



doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2023.02.006
http://dx.doi.org/10.7659/j.issn.1005-6947.2023.02.006
China Journal of General Surgery, 2023, 32(2):211-220.

· 基础研究 ·

Oddi括约肌功能障碍胆道结石患者的临床与胆道菌群特征分析

侯晓凡, 赵占学, 武金都, 张浩, 霍峥, 李笑, 李晨睿, 赵东豫, 刘林勋

(青海省人民医院肝胆胰外科, 青海 西宁 810000)

摘要

背景与目的: 研究显示, 胆道结石 (GSD) 的产生与胆道微生物群的变化有关, 而Oddi括约肌 (SO) 作为肠道与胆道之间的屏障, 其功能障碍导致胆道微生物群变化情况尚不明。因此, 本研究探讨存在SO功能障碍 (SOD) 的GSD患者的临床特征以及胆管内微生物菌群与SO功能正常GSD患者菌群差异。

方法: 前瞻性招募2019—2021年间青海省人民医院行急诊手术治疗的胆囊结石伴胆总管结石患者14例, 根据术中所测SO压力值, 其中7例存在SOD (SOD组), 7例SO功能正常 (SO正常组)。收集所有患者术前及术后3个月胆汁标本, 对所收集的样本进行16S rRNA基因提取及扩增子测序, 用QIIME 2微生物组生物信息学平台分析16S rRNA基因扩增子测序数据。

结果: SOD组患者术前白细胞计数明显高于SO正常组患者 ($P < 0.05$), 而两组患者间其他相关化验指标及一般情况均无明显差异 (均 $P > 0.05$)。所有病例中均发现了不同的胆汁微生物群落; 丰度等级曲线分析结果表明, SOD组术后标本的菌群丰度最高, 随后依次为SO正常组术后样本、SOD组术前样本、SO正常组术前样本; 两组患者的4组胆汁样本中的菌群属分布各不相同, 相对于SO功能正常的GSD患者, 有SOD的GSD患者的菌群种类更加集中在埃希氏菌属、梭状芽孢杆菌属和肠球菌属。

结论: 存在SOD的GSD患者的炎症负荷更高、胆道菌群的丰度显著增加, 较SO功能正常的GSD患者, 出现更多与结石相关的菌群, 可能更易引起胆道感染与结石复发。

关键词

胆石症; 奥狄括约肌; 微生物群; 宏基因组学

中图分类号: R657.4

Analysis of the clinical and on biliary microflora features in patients with cholelithiasis and Oddi sphincter dysfunction

HOU Xiaofan, ZHAO Zhanxue, WU Jindu, ZHANG Hao, HUO Zheng, LI Xiao, LI Chenrui, ZHAO Dongyu, LIU Linxun

(Department of Hepatobiliary and Pancreatic Surgery, Qinghai Provincial People's Hospital, Xining 810000, China)

Abstract

Background and Aims: Studies have indicated that gallstone disease (GSD) is related to the alterations of the bile duct microbiome. However, the bile duct microbiome changes caused by abnormal function of

基金项目: 青海省科技厅科技计划基金资助项目 (2018-ZJ-758)。

收稿日期: 2022-04-15; **修订日期:** 2022-07-20。

作者简介: 侯晓凡, 青海省人民医院硕士研究生, 主要从事胆道、胰腺方面的研究。

通信作者: 刘林勋, Email: lxzyxp@sina.com

the sphincter of Oddi (SO) that serves as the barrier between the intestinal tract and biliary tract are not fully known. Therefore, this study investigated the differences in clinical features and bile tract microbiotas between GSD patients with concomitant SO dysfunction (SOD) and GSD patients with normal SO function.

Methods: Fourteen patients with cholecystolithiasis and choledocholithiasis undergoing an emergency operation from 2019 to 2021 in Qinghai Provincial People's Hospital were prospectively recruited. Of the patients, 7 cases presented with SOD (SOD group), and 7 cases had normal SO function (normal SO group) according to the value of the SO pressure determined during operation. All patients' bile specimens were obtained before and three months after the operation. The 16S rRNA genes were extracted from the collected samples, and amplicon sequencing was performed. Then, the amplicon sequencing data of the 16S rRNA genes were analyzed using QIIME 2 microbiome bioinformatics platform.

Results: The preoperative white blood count in patients of the SOD group was significantly higher than that of the normal SO group ($P<0.05$). At the same time, the parameters of other laboratory tests and the general conditions showed no significant difference between the two groups of patients (all $P>0.05$). Different bile duct microbiotas were observed in all patients. The microbial abundance was highest in the postoperative samples from the SOD group, followed by postoperative samples from the normal SO group, preoperative samples from the SOD group, and preoperative samples from the normal SO group, successively. The distributions of species of the microbiota of the four groups of bile samples from the two groups were different from each other, and the bacterial communities involved in GSD patients with SOD were predominantly of *Escherichia*, *Clostridium*, and *Enterococcus* versus GSD patients with normal SO function.

Conclusion: GSD patients with SOD have a higher inflammatory burden and significantly increased microbial abundance. They present increased species of bacteria associated with cholelithiasis compared with GSD patients with normal SO function, which may more likely cause biliary tract infection and recurrent stones.

Key words Cholelithiasis; Sphincter of Oddi; Microbiota; Metagenomics

CLC number: R657.4

胆道结石 (gallstone disease, GSD) 作为良性疾病, 在中国、日本和韩国等亚洲国家发病率明显高于西方国家, 并且 GSD 是导致胆囊炎、胰腺炎或其他并发症^[1]的主要原因, 同时增加了心血管疾病^[2-3]的发生风险。胆道结构、饮食结构和卫生条件等被认为是导致胆总管结石 (common bile duct stones, CBDS) 发生的原因^[4-6]; 有研究显示, 炎症、感染和胆管结石有密切的联系^[7], 并且 Oddi 括约肌功能障碍 (sphincter of Oddi dysfunction, SOD) 与胆管结石有关, 可能是由于肠道内容物的回流增强, 从而改变了微环境^[8]。然而, 其微环境尚未得到全面的研究, 也很少有前瞻性研究提出直接证据。SOD 包括一系列临床综合征, 包括引起间

歇性或固定的类结石性阻塞, 阻碍胆汁或胰液的自由流动, 也被称为“胆道运动障碍”, 但这只表示功能障碍, 而不是解剖障碍^[9]。其表现为胆道和 (或) 胰腺疾病的症状和体征, 其他体征和症状包括肝功能异常或胰酶升高、胆总管 (common bile duct, CBD) 或胰管扩张以及复发性胰腺炎^[10]。Oddi 括约肌 (sphincter of Oddi, SO) 控制胆汁的单向流出, 将胆管与充满细菌的肠道分离^[11]。SOD 可导致胆管微环境的显著变化, 研究^[12]表明具有腐蚀性的肠道内容物反流所导致的胆道菌群改变和炎症反应可能是导致胆管结石的形成关键。

胆管微生物群和胆汁组成部分是胆管微环境的重要组成部分, 在胆管结石中起着关键作用。

以往的研究已经确定了许多与胆道感染相关的潜在病原体,而SOD患者微环境的变化却鲜为人知。研究^[13]表明,CBDS患者的所有胆汁微生物群均可在上消化道检测到,且胆汁微生物群与十二指肠液样本更相似。另有研究^[14]表明,口腔和呼吸道菌群在胆汁样本中比肠道菌群更一致。因此,除了肠道种类外,来自口腔/呼吸道的细菌也可能与人类胆道感染有关。但是胆管中微生物群和SOD的相互影响的诸多因素尚未明了。

由于SO损伤可加重术后胆管炎和结石的复发概率,已经越来越受到人们的重视^[15]。本研究分析存在SOD的GSD患者的临床特点,以及此类患者与SO功能正常的GSD患者胆管内微生物菌群差异。16S rRNA^[16]或核糖体DNA(rDNA)序列分析由于其通量高和测序的自动化以及快速准确全面获得样品细菌群落组成的优势已成为作为确定细菌之间关系的主要工具,因此,本研究用QIIME 2分析微生物组16S rRNA基因扩增子测序数据的方法研究菌群的变化。

1 材料与方法

1.1 研究对象

前瞻性招募2019—2021年青海省人民医院肝胆外科急诊手术行胆囊切除术+胆总管探查术+“T”管引流术(手术方式为开腹和腹腔镜)的14例住院患者作为研究对象,收集并记录患者炎症指标及肝功能情况,两次收集患者胆管胆汁标本均取得患者及其家属的同意,且符合伦理委员会的要求并在相关文书上签字(伦理批件号:2018-49)。伴有其他胆道疾病,如肝胆胰系统恶性肿瘤、胆道畸形、肝硬化、胆源性胰腺炎、消化道重建术后的患者;急诊手术前和(或)二次收集胆汁标本3 d内使用抗生素及益生菌等可能影响肠道菌群药物的患者均予以排除。在实施任何胆管手术之前,应用5 mL无菌空针收集患者的胆管胆汁标本,并于术后3个月在青海省人民医院肝胆外科门诊行经“T”管的胆道探查术和经“T”管的顺行SO基础压测定,并再次收集患者胆管胆汁标本。

1.2 标本的采集与处理

根据术中所测SO压力值,将患者分为SO功能异常组(SOD组)和SO功能正常组(SO正常组)。SOD组7例:男性3例,女性4例,年龄60~77岁;

SO正常组7例:男性4例,女性3例,年龄35~76岁。采集患者术前(术中获取)与术后共28个胆汁标本。

依据分组信息将标本分装处理如下:胆汁标本在充分打匀之前室温下常规解冻,用经校对的标准移液枪把1 mL的胆汁装入规格为2 mL的无菌抗黏附离心管(Coming公司,美国),余标本按医疗垃圾处理。上述操作过程在标准无菌操作台进行,等待操作的解冻胆汁暂时放入干冰中低温保存。由作者本人将分装好的标本送检武汉华大基因测序实验室,在干冰剩余量达到1/2之前送交实验室,然后转存于-80℃的超低温冰箱中备用。

1.3 SOD评判方法及标准

Oddi括约肌测压法(sphincter of Oddi manometry, SOM)常用的方法为在逆行胰胆管造影术下进行测压。本实验由于自身的特殊性,需行经“T”管的胆道镜下顺行SOM测得SO的基础压,而经“T”管的顺行SOM由于胆管的完整性被破坏,导致实际测得的SO压力值偏小,无法使用现有的逆行SOM的参考值比较,在查阅相关文献后,本研究采取的是经Tondelliet对SOD所定义的“T”管流体压力为SO压力>30 mmHg(1 mmHg=0.133 kPa)^[17-18]。具体方法:即用注射器外筒接到已放置好的T型管的长臂上,将注射筒注满盐水后升降其位置,观察筒内液体不再下降而维持静止时,筒内水平面与胆管间的距离即为胆道压。依据此定义,笔者改良了经“T”管的胆道镜下顺行测压法的方法,由1位高年资并有3年以上术中胆道镜操作经验的医师通过胆道镜(奥林巴斯胆道镜,镜身编号:MAL207,日本)完成。

具体操作步骤如下:(1)在镜下观察SO的外观、收缩功能10 min左右;(2)胆道镜观察括约肌持续开大、能通过Oddi的括约肌而无须任何扩张方式即可顺利到达十二指肠或部分患者可见肠道内容物反流可判断为SO松弛;(3)胆道镜观察到炎症或纤维化导致括约肌结构异常,出现部分狭窄及全部狭窄,判断SO有无收缩不良、括约肌松弛,括约肌炎症、纤维化、解剖及结构异常;(4)通过经“T”管窦道的顺行SOM测得SO的基础压,测得3次基础压力后取平均数,将SO基础压>30 mmHg定义为SO运动功能过强或者痉挛,SO基础压<5 mmHg定义为SO运动功能不足,SO基础压5~15 mmHg为SO功能基础压正常值,把SO基础压力

15~30 mmHg 为压力略升高组，并将压力>30 mmHg 和<5 mmHg 定义为 SOD。纳入的 7 例 SOD 患者的各标本具体情况见表 1。

表1 SOD 患者的SO 状态及SO 基础压

Table 1 SO status and SO basal pressure in patients with SOD

序号	SO 状态	SO 基础压(mmHg)
1	炎症	32.8
2	瘢痕狭窄	34.9
3	松弛	4.3
4	纤维化	35.0
5	松弛	3.6
6	炎症伴少许纤维化	36.8
7	炎症	31.5

1.4 脱氧核糖核酸提取及测序

脱氧核糖核酸提取及测序由华大基因测序平台完成，过程如下：应用微生物 DNA 提取试剂对细菌进行遗传物质提取，然后采用超微量分光光度计 (Nanodrop) 对 DNA 进行定量分析，最后将提取物放入溶度不同的琼脂里通电，分析其的质量。为了控制 PCR 的偏倚，将获得 DNA 样品分为 3 个试管，进行 PCR 低倍数扩张，然后将同一样品的 3 管 PCR 扩增产物混合，拿出一些质量较好的脱氧核糖核酸样本 30 ng，加入一些与之相对应的引物，一起放入 PCR 扩增容器中，设置好机器的参数，进行低倍数的扩增，把扩增好的溶液用 DNA 吸引磁珠与之前混入的引物进行分离和纯化，并且把纯化好的遗传物质，进行标记并且溶解在洗脱缓冲液 (elution buffer) 中，完成测序前的准备工作。对纯化物进行再次质控，选择试剂为安捷伦 2100，对再质控的合格样本选择合适的平台进行测序，一般选择 HiSeq 平台。

1.5 测序下机数据的处理

1.5.1 信息分析流程 进一步过滤从测序机器中生成的数据，把杂乱的数据整理清楚，高质量的碱基排列留下来进一步分析，通过序列间的重叠片段拼接成 Tag，并且将 Tag 聚类成可操作分类单元 (operational taxonomic unit, OTU)，把 OTU 与基因数据库进行比较和物种注释，以便于后面的生物学信息分析以及关联分析与模型预测等。

1.5.2 数据过滤 对测序的下机原始数据处理获得 Clean Data，步骤如下：(1) 将能匹配到引物的 reads，用软件 cutadapt v2.6 截取掉引物和接头污染，

得到目标区域的片段；(2) 使用窗口平均消除最低质量法：通过设置 30 bp 长度的窗口，把窗口平均质量≤20 的数值序列，开始截掉它的所有碱基末端序列，同时将最终长度低于原长度的 75% 的碱基配对直接删除；(3) 去除含 N 的 reads；(4) 去掉连续 10 个 ATCGreads (因复杂度低)，以获得最终的 Clean data。

1.5.3 Tag 连接 (1) 如果聚类方法是 Usearch，要用 Tag 直接进行 OTU 聚类。使用 DNA 序列拼接软件 FLASH，利用 2 个碱基之间的重叠其余，把多个碱基拼接成 1 个高变区的 Tag。拼接必须满足以下条件：匹配的碱基序列长度最小值为 15 bp；2 个碱基序列重叠的区域错误率必须控制在≤0.1。(2) 如果聚类方法是 DADA2，将在 DADA2 包中处理 Tag，不作为质控指标。

1.5.4 OTU 聚类结果统计 Usearch：按照 97% 序列相似性聚类生成 OTU；DADA2：通过去噪的序列以 100% 的相似度聚类来生成 ASV 序列，统称为 OTU。Usearch：使用 USOARCH (v7.0.1090_i86 linux32) 软件聚类已经完成拼接的 Tag，生成 OTU，具体拼接的过程：(1) 用 UPARSE 程序聚类相似度 97% 以上的碱基序列，从而获得 OTU 的代表序列；(2) 把低循环 PCR 扩增后所产生的嵌合子从所要得到的 OTU 代表序列中减去；(3) 通过 Usearch_global 程序工具，将 Tags 和形成的 OTU 代表序列加以比较，这样就获得了每个样本 OTU 丰度的统计表格。DADA2：利用软件 QIIME2 中的 DADA2 方法去噪，获得扩增子序列变异 (amplicon sequence variants, ASV)，ASV 为 100% 相近的序列。进而得到特征表 (feature table，对 ASV/OTU 等的统称)。其主要过程如下：(1) 利用 qiime tools import 导入过滤后的双端序列；(2) 利用 qiime dada2 denoise-paired 命令将导入后的双端序列基于 DADA2 的方法构建特征表；(3) 利用 qiime tools export 将特征表转换成可以直接查看的格式。

1.5.5 OTU 注释 把获得的 OTU 代表序列与现有的微生物数据使用 RDP classifier (1.9.1) 软件进行对比。对比后对 OTU 序列进行物种注释，物种注释的置信度数值设定为 0.6。删除数据库中没有的注释碱基和不在本研究范围以内的物种注释，剩下的 OTU 用于统计学分析。

1.6 统计学处理

采用 SPSS 25.0 软件进行数据整理和统计分析：

定量数据符合正态分布使用均数 \pm 标准 ($\bar{x} \pm s$) 差进行描述, 不符合正态分布则采用中位数 (四分位数间距) [$M(IQR)$] 表示。定量数据符合正态分布采用方差分析进行比较, 不符合则采用非参数检验进行比较; 定性数据采用例数 (百分比) [$n(\%)$] 表, χ^2 检验进行分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患者一般情况及术前相关化验指标对比结果

两组患者一般情况及术前相关化验指标对比见表2, 两组间白细胞计数差异明显 ($P < 0.05$), 表明在SOD组中患者的全身炎症反应可能更重。两组间其余指标差异无统计学意义 (均 $P > 0.05$)。

表2 两组患者一般情况及术前相关化验指标比较 ($n=7$)

Table 2 Comparison of the general conditions and preoperative laboratory indicators between the two groups of patients ($n=7$)

项目	SOD组	SO正常组	P
性别[n(%)]			
男	3(42.9)	4(57.1)	—
女	4(57.1)	3(42.9)	
年龄[岁, $\bar{x} \pm s$]	68.29 \pm 6.47	56.86 \pm 14.59	0.084
白细胞 $\times 10^9/L, \bar{x} \pm s$]	12.36 \pm 3.31	4.30 \pm 1.44	0.006
超敏C反应蛋白[mg/L, $M(IQR)$]	1.84(0.40~4.04)	0.26(0.200~2.99)	0.259
总胆红素[$\mu\text{mol/L}, M(IQR)$]	42.00(32.30~91.00)	42.40(25.60~50.50)	0.710
直接胆红素[$\mu\text{mol/L}, M(IQR)$]	15.00(10.10~46.00)	17.40(8.00~22.40)	0.902
γ -碱性磷酸酶[U/L, $M(IQR)$]	537.00(120.00~831.00)	196.00(138.00~430.00)	0.535

2.2 样本序列及ASV/OTU

得到清晰测序数据后使用Usearch方法聚类, 利用软件的Usearch将相似度 $\geq 97\%$ 的碱基序列归并为一个OTU。最后获取了高质量序列1 717 983条, 在去除序列均数为一的ASV序列之后, 收集到了1 706 982条最终有效序列, 平均为(60 963.64 \pm 6 698.753)条, 每个样本的数据量产出状况和ASV/OTU结果见表3; 各样本有效碱基序列所占总量的百分比(图1)及各样本ASV/OTU数占总量的百分比(图2)用饼状统计图表示。

结果显示, 所测的各样本中有效碱基序列较均匀, 说明各样本中细菌总量较均匀。而对有效碱基进行聚类后发现各样本中的OTU/ASV数量差异较大, SOD组病例2术前样本(7%)、SOD组病例2术后样本(15%)、SOD组病例5术后样本(9%)、SO正常组病例11术后样本(10%)占比较高, 说明这几个样本物种丰富度较高, 但增加的丰富度是由个体差异造成的, 还是能代表该组样本总体情况, 仍需结合后面的多样性分析及物种注释情况进行进一步的分析。

2.3 OTU统计分析结果

2.3.1 总体样本物种累积曲线 衡量和预测样本中物种丰富度的方法很多, 物种累积曲线是最好的

途径之一, 横坐标为样本量, 纵坐标为检测出的物种数量, 蓝色阴影表示的是置信区间, 曲线上的纵坐标随着横坐标数值升高, 当纵坐标达到某一数值时曲线趋向水平。从图形上来看, 当样本量达到30指标时曲线几乎接近水平, 继续增加样本量, 再无新的物种出现。说明本研究中的样本已达到研究要求所需, 该样本的数量和测序深度能够反映出样本中群落的结构情况(图3)。

2.3.2 丰度等级曲线 丰度等级曲线(rank-abundance曲线)将各组样本中的ASV/OTU按数量大小顺序排列, 然后以各组的丰度值为纵坐标用折线将各组中的ASV/OTU互相连接完成。从图4可以看出, SOD组术后的菌群丰度最高, 其次是SO正常组术后、SOD组术前、SO正常组术前样本。对于SOD组胆道菌群数量的增加是否由于SO发生异常后, 肠道内的菌群进入胆道导致胆道内菌群数量增加, 还要结合后续的分析判断增加的菌群是否为肠道中常见菌群。

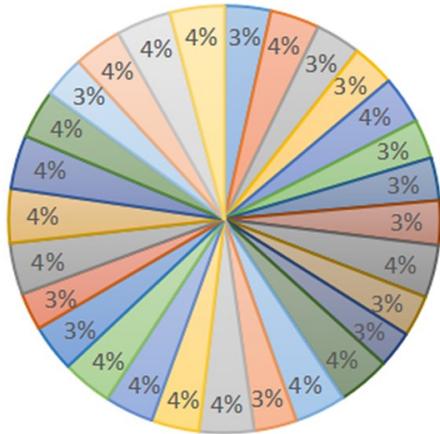
2.3.3 物种丰度热图 为了发现优势菌属在样本中的聚集情况及相对丰度, 根据所有样本在属水平的物种注释信息, 选取丰度排名前32的物种的属水平, 从样本和物种2个层次进行了聚类, 绘制成热图(图5)。该图颜色越红说明这个菌在这个组

中的含量比其他组要多，蓝色是负值，表示该菌的相对含量比其他组要低，可以整体看出各组之间菌群属之间的差异性较大，每组的优势菌群与其他组之间的分布明显不同。SOD组术前的菌群属较集中在右下角，物种相对丰度值也集中在右下角，而SOD组术后样本中的菌落在属水平上相对来说菌落较分散，并且优势菌群较为集中只有

埃希氏菌属 (*Escherichia*) (相对系数 1.96)，其次是梭状芽孢杆菌属 (*Clostridium sensu stricto*) (相对系数 0.34)，肠球菌属 (*Enterococcus*) (相对系数 0.24)。SO正常组术后样本之间菌群丰度较其术前样本在属水平上也相对较分散，但与SOD组术后样本之间的优势菌群存在明显差异。

表3 样本的数据量产出情况及ASV/OTU结果统计
Table 3 Sample data volume output and ASV/OTU results

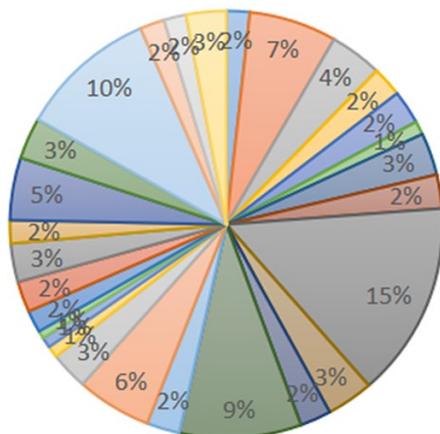
样本	高质量序列(条)	最终有效序列(条)	Tag平均长度(pb)	Tag数目	ASV/OTU(个)
SOD组术前					
1	59 650	59 517	428±1	59 474	24
2	62 950	62 786	406±3	62 710	90
3	58 096	57 792	428±1	57 708	54
4	55 241	54 951	428±1	54 863	31
5	62 053	61 492	428±2	61 400	35
6	51 101	50 765	428±1	50 641	14
7	55 433	55 250	416±10	55 193	44
SOD组术后					
1	58 106	57 551	425±8	57 092	35
2	68 595	67 783	421±8	60 712	203
3	53 497	53 314	429±3	53 133	48
4	47 160	47 060	410±8	46 858	32
5	67 404	67 167	427±7	62 989	125
6	66 504	65 826	428±2	63 988	34
7	54 630	54 443	429±2	54 385	77
SO正常组术前					
1	70 581	70 062	428±2	62 093	39
2	61 557	61 071	428±2	61 023	12
3	62 828	62 481	428±1	62 329	11
4	64 931	64 511	428±3	63 544	8
5	61 410	61 003	428±1	60 811	23
6	48 654	48 286	425±8	48 241	32
7	67 606	66 633	428±2	62 529	40
SO正常组术后					
1	70 305	69 905	424±7	62 211	24
2	69 876	69 534	423±10	63 288	65
3	62 788	62 406	423±10	60 812	43
4	54 307	54 014	422±9	53 315	142
5	61 965	61 672	425±8	61 603	25
6	70 869	70 290	427±5	63 869	23
7	69 886	69 417	427±6	61 887	41



- SOD 组术前例 1
- SOD 组术后例 1
- SO 正常组术前例 1
- SO 正常组术后例 1
- SOD 组术前例 2
- SOD 组术后例 2
- SO 正常组术前例 2
- SO 正常组术后例 2
- SOD 组术前例 3
- SOD 组术后例 3
- SO 正常组术前例 3
- SO 正常组术后例 3
- SOD 组术前例 4
- SOD 组术后例 4
- SO 正常组术前例 4
- SO 正常组术后例 4
- SOD 组术前例 5
- SOD 组术后例 5
- SO 正常组术前例 5
- SO 正常组术后例 5
- SOD 组术前例 6
- SOD 组术后例 6
- SO 正常组术前例 6
- SO 正常组术后例 6
- SOD 组术前例 7
- SOD 组术后例 7
- SO 正常组术前例 7
- SO 正常组术后例 7

图 1 各样本有效碱基序列条目所占百分比

Figure 1 Percentage of valid base sequence entries in each sample



- SOD 组术前例 1
- SOD 组术后例 1
- SO 正常组术前例 1
- SO 正常组术后例 1
- SOD 组术前例 2
- SOD 组术后例 2
- SO 正常组术前例 2
- SO 正常组术后例 2
- SOD 组术前例 3
- SOD 组术后例 3
- SO 正常组术前例 3
- SO 正常组术后例 3
- SOD 组术前例 4
- SOD 组术后例 4
- SO 正常组术前例 4
- SO 正常组术后例 4
- SOD 组术前例 5
- SOD 组术后例 5
- SO 正常组术前例 5
- SO 正常组术后例 5
- SOD 组术前例 6
- SOD 组术后例 6
- SO 正常组术前例 6
- SO 正常组术后例 6
- SOD 组术前例 7
- SOD 组术后例 7
- SO 正常组术前例 7
- SO 正常组术后例 7

图 2 各样本 ASV/OTU 数所占百分比

Figure 2 Proportion of ASV/OUT per sample

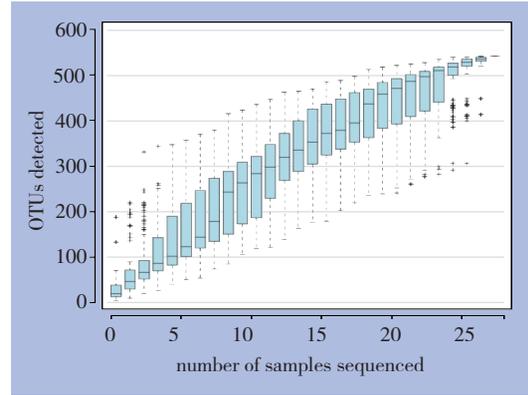


图 3 总体样本的物种累计曲线

Figure 3 Cumulative species curve of the population sample

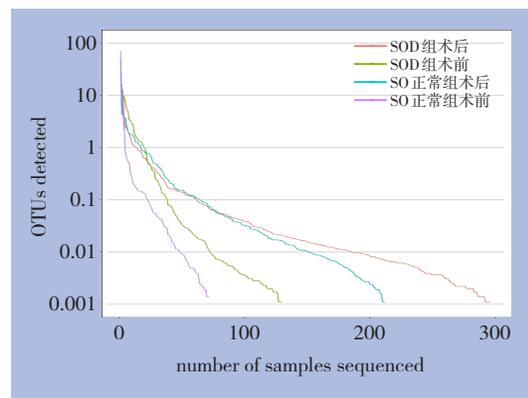


图 4 各组丰度等级曲线

Figure 4 RANK-abundance curves of each group

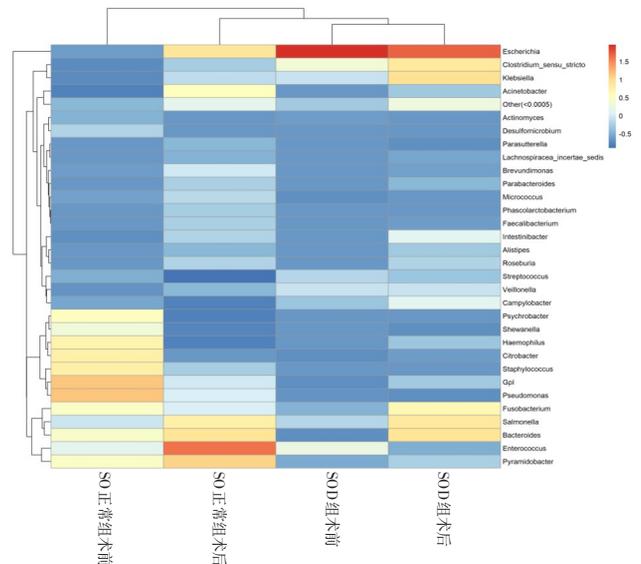


图 5 各组属水平物种丰度聚类热图

Figure 5 Cluster heat map of species abundance at each genus level

3 讨论

包括中国在内的许多亚洲国家，GSD的发病率远远高于一些西方国家，而该病的发生可由环境影响、遗传因素及其他因素的相互作用^[19]。由于胆结石的组成和钙化模式各不相同，并且参与结石形成和钙化的主要因素尚未确定，在目前的相关研究中，均认为胆汁的过度饱和是胆结石形成的第一步。因此，任何提高胆固醇浓度的因素都会增加胆结石形成的可能性。胆汁盐、卵磷脂和胆固醇的相对浓度也决定了胆汁的物理状态^[20]。除了这些因素外，细菌在胆结石的形成中也起着重要作用^[21-23]。

以往普遍认为，胆汁内高浓度的胆汁酸具有抑制细菌生长的作用，因此正常人的胆汁中可能为无菌状态。有研究^[8]发现，与无SOD的患者相比，SOD患者的异常胆汁中具有更多种类的微生物群，在SOD组中，病原菌如嗜胆菌属和海藻施万氏菌群落丰富，而无害细菌减少。同样，在一些关于内镜下治疗CBDS的研究中^[24-25]发现，SO遭到破坏后，术后胆管炎发生率未明显下降，并且远期胆管结石的发生率高达12%~18.9%。另外，也有实验^[26]表明肠道细菌在某些情况下可以易位到胆道，细菌的异常易位使其定居点发生了变化，进入胆道后，它们脱离肠道的限制，生长和繁殖，然后引起相关疾病。胆道菌群的不平衡和细菌的易位使这些细菌在一定条件下引起感染和炎症。反复感染导致慢性炎症，可引起胆管壁变形、渗出、增殖、炎症细胞浸润，甚至胆管组织纤维化、胆管重塑等改变，导致胆管狭窄和变形。

先前已有研究^[27]表明肠道菌群在GSD发病中的作用，在本研究中，应用高通量测序技术和生物信息学分析方法，提取胆道菌群基因组信息，并且对胆道的微生物群落特征进行描述。从实验结果可以看出，SOD患者的白细胞计数较SO正常患者明显升高，很可能与SOD患者的胆管炎的发生有关。并且，本研究还发现，有SOD的GSD患者的胆汁中拥有更多的微生物群并且更容易引起全身炎症发生。因此GSD的发生与胆道内菌群异常可能也有着密切关系。另外，胆汁中微生物的种类也需要平衡^[28]，以防止病原体感染和与胆结石形成相关的病理炎症。对于SOD患者的住院期间管理以及远期胆管结石的再复发需更加关注。

正常情况下胆道是否真的无菌仍无定论，需要进一步研究。

SOD可促进肠内容物反流至胆总管。而胆管微生物群植入不仅引起局部炎症，而且在很大程度上影响胆汁代谢^[29]。然而，SOD、胆道菌群和CBDS之间是否确实存在关联需要采用多样本的随机对照试验进一步证实。值得说明的是，本研究SOD组中胆道菌群的组成与Liang等^[8]、Pereira等^[30]、Zhang等^[31]大体一致，但本研究更加关注了患者术后胆道菌群的多样性研究，并得出结论，相对于SO正常GSD患者，伴有SOD的GSD患者的菌群种类更加集中在埃希氏菌属、梭状芽孢杆菌属和肠球菌属，有SOD的GSD患者的胆汁相比于SO正常GSD患者感染了更多的肠道致病菌。这些菌群丰度的增加可进一步作为GSD复发的生物标志物^[32-33]。也有研究^[32]表明梭状芽孢杆菌属与人类的胆盐代谢相关。但是，这些菌群丰度的增加是否会进一步引起患者GSD的复发仍需进一步对患者随访以及进行更大样本的研究。

综上所述，SOD可能导致更严重的感染，胆汁组成的改变以及炎症水平的升高均表明SOD患者有更重的胆管炎症状。SOD使胆道菌群丰度有了显著改变，并可能与患者胆管炎的发生以及GSD复发相关。本研究结果对控制SOD患者的感染及密切监测对于预防SOD患者胆管结石的再复发具有一定的临床价值。但是，本研究也存在一定的局限性，首先，本研究的样本规模较小，所收集的胆汁标本虽均为合格标本，但无法收集健康人群胆汁进行对比；第二，术中抗生素的使用难免会影响胆管内的微生物群，并且尚不能排除因CBDS以外疾病对胆道菌群的影响。因此，未来应纳入多中心研究队列，以评估观察到的胆汁微生物组变化的稳定性，并继续进行胆道微生态的研究，对未来CBDS患者的诊断、治疗及结石的复发方面提供更多的科学依据。

利益冲突：所有作者均声明不存在利益冲突。

作者贡献声明：刘林勋负责构思与实验设计，实施研究，获取研究经费，对文章的知识性内容作批评性审阅；侯晓凡、武金都负责起草文章、实施研究、采集数据；武金都、侯晓凡、张浩、霍峥负责收集数据；武金都、李笑、李晨睿、赵东豫负责统计分析。

参考文献

- [1] Everhart JE, Ruhl CE. Burden of digestive diseases in the United States Part III : liver, biliary tract, and pancreas[J]. *Gastroenterology*, 2009, 136(4): 1134–1144. doi: 10.1053/j.gastro.2009.02.038.
- [2] Upala S, Sanguankeo A, Jaruvongvanich V. Gallstone disease and the risk of cardiovascular disease: a systematic review and Meta-analysis of observational studies[J]. *Scand J Surg*, 2017, 106(1):21–27. doi: 10.1177/1457496916650998.
- [3] Shabanzadeh DM, Skaaby T, Sørensen LT, et al. Screen-detected gallstone disease and cardiovascular disease[J]. *Eur J Epidemiol*, 2017, 32(6):501–510. doi: 10.1007/s10654-017-0263-x.
- [4] Tazuma S. Epidemiology, pathogenesis, and classification of biliary stones (common bile duct and intrahepatic)[J]. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2006, 20(6): 1075–1083. doi: 10.1016/j.bpg.2006.05.009.
- [5] Tazuma S, Unno M, Igarashi Y, et al. Evidence-based clinical practice guidelines for cholelithiasis 2016[J]. *J Gastroenterol*, 2017, 52(3):276–300. doi: 10.1007/s00535-016-1289-7.
- [6] Lu DH, Huang YM, Kong Y, et al. Gut microecology: why our microbes could be key to our health[J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 131:110784. doi: 10.1016/j.biopha.2020.110784.
- [7] Ochoa Villalabeitia BT, González Serrano MC, Vazquez Melero A, et al. Hepatolithiasis as a cause of recurrent cholangitis[J]. *Surg Infect Case Rep*, 2017, 2(1):113–115. doi: 10.1089/crsi.2017.0027.
- [8] Liang TB, Su W, Zhang Q, et al. Roles of sphincter of oddi laxity in bile duct microenvironment in patients with cholangiolithiasis: from the perspective of the microbiome and metabolome[J]. *J Am Coll Surg*, 2016, 222(3): 269–280. doi: 10.1016/j.jamcollsurg.2015.12.009.
- [9] Wilcox CM. Sphincter of Oddi dysfunction Type III: new studies suggest new approaches are needed[J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21(19):5755–5761. doi: 10.3748/wjg.v21.i19.5755.
- [10] Villavicencio Kim J, Wu GY. Update on sphincter of oddi dysfunction: a review[J]. *J Clin Transl Hepatol*, 2022, 10(3):515–521. doi: 10.14218/jcth.2021.00167.
- [11] Zhang ZH, Wu SD, Wang B, et al. Sphincter of Oddi hypomotility and its relationship with duodenal-biliary reflux, plasma motilin and serum gastrin[J]. *World J Gastroenterol*, 2008, 14(25):4077–4081. doi: 10.3748/wjg.14.4077.
- [12] Toouli J. Sphincter of oddi: function, dysfunction, and its management[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2009, 24(Suppl 3):S57–62. doi: 10.1111/j.1440-1746.2009.06072.x.
- [13] Ye FQ, Shen HZ, Li Z, et al. Influence of the biliary system on biliary bacteria revealed by bacterial communities of the human biliary and upper digestive tracts[J]. *PLoS One*, 2016, 11(3): e0150519. doi: 10.1371/journal.pone.0150519.
- [14] Shen HZ, Ye FQ, Xie L, et al. Metagenomic sequencing of bile from gallstone patients to identify different microbial community patterns and novel biliary bacteria[J]. *Sci Rep*, 2015, 5:17450. doi: 10.1038/srep17450.
- [15] Mu HL, Gao JF, Kong QY, et al. Prognostic factors and postoperative recurrence of Calculus following small-incision sphincterotomy with papillary balloon dilation for the treatment of intractable choledocholithiasis: a 72-month follow-up study[J]. *Dig Dis Sci*, 2015, 60(7): 2144–2149. doi: 10.1007/s10620-015-3559-2.
- [16] Ju F, Zhang T. 16S rRNA gene high-throughput sequencing data mining of microbial diversity and interactions[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2015, 99(10): 4119–4129. doi: 10.1007/s00253-015-6536-y.
- [17] 田忠, 吴硕东, 孔静, 等. 胆管结石患者术后经“T”管窦道胆道镜 Oddi括约肌测压的表现及意义[J]. *世界华人消化杂志*, 2006, 14(11):1119–1123. doi: 10.3969/j.issn.1009-3079.2006.11.017.
- Tian Z, Wu SD, Kong J, et al. Choledochoscopic manometry research of the sphincter of Oddi motility in bile duct stone patients with a T tube after operation[J]. *World Chinese Journal of Digestology*, 2006, 14(11): 1119–1123. doi: 10.3969/j.issn.1009-3079.2006.11.017.
- [18] Toouli J, Roberts-Thomson IC, Dent J, et al. Manometric disorders in patients with suspected sphincter of odds dysfunction[J]. *Gastroenterology*, 1985, 88(5): 1243–1250. doi: 10.1016/S0016-5085(85)80086-X.
- [19] Chen YS, Kong J, Wu SD. Cholesterol gallstone disease: focusing on the role of gallbladder[J]. *Lab Invest*, 2015, 95(2):124–131. doi: 10.1038/labinvest.2014.140.
- [20] Rudling M, Laskar A, Straniero S. Gallbladder bile supersaturated with cholesterol in gallstone patients preferentially develops from shortage of bile acids[J]. *J Lipid Res*, 2019, 60(3):498–505. doi: 10.1194/jlr.S091199.
- [21] Kose SH, Grice K, Orsi WD, et al. Metagenomics of pigmented and cholesterol gallstones: the putative role of bacteria[J]. *Sci Rep*, 2018, 8:11218. doi: 10.1038/s41598-018-29571-8.
- [22] Dutt MK, Murphy GM, Thompson RPH. Unconjugated bilirubin in human bile: the nucleating factor in cholesterol cholelithiasis?[J]. *J Clin Pathol*, 2003, 56(8):596–598. doi: 10.1136/jcp.56.8.596.
- [23] Gomes P, Fernando S, Weerasekara DD, et al. Aerobic bacteria associated with symptomatic gallstone disease and their antimicrobial susceptibility[J]. *Galle Med J*, 2009, 11(1): 9. doi: 10.4038/gmj.v11i1.1110.
- [24] Natsui M, Saito Y, Abe S, et al. Long-term outcomes of endoscopic

- papillary balloon dilation and endoscopic sphincterotomy for bile duct stones[J]. *Dig Endosc*, 2013, 25(3): 313-321. doi: 10.1111/j.1443-1661.2012.01393.x.
- [25] Lu Y, Wu JC, Liu L, et al. Short-term and long-term outcomes after endoscopic sphincterotomy versus endoscopic papillary balloon dilation for bile duct stones[J]. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2014, 26(12):1367-1373. doi: 10.1097/MEG.0000000000000218.
- [26] Xiao ZQ, Huang ZH, Gao J, et al. The imbalance of biliary microflora in hepatolithiasis[J]. *Microb Pathog*, 2021, 157:104966. doi: 10.1016/j.micpath.2021.104966.
- [27] Molinero N, Ruiz L, Milani C, et al. The human gallbladder microbiome is related to the physiological state and the biliary metabolic profile[J]. *Microbiome*, 2019, 7(1): 100. doi: 10.1186/s40168-019-0712-8.
- [28] Wu T, Zhang ZG, Liu B, et al. Gut microbiota dysbiosis and bacterial community assembly associated with cholesterol gallstones in large-scale study[J]. *BMC Genomics*, 2013, 14: 669. doi: 10.1186/1471-2164-14-669.
- [29] Agha RA, Borrelli MR, Vella-Baldacchino M, et al. The STROCSS statement: strengthening the reporting of cohort studies in surgery[J]. *Int J Surg*, 2017, 46:198-202. doi: 10.1016/j.ijsu.2017.08.586.
- [30] Pereira P, Aho V, Arola J, et al. Bile microbiota in primary sclerosing cholangitis: impact on disease progression and development of biliary dysplasia[J]. *PLoS One*, 2017, 12(8): e0182924. doi: 10.1371/journal.pone.0182924.
- [31] Zhang Q, Ye M, Su W, et al. Sphincter of Oddi laxity alters bile duct microbiota and contributes to the recurrence of choledocholithiasis[J]. *Ann Transl Med*, 2020, 8(21): 1383. doi: 10.21037/atm-20-3295.
- [32] 黄瑶, 易剑锋, 周文策. 胆总管结石治疗后复发因素的研究进展[J]. *中国普通外科杂志*, 2021, 30(8):964-970. doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2021.08.012.
- Huang Y, Yi JF, Zhou WC. Research progress on postoperative recurrence factors of choledocholithiasis[J]. *China Journal of General Surgery*, 2021, 30(8): 964-970. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2021.08.012.
- [33] Ridlon JM, Kang DJ, Hylemon PB. Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria[J]. *J Lipid Res*, 2006, 47(2): 241-259. doi: 10.1194/jlr.R500013-JLR200.

(本文编辑 熊杨)

本文引用格式:侯晓凡,赵占学,武金都,等. Oddi括约肌功能障碍胆道结石患者的临床与胆道菌群特征分析[J]. *中国普通外科杂志*, 2023, 32(2):211-220. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2023.02.006

Cite this article as: Hou XF, Zhao ZX, Wu JD, et al. Analysis of the clinical and on biliary microflora features in patients with cholelithiasis and Oddi sphincter dysfunction[J]. *Chin J Gen Surg*, 2023, 32(2):211-220. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2023.02.006

本刊2023年各期重点内容安排

本刊2023年各期重点内容安排如下,欢迎赐稿。

- | | |
|-------------------|-----------------------|
| 第1期 肝癌基础与临床转化研究 | 第7期 肝脏外科疾病临床与基础研究 |
| 第2期 胆道肿瘤基础与临床研究 | 第8期 胆道外科疾病临床与基础研究 |
| 第3期 胰腺癌早期诊断与综合治疗 | 第9期 胰腺外科临床与基础研究 |
| 第4期 胃肠肿瘤基础与临床研究 | 第10期 胃肠外科临床与基础研究 |
| 第5期 甲状腺肿瘤的诊断与综合治疗 | 第11期 甲状腺乳腺外科疾病临床与基础研究 |
| 第6期 血管疾病手术与腔内治疗 | 第12期 血管外科疾病临床与基础研究 |

中国普通外科杂志编辑部