

腺癌患者和肺移植供者下呼吸道菌群对比研究

张鑫¹ 熊叶¹ 马可² 李强^{1,3}

【摘要】 目的 探讨肺腺癌患者和肺移植供者下呼吸道内菌群变化。方法 通过收集 12 例肺腺癌患者叶支气管及 5 例肺移植供者健康肺气管组织,提取肺部气道菌群 DNA,对测序区域进行 PCR 扩增,构建文库后,利用 Illumina MiSeq 测序平台,对细菌的 16S rDNA 基因 V4 区进行高通量测序,并对测序结果进行生物信息学分析。结果 (1) 两组患者下呼吸道菌群以 *Proteobacteria*、*Firmicutes*、*Bacteroidetes* 和 *Acidobacteria* 菌门为主,菌属水平以 *Burkholderia*、*Sediminibacterium*、*Lactobacillus*、*Acinetobacter*、*Pseudomonas*、*Lactococcus*、*Caulobacter*、*Ralstonia* 属为主;(2) 健康对照组(H)呼吸道内菌群 α 多样性要显著高于疾病组(DT),从 Chao1 和 ACE 指数上看,H 组明显高于 DT 组($P<0.01$)。两组在主要的菌门及菌属丰度两组间差异明显,*Proteobacteria* 和 *Firmicutes* 在 H 组丰度明显高于 DT 组($P<0.01$),*Bacteroidetes* 和 *Acidobacteria* 在 DT 组丰度明显高于 H 组($P<0.01$);*Lactobacillus*、*Erysipelotrichaceae*、*Oscillospira*、*Caulobacter*、*Flavobacterium*、*Thermoactinomyces*、*Ruminococcus*、*Coprobacillus*、*Dorea* 等菌属在 H 组丰度明显高于 DT 组;(3) 根据预测,菌群脂质及氨基酸等代谢功能在 H 对照组要高于 DT 组,能量及碳水化合物等代谢功能在 DT 组要高于 H 对照组。结论 和健康肺相比,腺癌患者下呼吸道内菌群多样性下降,主要的菌门和菌属存在明显变化。

【关键词】 肺腺癌; 下呼吸道; 菌群

中图法分类号: R734.2 R563

文献标识码: A

Comparative study of lower respiratory tract microbiota in patients with adenocarcinoma and lung transplantation

Zhang Xin¹, Xiong Ye¹, Ma Ke², Li Qiang^{1,3}. ¹Department of respiratory and critical care medicine, Changhai Hospital, the Second Military Medical University, Shanghai 200433, China. ²Clinical Medicine College of Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, Department of spleen and stomach medicine, Kunming 650000, China. ³Shanghai Jiaotong University Affiliated First People's Hospital, Shanghai 200433, China

Corresponding author: Li Qiang, Email: liqres@163.com

【Abstract】 Objective Although studies have reported on the characteristics of lung microbiota, but the sample was mostly sputum or bronchoalveolar lavage fluid, easily contaminated by the upper respiratory tract, therefore we through the surgical lung resection, to avoid through the upper respiratory tract, directly collected lung tracheal tissue to investigate the microbiota in the lower respiratory tract of patients with lung adenocarcinoma and lung transplantation donors. **Methods** We collected lung tracheal tissue of 12 lung adenocarcinoma patients and bronchial tissue of 5 lung transplantation donor, then extracted lung tracheal microbiota DNA. Then we performed PCR amplification of the sequencing region and completed the library construction. Using the Illumina MiSeq sequencing platform, the 16S rDNA gene V4 region of the bacteria was subjected to high throughput sequencing and the bioinformatics analysis was performed on the sequencing results. **Rresults** 1. In the two groups, the lower respiratory tract microbiota was mainly composed of

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-6902.2018.01.010

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81470265)

作者单位: 200433 上海,第二军医大学长海医院呼吸与危重症医学科¹

650000 昆明,云南省中医医院脾胃科²

200080 上海,上海交通大学附属上海市第一人民医院呼吸科

通信作者: 李强, Email: liqres@163.com

Proteobacteria, *Firmicutes*, *Bacteroidetes* and *Acidobacteria*. The level of bacteria genus was dominated by *Burkholderia*, *Sediminibacterium*, *Lactobacillus*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Lactococcus*, *Caulobacter* and *Ralstonia*; 2. The α -diversity in the respiratory tract of the healthy control group was significantly higher than that in the disease group. According to Chao1 and ACE index, H group was significantly higher than the DT group ($P < 0.01$). There were significant differences in the relative abundance between the phylum and genus in the two groups. The abundance of *Proteobacteria* and *Firmicutes* was significantly higher in group H than that in group DT ($P < 0.01$). The abundance of *Bacteroidetes* and *Acidobacteria* in group DT was significantly higher than that in group H ($P < 0.01$). The abundance of *Lactobacillus*, *Erysipelotrichaceae*, *Oscillospira*, *Caulobacter*, *Flavobacterium*, *Thermoactinomyces*, *Ruminococcus*, *Coprobacillus* and *Dorea* were significantly higher in H group than those in DT group. 3. According to the predicted, Lipid/Nucleotide and other metabolic functions in the healthy control group was higher than the disease group, Energy/Carbohydrate and other metabolic function in the disease group was higher than the healthy control group. **Conclusions** Compared with healthy lung, the diversity of microbiota in lower respiratory tract of adenocarcinoma patients decreased, and there was an imbalance of microbiota.

【Key words】 Adenocarcinoma; Lower respiratory tract; Microbiota

近年来通过新一代测序技术分析,人们发现机体拥有非常多样化的微生物群落,而这些微生物群落被认为对人体健康至关重要。已有证据显示人体不同部位微生物菌群的变化与癌症的发生发展相关^[1-4]。但到目前为止关于肺部菌群与肺癌之间关系的研究相对较少,是否会像其它部位的菌群一样,变化的肺部菌群影响着肺癌的发生发展目前仍不明确。本研究旨在观察对比腺癌患者下呼吸道和健康肺下呼吸道菌群结构是否存在差异。

对象与方法

一、一般资料

收集12例在上海长海医院胸外科行肺叶切除术的肺腺癌患者作为疾病组(DT组)。12例患者术前经血清学及影像学检查除外合并肺炎,其中男性6例,女性6例,年龄51~73岁(平均64.3岁)。12例患者术后经病理证实均诊断为肺腺癌,临床分期Ib期1例,IIa期6例,IIb期3例,IIIa期2例。同时收集5例在无锡市人民医院手术室行双肺移植手术过程中修剪下来的健康肺气管组织作为健康对照组(H组),5例患者均为男性,年龄34~50岁(平均40.5岁),影像学检查无明显感染病灶。所有样本在收集前由本人或家属签署知情同意书。

二、呼吸道组织收集及处理

手术室内获取组织后,放入2 ml的无菌Eppendorf管,并做好标记,立即放入液氮中瓶中,之后转运至我科实验室-80℃下冻存。干冰下运送至派森诺医药科技有限公司,无菌技术下对组织进行研磨、均浆、DNA提取。

三、测序与分析

本研究采用前引物(5'-AYTGGGYDTAAAGNG-3')和后引物(5'-TACNVGGGTATCTAATCC-3'),对样本DNA进行PCR扩增,采用Illumina公司的TruSeq Nano DNA LT Library Prep Kit制备测序文库,利用Illumina MiSeq测序平台对细菌的16S rDNA基因V4区进行高通量测序。对原始下机数据根据序列质量进行初步筛查,并去除嵌合体等疑问序列。应用UCLUST序列比对工具^[5]对获得的高质量序列按97%的序列相似度进行归并和OTU划分。通过QIIME软件将OTU代表序列与Greengenes数据库^[6]的模板序列相比对,获取每个OTU所对应的分类学信息。之后对每个样本 α 多样性指标(Chao1、ACE、Simpson及Shannon指数)进行计算,同时计算各样本在门及属水平上的OTU数。使用Mothur软件,调用Metastats对门和属水平的各个分类单元在样本(组)之间的序列量(即绝对丰度)差异进行两两比较检验。通过Galaxy在线分析平台提交属水平的相对丰度矩阵进行LEfSe分析。使用PICRUST软件,根据KEGG数据库中微生物代谢功能的类别对群落样本进行预测。

四、统计学方法

采用SPSS22.0统计软件,对符合正态分布的两组数据应用 t 检验;对不符合正态分布的数据,则进行非参数秩和检验。

结 果

一、样本菌群群落概况

17例组织样本中产生了总共623,370个高质

量序列,平均每个样本有 36 668 个序列。对前述获得的高质量序列按 97% 的序列相似度进行归并和 OTU 划分,通过去除一些丰度和出现频率都非常低的“稀有”OUT(当于菌群数据中的“背景噪音”)后,共计产生 38 220 个 OUT,平均每个样本具有 2 248 个 OUT。23 个高丰度(大于 1%) 的 OTUs 占所有序列的 80% ,大多数剩余的 OTUs 以低丰度存在(< 1%) 。根据样本 OUT 划分和各分类水平微生物类群数统计后发现,两组患者下呼吸道组织标本中 4 个最丰富的菌门包括: *Proteobacteria* (65%) , *Firmicutes*(18%) ,*Bacteroidetes*(9%) 和 *Acidobacteria* (2%) ,共占了总序列的 94%; 最丰富的属主要包括: *Burkholderia* (20%) 、*Sediminibacterium* (7. 4%) 、*Lactobacillus* (6%) 、*Acinetobacter* (3. 8%) 、*Pseudomonas*(3.7%) 、*Lactococcus*(3.3%) 、*Caulobacter* (3%) 、*Ralstonia* (2.7%) 共占了总序列的 50% ,见图 1。

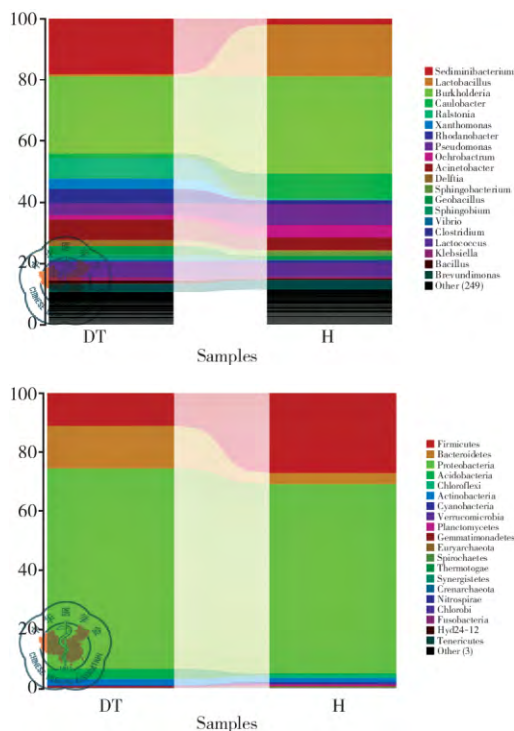


图 1 DT 组与 H 组在菌门(左图) 及菌属水平(右图) 相对丰度情况

二、两组菌群多样性及主要菌群丰度比较结果

两组 α 多样性指数: Chao1 ,ACE ,Shannon 和 Simpson 如表 1 所示。从反映菌群丰度的 Chao1 和 ACE 指数来看, H 组明显高于 DT 组($P < 0.01$) 。

Shannon 和 Simpson 指数反应了菌群的多样性, H 组 Shannon 指数高于 DT 组($P < 0.05$) ,Simpson 指数 H 和 DT 组间并没有发现明显区别。Shannon 指数对群落的丰富度以及稀有 OTU 更敏感,而 Simpson 指数对均匀度和群落中的优势 OTU 更敏感。以上结果说明,与 DT 组相比 H 组菌群丰度、多样性更高。

表 1 两组多样性指数比较

组 别	Simpson	Chao1	ACE	Shannon
DT 组	0.93±0.06	352±15.16	408.50±17.01	5.02±0.08
H 组	0.92±0.01	502.6±29.07 ^a	540.3±28.7 ^b	5.33±0.08 ^c

注: ^a $P=0.003$,^b $P=0.006$,^c $P=0.043$

对两组样本菌群最丰富 4 个菌门的相对丰度进行比较后发现(图 1 及表 2) ,*Proteobacteria* 和 *Firmicutes* 在 H 组丰度明显高于 DT 组($P < 0.01$) , *Bacteroidetes* 和 *Acidobacteria* 在 DT 组丰度明显高于 H 组($P < 0.01$) 。对差异菌门中的菌属进行进一步分析,通过 LEfSe 分析计算出两组丰度差异值最大的菌属,见图 2。发现 *Vibrio*、*Bifidobacterium*、*Megamonas*、*Streptomyces*、*Collinsella*、*Achromobacter* 等菌属在 DT 组丰度明显高于 H 组, *Lactobacillus*、*Erysipelotrichaceae*、*Oscillospira*、*Caulobacter*、*Flavobacterium*、*Thermoactinomyces*、*Ruminococcus*、*Coprobacillus*、*Dorea* 等菌属在 H 组丰度明显高于 DT 组。

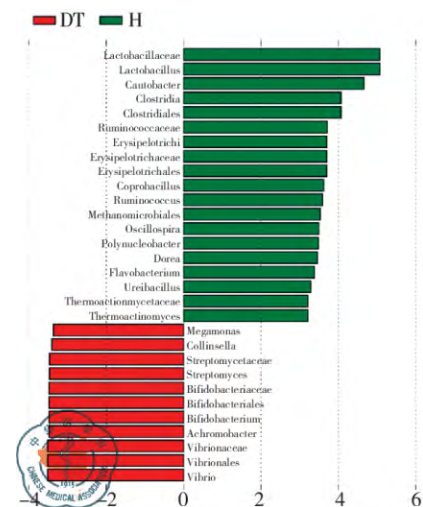


图 2 两组间具有显著差异的分类单元(横坐标则以条形图展示对应分类单元的 LDA 差异分析对数得分值,长度越长表明该分类单元的差异越显著)

表2 两组主要菌门间相对丰度比较

组 别	Proteobacteria	Firmicutes	Bacteroidetes	Acidobacteria
DT 组	20 115.25±1 322.65	3 307.42±409.27	4 247.62±585.27 ^c	1 001.8±145.9 d
H 组	33 257.4±3 356.05 ^a	13 980.4±2 450.46 ^b	1 968.2±233.9	257.6±61.2

注: ^a $P=0.013$ ^b $P=0.0001$ ^c $P=0.028$ ^d $P=0.0001$

三、两组在菌群代谢功能通路上的差异。

通过将现有的群落组成数据与已知的参考基因组数据库相比较,并对原始数据中的微生物丰度数据进行校正,通过 PICRUST 软件,根据 KEGG 数据库中微生物代谢功能的类别对群落样本进行预测。由图 3 可以预测,外来物质降解与代谢、核苷化合物和聚酮化合物的代谢、其他氨基酸的代谢、脂质代谢及氨基酸代谢等代谢功能在 H 组要高于 DT 组,辅助因子与维生素代谢,聚糖生物合成与代谢,酶家族,能量代谢,碳水化合物代谢等代谢功能在 DT 组要高于 H 组。

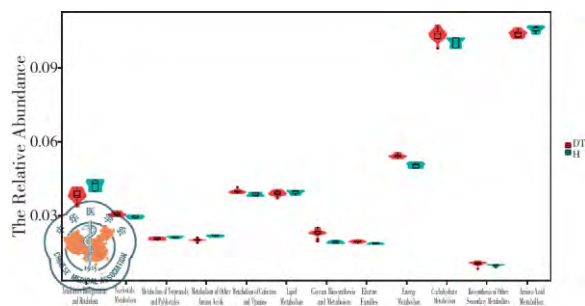


图3 群落样本的代谢功能预测图(图形的长度反映了该样本中编码相应功能的基因丰度的高低)

讨 论

过去一直认为健康肺是无菌的,但随着技术的发展,越来越多的研究显示,肺部存在微生物群落,并且这些微生物群落与多种肺部疾病相关(哮喘、COPD、间质性肺炎、支气管扩张等)^[7-10]。在做肺部菌群研究时,许多实验样本都是通过 BAL 和防污染毛刷获取的,支气管镜通过上呼吸道进入下呼吸道,存在上呼吸道污染下呼吸道样本的风险,但也有研究显示经支气管镜(经鼻或经口)取得的 BAL 中的菌群却未受影响^[11]。痰液作为一种无创的并且易获取的标本已经被广泛应用于许多肺部疾病中(如: COPD、哮喘、支气管扩张)^[12-15],但痰液标本更容易被污染。在手术室通过无菌手术获取肺组织可以避

免样本经过上呼吸道,是目前来说最能客观反映肺部菌群的理想样本,因此为了能客观反映腺癌患者下呼吸道菌群结构特点,我们采用了收集手术室肺切除组织作为研究对象。

目前关于非疾病部位肺组织的主要菌门报道相似,主要是以 *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* 四大菌门为主。我们的研究也显示肺组织中丰度最高的 4 个菌门是 *Proteobacteria* (65%), *Firmicutes* (18%), *Bacteroidetes* (9%) 和 *Acidobacteria* (2%)。但关于菌属的相关报道差异较大, Yu 等^[16]采用 illumina 测序方法,分析了 165 例肿瘤患者非肿瘤肺组织样本,发现相对丰度较高核心菌属: *Acinebacter* (11.9%), *Comamonadaceae* (11.6%), *Thermus* (8.7%), *Pseudomonas* (7.1%), *Oxalobacteraceae* (5.5%), *Ralsonia* (2.1%), *Staphylococcus* (2.1%), *Streptococcus* (2.0%)。而本研究显示除了 *Acinebacter*、*Ralsonia*、*Streptococcus* 三种菌属丰度相似外,另外三种 *Burkholderia*、*Sediminibacterium*、*Lactobacillus* 菌属丰度均较高, *Comamonadaceae*, *Thermus* 及 *Oxalobacteraceae* 菌属丰度较低。Bassis 等^[11]收集了 28 例健康人群的 BALF,通过 454 焦磷酸测序的方法分析菌群结构,发现健康人群 BALF 核心菌属主要是: *Prevotella*、*Streptococcus*、*Neisseria*、*Fusobacterium*、*Veillonella*、*Porphyromonas*、*Lactobacillus*、*Halomonas*、*Capnocytophaga*、*Actinomyces* 等。目前关于肺部菌群的研究大部分集中在西方人,而中国人肺部菌群研究相对较少。Hosgood 等^[17]收集了 8 例健康中国女性痰液样本,通过 454 焦磷酸测序后分析,痰液中核心菌属主要是: *Streptococcus*、*Neisseria*、*Gemella*、*Granulicatella*、*Actinomyces*、*Veillonella*、*Prevotella* 等。可见非疾病部位肺组织在不同的研究中菌属差异较大,考虑可能是受人群、生活区域、取材部位、样本类型、16SrDNA 靶测序区、数据库和数据分析方法等影响。目前已有研究显示非疾病部位菌群 α 多样性

与人口密度,空气 PM10 颗粒物及家用煤燃烧相关^[16-17]。

我们选取了 12 例肺叶支气管开口处作为 DT 组 5 例肺移植者健康肺气管组织作为 H 组。早期有报道显示非癌组织 α 多样性要显著高于癌组织,腺癌组织癌组织 α 多样性要显著高于鳞癌组织^[16]。我们的研究显示健康肺呼吸道内菌群 α 多样性要显著高于腺癌患者呼吸道组织,并且在主要的菌门及菌属丰度两组间差异明显。根据预测两组在菌群代谢通路上亦有诸多不同,这些改变会不会像肠道菌群一样,在癌症的发生、发展过程中起一定作用亦或是由于肺癌的进展导致局部微环境的变化进而影响肺部菌群,目前来看肺部菌群亦有这样的趋势,但还需要更多的研究来探讨这一问题。

本研究的不足是病例数较少,在未来我们需要更大样本的研究来分析中国人在肺内不同位置的菌群结构特征,另外其它的病理类型如鳞癌组织局部的菌群结构特征是否又有所不同,本研究并未涉及。

本研究应用高通量测序的方法,通过无菌条件下收集样本,分析了我国腺癌患者及健康肺下呼吸道内细菌菌群结构特征,以 *Proteobacteria*(65%)、*Bacteroidetes*(18%)、*Firmicutes*(9%) 和 *Acidobacteria*(2%) 菌门为主。另外本研究发现健康肺呼吸道内菌群 α 多样性要显著高于腺癌患者呼吸道组织,并且在主要的菌门及菌属丰度两组间差异明显。通过软件预测两组在菌群代谢通路上亦有诸多不同。这些菌群结构的改变对肺腺癌到底有何影响,还需要我们进一步研究。

参 考 文 献

- 1 Leung A, Tsoi H, Yu J. *Fusobacterium* and *Escherichia*: models of colorectal cancer driven by microbiota and the utility of microbiota in colorectal cancer screening[J]. Expert Rev Gastroenterol Hepatol, 2015, 9(5): 651-657.
- 2 Chase D, Goulder A, Zenhausern F, et al. The vaginal and gastrointestinal microbiomes in gynecologic cancers: a review of applications in etiology, symptoms and treatment[J]. Gynecol Oncol, 2015, 138(1): 190-200.
- 3 Wang L, Ganly I. The oral microbiome and oral cancer[J]. Clin Lab Med, 2014, 34(4): 711-719.
- 4 Roderburg C, Luedde T. The role of the gut microbiome in the development and progression of liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma[J]. Gut Microbes, 2014, 5(4): 441-445.
- 5 Edgar RC. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST[J]. Bioinformatics, 2010, 26(19): 2460-2461.
- 6 Desantis TZ, Hugenholtz P, Larsen N, et al. Greengenes, a Chimera-Checked 16S rRNA Gene Database and Workbench Compatible with ARB[J]. Appl Environ Microbiol, 2006, 72(7): 5069-5072.
- 7 Von Mutius E. The microbial environment and its influence on asthma prevention in early life[J]. J Allergy Clin Immunol, 2016, 137(3): 680-689.
- 8 Erb-Downward JR, Thompson DL, Han MK, et al. Analysis of the lung microbiome in the “healthy” smoker and in COPD[J]. PLoS One, 2011, 6(2): e16384.
- 9 Knippenberg S, Ueberberg B, Maus R, et al. Streptococcus pneumoniae triggers progression of pulmonary fibrosis through pneumolysin[J]. Thorax, 2015, 70(7): 636-646.
- 10 Tunney MM, Einarsson GG, Wei L, et al. Lung microbiota and bacterial abundance in patients with bronchiectasis when clinically stable and during exacerbation[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2013, 187(10): 1118-1126.
- 11 Bassis CM, Erb-Downward JR, Dickson RP, et al. Analysis of the upper respiratory tract microbiotas as the source of the lung and gastric microbiotas in healthy individuals[J]. MBio, 2015, 6(2): e00037.
- 12 Cox MJ, Allgaier M, Taylor B, et al. Airway microbiota and pathogen abundance in age-stratified cystic fibrosis patients[J]. PLoS One, 2010, 5(6): e11044.
- 13 Molyneux PL, Mallia P, Cox MJ, et al. Outgrowth of the bacterial airway microbiome after rhinovirus exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2013, 188(10): 1224-1231.
- 14 Rogers GB, Van Der Gast CJ, Cuthbertson L, et al. Clinical measures of disease in adult non-CF bronchiectasis correlate with airway microbiota composition[J]. Thorax, 2013, 68(8): 731-737.
- 15 Rogers GB, Zain NM, Bruce KD, et al. A novel microbiota stratification system predicts future exacerbations in bronchiectasis[J]. Ann Am Thorac Soc, 2014, 11(4): 496-503.
- 16 Yu G, Gail MH, Consonni D, et al. Characterizing human lung tissue microbiota and its relationship to epidemiological and clinical features[J]. Genome Biology, 2016, 17(1): 163.
- 17 Hosgood HD 3rd, Sapkota AR, Rothman N, et al. The potential role of lung microbiota in lung cancer attributed to household coal burning exposures[J]. Environ Mol Mutagen, 2014, 55(8): 643-651.
- 18 Seow WJ, Hu W, Vermeulen R, et al. Household air pollution and lung cancer in China: a review of studies in Xuanwei[J]. Chin J Cancer, 2014, 33(10): 471-475.

(收稿日期: 2017-08-25)

(本文编辑: 王亚南)

张鑫 熊叶 马可, 等. 腺癌患者和肺移植供者下呼吸道菌群对比研究[J/CD]. 中华肺部疾病杂志(电子版), 2018, 11(1): 50-54.