doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2021.14.035

粪便中双歧杆菌和大肠杆菌含量对肝癌患者预后的预测价值分析 *

薛 飞[1] 邵吉宝[2] 胡金曹[3] 李 杰[4] 顾明青[4△]

（1 江南大学附属医院检验科 江苏 无锡 214062；2 南京医科大学附属脑科医院检验科 江苏 南京 210029；
3 南京大学医学院附属鼓楼医院检验科 江苏 南京 210000；4 江苏省人民医院浦口分院检验科 江苏 南京 211800）

摘要 目的：探讨与分析粪便中双歧杆菌和大肠杆菌含量对肝癌患者预后的预测价值。**方法：**研究时间为 2016 年 12 月到 2019 年 12 月，采用回顾性研究方法，选择在本院重症监护病房(Intensive Care Unit，ICU)诊治的肝癌患者 78 例作为研究对象，检测粪便中双歧杆菌和大肠杆菌含量，调查患者的预后并进行预测价值分析。**结果：**在 78 例患者中，死亡 18 例，死亡率为 23.1 %。存活组与死亡组的性别、年龄、体重指数、白细胞(white blood cell，WBC)、血小板(Platelets，PLT)计数计数等对比差异无统计学意义(P>0.05)，两组的急性生理学及慢性健康状况评分系统(acute physiology andchronic health evaluation scoring system，APACHE Ⅱ)评分、临床分期等对比差异有统计学意义(P<0.05)，死亡组的血清甲胎蛋白(α-fetoprotein，AFP)值显著高于存活组(P<0.05)。死亡组的双歧杆菌含量与双歧杆菌 / 大肠杆菌比值低于存活组，大肠杆菌含量高于存活组，对比差异都有统计学意义(P<0.05)。直线相关分析显示患者预后死亡与双歧杆菌 / 大肠杆菌比值、AFP、APACHE Ⅱ评分、临床分期有相关性(P<0.05)。双歧杆菌 / 大肠杆菌比值对肝癌患者预后死亡的预测 ROC 曲线下总面积为 0.865。**结论：**肝癌患者预后死亡患者多伴随有粪便中菌群失衡状况，粪便中双歧杆菌和大肠杆菌含量能很好预测肝癌患者的预后。

关键词：肝癌；预后；粪便；双歧杆菌；大肠杆菌

中图分类号：R735.7 **文献标识码：**A **文章编号：**1673-6273(2021)14-2764-04

Predictive Values of Bifidobacteria and *E. coli* in Feces on Prognosis of Patients with Hepatocelluar Carcinom*

XUE Fei[1], SHAO Ji-bao[2], HU Jin-cao[3], LI Jie[4], GU Ming-qing[4△]

(1 Department of Laboratory Medicine, Affiliated Hospital of Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu, 214062, China;
2 Department of Laboratory Medicine, The Affiliated Brain Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu, 210029, China;
3 Department of Laboratory Medicine, Nanjing Drum Tower Hospital,
The Affiliated Hospital of Nanjing University Medical School, Nanjing, Jiangsu, 210000, China;
4 Department of Laboratory Medicine, Pukou Branch of Jiangsu Province People's Hospital, Nanjing, Jiangsu, 211800, China)

ABSTRACT Objective: To explore and analysis the predictive value of bifidobacteria and *E. coli* contents in feces on the prognosis of patients with hepatocelluar carcinoma. **Methods:** The study period were from December 2016 to December 2019. Used the retrospective research methods, 78 cases of patients with hepatocelluar carcinom diagnosed and treated in the intensive care unit (ICU) of our hospital were selected as the research objects, all cases were to detect bifidobacteria and *E. coli* contents in feces. and were to investigated the prognosis of patients and performed the predictive value analysis. **Results:** There were 18 cases were died in the 78 cases and the mortality rate were 23.1 %. There were no significant differences in gender, age, body mass index, WBC and PLT counts compared between the survival group and the death group (P>0.05), and there were statistically significant differences in the APACHE Ⅱ score and clinical stage compared between the two groups (P<0.05), The serum AFP values in the death group was significantly higher than that in the survival group (P<0.05). The content of Bifidobacterium and the ratio of Bifidobacterium / *E. Coli* in the death group were lower than those in the survival group, and the content of E. coli were higher than that in the survival group, and compared the differences were statistically significant (P<0.05). Linear correlation analysis showed that the prognosis of patients was correlated with the bifidobacterium / *E. Coli* ratio, AFP, APACHE Ⅱ score, and clinical stage (P<0.05). The total area under the predicted ROC curve of the bifidobacterium / *E. Coli* ratio for the prognosis of liver cancer patients were 0.865. **Conclusion:** The prognosis of patients with hepatocelluar carcinoma are mostly associated with the imbalance of bacterial flora in feces. The content of bifidobacteria and E. coli in stool can predict the prognosis of patients with hepatocelluar carcinoma.

Key words: Hepatocelluar carcinoma; Prognosis; Feces; Bifidobacteria; *E. coli*

Chinese Library Classification(CLC): R735.7 Document code: A

Article ID:1673-6273(2021)14-2764-04

* 基金项目：江苏省自然科学基金项目(BK20160195)

作者简介：薛飞(1983-)，男，本科，主管技师，研究方向：检验科，电话：13665155144，E-mail：gmqing82@163.com

△ 通讯作者：顾明青(1982-)，男，本科，主管技师，研究方向：检验方面，电话：13813006582，E-mail：gumingqing8@163.com

(收稿日期：2020-12-06 接受日期：2020-12-28)

前言

肝细胞肝癌(hepatocelluar carcinoma,HCC)简称肝癌,是临床上常见的消化系统肿瘤[1,2]。该病具有进展迅速、转移广泛、死亡率高等特征,特别是由于缺乏灵敏度、特异度高的诊断标志物,肝癌的早期诊断率一直较低,给个人、家庭、社会带来了巨大的负担,为此需要进行早期病情诊断与预后预测[3,4]。常规的影像学特征在肝癌的诊断方面缺乏特异性，更不能反映预后[5,6]。甲胎蛋白(α-fetoprotein,AFP)是肝癌的主要肿瘤标志物,但是诊断敏感度一直维持在 80%左右,且对于检测技术的要求比较高。病理学证据仍为诊断肝癌症的金标准,但是为有创性检查[7,8]。肠道微生物对维持机体健康具有重要意义,肠道微生物可帮助分解机体进食的食物，并提供能量或合成新物质,还可保护肠道上皮屏障的完整性[9,10]。特别是肠道正常菌群和肠黏膜结合形成的机械、生物与免疫屏障可维护机体内环境稳定[11,12]。肠道菌群失调可导致肝细胞环境的改变促进肝癌的发生、发展[13,14],但是对患者预后的影响还无相关报道。本文探讨与分析了粪便中双歧杆菌和大肠杆菌含量对肝癌患者预后的预测价值,以促进早期检出肝癌。

1 资料与方法

1.1 研究对象

研究时间为 2016 年 12 月到 2019 年 12 月,采用回顾性研究方法，选择在本院重症监护病房 (ICU) 诊治的肝癌患者 78 例,纳入标准:符合肝细胞癌的诊断标准;临床与随访资料完整;首次诊断;采样前未经手术、放化疗等任何抗肿瘤治疗。排除标准:临床资料记录不完全或者缺项患者;颅脑损伤、胸腹腔脏器的损伤以及骨折等合并伤患者;妊娠与哺乳期妇女;合并其他肿瘤患者。

所有病例随访至少 28 d，根据患者第 28 d 的生存情况分为两组:① 死亡组:经 ICU 治疗无效而死亡者。② 存活组:无死亡的患者。

1.2 观察指标

记录所有患者的一般资料,包括临床分期、急性生理学及慢性健康状况评分系统(acute physiology andchronic health evaluation scoring system,APACHE Ⅱ)、体重指数等。记录患者的血液学指标，主要为血清 AFP 含量、白细胞 (white blood cell, WBC)、血小板(Platelets,PLT)计数等。

1.3 双歧杆菌和大肠杆菌含量检测

收集所有患者的粪便标本,直接涂片革兰染色,镜下镜检。然后选择新鲜大便 1 g 置于离心管中,5 mL 蒸馏水稀释后涡旋,将细菌浓度均稀释至 10-8 倍进行接种培养,培养 48 h,观察菌群数量与分布,计数双歧杆菌和大肠杆菌含量,计算双歧杆菌 / 大肠杆菌比值。

1.4 统计方法

采用 SPSS 22.00，采用 $\bar{x}\pm s$、%等表示计量数据与计数数据，采用 t 检验、χ^2 检验进行对比分析，绘制受试者工作特征(receiver operating characteristic,ROC)曲线进行预测价值评估,相关性分析采用直线相关分析,检验水准为 α=0.05。

2 结果

2.1 一般情况对比

在 78 例患者中,死亡 18 例,死亡率为 23.1 %。存活组与死亡组的一般资料对比无差异 (P>0.05)，两组的 APACHE Ⅱ评分、临床分期等对比差异有统计学意义(P<0.05),见表 1。

表 1 两组一般情况对比

Table 1 Comparison of two general conditions

Groups	n	Gender (M/F)	Age (years)	BMI(kg/m²)	APACHE Ⅱ score (score)	Clinical stages (Ⅰ/Ⅱ/Ⅲ)
Survival group	60	36/24	64.20±2.48	22.48±1.22	12.20±1.48*	24/25/11*
Death group	18	11/7	64.02±3.19	22.19±2.48	15.10±1.11	1/2/15

Note: Compared with death group, *P<0.05.

2.2 血液学指标对比

两组的 WBC 与 PLT 计数对比差异无统计学意义(P>0.05),死亡组的血清 AFP 值为(178.09±8.22)ng/mL,显著高于存活组的(78.24±10.44)ng/mL,两组对比差异有统计学意义(P<0.05),见表 2。

表 2 两组血液学指标对比($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Comparison of hematology indexes between the two groups ($\bar{x}\pm s$)

Groups	n	WBC(10^9/L)	PLT(10^9/L)	AFP(ng/mL)
Survival group	60	11.03±1.49	143.19±9.33	78.24±10.44*
Death group	18	11.39±1.19	167.40±8.09	178.09±8.22

Note: Compared with death group, *P<0.05.

2.3 双歧杆菌和大肠杆菌含量对比

死亡组的双歧杆菌含量与双歧杆菌 / 大肠杆菌比值为(5.11±0.46)10^9/L、(0.48±0.02)%，低于存活组的（7.54±0.65）10^9/L、(1.07±0.22)%,大肠杆菌含量(10.63±0.13)10^9/L,高于存活组(7.01±0.85)10^9/L,两组对比差异均有统计学意义(P<0.05),见表 3。

表 3 两组双歧杆菌和大肠杆菌含量对比($\bar{x}\pm s$)

Table 3 Comparison of the content of Bifidobacterium and *E. coli* between the two groups ($\bar{x}\pm s$)

Groups	n	*Bacillus bifidus* (10^9/L)	*Bacillus coli*(10^9/L)	Bifidobacterium / *Escherichia coli* ratio
Survival group	60	7.54±0.65*	7.01±0.85*	1.07±0.22*
Death group	18	5.11±0.46	10.63±0.13	0.48±0.02

Note: Compared with death group, *P<0.05.

2.4 相关性分析

在 78 例患者中，直线相关分析显示患者预后死亡与双歧杆菌 / 大肠杆菌比值、AFP、APACHE Ⅱ评分、临床分期有相关性(P<0.05)，见表 4。

2.5 预测价值

双歧杆菌 / 大肠杆菌比值对肝癌患者预后死亡的预测 ROC 曲线下总面积为 0.865[95%置信区间(CI)为 1.263-1.917]，见图 1。

表 4 影响肝癌患者预后的相关性指标(n=78)

Table 4 Related indicators affecting the prognosis of patients with liver cancer (n=78)

Index	Bifidobacterium / Escherichia coli ratio	AFP	APACHE Ⅱ score	Clinical stages
r	-0.655	0.721	0.766	0.614
P	0.000	0.000	0.000	0.000

3 讨论

肝癌为临床上的常见危重疾病，死亡率一直维持在高位。特别是该病可导致患者出现重要脏器代谢障碍，从而发生多器官功能衰竭，尤其是发生感染性休克，死亡率可高达 60 %[15,16]。本研究显示在 78 例患者中，死亡 18 例，死亡率为 23.1 %，死亡率与其他研究类似[17]，也表明肝癌的早期诊断具有重要价值。本研究显示存活组与死亡组的一般资料对比无差异，两组的 APACHE Ⅱ评分、临床分期等对比有差异；两组的 WBC 与 PLT 计数对比差异无统计学意义，死亡组的血清 AFP 值显著高于存活组。当前对肝癌的常规检测指标如 WBC、PLT 等在诊断方面缺乏特异性；病理判断具有一定的创伤性，且依赖于医生的主观性，很难预测患者预后。目前应用最广泛的肿瘤标志物 -AFP 的诊断效果仍需要提高，尤其对早期的原发或转移肝癌灵敏度比较低[18,19]。

正常机体内的肠道停留着各种细菌，包括致病菌、益生菌、机会致病菌等，不同菌群在肠道消化环境中相互抑制、相互依存，维持稳定环境。并且由于存在肠黏膜屏障环境，肠道内绝大多数微生物及产物无法进入机体，以维持内环境的稳定[20,21]。当肠道菌群失调后，菌群的定植抵抗力减弱，肠道屏障保护作用将减弱，可引发肠道中其他潜在性病原体的定植和入侵，使得乳酸杆菌、双歧杆菌等显著降低，大肠杆菌、肠球菌等显著增多，引起机体免疫反应，诱发以结肠为主的肠管局部炎症反应[22]。本研究显示死亡组的双歧杆菌含量与双歧杆菌 / 大肠杆菌比值低于存活组，大肠杆菌含量高于存活组，对比差异都有统计学意义。与王雨[23]的研究类似，探讨 Toll- 样受体 4(TLR4) 和肠道菌群在原发性肝癌进展中动态变化情况，并分析其与预后之间的关系，结果显示随访 1 年，60 例肝癌患者中，18 例复发，15 例死亡，与未复发者和生存者比较，复发者和死亡者双歧杆菌和乳酸杆菌含量明显减少，但肠球菌和大肠埃希菌含量则明显升高。从机制上分析，肝癌患者可直接影响胃消化吸收

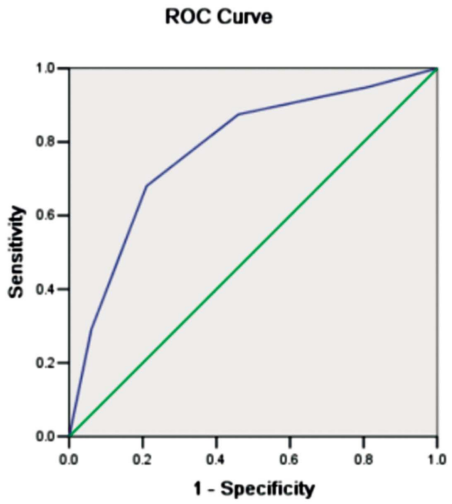

图 1 双歧杆菌 / 大肠杆菌比值对肝癌患者预后死亡的预测 ROC 曲线

Fig.1 The ROC curve of the ratio of Bifidobacterium/*E. coli* on the prognostic death of liver cancer patients

功能，增加肠道粘膜通透性，加重胃肠道淤血及水肿并为肠道细菌的繁殖提供适宜环境，从而引发大肠杆菌的过度生长[24,25]。

本研究直线相关分析显示肝癌患者的预后死亡与双歧杆菌 / 大肠杆菌比值、AFP、APACHE Ⅱ评分、临床分期有相关性；双歧杆菌 / 大肠杆菌比值对肝癌患者预后死亡的预测 ROC 曲线下总面积为 0.865[95%CI 为 1.263-1.917]。目前关于双歧杆菌 / 大肠杆菌比值对肝癌患者预测的应用几乎很少，多数都应用于肠道疾病，肺部疾病。如朱建俊[26]的研究探讨肠道双歧杆菌、肠球菌在老年慢性阻塞性肺疾病(COPD)患者粪便中的表达变化，结果同样也显示肠道双歧杆菌与肠球菌水平呈正相关，肠道双歧杆菌和肠球菌水平与年发作次数和营养状态有关，ROC 曲线显示肠道双歧杆菌，肠球菌及联合曲线下面积分别为 0.623、0.657 和 0.726。本研究的结果从机制上分析，正常肝脏可以将肠道危害菌群产生的有害物质转化为无害物质，并

能清除一部分大肠杆菌等[27,28]；当发生肝癌时，可使肠道菌群发生变化，导致大肠杆菌生成增加。并且肠道菌群失衡可加重已经形成的肝脏损害，还可诱发全身性代谢及血液动力学紊乱，从而形成恶性循环[29,30]。并且肝癌患者普遍存在门脉高压，肠道长期处于缺血、缺氧状态，产生大量自由基，诱导黄嘌呤氧化酶的激，导致肠道机械屏障功能的抵抗力降低，也会使得肠道菌群失衡。不过本研究也存在一定的不足，纳入的病例数较少，并且为回顾性分析，纳入的患者未能包括在普通病房治疗的肝癌患者，将在以后的研究中进行完善分析。

总之，肝癌患者预后死亡患者多伴随有粪便中菌群失衡状况，粪便中双歧杆菌和大肠杆菌含量能很好预测肝癌患者的预后。

参 考 文 献(References)

[1] 古曦,刘畅,刘双双,等.肝癌患者 TACE 术治疗前后血清 VEGF、bFGF、HIF-1α 水平变化及其临床意义 [J]. 标记免疫分析与临床, 2019, 26(4): 546-549, 559

[2] 蒋长斌,崔邦平,代文莉,等.超检测限 AFP、CA19-9 稀释后的检测结果对监测原发性肝癌栓塞治疗疗效的临床意义[J].标记免疫分析与临床, 2019, 26(6): 1020-1022

[3] 全敏,邢卉春.肠道菌群与慢性肝病相关研究进展[J].中国肝脏病杂志(电子版), 2019, 11(3): 26-30

[4] 杜晶晶,朱丽娜,赵芩旭.肝癌患者与健康成人肠道微生态的比较[J].中国肿瘤临床与康复, 2019, 26(4): 433-435

[5] Iida N, Mizukoshi E, Yamashita T, et al. Overuse of antianaerobic drug is associated with poor postchemotherapy prognosis of patients with hepatocellular carcinoma[J]. Int J Cancer, 2019, 145(10): 2701-2711

[6] 辛海荣,李喜,孙瑞芳,等.原发性肝癌患者内毒素与肠道菌群变化的相关性研究[J].中华普通外科杂志, 2019, 34(8): 686-688

[7] Li Q, Ma L, Shen S, et al. Intestinal dysbacteriosis-induced IL-25 promotes development of HCC via alternative activation of macrophages in tumor microenvironment [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2019, 38(1): e303

[8] Switlik WZ, Bielecka-Kowalska A, Karbownik MS, et al. Forms of diagnostic material as sources of miRNA biomarkers in hepatocellular carcinoma: a preliminary study[J]. Biomark Med, 2019, 13(7): 523-534

[9] Takai A, Kikuchi K, Ichimura M, et al. Fructo-oligosaccharides ameliorate steatohepatitis, visceral adiposity, and associated chronic inflammation via increased production of short-chain fatty acids in a mouse model of non-alcoholic steatohepatitis[J]. BMC Gastroenterol, 2020, 20(1): e46

[10] Colombo F, Smith S, Lai GW, et al. Correlation of the in vitro biotransformation of H3B-6527 in dog and human hepatocytes with the in vivo metabolic profile of (14)C-H3B-6527 in a dog mass balance study[J]. Xenobiotica, 2020, 50(4): 458-467

[11] Delaunay K, Edeline J, Rolland Y, et al. Preliminary results of the Phase 1 Lip-Re I clinical trial: biodistribution and dosimetry assessments in hepatocellular carcinoma patients treated with (188) Re-SSS Lipiodol radioembolization[J]. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2019, 46(7): 1506-1517

[12] Baktash Y, Madhav A, Coller KE, et al. Single Particle Imaging of Polarized Hepatoma Organoids upon Hepatitis C Virus Infection Reveals an Ordered and Sequential Entry Process [J]. Cell Host Microbe, 2018, 23(3): 382-394

[13] Blokker BA, Maijo M, Echeandia M, et al. Fine-Tuning of Sirtuin 1 Expression Is Essential to Protect the Liver From Cholestatic Liver Disease[J]. Hepatology, 2019, 69(2): 699-716

[14] Bokulich N, Mohamadkhani A, Moayyedkazemi A, et al. The Reference Genome Sequence of Scutellaria baicalensis Provides Insights into the Evolution of Wogonin Biosynthesis[J]. Cancer Med, 2019, 12(7): 935-950

[15] Cani PD. Human gut microbiome: hopes, threats and promises[J]. Gut, 2018, 67(9): 1716-1725

[16] Dubinkina VB, Tyakht AV, Odintsova VY, et al. Links of gut microbiota composition with alcohol dependence syndrome and alcoholic liver disease[J]. EMBO Rep, 2017, 5(1): e141

[17] Gural N, Mancio-Silva L, Miller AB, et al. In Vitro Culture, Drug Sensitivity, and Transcriptome of Plasmodium Vivax Hypnozoites[J]. Nat Commun, 2018, 23(3): 395-406.e4

[18] Hoyles L, Jiménez-Pranteda ML, Chilloux J, et al. Metabolic retroconversion of trimethylamine N-oxide and the gut microbiota[J]. Microbiome, 2018, 6(1): e73

[19] Lieber AD, Beier UH, Xiao H, et al. Loss of HDAC6 alters gut microbiota and worsens obesity[J]. FEBS Lett, 2019, 33(1): 1098-1109

[20] Ma J, Zheng B, Goswami S, et al. PD1(Hi) CD8(+) T cells correlate with exhausted signature and poor clinical outcome in hepatocellular carcinoma[J]. J Immunother Cancer, 2019, 7(1): e331

[21] Moroz K, Chakladar J, Wong LM, et al. The Liver Microbiome Is Implicated in Cancer Prognosis and Modulated by Alcohol and Hepatitis B[J]. Cells, 2020, 12(6): 224-229

[22] Rowland I, Gibson G, Heinken A, et al. Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components [J]. Eur J Nutr, 2018, 57(1): 21-24

[23] 王雨,许达峰,周开伦, 等. TLR4 和肠道菌群在原发性肝癌进展中动态变化及与预后的关系[J]. 肝脏, 2020, 25(3): 273-276

[24] Rubinstein MR, Baik JE, Lagana SM, et al. Fusobacterium nucleatum promotes colorectal cancer by inducing Wnt/β-catenin modulator Annexin A1[J]. Nat Commun, 2019, 20(4): 113-119

[25] Shi Z, Fultz RS, Engevik MA, et al. Distinct roles of histamine H1- and H2-receptor signaling pathways in inflammation-associated colonic tumorigenesis [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2019, 316(1): 205-216

[26] 朱建俊,陆洪国,胡志伟,等.老年慢性阻塞性肺疾病患者肠道双歧杆菌、肠球菌变化及其相关性研究[J].中国卫生检验杂志, 2018, 28(23): 2817-2819+2824

[27] Wang YY, Chen YY, Chen ZS, et al. Chaperone-Mediated Autophagy in the Liver: Good or Bad?[J]. Cancer Res, 2019, 8(11): 113-119

[28] Yim WJ, Lim JH, Yoon K, et al. The Effect of Microbiota on Colon Carcinogenesis[J]. Int J Mol Sci, 2018, 23(3): 117-125

[29] Yu L X, Schwabe R F. The gut microbiome and liver cancer: mechanisms and clinical translation [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2017, 14(9): 527-539

[30] Zhang F, Cui B, He X, et al. Microbiota transplantation: concept, methodology and strategy for its modernization[J]. Protein Cell, 2018, 9(5): 462-473