

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2023.02.008

单倍型造血干细胞移植后疾病复发患者肠道 微生物生态改变的临床分析*

杨 曦¹,黄家文¹,蒲文琪²,李成龙¹,叶雪梅²,毛 妍²,黄晓兵^{1△}

(1. 电子科技大学附属医院/四川省人民医院血液内科,成都 610000;2. 成都东篱医院血液内科,成都 610000)

[摘要] **目的** 探索单倍型移植体系中肠道微生物与移植后疾病复发的相关性。**方法** 对单倍型造血干细胞移植后疾病复发的 19 例患者(复发组)和同期移植未复发的 19 例患者(对照组)进行回顾性分析,采用扩增子测序法和宏基因组检测法分析两组之间的肠道微生物生态的差异。**结果** 与对照组相比,复发组中 Alpha 多样性指数趋于上升,肠道中有害菌数量增多。宏基因组分析显示在属和种 2 个水平中,复发组微生物种类较对照组明显增加。生物信息学分析显示,复发组营养代谢通路及相关因子失衡。**结论** 单倍型造血干细胞移植后疾病复发患者的肠道微生物生态存在紊乱,倾向于有害菌增加及其营养代谢通路失衡。

[关键词] 单倍型移植;移植后复发;肠道微生物;营养代谢通路失衡

[中图法分类号] R457.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2023)02-0200-05

Clinical analysis of intestinal microecological changes in patients with disease relapse after haplotype hematopoietic stem cell transplantation *

YANG Xi¹,HUANG Jiawen¹,PU Wenqi²,LI Chenglong¹,YE Xuemei²,MAO Yan²,HUANG Xiaobing^{1△}

(1. Department of Hematology, Affiliated Hospital, University of Electronic Science and Technology of China/Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu, Sichuan 610000, China; 2. Department of Hematology, Chengdu Dongli Hospital, Chengdu, Sichuan 610000, China)

[Abstract] **Objective** To explore the correlation between the intestinal microecology and disease relapse after transplantation in haplotype transplant system. **Methods** Nineteen patients with disease relapse after haplotype hematopoietic stem cell transplantation (relapse group) and 19 patients without disease relapse in contemporaneous transplantation (control group) were retrospectively analyzed. The amplicon sequencing and metagenomic detection methods were used to analyze the differences in the intestinal tract microecology between the two groups. **Results** Compared with the control group, the Alpha diversity index in the relapse group tended to increase and the number of harmful microbiota in the intestinal tract was increased. The metagenomic analysis showed that the microbial species at both genus and species levels in the relapse group were increased significantly. The bioinformatics analysis showed the imbalance of nutrient metabolic pathway and related factors in the relapse group. **Conclusion** The intestinal microbiota of the patients with disease relapse after haplotype hematopoietic stem cell transplantation has the disturbance, which tends to increase of harmful bacteria and imbalance of nutrient metabolic pathway.

[Key words] haplotype transplant; relapse after transplantation; intestinal tract microecology; imbalance of nutrient metabolic pathway

异基因造血干细胞移植是目前治愈急性白血病最有效的方法。近年来,单倍型造血干细胞移植技术突飞猛进,日臻成熟。相较于同胞全相合移植,单倍型造血干细胞移植具有远期复发率低的优势,但很多患者仍不可避免的遭遇复发。复发患者往往对化疗药物耐药,化疗后造血恢复慢,容易合并重症感染,导致生存期大大缩短。一项 351 例移植后复发的单中

心大样本回顾性分析提示:移植后复发患者的 3 年总生存期(OS)仅有 19%^[1]。肠道是人体免疫系统中关键的一环,体外各种物质透过饮食与肠道细胞及共生菌群交互作用,最终形成免疫屏障以保持人体健康^[2]。小鼠的体内实验证实,移植预处理损伤、抗菌药物使用、感染等因素,会对肠道微生物生态造成不同程度的损伤,进而增加移植后移植物抗宿主病(GVHD)

* 基金项目:成都市科技局技术创新项目(2019-YF05-00638-S1V);四川省科技计划项目(2021YJ0189)。 作者简介:杨曦(1983—),主治医师,博士,主要从事造血干细胞移植后复发的机制及免疫重建的研究。 △ 通信作者,E-mail:huangxiaobing@med.uestc.edu.cn。

的发生率^[3-4]。最近的一项大样本研究分析了来自 4 个不同中心的 1 362 例异基因造血干细胞移植患者(主要为同胞全相合和非血缘移植)的 8 767 份粪便样本,同样显示了较低的肠道多样性与移植相关死亡(TRM)和重度 GVHD 存在明显相关性^[4]。PELED 等^[5]通过对前瞻性收集的粪便样本进行 16S 核糖体测序,对 541 例接受异基因造血干细胞移植(71%为非血缘移植)治疗的患者肠道微生态情况分析发现,肠道菌群中一组细菌的丰度与移植术后疾病复发、进展之间存在关联,这也许可作为潜在的生物标志物或治疗靶点来预防移植后复发并提高生存率。与同胞全相合移植和非血缘移植相比,单倍型造血干细胞移植在免疫重建、复发方面具有自身的独特性^[6-7],主要体现在免疫重建后期的免疫耐受上。单倍型造血干细胞移植由于持续存在人类白细胞抗原不相合导致的异体反应性 T 细胞,使患者持续获得移植物抗白血病效应(GVL),因此复发率明显低于同胞全相合移植。这种 GVL 的实现,与肠道微生态存在关联,而具体的相关性尚不清楚。因此,本研究探讨单倍型造血干细胞移植后疾病复发患者肠道微生态的改变。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2019 年 8 月至 2021 年 8 月于四川省人民医院行异基因造血干细胞移植患者 38 例为研究对象,分为术后出现疾病复发(复发组 19 例)和术后未出现疾病复发(对照组 19 例),配对成 19 对。所有患者采集粪便样本前 1 个月内不能使用肠道菌群制剂、广谱抗生素。患者临床信息见表 1。

表 1 患者临床信息(n=19)

项目	对照组	复发组	P
性别(n)			
男	11	10	>0.05
女	8	9	
年龄[M(P ₂₅ ,P ₇₅),岁]	32.5(17.0,54.0)	40.0(18.0,52.0)	>0.05
疾病类型(n)			
急性淋巴细胞白血病	7	8	
急性髓细胞白血病	9	9	
慢性粒细胞白血病急变	2	1	
慢性粒单核细胞白血病	1	1	
移植类型(n)			
单倍型	17	18	>0.05
同胞全相合	2	1	
移植到复发时间[M(P ₂₅ ,P ₇₅),d]	267(162,327)	236(158,310)	>0.05

1.2 方法

1.2.1 粪便标本微生物的扩增子测序

所有患者收集粪便,立即置于无菌采样盒内,-80℃低温冷冻保存。取 200 mg 样品采用 QIAamp DNA Stool Mini Kit 试剂盒(QIAGEN)快速提取和纯化 DNA,委托协云基因信息技术有限公司

完成 16S rDNA 基因测序,使用 QIIME 软件进行测序数据处理并对获得的高质量序列进行分析比对。

1.2.2 粪便标本病原微生物宏基因组二代测序(mNGS)检测

在 38 例(19 对)患者中,根据扩增子结果,为进一步明确差异病原菌具体的种名及相关生物信息学特性,选择其中有代表性的 14 例(7 对)患者的粪便标本进行病原微生物 mNGS 检测,委托协云基因信息技术有限公司完成。提取送检样本中的所有核酸物质,包括 DNA/RNA,进行高通量测序,经过专用病原数据库比对与生物信息学分析,基于物种和功能丰度信息进行丰度柱状图、Alpha 多样性、beta 多样性及基于 Wilcox 秩和检验、LEfSe 多元统计分析及代谢通路比较分析,以挖掘样本(组)之间物种和功能组成的差异。另外,基于以上宏基因组标准分析的结果进行一系列高级分析,例如 NMDS、CCA/RDA、Network、CAG/MGS、肠型分析、ARDB 抗性基因注释等分析;同时,可以结合转录组、代谢组及蛋白组数据进行多组学的关联分析评估粪便菌群的种类、多样性、代谢通路等指标^[8]。

1.3 统计学处理

采用 SPSS23.0 统计软件进行分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验;不符合正态分布的计量资料以 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示,采用非参数 Kruskal-wallis 检验;计数资料以例数或率表示,采用 χ^2 检验或 Fisher 确切概率法。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Alpha 多样性指数分析

在复发人群中出现了 Alpha 多样性指数的上升趋势,代表其肠道中微生物数目趋于增加。这种增加的趋势结合物种构成及差异分布情况来看,提示在复发人群中有害菌有升高趋势,见图 1。

2.2 宏基因组分析

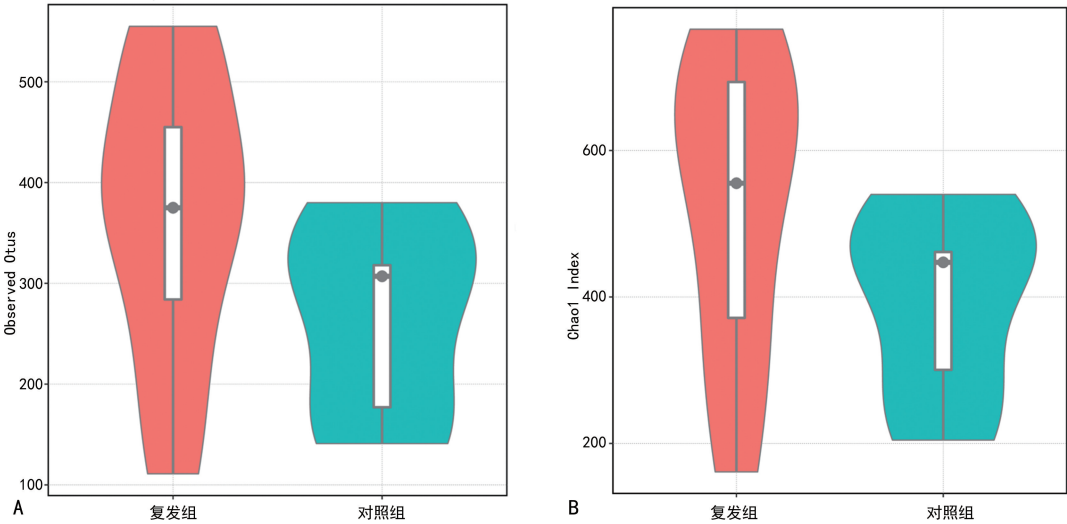
与对照组相比,复发组检测到更多的微生物种类,无论是在属水平,还是在种水平。属水平:与对照组相比,复发人群中 enterococcus(肠球菌属)和 escherichia(埃希氏菌属)物种丰度较低,bacteroides(拟杆菌属)、roseburia、blautia(布劳特氏菌属)、clostridium(梭菌属)和 ruminococcus(瘤胃球菌属)物种丰度较高(图 2A)。种水平:与对照组相比,复发人群中 enterococcus faecium(屎肠球菌)和 bifidobacterium animalis(动物双歧杆菌)丰度下调,bacteroides vulgatus(普通拟杆菌)、roseburia intestinalis(肠道蔷薇菌)、bacteroides xylanisolvens(木杆菌)丰度上调(图 2B)。此外,图 2 中也展示了 GVHD 组微生物构成的情况,由于 GVHD 组例数太少,没有进行进一步分析。

2.3 生物信息学分析

与对照组相比,复发组乳糖、半乳糖及蔗糖降解

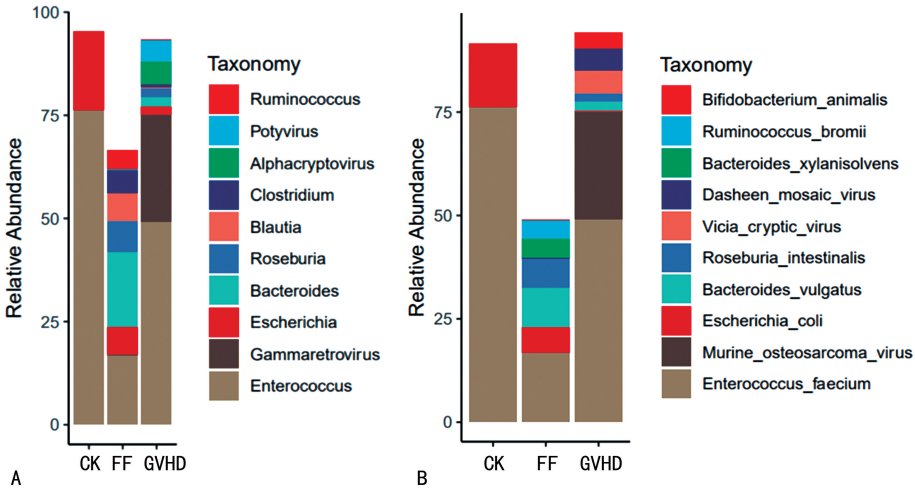
通路下调,丙酮酸代谢为异丁醇的通路、U 乙酰胞壁酰基丙氨酸酰及淀粉降解通路上调;GO 分析中,复发组细胞膜成分增加,ATP 结合、序列特异的 DNA 结

合模块表达增加;KEGG 和 Pfam 分析中,复发组核糖体亚基 L33 和 S14 明显减少,RNA 聚合酶 sigma-70 因子明显增加,见图 3~6。



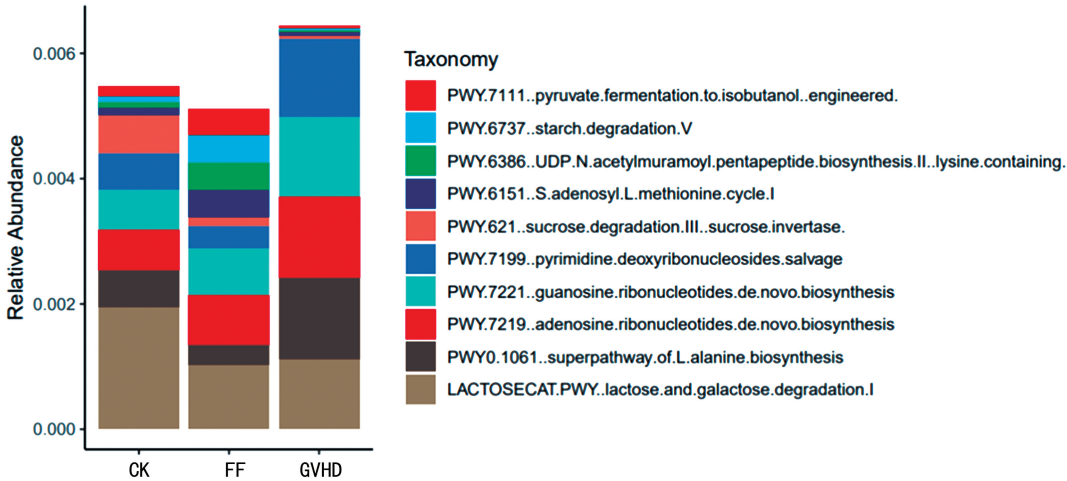
A: Observed OTUs 组间分布情况;B:Chao1 Index 组间分布情况。

图 1 Alpha 多样性指数分析两组差异



A:属水平;B:种水平;CK:对照组;FF:复发组。

图 2 两组物种构成差异



CK:对照组;FF:复发组。

图 3 Pathway 组成柱状图(丰度排序前 10)

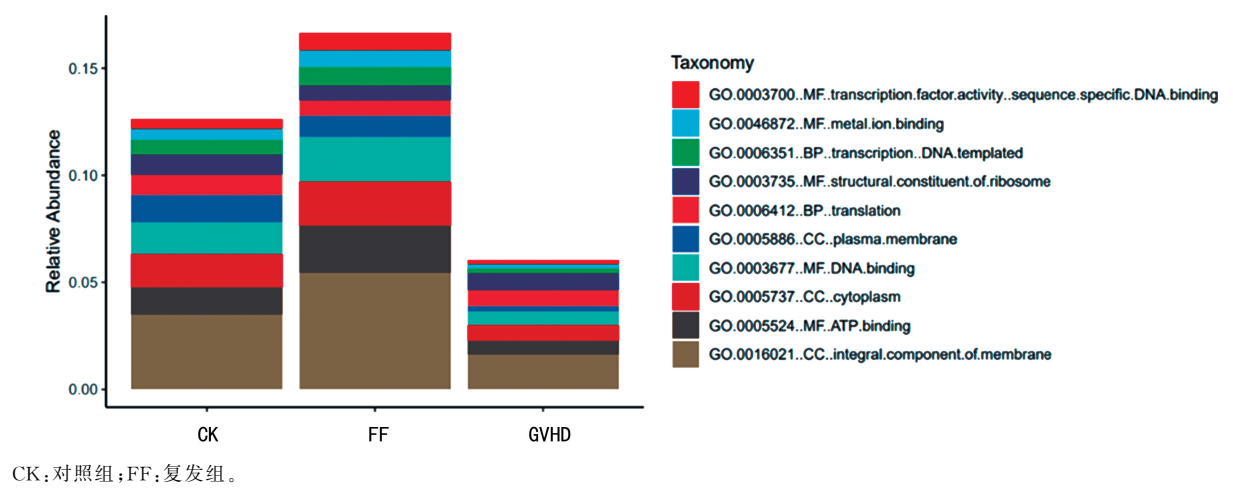


图 4 GO 数据库功能组成柱状图(丰度排序前 10)

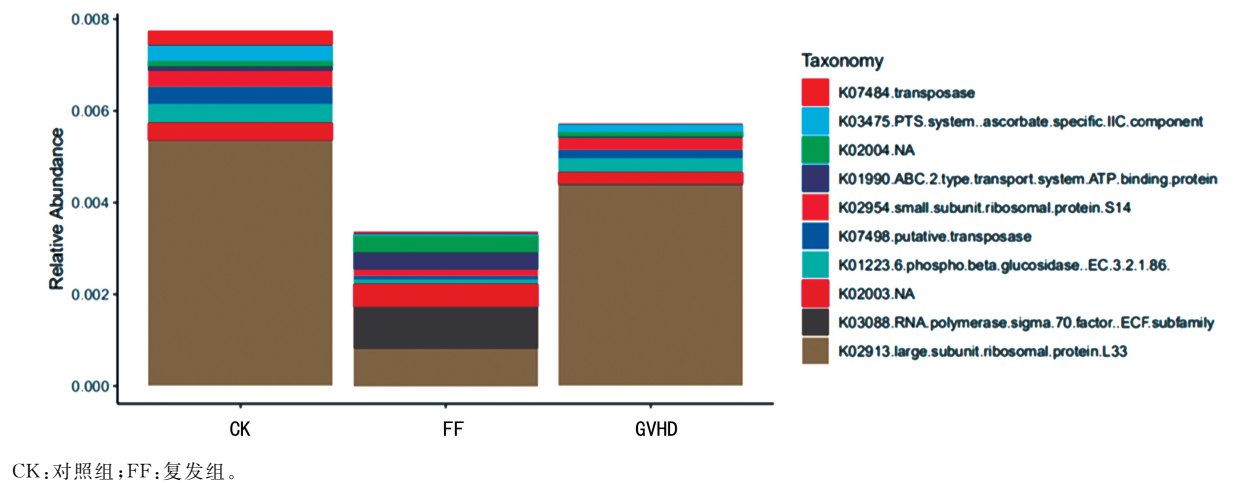


图 5 KEGG 数据库 KO 功能组成柱状图(丰度排序前 10)

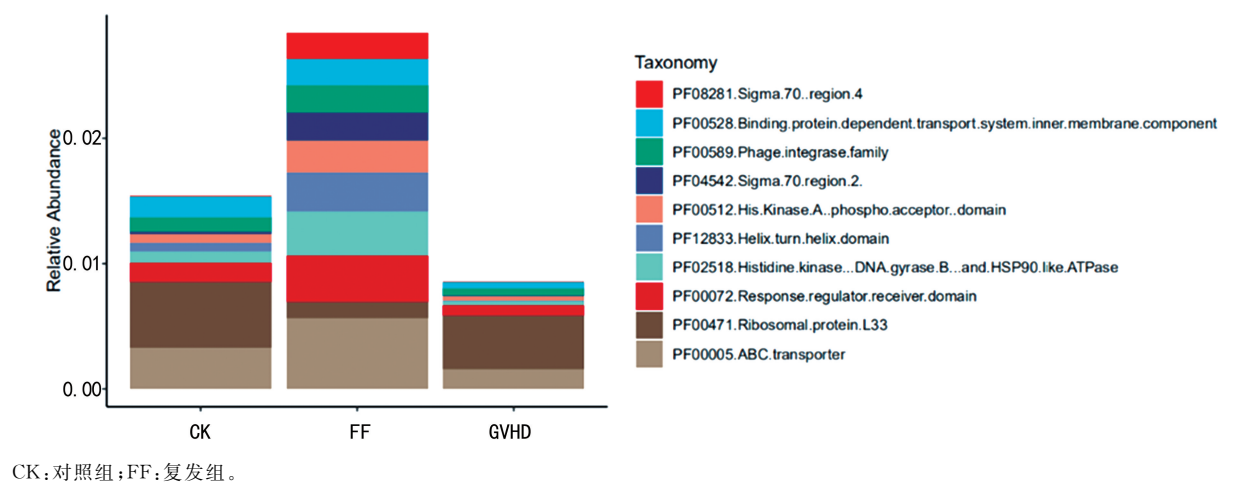


图 6 Pfam 数据库功能组成柱状图(丰度排序前 10)

3 讨 论

近年来,单倍型造血干细胞移植已经上升为最主要的异基因造血干细胞移植类型,尤其在中国。尽管与同胞全相合移植相比,单倍型移植具有更低的复发率,但移植后复发仍是移植后第一死亡原因。肠道菌群与 GVHD、移植后免疫重建、疾病复发的相关性得到了多项研究的证实^[9-12],但当前尚无法明确确切的关系,这与移植后复杂的生理、病理过程有关。

PELED 等^[5]研究证明,eubacterium limosum(黏液真杆菌)的高丰度与异基因造血干细胞移植术后疾病复发、进展之间存在关联,可能作为潜在的生物标志物或治疗靶点来预防移植后复发和提高生存率。GABORIAU-ROUTHIAU 等^[13]的实验发现,分节丝状杆菌的定植能够提高 Th1 细胞产 IFN- γ 的量、Th17 细胞分泌 IL-17 的量及小肠和结肠固有层淋巴细胞中 Treg 细胞的量,但单一定植分节丝状杆菌的小鼠体内

Th 和 Treg 细胞的总数量却比常规小鼠少,提示分节丝状杆菌尽管存在一定的免疫调节作用,同时也需要其他微生物共同参与才能实现^[14-15]。因此,单一微生物变化的影响有限,并不能很好地指导临床,这也是这个领域研究中存在的主要问题。近期发表在《新英格兰医学杂志》上的 ECOSPOR III 期临床试验结果首次证实了粪便提取的口服药物 SER-109 在临床上防治复发性艰难梭菌感染的可行性^[16]。这样一种全新的改善肠道微生态的方式完全可能在未来应用于造血干细胞移植后患者,只是安全性有待于进一步探索。

本研究提示了与文献报道不同的肠道微生物异常,尽管例数偏少,但都说明了移植后肠道菌群的变化与移植后复发存在相关性。这种差异不是单纯的一种微生物能够决定的。本研究结论中发现,动物双歧杆菌这种有益菌在复发组中丰度下降;同时也发现,屎肠球菌这种有害菌在复发组中丰度下降,普通拟杆菌、肠道蔷薇菌、木杆菌这些肠道常驻菌在复发组中丰度增加;进一步分析发现,在复发组中糖酵解相关通路、蛋白质合成代谢上存在一些差异,但由于例数偏少,无法得出有效的生物信息学结论。文献中关于上述几种肠道菌群也有一些报道,主要集中在与移植后感染和 GVHD 的相关性上,未见与移植后复发相关的报道。屎肠球菌,尤其是耐万古霉素的屎肠球菌在造血干细胞移植术后儿童患者的血流感染中比较常见^[17];普通拟杆菌的丰度与霉酚酸酯的代谢有关,高拟杆菌的患者霉酚酸酯血液浓度更高,潜在降低 GVHD 的发生率,但可能增加霉酚酸酯相关毒性^[18]。

综上所述,本研究初步发现,在单倍型移植体系下,复发患者的肠道微生态紊乱与文献报道的不尽相同,倾向于有害菌的增多及营养代谢通路失衡,但限于研究例数,这些差异还有待于更进一步的临床病例观察及干预性研究的证实。未来,无论上述差异如何,纠正复发患者的肠道微生态紊乱是全新的一种复发策略,而粪便提取的口服药物可能是一个不错的选择。

参考文献

- [1] SOIFFER R J, CHEN Y B. Pharmacologic agents to prevent and treat relapse after allogeneic hematopoietic cell transplantation [J]. Blood Adv, 2017, 1(25): 2473-2482.
- [2] MANZO VE, BHATT A S. The human microbiome in hematopoiesis and hematologic disorders[J]. Blood, 2015, 126(3): 311-318.
- [3] HONG T, WANG R, WANG X, et al. Interplay between the intestinal microbiota and acute graft-versus-host disease: experimental evidence and clinical significance [J]. Front Immunol, 2021, 12: 644982.
- [4] PELED J U, GOMES A L C, DEVLIN S M, et al. Microbiota as predictor of mortality in allogeneic hematopoietic-cell transplantation [J]. N Engl J Med, 2020, 382(9): 822-834.
- [5] PELED J U, DEVLIN S M, STAFFAS A, et al. Intestinal microbiota and relapse after hematopoietic-cell transplantation [J]. J Clin Oncol, 2017, 35(15): 1650-1659.
- [6] OGONEK J, KRALJ JURIC M, GHIMIRE S, et al. Immune reconstitution after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation [J]. Front Immunol, 2016, 7: 507.
- [7] CHANG Y J, ZHAO X Y, HUANG X J. Immune reconstitution after haploidentical hematopoietic stem cell transplantation [J]. Biol Blood Marrow Transplant, 2014, 20(4): 440-449.
- [8] GOODWIN S, MCPHERSON J D, MCCOMBIE W R. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies [J]. Nat Rev Genet, 2016, 17(6): 333-351.
- [9] 中国抗癌协会肿瘤与微生态专业委员会. 肠道微生态与造血干细胞移植相关性中国专家共识 [J]. 国际肿瘤学杂志, 2021, 48(3): 129-135.
- [10] HAN L, ZHANG H, MA P, et al. Intestinal microbiota score could predict survival following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation [J]. Ann Hematol, 2022, 101(6): 1283-1294.
- [11] 肖俊娟, 毕振旺, 李岩. 肠道微生态与肿瘤免疫调节的相关研究 [J]. 国际肿瘤学杂志, 2017, 44(1): 34-37.
- [12] CIERNIKOVA S, KASPEROVA B, DRGONA L, et al. Targeting the gut microbiome: an emerging trend in hematopoietic stem cell transplantation [J]. Blood Rev, 2021, 48: 100790.
- [13] GABORIAU-ROUTHIAU V, (下转第 209 页)

- 治疗中的应用研究[J]. 中国全科医学, 2019, 22(32): 3926-3931.
- [9] LUKASKI H C, KYLE U G, KONDRUP J. Assessment of adult malnutrition and prognosis with bioelectrical impedance analysis: phase angle and impedance ratio[J]. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2017, 20(5): 330-339.
- [10] CUONG T Q, BANKS M, HANNAN-JONES M, et al. Validity, reliability and feasibility of nutrition screening tools NRS-2002 and MST aD_{min}-istered by trained medical doctors in routine practice[J]. *Hosp Pract*, 2019, 47(5): 259-266.
- [11] HERSBERGER L, BARGETZI L, BARGETZI A, et al. Nutritional risk screening (NRS 2002) is a strong and modifiable predictor risk score for short-term and long-term clinical outcomes; secondary analysis of a prospective randomised trial[J]. *Clin Nutr*, 2020, 39(9): 2720-2729.
- [12] 宁华英, 赵崇法, 齐玉梅, 等. 相位角预测手术病人营养风险及住院时间[J]. 肠外与肠内营养, 2017, 24(5): 296-300.
- [13] PARK S, LEE C J, JHEE J H, et al. Extracellu-
(上接第 204 页)
lar fluid excess is significantly associated with coronary artery calcification in patients with chronic kidney disease[J]. *J Am Heart Assoc*, 2018, 7(13): e008935.
- [14] 肖慧娟, 张明, 齐玉梅, 等. 相位角与肝硬化病人营养状况及临床结局的关系研究[J]. 肠外与肠内营养, 2019, 26(3): 145-149.
- [15] 梁丹华, 谭荣韶, 刘岩, 等. 生物电阻抗相位角对血液透析患者蛋白质-能量消耗的预测价值[J]. 中华临床营养杂志, 2017, 25(6): 355-360.
- [16] 杜华, 潘俊均, 黄光日, 等. 血清 LDL、HCY、TNT-HSST 和 pro-BNP 检测在冠心病诊断中的应用价值分析[J]. 质量安全与检验检测, 2021, 31(2): 128-130.
- [17] MAEWAL P, DE LEMOS J A. Natriuretic peptide hormone measurement in acute coronary syndromes[J]. *Heart Fail Rev*, 2003, 8(4): 365-368.
- [18] DEO R, DE LEMOS J A. B-type natriuretic peptide in ischemic heart disease[J]. *Curr Cardiol Rep*, 2003, 5(4): 271-277.
- (收稿日期: 2022-03-08 修回日期: 2022-10-10)
- RAKOTOBÉ S, LECUYER E, et al. The key role of segmented filamentous bacteria in the coordinated maturation of gut helper T cell responses[J]. *Immunity*, 2009, 31(4): 677-689.
- [14] SCHNUPF P, GABORIAU-ROUTHIAU V, SANSONETTI P J, et al. Segmented filamentous bacteria, Th17 inducers and helpers in a hostile world[J]. *Curr Opin Microbiol*, 2017, 35: 100-109.
- [15] MAZMANIAN S K. Gut immune balance is as easy as S-F-B [J]. *Immunity*, 2009, 31(4): 536-538.
- [16] FEUERSTADT P, LOUIE T J, LASHNER B, et al. SER-109, an oral microbiome therapy for recurrent clostridioides difficile infection[J]. *N Engl J Med*, 2022, 386(3): 220-229.
- [17] CHILAMBI G S, NORDSTROM H R, EVANS D R, et al. Evolution of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* during colonization and infection in immunocompromised pediatric patients[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2020, 117(21): 11703-11714.
- [18] SAQR A, CARLSON B, STALEY C, et al. Reduced enterohepatic recirculation of mycophenolate and lower blood concentrations are associated with the stool bacterial microbiome after hematopoietic cell transplantation [J]. *Transplant Cell Ther*, 2022, 28(7): 372. e1-372. e9.
- (收稿日期: 2022-05-18 修回日期: 2022-09-28)