

· 胆道疾病 ·

DOI: 10.12449/JCH250923

十二指肠乳头旁憩室对原发性胆总管结石患者胆汁微生物生态的影响

王梦莹^{1,2}, 侯洪涛², 桑伟^{2,3}

1 河北北方学院研究生学院, 河北 张家口 075000

2 河北省人民医院消化内科, 石家庄 050051

3 河北医科大学研究生院, 石家庄 050017

通信作者: 侯洪涛, llvzi@126.com (ORCID: 0000-0003-1339-3205)

摘要: **目的** 探讨合并十二指肠乳头旁憩室(JPDD)的胆总管结石(CBD)及单纯胆总管结石患者的胆汁微生物特点。**方法** 前瞻性纳入2024年1月—5月河北省人民医院消化内科收治的CBD患者30例,根据是否合并JPDD分为JPDD组($n=15$)和CBD组($n=15$)。在内镜逆行胆胰管造影术中收集胆汁,行16S rRNA微生物测序分析,比较两组微生物组成、多样性及代谢通路差异。符合正态分布的计量资料两组间比较采用成组 t 检验,非正态分布的计量资料两组间比较采用Mann-Whitney U 秩和检验。计数资料两组间比较采用 χ^2 检验或Fisher精确检验法。临床指标与微生物物种丰度间的相关性采用Pearson相关分析或Spearman秩相关分析。**结果** JPDD组结石最大直径[(10.87±3.42) mm vs (6.80±2.08) mm, $t=3.94$, $P<0.01$]和胆总管直径[(14.73±3.95) mm vs (9.67±2.64) mm, $t=4.13$, $P<0.01$]均大于CBD组。胆汁微生物分析发现,两组最常见的菌门均为变形菌门、拟杆菌门、厚壁菌门、放线菌门,JPDD组中变形菌门占主导地位。在属和种水平,JPDD组大肠埃希氏-志贺氏菌属、肠球菌属、大肠杆菌相对丰度更高。两组Alpha多样性相似,Beta多样性差异明显(Adonis 检验, $P<0.05$)。LEfSe分析发现,两组存在25个差异菌种(LDA>2),JPDD组肠杆菌属、肠球菌科、克雷伯菌属等7个菌群富集;消化球菌科、罗斯拜瑞氏菌属、别样杆菌属等18个菌群在CBD组中富集明显($P<0.05$)。相关性分析发现,JPDD组显著富集的肠球菌科、肠球菌属与胆总管直径及结石最大直径呈正相关(P 值均<0.01);而表达下降的消化球菌科、不动杆菌属、别样杆菌属等与胆总管直径及结石最大直径呈负相关(P 值均<0.05)。胆汁微生物代谢富集通路发现,两组在细胞生长和死亡、运输和分解、神经系统,以及缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的生物合成,组氨酸代谢等10条代谢通路有统计学差异(P 值均<0.05)。**结论** JPDD的存在会导致胆汁微生物群发生改变(如肠球菌属升高、罗斯拜瑞氏菌属下降),特定菌群及其代谢可能促进CBD的形成。

关键词: 十二指肠乳头旁憩室; 胆总管结石病; 微生物群; 高通量核苷酸序列分析**基金项目:** 河北省政府资助医学人才项目(ZF2023188)

Influence of juxtapapillary duodenal diverticula on bile microecology in patients with primary common bile duct stones

WANG Mengying^{1,2}, HOU Hongtao², SANG Wei^{2,3}

1. Graduate School of Hebei North University, Zhangjiakou, Hebei 075000, China; 2. Department of Gastroenterology, Hebei General Hospital, Shijiazhuang 050051, China; 3. Graduate School of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China

Corresponding author: HOU Hongtao, llvzi@126.com (ORCID: 0000-0003-1339-3205)

Abstract: Objective To investigate the microbiological characteristics of bile in patients with common bile duct stones alone or comorbid with juxtapapillary duodenal diverticula (JPDD). **Methods** A prospective study was conducted among 30 patients with common bile duct stones who were admitted to Department of Gastroenterology, Hebei General Hospital, from January to May 2024, and according to the presence or absence of JPDD, they were divided into JPDD group and simple common bile duct stones group (CBD group), with 15 patients in each group. Bile samples were collected during endoscopic retrograde cholangiopancreatography, and 16S rRNA microbial sequencing was performed to compare the differences in microbial composition, diversity, and metabolic pathways

between the two groups. The independent-samples *t* test was used for comparison of normally distributed continuous data between two groups, and the Mann-Whitney *U* rank sum test was used for comparison of non-normally distributed continuous data between two groups; the chi-square test or the Fisher's exact test was used for comparison of categorical data between two groups. Pearson correlation analysis or Spearman correlation analysis was used to analyze the correlation between clinical indicators and microbial species abundance.

Results Clinical data showed that compared with the CBD group, the JPDD group had significantly greater maximum diameter of stones (10.87 ± 3.42 mm vs 6.80 ± 2.08 mm, $t=3.94$, $P<0.01$) and common bile duct diameter (14.73 ± 3.95 mm vs 9.67 ± 2.64 mm, $t=4.13$, $P<0.01$). The microbiological analysis of the bile showed that Proteobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, and Actinobacteria were the most common phyla in both groups, and Proteobacteria was the dominate phylum in the JPDD group. At the genus and species levels, the JPDD group had higher relative abundances of *Escherichia-Shigella*, *Enterococcus*, and *Escherichia coli*. Alpha diversity was similar between the two groups, and there was a significant difference in beta diversity between the two groups (Adonis test, $P<0.05$). The LEfSe analysis identified 25 differentially expressed species (LDA>2) between the two groups, and the JPDD group had enrichment of 7 flora such as *Enterobacter*, *Enterococcaceae*, and *Klebsiella*, while the CBD group had significant enrichment of 18 flora such as *Peptococcaceae*, *Roseburia*, and *Alistipes* ($P<0.05$). The correlation analysis showed that *Enterococcaceae* and *Enterococcus* significantly enriched in the JPDD group were positively correlated with the diameter of the common bile duct and the maximum diameter of stones ($P<0.01$), whereas *Peptococcaceae*, *Acinetobacter*, and *Alistipes* with reductions in expression were negatively correlated with the diameter of the common bile duct and the maximum diameter of stones ($P<0.05$). The enrichment analysis of biliary microbial metabolic pathways showed that there were significant differences between the two groups in 10 metabolic pathways such as cell growth and death, transportation and decomposition, nervous system, biosynthesis of valine, leucine, and isoleucine, and histidine metabolism ($P<0.05$).

Conclusion The presence of JPDD may lead to alterations in bile microbiota, such as an increase in *Enterococcus* and a reduction in *Roseburia*, and specific flora and metabolism can promote the formation of common bile duct stones.

Key words: Juxtapapillary Duodenal Diverticula; Cholelithiasis; Microbiota; High-Throughput Nucleotide Sequencing

Research funding: The 2023 Hebei Provincial Government Funded Medical Talent Project (ZF2023188)

胆总管结石(common bile duct stone, CBD)是消化系统常见疾病,其中原发性CBD是指在胆管内形成的结石,其成分以胆红素为主^[1-2],亚洲地区高发,确切病因及总体患病率尚不清楚。目前研究显示,CBD的形成可能与细菌感染、胆汁淤积密切相关,尤其是产 β -葡萄糖醛酸酶的细菌。该酶可水解胆红素,生成不溶性游离胆红素,进而促进结石形成^[3-4]。

十二指肠乳头旁憩室(juxtapapillary duodenal diverticula, JPDD)是位于十二指肠乳头开口以及壶腹周围2~3 cm处的肠壁薄弱区域,随年龄的增长发病率增高^[5]。根据内镜下十二指肠乳头与憩室的位置分为I型(乳头位于憩室内)、II型(乳头位于憩室边缘)和III型(乳头位于憩室外)^[6]。JPDD可能通过压迫胆总管、影响Oddi括约肌功能等导致胆汁排除不畅及细菌感染来促进CBD的形成。

在临床工作中,笔者发现许多高龄CBD患者合并JPDD。为探讨憩室与结石形成的相关性及其作用机制,本研究应用16S rRNA基因测序技术分析胆汁微生物特征,以阐明JPDD对原发性CBD形成的影响。

1 资料与方法

1.1 研究对象

本研究采用前瞻性研究方法,选取2024年1月—5月在河北省人民医院消化内科首次诊断为CBD的患者作为研究对象,拟行内镜逆行胆胰管造影(ERCP)治疗。

1.1.1 纳入标准及定义 通过临床症状,结合超声、CT、磁共振胰胆管成像等影像学检查及内镜检查确诊为原发性CBD。

目前原发性CBD尚缺乏明确定义。既往研究将其定义为:胆囊切除术后(未行胆总管探查)超过6个月在胆总管内新发的结石,且术前影像学检查未见胆囊结石。本研究参考前人研究方法,根据结石的颜色、质地、形态特征,结合影像学表现和临床经验综合判断是否为原发性CBD^[5]。插管成功:不超过3次尝试后成功插管,均无乳头预切开或进入胰管或植入胰管支架等。插管困难:超过3次尝试后才成功插管,有乳头预切开或进入胰管或植入胰管支架等。

1.1.2 排除标准 (1)经影像学确认明显胆总管非结石性狭窄、胆道肿瘤患者;(2)继发于胆囊结石(如结石形

态、位置特征符合原发性形成);(3)既往行内窥镜括约肌切开术的复发性CBD患者;(4)合并严重感染性休克,严重心、肺、脑血管疾病不能配合及耐受ERCP手术的患者;(5)合并其他恶性肿瘤患者。

1.2 研究内容 收集患者性别、年龄、BMI;既往病史,包括胆囊切除术、高血压、冠心病等慢性病史;术前化验,包括炎症指标、胆红素、转氨酶等。术前依据2018年东京急性胆管炎和胆囊炎管理指南^[7]评估患者胆管炎分级。ERCP过程中记录是否存在憩室,评估是否存在插管困难,并记录胆总管扩张直径、CBD最大直径。

1.3 标本收集及处理 应用十二指肠镜(奥林巴斯,TJF-290V,日本)收集患者的胆汁。十二指肠镜到达十二指肠部,应用20 mL无菌生理盐水冲洗镜头前端、活检孔、十二指肠乳头及周围,应用导丝成功插入胆管,在注入造影剂之前,用20 mL注射器抽取5 mL胆汁,迅速于无菌操作台置入冻存管内,-80 °C冰箱冻存。

运用QIIME2软件对胆汁微生物菌群的Alpha多样性与Beta多样性进行全面分析,评估手段包括Chao1指数与Shannon指数,揭示样本间的群落结构与多样性特征。Chao1指数用于估计群落中实际的物种数量,Shannon指数反映物种丰度和分布均匀度水平,物种多样性越高,物种分布越均匀,Shannon指数也就越大。利用R语言计算binary_jaccard距离矩阵以量化多样性,结合主坐标分析(principal coordinate analysis,PCoA)技术,对不同物种间的多样性差异进行综合评估。应用Adonis检验(binary_jaccard距离矩阵)来判定所观察到的多样性差异是否具有统计学差异。采用差异微生物分析(Linear discriminant analysis coupled with effect size measurement,LEfSe)方法分析两组样本间的差异微生物群。微生物KEGG通路富集分析应用PICRUST2软件预测已知微生物基因功能的构成。

1.4 统计学方法 应用SPSS 27.0软件进行统计学分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间比较采用成组 t 检验;非正态分布的计量资料以 $M(P_{25} \sim P_{75})$ 表示,两组间比较采用Mann-Whitney U 秩和检验。计数资料两组间比较采用 χ^2 检验或Fisher精确检验法。临床指标与微生物物种丰度之间的相关性采用Pearson相关分析(正态分布的数据)或Spearman秩相关分析(非正态分布的数据)。Wilcoxon检验比较两组间微生物差异。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般资料 最终共纳入30例原发性CBD患者,其

中合并JPDD的患者15例(JPDD组),单纯CBD患者15例(CBD组)。30例患者中男女比例为7:8。JPDD组的胆总管直径、结石最大直径、WBC、胆碱酯酶(ChE)显著高于CBD组(P 值均 < 0.05)(表1)。

2.2 胆汁微生物整体分布

共纳入30例样本,测序得到的原始数据Raw reads数据量分布在78 079 ~ 81 999,经过质控之后的Clean tags数据量在68 867 ~ 76 025,应用QIIME2软件去除嵌合体之后得到数据量分布在63 586 ~ 75 167,各个样本的扩增子序列变异个数分布在29 ~ 270。

2.2.1 两组患者胆汁微生物在门水平分布情况 JPDD组及CBD组常见的4种菌门相对丰度分别为:变形菌门(*Proteobacteria*),40.25% vs 31.83%;拟杆菌门(*Bacteroidota*),29.55% vs 38.21%;厚壁菌门(*Firmicutes*),25.12% vs 25.25%;放线菌门(*Actinobacteriota*),2.86% vs 2.69%。两组物种丰度在门水平分布相似,JPDD组以*Proteobacteria*占主导地位,CBD组以*Bacteroidota*占主导地位(图2)。

2.2.2 两组患者胆汁微生物在属水平分布情况 JPDD组中常见的4种菌属相对丰度分别为:大肠埃希氏-志贺氏菌属(*Escherichia shigella*),31.17%;鼠杆菌属(*Muribaculaceae.sp*),17.47%;拟杆菌属(*Bacteroides.sp*),6.27%;肠球菌属(*Enterococcus.sp*),4.57%。CBD组常见菌属相对丰度分别为:*Muribaculaceae.sp*,21.02%;*Escherichia shigella*,17.07%;*Bacteroides.sp*,9.88%;毛螺菌属(*Lachnospiraceae_NK4A136_group*),5.15%。与CBD组相比,JPDD组患者的*Escherichia shigella*、*Enterococcus.sp*相对丰度较高(图2)。

2.2.3 两组患者胆汁微生物在种水平分布情况 由于测序技术限制,检测种水平菌落有限,结果个体性显著。结果显示,JPDD组中的常见菌有:大肠杆菌(*Escherichia_coli_g_Escherichia shigella*,28.45%)、耐久肠球菌(*Enterococcus_durans_g_Enterococcus*,3.61%)、阴道阿托波菌(*Atopobium_vaginae_g_Atopobium*,1.80%)、克雷伯菌(*Klebsiella_pneumoniae_g_Klebsiella*,1.79%)等。CBD组中常见菌为*Escherichia_coli_g_Escherichia shigella*(12.48%)、海藻希瓦菌(*Shewanella_algae_g_Shewanella*,4.82%)、*Atopobium_vaginae_g_Atopobium*(2.18%)、普通拟杆菌(*Bacteroides_vulgatus_g_Bacteroides*,1.91%)等。本研究还发现,部分菌种如弗氏志贺菌(*Shigella_flexneri_g_Escherichia shigella*,1.42%)仅在JPDD组中出现,群落丰度占比差异明显可能与检测技术水平限制及样本量少有关。

2.3 胆汁微生物Alpha多样性分析 Alpha多样性分析反映物种的多样性程度。两组在Chao1指数、Shannon指数中没有明显差异(P 值均 > 0.05),说明两组在物种总数及物种均匀度方面相似(图3)。

表1 患者一般临床资料分析
Table 1 Analysis of general clinical data of patients

指标	JPDD组(n=15)	CBD组(n=15)	统计值	P值
性别[例(%)]				0.272
男	9(60.00)	5(33.33)		
女	6(40.00)	10(66.67)		
年龄(岁)	73.73±8.22	64.33±17.10	Z=-1.37	0.171
BMI(kg/m ²)	24.25±3.44	26.78±4.45	t=-1.74	0.092
既往胆囊切除术[例(%)]	4(26.67)	6(40.00)		0.700
高血压[例(%)]	6(40.00)	7(46.67)		0.999
冠状动脉粥样硬化性心脏病[例(%)]	2(13.33)	3(20.00)		0.999
糖尿病[例(%)]	0(0.00)	2(13.33)		0.483
脑梗死[例(%)]	3(20.00)	1(6.67)		0.598
胆总管直径(mm)	14.73±3.95	9.67±2.64	t=4.13	<0.001
结石最大直径(mm)	10.87±3.42	6.80±2.08	t=3.94	<0.001
CBD数量[例(%)]				0.710
1个	8(53.33)	10(66.67)		
≥2个	7(46.67)	5(33.33)		
WBC(×10 ⁹ /L)	9.50±3.53	7.14±1.84	t=2.30	0.032
NEUT(%)	79.83±10.46	79.38±11.01	t=0.12	0.909
TBil(μmol/L)	47.40(21.00 ~ 73.85)	31.30(13.00 ~ 67.55)	Z=-0.94	0.345
DBil(μmol/L)	24.40(7.80 ~ 38.05)	12.70(2.75 ~ 39.95)	Z=-1.02	0.309
ALT(U/L)	123.60(37.95 ~ 372.90)	154.40(33.70 ~ 364.50)	Z=-0.08	0.935
ASL(U/L)	75.70(27.05 ~ 250.35)	129.70(28.25 ~ 306.25)	Z=-0.12	0.902
GGT(U/L)	275.50(80.95 ~ 502.35)	147.10(54.40 ~ 423.85)	Z=-0.53	0.595
ALP(U/L)	131.90(74.45 ~ 261.90)	121.10(92.75 ~ 159.70)	Z=-0.20	0.838
ChE(U/L)	6 020.13±1 705.08	7 302.20±1 580.29	t=-2.14	0.042
TBA(U/L)	28.60(14.00 ~ 56.95)	79.89(3.05 ~ 134.74)	Z=-0.37	0.713
胆管炎级别[例(%)]				0.299
不伴有胆管炎	6(40.00)	9(60.00)		
I级	4(26.67)	5(33.33)		
II级	5(33.33)	1(6.67)		
术中插管困难[例(%)]	0(0.00)	2(13.33)		0.483

注:NEUT,中性粒细胞百分比;TBA,胆汁酸。

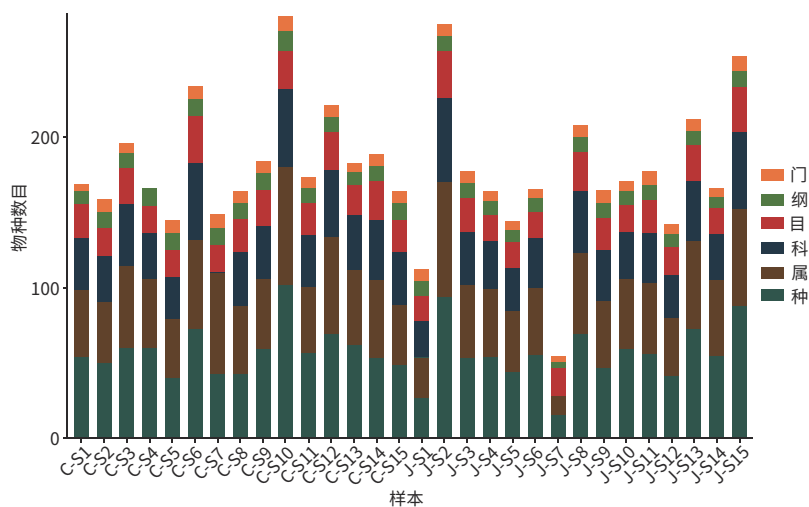


图1 各样本中门、纲、目、科、属和种水平的物种数量统计表

Figure 1 Statistical table of the number of species annotated to the phylum, class, order, family, genus, and species level in each sample

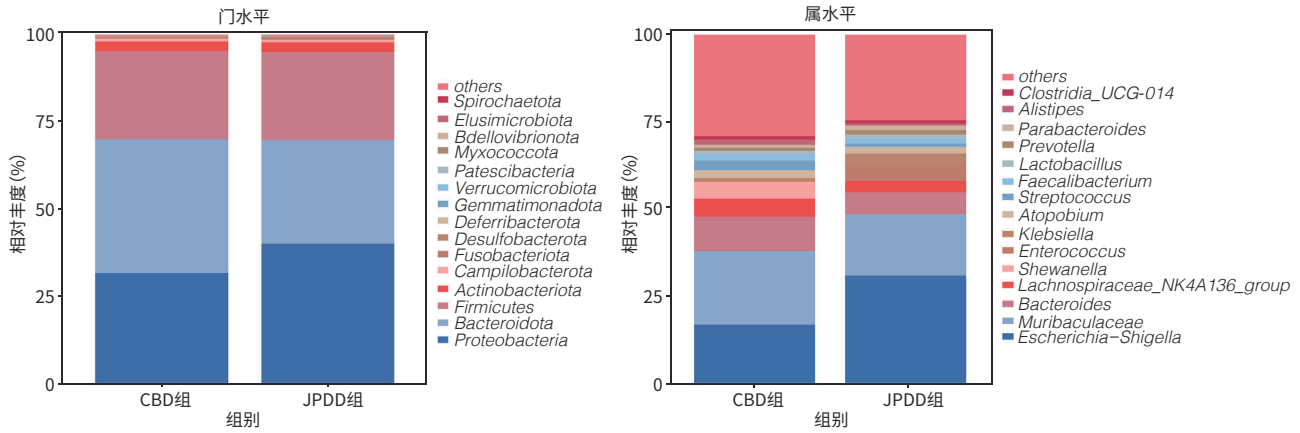
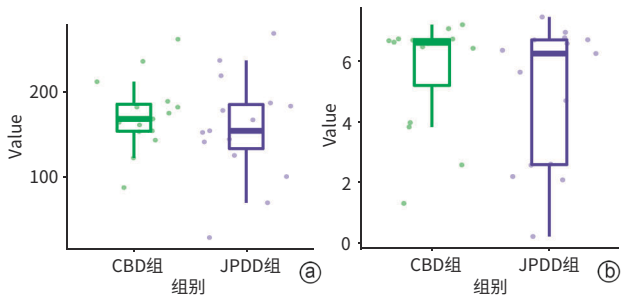


图2 两组胆道菌群在门、属水平上的分布

Figure 2 Distribution of biliary microbiota at the phylum and genus level in two groups



注:a, Chao1 指数; b, Shannon 指数。

图3 两组的 Alpha 多样性分析

Figure 3 Analysis of alpha diversity in two groups

2.4 胆汁微生物 Beta 多样性分析 应用PCoA 分析说明样本间的差异程度, JPDD 组患者的胆汁微生物群落 PCoA 分别在最大变异率 4.74%、4.49% 呈现不同区域聚集 (binary_jaccard 算法, Adonis 检验, $P < 0.05$), 说明两组间胆汁微生物群落组成有明显差异 (图 4)。

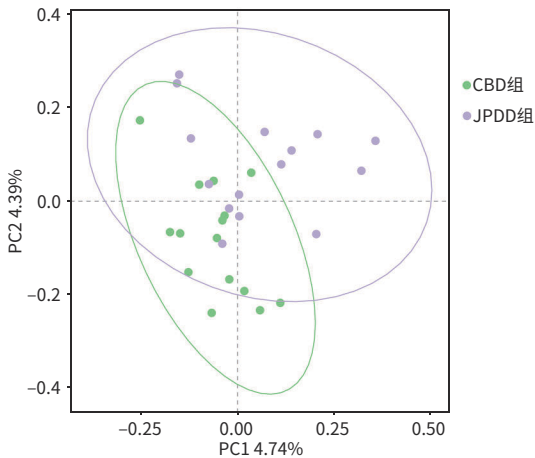


图4 两组的 Beta 多样性分析

Figure 4 Analysis of Beta diversity in two groups

2.5 差异菌群分析 在本研究中应用LDA 值分布展示 LEfSe 分析结果, 发现 25 个差异菌群在两组间存在统计学差异。JPDD 组中肠球菌科 (*Enterococcaceae*)、*Enterococcus. sp.*、克雷伯菌属 (*Klebsiella*)、孪生球菌属 (*Gemella. sp.*) 等 7 个菌群表达升高, 消化球菌科 (*Peptococcaceae*)、罗斯拜瑞氏菌属 (*Roseburia. sp.*)、别样杆菌属 (*Alistipes. sp.*)、不动杆菌属 (*Acinetobacter. sp.*)、链球菌属 (*Streptococcus. sp.*) 等 18 个菌群相对丰度表达下降, 结果表明 JPDD 组与 CBD 组胆汁中存在多种差异显著的菌群 ($P < 0.05$) (图 5)。

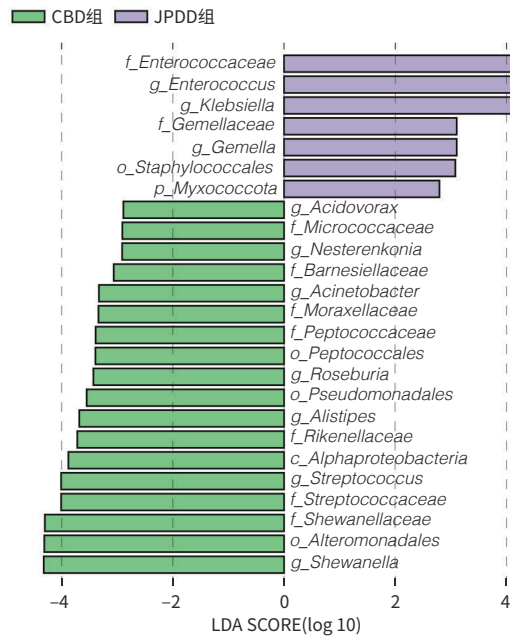
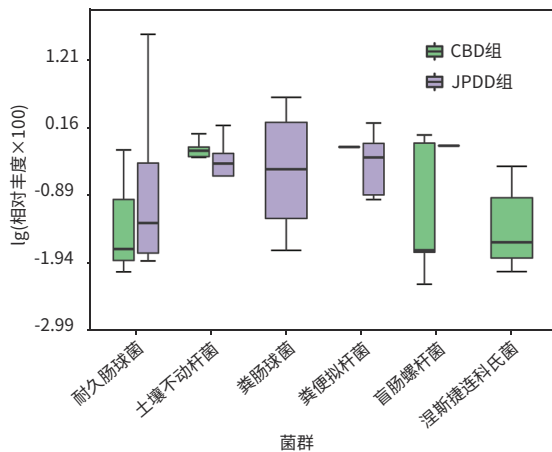


图5 两组胆汁微生物差异菌群的 LEfSe 分析 (LDA>2)

Figure 5 LEfSe analysis of bile microbiological differential flora in two groups (LDA>2)

应用 Wilcoxon 检验分析两组在种分类水平上存在差异的微生物群。JPDD 组中耐久肠球菌 (*Enterococcus_durans_g_Enterococcus*)、粪肠球菌 (*Enterococcus_faecalis_g_Enterococcus*) 和粪便拟杆菌 (*Bacteroides_stercoris_g_Bacteroides*) 显著富集; 而 CBD 组中土壤不动杆菌 (*Acinetobacter_soli_g_Acinetobacter*)、盲肠螺杆菌 (*Helicobacter_typhlonius_g_Helicobacter*) 和涅斯捷连科氏菌 (*Nesterenkonia_sp_g_Nesterenkonia*) 显著富集(图6)。



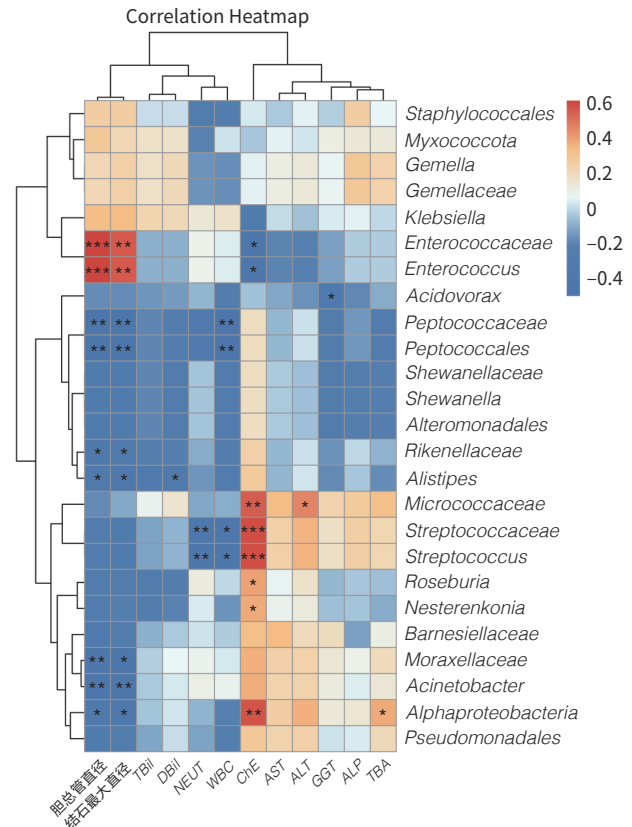
注: CBD组粪肠球菌未检出, 粪便拟杆菌只有1个样本检出; JPDD组盲肠螺杆菌只有1个样本检出, 涅斯捷连科氏菌未检出。

图6 箱线图展示了两组胆汁微生物群在种水平上物种丰度的差异分布

Figure 6 The boxplot illustrates the differences in species abundance at the species level between the two groups of bile microbiota

2.6 JPDD组患者胆汁微生物与临床资料的相关性分析 应用 Spearman 相关系数, 制作 Heatmap 图。结果显示, JPDD 组明显富集的 *Enterococcaceae*、*Enterococcus.sp* 相对丰度与胆总管直径 ($P < 0.001$)、结石最大直径 ($P < 0.01$) 呈正相关, 与 ChE 水平呈负相关 ($P < 0.05$), JPDD 组表达明显下降的 *Peptococcaceae*、莫拉氏菌科 (*Moraxellaceae*)、*Acinetobacter.sp*、理化所菌科 (*Rikenellaceae*)、*Alistipes.sp*、阿尔法变形菌纲 (*Alphaproteobacteria*) 与胆总管直径、结石最大直径呈负相关 (P 值均 < 0.05)。链球菌科 (*Streptococcaceae*)、*Streptococcus.sp*、*Peptococcaceae* 等与 WBC 呈负相关, *Alphaproteobacteria*、*Streptococcaceae*、*Streptococcus.sp* 与 ChE 呈正相关。说明 JPDD 组胆道微生物特征群落与 CBD 的形成及大小密切相关(图7)。

2.7 微生物 KEGG 通路富集分析 为了比较两组的代谢通路差异, 采用 PICRUST 2 对 KEGG 通路及丰度值进行了预测分析, 结果显示, 两组间存在 10 条显著差异的代谢通路 (P 值均 < 0.05), 说明 JPDD 组患者的肠道菌群



注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图7 临床数据与差异微生物相关性分析

Figure 7 Clinical data and differential microbiological correlation analysis

代谢功能可能发生改变。这些通路包括, 细胞生长和死亡、运输和分解、神经系统, 以及缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的生物合成, 组氨酸代谢等其他氨基酸的代谢和合成通路(图8)。

3 讨论

细菌微生物在维持人体内环境稳态中发挥着关键作用, 可通过微生物易位、调节免疫、调节新陈代谢和酶降解等方式影响胃肠道癌症和慢性疾病的发生及进展^[8-9]。CBD 患者常见的胆汁微生物群主要由 *Firmicutes*、*Bacteroidota*、*Actinobacteriota* 及 *Proteobacteria* 组成^[5,10-11], 微生物群失调与胆道疾病关系密切。本研究显示, JPDD 组患者的胆汁以 *Proteobacteria* (40.25%)、*Bacteroidota* (29.55%)、*Firmicutes* (25.12%)、*Actinobacteriota* (2.86%) 为主, 其中 *Proteobacteria* 占比在 JPDD 组较高, *Escherichia shigella*、*Escherichia_coli_g_Escherichia-Shigella*、*Shigella_flexneri_g_Escherichia-Shigella* 等丰度也升高。在细菌分类中, *Proteobacteria* 是最大的一门, 包含大肠杆菌、沙门氏

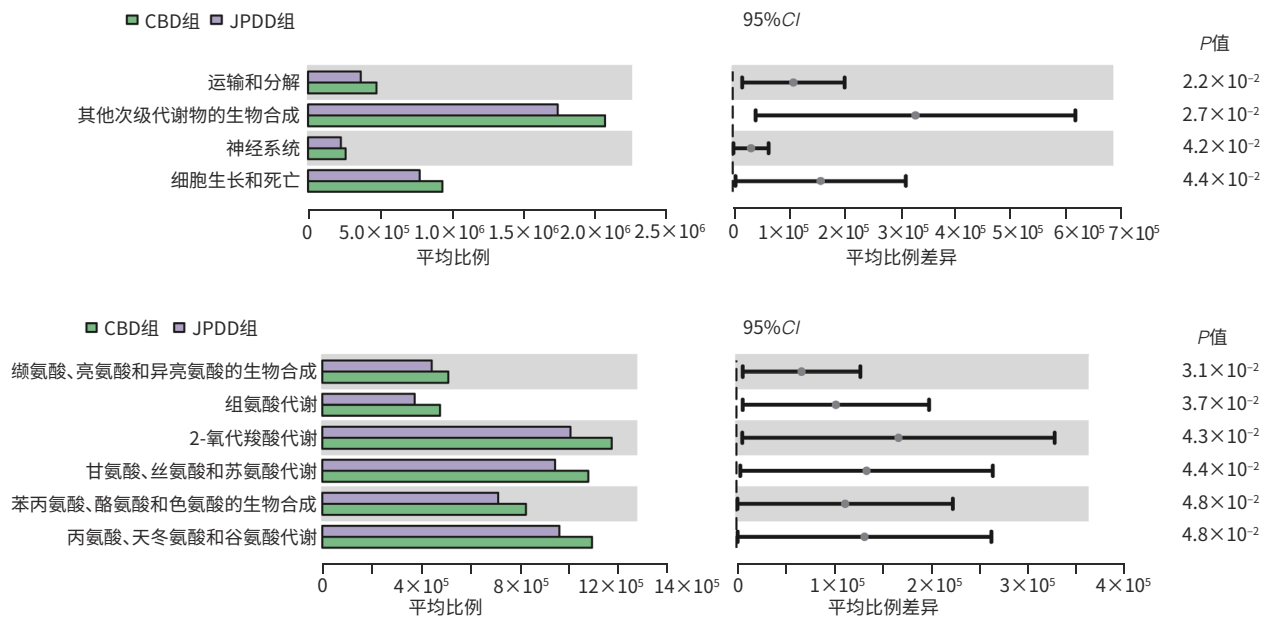


图8 KEGG通路功能预测
Figure 8 KEGG prediction of access function

菌、幽门螺杆菌等肠道常见微生物,也是胆汁培养的常见菌^[12-14]。肠道微生物的不平衡通常是由于 *Proteobacteria* 丰度的持续增加,笔者团队推测其在胆道中也可能扮演类似的角色。研究证实,CBD患者的胆汁和十二指肠液微生物组成高度相似,均以 *Proteobacteria* 为主,并且在复发的病例中从门到属水平平均呈现一致分布^[10,15-16]。十二指肠微生物的逆行迁移可能导致胆汁微生物的改变。十二指肠微生物和胆汁微生物之间存在肠-胆反流,JPDD导致Oddi括约肌功能失调,微生物通过Oddi括约肌迁移进入胆道,改变胆道微环境,影响结石的形成。Oddi括约肌功能受损还会导致胆汁淤积、促进感染,导致结石的发展^[17-18]。因此,推测JPDD通过改变胆道微环境来影响CBD的形成。

在合并JPDD的患者中,胆汁微生物的组成和丰度表现出显著差异。JPDD组中致病菌 *Enterococcus. sp.*、*Klebsiella* 等菌群丰度升高,提示这些微生物丰度变化可能与CBD的形成相关。目前细菌微生物在CBD形成中的作用机制主要包括β-葡萄糖醛酸酶、胆盐水解酶、黏蛋白等。*Enterococcus. sp.* 和 *Klebsiella* 是胆道感染的常见致病菌,能耐受较大范围的pH,产生β-葡萄糖醛酸酶,在胆道结构受损或梗阻时易水解胆红素葡萄糖醛酸形成胆色素钙晶体,促进色素性结石形成^[3,19-21]。胆汁微生物还可以通过改变胆汁成分调节CBD的形成。如 *Enterococcus. sp.*、*Klebsiella*、梭菌属等微生物具有胆盐水解酶活性,这些细菌可以在小肠内催化胆汁酸解离生成游离胆汁酸和氨基

酸,影响胆汁酸及胆固醇代谢^[22]。胆汁中黏蛋白也在色素性结石的形成过程中发挥作用。胆囊和胆管的慢性炎症可以增加上皮细胞中黏蛋白的产生,例如MUC5AC的表达水平升高可通过以下途径促进色素结石的形成和发展:提供基质,促进沉淀,与慢性炎症和胆道感染细菌(如 *Klebsiella* 和 *Escherichia coli*)相互作用^[23]。当肠黏膜屏障功能受损和存在肠-胆反流时,出现胆道微生态紊乱,血清中内毒素水平升高,胆管中的内毒素水平也升高,进一步增强胆管上皮细胞内β-葡萄糖醛酸酶和黏蛋白的内源性表达^[24],类似细菌β-葡萄糖醛酸酶和糖萼在结石形成中的作用,加快结石进程。本研究还发现,肠球菌科、*Enterococcus. sp.* 丰度与胆总管直径及结石最大直径呈显著正相关,提示JPDD、胆汁微生物及CBD之间存在着密切联系,调节微生物群和代谢通路可以影响结石的形成。

同样,部分有益菌在胆汁中的低表达也不利于胆道健康,进而可能促进结石的形成和发展。本研究发现JPDD组中 *Roseburia. sp.*、*Acinetobacter. sp.*、*Alistipes. sp.* 等微生物丰度明显下降。*Roseburia. sp.* 是定植于消化道的常见菌属,在很多疾病的进展中发挥保护作用,可通过加强肠道紧密连接来改善酒精相关性肝病^[25],降低炎症性肠病患者遗传风险评分^[26-27]。Keren等^[28]还发现肠道中 *Roseburia. sp.* 显著减少可以作为有症状胆结石形成的生物标志物。此外,产生短链脂肪酸的细菌丁酸梭菌能减少小鼠CBD形成并保护肠道微生物组平衡,降低胃肠道和胆道系统感染的危险^[29]。在本研究结果中,JPDD

组中 *Acinetobacter.sp*、*Alistipes.sp*、*Rikenellaceae* 等能产生短链脂肪酸的微生物丰度均较 CBD 组减少,并且与胆总管直径及结石最大直径呈负相关。正常的胆管类似肠道一样存在定殖菌群,微生物平衡维持胆道环境稳定^[30]。十二指肠憩室的存在导致括约肌功能异常出现肠胆反流,进而导致胆管菌群平衡出现异常,这些“有益菌”减少是结石形成可能的原因之一,但目前有关菌群在胆道中的作用研究较少。值得注意的是,原发性 CBD 的形成及发展是微生物群之间相互作用、相互影响的复杂过程。

胆道和肠道微生物几乎参与了胆汁形成的所有环节,包括脂质和胆固醇的代谢、生物转化和肠肝循环等过程。JPDD 的存在显著改变了胆汁代谢的平衡。JPDD 组与 CBD 组在 2-氧代羧酸代谢、甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢等方面存在 10 条差异富集通路,这些生理过程涵盖了胆汁酸合成与代谢、肝脏中的能量转换机制、氧化应激反应以及炎症性响应。多项研究显示,肠道微生物可以通过影响胆汁酸代谢(如初级胆汁酸、牛磺酸代谢)调节机体健康,改善肝纤维化、减弱肝脏氧化应激和细胞凋亡^[31-32]。当微生物失调时,继发的胆汁酸、氨基酸等代谢失衡可能导致胆管结石、胆汁淤积、脂肪肝等疾病的发生。因此,笔者认为 JPDD 的存在可能通过调节代谢物成分、影响胆汁酸和脂质代谢,从而影响 CBD 的形成。要深入研究胆汁代谢和微生物特征之间的潜在关系,仍需开展代谢组学进一步研究。

JPDD 与原发性 CBD 之间的关系复杂。笔者团队通过 16S rRNA 微生物测序对原发性 CBD 患者的胆汁微生物进行分析,探讨 JPDD 对结石形成的影响。胆汁微生物群丰度变化可能也参与了 CBD 的形成过程。当然,实验存在部分局限性:ERCP 为侵入性检查,无法保证在收集标本时内镜通过十二指肠过程中存在微量的肠道污染可能。在未来研究中,将扩大样本量进一步探讨原发性胆总管结石形成的机制,为疾病的预防及治疗提供更好的指导。

伦理学声明: 本研究方案于 2024 年 1 月 5 日经由河北省人民医院医院伦理委员会审批,批号:2024002。患者均签署知情同意书。

利益冲突声明: 本文不存在任何利益冲突。

作者贡献声明: 王梦莹负责设计论文框架,起草论文及实验操作,实施研究;桑伟负责数据收集,统计学分析及绘制图表;侯洪涛负责拟定写作思路,指导撰写文章并最后定稿。

参考文献:

- [1] LI SQ, GUIZZETTI L, MA C, et al. Epidemiology and outcomes of choledocholithiasis and cholangitis in the United States: Trends and urban-rural variations[J]. BMC Gastroenterol, 2023, 23(1): 254. DOI: 10.1186/s12876-023-02868-3.
- [2] TAZUMA S. Gallstone disease: Epidemiology, pathogenesis, and classification of biliary stones (common bile duct and intrahepatic) [J]. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2006, 20(6): 1075-1083. DOI: 10.1016/j.bpg.2006.05.009.
- [3] SKAR V, SKAR AG, MIDTVEDT T, et al. Beta-glucuronidase-producing bacteria in bile from the common bile duct in patients treated with endoscopic papillotomy for gallstone disease[J]. Scand J Gastroenterol, 1986, 21(2): 253-256. DOI: 10.3109/00365528609034656.
- [4] STEWART L, PONCE R, OESTERLE AL, et al. Pigment gallstone pathogenesis: Slime production by biliary bacteria is more important than beta-glucuronidase production[J]. J Gastrointest Surg, 2000, 4(5): 547-553. DOI: 10.1016/s1091-255x(00)80100-6.
- [5] FENG R, ZHANG TY, KAYANI MUR, et al. Patients with primary and secondary bile duct stones harbor distinct biliary microbial composition and metabolic potential[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2022, 12: 881489. DOI: 10.3389/fcimb.2022.881489.
- [6] KIM CW, CHANG JH, KIM JH, et al. Size and type of periampullary duodenal diverticula are associated with bile duct diameter and recurrence of bile duct stones[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2013, 28(5): 893-898. DOI: 10.1111/jgh.12184.
- [7] KIRIYAMA S, KOZAKA K, TAKADA T, et al. Tokyo guidelines 2018: Diagnostic criteria and severity grading of acute cholangitis (with videos) [J]. J Hepatobiliary Pancreat Sci, 2018, 25(1): 17-30. DOI: 10.1002/jhbp.512.
- [8] DEPOMMIER C, EVERARD A, DRUART C, et al. Supplementation with *Akkermansia muciniphila* in overweight and obese human volunteers: A proof-of-concept exploratory study[J]. Nat Med, 2019, 25(7): 1096-1103. DOI: 10.1038/s41591-019-0495-2.
- [9] FERNANDES MR, AGGARWAL P, COSTA RGF, et al. Targeting the gut microbiota for cancer therapy[J]. Nat Rev Cancer, 2022, 22(12): 703-722. DOI: 10.1038/s41568-022-00513-x.
- [10] LIU Q, ZHENG LY, WANG Y, et al. Primary choledocholithiasis occurrence and recurrence is synergetically modulated by the bile microbiome and metabolome alternations[J]. Life Sci, 2023, 331: 122073. DOI: 10.1016/j.lfs.2023.122073.
- [11] XIAO M, ZHOU YK, WANG ZF, et al. The dysregulation of biliary tract microflora is closely related to primary choledocholithiasis: A multicenter study[J]. Sci Rep, 2024, 14(1): 9004. DOI: 10.1038/s41598-024-59737-6.
- [12] GROMSKI MA, GUTTA A, LEHMAN GA, et al. Microbiology of bile aspirates obtained at ERCP in patients with suspected acute cholangitis[J]. Endoscopy, 2022, 54(11): 1045-1052. DOI: 10.1055/a-1790-1314.
- [13] SHIN JH, TILLOTSON G, MACKENZIE TN, et al. *Bacteroides* and related species: The keystone taxa of the human gut microbiota[J]. Anaerobe, 2024, 85: 102819. DOI: 10.1016/j.anaerobe.2024.102819.
- [14] ZHENG X, YAN YJ, LI X, et al. Microbial characteristics of bile in gallstone patients: A comprehensive analysis of 9, 939 cases[J]. Front Microbiol, 2024, 15: 1481112. DOI: 10.3389/fmicb.2024.1481112.
- [15] LEE J, PARK JS, BAE J, et al. Bile microbiome in patients with recurrent common bile duct stones and correlation with the duodenal microbiome [J]. Life (Basel), 2022, 12(10): 1540. DOI: 10.3390/life12101540.
- [16] LYU ZT, YU TT, ZHANG LC, et al. Analysis of the relationship between bile duct and duodenal microbiota reveals that potential dysbacteriosis is the main cause of primary common bile duct stones[J]. Synth Syst Biotechnol, 2021, 6(4): 414-428. DOI: 10.1016/j.synbio.2021.11.002.
- [17] LIU LX, ZHAO ZX, HOU XF, et al. Effect of sphincter of Oddi dysfunction on the abundance of biliary microbiota (biliary microecology) in patients with common bile duct stones[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2022, 12: 1001441. DOI: 10.3389/fcimb.2022.1001441.
- [18] YANG Y, ZHAO ZY, WU SD, et al. Structural or functional abnormality of sphincter of oddi: An important factor for the recurrence of choledo-

- cholithiasis after endoscopic treatment[J]. Ann Med, 2025, 57(1): 2440-119. DOI: 10.1080/07853890.2024.2440119.
- [19] LEUNG JW, LIU YL, LEUNG PS, et al. Expression of bacterial beta-glucuronidase in human bile: An in vitro study[J]. Gastrointest Endosc, 2001, 54(3): 346-350. DOI: 10.1067/mge.2001.117546.
- [20] MAKI T. Pathogenesis of calcium bilirubinate gallstone: Role of *E. coli*, beta-glucuronidase and coagulation by inorganic ions, polyelectrolytes and agitation[J]. Ann Surg, 1966, 164(1): 90-100. DOI: 10.1097/0000-0658-196607000-00010.
- [21] MUSSA M, PÉREZ-CRESPO PMM, LOPEZ-CORTES LE, et al. Risk factors and predictive score for bacteremic biliary tract infections due to *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*: A multicenter cohort study from the PROBAC project[J]. Microbiol Spectr, 2022, 10(4): e0005122. DOI: 10.1128/spectrum.00051-22.
- [22] KRIAA A, BOURGIN M, POTIRON A, et al. Microbial impact on cholesterol and bile acid metabolism: Current status and future prospects[J]. J Lipid Res, 2019, 60(2): 323-332. DOI: 10.1194/jlr.R088989.
- [23] ZHAO ZY, YANG Y, WU SD, et al. Role of secretory mucins in the occurrence and development of cholelithiasis[J]. Biomolecules, 2024, 14(6): 676. DOI: 10.3390/biom14060676.
- [24] MA WJ, WU ZR, YANG Q, et al. Biliary antibiotics irrigation for *E. coli*-induced chronic proliferative cholangitis and hepatolithiasis: A pathophysiological study in rabbits[J]. Clin Res Hepatol Gastroenterol, 2020, 44(3): 356-367. DOI: 10.1016/j.clinre.2019.07.008.
- [25] 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. DOI: 10.1016/j.chom.2019.11.001.
- [26] IMHANN F, VICH VILA A, BONDER MJ, et al. Interplay of host genetics and gut microbiota underlying the onset and clinical presentation of inflammatory bowel disease[J]. Gut, 2018, 67(1): 108-119. DOI: 10.1136/gutjnl-2016-312135.
- [27] SHENG TJ, YAN SM, LAN WR, et al. Research progress on the impact of gut microbiota on inflammatory bowel disease[J]. Chin J Med Offic, 2023, 51(9): 904-907. DOI: 10.16680/j.1671-3826.2023.09.06.
- 盛天骄, 闫思蒙, 兰威儒, 等. 肠道微生物对炎症性肠病影响研究进展[J]. 临床军医杂志, 2023, 51(9): 904-907. DOI: 10.16680/j.1671-3826.2023.09.06.
- [28] KEREN N, KONIKOFF FM, PAITAN Y, et al. Interactions between the intestinal microbiota and bile acids in gallstones patients[J]. Environ Microbiol Rep, 2015, 7(6): 874-880. DOI: 10.1111/1758-2229.12319.
- [29] LI GF, YU TT, DU HM, et al. Effect of *Clostridium butyricum* on the formation of primary choledocholithiasis based on intestinal microbiome and metabolome analysis[J]. J Appl Microbiol, 2023, 134(8): lxad170. DOI: 10.1093/jambio/lxad170.
- [30] MOLINERO N, RUIZ L, MILANI C, et al. The human gallbladder microbiome is related to the physiological state and the biliary metabolic profile[J]. Microbiome, 2019, 7(1): 100. DOI: 10.1186/s40168-019-0712-8.
- [31] LI GH, HUANG SJ, LI X, et al. Response of gut microbiota to serum metabolome changes in intrahepatic cholestasis of pregnant patients[J]. World J Gastroenterol, 2020, 26(46): 7338-7351. DOI: 10.3748/wjg.v26.i46.7338.
- [32] MEN L, GU ZH, WANG EH, et al. Fufang muji granules ameliorate liver fibrosis by reducing oxidative stress and inflammation, inhibiting apoptosis, and modulating overall metabolism[J]. Metabolites, 2024, 14(8): 446. DOI: 10.3390/metabo14080446.

收稿日期: 2025-03-11; 录用日期: 2025-05-06

本文编辑: 王莹

引证本文: WANG MY, HOU HT, SANG W. Influence of juxtapiillary duodenal diverticula on bile microecology in patients with primary common bile duct stones[J]. J Clin Hepatol, 2025, 41(9): 1868-1876.
王梦莹, 侯洪涛, 桑伟. 十二指肠乳头旁憩室对原发性胆总管结石患者胆汁微生态的影响[J]. 临床肝胆病杂志, 2025, 41(9): 1868-1876.

· 消息 ·

《临床肝胆病杂志》入选“首届东北地区科技期刊助力学科建设与区域创新特色案例·精品案例”

2025年9月16—17日,由中国高校科技期刊研究会、中国科学院自然科学期刊编辑研究会主办的“首届东北地区科技期刊助力学科建设与区域创新研讨会”在辽宁省沈阳市举办,会议发布了《东北地区科技期刊服务新时代东北全面振兴倡议》,公布了“首届东北地区科技期刊助力学科建设与区域创新特色案例”遴选结果(精品案例33种,优秀案例33种),《临床肝胆病杂志》申报的“融媒体创新发展的无界矩阵”案例入选精品案例,编辑部代表受邀在会上作主旨报告。

《临床肝胆病杂志》编辑部

2025年9月25日