

· 临床论著 ·

## 30 例湿热蕴结型结肠癌患者的肠道菌群结构变化研究

初旭 脱璐尧 辛红 徐巍

**摘要** 目的 探讨湿热蕴结型结肠癌患者与健康人群的肠道菌群的差异。方法 30 例湿热蕴结型结肠癌患者的粪便样本做为观察组, 收集 13 名健康人体检粪便样本为对照组, 分别提取两组样本中细菌总 DNA, 采用 16S rDNA 测序技术对各组的粪便样本进行分析。结果 与对照组比较, 观察组肠道菌群中拟杆菌门、放线菌门、变形杆菌门、拟杆菌属、大肠杆菌/志贺氏菌属丰度明显增加 ( $P<0.01$ )。II 期患者的双歧杆菌属、柯林斯菌属明显高于 III 期患者 ( $P<0.05$ )。结论 湿热蕴结型结肠癌与肠道菌群结构紊乱相关, 关联度较高的为条件致病菌大肠杆菌相对丰度的升高, 益生菌双歧杆菌相对丰度的减少。

**关键词** 16S rDNA 测序技术; 结肠癌; 湿热蕴结; 中医证型; 肠道菌群

**Study on the Structural Changes of Intestinal Flora in 30 Colon Cancer Patients with Moisture and Heat Accumulation Syndrome** CHU Xu, TUO Lu-yao, XIN Hong, and XU Wei *Department of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, First Affiliated Hospital, Harbin Medical University, Harbin (150001)*

**ABSTRACT Objective** To observe the difference of intestinal flora between colon cancer patients with moisture and heat accumulation syndrome (MHAS) and the healthy population. **Methods** The fecal samples of 30 colon cancer patients with MHAS were selected as an observation group, and 13 samples from the healthy subjects were selected as the control group. The total bacterial DNA was extracted from the two groups and analyzed by 16S rDNA sequencing. **Results** Compared with the control group, the abundance of *Bacteroidetes*, *Actinomycetes*, *Proteobacteria*, *Bacteroides*, *Escherichia Shigella* in the intestinal flora of the observation group increased significantly ( $P<0.01$ ). The contents of *Bifidobacterium* and *Collinsella* were significantly higher in stage II patients than in stage III patients ( $P<0.05$ ). **Conclusions** Colon cancer patients with MHAS were associated with structural disorder of intestinal flora. Higher relativities existed in increased relative abundance of *Escherichiacoli* and decreased relative abundance of *Bifidobacterium*.

**KEYWORDS** 16S rDNA sequencing; colon cancer; moisture and heat accumulation syndrome; Chinese medicine syndrome; intestinal flora

结直肠癌 (colorectal cancer, CRC) 是常见的消化道恶性肿瘤, 其发病率占有所有恶性肿瘤的第三位, 病死率居第二位<sup>[1,2]</sup>。诸多因素影响其发生发展和预后, 其中肠道菌群结构和功能改变是重要因素<sup>[3,4]</sup>。中医药在结肠癌预防和治疗领域一直扮演重要角色, 辨证论治是主要的治疗原则, 其中湿热蕴结是其主要分型<sup>[5-7]</sup>, 前期研究也发现结肠癌患者中

湿热蕴结型占比较多<sup>[8,9]</sup>。肠道菌群是人体内种群数量最大和最复杂的共生微生物生态系统, 被称为人类“第二基因组”<sup>[10,11]</sup>。肠道菌群失调可以直接影响宿主的肠道环境, 诸多研究表明结肠癌的发生发展与肠道菌群的变化密切相关<sup>[12-14]</sup>。因此本研究以湿热蕴结型作为切入点, 分析湿热蕴结型结肠癌患者与健康人肠道菌群差异分布的特点, 旨在探讨中医证候与肠道菌群的相关性, 寻找出结肠癌湿热蕴结型肠道菌群的特殊变化, 为中医药预防和干预提供依据。

基金项目: 黑龙江省中医药科研项目 (No. ZHY2020-166)

作者单位: 哈尔滨医科大学附属第一医院中西医结合科 (哈尔滨 150001)

通讯作者: 徐巍, Tel: 0451-85555815, E-mail: 13796059990@

163.com

DOI: 10. 7661/j. cjim. 20210126. 167

资料与方法

1 诊断标准

1.1 西医诊断标准 参照国际癌症研究机构出版的《消化系统肿瘤 WHO 分类》<sup>[15]</sup> 2010 年第 4 版的病理组织学或细胞学作为本研究诊断标准。肿瘤的分期根据 2016 年 AJCC 美国癌症分期联合委员会发布的第八版大肠癌 TNM 分期<sup>[16]</sup>。

1.2 中医湿热蕴结证辨证标准 参照《肿瘤中医诊疗指南》<sup>[17]</sup> 拟定: 主症: 排便规律的异常、粪便形质的变化、便血、腹胀、腹痛, 肛门灼热或里急后重, 大便黏滞恶臭或黏液血便; 次症: 口渴纳少, 乏力倦怠, 小便短赤; 舌脉象: 舌红, 苔黄腻, 脉滑数。舌脉象必备加至少 2 项主症、1 项次症。

## 2 纳入标准及排除标准

2.1 纳入标准 (1) 符合西医诊断标准, 经肠镜及病理诊断的结肠恶性肿瘤; 符合中医辨证分型为湿热蕴结型; (2) 具有手术指征者; (3) 年龄 20~80 岁; (4) 神志清楚, 能够进行交流; (5) 术前一周未应用抗生素或微生物制剂; (6) 术前未行放疗化疗治疗; (7) 患者或家属签署知情同意书。

2.2 排除标准 (1) 有其他癌症病史者; (2) 近 3 个月内行侵入性治疗者; (3) 有炎症性肠病如溃疡性结肠炎或克罗恩病者; (4) 合并肠梗阻或肠穿孔行急诊手术者; (5) 精神类病史, 不能加入并规范完成临床调查者; (6) 孕妇或哺乳期妇女。

3 一般资料 选取 2019 年 3 月—9 月在哈尔滨医科大学附属第一医院经肠镜检查及病理诊断为结肠腺癌、符合中医辨证分型为湿热蕴结型的术前患者 30 例 (I 期 1 例, 占 3.33%; II 期 15 例, 占 50.00%; III 期 11 例, 占 36.67%; IV 期 3 例, 占 10.00%) 设为观察组, 男性 23 例, 女性 7 例, 年龄 42~80 岁, 平均 (62.27 ± 8.69) 岁; 经肠镜检查正常者为健康人 13 名, 设为对照组, 男性 8 名, 女性 5 名, 年龄 35~80 岁, 平均 (65.62 ± 11.10) 岁。本研究经哈尔滨医科大学附属第一医院伦理委员会审批 (No. IRB-AF/SC-04/01.0)。

4 粪便样品的采集、DNA 提取 收集两组研究对象当日大便或者住院后首次大便, 用一次性无菌采样器采集样品, 将样品装入无菌粪盒, 冻存于 -80 °C 的冰箱中。采用美国 Illumina 公司生产的 MiSeq Reagent Kit v3 试剂盒进行 DNA 的提取, 所得 DNA 提取液保存于 -80 °C 的冰箱中。

## 5 观察指标及方法

5.1 标本的 16S rDNA V3-V4 检测 标本检测由天昊生物公司完成, 首先对送检 DNA 样品进行检测, 检测合格后的样品构建文库; 回收目的扩增片段,

用 16S 特定引物对特异可变区 V3~V4 区域进行扩增。使用 Illumina MiSeq 平台进行细菌 16S rDNA 高通量测序。

5.2 物种组成及丰度分析 测序数据采用 QIIME 进行优化处理, 按照 97% 相似性建立菌群可操作单元 (operational taxonomic unit, OTU), 并在各分类水平分析菌群结构。通过对组间样本进行比较, 在各分类水平上找出两组中具有显著差异的物种, 以  $P < 0.05$  作为差异显著性筛选阈值。

5.3 Alpha 多样性分析 用于分析样品内的微生物群落多样性和丰富度, 采用 Chao 1, Shannon 和 Simpson 指标评估, 丰富度用 Chao1 指数表示, 多样性用 Shannon 和 Simpson 指数表示。采用 Wilcoxon 秩和检验 (两组样本) 或 Kruskal-Wallis 秩和检验 (三组或三组以上样本) 对组间多样性指数进行差异分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

6 统计学方法 采用 SPSS 22.0 进行统计学分析, 计量资料采用  $t$  检验, 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

1 两组肠道菌群门水平比较 (图 1, 表 1) 在门分类水平上, 观察组相对丰度较高的依次为厚壁菌门、变形菌门、拟杆菌门、放线菌门; 对照组相对丰度较高的依次为厚壁菌门、变形杆菌门、放线菌门、拟杆菌门。观察组拟杆菌门、放线菌门、变形杆菌门明显高于对照组 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 对照组厚壁菌门明显高于观察组 ( $P < 0.01$ )。

表 1 两组肠道菌群门分类水平的相对丰度比较 (% ,  $\bar{x} \pm s$ )

| 组别 | 例数 | 厚壁菌门           | 拟杆菌门           | 变形杆菌门          | 放线菌门         |
|----|----|----------------|----------------|----------------|--------------|
| 观察 | 30 | 59.90 ± 4.18** | 12.07 ± 3.31** | 16.77 ± 3.33** | 6.66 ± 1.31* |
| 对照 | 13 | 93.12 ± 0.94   | 0.54 ± 0.14    | 3.27 ± 0.87    | 2.72 ± 0.33  |

注: 与对照组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$

2 两组肠道菌群属水平比较 (图 2, 表 2) 观察组优势菌种以拟杆菌属、肠球菌属、大肠杆菌/志贺菌属为主, 对照组以肠球菌属、链球菌属、布劳特氏属、毛螺菌属、乳酸杆菌属为主; 其中观察组拟杆菌属、大肠杆菌/志贺菌属明显高于对照组 ( $P < 0.01$ )。

3 两组肠道菌群种分类水平比较 (表 3) 观察组大肠杆菌明显高于对照组 ( $P < 0.01$ )。

4 Alpha 多样性分析 (图 3) 患者和健康对照组之间在丰富度和多样性上差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

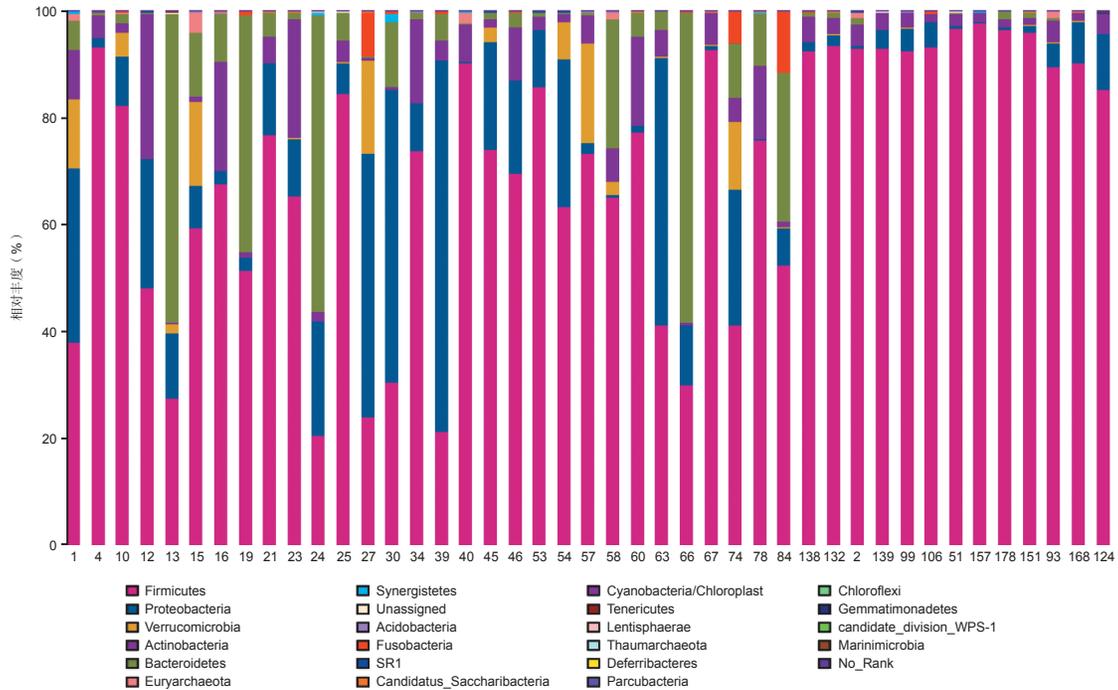


图 1 两组样本肠道菌群门分类水平的相对丰度

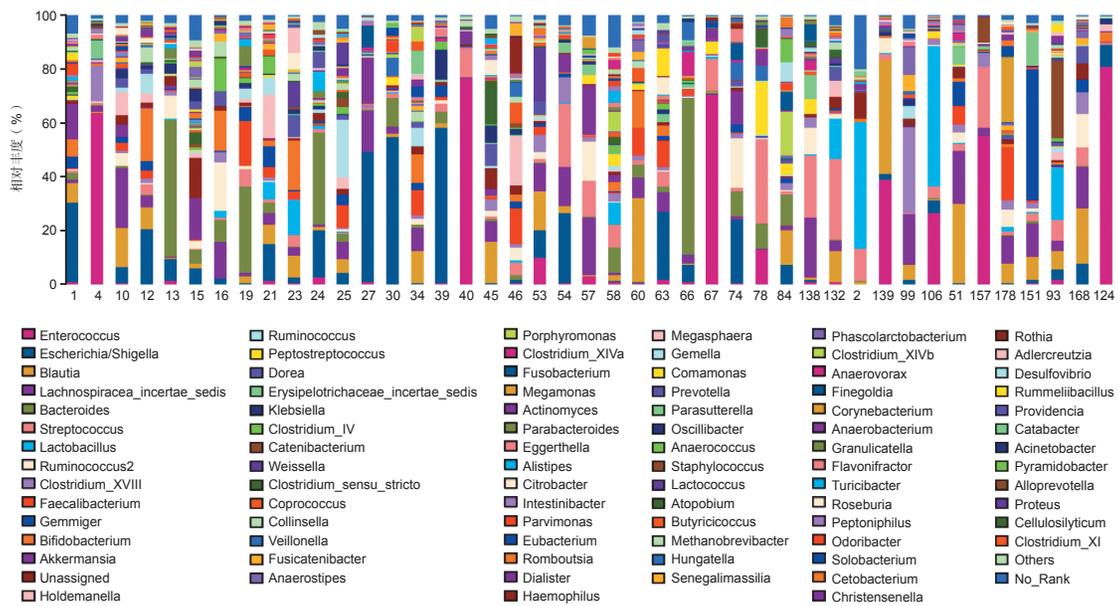


图 2 两组肠道菌群属分类水平的相对丰度

表 2 两组肠道菌群属类水平的相对丰度比较 (%,  $\bar{x} \pm s$ )

| 组别 | 例数 | 拟杆菌属         | 大肠杆菌/志贺菌属     |
|----|----|--------------|---------------|
| 观察 | 30 | 8.95 ± 2.74* | 12.44 ± 3.04* |
| 对照 | 13 | 0.22 ± 0.06  | 2.39 ± 0.79   |

注: 与对照组比较, \* $P < 0.01$

表 3 两组肠道菌群种类水平的相对丰度比较 (%,  $\bar{x} \pm s$ )

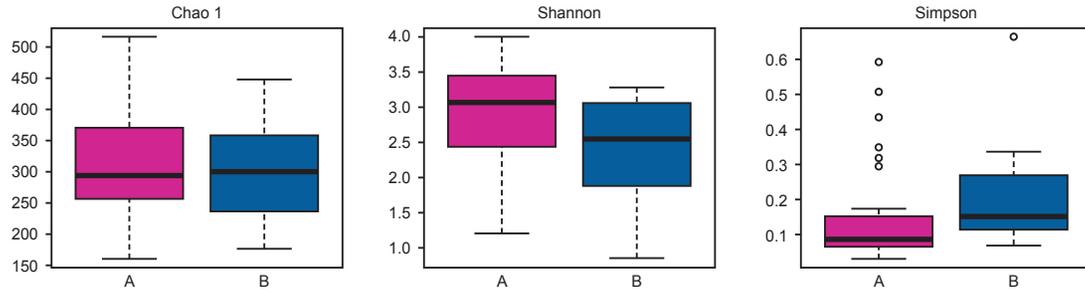
| 组别 | 例数 | 大肠杆菌          |
|----|----|---------------|
| 观察 | 30 | 12.42 ± 3.04* |
| 对照 | 13 | 2.39 ± 0.79   |

注: 与对照组比较, \* $P < 0.01$

5 湿热蕴结型结肠癌 II 期患者与 III 期患者肠道菌群属水平比较 (图 4, 表 4)。两组样本共计 26 例, II 期患者的双歧杆菌属、柯林斯菌属明显高于 III 期患者 ( $P < 0.05$ )。

### 讨 论

肠道菌群作为人体内最庞大的共生微生物生态系统, 参与着人体的消化过程、物质代谢、能量转化、



注: A 为观察组; B 为对照组

图 3 Alpha 多样性指数箱形图

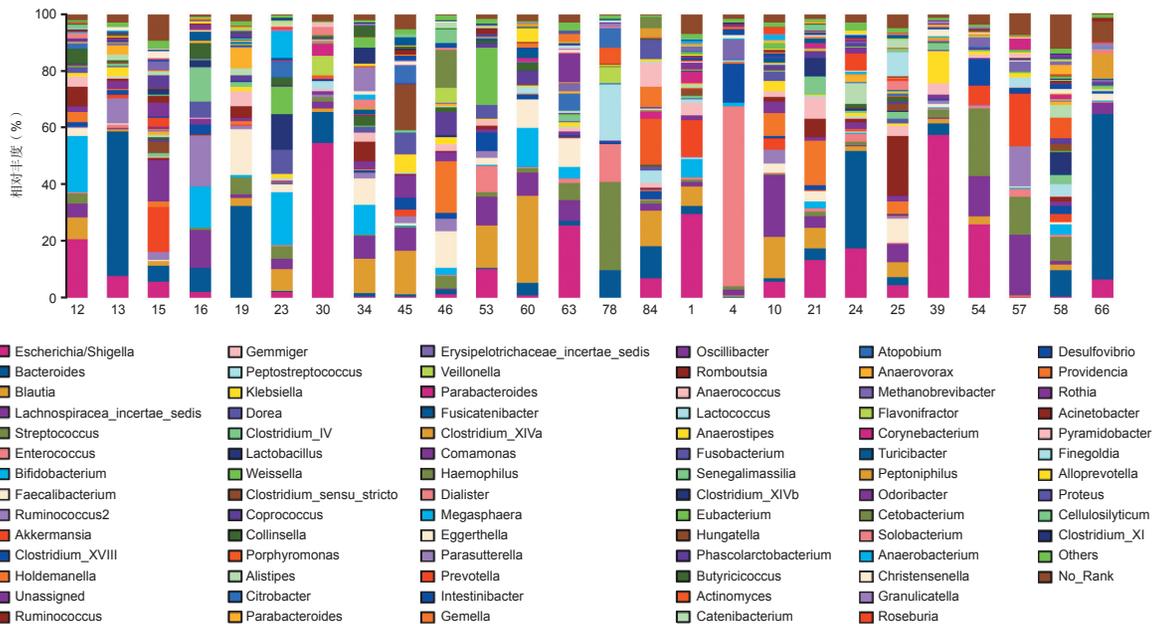


图 4 湿热蕴结型结肠癌 II、III 期患者肠道菌群分类水平的相对丰度

表 4 湿热蕴结型结肠癌 II、III 期患者肠道菌群属分类水平的相对丰度比较 (% ,  $\bar{x} \pm s$ )

| 组别    | 例数 | 双歧杆菌属        | 柯林斯菌属        |
|-------|----|--------------|--------------|
| II 期  | 15 | 5.67 ± 1.95* | 1.60 ± 0.51* |
| III 期 | 11 | 1.36 ± 0.62  | 0.32 ± 0.17  |

注: 与 III 期组比较, \* $P < 0.05$

免疫调节以及通过形成“生物菌膜”来抵御外源致病菌等作用。肠道菌群失调可通过多种途径影响肠道稳态, 如通过分泌代谢成分或刺激炎症因子分泌, 引起炎症反应等, 最终诱导产生致癌物质, 导致结肠癌的发生、发展并影响预后<sup>[18-20]</sup>。以辨证论治为基础的中医药治疗在结肠癌的早期预防和综合治疗中一直扮演着重要角色, 其中湿热蕴结是其主要证型<sup>[8,9]</sup>, 故选择湿热蕴结型结肠癌作为课题研究方向。

16S rDNA 高通量测序技术是目前肠道微生物领域应用最为广泛的一种方法<sup>[21,22]</sup>, 运用 16S rDNA 在结构与功能上具有高度保守性的特点, 可以检测已知

甚至未知的微生物种类, 达到更好的发现菌群结构差异的效果, 故选用 16S rDNA 高通量测序技术作为本研究的试验方法。术前肠道准备以及使用抗生素或微生物制剂是干扰肠道菌群的潜在因素<sup>[23-25]</sup>, 因此本研究所有患者标本均在术前或肠道准备前收集, 所有患者手术前一周未接受抗生素或微生物制剂, 尽可能避免抗生素和其他人为干扰对患者肠道菌群的影响。

本研究通过将湿热蕴结型结肠癌患者与健康人的肠道菌群物种组成进行测序分析对比, 发现在门、纲、目、科、属、种 6 个水平上两组样本均有差异变化。经过逐级细化, 最终发现两组样本的肠道菌群的组成结构差别, 主要体现在属水平上, 观察组中大肠杆菌属的相对丰度明显高于健康对照组 ( $P < 0.01$ ), 但在 II、III 期, 病理分型都为腺癌的结肠癌患者之间, 大肠杆菌的丰度差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。本研究, 应用 16S rDNA 测序方法检测了 II、III 期, 病理分型都为腺癌的结肠癌患者之间肠道菌群的差异, 发现在

属分类水平上, II 期患者的双歧杆菌属、柯林斯菌属明显高于 III 期患者 ( $P < 0.05$ )。

在健康状态下, 肠道内的益生菌和致病菌维持着平衡状态, 但是一旦由于某些因素导致机体的内、外环境发生变化, 致病菌会趁机大量繁殖, 以此引发肠道菌群失调。肠道菌群失调后, 致病菌数量的增多, 产生大量毒性因子损伤人肠道上皮细胞。大肠杆菌是肠道中最主要且数量最多的一种细菌, 大部分为条件致病菌, 在特定条件下能够诱导慢性炎症和毒素的产生<sup>[26]</sup>。根据获得的毒力因子, 将大肠杆菌分为 4 个系统发育类群 (A、B1、B2、D)。来自系统类群 A 和 B1 的大肠杆菌一般不具有致病性, 而系统类群 B2 和 D 参与肠道和肠外疾病<sup>[27]</sup>。Vezant J 等<sup>[28]</sup> 将结肠癌相关大肠杆菌菌株定植到 ApcMin<sup>+/+</sup> 小鼠中导致息肉数量的增加。不同病理分型的结肠息肉是结肠癌癌前病变的高危因素<sup>[29]</sup>。Bonnet M 等<sup>[30]</sup> 发现致病性环调蛋白阳性大肠埃希菌在 III / IV 期结肠癌患者黏膜中的比例明显高于 I 期结肠癌患者。上述研究表明不同分类的大肠杆菌是促进结肠癌发生、发展并影响其分期和预后的因素之一。

结直肠癌中医证型分布中, 湿热蕴结型占比较高<sup>[7,8]</sup>。在动物实验中, 大肠杆菌已日渐成为标准的湿热证诱导剂。相关研究表明大肠杆菌是导致湿热证产生的主要因素之一<sup>[31,32]</sup>。本试验结果表明, 湿热蕴结型结肠癌组大肠杆菌的相对丰度明显增高。综上所述, 大肠杆菌既能诱导湿热证, 也能促进结肠癌发生、发展。后续研究需要进一步明确哪类致病性大肠杆菌是直接促使湿热证肠道环境进展为结肠癌, 这可以为结肠癌提供更加精准的治疗靶点。

本研究发现随着临床分期的进展, 肠道内双歧杆菌丰度在减少。双歧杆菌是最为常见的益生菌之一, 其可促进炎症因子分泌, 激发吞噬细胞活性, 以增强免疫系统对抗肠道感染, 稳定肠道黏膜屏障, 预防结肠癌<sup>[33,34]</sup>。利用临床上较为常用的益生菌——双歧杆菌三联活菌以改善肠道菌群失调, 逆转结肠癌的进展, 可能是值得今后关注的一个问题。

利益冲突: 无。

#### 参 考 文 献

- [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394-424.
- [2] Evelien D, Pieter JT, Jasper LAV, et al. Colorectal cancer[J]. Lancet, 2019, 394(10207): 1467-1480.
- [3] Montalban-Arques A, Scharl M. Intestinal microbiota and colorectal carcinoma: Implications for pathogenesis, diagnosis, and therapy[J]. EBioMedicine, 2019, 48: 648-655.
- [4] Wiczorska K, Stolarek M, Stec R. The role of the gut microbiome in colorectal cancer: Where are we? Where are we going?[J]. Clin Colorect Cancer, 2020, 19(1): 5-12.
- [5] 胡慧菁, 罗家祺, 杜丽华, 等. 手术前后大肠癌中医证型变化规律研究[J]. 云南中医学院学报, 2014, 37(1): 53-55.
- [6] 邱艳艳, 梁波, 胡送娇, 等. 大肠癌中医证型分布特点的现代文献研究[J]. 上海中医药大学学报, 2014, 28(6): 52-55.
- [7] 王国娟, 余文燕. 大肠癌中医证型规律研究[J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(3): 837-840.
- [8] 冯小雪, 燕忠生. 大肠癌中医证型的研究进展[J]. 中国当代医药, 2019, 26(34): 24-27.
- [9] 葛青云, 陈玉根. 基于现代文献分析大肠癌中医证型及症状、体征分布规律[J]. 吉林中医药, 2018, 38(6): 625-628.
- [10] Qin J, Li R, Raes J, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing[J]. Nature, 2010, 464(7285): 59-65.
- [11] Rajilić-Stojanović M, de Vos WM. The first 1 000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota[J]. FEMS Microbiol Rev, 2014, 38(5): 996-1047.
- [12] He Z, Gharaibeh RZ, Newsome RC, et al. *Campylobacter jejuni* promotes colorectal tumorigenesis through the action of cytolethal distending toxin[J]. Gut, 2019, 68(2): 289-300.
- [13] Thakur BK, Malaisé Y, Martin A. Unveiling the mutational mechanism of the bacterial genotoxin colibactin in colorectal cancer[J]. Mol Cell, 2019, 74(2): 227-229.
- [14] Chew SS, Tan LT, Law JW, et al. Targeting gut microbial biofilms—a key to hinder colon carcinogenesis?[J]. Cancers (Basel), 2020, 12(8): 2272.

- [ 15 ] Bosman FT, Carneiro F, Hruban R H, et al. World Health Organization classification of tumours of the digestive system[M]. Lyon: IARC Press, 2010: 132-145.
- [ 16 ] AMIN MB, EDGE SB, GREENE FL, et al. AJCC cancer staging manual[M]. 8th ed.Chicago: Springer, 2017: 251-274.
- [ 17 ] 中华中医药学会主编. 肿瘤中医诊疗指南 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2008: 26-27.
- [ 18 ] Schoeler M, Caesar R. Dietary lipids, gut microbiota and lipid metabolism[J]. Rev Endocr Metab Disord, 2019, 20 ( 4 ): 461-472.
- [ 19 ] Gao R, Kong C, Huang L, et al. Mucosa-associated microbiota signature in colorectal cancer[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2017, 36 ( 11 ): 2073-2083.
- [ 20 ] Flemer B, Lynch DB, Brown JM, et al. Tumour-associated and non-tumour-associated microbiota in colorectal cancer[J]. Gut, 2017, 66 ( 4 ): 633-643.
- [ 21 ] Yu SY, Xie YH, Qiu YW, et al. Moderate alteration to gut microbiota brought by colorectal adenoma resection[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2019, 34 ( 10 ): 1758-1765.
- [ 22 ] 郭世奎, 王昆华, 包维民, 等. 手术处理对结直肠癌患者肠道菌群变化的临床研究 [J]. 结直肠肛门外科, 2010, 16 ( 4 ): 201-206.
- [ 23 ] 虞思祎. 结直肠肿瘤手术对肠道菌群影响的研究 [D]. 上海: 上海交通大学, 2018.
- [ 24 ] 沈洁心, 逯茂洋. 肠道菌群的检测方法及最新研究进展 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2017, 17 ( 102 ): 85, 87.
- [ 25 ] 杨波, 铁宝霞, 蔡小玲, 等. 肠道微生态研究方法及应用研究进展 [J]. 广西医学, 2018, 40 ( 10 ): 1219-1221.
- [ 26 ] 李玲玲, 陈硕, 刘海朝, 等. 肠道中特异性菌群与结直肠癌的发生发展关系 [J]. 中国微生态学杂志, 2019, 31 ( 8 ): 976-979.
- [ 27 ] Bonnet M, Buc E, Sauvanet P, et al. Colonization of the human gut by *E. coli* and colorectal cancer risk[J]. Clin Cancer Res, 2014, 20 ( 4 ): 859-867.
- [ 28 ] Veziant J, Gagnière J, Jouberton E, et al. Association of colorectal cancer with pathogenic *Escherichia coli*: focus on mechanisms using optical imaging[J]. World J Clin Oncol, 2016, 7 ( 3 ): 293-301.
- [ 29 ] Shah J, Shahidullah A. Spontaneous expulsion per rectum of a colorectal polyp: a rare and unusual case[J]. Gastroenterol Res, 2018, 11( 4 ): 329-332.
- [ 30 ] Bonnet M, Buc E, Sauvanet P, et al. Colonization of the human gut by *E. coli* and colorectal cancer risk[J]. Clin Cancer Res, 2014, 20 ( 4 ): 859-867.
- [ 31 ] 陈弋, 王琛, 徐秋英, 等. 两种岭南湿热证小鼠模型肠道菌群动态变化的研究 [J]. 世界科学技术 - 中医药现代化, 2020, 22 ( 7 ): 2186-2197.
- [ 32 ] 何雪萍, 吕军影, 阙铁生, 等. 清热祛湿法对温病湿热证大鼠舌及胃组织 AQP-1 表达的影响 [J]. 时珍国医国药, 2014, 25 ( 6 ): 1515-1519.
- [ 33 ] Agah S, Alizadeh AM, Mosavi M, et al. More protection of *Lactobacillus acidophilus* than *Bifidobacterium bifidum* probiotics on azoxymethane-induced mouse colon cancer[J]. Probiotics Antimicrob Proteins, 2019, 11 ( 3 ): 857-864.
- [ 34 ] Golkhalkhali B, Rajandram R, Paliany AS, et al. Strain-specific probiotic ( microbial cell preparation ) and omega-3 fatty acid in modulating quality of life and inflammatory markers in colorectal cancer patients: a randomized controlled trial[J]. Asia Pac J Clin Oncol, 2018, 14 ( 3 ): 179-191.

(收稿: 2020-10-24 在线: 2021-03-03)

责任编辑: 李焕荣  
英文责编: 张晶晶