

胃癌患者脾胃虚弱证形成与舌苔菌群相关性研究

沈睿¹, 李美凤¹, 彭宇恒¹, 滕钰浩², 钱峻³, 董伟¹, 詹臻¹, 张军峰¹

(1.南京中医药大学医学院·整合医学学院,江苏 南京 210023;2.南京中医药大学附属医院,江苏 南京 210029;3.南京中医药大学中医学学院·中西医结合学院,江苏 南京 210023)

摘要:**目的** 探讨胃癌患者脾胃虚弱证形成的系统生物学机制。**方法** 招募 22 例胃癌脾胃虚弱证患者和 32 例体检者作为对照,基于 16S rDNA 和 18S rDNA 基因高通量测序分析舌苔细菌和真菌,电化学发光技术检测血清 20 种炎症因子,超高效液相色谱质谱联用技术(UPLC-MS)分析血清代谢组学。**结果** 与对照组相比,脾胃虚弱证患者舌苔厚壁菌门相对丰度显著升高,而拟杆菌门、变形菌门、梭杆菌门相对丰度降低($P<0.05$)。线性判别分析(LDA)发现,芽孢杆菌属、肠球菌属、乳球菌属、沙雷氏菌属是胃癌脾胃虚弱证患者舌苔标志菌属。与对照组相比,胃癌脾胃虚弱证患者血清 GM-CSF、IL-17 α 、IL-12/IL23P40 和 IL-6 水平显著升高($P<0.05$),而 IL-5、TNF- β 、IL-4 水平显著降低($P<0.05$),9 种血清代谢分子(L-赖氨酸、二十碳五烯酸、L-天冬酰胺、溶血磷脂酰乙醇胺、磷脂酸、亚油酸、9-十六碳烯酸、 α -亚麻酸和 L-苯丙氨酸)显著上升($P<0.05$)。Spearman 相关性分析,IL-6、TNF- β 、IL-5 与卟啉单胞菌属、奈瑟菌属均显著相关($P<0.05$),奈瑟菌属、梭杆菌属与 9 种血清代谢分子均显著负相关($P<0.05$)。**结论** 胃癌脾胃虚弱证患者舌苔菌群结构差异与血清炎症因子和代谢组学相关,为阐明脾胃虚弱证的形成机制提供新的思路与方法。

关键词: 胃癌;脾胃虚弱证;舌苔菌群;系统生物学

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-0482(2020)02-0221-08

DOI: 10.14148/j.issn.1672-0482.2020.0221

引文格式: 沈睿,李美凤,彭宇恒,等.胃癌患者脾胃虚弱证形成与舌苔菌群相关性研究[J].南京中医药大学学报,2020,36(2): 221-228.

Study on the Correlation Between the Formation of Spleen-Stomach Deficiency Syndrome and Tongue Coating Microbiota in Patients with Gastric Cancer

SHEN Rui¹, LI Mei-feng¹, PENG Yu-heng¹, TENG Yu-hao², QIAN Jun³, DONG Wei¹, ZHAN Zhen¹, ZHANG Jun-feng¹

(1. School of Medicine & Holistic Integrative Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, 210023, China; 2. Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, 210029, China; 3. School of Chinese Medicine & Integrated Chinese and Western Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, 210023, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To explore the systemic biological mechanism of Spleen-Stomach Deficiency syndrome (SSD) in the patients with gastric cancer (GC). **METHODS** 22 GC patients with SSD and 32 healthy volunteers were recruited as controls. The tongue coating microbiota was analyzed by high-throughput sequencing based on 16S rDNA and 18S rDNA genes. Serum cytokines were detected by electrochemiluminescence, and serum metabolomics was analyzed by ultrahigh performance liquid chromatography-mass spectrometer (UPLC-MS). **RESULTS** Compared with the controls, the GC patients had significantly increased coating *Firmicutes* and significantly decreased coating *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* and *Fusobacteria* ($P<0.05$). Linear discriminant analysis (LDA) presented that four coating bacterial genera (*Bacillus*, *Enterococcus*, *Lactococcus* and *Serratia*) enriched in GC patients. Compared with the controls, the serum levels of GM-CSF, IL-17 α , IL-12/IL23P40 and IL-6 were significantly increased in GC patients ($P<0.05$), the serum levels of IL-5, TNF- β and IL-4 were significantly decreased ($P<0.05$), and nine serum metabolic molecules were significantly increased ($P<0.05$), including L-lysine, eicosap-

收稿日期: 2019-11-09

基金项目: 国家自然科学基金(81473458,81473593);国家中医临床研究基地业务建设科研专项(JDZX2015089);江苏省自然科学基金(BK20181097)

第一作者: 沈睿,女,硕士研究生,E-mail:18260095782@163.com

通信作者: 张军峰,男,教授,主要从事舌诊的生物学机制及临床应用研究,E-mail:zhangjunfeng5_5@163.com

entaenoic acid, L-asparagine, lysophosphatidylethanolamine, phosphatidic acid, linoleate, 9-hexadecanoic acid, α -linoleate, and L-phenylalanine. Spearman correlation analysis showed that IL-6, TNF- β and IL-5 were significantly correlated with coating *Porphyromonas* and *Neisseria* ($P < 0.05$), and *Neisseria* and *Fusobacterium* were negatively correlated with 9 serum metabolic molecules ($P < 0.05$). **CONCLUSION** The GC patients with SSD syndrome has altered tongue coating microbiota, which is linking with the different serum cytokines and metabolome. The data provides potential breakthrough point for clarifying the system biological mechanism of SSD syndrome.

KEYWORDS: gastric cancer; Spleen-Stomach Deficiency syndrome; tongue coating; system biology

脾胃为后天之本,气血生化之源,脾胃功能的正常发挥,有赖于脾胃之气的旺盛充盈,饮食失调、七情不合、劳倦内伤、先天禀赋不足都会损伤脾胃,脾胃损伤则导致脾胃气虚及脾胃运化功能减退,即脾胃虚弱证。脾胃虚弱证的病程较长,临床常见食少纳呆、大便溏稀、面色萎黄、神疲倦怠、形体瘦弱、舌质淡、苔薄白等^[1]。流行病学调查显示脾胃虚弱证是胃癌前病变及胃癌的重要证型^[2],调理脾胃可以缓解患者的不适,减轻恶性肿瘤手术、放化疗引起的不良反应,是提高胃癌患者生活质量,延长生存期的重要法则。

舌苔是由胃气熏蒸谷气上承于舌面而成,舌为脾之外候,与脾胃运化功能相应,能反映机体的病理生理状态,尤其是消化系统的状态,也是消化系统肿瘤辨证论治的重要依据^[3-4]。前期研究^[5]发现慢性萎缩性胃炎患者舌苔菌群结构与正常人舌苔菌群之间存在明显差异,本项目最新研究^[6]发现胃癌患者舌苔类型与舌苔菌群结构密切相关,并存在独特的菌群标志和共生关系^[7]。这些研究结果提示,在消化系统疾病(如慢性胃炎、胃癌前病变、胃癌)发生时,舌苔菌群能够反映消化系统的病理生理状态。

大量研究发现人体菌群变化与肿瘤患者免疫代谢密切相关^[8]。本项目前期研究发现胃癌患者中医证型与血清炎症因子表达水平存在一定相关性,IL-10 可能是区分胃癌实证的标志分子,IL-1 β 可能是区分胃癌虚证的标志分子^[9],胃癌患者不同舌苔类型的炎症因子表达模式不同,IL-17 α 可能是区分白苔与黄苔标志性炎症因子^[10]。由于中医理论的整体观与代谢组学整体角度研究生物体的功能水平相一致,中医病证引起代谢物组的共性分析和生物标记物的发现,可促进“证”本质的研究、中医辨证的科学化和量化^[11-12]。因此,本研究基于舌苔菌群,探究胃癌脾胃虚弱证患者舌苔菌群结构差异与血清代谢组、炎症因子的相关性,为脾胃虚弱证的形成机制提供新的思路与方法。

1 材料与方法

1.1 临床一般资料

经南京中医药大学附属医院伦理委员会批准(批号:2015NL-017-01),于 2015 年 1 月至 2015 年 12 月间,在南京中医药大学附属医院肿瘤内科募集病理确诊的胃癌患者,采用统一的调查表采集临床资料,按照前期诊断标准^[13],纳入脾胃虚弱证患者 22 例,男 19 例,女 3 例,年龄(63.5 ± 9.3)岁;同期在南京中医药大学附属医院体检中心募集无重大器质性病变的体检者 32 例,作为对照组,男 24 例,女 8 例,年龄(64.6 ± 10.2)岁,2 组年龄、性别均无显著性差异。

1.2 舌苔菌群检测

舌苔采集和菌群检测方法参考前期文献^[7],简述如下:晨起空腹,记录采集舌苔,提取舌苔沉淀的总 DNA,利用 16S rDNA 和 18S ITS1-ITS2 通用引物 PCR 扩增,制备 Miseq PE 文库,进行高通量测序,QIIME(version 1.17)优化测序数据,按照 97% 相似性在 UPARSE35 (version 7.1 <http://drive5.com/uparse/>)软件中建立菌群可操作单元(OTU),采用在线软件(<http://www.i-sanger.com>)和本地软件 Visual Genomics(Release 1,上海盈飞生物)进行菌群生物信息分析,包括 α 多样性、菌群结构、LEfSe 分析等。

1.3 血清炎症因子与血清代谢组学检测

血清炎症因子检测参考前期文献^[10],简述如下:空腹采集静脉血,分离血清,采用多因子电化学发光免疫检测 20 种血清炎症因子,检测试剂盒有 2 种:Pro-inflammatory Panel (human) (批号: N05049A-1, MSD, USA) 和 Cytokine Panel (human) (批号: N05050A-1, MSD, USA),严格按照试剂盒要求进行操作。

血清代谢组学检测参考前期文献^[14],简述如下:空腹采静脉血并分离血清,运用超高效液相色谱质谱联用(UPLC-MS)技术(Acquity 超高效液相色谱系统, Synapt 质谱系统, Masslynx 4.1 质谱工作

站,均来自美国 Waters 公司)检测血清代谢组,色谱条件:采用 Acquity UPLC™ BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 m× 50 mm × 1.7 μm),柱温 40 ℃,流速 0.4 mL/min,流动相 A 为含 0.1%甲酸水溶液,B 相为乙腈,每次进样 5 μL;质谱条件:电喷雾离子源(ESI)采用正离子扫描模式,毛细管电压 3.0 kV,锥孔电压 30 V,碰撞能电压 6 eV,离子源温度 120 ℃,除溶剂温度 350 ℃,除溶剂气体流为 700 L/h 氮气,采集范围 100~1 000 *m/z*,碰撞气体为氦气。xcmsonline(<https://xcmsonline.scripps.edu>)在线平台对原始数据进行峰识别、峰对齐和峰面积归一化处理后,导入 SIMCA 14.1 软件进行主成分分析(PCA)和正交偏最小二乘法判别分析(OPLS-DA),使用 HMDB(<http://www.hmdb.ca/metabolites>)、METLIN(<https://metlin.scripps.edu>)和 PubChem(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)在线数据库进行化合物鉴定。MetaboAnalyst 4.0(<http://www.metaboanalyst.ca/faces/home.xhtml>)平台对差异代谢物进行受试者工作特征曲线(ROC 曲线)

分析,获取曲线下面积(AUC)、95%置信区间(CI)、特异性和灵敏性,MetaboAnalyst 4.0 平台进行差异代谢物的富集分析,预测代谢信号通路。

1.4 统计学方法

采用 SPSS20.0 进行统计分析,对于非正态分布数据采用中位数(区间值),比较分析采用曼惠特尼 U 检验,相关性分析采用 Spearman 分析,R 软件绘制相关性热图,所有统计为双侧检验,*P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胃癌脾胃虚弱证患者舌苔菌群多样性

非参数检验分析舌苔菌群 alpha 多样性指数,结果显示,与对照组相比,脾胃虚弱证患者舌苔细菌丰富度指数(Ace、Chao、Observed OTUs)显著升高(*P* < 0.05);多样性指数 Shannon 显著降低(*P* < 0.05),Simpson 指数显著升高(*P* < 0.01)。然而,舌苔真菌多样性无显著统计学差异(*P* > 0.05)。见表 1。

表 1 胃癌脾胃虚弱证舌苔菌群 alpha 多样性分析[中位数(P25,P75)]

菌群	组别	Ace	Chao	Shannon
细菌	脾胃虚弱证(<i>n</i> = 32)	476.5(386.2,592.2)	430.9(368.1,564.1)	3.364(2.386,3.599)
	对照组(<i>n</i> = 22)	394.8(294.3,523.2)	362.9(298.0,468.1)	3.589(3.100,3.819)
	<i>Z</i> (<i>P</i>)	2.007(0.045)	2.025(0.043)	2.236(0.025)
真菌	脾胃虚弱证(<i>n</i> = 32)	157.7(132.2,199.6)	144.1(121.1,174.1)	3.139(2.700,3.661)
	对照组(<i>n</i> = 22)	146.3(121.6,200.9)	139.3(105.0,180.3)	3.131(2.810,3.503)
	<i>Z</i> (<i>P</i>)	0.593(0.553)	0.42(0.674)	0.205(0.838)
菌群	组别	Simpson	Observed OTUs	
细菌	脾胃虚弱证(<i>n</i> = 32)	0.072(0.054,0.194)	308.5(277.3,427.5)	
	对照组(<i>n</i> = 22)	0.047(0.037,0.076)	269.0(224.5,346.3)	
	<i>Z</i> (<i>P</i>)	2.746(0.006)	1.998(0.046)	
真菌	脾胃虚弱证(<i>n</i> = 32)	0.078(0.050,0.134)	123.0(101.5,148.0)	
	对照组(<i>n</i> = 22)	0.087(0.061,0.126)	119.0(88.0,146.0)	
	<i>Z</i> (<i>P</i>)	0.054(0.957)	0.367(0.714)	

2.2 胃癌脾胃虚弱证患者舌苔菌群群落结构分析

在全部人群中,舌苔中观察到 42 个细菌门和 8 个真菌门。采用非参数检验分析优势菌门(相对丰度 > 1%)的差异,结果发现,与对照组相比,胃癌脾胃虚弱证患者舌苔的厚壁菌门(*Firmicutes*)相对丰度显著升高(*P* < 0.01),拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、梭杆菌门(*Fusobacteria*)和变形菌门(*Proteobacteria*)的相对丰度降低(*P* < 0.05~0.01),厚壁菌门与拟杆菌门的比值(*Firmicutes/Bacteroidetes*, F/B)显著升高(*P* < 0.05)。然而,真菌门除了未知菌群门

(*Unclassified-fungi*)外,其余 3 个优势菌真菌门均无显著统计学差异(*P* > 0.05)。见表 2~3。

为了探索胃癌脾胃虚弱证患者舌苔标志菌群,这里展示了属水平的菌群结构,并采用线性判别分析(LDA),获得了从门到属水平的标志菌群(图 1)。其中,在全部人群中,舌苔中观察到 601 个已知细菌属和 507 个已知真菌属,舌苔优势菌属(相对丰度 > 1%)有 21 个,包括芽孢杆菌属(*Bacillus*)、肠球菌属(*Enterococcus*)、链球菌属(*Streptococcus*)、普雷沃菌属_7(*Prevotella_7*)、乳球菌属(*Lactococcus*)、韦

元在胃癌脾胃虚弱证患者舌苔中显著升高,26个标志细菌分类单元在对照组舌苔中显著升高;5个标志真菌分类单元在胃癌脾胃虚弱证患者舌苔中显著升高,2个标志真菌分类单元在对照组舌苔中显著升高。在属水平,可以发现芽孢杆菌属、肠球菌属、乳球菌属、沙雷氏菌属(*Serratia*)可能是胃癌脾胃虚弱证患者的舌苔标志细菌属,而未发现胃癌脾胃虚弱证相关舌苔标志真菌属。

表 3 胃癌脾胃虚弱证真菌门水平分析[中位数(P25,P75),%]

	<i>Ascomycota</i>	<i>Basidiomycota</i>	<i>Unclassified-fungi</i>	<i>Zygomycota</i>
脾胃虚弱证($n=22$)	70.10(65.96,77.91)	28.15(19.08,30.85)	1.067(0.456,1.839)	0.832(0.004,2.327)
对照组($n=32$)	69.40(60.27,80.77)	27.50(17.67,36.47)	0.356(0.022,1.017)	0.332(0.002,0.952)
$Z(P)$	0.657(0.511)	0.830(0.407)	2.447(0.014)	1.133(0.257)



图 1 胃癌脾胃虚弱证患者舌苔菌群分析

2.3 胃癌脾胃虚弱证患者血清炎症因子分析

结果发现,与对照组相比,脾胃虚弱证患者的血清 GM-CSF、IL-12/IL23P40、IL-17 α 和 IL-6 水平显著升高($P<0.05\sim0.01$),而 IL-5、TNF- β 和 IL-4 水平显著降低($P<0.05\sim0.01$)(表 4)。

表 4 胃癌脾胃虚弱证患者血清炎症因子表达水平[中位数(P25,P75),ng·mL⁻¹]

	GM-CSF	IL-5	IL-12/IL23P40	IL-17 α
脾胃虚弱证($n=22$)	0.154(0.105,0.221)	0.017(0.000,0.326)	151.960(105.429,237.070)	3.122(2.161,3.998)
对照组($n=32$)	0.076(0.033,0.137)	0.346(0.119,0.614)	120.021(88.763,150.912)	2.088(1.467,2.973)
$Z(P)$	2.619(0.009)	2.748(0.006)	2.271(0.023)	2.429(0.015)

	TNF- β	IL-4	IL-6
脾胃虚弱证($n=22$)	0.182(0.115,0.214)	0.000(0.000,0.009)	1.937(0.697,2.650)
对照组($n=32$)	0.251(0.183,0.308)	0.008(0.001,0.018)	0.685(0.484,1.077)
$Z(P)$	3.028(0.002)	2.432(0.015)	3.239(0.001)

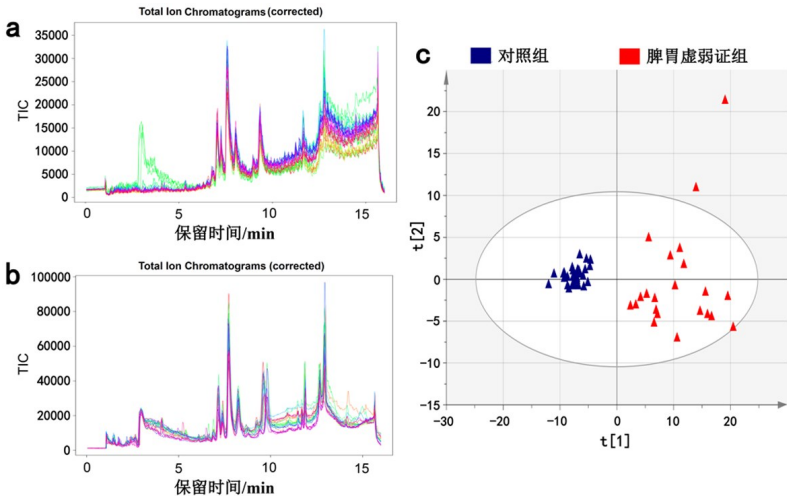
2.4 胃癌脾胃虚弱证患者血清代谢标志分子分析

血清代谢组学分析结果显示胃癌脾胃虚弱证患者与对照组存在显著差异(图 2)。血清代谢总离子图显示,对照组(图 2a)的响应值普遍低于胃癌脾胃虚弱证组(图 2b),尤其在 10~15 min 谱峰强度和数量存在明显差异。PCA 结果显示,脾胃虚弱证组与对照组明显区分开,模型参数 $R^2 X=0.813$, $Q^2=0.622$,表明本模型能够解释 81.3% 的原始数据,较好地实现了 2 组的区分(图 2c)。

进一步采用 OPLS-DA 分析,筛选出 $VIP>1$ 、 $P<0.05$ 、Fold Change >1.5 的变量,经过 MET-LIN、HMDB 和 PubChem 在线数据库鉴定代谢物,将筛选的潜在代谢物导入 MetaboAnalyst 4.0 平台进行 ROC 分析,以 AUC 大小判断诊断的准确度。

结果发现,与对照组相比,胃癌脾胃虚弱证患者血清有 9 个特征性代谢分子水平显著升高,分别为 L-赖氨酸、L-天冬酰胺、溶血磷脂酰乙醇胺、二十碳五烯酸、磷脂酸、亚油酸、9-十六碳烯酸、 α -亚麻酸和 L-苯丙氨酸(表 5)。

采用代谢通路富集分析探索差异代谢分子的代谢通路,发现 9 种差异代谢分子涉及 7 条代谢通路: α -亚麻酸代谢(α -Linolenic acid metabolism),赖氨酸降解(Lysine degradation),苯丙氨酸代谢(Phenylalanine metabolism),赖氨酸生物合成(Lysine biosynthesis),丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢(Alanine, aspartate and glutamate metabolism),氮代谢(Nitrogen metabolism)和氨酰基-tRNA 生物合成(Aminoacyl-tRNA biosynthesis)途径(图 3)。



注:a.对照组血清代谢总离子图;b.脾胃虚弱证血清代谢总离子图;
c.脾胃虚弱证和对照组 PCA 分析

图 2 胃癌脾胃虚弱证患者血清代谢组学 PCA 分析

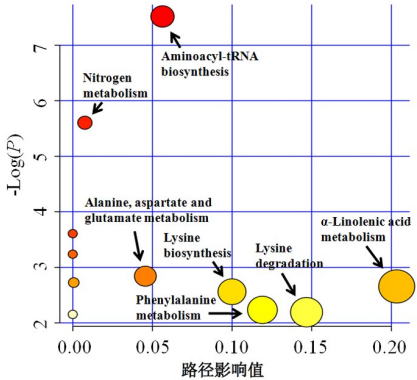
表 5 胃癌脾胃虚弱证患者血清代谢标志分子

代谢物	VIP	质荷比 <i>m/z</i>	保留时间/ min	变化倍数	<i>P</i>	AUC (95%CI)	敏感性/ %	特异性/ %
L-赖氨酸	3.204	540.329 6	7.72	2.2	1.41×10^{-13}	1.000(1.000~1.000)	100.0	100.0
L-天冬酰胺	2.149	566.345 4	8.23	3.0	1.57×10^{-13}	1.000(1.000~1.000)	100.0	100.0
溶血磷脂酰乙醇胺	2.804	506.324 2	8.23	3.0	2.82×10^{-13}	1.000(1.000~1.000)	100.0	100.0
二十碳五烯酸	1.340	303.232 1	11.69	2.6	7.38×10^{-10}	0.976(0.939~0.996)	95.5	87.5
磷脂酸	1.183	528.309 1	7.19	2.1	3.43×10^{-9}	0.999(0.994~1.000)	100.0	96.9
亚油酸	2.601	281.247 8	12.91	3.2	9.29×10^{-8}	0.929(0.815~0.991)	95.5	90.6
9-十六碳烯酸	1.480	255.232 1	12.64	4.2	9.71×10^{-8}	0.973(0.918~0.997)	86.4	90.6
α -亚麻酸	2.405	279.232 0	11.85	2.9	5.91×10^{-7}	0.928(0.825~0.992)	81.8	93.8
L-苯丙氨酸	1.334	564.329 6	7.14	1.9	5.61×10^{-6}	0.881(0.756~0.965)	81.8	84.4

2.5 胃癌患者脾胃虚弱证形成的多因素关联分析

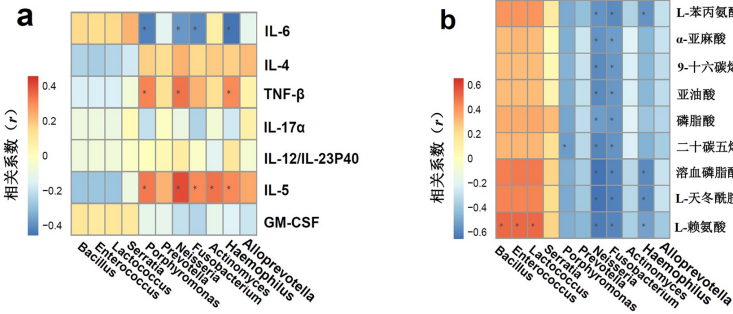
为了探索胃癌患者脾胃虚弱证形成的系统生物学机制,在全部人群中,基于差异的舌苔菌属,分别与差异血清炎症因子、代谢分子进行 Spearman 相关性分析(图 4)。结果显示,舌苔卟啉单胞菌属(*Porphyromonas*)、奈瑟菌属、梭杆菌属(*Fusobacterium*)、嗜血杆菌属与血清 IL-6 水平显著负相关($r < -0.4, P < 0.05$),卟啉单胞菌属、奈瑟菌属和嗜血杆菌属与 IL-5 和 TNF- β 显著正相关($r > 0.4, P < 0.05$),梭杆菌属与 IL-5 呈显著正相关($r > 0.4, P < 0.05$)(图 4a);舌苔芽孢杆菌属、肠球菌属、乳球菌属的相对丰度与血清赖氨酸水平显著正相关($r > 0.6, P < 0.05$),而舌苔奈瑟菌属、梭杆菌属的相对丰

度与 9 种血清代谢分子均显著负相关($r < -0.6, P < 0.05$)(图 4b)。



注:圆圈的直径和颜色基于 *P* 值和路径的影响值

图 3 胃癌脾胃虚弱证患者血清代谢通路图



注:红色表示正相关,蓝色表示负相关;a.差异舌苔菌属与血清炎症因子的相关性热图,
* $r > 0.4$ 或 $r < -0.4, P < 0.05$;b.差异舌苔菌属与血清代谢标志分子相关性热图,* $r > 0.6$ 或 $r < -0.6, P < 0.05$ 。

图 4 胃癌脾胃虚弱证患者舌苔菌群-炎症因子-代谢分子相关性热图

3 讨论

察舌苔是中医舌诊的重要内容,是中医辨证论治的依据。口腔约 700 多种微生物,而舌苔是口腔菌群的主要定植部位,其数量及种类远高于口腔的其他部位^[15]。前期研究发现舌苔菌群对慢性胃炎寒热证^[16]、慢性糜烂性胃炎^[17]、胃癌^[18]、慢性乙型肝炎^[19]等消化系统疾病具有诊断价值,甚至发现舌

苔简明弯曲菌(*Campylobacter concisus*)丰度随病情的进展而升高,与胃黏膜中丰度升高一致,能够反映慢性胃炎的进展阶段^[20],提示舌苔菌群可以反映消化系统的病理生理变化。

证候是疾病发展到一定阶段时,致病因素和机体内外环境相互作用的综合反映,由特定的症状和舌、脉象构成,是中医辨证论治的核心内容。脾胃虚

弱证是胃癌的重要证型^[21],因此,本研究系统分析了胃癌患者脾胃虚弱证与舌苔菌群、血清炎症因子和血清代谢组的相关性,发现胃癌脾胃虚弱证患者舌苔革兰阳性的芽孢杆菌属相对丰度显著升高,而革兰阴性的卟啉单胞菌属、奈瑟菌属、梭杆菌属、嗜血杆菌属等相对丰度显著降低。芽孢杆菌是胃癌患者的舌苔优势菌属,前期研究^[17]发现糜烂性胃炎黄苔患者芽孢杆菌属丰度升高,与本研究结果一致,提示舌苔芽孢杆菌属是胃黏膜炎症损伤与功能降低的潜在标志。

嗜血杆菌属是重要的呼吸道机会感染细菌,Wang等^[22]研究了慢性阻塞性肺病患者痰液菌群组成、蛋白组学、转录组学的相关性,发现中性粒细胞计数与嗜血杆菌属、奈瑟菌属显著正相关,嗜血杆菌属、莫拉菌属(*Moraxella*)丰度与痰液蛋白组学、转录组学关系最密切;Hughes等^[23]发现非典型流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*)感染模型中,上调巨噬细胞泛素连接酶 Pellino-1 表达水平,通过TLR4 信号通路诱导炎症反应。这些结果提示嗜血杆菌属在菌群-免疫交互作用导致的呼吸道感染中发挥关键作用。

卟啉单胞菌属包括牙龈卟啉单胞菌(*Porphyromonas gingivalis*)、牙髓卟啉单胞菌(*Porphyromonas endodontalis*)和利氏卟啉单胞菌(*Porphyromonas levii*)等,其中,牙龈卟啉单胞菌是常见牙周病原菌,不仅在牙周病患者口腔中过度增殖^[24],而且研究发现牙龈卟啉单胞菌在食管癌患者口腔中相对丰度显著升高^[25],其抗体水平在胰腺癌患者血清中显著上升^[26],提示牙龈卟啉单胞菌过度增殖及其诱导的炎症反应可能增加食管癌、胰腺癌发病风险。而本研究中,胃癌脾胃虚弱证患者卟啉单胞菌属显著降低,这与先前研究^[18]结果一致。

菌群与炎症的互作深刻影响人类疾病与健康,人体菌群对宿主免疫系统的发育和功能维持发挥重要作用,炎症免疫是实现宿主与菌群交互共生的途径^[27]。研究^[28-29]发现肠道菌群与血清炎症因子水平存在显著相关。本研究发现胃癌脾胃虚弱证患者舌苔卟啉单胞菌属、奈瑟菌属和嗜血杆菌属与血清IL-6 水平显著负相关,其中,胃癌脾胃虚弱证患者血清IL-6 水平显著升高,与代谢综合征大鼠脾虚证^[30]和慢性萎缩性胃炎脾虚证^[31]的研究结果一致。IL-6 是一种具有多效性的可溶性介质,其作为多种功能炎症细胞因子,阻止细胞凋亡,是激活的

NF- κ B 在促进肿瘤形成中的效应信号之一^[32],参与了胃癌的发生发展过程。Liu等^[33]研究发现,IL-6 水平与胃癌患者年龄、肿瘤大小、淋巴结转移、远处转移、临床分期和分化程度相关,老年人血清IL-6 水平升高可能与免疫功能较弱相关;Ashizawa等^[34]研究发现血清IL-6 升高与胃癌进展期、淋巴结转移相关,可作为胃癌预后的潜在标志。Park等^[35]研究发现血清IL-6 水平和牙龈卟啉单胞菌抗体效价可能是诊断口腔鳞状细胞癌的潜在标志物。这些结果为阐释胃癌患者脾胃虚弱证形成的分子机制提供了研究思路。

前期研究^[36]发现利血平可致脾虚证大鼠模型血清和尿液的糖代谢、脂质代谢、氨基酸代谢等紊乱;赵瑜等^[37]发现慢性乙型肝炎患者舌苔变化与尿液代谢组相关,舌红苔黄患者和舌淡苔白患者的差异代谢物主要与能量代谢、氨基酸代谢、核苷酸代谢以及肠道菌群代谢相关。本研究发现胃癌脾胃虚弱证患者赖氨酸水平与舌苔卟啉单胞菌属、奈瑟菌属和嗜血杆菌属丰度显著负相关,其中赖氨酸、苯丙氨酸、天冬酰胺的水平显著升高,主要涉及的氨酰基-tRNA 生物合成途径是控制蛋白质翻译的关键途径,提示胃癌脾胃虚弱证患者蛋白质合成异常活跃。赖氨酸是肉碱代谢的前体物质之一,而肉碱主要参与脂肪酸代谢,脂肪酸在许多恶性肿瘤中都显著升高,导致肉碱消耗增加,研究^[38]发现胃癌患者血浆赖氨酸水平显著降低,手术切除胃肿瘤后赖氨酸水平显著上升。这些结果提示,血清赖氨酸水平可能与肿瘤荷载相关,而血清赖氨酸水平与卟啉单胞菌属、奈瑟菌属、嗜血杆菌属显著负相关的分子机制有待深入研究。

综上,本研究发现胃癌脾胃虚弱证与舌苔菌群、血清炎症因子、代谢组学密切相关,为深入研究脾胃虚弱证形成的分子生物学机制提供新思路与方法。

参考文献:

- [1] 郭明冬. 中西医结合治疗老年脾胃虚弱型慢性胃炎患者的疗效[J]. 中国老年学杂志, 2014, 34(5):1409-1410.
- [2] 陈静, 赵爱光, 曹妮达, 等. 胃癌前疾病、癌前病变、胃癌与脾虚证的研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2013, 31(7):1654-1657.
- [3] 张昕洋, 郭子宁. 舌苔与病、证探讨[J]. 北京中医药大学学报, 2015, 38(6):373-376.
- [4] 单士普, 李丁. 肿瘤患者舌象研究进展[J]. 山东中医杂志, 2011, 30(8):592-594.
- [5] 王慧雯, 李莉, 李福凤, 等. 慢性萎缩性胃炎患者舌苔菌群的特异性菌属分析[J]. 中国微生态学杂志, 2018, 30(5):497-501.
- [6] 成颖, 吴娟, 章聪, 等. 新发胃癌患者舌苔类型与舌苔菌群的相关性分析[J]. 南京中医药大学学报, 2018, 34(4):404-408.

- [7] XU J, XIANG C, ZHANG C, et al. Microbial biomarkers of common tongue coatings in patients with gastric cancer[J]. Microb Pathogenesis, 2019, 127: 97-105.
- [8] HARTMANN N, KRONENBERG M. Cancer immunity thwarted by the microbiome[J]. Science, 2018, 360(6391):858-859.
- [9] 张玉, 张李唯, 董伟, 等. 胃癌中医辨证与血清炎症因子的相关性研究[J]. 时珍国医国药, 2017, 28(12):3043-3047.
- [10] 张军峰, 张李唯, 吴娟, 等. 不同舌苔胃癌患者血清炎症因子表达模式研究[J]. 北京中医药大学学报, 2018, 41(5): 405-412.
- [11] 贾伟, 蒋健, 刘平, 等. 代谢组学在中医药复杂理论体系研究中的应用[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(8):621-624.
- [12] 侯雅静, 陈家旭, 潘秋霞, 等. 基于代谢组学方法的中医证候研究进展[J]. 天津中医药大学学报, 2017, 36(4):241-244.
- [13] ZHANG JF, ZHAN Z, WU J, et al. Association among lifestyle, clinical examination, polymorphisms in CDH1 gene and TCM syndrome differentiation of gastric cancer[J]. J Tradit Chin Med, 2013, 33(5): 572-579.
- [14] 向春婕, 徐硕, 陶伟伟, 等. 基于 UPLC-MS 研究不同舌苔胃癌患者的血清代谢组学差异[J]. 中华中医药学刊, 2019, 37(9):2163-2167.
- [15] MAGER DL, XIMENEZ-FYVIE LA, HAFFAJEE AD, et al. Distribution of selected bacterial species on intraoral surfaces[J]. J Clin Periodontol, 2003, 30(7):644-654.
- [16] JIANG B, LIANG X, CHEN Y, et al. Integrating next-generation sequencing and traditional tongue diagnosis to determine tongue coating microbiome[J]. Sci Rep, 2012, 2:936.
- [17] YE J, CAI X, YANG J, et al. *Bacillus* as a potential diagnostic marker for yellow tongue coating[J]. Sci Rep, 2016, 6: 32496.
- [18] WU J, XU S, XIANG C, et al. Tongue coating microbiota community and risk effect on gastric cancer[J]. J Cancer, 2018, 9(21):4039-4048.
- [19] ZHAO Y, MAO Y, TANG Y, et al. Altered oral microbiota in chronic hepatitis B patients with different tongue coatings[J]. World J Gastroenterol, 2018, 24(30): 3448-3461.
- [20] CUI J, CUI H, YANG M, et al. Tongue coating microbiome as a potential biomarker for gastritis including precancerous cascade[J]. Protein Cell, 2019, 10(7):496-509.
- [21] 杨亚平, 吴娟, 佟书娟, 等. 胃癌的中医证型分布规律多因素研究[J]. 时珍国医国药, 2012, 23(10):2565-2567.
- [22] WANG Z, MASCHERA B, LEA S, et al. Airway host-microbiome interactions in chronic obstructive pulmonary disease[J]. Respir Res, 2019, 20(1):113.
- [23] HUGHES BM, BURTON CS, REESE A, et al. Pellino-1 regulates immune responses to *Haemophilus influenzae* in models of inflammatory lung disease[J]. Front Immunol, 2019, 10: 1721.
- [24] MYSAK J, PODZIMEK S, SOMMEROVA P, et al. Porphyromonas gingivalis; major periodontopathic pathogen overview[J]. J Immunol Res, 2014, 2014(1):476068.
- [25] PETERS BA, WU J, PEI Z, et al. Oral microbiome composition reflects prospective risk for esophageal cancers[J]. Cancer Res, 2017, 77(23):6777-6787.
- [26] MICHAUD DS, IZARD J, WILHELM-BENARTZI CS, et al. Plasma antibodies to oral bacteria and risk of pancreatic cancer in a large European prospective cohort study[J]. Gut, 2013, 62(12):1764-1770.
- [27] BELKAID Y, HAND T. Role of the microbiota in immunity and inflammation[J]. Cell, 2014, 157(1):121-141.
- [28] SCHIRMER M, SMEEKENS SP, VLAMAKIS H, et al. Linking the human gut microbiome to inflammatory cytokine production capacity[J]. Cell, 2016, 167(4):1125-1136.
- [29] 徐兴伟, 范朝刚, 李秋荣. 肠道菌群对免疫功能的影响和疾病研究的新进展[J]. 肠外与肠内营养, 2017, 24(2):118-121.
- [30] 王丹, 石岩. 中药复方“益糖康”对“脾虚证”代谢综合征大鼠血清炎症因子影响的实验研究[J]. 免疫学杂志, 2013, 29(6): 549-552.
- [31] 王小红, 崔应麟. 益气健脾活血法在脾虚型慢性萎缩性胃炎患者中的应用效果[J]. 中国老年学杂志, 2017, 37(13):3262-3264.
- [32] NAUGLER WE, KARIN M. The wolf in sheep's clothing: The role of interleukin-6 in immunity, inflammation and cancer[J]. Trends Mol Med, 2008, 14(3):109-119.
- [33] LIU S, ZHOU Y, ZHAO L, et al. IL-6 and miR-1271 expression levels in elderly and young gastric cancer patients and correlation analysis with prognosis[J]. Oncol Lett, 2019, 17(6): 5419-5424.
- [34] ASHIZAWA T, OKADA R, SUZUKI Y, et al. Clinical significance of interleukin-6 (IL-6) in the spread of gastric cancer: role of IL-6 as a prognostic factor[J]. Gastric Cancer, 2005, 8(2):124-131.
- [35] PARK DG, WOO BH, LEE BJ, et al. Serum levels of Interleukin-6 and titers of antibodies against Porphyromonas gingivalis could be potential biomarkers for the diagnosis of oral squamous cell carcinoma[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(11): 2749.
- [36] 邹忠杰, 施旭光, 龚梦鹃, 等. 利血平所致大鼠脾虚证代谢组学研究[J]. 中药新药与临床药理, 2012, 23(3):291-294.
- [37] 赵瑜, 苟小军, 戴建业, 等. 慢性乙型肝炎舌红苔黄和舌淡苔白不同舌象的尿代谢组研究[J]. 世界中医药, 2015, 10(2): 182-185.
- [38] 修凤民, 张凤, 矫健鹏, 等. 胃癌患者血浆 24 种氨基酸代谢物水平变化[J]. 第二军医大学学报, 2018, 39(1):62-66.

(编辑:杨巍敏)