

DOI:10.13350/j.cjpb.250306

• 论著 •

胆管癌患者肠道微生物多样性变化 及其对治疗反应的影响*

段文飞^{1,2**}, 王世贵^{1,2}, 朱志超^{1,2}, 陈祥^{1,2}, 范天龙^{1,2}, 巫俊^{1,2}

(1. 江苏大学附属句容医院外科教研室, 江苏句容 212400; 2. 江苏大学附属句容医院普通外科)

【摘要】 目的 探讨胆管癌患者肠道微生物多样性变化及其对不同治疗反应的影响, 分析肠道微生物群与治疗方式、治疗效果和生存结局之间的关联, 以及肠道微生物在胆管癌患者治疗中的潜在作用。 方法 本研究为前瞻性单中心临床研究, 共纳入 45 名确诊为胆管癌的患者, 分为手术组、化疗组和免疫治疗组。患者的粪便样本分别在治疗前(基线)、治疗中期和治疗结束时采集, 并通过 16S rRNA 基因测序分析肠道微生物多样性。微生物多样性分析包括 α 多样性(Shannon 指数和 Chao1 指数)和 β 多样性(基于 Bray-Curtis 距离的主坐标分析)。此外, 结合临床治疗反应, 将患者分为完全缓解组(CR)、部分缓解组(PR)、病情稳定组(SD)和疾病进展组(PD), 并评估其与无进展生存期(PFS)、总生存期(OS)及临床生物标志物的关系。采用 Kaplan-Meier 生存曲线、Cox 比例风险回归模型及 Spearman 相关性分析进行统计学评估。 结果 免疫治疗组患者的肠道微生物 α 多样性(Shannon 指数和 Chao1 指数)在治疗中期和治疗结束时显著增加(Shannon 指数 $P=0.045$, Chao1 指数 $P=0.038$), 而手术组和化疗组未见显著变化($P>0.05$)。 β 多样性分析显示, 免疫治疗组的微生物群组成在治疗过程中显著变化, 治疗结束时与手术组和化疗组存在显著差异($P=0.017$)。 CR 组和 PR 组患者的 α 多样性显著高于 SD 组和 PD 组($P<0.05$), 特别是在免疫治疗组中, *Faecalibacterium* 和 *Akkermansia* 属的丰度显著增加。生存分析结果显示, 高 α 多样性组患者的中位无进展生存期(PFS=12.8 个月)和总生存期(OS=19.2 个月)均显著长于低多样性组(PFS=8.3 个月, OS=12.4 个月)(log-rank 检验, $P<0.05$)。 Spearman 相关性分析显示, *Faecalibacterium* 属与 CRP 和 IL-6 等炎症标志物呈显著负相关($P<0.001$), 而 *Escherichia/Shigella* 属与这些标志物呈正相关($P<0.01$)。 结论 肠道微生物多样性与胆管癌患者的治疗反应和生存结局密切相关。免疫治疗显著增加了患者的肠道微生物多样性和特定菌属的丰度, 这些变化与良好的治疗反应和延长的生存期相关。*Faecalibacterium* 和 *Akkermansia* 等关键菌属的丰度增加可能通过调节炎症和免疫反应改善患者预后, 提示肠道微生物多样性是胆管癌患者治疗反应和预后的潜在预测因子。

【关键词】 肠道微生物多样性; 胆管癌; 免疫治疗; 治疗反应; 生存预后

【文献标识码】 A **【文章编号】** 1673-5234(2025)03-0297-05

[Journal of Pathogen Biology. 2025 Mar.; 20(03):297-304.]

Changes in gut microbiota diversity in patients with cholangiocarcinoma and its impact on treatment response

DUAN Wenfei^{1,2}, WANG Shigui^{1,2}, ZHU Zhichao^{1,2}, CHEN Xiang^{1,2}, FAN Tianlong^{1,2}, WU Jun^{1,2}

(1. Department of Surgery, Jurong Hospital Affiliated to Jiangsu University, Jurong, Jiangsu 212400, China; 2. General Surgery Department of Jurong Hospital Affiliated to Jiangsu University)***

【Abstract】 **Objective** To explore changes in intestinal microbial diversity in cholangiocarcinoma patients, its impact on treatment responses, and its relationship with survival outcomes. **Methods** This prospective study enrolled 45 patients divided into surgery, chemotherapy, and immunotherapy groups. Fecal samples were collected at baseline, mid-treatment, and end of treatment, and microbial diversity was analyzed using 16S rRNA sequencing for α diversity (Shannon, Chao1 indices) and β diversity. Patients were also categorized into treatment response groups (CR, PR, SD, PD) to evaluate associations with progression-free survival (PFS), overall survival (OS), and clinical biomarkers. **Results** The immunotherapy group showed a significant increase in α diversity during treatment (Shannon index $P=0.045$, Chao1 index $P=0.038$), while no significant changes were seen in surgery and chemotherapy groups ($P>0.05$). β diversity analysis revealed significant microbiota composition changes in the immunotherapy group and differences between groups at the end of treatment ($P=0.017$). Higher α diversity was observed in CR and PR groups compared to SD and PD groups ($P<0.05$), with significant increases in *Faecalibacterium* and *Akkermansia* genera, particularly in the

* **【基金项目】** 镇江市科学技术局项目(No. FZ2024026)。

** **【通信作者(简介)】** 段文飞(1982-), 男, 山西太原人, 硕士研究生, 副主任医师, 主要从事肝胆胰疾病的机制研究。E-mail: dwffxm@163.com

immunotherapy group. Survival analysis showed patients with high α diversity had longer PFS (12.8 vs. 8.3 months) and OS (19.2 vs. 12.4 months) ($P < 0.05$). *Faecalibacterium* was negatively correlated with inflammatory markers (CRP, IL-6, $P < 0.001$), while *Escherichia/Shigella* showed positive correlations ($P < 0.01$). **Conclusion** Intestinal microbial diversity is closely linked to treatment response and survival outcomes in *cholangiocarcinoma*. Immunotherapy significantly increased microbial diversity and the abundance of key genera, such as *Faecalibacterium* and *Akkermansia*, which were associated with better treatment responses and improved survival by modulating inflammation and immunity. Microbial diversity may serve as a predictor of treatment efficacy and prognosis in *cholangiocarcinoma* patients. .

【Keywords】 Intestinal microbial diversity; *cholangiocarcinoma*; immunotherapy; treatment response; survival prognosis

胆管癌是一种高度侵袭性的恶性肿瘤,其发病率和死亡率在全球范围内呈上升趋势^[1],其5年生存率低于20%^[2]。近年来,随着肿瘤微环境研究的深入,肠道微生物组在肿瘤发生、发展及治疗反应中的重要作用逐渐受到关注^[3]。肠道微生物群落与宿主间的平衡对健康至关重要^[4],其失衡与多种癌症的发生、发展及治疗反应密切相关^[5],肠道微生物可能通过调节宿主免疫反应、影响药物代谢、产生特定代谢物等机制影响肿瘤进展及治疗效果^[6-7]。例如,在结直肠癌中,特定的肠道菌群组成已被证实与免疫检查点抑制剂的疗效相关^[3]。鉴于胆管癌的解剖学特性,推测肠道微生物多样性的变化可能对胆管癌的治疗产生重要影响。

本研究旨在通过纵向分析胆管癌患者在手术、化疗及免疫治疗下的肠道微生物多样性变化,探讨其与治疗效果之间的潜在联系。本次研究将采用16S rRNA测序技术和生物信息学分析方法,结合详细的临床数据和生物标志物分析,以全面评估微生物多样性与治疗反应之间的关系。这种多维度的研究方法有望提供更加全面和可靠的结果,为胆管癌患者肠道微生物组与治疗反应之间的关系提供新的见解,为个体化治疗方案的制定和预后评估提供新的思路,最终期望改善胆管癌患者的临床结局。

对象和方法

1 研究对象

本研究在2020年1月至2024年5月期间招募了45名在江苏大学附属句容医院普外科诊断为胆管癌的患者。纳入标准包括:年龄18岁以上,经病理学确诊为胆管癌,接受标准治疗方案,且能够完成全程随访。排除标准包括:既往有其他恶性肿瘤病史,近3个月内使用抗生素或益生菌制剂,患有严重影响肠道微生物的疾病(如炎症性肠病),以及无法配合完成研究的患者。

本研究方案获得医院伦理委员会的批准同意,研究过程严格遵循《赫尔辛基宣言》的伦理原则。所有参与者均被详细告知研究目的、方法、潜在风险和益处,并签署了知情同意书。患者可随时退出研究,且不会

影响其常规治疗。

2 研究设计

本研究为前瞻性单中心临床研究。根据患者接受的治疗方式,分为3组:(1)手术组:15名患者接受胆管癌的根治性手术治疗;(2)化疗组:15名患者接受标准的化疗方案;(3)免疫治疗组:15名患者接受免疫检查点抑制剂或其他免疫治疗方案。在各组内,进一步根据患者对治疗的反应进行分组,根据国际标准的实体瘤疗效评价标准(RECIST)分为4类:(1)完全缓解组(CR):肿瘤完全消失,至少持续4周;(2)部分缓解组(PR):肿瘤最大直径缩小至少30%,至少持续4周;(3)病情稳定组(SD):肿瘤大小变化不足以达到部分缓解或进展标准;(4)疾病进展组(PD):肿瘤大小增加至少20%,或出现新的病灶。患者的粪便样本于治疗前(基线)、治疗中期、治疗结束3个时间点进行收集,以分析肠道微生物群的动态变化。本研究中,根据每种治疗方案的特点,治疗中期和治疗结束的时间点存在差别,对于治疗中期,其中(1)手术组:手术后3~4周,患者基本恢复且术后辅助治疗开始前的时间点;(2)化疗组:患者完成2~3个化疗周期后,即化疗开始后的6~8周;(3)免疫治疗组:患者接受3~4次免疫治疗后,即免疫治疗开始后的6~8周。对于治疗结束,其中(1)手术组:手术后6个月,患者完成所有术后辅助治疗;(2)化疗组:患者完成全部化疗疗程,通常为6~8个化疗周期(即4~6个月);(3)免疫治疗组:患者完成6个月的免疫治疗,或根据治疗效果决定是否终止或继续治疗。本研究亦控制了多个潜在混杂因素,包括患者的年龄、性别、肿瘤分期、生活方式和饮食习惯等。通过生存分析,系统评估肠道微生物多样性与治疗反应之间的关系,并比较不同治疗组内外的差异。

3 微生物多样性分析

患者粪便样本经低温保存后,使用DNA提取试剂盒进行DNA提取,并通过NanoDrop检测纯度和浓度。提取的DNA通过PCR扩增细菌16S rRNA基因的V3~V4可变区。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳确认后,在Illumina MiSeq平台进行高通量测序。测序数据经QIIME2软件处理,包括序列拼接、低质量序列

的过滤和去除嵌合体等步骤。随后基于 Greengenes 和 SILVA 参考数据库对序列中的操作分类单元 (OTU) 进行分类注释, 以确定各类微生物丰度及不同样本的分布差异。微生物多样性分析主要包括 α 多样性 (Shannon 和 Chao1 指数) 评估单一样本内的丰富度和均一性, 以及 β 多样性分析比较样本内微生物群差异。此外, 本研究通过差异丰度分析探讨微生物群组成与治疗反应的关系, 重点评估不同治疗阶段和治疗效果下微生物类群的显著变化。并利用 LEfSe (线性判别分析效应量) 方法筛选出与治疗效果相关的重要微生物标志物。

4 治疗反应评估

本研究的治疗反应评估采用多维度的方法, 结合影像学、临床指标和生物标志物的检测, 全面分析胆管癌患者在不同治疗方案下的疗效。其中, 影像学评估基于上述 RECIST 评估标准。临床指标包括患者的体重变化、体能状态 (使用美国东部肿瘤协作组 ECOG 评分)。血清生物标志物检测包括癌症相关标志物 (癌胚抗原 CEA、糖链抗原 CA19-9), 以及炎症和免疫反应相关标志物 [C-反应蛋白 (CRP)、白细胞介素-6 (IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)]。在整个研究过程中, 上述治疗反应的评估均于治疗前 (基线)、治疗中期和治疗结束 3 个纵向时间点进行。

5 统计学分析

定量变量将以均数 \pm 标准差表示, 定性变量则以频数和百分比表示。基线特征的组间比较采用卡方检验 (分类变量) 和 t 检验 (连续变量)。微生物多样性与治疗反应之间的关联将通过多变量回归模型评估。其中 α 多样性 (如 Shannon 指数、Chao1 指数) 和 β 多样性 (如主坐标分析结果) 的分析采用线性回归模型和广义线性模型, 控制年龄、性别、肿瘤分期、治疗类型及生活方式等等混杂因素, 从而更准确地评估肠道微生物多样性与患者治疗反应的独立关联。为确定与治疗效果相关的特定微生物类群, 使用 LEfSe 分析比较不同治疗反应组的微生物丰度差异。生存分析评估肠道微生物多样性与患者临床预后 (无进展生存期 PFS 和总生存期 OS) 的关系, Kaplan-Meier 生存曲线绘制不同微生物多样性水平下的生存情况, 并通过 Log-rank 检验比较组间差异。进一步采用 Cox 比例风险回归模型, 评估微生物多样性对 PFS 和 OS 的独立预测价值, 同时控制其他临床变量的影响。本研究所有统计分析使用 R 软件 (4.0.3) 进行, 双侧检验的显著性水平设定为 $P < 0.05$ 。

结果

1 患者基线特征

本研究共纳入 45 名胆管癌患者, 按治疗方式分为

手术组、化疗组及免疫治疗组, 每组各 15 名患者。3 组患者的基线特征差异无统计学显著性, 表明各组患者的基本情况具有可比性 (表 1)。手术组患者的平均年龄为 62.13 ± 9.45 岁, 化疗组为 63.80 ± 8.92 岁, 免疫治疗组为 61.47 ± 10.38 岁 ($P = 0.764$)。男性患者在手术组、化疗组和免疫治疗组中的比例分别为 60.0%、66.7% 和 60.0% ($P = 0.934$)。各组患者的肿瘤分期 ($P = 0.682$)、BMI ($P = 0.812$)、吸烟史 ($P = 0.893$) 和饮酒史 ($P = 0.774$) 均无显著差异。

表 1 患者基线特征
Table 1 Baseline characteristics of the patients

特征	手术组 (n=15)	化疗组 (n=15)	免疫治疗组 (n=15)	统计量	P
年龄 (岁)	62.13 \pm 9.45	63.80 \pm 8.92	61.47 \pm 10.38	$H = 0.538$	0.764
男性 (%)	9 (60.0%)	10 (66.7%)	9 (60.0%)	$\chi^2 = 0.135$	0.934
肿瘤分期 (%)	II 期 6 (40.0%)	7 (46.7%)	6 (40.0%)	$\chi^2 = 1.506$	0.682
	III 期 5 (33.3%)	4 (26.7%)	5 (33.3%)		
	IV 期 4 (26.7%)	4 (26.7%)	4 (26.7%)		
BMI (kg/m ²)	24.71 \pm 3.28	24.02 \pm 3.12	23.89 \pm 3.56	$H = 0.418$	0.812
吸烟史 (%)	7 (46.7%)	6 (40.0%)	7 (46.7%)	$\chi^2 = 0.224$	0.893
饮酒史 (%)	8 (53.3%)	7 (46.7%)	8 (53.3%)	$\chi^2 = 0.517$	0.774

2 微生物多样性变化

2.1 α 多样性分析 Kruskal-Wallis 检验结果显示, 基线时 3 组患者的 Shannon 指数和 Chao1 指数无显著差异 (Shannon 指数 $P = 0.684$, Chao1 指数 $P = 0.731$), 表明基线肠道微生物多样性相似 (表 2)。治疗中期, 免疫治疗组的 Shannon 指数和 Chao1 指数均显著高于手术组和化疗组 (Shannon 指数 $P = 0.046$, Chao1 指数 $P = 0.031$)。Dunn 检验 (经 Bonferroni 校正) 显示免疫治疗组与手术组和化疗组差异均显著 (Shannon 指数: 手术 vs 免疫 $P = 0.041$, 化疗 vs 免疫 $P = 0.045$; Chao1 指数: 手术 vs 免疫 $P = 0.038$, 化疗 vs 免疫 $P = 0.042$), 而手术组与化疗组间无显著差异。治疗结束时, 免疫治疗组的多样性仍显著高于手术组和化疗组 (Shannon 指数 $P = 0.037$, Chao1 指数 $P = 0.029$)。且组间的差异依然显著 (Shannon 指数: 手术 vs 免疫 $P = 0.036$, 化疗 vs 免疫 $P = 0.047$; Chao1 指数: 手术 vs 免疫 $P = 0.034$, 化疗 vs 免疫 $P = 0.041$), 而手术组与化疗组之间无显著差异。

2.2 β 多样性分析 基于 Bray-Curtis 距离的主坐标分析 (PCoA) 评估微生物群组成变化 (图 1)。Adonis 分析结果显示, 基线时 3 组患者肠道微生物群组成无显著差异, 表明治疗前基线组成相似。但治疗中期和结束时, 免疫治疗组的微生物群组成显著分离, 提示免疫治疗可能会导致肠道微生物群的显著重构。相比之下, 手术组和化疗组在治疗中期和治疗结束时的微生物群组成变化较小, 未出现显著分离。

表 2 治疗前、治疗中期及治疗结束时 α 多样性指数 (Shannon 指数与 Chao1 指数)

Table 2 Alpha diversity index (Shannon index and Chao1 index) before, during and after treatment

时间点	指数	手术组 n=15	化疗组 n=15	免疫治疗组 n=15	Kruskal-Wallis P 值	Dunn 检验校正 P 值	
基线	Shannon	3.45±0.56	3.48±0.53	3.47±0.55	0.684	$P_{\text{手术vs化疗}}=0.327$	
		$P_{\text{手术vs免疫}}=0.461$					
		$P_{\text{化疗vs免疫}}=0.774$					
	Chao1	248.34±45.28	251.23±47.15	252.45±46.78		0.731	$P_{\text{手术vs化疗}}=0.633$
		$P_{\text{手术vs免疫}}=0.875$					
		$P_{\text{化疗vs免疫}}=0.573$					
治疗中期	Shannon	3.38±0.62	3.44±0.58	3.71±0.60	0.046		$P_{\text{手术vs化疗}}=0.376$
		$P_{\text{手术vs免疫}}=0.041$					
		$P_{\text{化疗vs免疫}}=0.045$					
	Chao1	244.11±47.56	249.56±46.29	267.12±48.56		0.031	$P_{\text{手术vs化疗}}=0.742$
		$P_{\text{手术vs免疫}}=0.038$					
		$P_{\text{化疗vs免疫}}=0.042$					
治疗结束	Shannon	3.41±0.60	3.47±0.54	3.76±0.64	0.037		$P_{\text{手术vs化疗}}=0.841$
		$P_{\text{手术vs免疫}}=0.036$					
		$P_{\text{化疗vs免疫}}=0.047$					
	Chao1	246.78±46.32	250.89±45.85	269.45±49.32		0.029	$P_{\text{手术vs化疗}}=0.629$
		$P_{\text{手术vs免疫}}=0.034$					
		$P_{\text{化疗vs免疫}}=0.041$					

表 3 不同时间点的 Adonis 分析结果 (基于 Bray-Curtis 距离)
Table 3 Adonis analysis results at different time points (based on Bray-Curtis distance)

时间点	比较组别	Bray-Curtis 距离	R ²	P
基线	手术组 vs 化疗组	0.021	0.014	0.890
	手术组 vs 免疫治疗组	0.028	0.022	0.716
	化疗组 vs 免疫治疗组	0.025	0.016	0.632
治疗中期	手术组 vs 化疗组	0.065	0.045	0.157
	手术组 vs 免疫治疗组	0.134	0.091	0.021
	化疗组 vs 免疫治疗组	0.129	0.086	0.035
治疗结束	手术组 vs 化疗组	0.071	0.048	0.198
	手术组 vs 免疫治疗组	0.142	0.093	0.017
	化疗组 vs 免疫治疗组	0.137	0.089	0.029

3 不同治疗组之间的微生物群差异

为探讨不同治疗组间肠道微生物群组成差异,本研究采用差异丰度分析和线性判别分析效应量 (LEfSe, Linear Discriminant Analysis Effect Size) 方法,比较了 3 组患者在治疗前(基线)、治疗中期和治疗结束时肠道微生物的丰度变化。

3.1 差异丰度分析 差异丰度分析显示,基线时 3 组患者的 Top 10 肠道细菌属 (如 *Bacteroides*、*Faecalibacterium*、*Akkermansia* 和 *Bifidobacterium*) 无显著差异(图 2A, 表 4),但在治疗中期和治疗结束时,免疫治疗组的 *Bacteroides* 和 *Faecalibacterium* 丰度显著增加高于手术组和化疗组 ($P < 0.05$)。 *Akkermansia* 和 *Bifidobacterium* 属在免疫治疗过程中也显示出显著的丰度增加,提示这些微生物可能在免疫治疗中发挥了重要的调节作用。相比之下, *Ruminococcus*、*Escherichia/Shigella* 和 *Prevotella* 属的丰度在 3 组之间无显著差异。

3.2 LEfSe 分析 进一步确定了治疗相关的特定微生物标志物,在治疗结束时, *Bacteroides* (LDA=3.5) 和 *Faecalibacterium* (LDA=3.2) 也显著增加,与差异丰度分析结果一致(图 2B)。相比之下, *Ruminococcus* 属在化疗组富集 (LDA=2.1), *Escherichia/Shigella* 属在手术组中相对富集 (LDA=1.5),但这些菌群的效应量较低,提示其可能对治疗的作用有限。研究表明,免疫治疗显著重构了肠道微生物群,特定菌群可能在治疗中发挥关键调节作用。

4 微生物多样性与治疗反应的关联

4.1 α 多样性与治疗反应的关联 表 5 展示了不同治疗反应组在治疗前(基线)、治疗中期和治疗结束时的 Shannon 指数和 Chao1 指数。Kruskal-Wallis 检验结果显示,完全缓解组(CR)和部分缓解组(PR)的 α 多样性在治疗中期和结束时显著高于病情稳定组(SD)和疾病进展组(PD) ($P < 0.05$)。尤其在免疫治疗组中,CR 和 PR 患者的微生物多样性显著增加,提示高微生物多样性可能与更好的治疗反应有关。相比

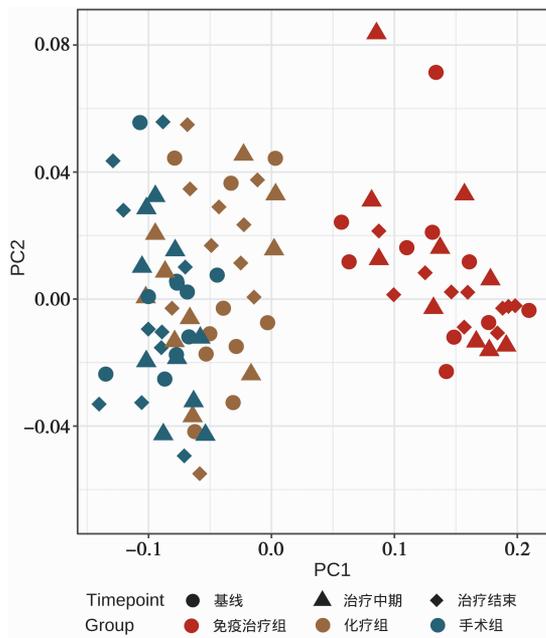
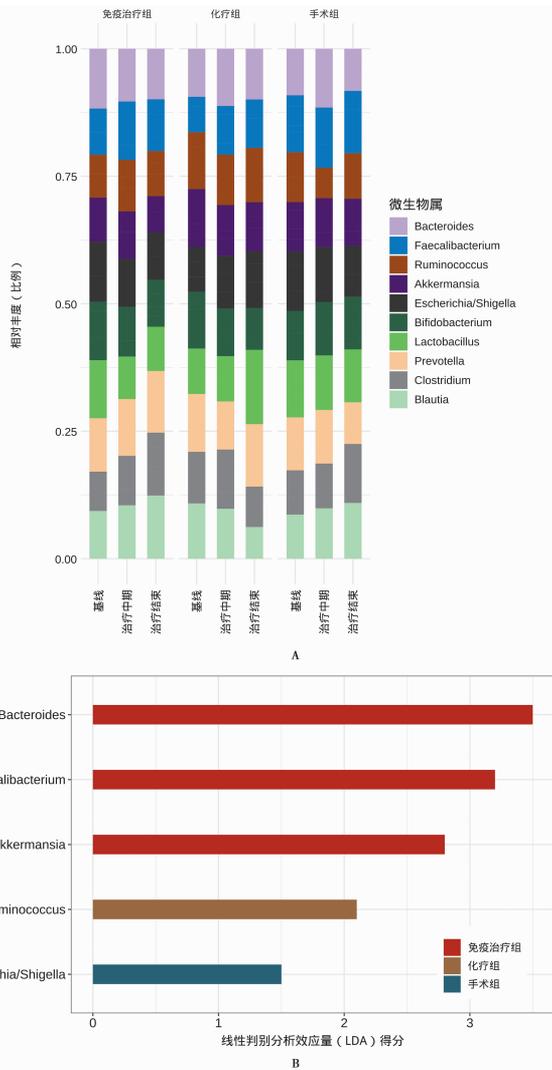


图 1 基于 Bray-Curtis 距离的主坐标分析 (PCoA)
Fig. 1 Principal coordinate analysis (PCoA) based on Bray-Curtis distance

Adonis 分析结果进一步证实了不同组别和时间点间的微生物群组成差异(表 3)。在基线时,3 组间的微生物群组成无显著差异 ($P_{\text{手术vs免疫}}=0.716$, $P_{\text{化疗vs免疫}}=0.632$)。在治疗中期和治疗结束时,免疫治疗组的微生物群组成与手术组和化疗组相比发生了显著变化 ($P_{\text{治疗中期}}=0.021$, $P_{\text{治疗结束}}=0.017$)。手术组和化疗组之间的微生物群组成差异在治疗中期和治疗结束时未达到统计学显著性 ($P_{\text{治疗中期}}=0.157$, $P_{\text{治疗结束}}=0.198$)。

之下,PD组的微生物多样性在治疗过程中显著下降,表明低微生物多样性可能与疾病恶化相关。



A 手术组、化疗组和免疫治疗组在各时间点的 Top 10 微生物属组成结构和丰度堆积柱状图; B LefSe 分析结果:在治疗结束时显著富集的微生物类群

图 2 手术组、化疗组和免疫治疗组在各时间点的 Top 10 微生物属组成结构和丰度堆积柱状图及 LefSe 分析结果

A The composition structure and abundance stacked histogram of the top 10 microbial genera in the surgery group, chemotherapy group and immunotherapy group at each time point; B LefSe analysis results; significantly enriched microbial groups at the end of treatment
Fig. 2 The composition structure and abundance stacked histogram of the top 10 microbial genera in the surgery group, chemotherapy group and immunotherapy group at each time point, and LefSe analysis results

4.2 β 多样性与治疗反应的关联 PCoA 分析显示, CR 组和 PR 组的微生物群组成在治疗中期和治疗结束时逐渐与 SD 组和 PD 组分开(图 3)。治疗结束时, CR 组和 PD 组的微生物群组成差异最为明显。Adonis 分析结果表明,治疗结束时 CR 组与 PD 组的微生物群组成差异显著($P=0.018, R^2=0.092$),表明微生物群组成的变化可能与患者治疗反应相关。

4.3 关键微生物群与治疗反应的关联 LefSe 分析

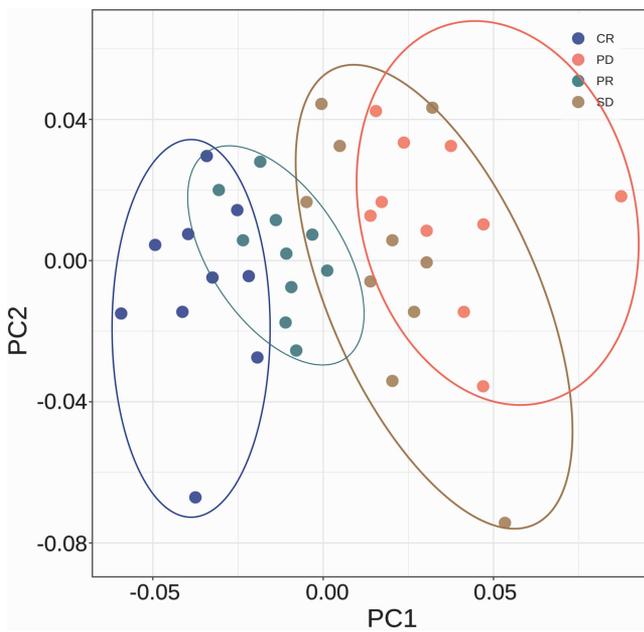
结果显示, *Bacteroides*、*Faecalibacterium* 和 *Akkermansia* 在 CR 组中显著富集,提示这些微生物可能在免疫治疗的良好反应中发挥了重要作用。相比之下, *Escherichia/Shigella* 和 *Prevotella* 属在 PD 组中显著富集,提示这些微生物可能与疾病进展相关。

表 4 手术组、化疗组和免疫治疗组 Top10 细菌属的相对丰度(%)比较
Table 4 Comparison of relative abundance (%) of the top 10 bacterial genera in the surgery group, chemotherapy group, and immunotherapy group

时间点	细菌属	手术组 n=15	化疗组 n=15	免疫治疗组 n=15	Kruskal-Wallis P 值	Dunn 检验校正 P 值		
基线	<i>Bacteroides</i>	0.32±0.08	0.30±0.09	0.31±0.07	0.725	$P_{\text{手术vs化疗}}=0.884$ $P_{\text{手术vs免疫}}=0.973$ $P_{\text{化疗vs免疫}}=0.782$		
		<i>Faecalibacterium</i>	0.18±0.05	0.19±0.06	0.17±0.06	0.812	$P_{\text{手术vs化疗}}=0.861$ $P_{\text{手术vs免疫}}=0.535$ $P_{\text{化疗vs免疫}}=0.624$	
			<i>Ruminococcus</i>	0.12±0.04	0.13±0.05	0.12±0.05	0.895	$P_{\text{手术vs化疗}}=0.763$ $P_{\text{手术vs免疫}}=0.720$ $P_{\text{化疗vs免疫}}=0.905$
	<i>Akkermansia</i>			0.10±0.04	0.11±0.05	0.09±0.04	0.781	$P_{\text{手术vs化疗}}=0.610$ $P_{\text{手术vs免疫}}=0.503$ $P_{\text{化疗vs免疫}}=0.876$
		<i>Escherichia/Shigella</i>		0.08±0.03	0.09±0.04	0.09±0.04	0.743	$P_{\text{手术vs化疗}}=0.776$ $P_{\text{手术vs免疫}}=0.674$ $P_{\text{化疗vs免疫}}=0.558$
			<i>Bacteroides</i>	0.31±0.09	0.33±0.10	0.49±0.08	0.022	$P_{\text{手术vs化疗}}=0.861$ $P_{\text{手术vs免疫}}=0.036$ $P_{\text{化疗vs免疫}}=0.041$
	<i>Faecalibacterium</i>			0.19±0.06	0.21±0.07	0.38±0.09	0.016	$P_{\text{手术vs化疗}}=0.882$ $P_{\text{手术vs免疫}}=0.028$ $P_{\text{化疗vs免疫}}=0.033$
		治疗中期		<i>Ruminococcus</i>	0.13±0.05	0.14±0.05	0.15±0.06	0.458
			<i>Akkermansia</i>		0.11±0.05	0.12±0.05	0.19±0.06	0.038
	<i>Escherichia/Shigella</i>				0.09±0.04	0.09±0.04	0.05±0.02	0.091
治疗结束		<i>Bacteroides</i>		0.32±0.08	0.34±0.09	0.51±0.07	0.019	$P_{\text{手术vs化疗}}=0.764$ $P_{\text{手术vs免疫}}=0.033$ $P_{\text{化疗vs免疫}}=0.040$
			<i>Faecalibacterium</i>	0.20±0.06	0.22±0.07	0.39±0.08	0.014	$P_{\text{手术vs化疗}}=0.445$ $P_{\text{手术vs免疫}}=0.027$ $P_{\text{化疗vs免疫}}=0.030$
	<i>Ruminococcus</i>			0.14±0.05	0.15±0.05	0.16±0.06	0.442	$P_{\text{手术vs化疗}}=0.562$ $P_{\text{手术vs免疫}}=0.364$ $P_{\text{化疗vs免疫}}=0.641$
<i>Akkermansia</i>		0.12±0.05		0.13±0.06	0.20±0.06	0.031	$P_{\text{手术vs化疗}}=0.425$ $P_{\text{手术vs免疫}}=0.041$ $P_{\text{化疗vs免疫}}=0.046$	
		<i>Escherichia/Shigella</i>	0.09±0.04	0.08±0.03	0.05±0.02	0.078	$P_{\text{手术vs化疗}}=0.772$ $P_{\text{手术vs免疫}}=0.062$ $P_{\text{化疗vs免疫}}=0.057$	

表 5 不同治疗反应组的 α 多样性 (Shannon 指数与 Chao1 指数)
Table 5 Alpha diversity (Shannon index and Chao1 index) of different treatment response groups

时间点	指数	CR 组 n=10	PR 组 n=12	SD 组 n=13	PD 组 n=10	Kruskal-Wallis P 值	Dunn 检验校正 P 值
基线	Shannon	3.51±0.52	3.49±0.55	3.45±0.57	3.42±0.60	0.742	$P_{CRvsPR}=0.861$ $P_{CRvsSD}=0.672$ $P_{CRvsPD}=0.513$
	Chao1	252.45±48.65	251.23±46.78	248.34±49.12	247.12±50.15	0.731	$P_{CRvsPR}=0.638$ $P_{CRvsSD}=0.544$ $P_{CRvsPD}=0.827$
治疗中期	Shannon	3.78±0.58	3.72±0.60	3.48±0.54	3.20±0.62	0.029	$P_{CRvsPR}=0.710$ $P_{CRvsSD}=0.034$ $P_{CRvsPD}=0.027$
	Chao1	268.12±49.32	265.78±47.89	251.34±48.12	235.45±50.83	0.017	$P_{CRvsPR}=0.692$ $P_{CRvsSD}=0.031$ $P_{CRvsPD}=0.019$
治疗结束	Shannon	3.82±0.61	3.75±0.62	3.50±0.56	3.15±0.63	0.021	$P_{CRvsPR}=0.268$ $P_{CRvsSD}=0.029$ $P_{CRvsPD}=0.015$
	Chao1	270.45±50.78	268.12±48.56	252.45±49.67	240.34±51.12	0.013	$P_{CRvsPR}=0.810$ $P_{CRvsSD}=0.027$ $P_{CRvsPD}=0.011$



B LEfSe 分析结果: 在治疗结束时显著富集的微生物类群
图 3 基于 Bray-Curtis 距离的治疗反应主坐标分析 (PCoA)

LEfSe analysis results: significantly enriched microbial taxa at the end of treatment

Fig. 3 Principal coordinates analysis (PCoA) of treatment response based on Bray-Curtis distance

5 微生物多样性与生存结局的关联

本研究分析了无进展生存期 (PFS, Progression-Free Survival) 和总生存期 (OS, Overall Survival) 与肠道微生物 α 多样性之间的关系。患者按 α 多样性水平分为高多样性组和低多样性组, 并通过 Kaplan-Meier 生存曲线和 Cox 比例风险回归模型, 评估其与生存结局的关联 (表 6, 图 4)。

表 6 α 多样性与生存结局的关系
Table 6 Relationship between α diversity and survival outcomes

α 多样性指标	组别	中位 PFS (月)	95% CI	P	中位 OS (月)	95% CI	P
Shannon 指数	高多样性组	12.80	10.2-15.5	0.004	19.2	15.1-23.3	0.012
	低多样性组	8.30	6.1-10.4		12.4	9.8-15.0	
Chao1 指数	高多样性组	13.10	10.4-15.8	0.006	19.4	15.3-23.5	0.014
	低多样性组	8.10	5.9-10.2		12.1	9.6-14.8	

结果显示, 高 α 多样性组的中位 PFS 显著优于低多样性组 (12.8 vs 8.3 个月, 95% CI: 10.2-15.5 vs 6.1-10.4 个月, log-rank $P=0.004$)。中位 OS 也显著延长 (19.2 个月 vs 12.4 个月, 95% CI: 15.1-23.3 vs 9.8-15.0 个月, log-rank $P=0.012$)。进一步分析显示, 高 Shannon 指数和 Chao1 指数组的中位 PFS 显著长于低多样性组 ($P=0.004$ 和 $P=0.006$), 中位 OS 也显著延长 ($P=0.012$ 和 $P=0.014$)。这些结果提示, 肠道微生物的丰富度和均一性与胆管癌患者的生存预后密切相关。

多变量 Cox 回归模型调整了患者的年龄、性别、肿瘤分期和治疗方案后, 发现高 Shannon 指数和 Chao1 指数与更长的 PFS 和 OS 显著相关 (Shannon 指数 $HR=0.68$, 95% CI: 0.52-0.88, $P=0.003$; Chao1 指数 $HR=0.65$, 95% CI: 0.49-0.85, $P=0.002$) 显著相关。结果表明, 肠道微生物多样性可能是胆管癌患者生存预后的一个独立预测因子。

6 生物标志物与微生物群的相关性分析

为了进一步探讨肠道微生物群与胆管癌患者临床生物标志物之间的关系, 本研究对患者血清中的重要生物标志物 (CRP、WBC、LDH、IL-6、CA19-9) 与肠道

微生物群的相关性进行了分析。Top10 关键微生物属丰度与生物标志物存在显著关联(图 5,表 7)。

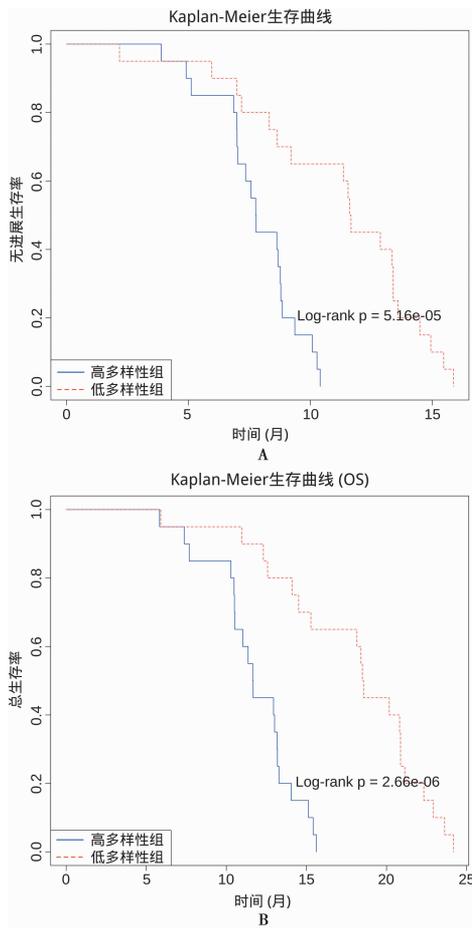


图 4 α 多样性与无进展生长期(A)和总生存期(B)生存结局的 Kaplan-Meier 生存曲线

Fig. 4 Kaplan-Meier survival curves of alpha diversity and progression-free survival (A) and overall survival (B)

表 7 微生物属与临床生物标志物的 Spearman 相关性分析
Table 7 Spearman correlation analysis between microbial genera and clinical biomarkers

微生物属	CRP (ρ, P)	WBC (ρ, P)	LDH (ρ, P)	IL-6 (ρ, P)	CA19-9 (ρ, P)
<i>Bacteroides</i>	-0.42, 0.002	-0.35, 0.005	-0.29, 0.022	-0.40, 0.003	-0.33, 0.008
<i>Faecalibacterium</i>	-0.50, <0.001	-0.44, <0.001	-0.46, <0.001	-0.52, <0.001	-0.48, <0.001
<i>Ruminococcus</i>	-0.12, 0.342	-0.15, 0.276	-0.18, 0.164	-0.14, 0.294	-0.10, 0.489
<i>Akkermansia</i>	-0.39, 0.004	-0.36, 0.005	-0.35, 0.007	-0.41, 0.002	-0.38, 0.004
<i>Escherichia/Shigella</i>	0.40, 0.003	0.38, 0.004	0.42, 0.002	0.44, 0.001	0.35, 0.006
<i>Bifidobacterium</i>	-0.33, 0.009	-0.34, 0.008	-0.30, 0.017	-0.35, 0.006	-0.29, 0.019
<i>Lactobacillus</i>	-0.28, 0.021	-0.27, 0.031	-0.26, 0.038	-0.30, 0.018	-0.25, 0.045
<i>Prevotella</i>	-0.09, 0.521	-0.12, 0.421	-0.10, 0.489	-0.08, 0.543	-0.11, 0.470
<i>Clostridium</i>	-0.35, 0.006	-0.31, 0.014	-0.32, 0.012	-0.36, 0.005	-0.30, 0.017
<i>Blautia</i>	-0.42, 0.002	-0.40, 0.003	-0.33, 0.009	-0.45, 0.001	-0.37, 0.005

Bacteroides 和 *Faecalibacterium* 属与 CRP、WBC、LDH、IL-6 和 CA19-9 呈显著负相关,尤其是 *Faecalibacterium* 属与所有生物标志物均呈显著负相关($P < 0.001$),说明其在抑制炎症和减缓疾病进展中可能起到了重要作用。*Akkermansia* 属的丰度与 CRP 和 IL-6 水平显著负相关($P < 0.01$),表明其可能

通过调节免疫反应来减轻患者的炎症水平。*Escherichia/Shigella* 属与 CRP、WBC、LDH、IL-6 和 CA19-9 水平呈显著正相关($P < 0.01$),提示其丰度增加可能与炎症水平升高和疾病进展加速相关。这与 *Escherichia/Shigella* 属作为潜在病原菌的作用一致。其他菌属如 *Clostridium* 和 *Blautia* 也与多种生物标志物呈中度负相关,提示它们可能在调节炎症和免疫反应中发挥了额外作用。

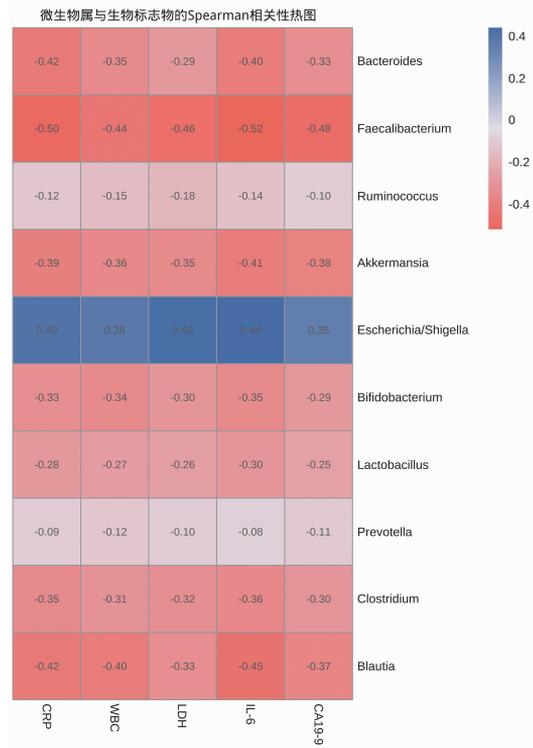


图 5 微生物属与生物标志物的 Spearman 相关性热图
Fig. 5 Spearman correlation heat map of microbial genera and biomarkers

讨论

本研究分析了胆管癌患者肠道微生物多样性的变化及其对治疗反应的影响,揭示了微生物组在预测治疗效果和生存结局中的潜在价值。研究发现,不同治疗方式对患者肠道微生物多样性产生了显著影响,尤其是免疫治疗组患者在治疗过程中 α 多样性(Shannon 指数和 Chao1 指数)显著增加,而手术组和化疗组的变化相对较小。这一发现与 Routy 等的研究一致,免疫治疗可能通过调节肠道微生物组来增强其抗肿瘤效果^[8]。其机制可能涉及到 T 细胞活化、细胞因子分泌模式的改变以及肠道屏障功能的增强等多个方面^[9]。

在本项研究中发现几个与治疗反应密切相关的关键微生物属,尤其是 *Bacteroides*、*Faecalibacterium* 和 *Akkermansia* 在治疗反应良好的患者中显著富集,这与 Gopalakrishnan 等^[10] 研究相呼应,中发现,

Faecalibacterium 属的丰度与黑色素瘤患者对 PD-1 免疫治疗的反应呈正相关。*Bacteroides* 属被认为在维持肠道稳态和调节免疫反应中发挥重要作用^[11]。本研究进一步支持了这一观点,并首次在胆管癌患者中证实了其与健康治疗反应的关联。*Faecalibacterium* 属,特别是 *F. prausnitzii*, 被认为是一种具有抗炎作用的重要益生菌^[12]。本研究结果强调了这类微生物在肿瘤免疫治疗中的潜在价值。*Akkermansia* 属,尤其是 *A. muciniphila*, 近年来因其在代谢健康和免疫调节中的作用而受到广泛关注^[13]。本研究在胆管癌中报道了 *Akkermansia* 属与治疗反应的正相关,这为未来探索以微生物为靶点的辅助治疗策略提供了新的方向。本次研究结果明确显示,较高的 α 多样性与更长的无进展生存期 (PFS) 和总生存期 (OS) 显著相关。这一发现强调了维持健康、多样化的肠道微生物群落对癌症患者预后的重要性。这与文献^[14]中提出的观点一致,即肠道微生物多样性可能是癌症患者预后的一个重要指标。本研究的 Cox 比例风险回归分析进一步证实,高 Shannon 指数和 Chao1 指数是独立于传统临床因素的预后预测因子。这一发现提示可能通过评估和调节肠道微生物多样性来改善胆管癌患者的预后。在本研究中,观察到某些微生物属(如 *Bacteroides* 和 *Faecalibacterium*) 与炎症标志物 (CRP 和 IL-6) 呈显著负相关,而 *Escherichia/Shigella* 属则呈正相关。这些发现揭示了肠道微生物组与宿主炎症反应之间的复杂互动。已有研究表明,某些肠道微生物可通过产生短链脂肪酸等代谢物来调节炎症反应^[15-18],本次研究为这一机制在胆管癌中的重要性提供了新的证据。

综上所述,本研究揭示了胆管癌患者肠道微生物多样性的动态变化及其与治疗反应和预后的密切关联,研究中的发现对评估和调节肠道微生物组在胆管癌治疗中的潜在价值,以及为开发基于微生物组的诊断、预后和治疗策略提供了新的思路,但本次研究为初步探索性观察研究,无法确定因果关系,未来的新研究将考虑进行功能性实验,比如粪菌移植或单菌株干预,进一步阐明特定微生物与治疗反应之间的因果关系,另外也考虑整合宏基因组学、代谢组学和免疫组学数据,提供微生物组、宿主代谢和免疫反应之间的相互作用更全面的图景,以期胆管癌个体化治疗策略提供新的干预选择方案。

【参考文献】

- [1] 赵磊,彭小红,华支攀吸虫致肝胆管纤维化的免疫学机制研究进展[J]. 中国病原生物学杂志,2023,18(5):609-613.
- [2] 陈文辉. 胆囊癌及胆囊结石患者肠道菌群变化研究[D]. 河南:郑州大学,2023.
- [3] Wong CC, Yu J. Gut microbiota in colorectal cancer development and therapy [J]. Nat Rev Clin Oncol, 2023, 20(7): 429-452.
- [4] Howard EJ, Lam TKT, Duca FA. The gut microbiome: connecting diet, glucose homeostasis, and disease [J]. Annu Rev Med, 2022(73): 469-481.
- [5] 刘珂良,王晓慧,李思柔,等. 肠道微生物群在肝胆胰恶性肿瘤中的研究进展[J]. 中国普通外科杂志,2023,32(2): 279-286.
- [6] Wong-Rolle A, Wei HK, Zhao C, et al. Unexpected guests in the tumor microenvironment: microbiome in cancer [J]. Protein Cell, 2021, 12(5): 426-435.
- [7] Ternes D, Tsenkova M, Pozdeev VI, et al. The gut microbial metabolite formate exacerbates colorectal cancer progression [J]. Nat Metab, 2022, 4(4): 458-475.
- [8] Zitvogel L, Galluzzi L, Viaud S, et al. Cancer and the gut microbiota: an unexpected link [J]. Sci Transl Med, 2015, 7(271): 271ps271.
- [9] Routy B, Le Chatelier E, Derosa L, et al. Gut microbiome influences efficacy of PD-1-based immunotherapy against epithelial tumors [J]. Science, 2018, 359(6371): 91-97.
- [10] Gopalakrishnan V, Spencer CN, Nezi L, et al. Gut microbiome modulates response to anti-PD-1 immunotherapy in melanoma patients [J]. Science, 2018, 359(6371): 97-103.
- [11] Garrett WS. Cancer and the microbiota [J]. Science, 2015, 348(6230): 80-86.
- [12] Matson V, Fessler J, Bao R, et al. The commensal microbiome is associated with anti-PD-1 efficacy in metastatic melanoma patients [J]. Science, 2018, 359(6371): 104-108.
- [13] Alexander JL, Wilson ID, Teare J, et al. Gut microbiota modulation of chemotherapy efficacy and toxicity [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2017, 14(6): 356-365.
- [14] Vetizou M, Pitt JM, Daillere R, et al. Anticancer immunotherapy by CTLA-4 blockade relies on the gut microbiota [J]. Science, 2015, 350(6264): 1079-1084.
- [15] 桑慧,李文洁,周颖,等. 胆汁酸、肠道微生物与胆管癌发生和发展关系的研究进展[J]. 中华肝脏病杂志, 2021, 29(5): 493-496.
- [16] Gopalakrishnan V, Helmink BA, Spencer CN, et al. The Influence of the Gut Microbiome on Cancer, Immunity, and Cancer Immunotherapy [J]. Cancer Cell, 2018, 33(4): 570-580.
- [17] 霍丽,畅智慧. 胆道微生物群在常见胆道疾病发生发展中的作用 [J]. 临床肝胆病杂志, 2024, 40(8): 1699-1703.
- [18] Yang Q, Wang B, Zheng Q, et al. A review of gut microbiota-derived metabolites in tumor progression and cancer therapy [J]. Adv Sci (Weinh), 2023, 10(15): e2207366.

【收稿日期】 2024-10-21 【修回日期】 2025-01-11