

·论著·

复杂性肛瘘患者肠道微生态检测及分析

裘建明 杨关根 王东 陈金明 沈忠 邵书先

杭州市第三人民医院肛肠外科 浙江省中西医结合盆底疾病实验室,杭州 310009

通信作者:杨关根,Email:yangguangen88@126.com

【摘要】 目的 通过 16S rDNA 基因测序检测复杂性肛瘘患者的肠道菌群分布,探讨其与健康人的菌群分布是否存在差异。**方法** 采用病例对照研究方法,回顾性收集 2020 年 6 月至 12 月期间杭州市第三人民医院接受手术治疗的 30 例复杂性肛瘘患者临床资料(复杂性肛瘘组),并按 1:1 配比选择本院健康体检人群 30 例作为对照组(健康对照组)。病例纳入标准:(1)符合腺源性肛瘘诊断的标准,且症状持续 3 个月以上;(2)术前已行电子结肠镜检查排除肠道炎症反应、炎性肠病等;(3)复杂性肛瘘的定义为符合下面情况之一者:瘘管跨越 2/3 及以上的肛门括约肌;包含两个以上的外口或瘘管;既往已行肛瘘手术后确认复发者。排除标准:(1)合并有炎性肠病、慢性腹泻或便秘、糖尿病、消化道恶性肿瘤、肝肾功能障碍等;(2)克罗恩病、外伤、特殊感染(如放线菌病和结核病)等引起的肛瘘;(3)近 1 个月内使用过抗生素、益生元、益生菌等可能影响肠道微生态制剂者;(4)认知缺陷不能配合者。提取研究对象的粪便样本总 DNA,扩增细菌 16S rDNA 基因序列的 V4 高变区,利用 Illumina Miseq 平台进行高通量测序,最后进行操作分类单元(OTU)聚类、进行 Alpha 多样性和 LEfSe 数据分析,其中 Chao 指数或 ACE 指数越大,表明微生物区系的预期物种丰度越高,Simpson 指数越小或 Shannon 指数越大,表明微生物区系多样性越高。两组间性别、年龄、体质指数(BMI)、饮酒吸烟史基线资料比较差异均无统计学意义(均 $P>0.05$),说明两组具有可比性。本研究观察指标包括两组的测序和质量控制、Alpha 多样性分析和物种及其丰度分析以及 LEfSe 分析。**结果** 复杂性肛瘘组与健康对照组的主要优势菌都是厚壁菌门和拟杆菌门,分别占 $93.4\%\pm 32.0\%$ 和 $87.4\%\pm 41.2\%$;在属水平上,复杂性肛瘘组的普雷沃菌属($4.9\%\pm 7.4\%$ 比 $0.1\%\pm 1.1\%$, $P<0.001$)、巨细胞菌属($3.9\%\pm 8.2\%$ 比 $0.5\%\pm 4.2\%$, $P<0.05$)和毛螺菌属($2.6\%\pm 5.7\%$ 比 $0.1\%\pm 3.4\%$, $P<0.05$)的丰度明显更高,而变形菌属($0.02\%\pm 4.2\%$ 比 $9.3\%\pm 14.4\%$, $P<0.01$)、肠球菌属($0.02\%\pm 2.3\%$ 比 $9.3\%\pm 19.6\%$, $P<0.05$)、拟杆菌属($24.7\%\pm 9.9\%$ 比 $29.8\%\pm 9.1\%$, $P<0.05$)和克雷伯菌属($0.4\%\pm 4.2\%$ 比 $3.9\%\pm 7.3\%$, $P<0.05$)相对更低。与健康对照组相比,复杂性肛瘘组肠道菌群多样性更丰富,表现为 ACE 指数更高[(293.30 ± 44.00)比(218.75 ± 33.83), $t=102.069$, $P<0.001$], Chao 指数也更高[(318.40 ± 41.99)比(250.00 ± 46.38), $t=77.818$, $P=0.028$], Shannon 指数更高[(3.36 ± 0.29)比(2.43 ± 0.34), $t=9.657$, $P=0.001$];而 Simpson 指数更低[(0.103 ± 0.013)比(0.131 ± 0.013), $t=5.551$, $P=0.046$],差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。韦荣菌科、Selenomonadales 及厌氧菌纲(均属于厚壁菌门)的菌株总体上对两组样本肠道菌群差异的影响最大(LDA 值均 >4)。**结论** 与健康对照组相比,复杂性肛瘘患者肠道菌群多样性更丰富,提示某些肠道菌群及其代谢产物可能在肛瘘发病中发挥了一定的作用。

【关键词】 肛瘘,复杂性; 肠道微生态; 高通量测序**基金项目:**浙江省科技厅公益研究项目(LGF20H270001、LGF20H030002);杭州市医药卫生科技项目(A20200122)

Detection and analysis of intestinal flora diversity in patients with complex anal fistula

Qiu Jianming, Yang Guangen, Wang Dong, Chen Jinming, Shen Zhong, Shao Shuxian

DOI: 10.3760/cma.j.cn441530-20220412-00142

收稿日期 2022-04-12 本文编辑 万晓梅

引用本文:裘建明,杨关根,王东,等.复杂性肛瘘患者肠道微生态检测及分析[J].中华胃肠外科杂志,2022,25(9):792-797. DOI: 10.3760/cma.j.cn441530-20220412-00142.



Department of Anal-Colorectal Surgery, Zhejiang Pelvic Floor Disease Laboratory of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Hangzhou Third People's Hospital, Hangzhou 310009, China
Corresponding author: Yang Guangen, Email: yangguangen88@126.com

【 Abstract 】 Objective To explore the possibility that the intestinal flora profile in complex anal fistula patients is different to that of healthy controls. This was assessed by sequencing of 16S rDNA in fecal samples from cohorts representing these populations. **Methods** Fecal samples were collected from 30 complex anal fistula patients and 30 matched healthy controls. Patients were included if they met the diagnostic criteria of cryptoglandular anal fistula and had exhibited symptoms for more than 3 months. Complex anal fistula is diagnosed under the following circumstances: if the fistula in question spans 2/3 or more of the diameter of the anal sphincter; if there are more than two external orifices or fistula tracks; or if recurrence is observed after previous anal fistula surgery. Patients were excluded if there were comorbidities including inflammatory bowel disease (as assessed by colonoscopy), chronic diarrhea, chronic constipation, diabetes, gastrointestinal malignancies, liver/ kidney dysfunction, or cognitive impairment. Patients whose anal fistulas were caused by Crohn's disease, trauma, special infections (such as actinomycosis and tuberculosis) were also excluded, as were those who had used antibiotics, prebiotics, or probiotics that may affect intestinal microecology in the month prior to the study. Total bacterial genomic DNA was extracted by PCR amplification of the V4 hypervariable region of the 16S rRNA sequences. High-throughput sequencing and data analysis were performed on the Illumina Miseq platform. Finally, operational taxonomic unit (OTU) clustering, alpha diversity and LEfSE data analysis were carried out. The larger the Chao or ACE index is, the higher the species abundance of the microflora is expected to be. Similarly, a smaller value for the Simpson index or a larger value for the Shannon index indicates greater microflora diversity. There was no statistically significant difference in gender, age, body mass index (BMI), drinking history, or smoking history between the two groups ($P>0.05$), indicating that they were comparable. **Results** The α -diversity analysis including ACE, Chao, Shannon and Simpson indexes indicated a richer diversity of intestinal microflora in complex anal fistula patients than in healthy controls. In both patients and controls, OUT cluster analysis demonstrated that $93.4\%\pm 32.0\%$ and $87.4\%\pm 41.2\%$ of sequences were from Firmicutes and Bacteroidetes spp., respectively. On a genus level, samples from anal fistula patients showed a greater abundance of *Prevotella* spp. ($4.9\%\pm 7.4\%$ vs. $0.1\%\pm 1.1\%$, $P<0.001$), *Megamonas* ($3.9\%\pm 8.2\%$ vs. $0.5\%\pm 4.2\%$, $P<0.05$) and *Lachnospira* ($2.6\%\pm 5.7\%$ vs. $0.1\%\pm 3.4\%$, $P<0.05$), while showing a lesser abundance of *Proteobacteria* spp. ($0.02\%\pm 4.2\%$ vs. $9.3\%\pm 14.4\%$, $P<0.01$), *Enterococcus* ($0.02\%\pm 2.3\%$ vs. $9.3\%\pm 19.6\%$, $P<0.05$), *Bacteroides* ($24.7\%\pm 9.9\%$ vs. $29.8\%\pm 9.1\%$, $P<0.05$) and *Klebsiella* ($0.4\%\pm 4.2\%$ vs. $3.9\%\pm 7.3\%$, $P<0.05$) compared with healthy controls. Intestinal flora diversity in the complex anal fistula group was richer than in controls, as indicated by a higher ACE index (293.30 ± 44.00 vs. 218.75 ± 33.83 , $t=102.069$, $P<0.001$), a higher Chao index (318.40 ± 41.99 vs. 250.00 ± 46.38 , $t=77.818$, $P=0.028$), a higher Shannon index (3.36 ± 0.29 vs. 2.43 ± 0.34 , $t=9.657$, $P=0.001$), and a lower Simpson index (0.103 ± 0.013 vs. 0.131 ± 0.013 , $t=5.551$, $P=0.046$). LDA effect size analysis suggests that the main strains of *Veillonellaceae*, *Selenomonadales* and *Negativicutes*, which all belong to the phylum Firmicutes, have the greatest influence on the above difference ($LDA>4$). **Conclusions** The diversity of intestinal flora in patients with complex anal fistula is greater than in healthy controls, suggesting that these bacteria or their metabolites may be involved in the occurrence and development of anal fistulas.

【 Key words 】 Anal fistula, complex; Intestinal flora; High-throughput sequencing

Fund programs: Public Welfare Project of Zhejiang Provincial Department of Science and Technology (LGF20H270001, LGF20H030002); Hangzhou Science and Technology Project of Medicine and Health (A20200122)

肛瘘是肛肠外科的常见病和多发病,好发于青壮年,典型的临床表现为肛门疼痛和流脓,严重影响患者的工作和生活^[1]。但是复杂性肛瘘术后

容易复发,还存在肛门括约肌损伤的风险,这一直是肛肠外科医生面临的一大挑战。所以,进一步理解肛瘘的发病机制对于提高肛瘘的治疗效果很

有必要。目前,公认关于肛瘘发病机制的理论是 Parks 和 Eisenhammer 提出的隐窝感染学说^[2-4]。但是该学说并不能有效阐明为什么同样含有大量致病菌的健康人群没有发生肛瘘。近年研究表明,肠道菌群的动态平衡与人体健康密不可分,一旦发生紊乱会引发多种疾病^[5]。肛瘘患者,特别是复杂性肛瘘患者是否存在有异于健康人群的肠道微生态,才导致肛瘘的发生呢? 目前这方面的研究尚未见报道,为了验证这一假说,我们利用高通量测序技术,检测并分析了复杂性肛瘘患者与健康人群肠道菌群的多样性差异,以期为后续研究提供基础。

资料与方法

一、研究对象

采用病例对照研究方法。

(一)病例组纳入标准和排除标准

纳入标准:(1)符合腺源性肛瘘诊断的标准^[1],且症状持续3个月以上;(2)复杂性肛瘘的定义为符合下面情况之一者:瘘管跨越2/3及以上的肛门括约肌;包含两个以上的外口或瘘管;既往已行肛瘘手术后确认复发者^[4]。

排除标准:(1)合并有炎性肠病、慢性腹泻或便秘、糖尿病、消化道恶性肿瘤、肝肾功能障碍等;(2)克罗恩病、外伤、特殊感染(如放线菌病和结核病)等引起的肛瘘;(3)近1个月内使用过抗生素、益生元、益生菌等可能影响肠道微生态制剂者;(4)认知缺陷不能配合者。

根据上述标准,回顾性收集杭州市第三人民医院2020年6—12月期间接受手术治疗的30例复杂性肛瘘患者临床资料,设为病例组(复杂性肛瘘组)。

(二)对照组选择方法

以1:1配比选取本院健康体检的人群30例作为对照组(健康对照组),配比条件包括年龄、性别、体质指数(body mass index, BMI)等。

两组间性别、年龄、BMI、饮酒吸烟史基线资

料比较差异均无统计学意义(均 $P>0.05$),见表1。本研究经医院伦理委员会审批通过(审批号:Y-KL2020015),所有受试者均知情并签署标本采集同意书。

二、粪便样本收集与保存

嘱受试者收集新鲜清洁粪便约2 g置于粪便采样盒内,注意收集粪便时应避免收集尿液污染和固体残渣部分,女性受试者收集粪便应在月经干净4~5 d后,避免血液污染粪便。收集到的粪便样本在30 min内放置于超低温冰箱(-80°C)内保存备用。

三、粪便细菌DNA的提取、扩增和纯化

取大约50 mg粪便样品,按照粪便微生物DNA提取试剂盒(Minka Gene Stool DNA kit)说明书的要求提取每个粪便样品中的总微生物DNA。选取微生物16S rDNA基因的V4可变区进行扩增。正向引物为514F-5'GTGCCAGCMGCCGCGGTAA3',反向引物为1063R-5'ACAGCCATGCANCACCT3'。扩增反应选择20 μl PCR反应体系。接着用含溴化乙锭的2%的琼脂糖凝胶回收所得到的PCR产物,将所得到的PCR产物进行纯化(利用AxyPrep DNA凝胶回收试剂盒切割凝胶),用Tris-HCl洗脱纯化后的PCR产物,并在150 V下电泳30 min,分析提取基因组DNA的质量。

四、肠道菌群高通量测序

依据Illumina Miseq平台的操作流程进行文库构建,并委托博奥生物科技有限公司完成肠道菌群DNA16S rRNA高通量测序。去除重叠长度<10 bp或者错配率>0.2的不合格序列。

五、生物信息学分析

1. 操作分类单元(operational taxonomic unit, OTU)聚类:OTU的提出目标是指定一个定量策略,不同的16S rRNA序列同源性>97%就可以定义为一个OTU,每个OTU对应于一个不同的16S rRNA序列,也就是每个OTU对应一个不同的细菌(微生物)种。通过OTU分析来判断样品中的微生物多样性和不同微生物的丰度。

表1 复杂性肛瘘组与健康对照组临床基线资料比较

组别	例数	性别[例(%)]		年龄 (岁, $\bar{x}\pm s$)	体质指数 (kg/m^2 , $\bar{x}\pm s$)	饮酒史 [例(%)]	吸烟史 [例(%)]
		男	女				
复杂性肛瘘组	30	12(40.0)	18(60.0)	33.48 $\pm$ 14.64	22.38 $\pm$ 1.96	14(46.7)	9(30.0)
健康对照组	30	14(46.7)	16(53.3)	30.64 $\pm$ 11.76	21.49 $\pm$ 2.53	13(43.3)	10(33.3)
统计值		$\chi^2=0.271$		$t=0.738$	$t=0.575$	$\chi^2=0.067$	$\chi^2=0.077$
P值		0.602		0.470	0.660	0.795	0.781

2. Alpha 多样性分析: Alpha 多样性分析中的主要指标包括 Chao 指数、ACE 指数、Simpson 指数、Shannon 指数等。通过这些指标的计算分析,可了解单样本中微生物的丰度以及多样性。ACE 和 Chao 指数反映样本中 OTU 的丰度, Shannon 和 Simpson 指数反映样本中 OTU 的多样性。ACE 或 Chao 指数越大,表明微生物区系的预期物种丰度越高, Simpson 指数越小或 Shannon 指数越大,表明微生物区系的多样性越高。

3. LEfSE 分析:主要是实现多个分组及其亚组之间比较,从而找到组间在丰度上有显著差异的物种。本研究中, LDA 值绝对值 >4 设定为丰度上有显著差异。

六、统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计软件对数据进行分析整理。对呈正态分布且方差齐性的计量资料使用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用配对 t 检验。计数资料用百分数表示,组间比较采用配对 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 时差异有统计学意义。

结 果

一、测序和质量控制

对 60 例粪便样本微生物基因组进行高通量测序,共计收集 848 775 条序列,其中复杂性肛瘘组和健康对照组的总序列分别为 363 900 条和 484 875 条。去除所有不合格的序列后,复杂性肛瘘组和健康对照组最终获得的有效序列分别为 (45 497 ± 3 938) 条和 (48 478 ± 1 641) 条,两组比较差异无统计学意义

($t = 0.724, P = 0.462$)。序列分析结果显示,两组共测得 675 个 OTU,组间 OTU 相似度达到 97%,其中复杂性肛瘘组有 603 个 OTU,健康对照组 579 个 OTU;两组共有的 OTU 数为 507 个,复杂性肛瘘组与健康对照组特有的 OTU 数分别为 96 个和 72 个。

二、Alpha 多样性分析

Alpha 多样性分析结果显示:复杂性肛瘘组患者肠道菌群的 ACE 指数、Chao 指数和 Shannon 指数均高于健康对照组,而在 Simpson 指数低于健康对照组,差异均具有统计学意义(均 $P < 0.05$)。见表 2。表明复杂性肛瘘组患者肠道菌群的多样性更为丰富。

三、物种及其丰度分析

1. 门水平方面的比较:对样本各 OTU 聚类分析后发现,在门水平上,复杂性肛瘘组与健康对照组样本中肠道微生物均主要由厚壁菌门、拟杆菌门、变形菌门、梭杆菌门、放线菌门这 5 门菌群组成,两组上述菌群水平比较差异没有统计学意义(均 $P > 0.05$)。复杂性肛瘘组和健康对照组共同的优势菌为厚壁菌门和拟杆菌门,分别占总门数的 93.4% ± 32.0% 和 87.4% ± 41.2%。见表 2。

2. 属水平方面的比较:在属水平上,与健康对照组相比,复杂性肛瘘组中普雷沃菌属巨单胞菌属和毛螺菌属的丰度更高,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);复杂性肛瘘组变形菌属、肠球菌属、拟杆菌属和克雷伯菌属则要低于健康对照组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。见表 3。

四、LEfSE 分析

两组微生物组相对丰度的 LEfSE 分析结果显

表 2 复杂性肛瘘组与健康对照组肠道菌群 Alpha 多样性比较

组别	例数	ACE 指数	Chao 指数	Shannon 指数	Simpson 指数
复杂性肛瘘组	30	293.30 ± 44.00	318.40 ± 41.99	3.36 ± 0.29	0.103 ± 0.013
健康对照组	30	218.75 ± 33.83	250.00 ± 46.38	2.43 ± 0.34	0.131 ± 0.013
t 值		102.069	77.818	9.657	5.551
P 值		<0.001	0.028	0.001	0.046

表 3 复杂性肛瘘组与健康对照组粪便菌群门、属水平和分布比较(%)

组别	例数	门水平					属水平						
		厚壁菌门	拟杆菌门	变形菌门	梭杆菌门	放线菌门	普雷沃菌属	巨单胞菌属	毛螺菌属	变形菌属	肠球菌属	拟杆菌属	克雷伯菌属
复杂性肛瘘组	30	55.3 ± 22.4	38.1 ± 19.6	4.2 ± 10.4	1.9 ± 6.9	0.5 ± 4.3	4.9 ± 7.4	3.9 ± 8.2	2.6 ± 5.7	0.02 ± 4.2	0.02 ± 2.3	24.7 ± 9.9	0.4 ± 4.2
健康对照组	30	48.0 ± 20.9	39.4 ± 20.3	10.9 ± 17.2	0.1 ± 1.7	1.3 ± 4.5	0.1 ± 1.1	0.5 ± 4.2	0.1 ± 3.4	9.3 ± 14.4	9.3 ± 19.6	29.8 ± 9.1	3.9 ± 7.3
t 值		1.305	0.252	1.826	0.694	0.704	3.514	2.021	2.063	3.389	2.576	2.077	2.276
P 值		0.197	0.802	0.073	0.491	0.484	<0.001	0.048	0.044	0.001	0.013	0.042	0.027

示,复杂性肛瘘组中韦荣菌科(*Veillonellaceae*)(LDA 值=4.896)、*Selenomonadales*(LDA 值=4.637)和厌氧菌纲(*Negativicutes spp*)(LDA 值=4.577)丰度更高;而健康对照组的另枝菌属(*Alistipes*)(LDA 值=-4.165)、理研菌科(*Rikenellaceae*)(LDA 值=-4.025)和 *Lachnoclostridium*(LDA 值=-4.799)的丰度较高。见图 1。

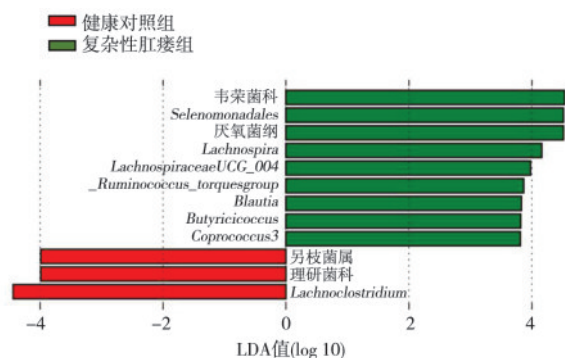


图 1 复杂性肛瘘组与健康对照组肠道菌群物种相对丰度的 LefSe 分析

讨 论

肛瘘为常见的肛周良性疾病之一,发病率高,临床症状多变^[1]。虽不是致命性疾病,但其复杂多样的症状严重影响患者的社交、亲密关系和工作生活。手术是治疗肛瘘的主要方法,但是,复杂性肛瘘对于肛肠外科医生仍是一个巨大的挑战。治疗的过程需要平衡肛瘘复发的风险与患者肛门括约肌的功能保护。

肛瘘的发病机制目前尚不完全明确。目前公认的关于肛瘘发病机制的隐窝腺感染学说,历经半个多世纪还有很多值得商榷的地方。首先,它并不能解释为何有些人好发肛瘘;其次,曾有研究分析了 53 个肛瘘患者的瘘管,结果并未发现任何腺上皮^[6]。我们推测,细胞因子和肠道免疫屏障失衡在肛瘘的发病中占据重要地位。

肠道菌群在人体内的数量十分庞大,其通常处于一种动态平衡状态,与人体健康密不可分。肠道菌群和宿主间是相辅相成、相互作用的共生关系。肠道菌群处于某种稳态可提高患者肠道免疫,加强营养物质代谢吸收,维持人体健康。

目前,国内外尚未见原发性肛瘘和肠道微生物群的相关性研究。因此,在本研究中我们收集了腺源性肛瘘患者的粪便标本,通过 16S rDNA 基因测

序检测并分类细菌种类,并与健康对照组进行比较。本研究结果表明:(1)复杂性肛瘘组和健康对照组共同的优势菌为厚壁菌门和拟杆菌门;(2)与健康对照组相比,复杂性肛瘘组肠道菌群的结构和丰度具有较大差异,在属水平上,复杂性肛瘘组普雷沃菌属、巨单胞菌属和毛螺菌属的丰度明显更高,变形菌属和肠球菌属的丰度则更低;(3)LEfSe 分析提示韦荣菌科、*Selenomonadales* 目和厌氧菌纲(均属于厚壁菌门)等主要菌株总体上对两组肠道菌群差异的影响最大。

既往研究表明,微生物在形成免疫反应、调节疾病活动和控制局部组织愈合方面起着重要作用。普雷沃菌属隶属于拟杆菌门,是一种革兰阴性的专性厌氧杆菌,其丰度与辅助性 T 细胞 17(Th17)介导的黏膜炎性反应增强有关,其可能的机制是 Toll 样受体(Toll-like receptors, TLR)-2 的激活、下游的 IL-23 和 IL-1 的产生,以及中性粒细胞的募集,它们的存在可能引发持续的炎症反应^[7]。

巨单胞菌属(*Negativicutes* 纲,厚壁菌门)细胞壁的外壁层中的脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)包膜可与巨噬细胞表面的 TLR4 特异性结合,引发炎症级联反应^[8]。毛螺菌属和巨单胞菌属一样隶属于厚壁菌门,革兰弱阳性,其主要存在与肠道黏膜层,可以降解黏蛋白,产生短链脂肪酸(short-chain fatty acids, SCFA),而 SCFA 是公认可改变肠道黏膜通透性,导致炎症反应的重要代谢物质^[9]。因此,我们推测普雷沃菌属、巨单胞菌属和毛螺菌属丰度增加可促进炎症反应,导致肛瘘的发生。

LEfSe 分析提示,复杂性肛瘘组韦荣菌科、*Selenomonadales* 目和厌氧菌纲(均属于厚壁菌门)的主要菌株显著增加,另枝菌属、理研菌科和 *Lachnoclostridium* 的丰度则有所下降。其中韦荣菌科为革兰阴性的厌氧菌,目前的研究认为,于韦荣菌科与牙周炎、脑膜炎、关节炎等炎症性疾病有关,所以其丰度增加可能与肛瘘发生相关,值得进一步研究验证^[10]。*Selenomonadales* 目隶属于厌氧菌纲,能降解淀粉和纤维素,据报道新生儿坏死性小肠结肠炎该菌数量下降,表明该均属对肠道可能有保护作用^[11]。其在肛瘘患者中的上调是否为继发性的应激变化还有待进一步研究。

肠道菌群的改变能刺激机体产生各类细胞因子参与创口愈合。因此,我们推测肠道菌群的变化可能引起肛瘘患者瘘管形成并慢性化演变,导致瘘

管组织持续不愈合。Haac 等^[12]曾对 17 例克罗恩病肛瘘患者进行了肠道微生物群的高通量检测,发现其与健康对照组相比,无色杆菌和棒状杆菌含量均有显著提高,而链球菌和双歧杆菌则有明显下调。这与本研究结果存在较大差异,可能与入选病例背景差异、克罗恩病本身造成的肠道菌群改变等因素直接相关。

总而言之,对于肛瘘细菌学的研究中,尚有大量无法证明的细菌种类^[13-15]。而在持续性瘘管病例中,光有细菌微生态的研究也是不全面的,可能在今后的研究中要增加检测的范围,将病毒、支原体,甚至寄生虫等致病微生物纳入研究范围。

不可否认,本研究存在如下局限性:首先,本研究入组人群均来自单中心的门诊和住院患者,有明显地域局限性。其次,为了尽可能显示复杂性肛瘘与健康对照组之间的差异以阐明研究初衷欲证实的目标,此次纳入的肛瘘病例均为复杂性肛瘘,尽管我们认为,复杂性肛瘘和单纯性肛瘘就发病的本质是一致的,但其在发病的病理生理过程的细节上可能与后者存在差异。所以,今后的研究中需进一步增加样本量,纳入单纯性肛瘘的患者。此外,虽然细菌 rRNA 包含高度保守的共享核苷酸序列的基序,但这种方法对一些属[如肠杆菌属(*Enterobacteriaceae*)和不动杆菌属(*Acinetobacter spp.*)]的鉴别能力较弱,DNA 亲缘关系的倒数分辨率能力相对较差。

总之,本研究表明,与健康对照组相比,复杂性肛瘘病例中的细菌微生物群存在明显差异,其中一些菌种及其代谢产物可能跟涉及瘘管持续不愈合相关。该研究为进一步理解肛瘘的发病机制提供了新的视角,为将来研发新的肛瘘治疗方案提供了初步的理论基础。未来的研究必将在更广泛的人群样本中证实隐匿性肛瘘主要的微生物失调,并将其与瘘管上皮化、抗菌肽表达,以及促炎性细胞因子微环境相关联。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 裘建明提出整个研究的设想,制定了技术路线和研究方案,撰写了论文初稿;杨关根对整个研究质量进行了把控,协调各人员之间的分工配合,对论文进行了多次的修改;王东和陈金明主要负责具体实验的实施和数据的统计分析;沈忠和邵书先协助收集了部分病例和样本

参 考 文 献

- [1] Sugrue J, Nordenstam J, Abcarian H, et al. Pathogenesis and persistence of cryptoglandular anal fistula: a systematic review[J]. Tech Coloproctol, 2017, 21(6): 425-432. DOI: 10.1007/s10151-017-1645-5.
- [2] Gosselink MP, van Onkelen RS, Schouten WR. The cryptoglandular theory revisited[J]. Colorectal Dis, 2015, 17(12):1041-1043. DOI: 10.1111/codi.13161.
- [3] Hu Z, Yan C, Liu P, et al. Crystal structure of NLRC4 reveals its autoinhibition mechanism[J]. Science, 2013, 341(6142): 172-175. DOI: 10.1126/science.1236381.
- [4] Parés D. Pathogenesis and treatment of fistula in ano[J]. Br J Surg, 2011, 98(1):2-3. DOI: 10.1002/bjs.7341.
- [5] Kunz C, Kuntz S, Rudloff S. Intestinal flora[J]. Adv Exp Med Biol, 2009, 639:67-79. DOI:10.1007/978-1-4020-8749-3_6.
- [6] Leonie B, Anastasios G, Nicola G, et al. Regulation of TH17 cells and associated cytokines in wound healing, tissue regeneration, and carcinogenesis[J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(5):1033. DOI: 10.3390/ijms18051033.
- [7] Larsen JM, Musavian HS, Butt TM, et al. Chronic obstructive pulmonary disease and asthma-associated proteobacteria, but not commensal prevotella spp., promote toll-like receptor 2-independent lung inflammation and pathology[J]. Immunology, 2015, 144(2): 333-342. DOI: 10.1111/imm.12376.
- [8] Park BS, Song DH, Kim HM, et al. The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex[J]. Nature, 2009, 458(7242): 1191-1195. DOI: 10.1038/nature07830.
- [9] 马超, 贺毅, 孙作厘, 等. 基于 16SrRNA 技术分析石珍安神汤对脱髓鞘小鼠肠道菌群多样性的影响[J]. 首都医科大学学报, 2020, 41(1): 64-70. DOI: 10.3969/j.issn.1006-7795.2020.01.013.
- [10] Berry D, Kuzyk O, Rauch I, et al. Intestinal microbiota signatures associated with inflammation history in mice experiencing recurring colitis[J]. Front Microbiol, 2015, 6: 1408. DOI: 10.3389/fmicb.2015.01408.
- [11] Pangallo D, Drahovská H, Harichová J, et al. Assessment of environmental enterococci: bacterial antagonism, pathogenic capacity and antibiotic resistance[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2008, 94(4):555-562. DOI:10.1007/s10482-008-9272-9.
- [12] Haac BE, Palmateer NC, Seaton ME, et al. A distinct gut microbiota exists within Crohn's disease-related perianal fistulae[J]. J Surg Res, 2019, 242:118-128. DOI:10.1016/j.jss.2019.04.032.
- [13] Lunniss PJ, Faris B, Rees HC, et al. Histological and microbiological assessment of the role of microorganisms in chronic anal fistula[J]. Br J Surg, 1993, 80(8):1072. DOI: 10.1002/bjs.1800800853.
- [14] Seow-Choen F, Hay AJ, Heard S, et al. Bacteriology of anal fistulae[J]. Br J Surg, 1992, 79(1):27-28. DOI:10.1002/bjs.1800790107.
- [15] Whitehead SM, Leach RD, Eykyn SJ, et al. The aetiology of perirectal sepsis[J]. Br J Surg, 1982, 69(3): 166-168. DOI: 10.1002/bjs.1800690319.