

肠道菌群失调与原发肝癌的关系研究

梁素妨¹, 许琳¹, 张东生², 黄维清³ (1.青岛大学附属青岛市市立医院 消化内科, 山东 青岛 266000; 2.青岛大学附属青岛市市立医院 肝胆外科, 山东 青岛 266000; 3.青岛大学附属青岛市市立医院 病理科, 山东 青岛 266000)

摘要: 目的 探讨原发性肝癌患者中小肠细菌过度生长 (small intestinal bacterial overgrowth, SIBO) 情况及肠道菌群和Toll样受体4 (TLR4) 在原发性肝癌发生、发展中的作用。方法 选取青岛大学医学院附属青岛市市立医院2013年7月至2015年7月原发性肝癌患者51例, 其中男性38例, 女性13例, 年龄36~73岁, 平均 (55.71 ± 8.99) 岁, 选取同期20例健康体检者为对照, 行葡萄糖氢呼气试验 (GHBT) 检查小肠细菌过度生长情况, 并用免疫组织化学的方法检查肝癌患者和健康体检者肝脏组织中TLR4的表达情况。结果 51例肝癌患者中GHBT阳性37例 (72.6%), GHBT阴性14例 (27.4%); 对照组中无GHBT阳性者, 肝癌患者与对照组SIBO发生率差异有统计学意义 ($\chi^2 = 30.3$, $P = 0.000$)。Toll样受体4 (Toll-like receptor 4, TLR4) 在肝癌组织中均有不同程度的表达, 而在正常肝组织中仅有少量表达, 差异有显著统计学意义, 且肝癌患者中GHBT阳性者肝癌组织TLR4的表达水平高于GHBT阴性者 ($\chi^2 = 5.088$, $P = 0.024$)。结论 原发性肝癌患者容易发生SIBO, 且肠道菌群可能通过TLR4的表达促进肝癌的发生。

关键词: 原发性肝癌; SIBO; Toll样受体4; GHBT; 免疫组化

Relationship between intestinal dysbacteriosis and primary liver cancer

LIANG Su-fang¹, XU Lin¹, ZHANG Dong-sheng², HUANG Wei-qing³ (1. Department of Gastroenterology, Qingdao Municipal Hospital Affiliated to Qingdao University, Qingdao 266000, Shandong Province, China; 2. Department of Hepatobiliary Surgery, Qingdao Municipal Hospital Affiliated to Qingdao University, Qingdao 266000, Shandong Province, China; 3. Department of Pathology, Qingdao Municipal Hospital Affiliated to Qingdao University, Qingdao 266000, Shandong Province, China)

Abstract: Objective To discuss the condition of small intestinal bacterial overgrowth (SIBO) in patients with primary liver cancer and the roles of intestinal flora and toll-like receptor 4 (TLR4) in the occurrence and development of primary liver cancer. **Methods** Total of 51 patients with primary liver cancer in Qingdao Municipal Hospital Affiliated to Qingdao University from July 2013 to July 2015 and 20 healthy controls were selected. Among the 51 patients with primary liver cancer, 38 cases were male and 13 cases were female, the average age was (55.71 ± 8.99) years old. The glucose hydrogen breath test (GHBT) was used to detect the condition of SIBO and the immunohistochemical method was used to detect the expression of TLR4 in liver tissue of all subjects. **Results** Of 51 patients with primary liver cancer, 37 (72.6%) were GHBT positive and 14 (27.4%) were GHBT negative, while in the control group, none was GHBT positive. The difference in the incidence of SIBO between liver cancer patients and control group was statistically significant ($\chi^2 = 30.3$, $P = 0.000$). The expressions of TLR4 were different in all liver cancer tissues, and in normal liver tissue it had only a small amount of expression. In patients with liver cancer, the expression level of TLR4 in GHBT positive patients was higher than that of GHBT negative ($\chi^2 = 5.088$, $P = 0.024$). **Conclusion** Patients with primary liver cancer are prone to SIBO, and the intestinal flora may promote the occurrence of liver cancer through the expression of TLR4.

Key words: Primary liver cancer; SIBO; Toll-like receptor 4; GHBT; Immunohistochemistry

肠道细菌移位是慢性肝病的常见表现,它可促进肝炎、肝纤维化的发展^[1]。而病毒性肝炎、肝硬化是原发性肝癌的主要病因。研究表明^[2-4],肝病者小肠细菌过度生长(small intestinal bacterial overgrowth, SIBO)的发生率较高。肝病患者特别是发生肝功能衰竭时,肠道细菌明显上移,造成胃及小肠内的细菌大量繁殖,产生大量代谢产物及内毒素,破坏肠黏膜屏障,从而引起肠道菌群移位、过度生长和内毒素血症。而细菌内毒素则可通过介导TLR4依赖的胞内信号转导途径导致炎性因子大量释放,从而造成组织和器官的进一步损伤。有动物实验^[5]显示:肠道菌群和TLR4可引发慢性肝损伤、肝炎、肝纤维化进而促进肝细胞癌的发生。然而,在临床实践中相关的研究却鲜见报道。为此,本研究检测原发性肝癌患者中SIBO发生情况及TLR4在肝癌组织中的表达及意义。

1 材料与方法

1.1 一般资料 收集青岛大学医学院附属青岛市立医院肝胆外科2013年7月至2015年7月手术切除经病理证实的原发性肝癌51例,其中男性38例,女性13例,年龄36~73岁,平均(55.71 ± 8.99)岁,血清学检测证实患者均有乙型肝炎病毒感染史。所有原发性肝癌患者术前未行放射治疗和化疗治疗,且在近1个月内未使用抗生素或其他影响胃肠动力的药物如多潘立酮、美托洛尔等;未使用泼尼松、抗抑郁药、阿片类药物;无糖尿病、甲状腺疾病、硬皮病、假性肠梗阻、功能性胃肠病等引起胃肠动力改变的疾病;无结肠镜检查及灌肠治疗史。所有标本手术切除后经10%甲醛固定石蜡包埋切片行免疫组化染色。选择20例健康体检者作为对照组,男性10例,女性10例,年龄32~60岁,平均(51.23 ± 10.07)岁。

1.2 方法

1.2.1 葡萄糖氢呼气试验(glucose hydrogen breath test, GHBT) 所有患者在接受治疗前均进行葡萄糖氢呼气试验,采用HHBT-01型呼气氢测试仪(深圳市中核海得威生物科技有限公司),按其操作规程进行检测。先测空腹氢气浓度,然后口服葡萄糖50 g(50%葡萄糖液100 ml),每20分钟测试1次呼气氢浓度,共2小时,试餐后呼气氢浓度上升超过 12×10^6 为SIBO阳性,反之为阴性。

1.2.2 主要试剂 兔抗人TLR4多克隆抗体购自湖北武汉Elabscience公司,辣根酶标羊抗小鼠/兔IgG聚合物购自北京中杉金桥生物技术有限公司,免疫组化

试剂盒和DAB显色试剂盒购自福州迈新生物技术开发有限公司。

1.2.3 免疫组织化学分析 所有标本蜡块做4 μm连续切片,用二甲苯及乙醇脱蜡处理,PBS洗片后,用柠檬酸高压法进行抗原修复,后滴加3%过氧化氢溶液以阻断内源性过氧化物酶的作用,PBS洗片后加入一抗稀释液(1:200)4℃冰箱过夜,二抗37℃孵育30分钟,PBS洗片,DAB显色,苏木精复染,组织透明,树胶封片。设立阴性对照,以PBS代替一抗。

免疫组织化学染色及结果判定:出现黄色或棕黄色颗粒为阳性,评分标准采用综合评价法,每张切片随机观察100个细胞。染色范围评分标准:无阳性细胞为0分,0~30%阳性细胞为1分,31%~60%阳性细胞为2分,>60%阳性细胞为3分。染色强度评分标准:无染色为0分,染色颗粒黄、细、成堆为1分,染色颗粒深黄、粗、成片为2分,染色颗粒棕黄、粗大、成片为3分。两个评分相加即为肿瘤细胞的免疫组织化学染色得分,0~3分为低表达,4~6分为高表达^[6]。

1.3 统计学方法 应用SPSS 19.0软件对结果进行统计学分析,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,其中两组独立样本均数比较用 t 检验,样本率比较用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 GHBT检测结果 51例肝癌患者经GHBT检测,37例(72.6%)为SIBO阳性,14例(27.4%)为SIBO阴性,20例健康对照组中无SIBO阳性者,差异有统计学意义($\chi^2 = 30.3, P = 0.000$)

2.2 免疫组织化学染色结果分析

2.2.1 染色情况 TLR4主要表达于细胞质及部分细胞膜上,而细胞核及汇管区无表达。所有肝癌组织标本均可见不同程度TLR4的表达,其中TLR4蛋白高表达31例(60.8%),低表达20例(39.2%)。正常肝组织中TLR4蛋白仅有极低量的表达。见图1、图2。

2.2.2 肝癌组织中TLR4的表达与临床病理参数的关系 从表1中可看出,肝癌组织中TLR4的表达水平与患者性别、年龄及肿瘤大小无关($P > 0.05$),而与TNM分期、肿瘤分化程度、SIBO及是否伴有肝炎、肝硬化等因素相关($P < 0.05$)。

3 讨论

原发性肝癌是我国常见的恶性肿瘤之一。国内有文献报道,肝癌患者容易发生SIBO^[7]。胃肠道是肝病影响最早也是最严重的肝外器官,肝病越重,

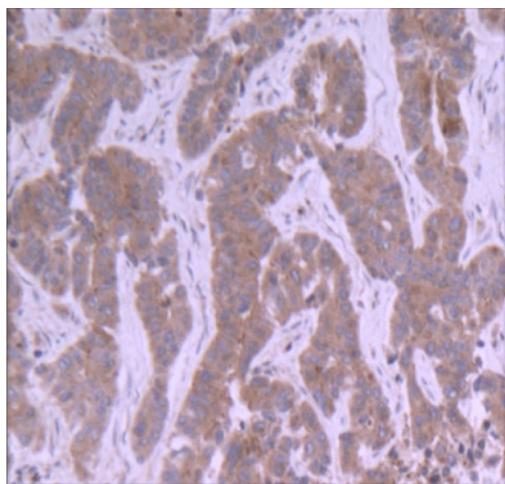


图1 TLR4在肝癌组织中的阳性表达(SP染色, 100×)

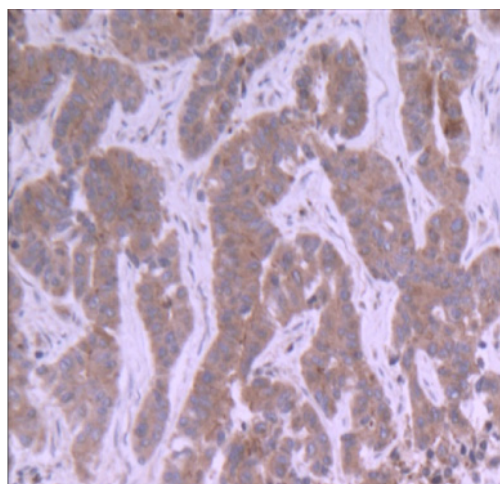


图2 TLR4在正常肝组织中的阴性表达(SP染色, 100×)

胃肠功能障碍越明显。目前肝癌的病因及发病机制尚不明确,一般认为病毒性肝炎、肝硬化与肝癌的发生发展有密切关系。肝癌患者,特别是合并肝硬化时,门脉高压使胃肠道淤血、水肿,影响胃的消化吸收功能,从而为肠道细菌的繁殖提供了适宜的环境;肝功能障碍,蛋白质合成减少,进一步加重胃肠道淤血、水肿,且通过神经-体液因素的调节抑制了消化道运动,抑制胃肠黏膜的分泌、吸收,抑制食欲,上述因素均可破坏肠道屏障功能,使肠黏膜通透性增加,引发肠道菌群的移位及过度生长。本研究亦显示,肝癌患者的SIBO阳性率为72.6%,而健康对照组SIBO全为阴性。此结果进一步证实了原发性肝癌患者容易发生SIBO。

小肠细菌过度生长(SIBO)主要表现为肠道益生菌的减少和致病菌的增多,通过益生菌的治疗可调节肠道菌群失调,抑制小肠细菌过度生长^[8]。在肝癌患者中,小肠细菌尤其是G-需氧菌过度繁殖或生长,可产生大量内毒素,导致肠黏膜通透性增高,屏障功能减弱^[9,10]。肝癌患者因正常肝实质细胞大量减少,致使肝库弗细胞和肝巨噬细胞清除和结合内毒素的能力大大降低,导致大量的内毒素通过破损的肠道黏膜和侧枝循环进入体循环,形成肠源性内毒素血症。

内毒素是革兰阴性菌细胞壁外膜上的一种脂多糖(lipopolysaccharides, LPS)与微量蛋白质的复合物, LPS是内毒素的活性成分。有研究显示,

表1 51例原发性肝癌患者肝癌组织中TLR4的表达与临床病理参数的关系(例)

临床病理	例数	TLR4		χ^2 值	P 值
		低表达	高表达		
性别					
男	38	16	22	0.522	0.470
女	13	4	9		
年龄(岁)					
≥ 50	36	14	22	0.005	0.941
< 50	15	6	9		
肿瘤大小(cm)					
≥ 4	27	9	18	0.833	0.361
< 4	24	11	13		
TNM分期					
I + II	38	18	20	4.157	0.041
III + IV	13	2	11		
组织学分化					
高、中分化	36	18	18	5.972	0.015
低、未分化	15	2	13		
SIBO					
阳性	37	11	26	5.088	0.024
阴性	14	9	5		
乙型肝炎、肝硬化					
有	28	6	22	8.241	0.004
无	23	14	9		

肝脏受损后,肝门脉系统和体循环系统的LPS水平明显增加^[11]。

Toll样受体4 (TLR4) 是能被某些病原微生物保守分子激活的一种模式识别受体,它可以识别病原体的病原相关分子模式(PAMPs),在天然免疫防御中起重要作用,并最终激活获得性免疫系统,其配体主要是LPS。有研究显示TLR4在肝脏各种疾病如HBV感染、酒精性肝损害、肝脏纤维化、肝脏缺血/再灌注损伤中有着重要作用^[12]。最初认为TLR4主要表达于免疫细胞尤其是巨噬细胞和树突状细胞表面^[13],然而目前有大量研究表明,TLR4在多种肿瘤细胞表面也有表达^[14]。Yu等^[15]首次对肠源性LPS在肝细胞癌发生中的作用进行了综合的研究,发现肠道的灭菌和TLR4的消耗可以降低肝细胞癌肿瘤的发生率和肿瘤的增长,并得出在用二乙基亚硝胺(DEN)诱导的动物模型中LPS的累积促进了肝细胞癌的发生。Dapito等^[5]运用二乙基亚硝胺(DEN)/四氯化碳(CCl₄)的小鼠模型进一步阐释了肠道菌群和TLR4在肝细胞癌发生中的特有作用,同时也证实了应用抗生素清除肠道菌群可使高达90%肝细胞癌的发生进展受到抑制。在本实验中,通过免疫组织化学法测得所有肝癌组织都不同程度的表达TLR4,而正常肝组织中仅有少量TLR4的表达。此结果与Wang等^[16]的研究结果相符。

另外,本研究亦显示,TLR4的表达水平与原发肝癌患者是否存在SIBO及是否伴有乙型肝炎、肝硬化等因素有关。其机制可能是肝病患者常存在肠道菌群失调,进而通过TLR4信号转导通路的激活,导致持续的慢性肝功能损伤、肝炎、肝纤维化,最终发展成肝癌。上述研究结果均说明肠道菌群和TLR4在肝癌的发生、发展过程中有着重要作用。

因此,可将调节肠道菌群、阻止肠道细菌移位或阻断炎症信号通路等作为治疗靶点,来预防某种癌症的发生和发展,以避免其对人体健康造成重大危害。然而,目前尚存在很多问题,大多数国内外的研究只限于动物模型或体外细胞培养,在人体内

的确切作用尚无法得到明确,还需大样本、多中心的临床研究来获取循证医学的证据。

参考文献

- [1] Schuppan D, Afdhal NH. Liver cirrhosis[J]. Lancet,2008,371:838-851.
- [2] 王为,周国华,冷明芳,等.酒精性肝病患者小肠细菌过度生长情况研究[J].中华临床医师杂志,2009,3:86-87.
- [3] Wigg AJ, Roberts-Thomson IC, Dymock RB, et al. The role of small intestinal bacterial overgrowth, intestinal permeability, endotox-aemia and tumour necrosis factor- α in the pathogenesis of non-alcoholic steatophepatitis[J]. Gut,2001,48:206-211.
- [4] 逢作祥,李晓东,吕晓军,等.小肠细菌过度生长与肝硬化的关系探讨[J].实用肝病杂志,2008,11:327-329.
- [5] Dapito DH, Mencin A, Gwak GY, et al. Promotion of Hepatocellular Carcinoma by the Intestinal Microbiota and TLR4[J]. Cancer Cell,2012,21:504-516.
- [6] 廖明媚,赵劲风,王宁,等. MMP-1在肝细胞癌中的表达及临床意义[J].中国现代医学杂志,2012,22:34-36.
- [7] 王为,刘峰,徐爱蕾,等.三种消化道恶性肿瘤小肠细菌过度生长情况的研究[J].医学综述,2011,17:946-947.
- [8] 姜彬言,王巧民.益生菌治疗肠易激综合征的相关机制[J].医学综述,2011,17:2358-2360.
- [9] Markell TA, Crisostomo PR, Wairiuko GM, et al. Cytokines in necrotizing enterocolitis[J]. Shock,2006,25:329-337.
- [10] Dumas ME, Barton RH, Toye A, et al. Metabolic profiling reveals a contribution of gut microbiota to fatty liver phenotype in insulin-resistant mice[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2006,103:12511-12516.
- [11] Schwabe RF, Seki E, Brenner DA. Toll-like receptor signaling in the liver[J]. Gastroenterology,2006,130:1886-1900.
- [12] 陈圻,邓存良. TLR4在肝脏损伤中的作用研究进展[J].医学综述,2008,14:2897-2899.
- [13] Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors[J]. Annu Rev Immunol,2003,21:335-376.
- [14] Huang B, Zhao J, Li H, et al. Toll-like receptors on tumor cells facilitate evasion of immune surveillance[J]. Cancer Res,2005,65:5009-5014.
- [15] Yu LX, Yan HX, Liu Q, et al. Endotoxin accumulation prevents carcinogen-induced apoptosis and promotes liver tumorigenesis in rodents[J]. Hepatology,2010,52:1322-1333.
- [16] Lili Wang, Rong Zhu, Zhiqian Huang, et al. Lipopolysaccharide-induced toll-like receptor 4 signaling in cancer cells promotes cell survival and proliferation in hepatocellular carcinoma[J]. Dig Dis Sci,2013,58:2223-2236.

收稿日期: 2015-06-09