

# 酒精性脂肪性肝病患者肠道菌群特征及其临床意义

池欣<sup>1,2,3</sup>, 孙秀<sup>1,2,3</sup>, 许艺凡<sup>1,2,3</sup>, 程丹颖<sup>1,3</sup>, 刘顺爱<sup>2,3</sup>, 成军<sup>2,3</sup>, 邢卉春<sup>1,3</sup> (1.首都医科大学附属北京地坛医院 肝病三科, 北京 100015; 2.首都医科大学附属北京地坛医院 新发突发传染病北京市重点实验室, 北京 100015; 3.国家传染病医学中心, 北京 100015)

**摘要:** **目的** 观察酒精性脂肪性肝病(alcohol related fatty liver disease, AFLD)患者肠道菌群的变化特征。**方法** 选择2019年12月至2020年12月在首都医科大学附属北京地坛医院就诊的AFLD患者为AFLD组(26例), 选择性别、年龄等相匹配的健康人群作为健康对照组(32例)。收集研究对象的身高、体质量、生活习惯和生活地区等人口学信息; 同时收集血液和粪便标本, 检测丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、天门冬氨酸氨基转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)、 $\gamma$ -谷氨酰转肽酶( $\gamma$ -glutamyl transpeptidase, GGT)、血清总胆红素(total bilirubin, TBil)、肌酐(creatinine, Cr)、总胆固醇(total cholesterol, TCHO)等临床指标和粪便菌群组成, 并用 $\alpha$ 多样性分析、主坐标分析和LEfSe分析方法等分析AFLD患者肠道菌群特征及其临床意义。**结果**  $\alpha$ 多样性分析显示, AFLD组和健康对照组肠道菌群丰度和多样性相似。基于加权距离和非加权距离的主坐标分析中, AFLD组和健康对照组的肠道菌群结构存在显著差异。AFLD组肠道菌群组成与健康对照组相比, 门水平上, 厚壁菌门(Firmicutes)、变形菌门(Proteobacteria)和梭杆菌门(Fusobacteriota)相对丰度升高, 拟杆菌门(Bacteroidetes)和放线菌门(Actinobacteria)相对丰度降低; 属水平上, AFLD组大肠志贺菌属(*Escherichia Shigella*)、巨单胞菌属(*Megamonas*)、梭杆菌属(*Fusobacterium*)、小类杆菌属(*Dialister*)、*Lachnoclostridium*、乳杆菌属(*Lactobacillus*)、*Tyzzera*、链球菌属(*Streptococcus*)、UCG-002和*Romboutsia*相对丰度较健康对照组显著升高, 普雷沃氏菌属(*Prevotella*)、拟杆菌属(*Bacteroides*)、双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)、粪杆菌属(*Faecalibacterium*)、布劳特氏菌属(*Blautia*)、毛螺菌属(*Lachnospira*)、罗斯氏菌属(*Roseburia*)和瘤胃球菌属(*Ruminococcus*)相对丰度降低。LEfSe分析发现AFLD组和健康对照组有6个显著差异的菌属, AFLD组的梭杆菌属(*Fusobacterium*)、*Lachnoclostridium*和大肠志贺菌属(*Escherichia Shigella*)数量显著增多, 拟杆菌属(*Bacteroides*)、普雷沃氏菌属(*Prevotella*)和粪杆菌属(*Faecalibacterium*)数量显著降低, 差异均有统计学意义(LDA > 4,  $P < 0.05$ )。其中, 相对丰度降低的瘤胃球菌属和拟杆菌属以及相对丰度增加的链球菌属用来诊断AFLD的受试者工作特征(receiver operator characteristic, ROC)曲线下面积分别为0.817、0.757和0.820, 提示它们可能作为区分健康对照和AFLD的微生物学标志物。**结论** AFLD患者肠道菌群结构较健康人群存在显著差异, 与AFLD密切相关的瘤胃球菌属和拟杆菌属降低及链球菌属的增加可能作为酒精性肝病早期诊断的生物标志物。

**关键词:** 脂肪性肝病; 酒精性; 肝病; 肠道菌群; 临床

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7380.2023.01.004

基金项目: 首都卫生发展科研专项(重点攻关)(CFH2020-1-2171); 北京市医院管理局消化内科学科协同发展中项目(XXT26); 国家重点研发计划“病原学与防疫技术体系研究”重点专项(2021年度)(2021YFC2301801)

通讯作者: 邢卉春 Email: hchxing@sohu.com

### Characteristics and clinical significance of intestinal microbiota in patients with alcoholic fatty liver disease

Chi Xin<sup>1,2,3</sup>, Sun Xiu<sup>1,2,3</sup>, Xu Yifan<sup>1,2,3</sup>, Cheng Danying<sup>1,3</sup>, Liu Shun'ai<sup>2,3</sup>, Cheng Jun<sup>2,3</sup>, Xing Hui-chun<sup>1,3</sup>

(1.Department of Hepatology Division 3, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015, China; 2.Beijing Key Laboratory of Emerging Infectious Diseases, Institute of Infectious Disease, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015, China; 3.National Center For Infectious Diseases, Beijing 100015, China)

**Abstract: Objective** To investigate the changes of intestinal microbiota in patients with alcohol related fatty liver disease (AFLD). **Methods** Patients with AFLD in Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University from December 2019 to December 2020 were selected as AFLD group (26 cases), and healthy people matched with gender and age were selected as healthy control group (32 cases). Demographic information such as height and weight of subjects were collected. At the same time, blood and stool samples, living habits and living areas were collected to detect the clinical indicators [alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (ALP),  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase (GGT) total bilirubin (TBil), creatinine (Cr), total cholesterol (TCHO)] of hematology and the composition of intestinal microbiota. The characteristics of intestinal microbiota in patients with AFLD and its relationship with clinical indicators were analyzed by alpha diversity analysis, principal coordinate analysis and LEfSe analysis. **Results** Alpha diversity analysis showed that the abundance and diversity of intestinal microbiota in AFLD group and healthy control group were similar. In the principal coordinate analysis (PCoA) based on weighted UniFrac distance and unweighted UniFrac distance, there were significant differences in the structure of intestinal microbiota between AFLD group and healthy control group. The structure of intestinal microbiota in AFLD group has changed. Compared with healthy control group, the relative abundance of Firmicutes, Proteobacteria and Fusobacteriota increased, while the relative abundance of Bacteroidetes and Actinobacteria decreased. At the genus level, the relative abundances of *Escherichia Shigella*, *Megamonas*, *Fusobacterium*, *Dialist*, *Lachnospirillum*, *Lactobacillus*, *Tyzzereella*, *Streptococcus*, *UCG-002* and *Romboutsia* in AFLD group were significantly higher than those in healthy control group. The relative abundance of *Prevotella*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Faecalibacterium*, *Blautia*, *Lachnospira*, *Roseburia* and *Ruminococcus* decreased. LEfSe analysis showed that there were 6 bacterial genera with significant differences between AFLD group and healthy control group. The number of *Fusobacterium*, *Lachnospirillum* and *Escherichia Shigella* in AFLD group increased significantly, and the number of *Bacteroides*, *Prevotella* and *Faecalibacterium* decreased significantly, and the difference was statistically significant ( $LDA > 4$ ,  $P < 0.055$ ). Among them, the area under the receiver operator characteristic (ROC) curve of *Ruminococcus* and *Bacteroidetes* with decreased relative abundance and *Streptococcus* with increased relative abundance were 0.832, 0.768 and 0.823, respectively, suggesting that they may be used as microbial markers to distinguish healthy control from AFLD. **Conclusions** There are significant differences in the structure of intestinal microbiota in patients with AFLD. The decreased *Ruminococcus* and *Bacteroidetes* and increased *Streptococcus*, which closely associated with AFLD, may be served as biomarkers for the early diagnosis of ALD.

**Key words:** Fatty liver disease, alcoholic; Liver disease; Intestinal microbiota; Clinical

酒精性脂肪性肝病(alcohol related fatty liver disease, AFLD)是由于长期饮酒所导致的肝内脂肪堆积超过肝脏重量5%的一种慢性肝脏疾病,是酒精相关性肝病(alcohol-related liver disease, ALD)最常见和可逆的阶段,几乎所有经常饮酒的人都会发生脂肪变性,如果不加以控制可进展为肝纤维化、肝硬化甚至肝癌<sup>[1,2]</sup>。AFLD早期无明显临床症状且可逆,但肝脏脂肪变性的加重会使得肝脏更易遭受毒素侵害,从而促进晚期ALD的发生和发展<sup>[3]</sup>。目前临床上对AFLD最好的治疗手段仍然是戒酒,尚无其他有效方法,探究肠道菌群在AFLD发病中的作用将为深入了解AFLD的发病机理提供重要的理论基础<sup>[4]</sup>。

研究表明,氧化应激、缺氧和炎症细胞因子等在AFLD的发病机制中发挥重要作用<sup>[5]</sup>。由于肠肝轴的存在,肠道菌群的变化与AFLD密切相关,肠道菌群是AFLD发生和进展过程中的关键因素<sup>[6]</sup>。长期饮酒会破坏肠肝轴,改变肠道屏障功能,肠道通透性改变,炎症因子如白细胞介素6(interleukin 6, IL-6)、白细胞介素4(interleukin 4, IL-4)、肿瘤坏死因子 $\alpha$ (tumor necrosis factor  $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )的分泌增加,从而导致肝细胞损伤加重<sup>[7]</sup>和肝脏促炎环境的形成<sup>[8]</sup>。另外,肠道菌群的失衡还会影响肝脏中的脂质代谢,从而加剧酒精诱导的肝脏脂质稳态的有害变化<sup>[9]</sup>。大量证据表明,ALD患者的肠道菌群发生变化,表现为小肠细菌过度生长,致病菌大量繁殖,优势菌群被抑制<sup>[4]</sup>,即使是在酒精性肝损伤的早期阶段也存在菌群失调<sup>[10]</sup>。有研究提示,与正常对照组小鼠相比,AFLD小鼠肠道微生物的丰富度和多样性增加,肠球菌科、肠球菌属和链球菌属的相对丰度增加<sup>[11]</sup>。但相关临床试验较少,尤其是针对中国人群的研究。因此,本研究纳入了AFLD患者,同时选择了性别、年龄等相匹配的健康人群作为研究对照,使用16S rDNA高通量测序技术对两组患者粪便微生物群特征进行鉴定,以明确AFLD患者的肠道菌群变化情况及其与临床的关系,明确肠道菌群变化在AFLD中的作用,并为靶向于肠道菌群AFLD的诊断及治疗奠定基础。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选取2019年12月至2020年12月在北京医科大学附属北京地坛医院门诊就诊的AFLD患者为AFLD组,并选择性别、年龄相匹配的健康人群为研究对照(健康对照组)。纳入标准:所有研究对象均为18~70周岁的男性,生活地区和生活习惯无显著差异,能理解并签署书面知情同意,

自愿加入本研究;其中AFLD组还应满足①有长期饮酒史(一般超过5年,折合乙醇量男性 $\geq 40$  g/d,女性 $\geq 20$  g/d);②影像学诊断符合脂肪肝标准,血清丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT) $> 50$  U/L或天门冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST) $> 35$  U/L或 $\gamma$ -谷氨酰转肽酶( $\gamma$ -glutamyl transpeptidase, GGT) $> 50$  U/L;健康对照组应符合世界卫生组织对健康的定义(即在身体、精神和社会等方面均处于良好状态的),肝功能、肾功能等无异常。排除标准:①合并乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)、丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HBV)、药物、自身免疫等其他原因导致的慢性肝病患者;②入组前1个月内应用过抗真菌、抗细菌药物或口服肠道微生态制剂;③入组前1个月内合并有细菌、真菌感染的患者;④合并人类免疫缺陷病毒感染的患者;⑤药物滥用或者曾有药物滥用史者患者;⑥同时患有其他影响肠道微生态的消化道疾病如胰腺炎、炎症性肠病等。本研究经首都医科大学附属北京地坛医院伦理委员会审核通过,伦理审查批件号:京地伦科字(2019)第(027)-001号,患者均签署知情同意书,并且在中国临床试验注册中心审核通过(注册号:ChiCTR1900026113)。

## 1.2 研究方法

**1.2.1 标本采集** 采集符合入选及排除标准的患者空腹外周静脉血。同时收集患者同日新鲜粪便标本于无菌留便盒中,在超净台上用无菌勺将粪便标本移入冻存管中,之后快速转运至-80℃冰箱冻存备用。

**1.2.2 检测方法** 血液标本在首都医科大学附属北京地坛医院检验科完成检测。采用全自动生化分析仪(日立7600-020,日本)检测ALT、AST、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)、GGT、血清总胆红素(total bilirubin, TBil)、肌酐(creatinine, Cr)、总胆固醇(total cholesterol, TCHO)等;采用全自动血细胞分析仪(希斯美康XN-10,中国)检测平均红细胞体积(mean corpuscular volume, MCV)等血常规相关指标。冻存的标本送至北京诺禾致源科技股份有限公司进行16S rDNA V3~V4区高通量测序。

**1.3 统计学处理** 使用Shannon指数和Simpson指数计算 $\alpha$ 多样性;基于加权距离和非加权距离进行主坐标分析(principal co-ordinates analysis, PCoA)确定属水平上的 $\beta$ 多样性;线性判别分析(linear discriminant analysis effect size, LEfSe)中线性判别分析值(linear discriminant analysis, LDA) $> 4$ ,

认为是相对丰度显著差异的生物学指标。临床数据采用SPSS 17.0和MedCalc 20.0软件进行统计分析。年龄、TCHO、HGB等符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，两组间比较采用独立样本 $t$ 检验；ALT、AST、GGT等非正态分布的计量资料以 $M(p_{25}, p_{75})$ 表示，两组间比较采用非参数Mann-Whitney  $U$  检验；计数资料以例数或百分数表示，采用Pearson  $\chi^2$  检验。预测AFLD微生物学标志物的评价采用受试者工作特征（receiver operating characteristic，ROC）曲线分析，通过计算曲线下面积（area under the curve，AUC）评价微生物标志物诊断AFLD的准确性。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 一般资料 本研究共纳入26例AFLD患者及32例健康对照人群。两组间年龄和体重指数（body mass index，BMI）等人口学常量差异无统计学意义（ $P > 0.05$ ）。AFLD组患者ALT、AST、GGT、TCHO、MCV和HGB水平均显著高于健康对照组（ $P < 0.05$ ），两组间ALB、TBil、WBC、RBC、PLT和Cr水平差异无统计学意义（ $P > 0.05$ ），见表1。

2.2 两组肠道微生物群落多样性分析

2.2.1  $\alpha$ 多样性分析 两组58例样本共聚类为4439个操作分类单元（operational taxonomic units，OTUs），其中AFLD组特有的OTUs为1991个，健康对照组特有的OTUs为1564个，两组间共有的OTUs为884个（图1）。 $\alpha$ 多样性分析显示（图2），与健康对照组相比较，ALFD组 $\alpha$ 多样性指数（Shannon指数和

Simpson指数）差异无统计学意义（ $z = -0.735$ ， $P = 0.462$ ； $z = -0.969$ ， $P = 0.332$ ），说明两组研究对象肠道菌群的丰度和多样性相似。

2.2.2  $\beta$ 多样性分析 基于加权距离和非加权距离对健康对照组和AFLD组样本进行PCoA，两组样本相互分离，菌群结构差异显著（图3），提示AFLD患者肠道菌群结构组成较健康对照组已发生明显改变。

2.3 两组肠道菌群组成特征 根据物种注释的结果，选取相对丰度较高的物种，生成物种相对丰度柱形图（图4）。AFLD组和健康对照组相对丰度排名前5的菌门为厚壁菌门（Firmicutes）（50.1%、43.8%）、变形菌门（Proteobacteria）（17.2%、4.4%）、梭杆菌门（Fusobacteriota）（2.8%、0.1%）、拟杆菌门（Bacteroidetes）（24.7%、47.1%）和放线菌门（Actinobacteria）（2.4%、

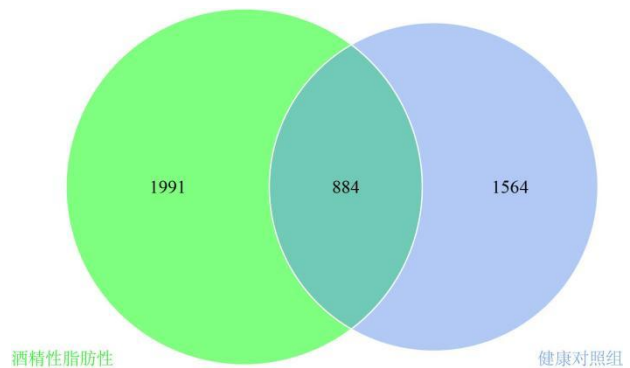


图1 AFLD组和健康对照组聚类的OTUs数目  
注：绿色圆圈表示AFLD组，蓝色圆圈表示健康对照组，中间重叠的部分为两组共有的OTUs。

表1 AFLD组和健康对照组的基线资料

指标	AFLD组（26例）	健康对照组（32例）	统计量值	P值
年龄（ $\bar{x} \pm s$ ，岁）	45.12 $\pm$ 10.58	49.50 $\pm$ 8.39	$t = -1.761$	0.084
BMI（ $\bar{x} \pm s$ ，kg/m <sup>2</sup> ）	23.42 $\pm$ 2.38	23.43 $\pm$ 2.49	$t = -0.026$	0.979
ALT [ $M(p_{25}, p_{75})$ ，U/L]	41.15 (26.23, 64.23)	20.00 (12.93, 27.15)	$z = -4.058$	< 0.001
AST [ $M(p_{25}, p_{75})$ ，U/L]	30.80 (21.70, 60.55)	19.25 (16.75, 22.13)	$z = -4.027$	< 0.001
GGT [ $M(p_{25}, p_{75})$ ，U/L]	70.60 (44.65, 245.35)	16.70 (12.15, 25.25)	$z = -5.246$	< 0.001
ALB（ $\bar{x} \pm s$ ，g/L）	47.28 $\pm$ 4.71	46.11 $\pm$ 2.39	$t = 1.110$	0.275
TBil [ $M(p_{25}, p_{75})$ ， $\mu$ mol/L]	17.00 (11.70, 25.75)	14.05 (12.58, 17.43)	$z = -1.512$	0.131
TCHO（ $\bar{x} \pm s$ ，mmol/L）	4.91 $\pm$ 0.82	4.43 $\pm$ 0.74	$t = 2.331$	0.023
WBC [ $M(p_{25}, p_{75})$ ， $\times 10^9/L$ ]	5.27 (4.63, 6.71)	5.78 (4.92, 6.19)	$z = -0.265$	0.791
RBC [ $M(p_{25}, p_{75})$ ， $\times 10^9/L$ ]	4.86 (4.64, 4.99)	4.98 (4.80, 5.23)	$z = -1.536$	0.124
MCV（ $\bar{x} \pm s$ ，fl）	94.76 $\pm$ 5.31	91.09 $\pm$ 3.36	$t = 3.133$	0.003
HGB（ $\bar{x} \pm s$ ，g/L）	154.48 (152, 165)	154.25 (146, 160)	$z = -1.486$	0.002
PLT（ $\bar{x} \pm s$ ， $\times 10^9/L$ ）	229.09 $\pm$ 47.37	216.69 $\pm$ 49.55	$t = 0.932$	0.355
Cr（ $\bar{x} \pm s$ ， $\mu$ mol/L）	71.78 $\pm$ 8.94	77.01 $\pm$ 10.88	$t = -1.970$	0.054

3.3%)。其中, AFLD组厚壁菌门、变形菌门和梭杆菌门的相对丰度较健康对照组升高, 拟杆菌门和放线菌门相对丰度降低。AFLD组大肠志贺菌属、巨单胞菌属、梭杆菌属、小类杆菌属、*Lachnoclostridium*、乳杆菌属、*Tyzzereella*、链球菌属、*UCG-002*和*Romboutsia*的相对丰度较健康对照组显著升高, 普雷沃氏菌属、拟杆菌属、双歧杆菌属、粪杆菌属、布劳特氏菌属(*Blautia*)、毛螺菌属、罗斯氏菌属(*Roseburia*)和瘤胃球菌属的相对丰度降低。

2.4 两组显著性差异菌群构成 通过LEfSe分析两组组间具有显著差异的菌群, LDA值设置为4。两组LDA值分布柱形图和进化分支图如图5。AFLD组梭杆菌门(LDA = 4.1,  $P = 0.004$ )、变形菌门

(LDA = 4.8,  $P < 0.001$ )、梭杆菌属(LDA = 4.2,  $P = 0.017$ )、*Lachnoclostridium* (LDA = 4.1,  $P = 0.026$ ) 和大肠志贺菌属(LDA = 4.7,  $P < 0.001$ ) 数量显著富集, 拟杆菌门(LDA = 5.0,  $P < 0.001$ )、拟杆菌属(LDA = 4.9,  $P < 0.001$ )、普雷沃氏菌属(LDA = 4.5,  $P = 0.012$ ) 和粪杆菌属(LDA = 4.1,  $P = 0.004$ ) 数量显著降低, 差异有统计学意义。

2.5 预测AFLD的微生物学标志物 结合属水平上丰度排名靠前的菌属相对丰度的差异以及LEfSe分析中显著差异的菌属, 探索可能用于预测AFLD的微生物学标志物。对各个指标绘制ROC曲线, 计算ROC曲线下面积值, 发现预测AFLD的ROC曲线下面积最大的3个菌属是瘤胃球菌属、链球菌属、拟

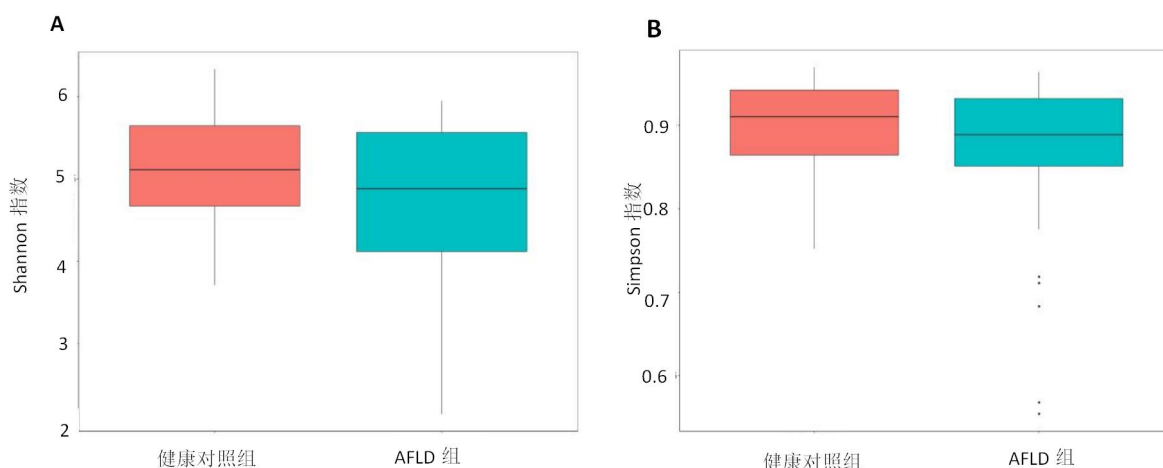


图2 AFLD组和健康对照组肠道菌群的物种丰富度和均匀度

注: 与健康对照组相比较, AFLD组 Shannon 指数(图A,  $z = -0.735$ ,  $P = 0.462$ )和 Simpson 指数(图B,  $z = -0.969$ ,  $P = 0.332$ ) 差异无统计学意义。

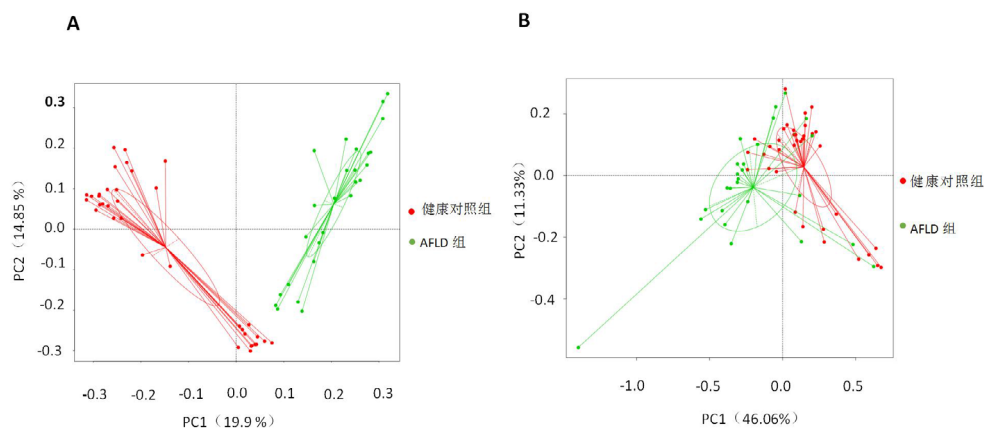


图3 AFLD组和健康对照组的 $\beta$ 多样性分析

注: A 为 AFLD 组和健康对照组基于非加权距离的 PCoA 分析, 横坐标表示一个主成分, 纵坐标表示另一个主成分, 百分比表示主成分对样本差异的贡献值, 样本距离远, 表示物种群落结构差异大; B 为 AFLD 组和健康对照组基于加权距离的 PCoA 分析。



杆菌属，分别为0.817、0.820、0.757，提示这3个菌属可用来区分AFLD患者和健康对照组。其中，链球菌属和瘤胃球菌属相对丰度比值（潜在有害菌/潜在有益菌）的ROC曲线下面积为0.885。临床指标中ALT、AST、GGT和TCHO的ROC曲线下面积分别为0.816、0.810、0.903和0.677，见图6。其中，将菌群和临床参数生物标志物各个因素的

ROC曲线下面积进行两两比较，发现除了GGT诊断的准确性显著高于拟杆菌属以外（ $z = 2.132$ ， $P = 0.033$ ），其他因素间两两比较差异均无统计学意义（ $P$ 均 $> 0.05$ ），见表2。说明我们提出的微生物学标志物除了拟杆菌属的诊断价值略低于GGT，其他几个微生物学标志物的诊断价值不劣于临床指标。

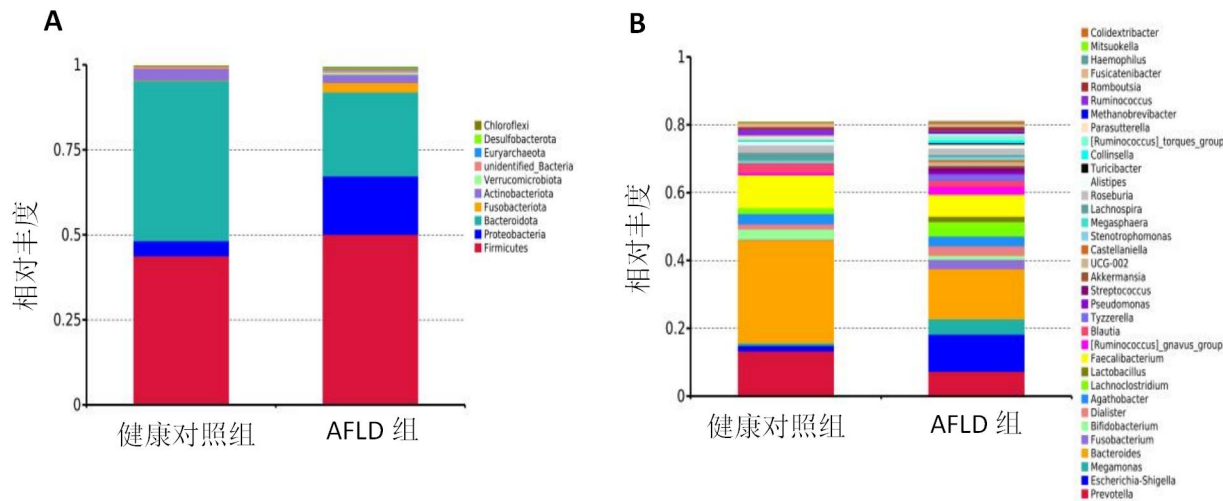


图4 AFLD组和健康对照组物种的相对丰度柱形图

注：A为相对丰度排名前10的菌门；B为相对丰度排名前30的菌属。

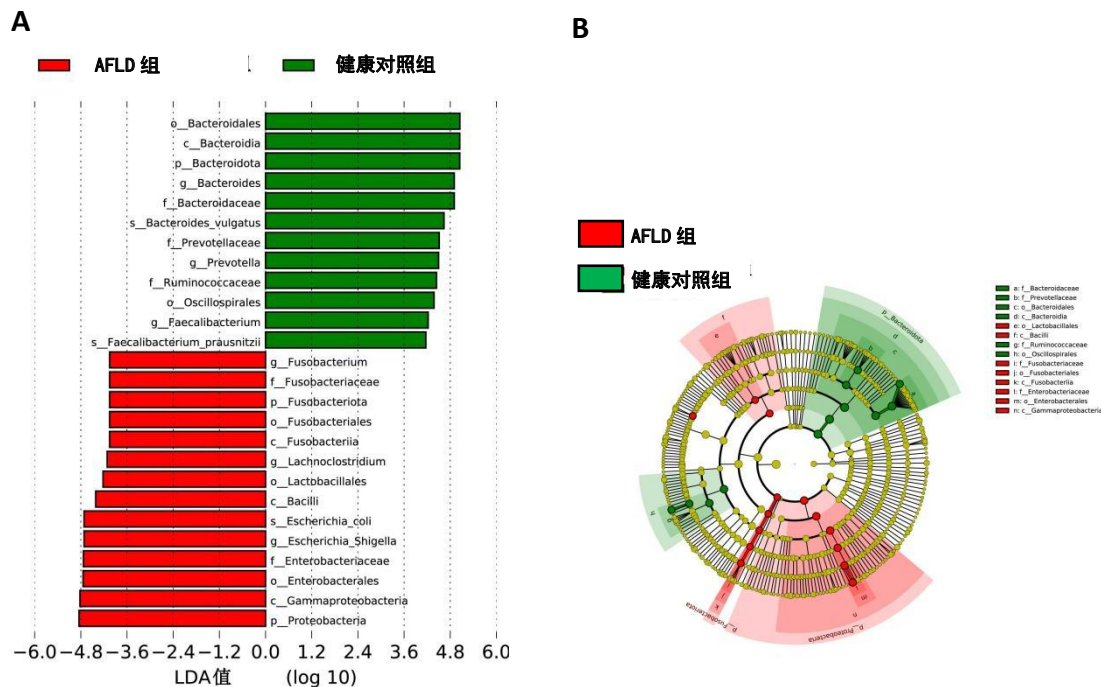


图5 AFLD组和健康对照组有显著差异的菌属

注：A为LDA值分布柱形图，LEfSe分析显示了AFLD组和健康对照组中丰度显著差异的物种，柱形图的长度表示差异物种的影响大小。红色节点表示差异物种在AFLD组中富集，绿色节点表示在健康对照组中富集；B为进化分析图，由内至外辐射的圆圈代表了由门至属的分类级别，不同分类级别上的小圆圈表示该水平上的一个分类，小圆圈的直径代表了相对丰度的大小；红色和绿色节点分别表示在AFLD组和健康对照组中起到重要作用的微生物群。

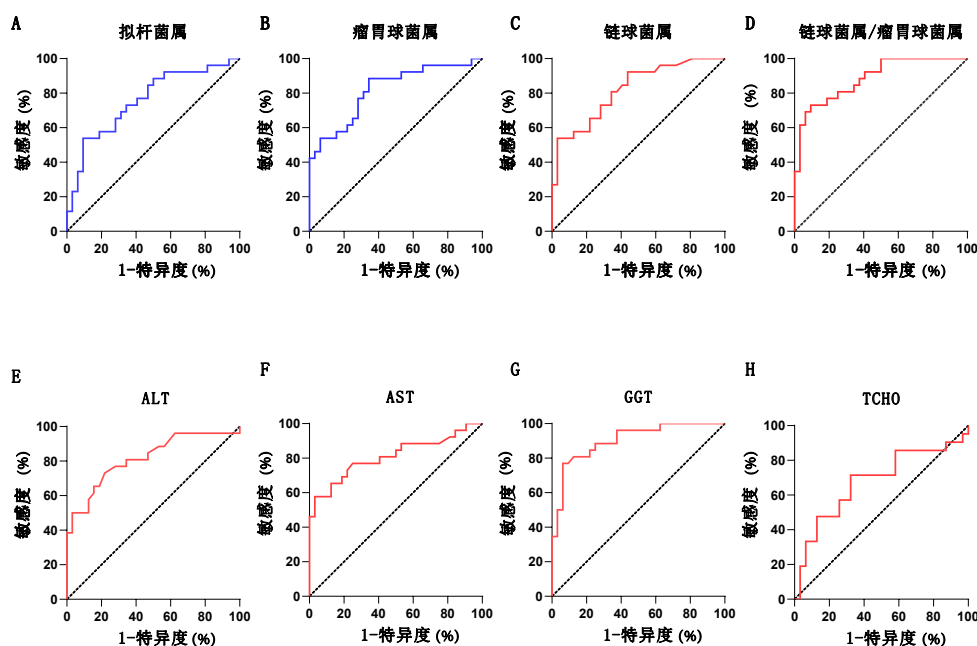


图6 预测 AFLD 生物学标志物的 ROC 曲线

表2 预测 AFLD 的生物学标志物的 AUC

物种	AUC	95%CI	P值
瘤胃球菌属	0.817	0.706~0.928	< 0.001
链球菌属	0.820	0.714~0.927	< 0.001
拟杆菌属	0.757	0.631~0.883	< 0.001
链球菌属/瘤胃球菌属	0.885	0.801~0.968	< 0.001
ALT	0.816	0.702~0.929	< 0.001
AST	0.810	0.690~0.929	< 0.001
GGT	0.903	0.826~0.981	< 0.001
TCHO	0.677	0.520~0.835	0.031

注：瘤胃球菌属和临床指标的 AUC 相比，ALT  $z = 0.673$ ,  $P = 0.501$ ; AST  $z = 0.615$ ,  $P = 0.539$ ; GGT  $z = 0.488$ ,  $P = 0.626$ ; TCHO  $z = 1.421$ ,  $P = 0.155$ ; 链球菌属和临床指标的 AUC 相比，ALT  $z = 0.086$ ,  $P = 0.932$ ; AST  $z = 0.074$ ,  $P = 0.941$ ; GGT  $z = 1.026$ ,  $P = 0.305$ ; TCHO  $z = 0.952$ ,  $P = 0.341$ ; 拟杆菌属和临床指标的 AUC 相比，ALT  $z = 0.875$ ,  $P = 0.382$ ; AST  $z = 0.828$ ,  $P = 0.408$ ; GGT  $z = 2.043$ ,  $P = 0.041$ ; TCHO  $z = 0.035$ ,  $P = 0.972$ ; 链球菌属/瘤胃球菌属和临床指标的 AUC 相比，ALT  $z = 1.173$ ,  $P = 0.241$ ; AST  $z = 1.127$ ,  $P = 0.260$ ; GGT  $z = 0.100$ ,  $P = 0.921$ ; TCHO  $z = 2.022$ ,  $P = 0.043$ 。

### 3 讨论

肠道菌群是一个复杂的微生物系统，有1000多种细菌组成，基因组数量比人类多150倍，在宿主自身免疫、营养代谢和内分泌调节等方面发挥重要作用<sup>[12]</sup>，肠道微生物群的组成和多样性受年龄、环境和生活方式等的影响<sup>[13]</sup>。大量动物研究表明，酒精摄入可降低肠道黏液厚度，增加肠黏膜通透性，导致细菌和细菌产物移位，肠道微生物群改变，从而诱发炎症性改变，导致或加重AFLD的发生<sup>[14-17]</sup>。与健康对照组相比，AFLD小鼠厚壁菌门数量减少，拟杆菌门和疣微菌门数量增加<sup>[14]</sup>。也有

人类研究支持AFLD与肠道微生物群密切相关，与健康对照组相比较，AFLD患者粪便嗜粘艾克曼菌（*A. muciniphila*）数量显著减少<sup>[18]</sup>。ALD患者肠道微生物变化的相关临床试验较多，但研究对象大多是针对肝硬化、重症酒精性肝炎等晚期阶段的ALD患者，ALD早期和晚期阶段肠道菌群的组成和多样性存在显著差异<sup>[19]</sup>。虽然一些研究已经确定了AFLD肠道微生物失调模式，但大多是动物实验，临床试验较少<sup>[20]</sup>。因此，本研究选择了AFLD的患者和健康人群作为研究对象，探讨AFLD患者肠道菌群的变化特征。

本研究表明,与健康对照组相比,AFLD组的 $\alpha$ 多样性未发生改变,两组菌群丰度和多样性相似。 $\beta$ 多样性分析中,两组间样本相互分离,AFLD组肠道菌群结构较健康对照组已经发生明显改变。临床上多项证据表明,肠道菌群失调的表现之一就是肠道菌群多样性的改变<sup>[18,21]</sup>。这种变化可能是由于酒精滥用破坏了肠道屏障功能,使肠道内细菌和有害代谢产物等发生渗漏<sup>[22]</sup>。物种相对丰度柱形图可看出,门水平上,与健康对照组相比,AFLD组厚壁菌门、变形菌门和梭杆菌门的相对丰度升高,拟杆菌门和放线菌门的相对丰度降低。Mutlu等<sup>[23]</sup>研究显示,酗酒者肠道菌群的变形菌门丰富,拟杆菌门减少。Bajaj等<sup>[24]</sup>也提到饮酒人群梭杆菌门的相对丰度高于健康人群,拟杆菌门的相对丰度低于健康人群。同时,随着ALD的进展,变形菌门和梭杆菌门呈逐渐富集的趋势,拟杆菌门呈下降趋势<sup>[18]</sup>。这些结果提示,长期的酒精消耗可能会减少拟杆菌门和放线菌门,增加变形菌门。增加的变形菌门包括大肠杆菌、沙门氏菌属、弧菌属和幽门螺杆菌属等革兰氏阴性致病菌<sup>[25]</sup>,是肠道优势菌门中最不稳定的一个门。疾病状态时变形菌门大量繁殖,促进肠道免疫系统的炎症激活和外源性病原体的入侵<sup>[26]</sup>,导致全身器官形成促炎环境,从而加重肝脏炎症程度<sup>[27]</sup>。丰度降低的放线菌门主要是双歧杆菌属、*Atopobium*和*Collinsella*组成,对机体有潜在有益作用<sup>[28]</sup>。属水平上,AFLD组拟杆菌属、双歧杆菌属和瘤胃球菌属等专性厌氧菌数量减少,专性厌氧菌可通过一系列作用限制致病菌的生长及有毒物质在肠黏膜上皮细胞的黏附,对肠道菌群结构起到改善作用<sup>[29]</sup>。而这些细菌的减少可能是由于长期酒精的暴露诱导活性氧产生,导致氧化应激,专性厌氧的这些细菌易受到影响<sup>[21]</sup>。同时,AFLD组中与炎症和感染相关的一些潜在致病菌(如大肠志贺菌属、梭杆菌属和链球菌属等)数量增加,潜在抗炎的有益菌(罗斯氏菌属、普雷沃氏菌属、拟杆菌属、双歧杆菌属、瘤胃球菌属和柔嫩梭菌属等)数量减少,这种肠道微生态的失调会通过免疫、内分泌等途径诱发机体的免疫和代谢功能紊乱,激活炎症级联反应,导致肝细胞损伤,进而影响患者的预后<sup>[30,31]</sup>。

我国AFLD患病率逐年上升,寻找有价值的预后和诊断生物学标志物在ALD领域非常重要。AFLD诊断的先决条件是饮酒,同时还要根据实验室指标和影像学表现<sup>[32]</sup>,但这些检查和化验存在

有创、价格贵、耗费时间和精力等局限性,另外有些AFLD患者常在肝功能损伤前肠道菌群就已发生失调。无创性微生物标志物在疾病的诊断分期和预后评估中的应用受到了研究者的广泛关注<sup>[33,34]</sup>。之前有学者构建了微生态模型,可有效评估乙型肝炎肝硬化患者肠道菌群的失衡状态,可在一定程度上反映肝病的严重程度<sup>[35]</sup>。因此,本研究也尝试发现可用于AFLD早期诊断的微生物学标志物。用ROC曲线下面积评价微生物群的诊断效能时,我们发现丰度显著增加的链球菌属和丰度显著降低的拟杆菌属和瘤胃球菌属可能作为诊断AFLD的微生物学标志物。研究表明,瘤胃球菌属可产生短链脂肪酸,为肠道细胞提供能量来源,改善肠道屏障功能,同时还具有抗炎作用<sup>[36,37]</sup>,瘤胃球菌属的丰度降低与肠道通透性增加和生态失调有关<sup>[28]</sup>。拟杆菌属代谢可产生色氨酸,其衍生物吲哚是芳香烃受体(aryl hydrocarbon receptor, AhR)的配体,AhR可通过增加IL-22的表达来改善肝脏的屏障功能,从而增加抗菌蛋白的表达<sup>[38]</sup>。链球菌属是ALD患者中主要的致病性细菌,链球菌属的丰度和肝细胞损伤的严重程度呈正相关,可能作为肝硬化患者肝损伤程度的微生物学标志物<sup>[19]</sup>。本研究中,瘤胃球菌属和链球菌属单独诊断AFLD的ROC曲线下面积略高于肝功能指标ALT、AST以及血脂指标TCHO,联合两个菌属时,链球菌属/瘤胃球菌属相对丰度的比值的ROC曲线下面积明显高于ALT、AST和TCHO。微生物学标志物和临床指标的各个因素进行两两比较时,瘤胃球菌属、链球菌属和链球菌属/瘤胃球菌属诊断AFLD的准确性均不劣于ALT、AST、GGT和TCHO,但拟杆菌属的诊断价值低于临床指标中的GGT。这些说明肠道微生物学有可能作为AFLD诊断的生物学标志物之一,但目前仍不能取代临床上的肝功能指标。

综上所述,AFLD患者的肠道菌群结构已经发生明显改变,与感染、炎症等相关的潜在致病菌属增加,与抗炎作用有关的潜在有益菌属降低,从而诱导肝脏的炎症反应,损伤肝细胞,与AFLD的发生和发展密切相关。肠道菌群有可能会成为疾病早期诊断的非侵入性微生物标志物,同时为AFLD新治疗靶点的开发提供新的科学依据。但本研究仅在属水平上对肠道细菌类群进行了横断面分析,未来可进一步使用宏基因分析以及代谢组学分析进行纵向研究,以进一步探讨肠道菌群和AFLD的因果关系。



## 参考文献

- [1] KONG L, CHEN J, JI X, et al. Alcoholic fatty liver disease inhibited the co-expression of Fmo5 and PPAR $\alpha$  to activate the NF- $\kappa$ B signaling pathway, thereby reducing liver injury via inducing gut microbiota disturbance[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2021, 40(1):18.
- [2] JEON S, CARR R. Alcohol effects on hepatic lipid metabolism[J]. *J Lipid Res*, 2020, 61(4):470-479.
- [3] 周群, 张华, 刘平, 等. 胆汁酸G蛋白偶联受体5在非病毒性肝病中的作用[J]. *临床肝胆病杂志*, 2022, 38(9):2172-2176.
- [4] LI B, MAO Q, ZHOU D, et al. Effects of tea against alcoholic fatty liver disease by modulating gut microbiota in chronic alcohol-exposed mice[J]. *Foods*, 2021, 10(6):1232.
- [5] ZHANG T, LI J, LIU C P, et al. Butyrate ameliorates alcoholic fatty liver disease via reducing endotoxemia and inhibiting liver gasdermin D-mediated pyroptosis[J]. *Ann Transl Med*, 2021, 9(10):873.
- [6] SEO B, JEON K, MOON S, et al. Roseburia spp. abundance associates with alcohol consumption in humans and its administration ameliorates alcoholic fatty liver in mice[J]. *Cell Host Microbe*, 2020, 27(1):25-40. e6.
- [7] PLAZA-DÍAZ J, SOLÍS-URRA P, RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ F, et al. The gut barrier, intestinal microbiota, and liver disease: molecular mechanisms and strategies to manage[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(21):8351.
- [8] ALBILLOS A, DE GOTTARDI A, RESCIGNO M. The gut-liver axis in liver disease: Pathophysiological basis for therapy[J]. *J Hepatol*, 2020, 72(3):558-577.
- [9] MUTLU E, KESHAVERZIAN A, ENGEN P, et al. Intestinal dysbiosis: a possible mechanism of alcohol-induced endotoxemia and alcoholic steatohepatitis in rats[J]. *Alcohol Clin Exp Res*, 2009, 33(10):1836-1846.
- [10] TILG H, MATHURIN P. Altered intestinal microbiota as a major driving force in alcoholic steatohepatitis[J]. *Gut*, 2016, 65(5):728-729.
- [11] KANG K, SUN Y, PAN D, et al. Distinctive gut microbial dysbiosis between chronic alcoholic fatty liver disease and metabolic-associated fatty liver disease in mice[J]. *Exp Ther Med*, 2021, 21(5):418.
- [12] LEE NY, SUK K T. The role of the gut microbiome in liver cirrhosis treatment[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 22(1):199.
- [13] SEBASTIÁN DOMINGO JJ, SÁNCHEZ SÁNCHEZ C. From the intestinal flora to the microbiome[J]. *Rev Esp Enferm Dig*, 2018, 110(1):51-56.
- [14] YAN A W, FOUTS D E, BRANDL J, et al. Enteric dysbiosis associated with a mouse model of alcoholic liver disease[J]. *Hepatology*, 2011, 53(1):96-105.
- [15] LOWE P P, GYONGYOSI B, SATISHCHANDRAN A, et al. Alcohol-related changes in the intestinal microbiome influence neutrophil infiltration, inflammation and steatosis in early alcoholic hepatitis in mice[J]. *PLoS One*, 2017, 12(3):e0174544.
- [16] WANG H, YAN Y, YI X, et al. Histopathological features and composition of gut microbiota in rhesus monkey of alcoholic liver disease[J]. *Front Microbiol*, 2019, 10:165.
- [17] SHARMA S P, SUK K T, KIM D J. Significance of gut microbiota in alcoholic and non-alcoholic fatty liver diseases[J]. *World J Gastroenterol*, 2021, 27(37):6161-6179.
- [18] addolorato g, ponziani fr, dionisi T, et al. Gut microbiota compositional and functional fingerprint in patients with alcohol use disorder and alcohol-associated liver disease[J]. *Liver Int*, 2020, 40(4):878-888.
- [19] ZHONG X, CUI P, JIANG J, et al. Streptococcus, the predominant bacterium to predict the severity of liver injury in alcoholic liver disease[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2021, 11:649060.
- [20] SidDIQUI M T, CRESCI G. Microbiota reprogramming for treatment of alcohol-related liver disease[J]. *Transl Res*, 2020, 226:26-38.
- [21] TsURUYA A, KUWAHARA A, SAITO Y, et al. Ecophysiological consequences of alcoholism on human gut microbiota: implications for ethanol-related pathogenesis of colon cancer[J]. *Sci Rep*, 2016, 6:27923.
- [22] 李莹, 侯俊杰, 王欣, 等. 肠道菌群与脂肪性肝病研究新进展[J]. *世界华人消化杂志*, 2021, 29(23):1355-1361.
- [23] MUTLU E A, GILLEVET P M, RANGWALA H, et al. Colonic microbiome is altered in alcoholism[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2012, 302(9):G966-G978.
- [24] BAJAJ J S. Alcohol, liver disease and the gut microbiota[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2019, 16(4):235-246.
- [25] BULL-OTTERSON L, FENG W, KIRPICH I, et al. Metagenomic analyses of alcohol induced pathogenic alterations in the intestinal microbiome and the effect of Lactobacillus rhamnosus GG treatment[J]. *PLoS One*, 2013, 8(1):e53028.
- [26] SHIN N R, WHON T W, BAE J W. Proteobacteria: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota[J]. *Trends Biotechnol*, 2015, 33(9):496-503.
- [27] BAJAJ J S, VARGAS H E, REDDY K R, et al. Association between intestinal microbiota collected at hospital admission and outcomes of patients with cirrhosis[J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2019, 17(4):756-765. e3.
- [28] PHILIPS C A, AUGUSTINE P, YEROL P K, et al. Modulating the Intestinal Microbiota: Therapeutic Opportunities in Liver Disease[J]. *J Clin Transl Hepatol*, 2020, 8(1):87-99.
- [29] 刘颖, 张洁, 高祀龙, 等. 酒精性肝病患者肠道中6种重要菌群的定量分析[J]. *营养学报*, 2018, 40(1):36-41.
- [30] CASSARD AM, CIOCAN D. Microbiota, a key player in alcoholic liver disease[J]. *Clin Mol Hepatol*, 2018, 24(2):100-107.
- [31] DUBINKINA V B, TYAKHT A V, ODINTSOVA V Y, et al. Links of gut microbiota composition with alcohol dependence syndrome and alcoholic liver disease[J]. *Microbiome*, 2017, 5(1):141.
- [32] 中华医学会肝病学会脂肪肝和酒精性肝病学组, 中国医师协会脂肪性肝病专家委员会. 酒精性肝病防治指南(2018更新版)[J]. *中华肝脏病杂志*, 2018, 26(3):188-194.
- [33] OH T G, KIM S M, CAUSSY C, et al. A universal gut-microbiome-derived signature predicts cirrhosis[J]. *Cell Metab*, 2020, 32(5):878-888. e6.
- [34] CHEN Y, GUO J, QIAN G, et al. Gut dysbiosis in acute-on-chronic liver failure and its predictive value for mortality[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2015, 30(9):1429-1437.
- [35] 王艺璇, 张珊, 程丹颖, 等. 乙型肝炎肝硬化患者肠道菌群失调度与肝病严重程度的相关性[J/CD]. *中国肝脏病杂志(电子版)*, 2019, 11(3):8-13.
- [36] LANG S, SCHNABL B. Microbiota and fatty liver disease-the known, the unknown, and the future[J]. *Cell Host Microbe*, 2020, 28(2):233-244.
- [37] 乔兵, 周永, 马文洁, 等. 肠道菌群失调在非酒精性脂肪性肝病中研究进展[J/CD]. *中国肝脏病杂志(电子版)*, 2020, 12(4):29-33.
- [38] WRZOSEK L, CIOCAN D, HUGOT C, et al. Microbiota tryptophan metabolism induces aryl hydrocarbon receptor activation and improves alcohol-induced liver injury[J]. *Gut*, 2021, 70(7):1299-1308.

收稿日期: 2021-09-01

池欣, 孙秀, 许艺凡, 等. 酒精性脂肪性肝病患者肠道菌群特征及其临床意义[J/CD]. *中国肝脏病杂志(电子版)*, 2023, 15(1): 19-