

原发性肝癌患者口腔菌群多样性研究

曹龙飞, 马晓莹, 许琳*

青岛大学附属青岛市市立医院消化内科, 山东 青岛

收稿日期: 2023年4月28日; 录用日期: 2023年5月21日; 发布日期: 2023年5月31日

摘要

目的: 探讨口腔菌群与原发性肝癌的关系。方法: 通过16S rRNA高通量测序技术分析10例原发性肝癌患者及10例健康体检者口腔菌群微生物多样性。结果: 在门水平, 与健康组相比肝癌组厚壁菌门丰度显著升高($P = 0.005$), 变形菌门丰度显著降低($P = 0.041$)。在属水平, 肝癌组链球菌属丰度显著升高($P = 0.023$), 梭杆菌属、拟普氏菌属、普氏菌属丰度显著降低($P = 0.019, P = 0.041, P = 0.028$)。结论: 原发性肝癌患者存在口腔菌群失调, 其中链球菌属丰度显著升高, 梭杆菌属、拟普氏菌属、普氏菌属丰度显著降低, 能够作为生物标志物辅助原发性肝癌的早期诊断。

关键词

原发性肝癌, 高通量核苷酸测序, 口腔菌群

Study on the Diversity of Oral Microflora in Patients with Primary Hepatic Carcinoma

Longfei Cao, Xiaoying Ma, Lin Xu*

Department of Gastroenterology, Qingdao Municipal Hospital, Qingdao University, Qingdao Shandong

Received: Apr. 28th, 2023; accepted: May 21st, 2023; published: May 31st, 2023

Abstract

Objective: To investigate the relationship between oral microflora and primary hepatic carcinoma. **Methods:** 16S rRNA high-throughput sequencing and bioinformatic analysis were used to examine oral bacterial diversity in the different patients including 10 patients with primary hepatic carcinoma, and 10 healthy controls. **Results:** At the phylum level, the proportion of Firmicutes was increased significantly ($P = 0.005$), however, the proportion of Proteobacteria was decreased significantly in L group ($P = 0.041$). At the genus level, the proportion of *Streptococcus* was increased significantly ($P = 0.023$), whereas the proportion of *Fusobacterium*, *Alloprevotella* and *Prevotella*

*通讯作者。

decreased significantly in L group ($P = 0.019$, $P = 0.041$, $P = 0.028$). Conclusion: The statistical analyses confirmed that there are significant differences between every two groups in one phylum and three genera, which could be used for biomarkers in diagnosis of primary hepatic carcinoma.

Keywords

Primary Hepatic Carcinoma, High-Throughput Nucleotide Sequencing, Oral Microbiota

Copyright © 2023 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

原发性肝癌(Primary Hepatic Carcinoma)是原发于肝脏的上皮性恶性肿瘤,其中超过90%的肝癌为肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC) [1] [2]。我国原发性肝癌发病率居恶性肿瘤第5位,死亡率居第2位,疾病负担较重[3],且发现时多为晚期,5年生存率仅有7%~10%,由于部分患者对疾病重视程度不足、缺乏定期检查意识,往往错过了最佳诊疗时机。目前临床常以影像学技术结合生物标志物检测的方法诊断原发性肝癌,现有的血清学标志物大多灵敏度低,特异性各异,临床上常对这些标志物进行纵向评估,或用几种血清学标志物联合诊断肝癌。监测和早期诊断原发性肝癌的生物标志物仍然缺乏[4]。

口腔微生物组是由细菌、真菌、病毒、古生菌构成的高度复杂和多样的生态系统,它们悬浮在唾液内或附着于组织表面[5]。其中包括700余种细菌、100种真菌以及大量的病毒群落。这些微生物在口腔中定植并处于相对稳定的动态平衡中[6],在消化吸收、合成维生素B及维生素K、防止致病微生物入侵、免疫应答等方面发挥作用[7]。随着人类微生物组计划(human microbiome project, HMP)的完成,人们对口腔微生物的认识更加深入,不仅进一步解析了口腔微生物在龋病、牙周病以及口腔癌等口腔疾病发生发展中的作用,还发现口腔微生物与全身系统疾病密切相关,包括类风湿性关节炎、不良妊娠结局和心血管疾病等。而大量口腔微生物通过唾液从口腔进入下游的消化道,因此其与消化系统疾病之间也存在着尤为紧密的联系。

有研究表明胰腺癌与口腔菌群失调、幽门螺杆菌感染、细菌、嗜肝病毒、胰腺内微生物组密切相关。研究显示肠-肝轴的存在影响肝癌的发生[8]。Lu等[9]首次发现肝癌患者存在舌苔菌群失调。

如今,原发性肝癌治疗策略有限并缺乏公认的筛查工具用于早期诊断。本研究旨在采用16S rRNA扩增子测序技术研究原发性肝癌患者口腔菌群多样性,为原发性肝癌的早期诊断提供参考。

2. 材料与方法

2.1. 研究对象

本研究选取青岛市市立医院2022年1月至2022年12月临床诊断为原发性肝癌的患者10例作为实验组,另选择同时期的健康体检志愿者10例作为对照组,采集以上人群的唾液标本。所有研究对象对本研究均知情同意,本课题获得了青岛市市立医院伦理委员会的审核同意。其中实验组即肝癌组患者用L组表示,对照组即健康组患者用H组表示。排除标准:伴其它系统重大疾病;有牙科病史和口腔检查发现有活动性牙龈或牙周病;合并慢性腹泻、炎症性肠病;有胃肠道手术史;近4周内使用过抗生素、PPI或益生菌。

2.2. 标本采集

所有研究对象唾液标本收集时间为上午6点至12点,要求研究对象至少在标本收集2小时前不进食、

不饮水、不刷牙，清水漱口后手持无菌、无酶冻存管，口含唾液至少 1 min，随后使唾液流入试管中，重复多次直到收集的唾液达到 2~5 mL，2 h 内送至实验室-86℃冰箱保存。

2.3. DNA 提取和测序

使用 TGuide S96 磁珠法土壤/粪便基因组 DNA 提取试剂盒完成核酸的提取，使用酶标仪(基因有限公司 GeneCompang Limited, synergy HTX)对核酸进行浓度检测，下一步进行扩增检测，扩增后 PCR 产物使用浓度 1.8%的琼脂糖进行电泳检测(北京博美富鑫科技有限公司)对完整性进行检测，使用 NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, USA)测定 DNA 浓度和纯度。使用引物 338F 和 806R (338F 5'-ACTCCTACGGGAG GCAGCA-3'/806R 5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')进行 PCR 扩增。其操作流程为：(1) 目标区域 PCR，(2) Solexa PCR，(3) Nanodrop 定量及混样，(4) 过柱纯化，(5) 切胶回收。使用 Illumina 公司的 Novaseq6000 平台进行测序，测序类型为 PE250。高通量测序文库的构建和基于 IlluminaNovaseq6000 平台的测序任务由北京百迈客生物科技有限公司(北京，中国)完成。

2.4. 数据处理和分析

首先使用 Trimmomatic (version 0.33)对原始数据进行质量过滤，然后使用 Cutadapt (version 1.9.1)进行引物序列的识别与去除，其后使用 USEARCH (version 10)对双端 reads 进行拼接并去除嵌合体(UCHIME, version 8.1)，最终得到高质量的序列用于后续分析。

采用 QIIME2 软件对各样本进行 Alpha 多样性指数分析，得到各样本物种丰富度和均匀度信息；计算 Unifrac 距离，进行 Beta 多样性指数组间差异分析，直观展示不同样本和分组之间的群落结构差异；将高质量序列划分 OTU 进行物种注释及分类学分析，得到门(Phylum)、属(Genus)分类水平上的物种分布柱状图；基于组间样品 LEfSe 分析，在不同组间寻找具有统计学差异的 Biomarker；基于 16S 功能基因进行预测分析。使用 R 软件将分析结果绘制成图。

2.5. 统计学分析

应用 SPSS 26.0 进行统计学处理，对所有入选的各组计量资料进行正态检验，计量资料表示用均数±标准差或中位数 M。符合正态分布且方差齐性两组比较采用 t 检验，不符合正态分布两组采用 Wilcoxon 符号秩和检验；计数资料两两比较采用卡方检验或 Fisher 精确检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

3. 结果

3.1. 研究对象基本情况

本研究经过纳入、排除标准筛选后，最终纳入肝癌组(L group)患者 10 例，健康组(H group)患者 10 例。两组之间在年龄、性别、体质指数(BMI)指标上无显著差异，在指标血清白蛋白(ALB)、谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、总胆红素(TBIL)及凝血酶原时间(PT)差异显著(表 1)。

3.2. 物种注释情况

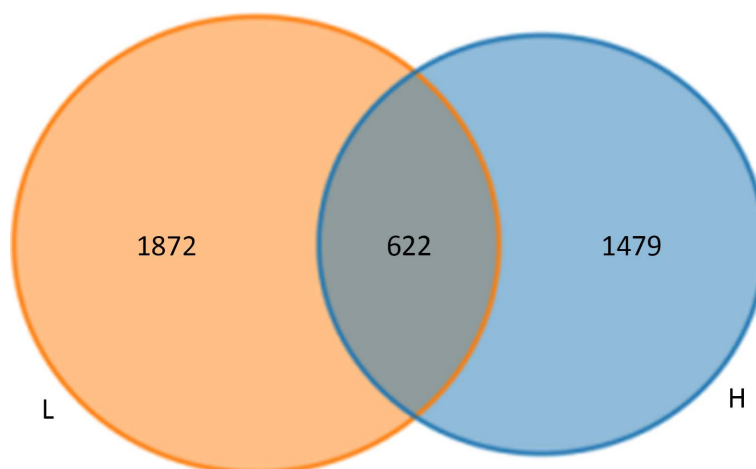
通过 16S rRNA 扩增子测序，一共得到 1,564,091 对 Reads，经过双端 Reads 质控、拼接后共产生 1,559,016 条 Clean Reads，每个样本至少产生 44,376 条 Clean Reads(平均产生 77,951 条 Clean Reads)用于数据分析，每个序列平均有 420 个碱基对(390~450 bp)。两组一共测得 3973 个独一无二的序列，代表了口腔中存在的所有菌种，两组样本覆盖率(Coverage)均大于 99%。

Table 1. Comparison of basic characteristics in each group**表 1.** 各组基本特征对比

指标	H 组(n = 10)	L 组(n = 10)	统计值	P 值
性别(男/女)	5/5	9/1	-	0.141
年龄(岁)	57.00 ± 16.99	56.80 ± 8.13	t = 0.034	0.974
BMI (kg/m ²)	24.40 ± 3.42	24.19 ± 3.35	t = 0.139	0.891
ALB (g/L)	38.53 ± 1.67	32.18 ± 4.42	t = 4.249	0.001
ALT (U/L)	15.4 (6.74~75.75)	57.10 (17.67~300.86)	z = -2.65	0.008
AST (U/L)	19.17 (10.92~54.57)	63.02 (27.84~277.56)	z = -3.33	0.001
TBIL (umol/L)	10.95 (7.90~14.30)	36.85 (13.60~187.70)	z = -3.63	0.000
PT (s)	12.30 (10.60~13.60)	14.40 (12.00~19.70)	z = -3.02	0.003

3.3. OTUs 分析

健康组共有 OTU 2101 个, 肝癌组共有 OTU 2494 个, 两组样品共有 622 个 OTU 相互重叠, 而肝癌组有 1872 个 OTU 在健康组中不存在, 健康组中有 1479 个 OTU 在肝癌组中不存在(图 1)。

**Figure 1.** Venn graphs based OTU numbers**图 1.** 基于 OTU 的韦恩图

3.4. Alpha 多样性

为了探究肝癌组和健康组中口腔微生物的 Alpha 多样性, 基于秩和检验, 计算 Chao1、ACE、Shannon、Simpson 指数, R 语言可视化结果显示, 肝癌组与健康组相比, α 多样性指数均有降低的趋势, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$; 图 2)。

3.5. Beta 多样性

在加权的 PCoA 图中肝癌组与健康组明显分离, 说明使用 PCoA 分析可以清楚地分出肝癌组和健康组的口腔微生物群。Anosim (analysis of similarities) 分析是用于分析多维度数据组间相似性的统计方法, Anosim 检验表明肝癌组与健康组之间群落构成有显著差异 ($R = 0.229$, $P = 0.001$; 图 3)。

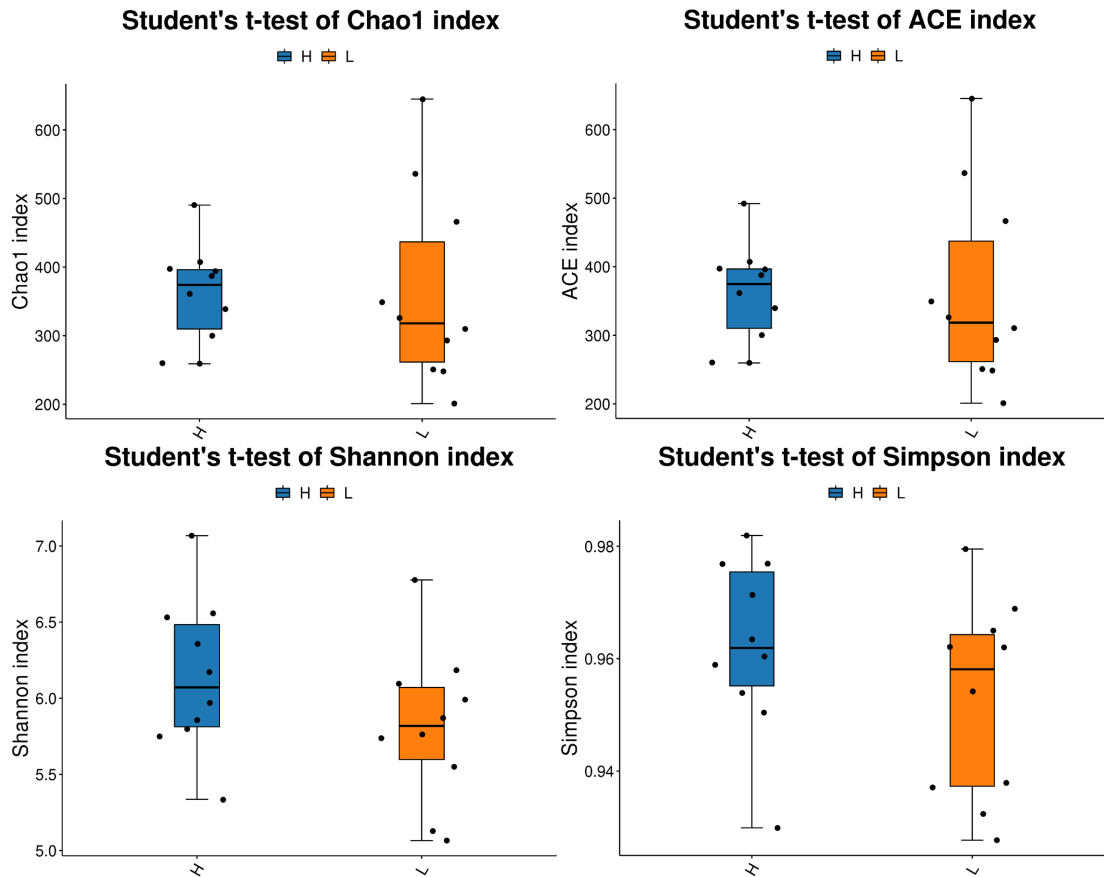


Figure 2. Box plots of Alpha diversity index
图 2. α 多样性指数组间差异箱线图

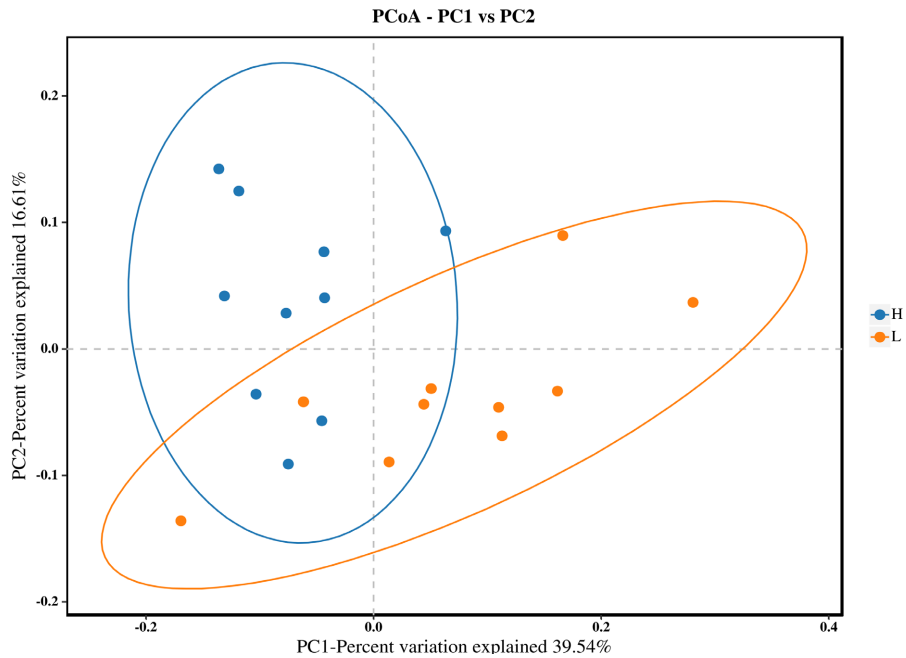


Figure 3. Weighted principal coordinate analysis (PCoA) scores plot based on principal components 1 and 2
图 3. 基于主成分 1 和 2 的 Weighted PCoA 图

3.6. 各组间 Top 10 丰度菌群的比较

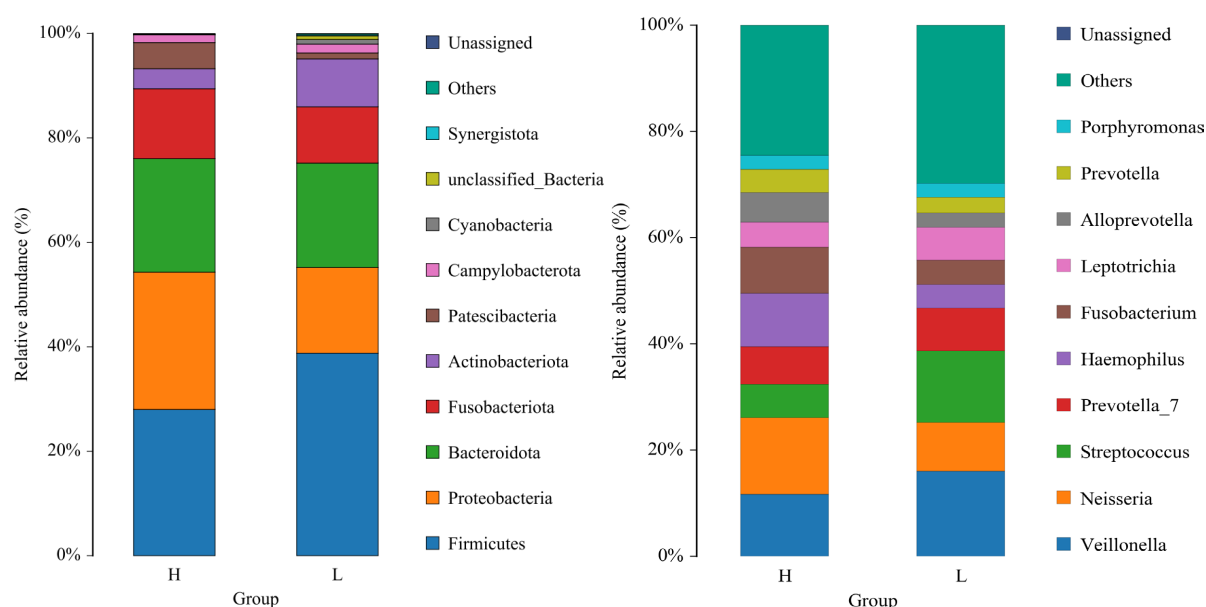
在门水平上口腔菌群主要由厚壁菌门(Firmicutes)、变形菌门(Proteobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidota)、梭杆菌门(Fusobacteriota)组成。其中肝癌组厚壁菌门丰度显著高于健康组($P = 0.005$)，变形菌门丰度显著低于健康组($P = 0.041$)，拟杆菌门、梭杆菌门丰度则均降低，差异不显著。在属水平上排名前五的是韦荣球菌属(*Veillonella*)、奈瑟菌属(*Neisseria*)、链球菌属(*Streptococcus*)、普氏菌属(*Prevotella*)、嗜血杆菌属(*Haemophilus*)，其中肝癌组链球菌属丰度明显高于健康组($P = 0.023$)，梭杆菌属、拟普氏菌属、普氏菌属丰度显著低于健康组($P = 0.019$, $P = 0.041$, $P = 0.028$; 图 4)。

3.7. 肝癌组和健康组差异菌属分析

如图 5，LEfSe 分析的结果显示在门水平上肝癌组厚壁菌门(Firmicutes)的丰度显著高于健康组，Patescibacteria、变形菌门(Proteobacteria)的丰度显著低于健康组；在纲水平上芽孢杆菌纲(Bacilli)、放线菌纲(Actinobacteria)的丰度显著高于健康组，Gracilibacteria、梭菌纲(Clostridia)、 γ -变形菌纲(Gammaproteobacteria)的丰度显著低于健康组；在目水平上乳杆菌目(Lactobacillales)的丰度显著高于健康组，Absconditabacteriales_SR1 丰度显著低于健康组；在科水平上链球菌科(Streptococcaceae)的丰度显著高于健康组，梭杆菌科(Fusobacteriaceae)的丰度显著低于健康组；在属水平上链球菌属(*Streptococcus*)的丰度显著高于健康组，而拟普氏菌属(*Alloprevotella*)、梭杆菌属(*Fusobacterium*)的丰度显著低于健康组。上述结果与物种组成分析结果一致，可以作为 Biomaker 为原发性肝癌的早期诊断提供参考。

3.8. 肝癌组和健康组代谢功能预测

根据 PICRUSt2 (Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States) 菌群基因功能预测结果，比较两组口腔菌群的 KEGG 通路，并筛选出具有显著性组间差异的通路。如图 6 所示，左侧横向柱状图代表已筛选代谢通路的丰度分别占两组样本中所有代谢通路的百分比，右侧为功能通路丰度在 95%CI 内的差异比例，右边为 P 值。在第三级 KEGG 通路层次，与健康组相比，肝癌组在异生物素的生物降解和代谢途径、传染性病原体相关途径、肿瘤相关途径方面均升高。



Cladogram

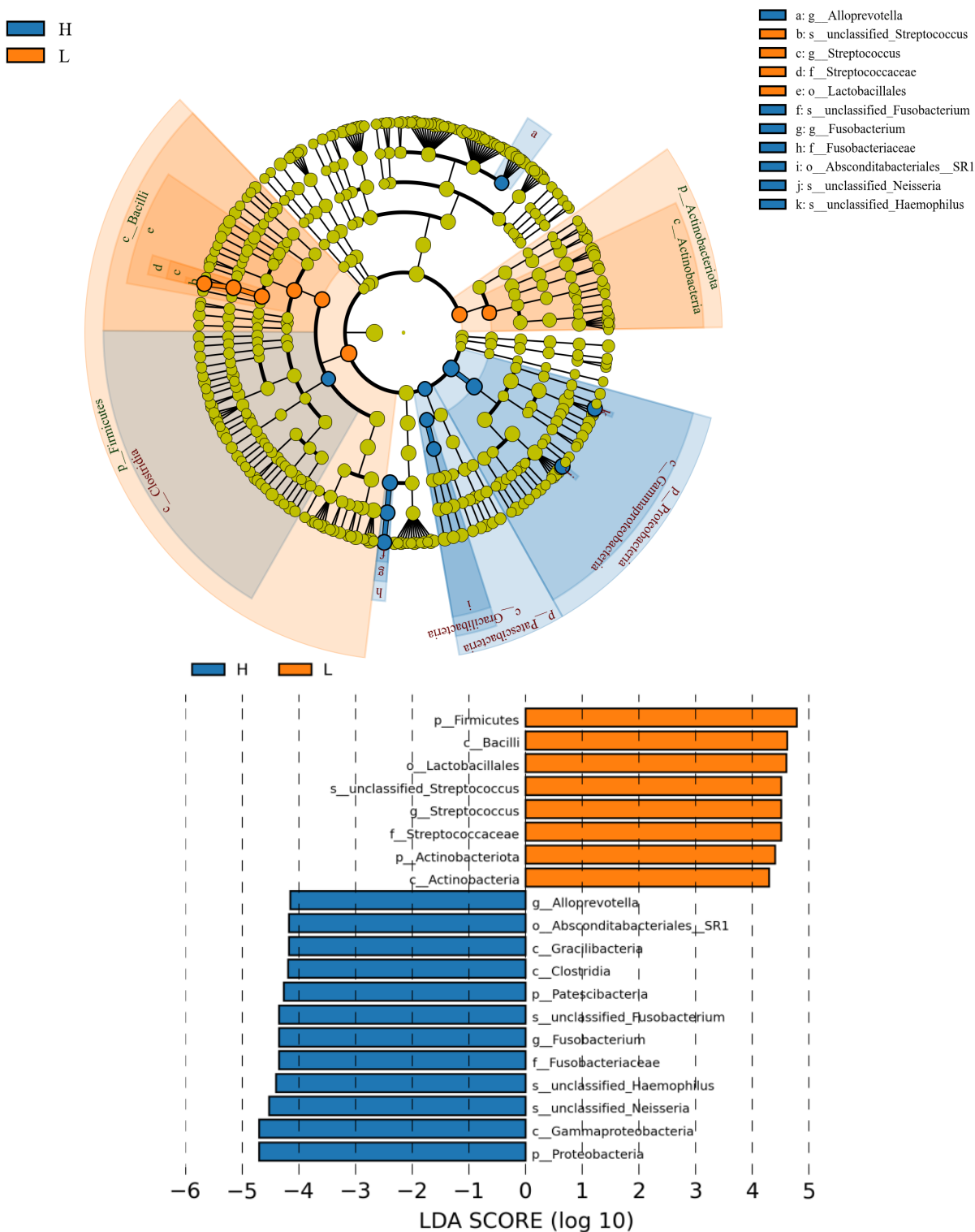


Figure 5. LEfSe analysis cladogram of the oral microbiota in healthy group and hepatocellular carcinoma group; histogram of LDA value distribution

图 5. 健康组与肝癌组口腔菌群 LEfSe 分析进化分枝图；LDA 值分布柱状图

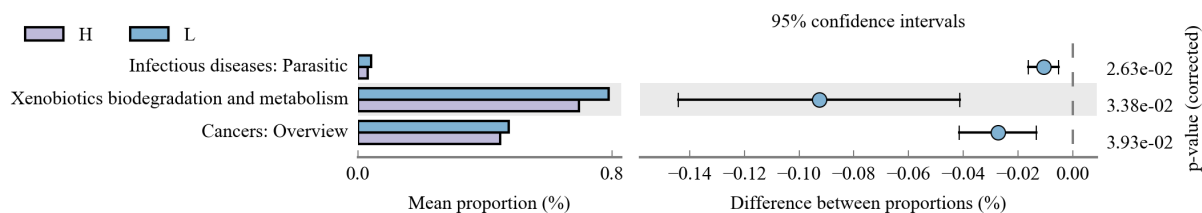


Figure 6. Variance analysis chart of KEGG metabolic pathway between H and L groups

图 6. H 组和 L 组间 KEGG 代谢途径差异分析图

4. 讨论

口腔和胃肠道在人体内形成了微生物共生的微环境,二者虽是各自独立的,但也互相依存和影响[10]。健康人肠道内较少有口腔菌群定植,然而炎症性肠病(IBD)、HIV 感染、肝硬化和结肠癌患者肠道微生物组中口腔来源的微生物群有所增加。1998 年马歇尔(Marshall)教授提出“肠-肝轴”概念,其认为胃肠道与肝脏之间通过门脉系统,在神经内分泌、免疫应答、肠道屏障功能等方面进行双向的反馈调节。肠道菌群对早期肝癌甚至进展期肝癌具有强大的诊断潜力。有研究通过随机森林模型五重交叉验证确定了 30 个生物标志物,在 75 例早期肝癌和 105 例非肝癌样本之间的曲线下面积达到 80.64% [11]。Xu 等[12]提出口腔微生物与肠道微生物具有同源性,二者菌群组成相似,并通过消化道、血液、淋巴循环互相影响。据估计,每天约有 1 g 细菌(约 1011 个细胞)随着 500~1500 mL 唾液被吞咽。Zhou 等[13]由此提出“口-肠-肝轴”理论,用来阐述口腔菌群与肝细胞癌产生关联的可能机制:1. 口腔微生物通过吞咽很容易进入胃肠道,引起微生态失衡,致病菌增加。2. 口腔中的致病菌,通过血液循环作用于肝脏在内的全身各器官。3. 口腔菌群的代谢产物进入到体循环的血液中,使人体处于低度的炎症状态,导致慢性肝炎、肝硬化等疾病的进展。Xu 等[14]分别对 15 例肝癌组织和 15 例癌旁组织进行高通量测序,发现其菌群分类与肠道菌群在门、属分类水平基本一致,提示肝癌的发生、发展可能与菌群有关。

本研究通过 16S rRNA 扩增子测序技术分析原发性肝癌患者和健康人群口腔菌群微生物多样性,研究结果显示肝癌组较健康组 Alpha 多样性指数降低,但无显著差异,与现有研究结论不一。Li 等[15]分析了肝癌进展过程中不同肝病阶段的患者和健康人群唾液菌群的多样性,结果发现肝癌患者口腔菌群多样性较慢性乙型肝炎患者、乙肝肝硬化患者以及健康体检者均显著降低。Lu 等[9]对 35 例肝癌患者和 25 例健康人舌苔菌群进行测序分析,结果发现肝癌患者舌苔菌群多样性显著增高,其中东方菌(*Oribacterium*)和梭杆菌(*Fusobacterium*)作为显著差异菌群,是良好的生物标志物。研究结果不一致性可能与物种替代有关,即多样性指数无显著差异,但物种组成不同。同时也受肝癌患者病因、临床分期以及样本和采样方法的影响。Weighted-Unifrac PcoA 主坐标分析,其物种组成结构越相似,则样本距离越相近。结果显示肝癌组与健康组呈各自组内聚集,组间呈不同位置及形态分布。说明原发性肝癌患者口腔菌群存在明显失衡。

物种组成分析显示,肝癌组与健康组之间群落构成相同,但相对丰度不同,这意味着肝癌已经改变了患者的口腔菌群。其中与健康组相比肝癌组厚壁菌门丰度显著升高,变形菌门丰度显著降低。厚壁菌门增加可以引起口腔菌群紊乱、黏膜防御功能下降,从而导致口腔致病菌向胃肠道转移。变形菌门门下的细菌均为革兰氏阴性菌,以兼性厌氧菌为主,受环境影响大,与肥胖、糖尿病、消化性溃疡、炎症性肠病有关[16]。有研究显示肝癌患者肠道菌群变形菌门丰度增加,提示肝癌患者存在着一定程度的口腔菌群移位。在属水平上,与健康组相比肝癌组链球菌属显著升高,而梭杆菌属、拟普氏菌属、普氏菌属丰度显著降低。研究证实链球菌属的增加是肝癌进展过程中的驱动力[17] [18]。普氏菌属是革兰氏阴性菌,可在厌氧条件下生长。其通常被认为是一种与健康的植物性饮食相关的菌,在人体中发挥“益生菌”的

作用。普氏菌属的减少与自闭症、过敏、多发性硬化症等疾病相关[19]。LEfSe 分析与物种组成分析结果一致,综上所述,口腔菌群的变化可以为原发性肝癌的早期诊断提供参考。PICRUSt2 菌群基因功能预测结果显示,与健康组相比,肝癌组在异生物素的生物降解和代谢途径、传染性疾病相关途径、肿瘤相关途径方面均升高。

慢性乙肝病毒感染患者,如乙型肝炎、乙肝肝硬化、肝癌患者对乙肝病毒的免疫应答减弱,受损的免疫系统对这种病毒的反应减弱导致了慢性感染[20]。患者免疫应答受损不仅发生在肝脏,也同样出现在身体的其它部位,例如口腔。有研究证实肝硬化患者口腔防御系统受损,炎症水平增高,IL-6、IL-1 β 和分泌型 IgA 较正常人升高,而溶菌酶、唾液肽 Histatins-1 和 5 降低[21]。Wang 等[22]证实牙龈上微生物群的组成更多的受人体免疫状况影响,而非仅仅与齿龈炎、牙周炎有关。慢性乙肝病毒感染患者受损的免疫应答可能导致口腔菌群失调[23][24]。由于这些患者口腔菌群失调,细菌能够轻易地突破受损的口腔防御系统,作为机会致病菌侵入胃肠道。这些细菌在肠道黏膜屏障受损时入血,引起 TNF- α 、IL-1、IL-6 等炎症介质的释放,长期慢性炎症刺激加重肝脏功能及结构损伤,导致肝癌的发生。

本研究缺少慢性乙肝病毒感染各发病阶段的口腔菌群分析,查阅相关文献发现,Ling 等[25]分析了 10 例慢性乙型肝炎患者和 10 例乙肝相关肝硬化患者的口腔菌群,发现两组口腔菌群极其相似,使用 PCoA 分析无法将两组区分开来。一个原因是 10 例乙肝相关肝硬化患者均处于代偿期,尚无肝性脑病、腹水等并发症,另一个原因是乙肝肝硬化患者在常年的慢性乙肝病毒感染过程中口腔菌群构成仅发生了轻微的改变。

口腔菌群方便提取易操作,通过高通量测序技术发现微生物群落的变化,推测其功能改变,可以用于预测疾病的发生和发展,为疾病的诊断提供参考。然而不可否认本研究仍存在诸多局限:首先,本研究仅分析了肝癌患者和健康者口腔这一特定部位的菌群构成,而研究对象的肠道菌群未能同时分析,因此,现有数据不足以建立起口腔菌群与肠道菌群的直接联系,只能推测出肝癌患者口腔菌群的关键种型改变可能导致肠道菌群的变化。其次,原发性肝癌和口腔菌群间的相关性及其中机制尚不明确,口腔菌群失衡是肝细胞癌的“因”还是“果”,还需进一步研究。再次,本研究未分析非乙肝病毒感染的肝癌患者口腔菌群构成,例如酒精性肝病、非酒精性脂肪性肝病、自身免疫性肝炎等。最后,本研究样本量较少,慢性乙肝病毒感染各阶段的大样本分析将使结果更具有说服力。

5. 结论

原发性肝癌患者存在口腔菌群失调,其中链球菌属丰度显著升高,梭杆菌属、拟普氏菌属、普氏菌属丰度显著降低,能够作为生物标志物辅助原发性肝癌的早期诊断。

参考文献

- [1] Sung, H., et al. (2021) Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, **71**, 209-249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- [2] Kim, Y.S. and Shin, S.W. (2019) Hepatocellular Carcinoma. *The New England Journal of Medicine*, **381**, e2.
- [3] 徐小元, 南月敏. 原发性肝癌二级预防共识(2021 年版) [J]. *临床肝胆病杂志*, 2021, 37(3): 11.
- [4] Pessa, M.G. (2020) Biomarkers in Hepatocellular Carcinoma: Diagnosis, Prognosis and Treatment Response Assessment. *Cells*, **9**, Article No. 1370.
- [5] Samaranayake, L. Matsubara, V.H. (2017) Normal Oral Flora and the Oral Ecosystem. *Dental Clinics of North America*, **61**, 199-215. <https://doi.org/10.1016/j.cden.2016.11.002>
- [6] Brandilyn, A.P., Wu, J., Hayes, R.B., et al. (2017) The Oral Fungal Mycobiome: Characteristics and Relation to Periodontitis in a Pilot Study. *BMC Microbiology*, **17**, Article No. 157. <https://doi.org/10.1186/s12866-017-1064-9>
- [7] Gopalakrishnan, V., Spencer, C.-N., Nezi, L., et al. (2018) Gut Microbiome Modulates Response to Anti-PD-1 Immu-

- notherapy in Melanoma Patients. *Science*, **359**, 97-103. <https://doi.org/10.1126/science.aan4236>
- [8] Stachowska, E., Folwarski, M., Kaźmierczak-Siedlecka, K., *et al.* (2021) The Potential of Gut Microbiome as a Non-Invasive Predictive Biomarker for Early Detection of Pancreatic Cancer and Hepatocellular Carcinoma. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, **25**, 7275-7284.
- [9] Lu, H.F., *et al.* (2016) Deep Sequencing Reveals Microbiota Dysbiosis of Tongue Coat in Patients with Liver Carcinoma. *Scientific Reports*, **6**, Article No. 33142.
- [10] Atarashi, K., *et al.* (2017) Ectopic Colonization of Oral Bacteria in the Intestine Drives T_H1 Cell Induction and Inflammation. *Science*, **358**, 359-365. <https://doi.org/10.1126/science.aan4526>
- [11] Ren, Z.G., *et al.* (2018) Gut Microbiome Analysis as a Tool towards Targeted Non-Invasive Biomarkers for Early Hepatocellular Carcinoma. *Gut*, **68**, 1014-1023. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2017-315084>
- [12] Xu, X., He, J.Z., Xue, J., *et al.* (2015) Oral Cavity Contains Distinct Niches with Dynamic Microbial Communities. *Environmental Microbiology*, **17**, 699-710. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12502>
- [13] 杨林, 周铨, 张佳铭, 郭礼, 司海龙. 基于口-肠-肝轴理论探讨原发性肝癌的新型治疗策略[J]. 临床肝胆病杂志, 2020, 36(7): 1646-1649.
- [14] 徐寅. 肝癌, 胆管癌与癌旁组织细菌的相关性研究[D]: [硕士学位论文]. 青岛: 青岛大学, 2019.
- [15] Xi, D.X., *et al.* (2020) Oral Microbial Community Analysis of the Patients in the Progression of Liver Cancer. *Microbial Pathogenesis*, **149**, Article ID: 104479.
- [16] Shin, N.-R., Whon, T.-W. and Bae, J.-W. (2015) Proteobacteria: Microbial Signature of Dysbiosis in Gut Microbiota. *Trends in Biotechnology*, **33**, 496-503. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.06.011>
- [17] Zhou, D., Pan, Q., Shen, F., *et al.* (2017) Total Fecal Microbiota Transplantation Alleviates High-Fat Diet-Induced Steatohepatitis in Mice via Beneficial Regulation of Gut Microbiota. *Scientific Reports*, **7**, Article No. 1529. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01751-y>
- [18] De Minicis, S., Rychlicki, C., Agostinelli, L., *et al.* (2014) Dysbiosis Contributes to Fibrogenesis in the Course of Chronic Liver Injury in Mice. *Hepatology*, **59**, 1738-1749. <https://doi.org/10.1002/hep.26695>
- [19] Tett, A., Pasolli, E., *et al.* (2021) Prevotella Diversity, Niches and Interactions with the Human Host. *Nature Reviews Microbiology*, **19**, 585-599. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00559-y>
- [20] Stoop, J.,-N., van der Molen, R.G., Baan, C.C., *et al.* (2005) Regulatory T Cells Contribute to the Impaired Immune Response in Patients with Chronic Hepatitis B Virus Infection. *Hepatology*, **41**, 771-778. <https://doi.org/10.1002/hep.20649>
- [21] Basic, A. and Dahlén, G. (2015) Hydrogen Sulfide Production from Subgingival Plaque Samples. *Anaerobe*, **35**, 21-27. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2014.09.017>
- [22] The PLOS ONE Staff (2014) Correction: Oral Microbiota Distinguishes Acute Lymphoblastic Leukemia Pediatric Hosts from Healthy Populations. *PLOS ONE*, **9**, e110449. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110449>
- [23] Chen, Y.F., *et al.* (2011) Characterization of Fecal Microbial Communities in Patients with Liver Cirrhosis. *Hepatology*, **54**, 562-572.
- [24] Crielaard, W., Zaura, E., Schuller, A.-A., *et al.* (2011) Exploring the Oral Microbiota of Children at Various Developmental Stages of Their Dentition in the Relation to Their Oral Health. *BMC Med Genomics*, **4**, Article No. 22. <https://doi.org/10.1186/1755-8794-4-22>
- [25] Ling, Z.X., Liu, X., Cheng, Y.W., *et al.* (2015) Decreased Diversity of the Oral Microbiota of Patients with Hepatitis B Virus-Induced Chronic Liver Disease: A Pilot Project. *Scientific Reports*, **5**, Article No. 17098. <https://doi.org/10.1038/srep17098>