表明，原发性硬化性胆管炎以上消化道和胆管的微生物群改变为特征；且胆道菌群失调与具有促炎及潜在致癌作用的牛磺胆酸浓度增加有关[6]。还有研究表明胆汁的微生物群与唾液的细菌组成有关，胆道的微生物群与十二指肠的微生物群有高度的相似性[7]。Ye F 等用 16S rRNA 扩增序列分对 6 例胆总管结石患者的胆道、十二指肠、胃和口腔的细菌群落进行比较，发现所有观察到的胆汁细菌都可以在上消化道检测到，胆汁微生物区系与十二指肠微生物

物区系的相似性相对较高, 研究结果支持了胆道细菌起源于肠道细菌逆行感染的假设。此外通过胆道微生物群相对于上消化道微生物群的不同改变揭示了胆道环境对胆道细菌组成的影响, 结果表明胆道微生物多样性较低, 虽然大多数已鉴定的细菌在胆汁中的数量大大减少, 但胆汁中仍含有 3 个肠杆菌科细菌属(大肠杆菌、克雷伯氏菌和一个未分类属)和金字塔杆菌, 他们还评估了所有采样点的预测功能特征, 分析表明胆汁细菌的环境信息处理能力和细胞运动能力增强, 可能是胆道系统对常驻细菌功能的影响[4]。微生物种属中大肠杆菌是从胆道疾病患者的胆汁中分离到的最常见的菌种。Razaghi M 等对 102 例胆道疾病患者行内窥镜逆行胰胆管造影术, 对 *stx1*、*stx2*、*exhA*、*eae*、*bfp*、*agg*、*pcvd432*、*lt*、*st*、*ipah*、*picc*、*pET*、*ast*、*set*、*sen* 和 *cdtB* 基因的引物进行 PCR 扩增, 检测大肠埃希菌特征菌株对脱氧胆酸钠和 19 种抗生素的耐药性。研究的结果表明, 大肠杆菌的定植与胆总管结石之间存在显著的相关性, 这些菌株毒力基因组合的异常存在及其对多种抗生素的耐药性可能是它们在这种恶劣的微环境中持续存在的可能原因[8]。Shen HZ 等人采用 WMS 和 16S rRNA 测序方法对胆总管结石患者的胆管标本进行测序, 这些患者的微生物群落被分为两类: 第一类是以肠道和口腔/呼吸道为特征的微生物群落, 第二类是以口腔/呼吸道为特征的微生物群落。由于胆道与小肠直接相连, 一般认为胆道感染源于肠道细菌的逆行性感染, 但意外的是他们观察到胆汁样本中口腔/呼吸道的微生物群落比肠道微生物群落更普遍。因此, 除了肠道细菌外, 来自口腔/呼吸道的细菌可能与人类胆道感染有关。另一方面, 与健康个体的粪便样本相比, 胆汁微生物群落的样本多样性降低, 而参与炎症、氧化应激反应、鞭毛组装和膜转运的途径丰度水平升高[9]。另外, 幽门螺杆菌也有助于胆固醇结石的形成, 某些种类的幽门螺杆菌, 包括 *H.bilis* 和 *H.liver*, 栖息于肠内并侵入胆管和肝脏, 在日本和中国的研究中, 已经证实幽门螺杆菌的存在与胆结石呈正相关, 根除幽门螺杆菌甚至可以预防胆结石, 且已经注意到, 胆道结石经常出现在眼胸虫病的流行区域: 结石中可见虫卵的存在[3]。

3. 胆道肿瘤

胆道癌或肝外胆管癌包括胆管、胆囊和壶腹的肿瘤, 是西方国家胃肠道恶性病变的第 6 大原因, 胆道癌通常在晚期诊断, 对放疗和化疗敏感性较低, 预后很差, 在过去的十年里, 这些病人的诊断和治疗方法已经开始改变, 但胰胆系统恶性肿瘤的生存率仍然很低[10]。

3.1. 胆道癌的发病机制

胆道癌的发病机制包括遗传背景和环境因素作用, 但癌症的发生机制尚不清楚, 目前认为可能与胃肠癌的发展相似, 从增生到上皮化生、异型增生和腺癌。在日本、泰国和墨西哥胆红素被认为与胆道和胆囊癌有关, 而亚洲一些地区寄生虫感染也被认为是主要危险因素。21 世纪以来, 科学家们开始假设细菌感染引起的慢性炎症可能导致癌变, 其中细菌毒素和由慢性细菌感染产生的次生代谢产物可能导致癌变, 并描述了胆管癌发生的一些机制。目前研究显示人类微生物菌群的变化与结肠癌、口腔癌和肺癌的发生有一定关系, 结直肠癌患者肠道菌群中拟杆菌、普氏菌和梭杆菌的数量增加, 而产生丁酸盐的细菌减少[11]。肠道微生物群落通过调节免疫和代谢过程, 在保护宿主免受病原微生物侵袭方面起着至关重要的作用, 作为对环境因素的反应, 微生物菌群的改变会改变定植细菌与上皮细胞或免疫细胞之间的许多信号, 导致炎症、上皮细胞增殖或粘液增多等改变, 其中一些变化会促进细胞转化或 DNA 损伤, 有发生癌前病变和癌症的风险, 且对胆道疾病的研究表明胆道的炎症环境是胆道癌发生发展的重要因素, 细菌感染引起的炎症也可能在胆道癌的发病机制中起重要作用[12]。尚有研究表明, 感染幽门螺杆菌可能会导致胆道癌, 就像幽门螺杆菌对胃癌的影响一样[11]。世界卫生组织的国际癌症研究机构将食源性肝吸虫、泰国肝吸虫和华支睾吸虫列为致癌物, 幽门螺杆菌感染同样也被归类为致癌物[13]。幽门螺杆菌是第一个

被证实引起胃疾病的原核生物,包括消化性溃疡、胃粘膜相关组织淋巴瘤和腺癌[14]。幽门螺杆菌可从胃转至十二指肠,通过十二指肠乳头和壶腹进入胆道,也可被肝吸虫引导,有报道在胆管肿瘤中发现了幽门螺杆菌特异性的 DNA 序列,在眼胸虫病流行区域也发现了诊断为胆囊炎/胆结石的病变,眼胸虫病和幽门螺杆菌同时定殖可能加速甚至协同胆管细胞恶性转化[15]。体外研究发现幽门螺旋杆菌对胆管癌细胞系有多种作用,包括炎症(IL-8 的产生)、细胞增殖和凋亡,即使在低多样性感染情况下,幽门螺杆菌也能诱导胆道细胞系的促炎细胞因子和细胞增殖反应,即使少量的杆菌就可能到达胆道,足以促进炎症和胆道上皮的转化[16]。Thanaphongdech P 等研究表明幽门螺杆菌定殖可引起上皮细胞到间质细胞的转化、细胞增殖、细胞迁移和侵袭反应,并可引起 H69 人胆管细胞系和 CC-LP-1 胆管癌细胞系细胞的伤口关闭,证明了感染可以导致胆管上皮恶变[16]。

肿瘤患者可能受到营养不良或恶病质的影响,使生活质量降低,对治疗的反应降低,发病率和死亡率增加,住院时间延长,术后并发症也可能影响胆道菌群。Di CP 等对 152 例胆胰系统疾病患者胆汁培养、治疗和存活率进行分析探讨胆汁微生物群在这些患者中的潜在临床影响,以及肠杆菌科是否与胆道肿瘤显著相关,结果表明主要培养细菌为大肠杆菌、肺炎克雷伯菌和绿脓杆菌,其对 3CGS、氨基糖苷类、喹诺酮类的耐药菌比例较高,认为胆汁史无前例的增加导致存活率下降,且在胆汁标本中分离到的某些菌株可能是肝胆系恶性肿瘤发生和(或)进展的危险因素之一[17]。

3.2. 胆道菌群

Chng 等人采用高通量 16S rRNA 测序,对有或没有 OpV 感染的患者的成对肿瘤和邻近非肿瘤新鲜/冷冻组织胆道微生物进行了分析。发现正常 OpV +ve 患者与正常 OpV -ve 患者的 Shannon 指数多样性显著增加($p = 0.026$),并且一个属在所有细菌属中显著富集。与正常组织相比,OpV -ve 患者肿瘤组织中可见狭营养单胞菌(狭营养单胞菌科)富集。OpV +ve 与 OpV -ve 组织比较,双歧杆菌、肠杆菌均有富集[18]。ChenB 等人从不同的范围,不包括肝吸虫患者,设计了一项胆道微生态研究。他们在标准内镜下逆行胆管造影术(ERCP)中收集胆汁样本,取出至少 5~10 mL 胆汁,这些胆汁样本用于扩增 16S rRNA 基因的可变区域 V3 和 V4,结果提示在胆管癌患者中,变形杆菌、纤毛杆菌、类杆菌和放线杆菌是胆汁中最主要的类群,也是胆总管结石发病的主要原因[19]。Avilez-Jimenez 等人在墨西哥胆管癌患者中寻找微生物群的差异。他们在内镜逆行胰胆管造影(ERCP)中,通过刷胆囊附近的胆总管或壶腹附近的胆总管进行 DNA 分析,然后,采用 PCR 法,筛选出肝螺杆菌和幽门螺杆菌阳性的患者。进行 16S rRNA 基因 V4 区扩增结果表明,变形菌门是胆道癌患者中最常见的门(平均 60.4%),在 4002 个鉴定出的 OTUs 中,涅斯捷连科氏菌等门有所减少,而嗜甲基菌科、梭杆菌属、普氏菌属、放线菌属、新鞘脂菌属、幽门螺旋杆菌等门增加[11]。

4. 胆道结石与肿瘤菌群差异

ChenB 等通过比较胆管癌、新发胆管结石和复发性胆管结石的患者,得到的结果是胆总管结石患者相比,远端胆管癌患者中双歧杆菌门、硝酸螺旋菌门、氯柔菌门、隐孢子菌门和浮霉状菌属门的数量明显增加,最后根据 252 个细菌属水平的测序结果,揭示了个体间的异质性,他们认为胆道核心微生物群的组成变化提示了微生物在胆道疾病具有潜在的生物学和医学意义[19]。还有研究结果表明,氧化还原依赖性的半胱氨酸修饰和胆汁液中的铁蛋白作用可能是肝外胆管癌的机制。一些与 PTM 相关的蛋白质和致癌途径如 p53 和 mTORC1 在胆管癌组织中也被发现,在胆汁中也得到了丰富,提示胆汁具有肝外胆管癌组织的致癌特征。因此,胆汁中的生物标志物可用于诊断胆道癌以及区分胆道癌和良性胆道疾病,而大肠杆菌、肠球菌、铜绿假单胞菌和肺炎 K.球菌是恶性和良性疾病患者中最常见的细菌[20]。张晓芬等

通过 16S rDNA 对胆道良恶性梗阻患者(胆管结石组 92 例,胆道肿瘤组 32 例)进行胆道菌群分析,结果表明胆管结石组与胆道肿瘤组胆道菌群在菌群多样性方面无显著差异,但物种差异分析方面发现两组存在明显差异的菌群,其中胆管结石组主要的特征菌群为: *Granulicatella* (颗粒链菌属)、*Neisseriaceae* (奈瑟氏球菌科)、*Carnobacteriaceae* (肉杆菌科)、*Erythrobacteraceae* (赤杆菌科)、*Bulleidia* (牛肝菌属)、*Hyphomicrobium* (生丝微菌属)、*Parvimonas* (单胞菌属)、*Filifactor* (产线菌属);胆道肿瘤组主要的特征菌群包括: *Lactobacillus* (乳酸杆菌属)、*Anaerovibrio* (厌氧弧菌属)、*Mitsuokella multacida* (多酸光冈菌种)、*Mitsuokella* (光冈菌属)、*Peptococcaceae* (消化球菌科)、*Bifidobacterium longum*、*Pasteurella pneumotropica* (嗜肺巴氏杆菌种) [21]。Alves JR 等对 30 例胆胰良恶性疾病患者的胆汁培养进行回顾性研究。对样本进行评估,以确定胆汁微生物区系,并寻找其与合并症、癌变和术后感染并发症的可能联系。结果证实大肠埃希菌和克雷伯氏菌多见于良性疾病,克雷伯氏菌和链球菌多见于癌症患者[22]。

5. 小结与展望

综上所述,近年来关于胆道结石、肿瘤与微生物的关系研究逐步增多,微生物与胆道结石及肿瘤的发生发展有关,但其机制仍不明确,研究胆道微生物与胆道疾病的作用及胆汁中微生物菌群差异可能为胆道结石与肿瘤的预防及治疗提供新的思路。

参考文献

- [1] Gu, X.X., Zhang, M.P., Zhao, Y.F., et al. (2020) Clinical and Microbiological Characteristics of Patients with Biliary Disease. *World Journal of Gastroenterology*, **26**, 1638-1646. <https://doi.org/10.3748/wjg.v26.i14.1638>
- [2] O'Connell, K. and Brasel, K. (2014) Bile Metabolism and Lithogenesis. *Surgical Clinics of North America*, **94**, 361-375. <https://doi.org/10.1016/j.suc.2014.01.004>
- [3] Grigor'eva, I.N. and Romanova, T.I. (2020) Gallstone Disease and Microbiome. *Microorganisms*, **8**, 835.
- [4] Ye, F.Q., Shen, H.Z., Li, Z., et al. (2016) Influence of the Biliary System on Biliary Bacteria Revealed by Bacterial Communities of the Human Biliary and Upper Digestive Tracts. *PLoS ONE*, **11**, e0150519. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150519>
- [5] Petrov, V.A., et al. (2020) Biliary Microbiota and Bile Acid Composition in Cholelithiasis. *BioMed Research International*, **2020**, Article ID: 1242364.
- [6] 颜学波, 孙永康, 唐才喜, 等. 原发性硬化性胆管炎中胆汁微生物菌群的变化[J]. 临床肝胆病杂志, 2020, 36(7): 1473.
- [7] Jo, I.H., Kim, Y.J., Chung, W.C., et al. (2020) Microbiology and Risk Factors for Gram-Positive Cocci bacteremia in Biliary Infections. *Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International*, **19**, 461-466. <https://doi.org/10.1016/j.hbpd.2020.05.006>
- [8] Razaghi, M., Tajeddin, E., Ganji, L., et al. (2017) Colonization, Resistance to Bile, and Virulence Properties of *Escherichia coli* Strains: Unusual Characteristics Associated with Biliary Tract Diseases. *Microbial Pathogenesis*, **111**, 262-268. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.08.043>
- [9] Shen, H.Z., Ye, F.Q., Xie, L., et al. (2015) Metagenomic Sequencing of Bile from Gallstone Patients to Identify Different Microbial Community Patterns and Novel Biliary Bacteria. *Scientific Reports*, **5**, Article ID: 17450. <https://doi.org/10.1038/srep17450>
- [10] Kwarada, Y., Yamagiwa, K. and Das, B.C. (2002) Analysis of the Relationships between Clinicopathologic Factors and Survival Time in Intrahepatic Cholangiocarcinoma. *The American Journal of Surgery*, **183**, 679-685. [https://doi.org/10.1016/S0002-9610\(02\)00853-X](https://doi.org/10.1016/S0002-9610(02)00853-X)
- [11] Avilés-Jiménez, F., Guitron, A., Segura-López, F., et al. (2016) Microbiota Studies in the Bile Duct Strongly Suggest a Role for *Helicobacter pylori* in Extrahepatic Cholangiocarcinoma. *Clinical Microbiology and Infection*, **22**, 178.e11-178.e22. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.10.008>
- [12] Wang, W.L., Xu, S.Y., Ren, Z.G., Tao, L., Jiang, J.W. and Zheng, S.S. (2015) Application of Metagenomics in the Human Gut Microbiome. *World Journal of Gastroenterology*, **21**, 803-814. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i3.803>
- [13] IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans (2012) Biological Agents. Volume 100 B. A Review of Human Carcinogens. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, **100**, 1-441.

-
- [14] Cover, T.L. (2016) *Helicobacter pylori* Diversity and Gastric Cancer Risk. *Mbio*, **7**, e01869-15. <https://doi.org/10.1128/mBio.01869-15>
- [15] Thanaphongdech, P., Karinshak, S.E., Ittiprasert, W., *et al.* (2020) *Helicobacter pylori* Infection with Induces Epithelial to Mesenchymal Transition in Human Cholangiocytes. *Pathogens*, **9**, 971. <https://doi.org/10.1101/2020.04.28.066324>
- [16] Boonyanugomol, W., Chomvarin, C., Baik, S.C., *et al.* (2011) Role of cagA-Positive *Helicobacter pylori* on Cell Proliferation, Apoptosis, and Inflammation in Biliary Cells. *Digestive Diseases and Sciences*, **56**, 1682-1692. <https://doi.org/10.1007/s10620-010-1512-y>
- [17] Di, C.P., Serra, N., D'Arpa, F., *et al.* (2019) The Microbiota of the Bilio-Pancreatic System: A Cohort, STROBE-Compliant Study. *Infection and Drug Resistance*, **12**, 1513-1527.
- [18] Chng, K.R., Chan, S.H., Ng, A.H.Q., *et al.* (2016) Tissue Microbiome Profiling Identifies an Enrichment of Specific Enteric Bacteria in *Opisthorchis viverrini* Associated Cholangiocarcinoma. *EBioMedicine*, **8**, 195-202. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.04.034>
- [19] Chen, B., Fu, S.W., Lu, L. and Zhao, H. (2019) A Preliminary Study of Biliary Microbiota in Patients with Bile Duct Stones or Distal Cholangiocarcinoma. *BioMed Research International*, **2019**, Article ID: 1092563. <https://doi.org/10.1155/2019/1092563>
- [20] Han, J.Y., Ahn, K.S., Baek, W.K., *et al.* (2020) Usefulness of Bile as a Biomarker via Ferroptosis and Cysteine Prenylation in Cholangiocarcinoma; Role of Diagnosis and Differentiation from Benign Biliary Disease. *Surgical Oncology*, **34**, 174-181. <https://doi.org/10.1016/j.suronc.2020.04.019>
- [21] 张晓芬. 良恶性胆道梗阻患者胆汁中菌群差异分析[D]: [硕士学位论文]. 福州: 福建医科大学, 2019.
- [22] Alves, J.R., Silva, R.C., Guerra, S.C.P., *et al.* (2016) Microbiological Analysis of Bile in Patients with Benign and Malignant Biliopancreatic Diseases and Its Consequences. *Archives of Gastroenterology*, **53**, 156-162. <https://doi.org/10.1590/S0004-28032016000300007>