

DOI:10.13350/j.cjpb.250112

• 论著 •

肝棘球蚴感染与肝外胆管癌类器官生态微环境的相关性高通量测序分析*

于志清^{1,2}, 赵斌², 李培武^{1,2*}

(1. 兰州大学第二医院急救中心, 甘肃兰州 730030; 2. 兰州大学第二医院普通外科)

【摘要】 **目的** 通过 16S rRNA 高通量测序技术和类器官模型, 探讨肝棘球蚴抗原处理对肝外胆管癌(CCA)类器官生态微环境的影响, 揭示肝棘球蚴在 CCA 发病机制中的潜在作用。 **方法** 本研究为前瞻性对照研究, 纳入 60 例肝外胆管癌(CCA)的患者, 分为实验组(暴露于肝棘球蚴抗原)和对照组(暴露于 PBS), 每组 30 例样本。通过类器官技术培养肿瘤组织样本, 并使用 16S rRNA 高通量测序技术分析 2 组样本的微生物群落组成和功能基因丰度。使用线性判别分析效应量(LEfSe)方法和 PICRUSt 工具进行微生物群落差异分析和功能预测分析, 进一步通过 qPCR 和细胞功能实验验证关键微生物类群和信号通路的变化。 **结果** 实验组和对照组的主要微生物门包括厚壁菌门(*Firmicutes*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、变形菌门(*Proteobacteria*)、放线菌门(*Actinobacteria*)和耐热菌门(*Thermotogae*)。实验组中厚壁菌门和放线菌门的丰度显著高于对照组, 而拟杆菌门的丰度显著降低($P < 0.05$)。α多样性分析显示, 实验组的 Chao1 指数(150.25 ± 15.75)和 Shannon 指数(3.50 ± 0.45)均显著高于对照组(Chao1 指数: 140.80 ± 14.95 , Shannon 指数: 3.31 ± 0.40 , $P < 0.05$)。β多样性分析基于 Bray-Curtis 距离的主坐标分析(PCoA)和非度量多维尺度分析(NMDS)结果显示, 实验组和对照组在微生物群落组成上存在显著差异(PERMANOVA: $F = 2.423$, $P < 0.001$)。PICRUSt 分析结果显示, 实验组在碳水化合物代谢($25.30\% \pm 2.50\%$ vs $23.10\% \pm 2.40\%$)、能量代谢($18.75\% \pm 1.95\%$ vs $17.50\% \pm 2.10\%$)、脂类代谢($15.20\% \pm 1.80\%$ vs $14.00\% \pm 1.75\%$)、氨基酸代谢($12.50\% \pm 1.60\%$ vs $11.20\% \pm 1.55\%$)、核苷酸代谢($10.00\% \pm 1.25\%$ vs $9.00\% \pm 1.20\%$)和信号转导($8.75\% \pm 1.10\%$ vs $7.50\% \pm 1.05\%$)等功能路径的基因丰度上显著高于对照组($P < 0.05$)。qPCR 结果显示, 实验组中厚壁菌门($t = 2.191$, $P = 0.033$)、变形菌门($t = 2.253$, $P = 0.029$)和放线菌门($t = 2.311$, $P = 0.026$)的相对丰度显著增加, 而拟杆菌门($t = 2.432$, $P = 0.021$)和耐热菌门($t = 2.732$, $P = 0.009$)的相对丰度显著降低。细胞功能实验显示, 实验组在细胞增殖、迁移和侵袭能力上显著增强($P < 0.05$)。Spearman 相关性分析表明厚壁菌门的丰度与患者年龄($r = 0.452$, $P = 0.001$)和病史($r = 0.322$, $P = 0.013$)呈显著正相关, 与肿瘤分级呈显著负相关($r = -0.455$, $P = 0.001$), 而与肿瘤分期呈显著正相关($r = 0.311$, $P = 0.024$)。 **结论** 本研究通过高通量测序和功能预测分析, 揭示了肝棘球蚴抗原处理对肝外胆管癌类器官微生态环境的显著影响, 尤其体现在微生物群落组成和功能基因丰度的改变。

【关键词】 肝棘球蚴感染; 肝外胆管癌; 类器官; 16S rRNA 高通量测序; 微生物群落

【文献标识码】 A **【文章编号】** 1673-5234(2025)01-0064-07

[Journal of Pathogen Biology. 2025 Jan.; 20(01):64-70,76.]

High-throughput sequencing analyses of the correlation between hepatic echinococcosis infection and the ecological microenvironment of extrahepatic cholangiocarcinoma-like organs

YU Zhiqing^{1,2}, ZHAO Bin², LI Peiwu^{1,2} (1. Emergency Center, Lanzhou University Second Hospital, Lanzhou 730030, China; 2. General Surgery, Lanzhou University Second Hospital)***

【Abstract】 **Objective** To investigate the effect of hydatid antigen treatment on the ecological microenvironment of extrahepatic cholangiocarcinoma (CCA) organoids by using 16S rRNA high-throughput sequencing technology and organoid models, and to reveal the potential role of hydatid cysts in the pathogenesis of CCA. **Methods** This study was a prospective controlled study, in which 60 patients diagnosed with extrahepatic cholangiocarcinoma (CCA) were enrolled and divided into an experimental group (exposed to hydatid antigen) and a control group (exposed to PBS), with 30 samples in each group. Tumor tissue samples were cultured by organoid technology, and 16S rRNA high-throughput sequencing technology was used to analyze the microbial community composition and functional gene abundance of the two groups of samples. The linear discriminant analysis effect size (LEfSe) method and PICRUSt tool were used for microbial

* **【基金项目】** 甘肃省科技计划项目自然科学基金(No. 24JRRA327); 甘肃省科技计划项目自然科学基金(No. 22JR5RA951)。

** **【通讯作者】** 李培武, E-mail: wuzi360@126.com

【作者简介】 于志清(1979-), 男, 山东曹县人, 硕士, 副主任医师, 主要从事肝胆胰脾疾病等消化疾病诊疗工作。E-mail: yuzqmd@126.com

community difference analysis and functional prediction analysis, and the changes of key microbial groups and signaling pathways were further verified by qPCR and cell function experiments. **Results** The main microbial phyla in the experimental and control groups included *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, and *Thermotogae*. The abundance of *Firmicutes* and *Actinobacteria* in the experimental group was significantly higher than that in the control group, while the abundance of *Bacteroidetes* was significantly decreased ($P < 0.05$). α -diversity analysis showed that the Chao1 index (150.25 ± 15.75) and Shannon index (3.50 ± 0.45) in the experimental group were significantly higher than those in the control group (Chao1 index: 140.80 ± 14.95 , Shannon index: 3.31 ± 0.40 , $P < 0.05$). The results of principal coordinates analysis (PCoA) and nonmetric multidimensional scaling (NMDS) based on Bray-Curtis distance for β -diversity analysis showed that there were significant differences in the composition of the microbial communities between the experimental and control groups (PERMANOVA: $F = 2.423$, $P < 0.001$). PICRUST analysis results showed that the gene abundance of the experimental group in functional pathways such as carbohydrate metabolism ($25.30\% \pm 2.50\%$ vs $23.10\% \pm 2.40\%$), energy metabolism ($18.75\% \pm 1.95\%$ vs $17.50\% \pm 2.10\%$), lipid metabolism ($15.20\% \pm 1.80\%$ vs $14.00\% \pm 1.75\%$), amino acid metabolism ($12.50\% \pm 1.60\%$ vs $11.20\% \pm 1.55\%$), nucleotide metabolism ($10.00\% \pm 1.25\%$ vs $9.00\% \pm 1.20\%$) and signal transduction ($8.75\% \pm 1.10\%$ vs $7.50\% \pm 1.05\%$) was significantly higher than that in the control group ($P < 0.05$). qPCR results showed that the relative abundance of *Firmicutes* ($t = 2.191$, $P = 0.033$), *Proteobacteria* ($t = 2.253$, $P = 0.029$) and *Actinobacteria* ($t = 2.311$, $P = 0.026$) in the experimental group increased significantly, while the relative abundance of *Bacteroidetes* ($t = 2.432$, $P = 0.021$) and *Thermotolerant bacteria* ($t = 2.732$, $P = 0.009$) decreased significantly. Cell function experiments showed that the experimental group had significantly enhanced cell proliferation, migration and invasion abilities ($P < 0.05$). Spearman correlation analysis showed that the abundance of *Firmicutes* was significantly positively correlated with patient age ($r = 0.452$, $P = 0.001$) and medical history ($r = 0.322$, $P = 0.013$), and was significantly negatively correlated with tumor grade ($r = -0.455$, $P = 0.001$), and was significantly positively correlated with tumor stage ($r = 0.311$, $P = 0.024$). **Conclusion** This study revealed the significant effect of hydatid antigen treatment on the microecological environment of extrahepatic cholangiocarcinoma organoids through high-throughput sequencing and functional prediction analysis, especially in the changes of microbial community composition and functional gene abundance.

【Keywords】 Hepatic echinococcosis; extrahepatic cholangiocarcinoma; organoids; 16S rRNA high-throughput sequencing; microbial community

肝棘球蚴 (hepatic echinococcosis) 是由棘球绦虫 (*Echinococcus spp.*) 引起的人兽共患寄生虫病, 主要流行于牧区和少数民族地区^[1-2], 该疾病不仅对人类健康构成严重威胁, 还对畜牧业造成显著经济损失^[3]。近年来, 随着研究的深入, 人们逐渐认识到寄生虫感染对宿主生态环境的深远影响, 尤其是在癌症发生和进展中的作用。已有研究报道某些寄生虫感染已被证明能通过改变宿主组织的免疫微环境, 促进或抑制肿瘤的发生和发展^[4-5]。肝外胆管癌 (cholangiocarcinoma, CCA) 是一种高度侵袭性和预后极差的恶性肿瘤, 其发病机制复杂, 涉及多种遗传和环境因素的交互作用^[6]。尽管近年来在 CCA 的诊断和治疗方面取得了一定进展, 但其总体生存率仍然较低^[7-8]。因此, 探索新的致病机制和治疗靶点对提高 CCA 患者的预后具有重要意义。类器官 (organoids) 技术的兴起为研究复杂疾病的发病机制提供了新的方法。类器官是一种源自干细胞或肿瘤细胞, 具有自我更新和多向分化能力的三维细胞培养体系^[9,10]。它能够在体外重构组织的微环境和功能结构, 成为研究肿瘤生物学^[11] 和药物筛选^[12] 的理想模型。此外, 高通

量测序技术可以全面解析微生态环境在疾病中的作用, 16S rRNA 基因测序是研究微生物群落结构和多样性的常用方法, 已广泛应用于肠道^[13]、口腔^[14] 等多种体内微生物群的研究。然而, 目前肝棘球蚴感染对 CCA 类器官生态微环境具体影响机制仍不明确。

本研究旨在通过 16S rRNA 高通量测序技术分析肝棘球蚴感染对 CCA 类器官生态微环境的影响及其相关性, 比较暴露于肝棘球蚴抗原的 CCA 类器官与未暴露组之间的微生物群落结构和功能差异, 揭示肝棘球蚴在 CCA 发病机制中的潜在作用, 为肝棘球蚴感染相关 CCA 的预防和治疗提供新的理论依据和研究思路。

对象和方法

1 研究对象

本研究为前瞻性对照研究, 于 2022 年 3 月至 2024 年 3 月在兰州大学第二医院进行。研究对象包括确诊为肝外胆管癌 (CCA) 的患者, 共分为 2 组: 实验组和对照组, 每组 30 例样本。实验组类器官暴露于肝棘球蚴抗原, 模拟肝棘球蚴感染环境; 对照组类器官

未暴露于肝棘球蚴抗原,作为基础对照。实验组和对照组的纳入标准包括:(1)年龄 ≥ 18 岁;(2)经病理学确诊为肝外胆管癌;(3)未接受任何抗癌治疗(如手术、放疗、化疗或免疫治疗);(4)无其他严重系统性疾病或感染。排除标准包括:(1)过去3个月内使用过抗生素、益生菌或其他可能影响微生物群落的药物;(2)合并严重的肝、肾功能不全或其他可能显著影响生存期的恶性肿瘤等疾病;(3)妊娠或哺乳期女性。

患者的肿瘤组织样本在采集后立即进行处理得到单细胞悬液,用于后续类器官的培养。实验组的类器官暴露于提取自肝棘球蚴囊液的抗原,对照组类器官则暴露于等体积的磷酸盐缓冲液(PBS)。所有患者在入组后接受基线信息采集,包括年龄、性别、病史等临床资料。

每位患者均签署知情同意书,研究方案获得本医院伦理委员会批准同意,且研究过程严格遵循《赫尔辛基宣言》的伦理指导原则。

2 类器官模型的建立

获取患者的肿瘤组织样本后,切割成约 $1\sim 2\text{ mm}^3$ 小块,尽量减少机械损伤。然后,将肿瘤组织块置于含有胶原酶和透明质酸酶的消化液中, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 $1\sim 2\text{ h}$,期间轻柔振荡以促进消化。经过充分消化后,使用 $40\text{ }\mu\text{m}$ 细胞滤网过滤,得到单细胞悬液。单细胞悬液经PBS洗涤2次计数并调整细胞浓度至适合类器官培养的浓度。随后将单细胞悬液嵌入Matrigel支架材料中,以形成三维结构。每个样本的细胞悬液将分装至多个培养孔中,确保实验组和对照组的类器官数目和条件一致。培养孔板置于 $37\text{ }^\circ\text{C}$, $5\%\text{ CO}_2$ 的培养箱中培养,使用类器官培养基进行定期更换。类器官培养基的组成包括DMEM培养基,添加B27补充剂、N2补充剂、EGF、FGF和Noggin等生长因子,以促进类器官的生长和维持其生物特性。实验组类器官暴露于提取自肝棘球蚴囊液的抗原($10\text{ }\mu\text{g/mL}$),对照组类器官则暴露于等体积的磷酸盐缓冲液(PBS)。处理过程中,定期观察类器官的生长状态,并及时更换培养基,以保持最佳的培养条件。

3 16S rRNA高通量测序

对照组和实验组的样本均取自处理后 48 h 。DNA提取使商业化试剂盒(Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kit)进行操作。将类器官样本置于裂解缓冲液中,进行机械和酶解裂解,释放细菌DNA。随后,通过柱式纯化方法,去除蛋白质和其他杂质,最终得到高纯度的细菌DNA。提取的DNA样本通过NanoDrop进行浓度和纯度测定。使用通用引物扩增细菌16S rRNA基因的V3-V4区域,扩增产物经过纯化后,利用Illumina TruSeq DNA Sample Preparation Kit构

建测序文库,构建完成的文库通过Agilent 2100 Bioanalyzer进行质量控制,确保片段大小和浓度符合测序要求。测序在Illumina MiSeq或HiSeq平台上进行,采用双端测序模式(paired-end sequencing),以获得高质量的16S rRNA基因序列数据。测序运行结束后,生成的原始数据(raw data)通过Illumina的CASAVA软件进行基础数据处理,输出fastq格式文件。使用QIIME软件对原始测序数据进行质量过滤,去除低质量读数和接头序列。高质量序列经过拼接和去冗余处理,生成代表性序列。随后,将代表性序列比对至Greengenes数据库,进行分类注释,确定每个样本的微生物群落组成。

4 测序数据分析

α 多样性分析通过计算Chao1指数、Shannon指数多样性指标,评估样本内微生物群落的丰富度和均匀度。 β 多样性分析则使用主坐标分析(PCoA)和非度量多维尺度分析(NMDS),评估不同样本间微生物群落组成的差异。利用线性判别分析效应量(LEfSe)方法进行差异分析,确定实验组与对照组间显著差异的微生物类群。此外,使用PICRUST工具进行功能预测分析,评估肝棘球蚴感染对类器官微生物群功能基因的潜在影响。最后,通过qPCR和细胞功能实验,进一步确认关键微生物类群和信号通路蛋白的变化,揭示肝棘球蚴感染对肝外胆管癌类器官生态微环境的具体影响机制。

5 相关性分析

对筛选出的差异微生物丰度与患者的临床资料(年龄、性别、病史)及病理特征(肿瘤分级、分期)进行相关性分析。使用Spearman相关系数评估特异基因丰度与临床和病理特征之间的关系。

6 统计学分析

统计分析使用R语言(版本4.1.0)软件进行。 α 多样性(Chao1指数和Shannon指数)、qPCR数据和Western Blot数据的组间比较采用独立样本 t 检验。 β 多样性分析通过主坐标分析(PCoA)和非度量多维尺度分析(NMDS)进行。使用PERMANOVA(Permutational Multivariate Analysis of Variance)方法评估不同样本组间的群落组成差异的显著性。使用LEfSe分析差异微生物类群,同时结合线性判别分析(LDA)量化不同类群的显著性差异。数据以平均值 \pm 标准差($Mean\pm SD$)表示, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 一般资料

本研究共纳入60例确诊为肝外胆管癌(CCA)的

患者,分为实验组和对照组,每组 30 例样本。实验组年龄 56.20 ± 10.15 岁,病史 3.50 ± 1.75 年,男、女分别为 17 和 13 例,对照组年龄 54.70 ± 11.00 岁,病史 3.30 ± 1.65 年,男、女分别为 18 和 12 例。实验组和对照组在年龄、病史年限以及性别比例方面差异均无统计学意义 ($t = 0.574, 0.451, \chi^2 = 0.067$, 均 $P > 0.05$)。

2 16S rRNA 测序结果

测序得到的高质量序列经过拼接和去冗余处理后,将代表性序列比对至 Greengenes 数据库进行分类注释,结果显示(图 1A),实验组和对照组类器官样本中的微生物门主要包括厚壁菌门(*Firmicutes*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、变形菌门(*Proteobacteria*)、放线菌门(*Actinobacteria*)、耐热菌门(*Thermotogae*)、蓝细菌门(*Cyanobacteria*)、绿弯菌门(*Chloroflexi*)、酸杆菌门(*Acidobacteria*)和纤维菌门(*Fibrobacteres*)等。对 2 组类器官样本的微生物群落组成进行比较(图 1B),结果显示样本中本中厚壁菌门($40.25\% \pm 3.15\%$ vs $38.90\% \pm 3.05\%$, $t = 2.671, P = 0.009$)、拟杆菌门($30.50\% \pm 2.80\%$ vs $32.10\% \pm 2.95\%$, $t = 3.562, P = 0.007$)和放线菌门($8.50\% \pm 1.75\%$ vs $7.70\% \pm 1.65\%$, $t = 2.220, P = 0.030$)微生物群落的相对丰度存在显著差异(表 1)。

表 1 实验组和对照组类器官样本中共有的微生物门类相对丰度比较
Table 1 Comparison of relative abundance of common microbial phyla in organoid samples of the experimental group and the control group

微生物类群	实验组 (%, n=30)	对照组 (%, n=30)	t 值	P 值
厚壁菌门	40.25±3.15	38.90±3.05	2.671	0.009
拟杆菌门	30.50±2.80	32.10±2.95	3.562	0.007
变形菌门	20.75±2.60	21.30±2.50	0.691	0.493
放线菌门	8.50±1.75	7.70±1.65	2.220	0.030
耐热菌门	4.50±1.20	5.00±1.30	0.235	0.815
蓝细菌门	2.75±1.10	2.90±1.05	-0.447	0.656
绿弯菌门	1.50±0.80	1.80±0.85	-1.140	0.258
酸杆菌门	1.00±0.60	1.20±0.65	-1.981	0.053
纤维菌门	0.75±0.50	0.85±0.55	0.589	0.559
其他	1.50±0.75	2.25±0.85	-3.202	0.002

3 微生物多样性分析

α 多样性用于分析样本内微生物群落的丰富度和均匀度,本研究采用 Chao1 指数和 Shannon 指数进行评估。Chao1 指数主要用于估计微生物群落的物种丰富度,如图 2A 显示,实验组的 Chao1 指数与对照组相比显著增加(150.25 ± 15.75 vs 140.80 ± 14.95 , $t = 2.142, P = 0.021$)。Shannon 指数反映微生物群落的多样性和均匀度,结果表明实验组的 Shannon 指数(3.50 ± 0.45)相较于对照组(3.31 ± 0.40)显著增加($t = 2.123, P = 0.037$, 图 2B)。

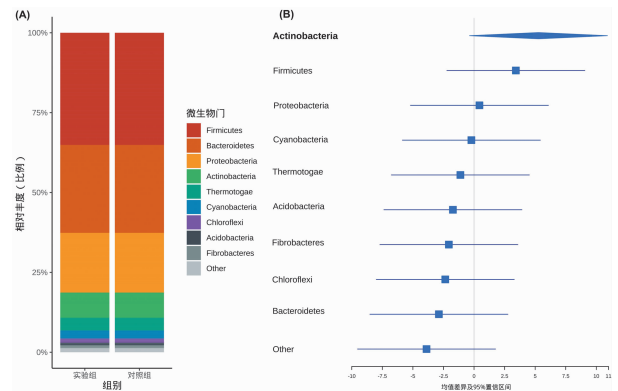


图 1 实验组和对照组类器官样本门水平(Phylum)共有优势微生物菌落结构(A)和丰度占比差异比较森林图(B)
Fig. 1 Forest plot comparing the common dominant microbial colony structure (A) and abundance ratio (B) at the phylum of organoid samples in the experimental and control groups

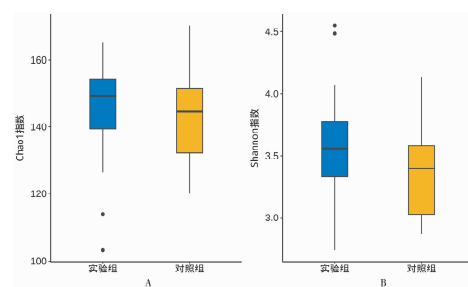


图 2 基于 Chao1 指数(A)和 Shannon 指数(B)评估实验组和对照组类器官样本的 α 多样性分析
Fig. 2 Alpha diversity analysis of organoid samples from the experimental and control groups evaluated based on the Chao1 index (A) and Shannon index (B)

β 多样性分析用于评估不同样本间微生物群落组成的差异。本研究采用主坐标分析(PCoA)和非度量多维尺度分析(NMDS)方法进行 β 多样性分析。基于 Bray-Curtis 距离矩阵的 PCoA 结果显示,实验组和对照组的微生物群落在 PCoA 轴上的分布存在明显的聚类趋势,各组样本在主坐标轴 1 和主坐标轴 2 上的分布比较见图 3。图 3 显示了实验组(暴露于棘球绦虫抗原)和对照组的微生物群落聚类情况。两组之间的分离表明微生物群落组成存在显著差异($F = 2.423, P < 0.001$)。

同时, NMDS 结果显示,实验组和对照组的微生物群落在 NMDS 空间中的分布亦存在明显的聚类趋势,见图 4。图 4 中显示了实验组(暴露于棘球绦虫抗原)和对照组的微生物群落聚类情况。每个点代表一个样本,两组的分离表明微生物群落组成存在显著差异。此外,使用 PERMANOVA (Permutational Multivariate Analysis of Variance) 方法对不同样本组间的群落组成差异进行统计检验,结果表明实验组和对照组之间的群落组成差异有统计学意义($F = 2.423, P < 0.001$)。

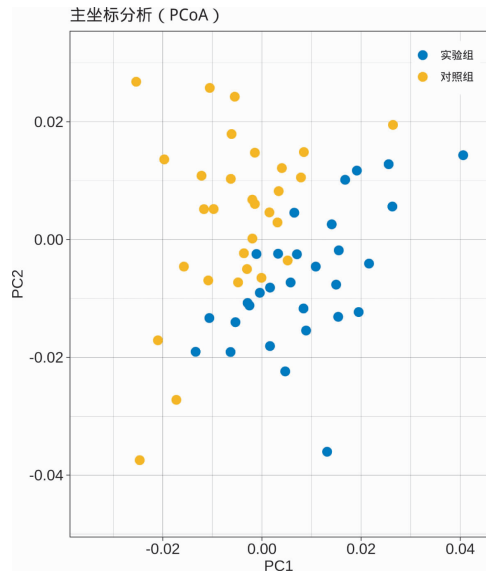


图 3 基于 Bray-Curtis 距离的主坐标分析 (PCoA) 图
Fig. 3 Principal coordinates analysis (PCoA) plot based on bray-curtis distances

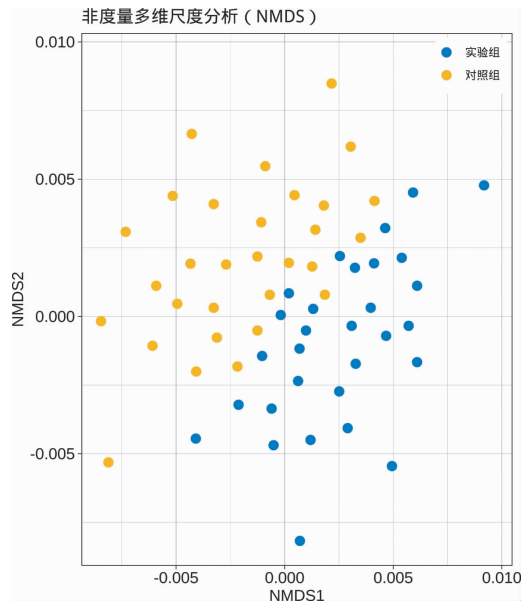


图 4 基于 Bray-Curtis 距离的非度量多维标度 (NMDS) 图
Fig. 4 Non-metric Multidimensional Scaling (NMDS) plot based on Bray-Curtis distances

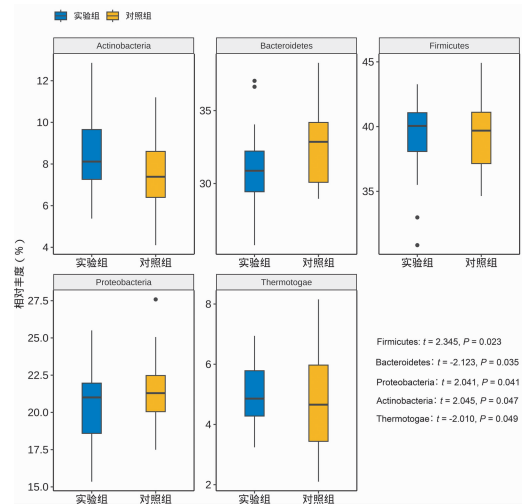
4 微生物群落差异分析

本研究使用线性判别分析效应量 (LEfSe) 方法对实验组和对照组微生物群落的差异进行分析, 以进一步探讨肝棘球蚴抗原处理对肝外胆管癌 (CCA) 类器官微生物群落组成的影响。LEfSe 分析结合非参数检验和线性判别分析 (LDA), 识别并量化实验组和对照组之间显著差异的微生物类群见表 2, 通过 LDA 进一步验证 LEfSe 分析中识别出的差异微生物类群分别为厚壁菌门 (*Firmicutes*)、拟杆菌门 (*Bacteroidetes*)、变形菌门 (*Proteobacteria*)、放线菌门 (*Actinobacteria*) 和耐热菌门 (*Thermotogae*) (图 5)。

表 2 基于线性判别分析 (LDA) 评分的 LEfSe 方法识别出的关键微生物类群

Table 2 Key microbial groups identified by the LEfSe method based on linear discriminant analysis (LDA) scores

微生物门	实验组 (%, n=30)	对照组 (%, n=30)	LDA 评分	P 值
厚壁菌门	40.25 ± 3.15	38.90 ± 3.05	3.52	0.023
拟杆菌门	30.50 ± 2.80	32.10 ± 2.95	3.31	0.035
变形菌门	40.25 ± 3.15	38.90 ± 3.05	2.84	0.041
放线菌门	8.50 ± 1.75	7.70 ± 1.65	2.52	0.047
耐热菌门	4.50 ± 1.20	5.00 ± 1.30	2.11	0.049



注: 每个子图代表不同的微生物门, 箱线图显示各组内相对丰度的分布。使用独立样本 *t* 检验评估统计显著性。

图 5 箱线图显示实验组 (用棘球蚴抗原处理) 和对照组中主要微生物门的相对丰度

Fig. 5 Boxplots showing the relative abundance of key microbial phyla in the experimental group (treated with *Echinococcus* antigen) and the control group

5 功能预测分析

本研究使用 PICRUSt 分析将 16S rRNA 测序数据映射到 Greengenes 数据库中, 推测出样本中微生物群落的基因功能。根据 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 数据库, 将预测的基因功能分类到不同的功能路径中, 结果见表 3。通过功能预测分析, 研究发现肝棘球蚴抗原处理显著改变了肝外胆管癌类器官中微生物群落的功能基因丰度, 主要包括碳水化合物代谢 (Carbohydrate metabolism)、能量代谢 (Energy metabolism)、脂类代谢 (Lipid metabolism)、氨基酸代谢 (Amino acid metabolism)、核苷酸代谢 (Nucleotide metabolism) 和信号转导 (Signal transduction) 等功能路径。

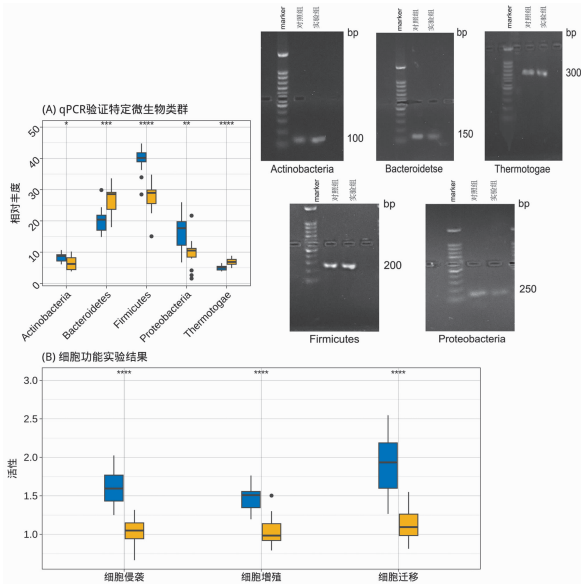
6 qPCR 和细胞功能验证

基于上述分析中识别出的显著差异的微生物类群, 本研究对上述微生物的特异基因使用 qPCR 方法进行验证, 包括厚壁菌门 (*Firmicutes*)、拟杆菌门 (*Bacteroidetes*)、变形菌门 (*Proteobacteria*)、放线菌门 (*Actinobacteria*) 和耐热菌门 (*Thermotogae*)。结果

显示厚壁菌门($t=2.191, P=0.033$)、变形菌门($t=2.253, P=0.029$)和放线菌门($t=2.311, P=0.026$)在实验组样本中均显著升高。拟杆菌门($t=2.432, P=0.021$)和耐热菌门($t=2.732, P=0.009$)在实验组样本中均显著降低(图 6A)。为了进一步验证肝棘球蚴抗原处理对 CCA 类器官功能的影响,本研究使用 CCK-8 试剂盒检测细胞增殖活性、划痕实验检测细胞迁移能力以及 Transwell 侵袭实验检测细胞侵袭能力,结果显示上述细胞功能在实验组中均观察到了显著增加($P<0.05$,图 6B)。

表 3 实验组和对照组微生物群落的 PICRUSt 功能预测结果比较
Table 3 Comparison of PICRUSt function prediction results of microbial communities in the experimental and control groups

功能路径	实验组 (%)	对照组 (%)	LDA 评分	P 值
碳水化合物代谢	25.30±2.50	23.10±2.40	3.71	0.015
能量代谢	18.75±1.95	17.50±2.10	3.22	0.028
脂类代谢	15.20±1.80	14.00±1.75	3.02	0.032
氨基酸代谢	12.50±1.60	11.20±1.55	2.93	0.037
核苷酸代谢	10.00±1.25	9.00±1.20	2.84	0.041
信号转导	8.75±1.10	7.50±1.05	2.51	0.048



注:(A)箱线图显示实验组(用棘球蚴抗原处理)和对照组中特定微生物门的相对丰度,由 qPCR 测定。(B)箱线图显示细胞功能测定的结果,包括细胞增殖、细胞迁移和细胞侵袭。与对照组相比,实验组在所有测定中表现出明显更高的活性。使用独立样本 t 检验评估统计学意义,*** $P<0.001$,** $P<0.01$,* $P<0.05$ 。

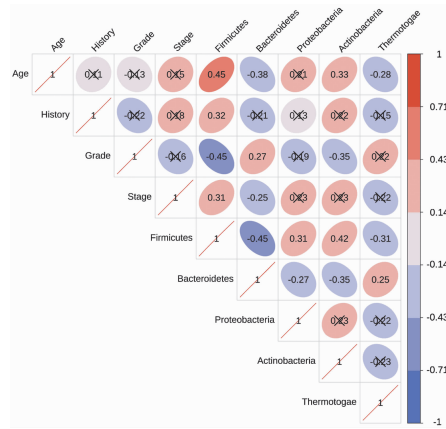
图 6 微生物群落组成 qPCR 和细胞功能测定的实验验证。

Fig. 6 Experimental validation of microbial community composition and cell function assays

7 差异微生物与临床特征的相关性分析

Spearman 相关性分析显示某些差异微生物的丰度与临床特征之间存在显著相关性(图 7)。厚壁菌门的丰度与患者年龄呈显著正相关($r=0.452, P=0.001$)。耐热菌门的丰度与患者年龄呈显著负相关($r=-0.281, P=0.032$)。此外,放线菌门的丰度与患者年龄呈显著正相关($r=0.334, P=0.011$)。结果还显示,厚壁菌门的丰度与病史呈显著正相关($r=0.322, P=0.013$)。肿瘤分级方面,厚壁菌门的丰度与肿瘤分级呈显著负相关($r=-0.455, P=0.001$);而拟杆菌门的丰度与肿瘤分级呈显著正相关($r=0.271, P=0.048$)。放线菌门的丰度与肿瘤分级也呈显著负相关($r=-0.352, P=0.015$)。在肿瘤分期方面,厚壁菌门的丰度与肿瘤分期呈显著正相关($r=0.311, P=0.024$),而拟杆菌门的丰度与肿瘤分期呈显著负相关($r=-0.253, P=0.041$)。

此外,放线菌门的丰度与患者年龄呈显著正相关($r=0.334, P=0.011$)。结果还显示,厚壁菌门的丰度与病史呈显著正相关($r=0.322, P=0.013$)。肿瘤分级方面,厚壁菌门的丰度与肿瘤分级呈显著负相关($r=-0.455, P=0.001$);而拟杆菌门的丰度与肿瘤分级呈显著正相关($r=0.271, P=0.048$)。放线菌门的丰度与肿瘤分级也呈显著负相关($r=-0.352, P=0.015$)。在肿瘤分期方面,厚壁菌门的丰度与肿瘤分期呈显著正相关($r=0.311, P=0.024$),而拟杆菌门的丰度与肿瘤分期呈显著负相关($r=-0.253, P=0.041$)。



注:颜色表示相关系数的强度和方向,红色表示正相关,蓝色表示负相关。

图 7 相关性热图展示差异微生物丰度与临床特征(包括年龄、病史、肿瘤分级和肿瘤分期)之间的 Spearman 相关系数
Fig. 7 Correlation heat map showing Spearman correlation coefficients between differential microbial abundance and clinical characteristics including age, medical history, tumor grade, and tumor stage

讨论

本研究通过使用 16S rRNA 高通量测序技术和类器官模型,探讨了肝棘球蚴抗原处理对肝外胆管癌(CCA)类器官生态微环境的影响。结果显示,肝棘球蚴抗原处理显著改变了 CCA 类器官的微生物群落组成和功能基因丰度,揭示了肝棘球蚴感染在 CCA 发病机制中的潜在作用。本研究发现,暴露于肝棘球蚴抗原的 CCA 类器官中,厚壁菌门(*Firmicutes*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)和放线菌门(*Actinobacteria*)的相对丰度显著变化。具体而言,实验组中厚壁菌门和放线菌门的丰度显著高于对照组,而拟杆菌门的丰度则显著降低。这些变化可能反映了肝棘球蚴感染对宿主微生态环境的深远影响。厚壁菌门和放线菌门的增加可能与肝棘球蚴抗原引起的炎症反应有关,已有研究表明,厚壁菌门中的某些菌属可以通过促进炎症反应,影响肿瘤的发生和发展^[15-16]。放线菌门的增加也可能与其在调节宿主免疫反应中的作用有关^[17-19],这与本研究观察到的实验组类器官中某些炎症相关信号

通路的激活一致。相反,拟杆菌门的减少可能与其在维持肠道和其他组织微生态平衡中的重要作用有关,拟杆菌门的减少可能削弱其对炎症和肿瘤发展的抑制作用,从而促进 CCA 的进展^[20]。通过 PICRUSt 功能预测分析发现,肝棘球蚴抗原处理显著改变了 CCA 类器官中微生物群落的功能基因丰度。

本研究实验组中碳水化合物代谢、能量代谢、脂类代谢、氨基酸代谢、核苷酸代谢和信号转导等功能路径的基因丰度显著增加。这些功能变化可能在 CCA 的致癌转化和肿瘤生态微环境的调控中发挥重要作用。碳水化合物代谢和能量代谢的增加可能为肿瘤细胞提供了更多的能量和代谢中间产物,促进肿瘤的生长和增殖^[21-22]。脂类代谢的增加可能与肿瘤细胞膜合成和信号分子生成有关^[23],氨基酸代谢的增加可能为肿瘤细胞提供必要的氨基酸,以支持其快速生长。核苷酸代谢的增加则可能与肿瘤细胞的 DNA 合成和修复有关。此外,信号转导通路的激活可能促进肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭^[24]。

为了验证高通量测序和功能预测分析的结果,本研究进行了 qPCR 和细胞功能实验。qPCR 结果显示,实验组中厚壁菌门、变形菌门和放线菌门的基因丰度显著增加,而拟杆菌门和耐热菌门的丰度显著降低。这些结果与高通量测序结果一致,进一步支持了肝棘球蚴抗原处理对微生物群落组成的影响。细胞功能实验结果显示,暴露于肝棘球蚴抗原的 CCA 类器官在细胞增殖、迁移和侵袭能力方面显著增强。这些功能变化可能与肝棘球蚴抗原引起的微生物群落和代谢功能的变化密切相关。推测,肝棘球蚴抗原通过改变微生态环境,促进肿瘤细胞的恶性行为,从而加速 CCA 的进展。Spearman 相关性分析进一步揭示了差异微生物丰度与临床特征之间的关系。厚壁菌门的丰度与患者年龄和病史呈显著正相关,与肿瘤分级呈显著负相关,而与肿瘤分期呈显著正相关。这表明,随着患者年龄和病史的增长,厚壁菌门的丰度增加,但在肿瘤分级较高的患者中,其丰度较低,研究结果提示与厚壁菌门在促进炎症反应和影响肿瘤发生发展中的作用有关。

但本研究也存在一些局限性。首先,本研究基于类器官模型,尽管类器官能够模拟体内微环境,但其仍然不能完全替代复杂的体内环境。其次,本研究的样本量有限,需要通过更大规模的研究来验证本研究结果。此外,未来的研究还应进一步探讨肝棘球蚴感染与 CCA 之间的具体分子机制,以揭示其潜在的治疗靶点。本次研究揭示了肝棘球蚴抗原处理对肝外胆管癌类器官生态微环境的显著影响,为理解肝棘球蚴感染在 CCA 发病机制中的作用提供了新的视角。这些

结果不但丰富了对肝棘球蚴感染和 CCA 发病机制的理解,还为未来的临床研究和治疗策略提供了参考。

【参考文献】

- [1] 盖俊杰,王恒,孟庆东. 肝棘球蚴病的微创外科治疗现状[J]. 中国病原生物学杂志,2024,19(5):610-613.
- [2] Yang Y, Cairang Y, Jiang T, et al. Ultrasound identification of hepatic echinococcosis using a deep convolutional neural network model in China: a retrospective, large-scale, multicentre, diagnostic accuracy study [J]. *Lancet Digit Health*, 2023, 5(8): e503-e514.
- [3] Zalaquett E, Menias C, Garrido F, et al. Imaging of Hydatid Disease with a Focus on Extrahepatic Involvement [J]. *Radiographics*, 2017, 37(3): 901-923.
- [4] Liu M, Cho WC, Flynn RJ, et al. microRNAs in parasite-induced liver fibrosis: from mechanisms to diagnostics and therapeutics [J]. *Trends Parasitol*, 2023, 39(10): 859-872.
- [5] Greening DW, Xu R, Ale A, et al. Extracellular vesicles as next generation immunotherapeutics [J]. *Semin Cancer Biol*, 2023 (90): 73-100.
- [6] Banales JM, Marin JJG, Lamarca A, et al. Cholangiocarcinoma 2020: the next horizon in mechanisms and management [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2020, 17(9): 557-588.
- [7] Sato K, Glaser S, Alvaro D, et al. Cholangiocarcinoma: novel therapeutic targets [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2020, 24(4): 345-357.
- [8] Zhu AX, Macarulla T, Javle MM, et al. Final overall survival efficacy results of ivosidenib for patients with advanced cholangiocarcinoma with IDH1 Mutation: The phase 3 randomized clinical ClarIDHy trial [J]. *JAMA Oncol*, 2021, 7(11): 1669-1677.
- [9] Xu H, Jiao D, Liu A, et al. Tumor organoids: applications in cancer modeling and potentials in precision medicine [J]. *J Hematol Oncol*, 2022, 15(1): 58.
- [10] Cowan CS, Renner M, De Gennaro M, et al. Cell types of the human retina and its organoids at single-cell resolution [J]. *Cell*, 2020, 182(6): 1623-1640 e1634.
- [11] Veninga V, Voest EE. Tumor organoids: Opportunities and challenges to guide precision medicine [J]. *Cancer Cell*, 2021, 39(9): 1190-1201.
- [12] Li Z, Xu H, Gong Y, et al. Patient-derived upper tract urothelial carcinoma organoids as a platform for drug screening [J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2022, 9(4): e2103999.
- [13] Guo X, Okpara ES, Hu W, et al. Interactive Relationships between Intestinal Flora and Bile Acids [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(15): 8343.
- [14] Jang H, Patoine A, Wu TT, et al. Oral microflora and pregnancy: a systematic review and meta-analysis [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 16870.
- [15] 张慧. 虫体抗原与细胞因子对两型棘球蚴-宿主肝脏界面淋巴细胞/浆细胞趋化作用的研究[D]. 新疆: 新疆医科大学, 2022.
- [16] An J, Kwon H, Kim YJ. The Firmicutes/Bacteroidetes Ratio as a Risk Factor of Breast Cancer [J]. *J Clin Med*, 2023, 12(6): 2216.

当或其他原因,容易导致部分菌体的丢失,从而影响最终的鉴定结果^[15]。因此,在使用 Percoll 分离法时,需要格外注意操作细节,以确保实验的准确性和可靠性。

综上所述,本次研究揭示了医院内血流感染病原菌的分布特点,对指导合理使用抗生素、防控感染具有重要意义。在此基础上,医院应进一步强化感染控制策略,提升病原菌检测能力,确保患者安全。同时,通过结合 MALDI-TOF MS 技术的深入应用,持续优化病原菌检测流程,确保检测结果的准确性和时效性。通过跨学科合作,强化病原菌信息数据库建设,为临床医生提供更为全面、精准的病原学参考,助力提升感染性疾病诊疗水平。

【参考文献】

[1] Kern WV, Rieg S. Burden of bacterial bloodstream infection: a brief update on epidemiology and significance of multidrug-resistant pathogens[J]. Clin Microbiol Infect, 2020, 26(2): 151-157.

[2] Rhee C, Dantes R, Epstein L, et al. Incidence and trends of sepsis in US hospitals using clinical vs claims data, 2009-2014 [J]. JAMA, 2017, 318(13): 1241-1249.

[3] Isendahl J, Giske CG, Tegmark Wisell K, et al. Risk factors for community-onset bloodstream infection with extended-spectrum β-lactamase-producing Enterobacteriaceae: national population-based case-control study [J]. Clin Microbiol Infect, 2019, 25(11): 1408-1414.

[4] Romero-Gomez MP, Gomez-Gil R, Pano-Pardo JR, et al. Identification and susceptibility testing of microorganism by direct inoculation from positive blood culture bottles by combining MALDI-TOF and Vitek 2 compact is rapid and effective[J]. J Infect, 2019, 65(6): 513-520.

[5] Barberino MG, Silva MO, Arraes ACP, et al. Direct identification

from positive blood broth culture by matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS)[J]. Braz J Infect Dis, 2017, 21(3): 339-342.

[6] Dubourg G, Raoult D, Fenollar F. Emerging methodologies for pathogen identification in bloodstream infections: an update[J]. Expert Rev Mol Diagn, 2019, 19(2): 161-173.

[7] Menglan Z, Qiwen Y, Timothy K, et al. An improved in-house MALDI-TOF MS protocol for direct cost-effective identification of pathogens from blood cultures[J]. Front Microbiol, 2017, 8(2): 1824-1832.

[8] 杨思恒, 张学武, 胡国启, 等. 2019-2022 年我院血流感染病原菌分布及耐药性分析[J]. 内科理论与实践, 2023, 18(6): 424-430.

[9] 严丽, 管湘玉. 苏州某中医院血流感染病原菌分布及耐药性分析[J]. 检验医学与临床, 2024, 21(2): 170-173.

[10] 陈重, 胡继华, 邓名贵, 等. 2020 年深圳市 56 家医院血培养送检情况[J]. 中华医院感染学杂志, 2022, 32(6): 840-845.

[11] Tsuchida S, Umemura H, Nakayama T. Current status of matrix-assisted laser desorption/ ionization-time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in clinical diagnostic microbiology[J]. Molecules, 2020, 25(20): 4775.

[12] 梁林, 幸雯, 张京, 等. Percoll 分离法联合 MALDI-TOF MS 直接鉴定血培养专性厌氧菌阳性标本的应用价值[J]. 国际检验医学杂志, 2021, 42(19): 2324-2328.

[13] Angel A, Maria UB, Wolfgang L. Variances in cellular sedimentation behavior as an effective enrichment method of hydrocarbon-overproducing *Micrococcus luteus* strains [J]. Biotechnol Biofuels, 2018, 11(3): 288-294.

[14] 吴天鸽, 黄文君, 冯嘉轩. 三氯醋酸/丙酮沉淀法与硫酸铵沉淀法去除血浆高丰度蛋白效果的对比研究[J]. 重庆医学, 2020, 49(23): 3876-3879.

[15] 肖剑梅, 何韦韦, 王昊亮, 等. Percoll 离心结合免疫磁珠分选的方法从外周血分离单核细胞[J]. 免疫学杂志, 2021, 37(5): 454-460.

【收稿日期】 2024-08-13 【修回日期】 2024-10-30

(上接 70 页)

[17] Hufnagl K, Pali-Scholl I, Roth-Walter F, et al. Dysbiosis of the gut and lung microbiome has a role in asthma [J]. Semin Immunopathol, 2020, 42(1): 75-93.

[18] McCulloch JA, Davar D, Rodrigues RR, et al. Intestinal microbiota signatures of clinical response and immune-related adverse events in melanoma patients treated with anti-PD-1 [J]. Nat Med, 2022, 28(3): 545-556.

[19] 排组拉沙拉依阿当, 阿卜杜萨拉木·艾尼, 阿卜杜艾尼·阿卜力孜, 等. 肝泡型棘球蚴病病灶微环境中免疫细胞浸润范围指导研究取材的前瞻性研究[J]. 中华地方病学杂志, 2023, 42(10): 781-785.

[20] Komiyama S, Yamada T, Takemura N, et al. Profiling of tumour-associated microbiota in human hepatocellular carcinoma [J]. Sci

Rep, 2021, 11(1): 10589.

[21] Lin X, Xiao Z, Chen T, et al. Glucose Metabolism on Tumor Plasticity, Diagnosis, and Treatment [J]. Front Oncol, 2020, 10: 317.

[22] 阿卜杜艾尼·阿卜力孜, 阿卜杜萨拉木·艾尼, 冉博, 等. 肝泡型棘球蚴病病灶微环境摄取氟代脱氧葡萄糖的特征研究[J]. 中华肝胆外科杂志, 2023, 29(3): 176-180.

[23] Bian X, Liu R, Meng Y, et al. Lipid metabolism and cancer. J Exp Med. 2021, 218(1): e20201606.

[24] 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.

【收稿日期】 2024-08-19 【修回日期】 2024-11-08