

· 脂肪性肝病 ·

DOI: 10.12449/JCH250511

非酒精性脂肪性肝病合并幽门螺杆菌感染患者肠道菌群特征分析

刘晶晶, 王琦珂, 马志强, 梁燕, 李忍萍

河南科技大学第二附属医院消化内科, 河南 洛阳 471000

通信作者: 李忍萍, 1823131236@qq.com (ORCID: 0009-0005-3109-3013)

摘要: 目的 通过比较健康人群、幽门螺杆菌(HP)感染患者、非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)患者以及HP感染合并NAFLD患者的肠道菌群变化特点,探讨NAFLD合并HP患者肠道菌群特征及作用机制。方法 选取河南科技大学第二附属医院2023年3月1日—2024年4月30日收治的NAFLD患者19例(NAFLD组)、HP感染患者19例(HP组)、NAFLD合并HP感染患者19例(NAFLD合并HP组),另选取健康体检者20例作为对照。留取粪便标本,提取标本的总DNA,进行PCR扩增,通过16S rDNA测序,分析4组人群肠道菌群特征及差异性。计量资料多组间比较采用方差分析,计数资料多组间比较采用 χ^2 检验。菌群物种之间差异性分析采用Mann-Whitney *U*检验或Kruskal-Wallis *H*检验。结果 NAFLD合并HP组与其他3组相比,肠道菌群丰富度有降低趋势。NAFLD合并HP组与NAFLD组相比、NAFLD组与健康对照组相比,菌群分布具有明显差异性(*P*值均 <0.05)。在门水平上,NAFLD合并HP组占前3位的物种分别为厚壁菌门(59.94%)、变形菌门(17.00%)、放线菌门(14.75%),相比于其他3组,变形菌门占比增加,放线菌门占比减少。在属水平上,NAFLD合并HP组的前5位优势菌属分别为 *Bifidobacterium*、*Streptococcus*、*Escherichia-Shigella*、*Agathobacter*、*Ruminococcus gnavus_group*。与NAFLD组相比,NAFLD合并HP组 *Streptococcus*、*Veillonella*、*Rothia* 的丰度升高, *Dialister*、*Ruminococcus toraues_group* 的丰度降低。与HP组相比,NAFLD合并HP组 *Collinsella*、*Subdoligranulum*、*Catenibacterium*、*Porphyromonas* 的丰度降低,而 *Citrobacter*、*Olsenella* 的丰度升高,物种差异性分析均具有统计学意义(*P*值均 <0.05)。结论 NAFLD合并HP感染患者的肠道菌群发生相应变化,这些菌群可能是HP感染促进NAFLD发生、发展的肠道微生态因素。

关键词: 非酒精性脂肪性肝病; 幽门螺杆菌; 胃肠道微生物组**基金项目:** 洛阳市科技计划项目(2022063Y)

Features of intestinal flora in patients with nonalcoholic fatty liver disease and *Helicobacter pylori* infection

LIU Jingjing, WANG Qike, MA Zhiqiang, LIANG Yan, LI Renping

Department of Gastroenterology, The Second Affiliated Hospital of Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471000, China

Corresponding author: LI Renping, 1823131236@qq.com (ORCID: 0009-0005-3109-3013)

Abstract: Objective To investigate the features and mechanism of action of intestinal flora in patients with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) and *Helicobacter pylori* (HP) infection by comparing the changes in intestinal flora between the healthy population, the patients with HP infection, the patients with NAFLD, and the patients with NAFLD and HP infection. **Methods** This study was conducted among the 19 patients with NAFLD (NAFLD group), 19 patients with HP infection (HP group), and 19 patients with NAFLD and HP infection (NAFLD+HP group) who were admitted to The Second Affiliated Hospital of Henan University of Science and Technology from March 1, 2023 to April 30, 2024, and 20 individuals undergoing physical examination were enrolled as control group. Fecal samples were collected, total DNA was extracted for PCR amplification, and 16S rDNA sequencing was performed to compare the features of intestinal flora between the four groups. An analysis of variance was used for comparison of continuous data between multiple groups, and the chi-square test was used for comparison of categorical data between multiple groups. The Mann-Whitney *U* test or the Kruskal-Wallis *H* test was used for comparison of the species in intestinal flora. **Results** The NAFLD+HP

group showed a tendency of reduction in flora abundance compared with the other three groups. There was a significant difference in flora distribution between the NAFLD+HP group and the NAFLD group and between the NAFLD group and the control group ($P < 0.05$). At the phylum level, the top three species in the NAFLD+HP group were Firmicutes (59.94%), Proteobacteria (17.00%), and Actinobacteria (14.75%), with an increase in the proportion of Proteobacteria and a reduction in the proportion of Actinobacteria compared with the other three groups. At the genus level, the top five dominant bacteria in the NAFLD+HP group were *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Escherichia-Shigella*, *Agathobacter*, and *Ruminococcus gnavus_group*. Compared with the NAFLD group, the NAFLD+HP group had increases in the abundance of *Streptococcus*, *Veillonella*, and *Rothia* and reductions in the abundance of *Dialister* and *Ruminococcus toraes_group*. Compared with the HP group, the NAFLD+HP group had reductions in the abundance of *Collinsella*, *Subdoligranulum*, *Catenibacterium*, and *Porphyromonas* and increases in the abundance of *Citrobacter* and *Olsenella* (all $P < 0.05$). **Conclusion** Patients with NAFLD and HP infection have changed in intestinal flora. These flora may be the intestinal microecological factors for HP infection in promoting the development and progression of NAFLD.

Key words: Non-alcoholic Fatty Liver Disease; Helicobacter Pylori; Gastrointestinal Microbiome

Research funding: Luoyang Science and Technology Plan Project (2022063Y)

非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)是指除外酒精和其他明确的致损肝因素后,肝细胞内脂肪过度沉积进而引起一系列症状的临床病理综合征,目前是全球发病率最高的慢性肝病。NAFLD可由简单的脂肪变性发展到脂肪性肝炎、肝硬化,甚至是肝细胞癌,严重影响人类健康。近年来研究表明,肠道菌群在NAFLD的发生、发展中起重要作用,当肠道菌群结构或分布出现异常时,宿主的能量吸收及储存脂肪的平衡被打破,加重机体代谢紊乱程度^[1]。幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, HP)是一种常见的寄居在胃黏膜的革兰阴性螺杆菌,有研究表明,HP感染与代谢综合征、NAFLD等关系密切,HP感染患者的NAFLD发生率明显升高,HP感染可能是NAFLD的独立危险因素^[2-4]。故本研究从肠道微生物的角度入手,结合16S rDNA高通量测序技术研究NAFLD合并HP感染患者的肠道菌群变化,寻求NAFLD合并HP感染患者的风险因素和新型生物标志物,以及HP感染增加NAFLD患者发生、发展的肠道菌群因素,以期NAFLD的综合治疗提供一定的理论依据。

1 资料与方法

1.1 研究对象 选取本院2023年3月1日—2024年4月30日消化内科门诊、住院部的NAFLD合并/不合并HP感染患者、单纯HP感染患者,另选取同期健康体检人群作为对照。纳入标准:(1)年龄18~60岁;(2)NAFLD诊断符合《代谢相关(非酒精性)脂肪性肝病防治指南(2024年版)》^[5]。排除标准:(1)合并其他类型肝病;(2)有胃肠道及肝胆手术史;(3)近3个月内服用抑酸剂、抗生素、胃

黏膜保护剂、微生态制剂、中药等;(4)有严重心、肝、肺疾病或其他恶性疾病;(5)精神障碍;(6)肝硬化。

1.2 标本采集 留取所有纳入研究对象的粪便样品,收集后冻存于中心实验室-80℃冰箱中备用。

1.3 实验方法 取出粪便样品,采用OMEGA Stool DNA Kit试剂盒提取总DNA,测定其浓度和纯度,通过琼脂糖凝胶电泳检测DNA的提取质量,同时采用紫外分光光度计对DNA进行定量,检测合格的DNA用于后续实验。根据16S rDNA序列中的保守区域设计相应引物,以提取好的微生物总DNA为模板,使用Phusion酶进行PCR,扩增35个循环,通过PCR在目标区域扩增产物上添加测序通用接头和样本特异性Barcode序列。PCR扩增产物通过1.5%琼脂糖凝胶电泳进行检测,并对目标片段进行回收。对纯化后的PCR产物使用Agilent 2100生物分析仪(Agilent,美国)和Illumina(Kapa Biosciences, Woburn, MA,美国)的文库定量试剂盒进行评估,合格的文库浓度应在2 nmol/L以上。将合格的上机测序文库(Index序列不可重复)梯度稀释后,根据所需测序量按照相应比例混合,并经NaOH变性为单链进行上机测序;使用NovaSeq 6000测序仪进行2×250 bp的双端测序,相应试剂为NovaSeq 6000 SP Reagent Kit (500 cycles)。

1.4 生物信息学分析 测序得到原始的下机数据,进行拼接、质控、嵌合体过滤,获得高质量的clean data。DADA2 (divisive amplicon denoising algorithm)通过“去重复”(dereplication,相当于以100%相似度聚类)等步骤,进而获得单碱基精度的代表序列。过滤和去噪后获得ASV (amplicon sequence variant)特征序列和ASV丰度表格,进行α多样性分析和β多样性分析。根据ASV序列文

件采用 SILVA 和 NT-16S 数据库进行物种注释,并通过 ASV 丰度表对各层级物种在各样本中的丰度进行统计。使用 KEGG 通路数据库(<https://www.kegg.jp/>)分析预测肠道菌群生物代谢通路。

1.5 统计学方法 应用 R 4.1.3 软件进行统计学分析,主要涉及 Venn Diagram、ggplot2 等程序包。计量资料多组间比较采用方差分析。计数资料多组间比较采用 χ^2 检验。基于得到的物种丰度统计信息,进行各组之间的差异分析,两组间比较采用 Mann-Whitney U 检验,多组间比较采用 Kruskal-Wallis H 检验。在分类水平上,4 组通过线性判别分析(linear discriminant analysis, LDA) > 3.0 且 $P < 0.05$, 得到最终的差异物种。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般资料 共入组 77 例研究对象,其中 NAFLD 组 19 例,NAFLD 合并 HP 组 19 例,HP 组 19 例,健康对照组 20 例。4 组一般资料比较,ALT、BMI 差异均有统计学意义(P 值均 < 0.05)(表 1)。

2.2 物种丰度 图 1 为测序后 16S rDNA 序列长度分布,均为 400~500 bp。图 2 为物种等级曲线图,每条线代表一个样本,不同的颜色代表不同的分组,可以从 4 组样本中获得足够的测序信息。

2.3 各组肠道菌群组成 按照 97% 的相似性,将 4 组的 77 个样本获得有效序列聚类成可操作的物种分类单元(operational taxonomic units, OTUs),共得到 4 927 个 OTUs。绘制 Venn 图,结果显示,健康对照组独有 OTUs 数目最多,HP 组次之,NAFLD 合并 HP 组最少;475 个 OTUs 为 4 组共有,611 个 OTUs 为 NAFLD 合并 HP 组特有(图 3)。

2.4 α 多样性分析 在 α 多样性方面,Chao1 指数结果显示,组间差异无统计学意义($P > 0.05$),但 NAFLD 合并 HP 组的肠道菌群丰富度与其他 3 组相比有下降趋势(图 4)。

2.5 β 多样性分析 通过主成分分析进行肠道菌群 β 多样性分析,结果显示,NAFLD 合并 HP 组与 NAFLD 组

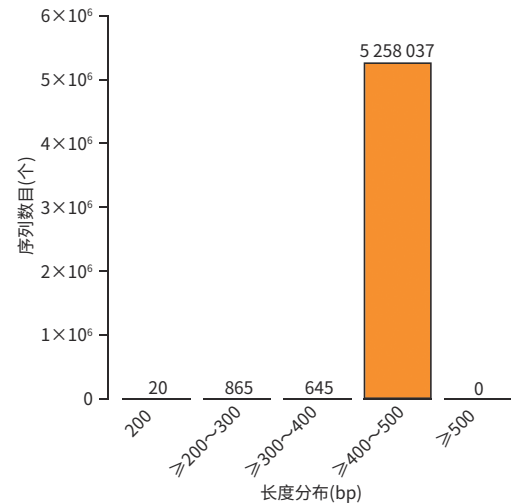


图 1 测序后 16S rDNA 序列长度分布

Figure 1 Length distribution of 16S rDNA sequences after sequencing

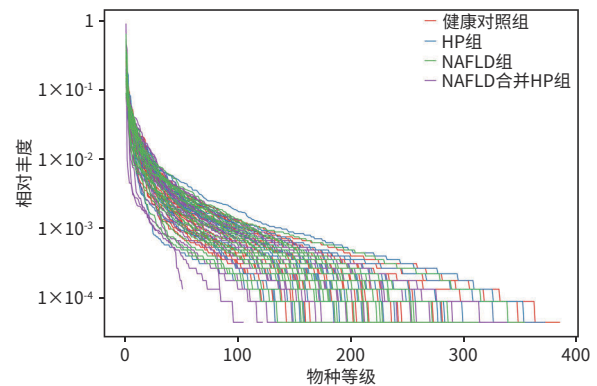


图 2 物种等级曲线图

Figure 2 Species rank curve

相比(图 5)、NAFLD 组与健康对照组相比(图 6),菌群分布均具有明显差异性(P 值均 < 0.05)。

2.6 相似性分析 通过杰卡德相似性分析检验组间差异是否显著大于组内差异,结果如图 7 所示,差异有统计学意义($P = 0.001$),表明分组有意义。

2.7 物种组成分析 根据物种丰度表和物种注释表,选取丰度前 30(有明确分类信息的丰度最高的前 30 个)物种分类,将每个分组的相对丰度进行不同形式的展示。

表 1 4 组研究对象一般情况比较

Table 1 Comparison of the general conditions of the four groups of study subjects

项目	NAFLD 组($n=19$)	NAFLD 合并 HP 组($n=19$)	HP 组($n=19$)	健康对照组($n=20$)	统计值	P 值
男/女(例)	11/8	9/10	10/9	11/9	$\chi^2=0.456$	0.928
年龄(岁)	42.57 \pm 8.12	41.63 \pm 7.86	42.42 \pm 8.28	40.75 \pm 8.72	$F=0.202$	0.895
ALT(U/L)	37.68 \pm 9.92	37.95 \pm 8.34	34.05 \pm 7.34	31.35 \pm 6.07	$F=3.019$	0.035
AST(U/L)	27.16 \pm 7.76	25.74 \pm 7.11	25.74 \pm 6.39	23.85 \pm 8.29	$F=0.652$	0.584
GGT(U/L)	30.42 \pm 7.52	27.90 \pm 6.72	30.16 \pm 6.30	27.70 \pm 6.11	$F=0.904$	0.443
BMI(kg/m^2)	25.56 \pm 1.46	25.63 \pm 1.70	23.44 \pm 1.96	22.79 \pm 1.07	$F=16.564$	< 0.001

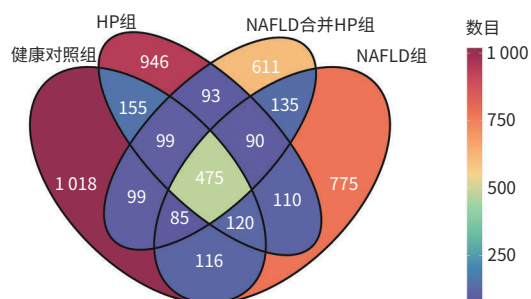


图3 4组样本 Venn 图

Figure 3 Four groups of samples Venn

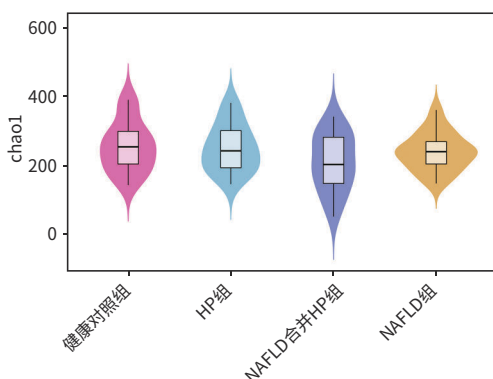
图4 4组样本 α 多样性小提琴图

Figure 4 Alpha diversity violin diagram of four groups

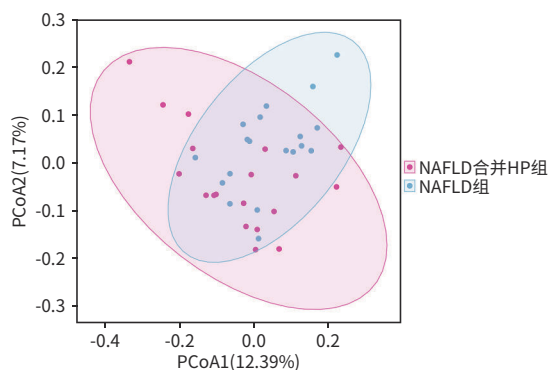
图5 NAFLD合并HP组与NAFLD组 β 多样性

Figure 5 Beta diversity in NAFLD combined with the HP infection group and NAFLD group

如图8所示,在门水平上,4组样本最大丰度均处于前5位的物种分布为 *Firmicutes*、*Actinobacteriota*、*Proteobacteria*、*Bacteroidota*、*Verrucomicrobiota*,其中以厚壁菌门、放线菌门、变形菌门为主。在门水平上,NAFLD合并HP组占前3位的物种分别为厚壁菌门(59.94%)、变形菌门(17.00%)和放线菌门(14.75%),其余3组占前3位的物种顺序依次为厚壁菌门、放线菌门、变形菌门。如图9所示,在属水平上,4组样本占前10位的优势菌群分别为 *Bifidobacterium*、*Escherichia-Shigella*、*Streptococcus*、*Faecalibacterium*、*Agathobacter*、*Collinsella*、*Ruminococcus*

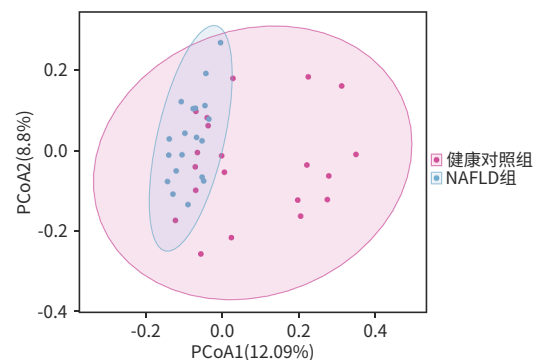
图6 NAFLD组与健康对照组 β 多样性

Figure 6 Beta diversity in NAFLD and control group

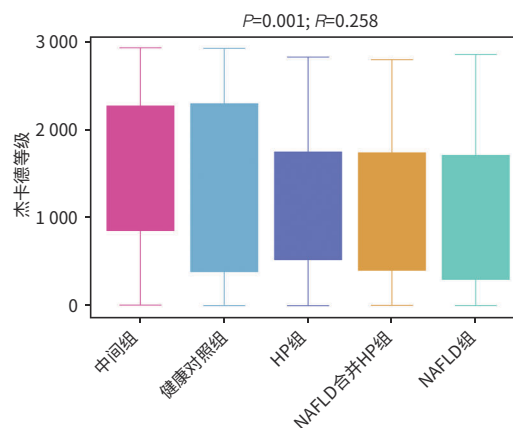


图7 4组相似性分析

Figure 7 ANOSIM of four groups

gnavus_group、*Klebsiella*、*Bacteroides*、*Subdoligranulum*。其中,NAFLD合并HP组前5位优势菌属分别为 *Bifidobacterium*(11.94%)、*Streptococcus*(9.68%)、*Escherichia-Shigella*(9.44%)、*Agathobacter*(6.57%)、*Ruminococcus gnavus_group*(6.21%);NAFLD组前5位优势菌属分别为 *Bifidobacterium*(21.46%)、*Faecalibacterium*(8.36%)、*Klebsiella*(5.37%)、*Escherichia-Shigella*(5.31%)、*Agathobacter*(4.40%);HP组前5位优势菌属分别为 *Bifidobacterium*(14.42%)、*Streptococcus*(9.08%)、*Faecalibacterium*(8.55%)、*Escherichia-Shigella*(6.87%)、*Agathobacter*(6.29%);健康对照组前5位优势菌属分别为 *Bifidobacterium*(22.50%)、*Escherichia-Shigella*(9.16%)、*Streptococcus*(7.76%)、*Faecalibacterium*(5.65%)、*Collinsella*(5.49%)。

2.8 物种差异分析

2.8.1 显著性差异分析 在门水平上,选取4组样本中具有显著性差异($P < 0.05$)的物种丰度前5位以柱状图展示。4组相比,在 *Actinobacteriota* 菌门中,健康对照组该菌的丰度明显大于其余3组,NAFLD合并HP组的丰度最小;在 *Desulfobacterota* 菌门中,HP组的丰度最小(图10)。

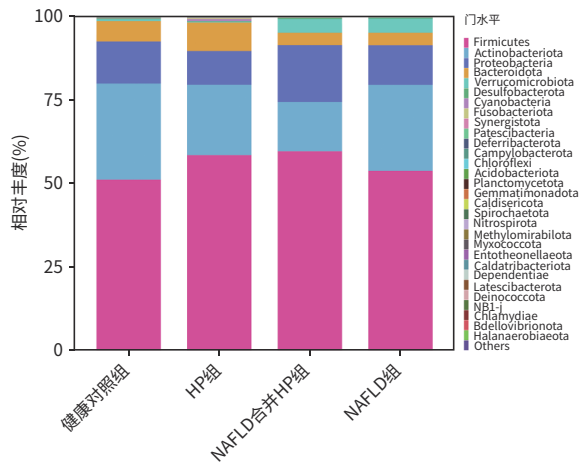


图8 门水平物种相对丰度柱状图

Figure 8 Histogram of relative abundance of species at the phylum level

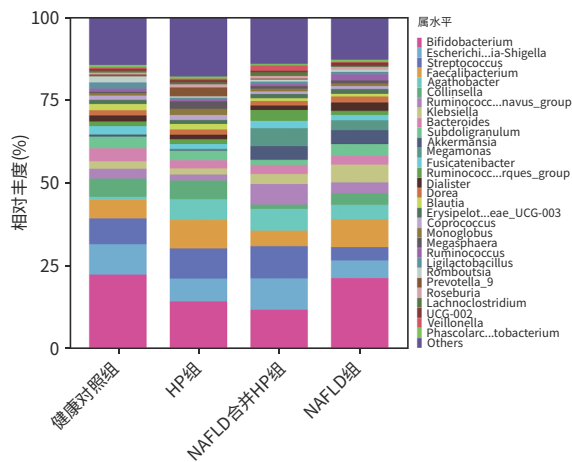


图9 属水平物种相对丰度柱状图

Figure 9 Histogram of relative abundance of species at the genus level

HP组与健康对照组相比,具有显著性差异前5位的物种分别为 *Desulfobacterota*、*Synergistota*、*Campylobacterota*、*Acidobacteriota*、*Deferribacterota*,除 *Campylobacterota* 外,HP组其他4种微生物丰度均小于健康对照组(图11)。NAFLD合并HP组 *Desulfobacterota*、*Deferribacterota* 的丰度均大于HP组(图12)。NAFLD合并HP组 *Campylobacterota* 的丰度明显小于NAFLD组(图13)。NAFLD组与健康对照组相比,除 *Patescibacteria*,其余3种微生物丰度均明显小于健康对照组(图14)。

在属水平上,选取4组样本中具有显著性差异($P < 0.05$)的物种丰度前10位以柱状图展示。4组相比,NAFLD组 *Streptococcus* 丰度最低,余3组基本相当;与健康对照组相比,NAFLD组、HP组和NAFLD合并HP组 *Agathobacter* 的丰度较高;NAFLD合并HP组 *Collinsella*

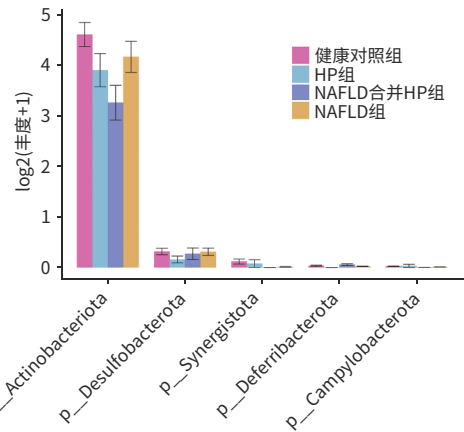


图10 4组间门水平差异

Figure 10 Difference between the four groups at the phylum level

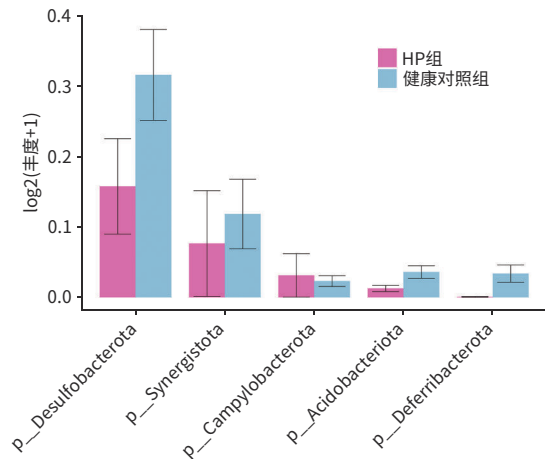


图11 HP组与健康对照组门水平差异

Figure 11 Difference between HP group and control group at phylum level

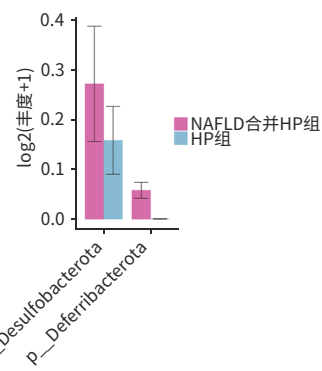


图12 NAFLD合并HP组与HP组门水平差异

Figure 12 Difference between NAFLD combined with the HP infection group and HP group at phylum level

和 *Ruminococcus* 的丰度明显低于其他3组, *Veillonella*、*Citrobacter* 和 *Rothia* 的丰度均高于其他3组;4组样本之间 *Romboutsia*、*Porphyromonas*、*Catenibacterium* 的丰度亦

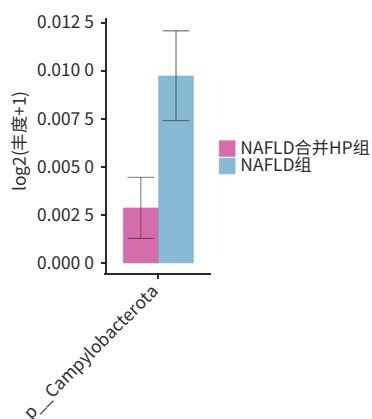


图13 NAFLD合并HP组与NAFLD组门水平差异
Figure 13 Difference between NAFLD combined with the HP infection group and NAFLD group at phylum level

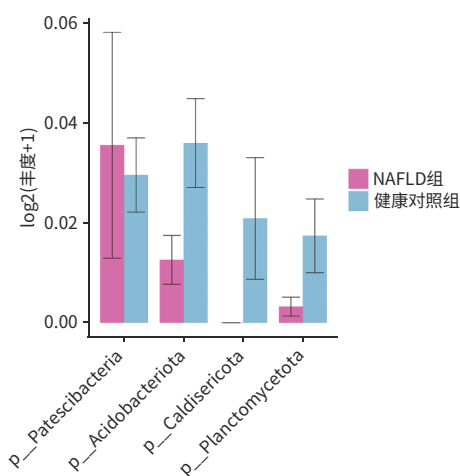


图14 NAFLD组与健康对照组门水平差异
Figure 14 Difference between NAFLD group and control group at phylum level

有不同, 详见图15。HP组 *Agathobacter*、*Prevotella_9*、*Catenibacterium*、*Enterococcus*、*Lachnospiraceae_NK4A136_group* 及 *Peptoclostridium* 的丰度明显高于健康对照组, *Romboutsia*、*UCG-005*、*Raoultella* 和 *Eubacterium_nodatum_group* 的丰度低于健康对照组(图16)。NAFLD合并HP组部分菌群丰度明显低于HP组, 例如 *Collinsella*、*Subdoligranulum*、*Catenibacterium*、*Porphyromonas* 等, 部分菌群丰度高于HP组, 例如 *Citrobacter*、*Olsenella* 等(图17)。NAFLD合并HP组与NAFLD组相比, 菌群丰度亦有明显改变, 例如 *Streptococcus*、*Veillonella*、*Rothia* 等丰度升高, *Dialister*、*Ruminococcus* 等丰度降低(图18)。NAFLD组部分菌群低于健康对照组, 例如 *Streptococcus*、*Trichococcus* 等, 部分菌群丰度高于健康对照组, 例如 *Olsenella*、*Lachnospira*、*Desulfovibrio* 等(图19)。

2.8.2 4组间在丰度上有显著性差异的物种分析 在分

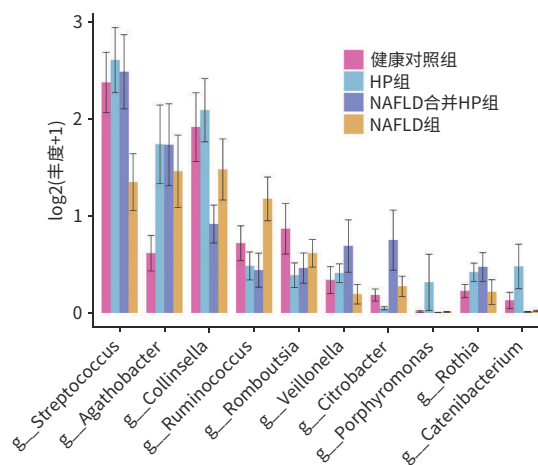


图15 4组间属水平差异
Figure 15 Difference between the four groups at the genus level

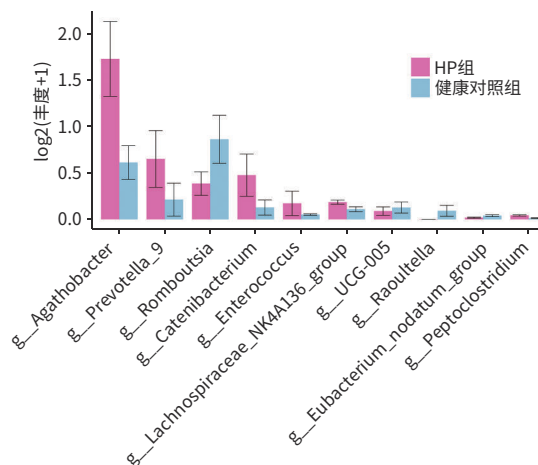


图16 HP组与健康对照组属水平差异
Figure 16 Difference between HP and control group at genus level

类水平上, 从门到种, 4组分别筛选出具有显著差异的5个物种 ($LDA > 3.0$ 且 $P < 0.05$)。健康对照组: *p_Actinobacteriota*、*f_Porphyromonadaceae*、*g_Porphyromonas*、*s_uncultured_Porphyromonas_sp*、*s_Streptococcus_equinus*; HP组: *c_Bacilli*、*g_Agathobacter*、*s_Agathobacter_unclassified*、*f_Streptococcaceae*、*g_Streptococcus*; NAFLD合并HP组: *g_Citrobacter*、*s_Streptococcus_constellatus*、*s_Streptococcus_australis*; NAFLD组: *g_Romboutsia*、*s_Romboutsia_unclassified*、*g_Ruminococcus*、*s_Ruminococcus_unclassified*、*g_UCG-005* (图20, 21)。

2.9 肠道微生物的代谢通路相关分析 KEGG 通路数据库分析生物代谢通路, 预测了显著不同的肠道菌群的通路和代谢过程。结果显示, 4组样本主要富集途径为

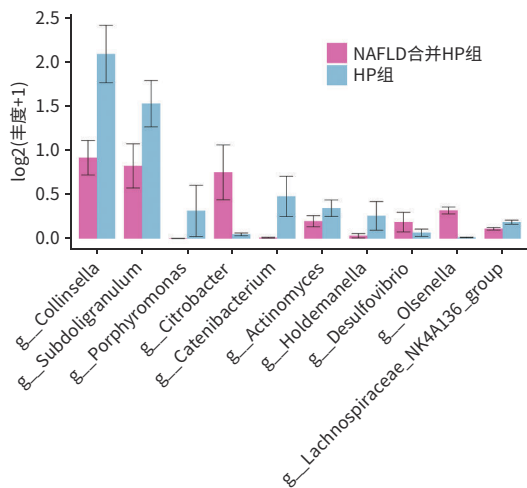


图 17 NAFLD 合并 HP 组与 HP 组属水平差异
Figure 17 Difference between NAFLD combined with the HP infection group and HP group at genus level

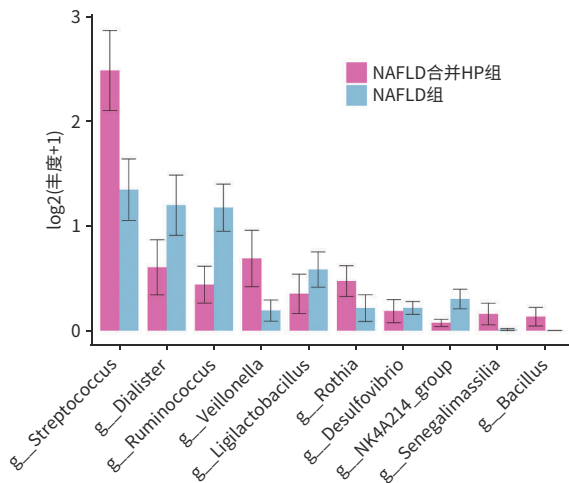


图 18 NAFLD 合并 HP 组与 NAFLD 组属水平差异
Figure 18 Difference between NAFLD combined with the HP infection group and NAFLD group at genus level

肽酶代谢通路、磷脂酰肌醇信号通路、胰岛素信号传导通路和谷氨酸能突触信号通路,其中NAFLD合并HP组肽酶代谢通路、磷脂酰肌醇信号通路和谷氨酸能突触信号通路信号系统减弱,丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶A (PPKA)、磺基乙醛乙酰转移酶(Xsc)、磺基丙二醇3-脱氢酶、锰转运系统结合蛋白(MntC)、K09126蛋白表达明显。详见图22、23。

3 讨论

近年来,NAFLD发病率明显升高,NAFLD的肠道菌群变化成为学术研究热点。一项横断面研究表明,肠道微生物组成的变化与NAFLD严重程度的临床表现存在联

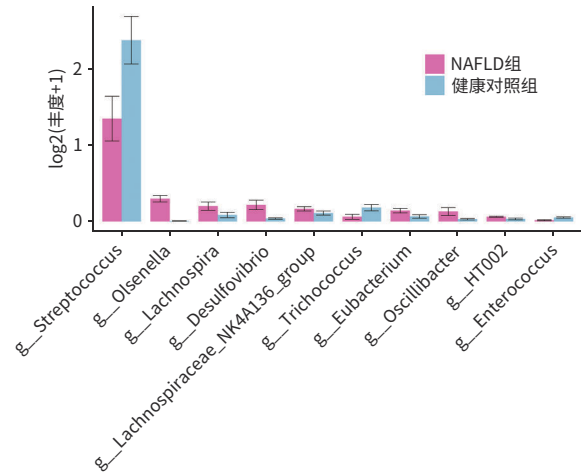
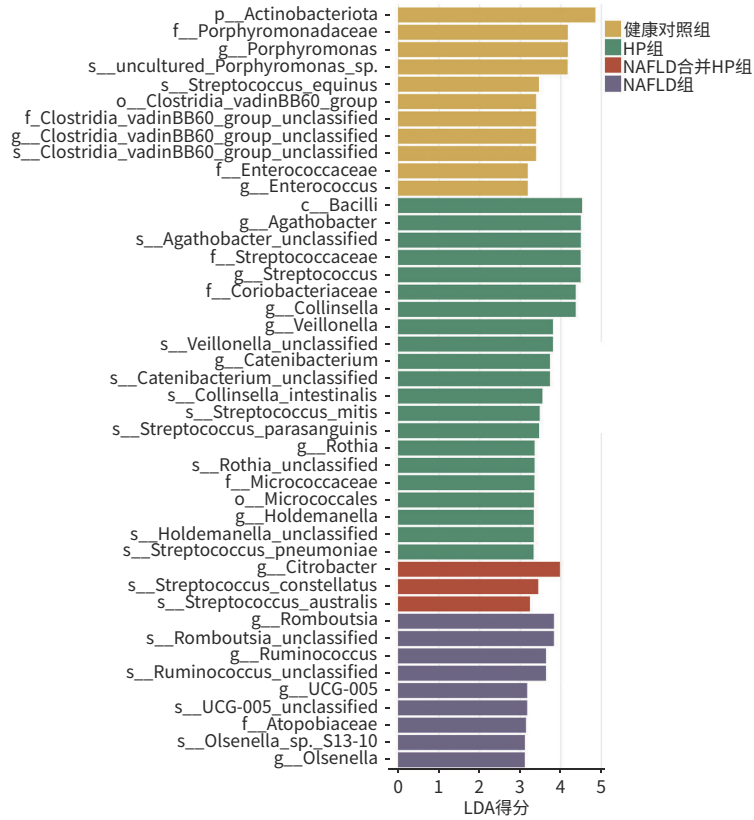


图 19 NAFLD 组与健康对照组属水平差异
Figure 19 Difference between NAFLD group and control group at genus level

系^[6]。Zhang等^[7]的荟萃分析表明,HP感染患者的NAFLD发病率更高,NAFLD患者的HP阳性率更高。Mantovani等^[8]也发现,HP感染与代谢障碍相关性脂肪性肝病发病的风险轻度增加有关。人类胃肠道存在多样化和动态的共生微生物群落,主要由厚壁菌门、拟杆菌门、放线菌门、变形菌门和疣微菌门组成^[9]。胃肠道微生物在疾病条件下的相对改变主要可分为致病性富集、共生耗竭或多样性减少^[10]。

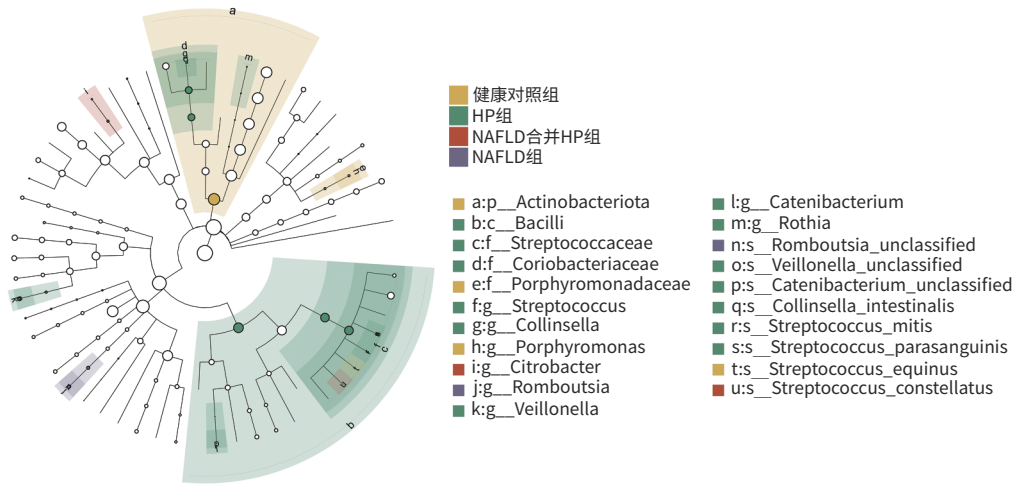
本研究结果表明,在门水平上,NAFLD组占前3位的物种顺序依次为厚壁菌门、放线菌门和变形菌门。属水平上,NAFLD组 *Bifidobacterium*、*Faecalibacterium*、*Klebsiella*、*Escherichia-Shigella*、*Agathobacter* 为优势菌属, *Streptococcus* 丰度最低。这与Boursier等^[11]的研究结果相似,NAFLD患者的肠道微生物在门水平上变形菌门和厚壁菌门的数量增加,拟杆菌门的存在减少。本研究发现,NAFLD合并HP组与其他3组肠道菌群相比,菌群丰富度有下降趋势;NAFLD合并HP组与NAFLD组相比、NAFLD组与健康对照组相比,菌群分布均具有明显差异性。HP感染可以改变胃肠道内的细菌多样性和丰度^[12],这与本研究结果一致。在门水平上,NAFLD合并HP组占前3位的物种分别为厚壁菌门(59.94%)、变形菌门(17.00%)、放线菌门(14.75%),与其他3组相比,变形菌门占比明显增加, *Actinobacteriota* 的丰度最小。Gao等^[13]报道了HP感染可引起粪便微生物群的变化,主要是拟杆菌门、厚壁菌门和变形菌门的比例变化。HP感染患者肠道菌群在门水平上,厚壁菌门、变形菌门、放线菌门和酸杆菌门升高,而拟杆菌门减少^[14]。综上所述,HP感染时变形菌门增加,这可能与NAFLD的发生有关。



注:主要展示 LDA score 大于预设值的显著差异物种,预设值为 LDA>3.0 且 P<0.05。

图 20 标记物种的 LDA 效应值直方图

Figure 20 Histogram of LDA effect values for labeled species



注:不同圆圈层从内至外辐射分别代表界、门、纲、目、科、属、种7个分类级别,节点颜色为黄色则表示该物种在比较组中有显著性差异。

图 21 组间差异的分类层次结构树

Figure 21 Taxonomic hierarchical tree of differences between groups

本研究发现,在属水平上,NAFLD 合并 HP 组 *Bifidobacterium*、*Collinsella* 丰度相比健康对照组减少, *Streptococcus*、*Ruminococcus gnavus_group* 增加。与健康对照组相比,NAFLD 组与 HP 组肠道的 *Bifidobacterium* 丰度亦有下降,但 NAFLD 合并 HP 组的下降比例最大。从中

可以看出,HP 感染是引起 NAFLD 或健康人群中肠道 *Bifidobacterium* 明显减少的主要因素。既往有研究表明,在 HP 根除治疗后, *Enterococcus* 的数量减少,而 *Bifidobacterium* 和 *Bacteroides* 属的数量增加,这可能与 HP 竞争性地抑制某些特定的微生物群(如乳酸杆菌和双歧

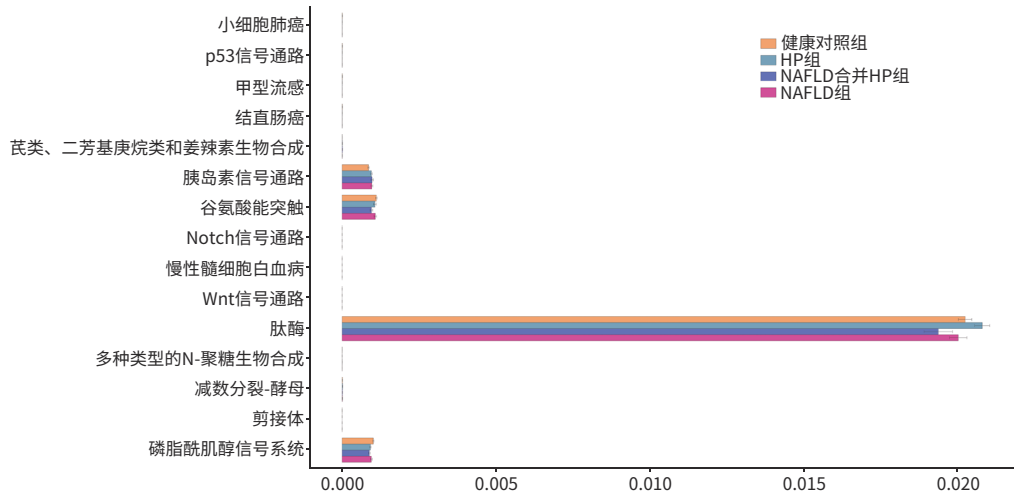


图22 4组间代谢通路相关分析

Figure 22 Metabolic pathway correlation analysis between four groups

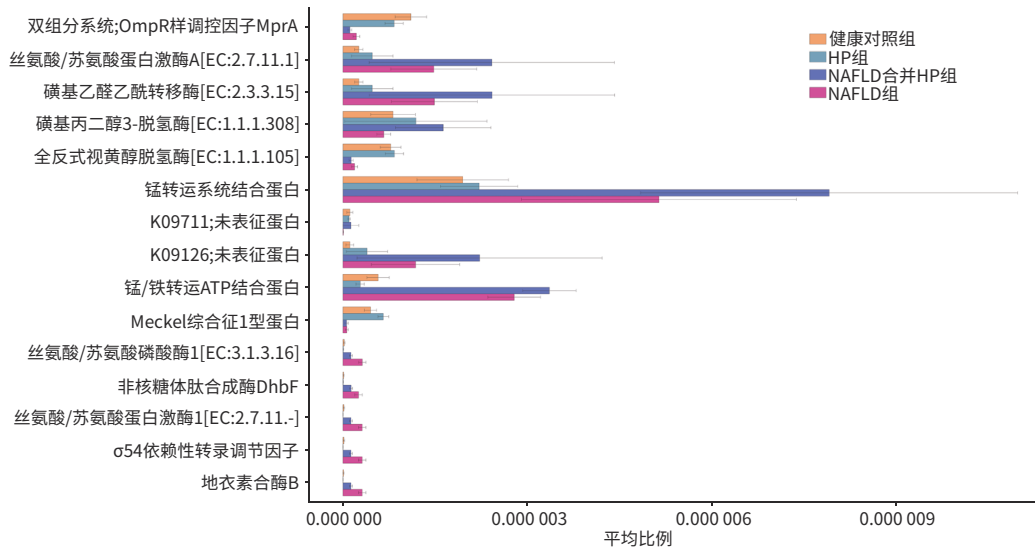


图23 KEGG直系同源基因图

Figure 23 KEGG immediate homologous gene map

杆菌)有关^[15-17]。一项随机、双盲、安慰剂对照研究发现,益生菌 *Bifidobacterium* 的增加可改善肠道功能,并有效改善 NAFLD,其作用机制可归因于产生短链脂肪酸 (short-chain fatty acids, SCFA) 的能力,而 SCFA 可抑制肝脏胆固醇和脂肪生成,同时激活肝脏脂质氧化^[18-19]。SCFA 是肠道厌氧微生物群发酵膳食纤维的主要代谢产物,包括乙酸盐、丙酸盐及丁酸盐等,其已被证明对人类的能量代谢产生有益影响。肠道中微生物群产生的 SCFA 可在肝、门静脉和外周血中找到,这些 SCFA 影响各种组织中的脂质、葡萄糖和胆固醇代谢^[20-21]。结合本研究结果,笔者推测 NAFLD 合并 HP 患者 *Bifidobacterium* 降低致使 SCFA 生成减少,进而引起肝脏胆固醇与脂肪堆积来促进 NAFLD 的进一步发展。本研究结果显示,

与 NAFLD 组相比,NAFLD 合并 HP 组 *Bifidobacterium*、*Faecalibacterium* 明显减少, *Escherichia-Shigella*、*Streptococcus*、*Ruminococcus gnavus_group* 明显增加。以上菌属的增加或减少,表明 NAFLD 合并 HP 患者肠道菌群比例失调更为明显。有研究发现,在 NAFLD 患者肠道中 *Streptococcus* 有所增加^[22],但是本研究中 NAFLD 组该菌丰度降低,可能是样本量的局限性所致,未来需大样本量进一步研究明确。本研究发现 NAFLD 合并 HP 组 *Escherichia-Shigella* 和 *Streptococcus* 丰度较高,提示肠道 *Escherichia-Shigella*、*Streptococcus* 与 NAFLD 和 HP 两种疾病关系密切,这两种菌属可能通过产生肠道炎症因子参与 NAFLD 的代谢。*Ruminococcus gnavus_group* 是肠道的严格厌氧菌,其在 NAFLD 合并 HP 组中亦明显增加。Crost 等^[23] 研究发现

Ruminococcus gnavus_group 增加与 NAFLD 发展呈正相关,在肠-肝轴中起重要作用。综上,本研究发 现,HP 感染合并 NAFLD 患者肠道菌群发生相应改变,这些改变可能是 HP 感染促进 NAFLD 严重肝病事件发生的肠道微生态因素。另外,肠道微生物群的预测功能特征显示,NAFLD 合并 HP 组肽酶代谢通路、磷脂酰肌醇信号通路和谷氨酸能突触信号通路信号系统减弱,可能与 MntC、PPKA、Xsc、K09126 等蛋白表达增多有关。菌群与以上信号传导通路及蛋白之间的调控仍需进一步探索。

伦理学声明: 本研究方案于 2023 年 9 月 27 日经由河南科技大学第二附属医院伦理委员会审批,批号:L2023006。

利益冲突声明: 本文不存在任何利益冲突。

作者贡献声明: 刘晶晶、王琦珂负责论文撰写,数据分析,表格制作;马志强负责拟定写作思路,研究过程的实施;梁燕负责数据收集;李忍萍负责论文修改。

参考文献:

- [1] FANG J, YU CH, LI XJ, et al. Gut dysbiosis in nonalcoholic fatty liver disease: Pathogenesis, diagnosis, and therapeutic implications[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2022, 12: 997018. DOI: 10.3389/fcimb.2022.997018.
- [2] ZHANG YB, GUO GY, ZHENG CH, et al. Research progress in association between *Helicobacter pylori* and metabolic syndrome and its effect on occurrence and development of metabolic syndrome[J]. *J Jilin Univ (Med Edit)*, 2024, 50(6): 1757-1762. DOI: 10.13481/j.1671-587X.20240631.
- [3] 张艳彬, 郭光业, 郑彩华, 等. 幽门螺杆菌与代谢综合征关联性及其对代谢综合征发生发展影响的研究进展[J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2024, 50(6): 1757-1762. DOI: 10.13481/j.1671-587X.20240631.
- [4] ABO-AMER YE, SABAL A, AHMED R, et al. Relationship between *Helicobacter pylori* infection and nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) in a developing country: A cross-sectional study[J]. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 2020, 13: 619-625. DOI: 10.2147/DMSO.S237866.
- [5] OKUSHIN K, TSUTSUMI T, IKEUCHI K, et al. *Helicobacter pylori* infection and liver diseases: Epidemiology and insights into pathogenesis[J]. *World J Gastroenterol*, 2018, 24(32): 3617-3625. DOI: 10.3748/wjg.v24.i32.3617.
- [6] Chinese Society of Hepatology, Chinese Medical Association. Guidelines for the prevention and treatment of metabolic dysfunction-associated (non-alcoholic) fatty liver disease (Version 2024) [J]. *J Prac Hepatol*, 2024, 27(4): 494-510. 中华医学会肝病学会. 代谢相关(非酒精性)脂肪性肝病防治指南(2024年版)[J]. *实用肝脏病杂志*, 2024, 27(4): 494-510.
- [7] KONING M, HERREMA H, NIEUWDORP M, et al. Targeting nonalcoholic fatty liver disease via gut microbiome-centered therapies[J]. *Gut Microbes*, 2023, 15(1): 2226922. DOI: 10.1080/19490976.2023.2226922.
- [8] ZHANG DY, WANG Q, BAI FH. Bidirectional relationship between *Helicobacter pylori* infection and nonalcoholic fatty liver disease: Insights from a comprehensive meta-analysis[J]. *Front Nutr*, 2024, 11: 1410543. DOI: 10.3389/fnut.2024.1410543.
- [9] MANTOVANI A, LANDO MG, BORELLA N, et al. Relationship between *Helicobacter pylori* infection and risk of metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease: An updated meta-analysis[J]. *Liver Int*, 2024, 44(7): 1513-1525. DOI: 10.1111/liv.15925.
- [10] THURSBY E, JUGE N. Introduction to the human gut microbiota[J]. *Biochem J*, 2017, 474(11): 1823-1836. DOI: 10.1042/BCJ20160510.
- [11] LEVY M, KOLODZIEJCZYK AA, THAISS CA, et al. Dysbiosis and the immune system[J]. *Nat Rev Immunol*, 2017, 17(4): 219-232. DOI: 10.1038/nri.2017.7.
- [12] BOURSIER J, MUELLER O, BARRET M, et al. The severity of non-alcoholic fatty liver disease is associated with gut dysbiosis and shift in the metabolic function of the gut microbiota[J]. *Hepatology*, 2016, 63(3): 764-775. DOI: 10.1002/hep.28356.
- [13] MAVILIA-SCRANTON MG, WU GY, DHARAN M. Impact of *Helicobacter pylori* infection on the pathogenesis and management of non-alcoholic fatty liver disease[J]. *J Clin Transl Hepatol*, 2023, 11(3): 670-674. DOI: 10.14218/JCTH.2022.00362.
- [14] GAO JJ, ZHANG Y, GERHARD M, et al. Association between gut microbiota and *Helicobacter pylori*-related gastric lesions in a high-risk population of gastric cancer[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2018, 8: 202. DOI: 10.3389/fcimb.2018.00202.
- [15] NABAVI-RAD A, SADEGHI A, ASADZADEH AGHDAEI H, et al. The double-edged sword of probiotic supplementation on gut microbiota structure in *Helicobacter pylori* management[J]. *Gut Microbes*, 2022, 14(1): 2108655. DOI: 10.1080/19490976.2022.2108655.
- [16] DU LJ, CHEN BR, CHENG FL, et al. Effects of *Helicobacter pylori* therapy on gut microbiota: A systematic review and meta-analysis [J]. *Dig Dis*, 2024, 42(1): 102-112. DOI: 10.1159/000527047.
- [17] WANG YH, HUANG Y. Effect of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* supplementation to standard triple therapy on *Helicobacter pylori* eradication and dynamic changes in intestinal flora[J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2014, 30(3): 847-853. DOI: 10.1007/s11274-013-1490-2.
- [18] WEISS G, FORSTER S, IRVING A, et al. *Helicobacter pylori* VacA suppresses *Lactobacillus acidophilus*-induced interferon beta signaling in macrophages via alterations in the endocytic pathway[J]. *mBio*, 2013, 4(3): e00609-12. DOI: 10.1128/mBio.00609-12.
- [19] AHN SB, JUN DW, KANG BK, et al. Randomized, double-blind, placebo-controlled study of a multispecies probiotic mixture in non-alcoholic fatty liver disease[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 5688. DOI: 10.1038/s41598-019-42059-3.
- [20] den BESTEN G, van EUNEN K, GROEN AK, et al. The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism[J]. *J Lipid Res*, 2013, 54(9): 2325-2340. DOI: 10.1194/jlr.R036012.
- [21] YOON SJ, YU JS, MIN BH, et al. *Bifidobacterium*-derived short-chain fatty acids and indole compounds attenuate nonalcoholic fatty liver disease by modulating gut-liver axis[J]. *Front Microbiol*, 2023, 14: 1129904. DOI: 10.3389/fmicb.2023.1129904.
- [22] BLAAK EE, CANFORA EE, THEIS S, et al. Short chain fatty acids in human gut and metabolic health[J]. *Benef Microbes*, 2020, 11(5): 411-455. DOI: 10.3920/BM2020.0057.
- [23] MBAYE B, MAGDY WASFY R, BORENTAIN P, et al. Increased fecal ethanol and enriched ethanol-producing gut bacteria *Limosilactobacillus fermentum*, *Enterocloster bolteae*, *Mediterraneibacter gnavus* and *Streptococcus mutans* in nonalcoholic steatohepatitis[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2023, 13: 1279354. DOI: 10.3389/fcimb.2023.1279354.
- [24] CROST EH, COLETTI E, BELL A, et al. *Ruminococcus gnavus*: Friend or foe for human health[J]. *FEMS Microbiol Rev*, 2023, 47(2): fuad014. DOI: 10.1093/femsre/fuad014.

收稿日期: 2024-10-10; 录用日期: 2024-10-29

本文编辑: 葛俊

引证本文: LIU JJ, WANG QK, MA ZQ, et al. Features of intestinal flora in patients with nonalcoholic fatty liver disease and *Helicobacter pylori* infection[J]. *J Clin Hepatol*, 2025, 41(5): 862-871.

刘晶晶, 王琦珂, 马志强, 等. 非酒精性脂肪性肝病合并幽门螺杆菌感染患者肠道菌群特征分析[J]. *临床肝胆病杂志*, 2025, 41(5): 862-871.