

鼻咽癌患者在放疗过程中鼻咽部细菌群落结构的动态变化*

张 勇, 黄婷婷, 陈静珊, 何 峰

(广西医科大学第一附属医院放疗科, 南宁 530021)

摘要 目的:探索鼻咽癌患者在放射治疗过程中鼻咽部细菌群落结构的动态变化情况。**方法:**取7例鼻咽癌患者在放疗过程中不同时点的鼻咽拭子样本,利用T-RFLP技术对其鼻咽部菌群结构进行分析。**结果:**在放疗不同时点的鼻咽拭子样本中共获取115种末端限制性片段(T-RFs),其中以放疗前的数目最多(91种),放疗结束时最少(49种),片段62 bp、65 bp、77 bp、120 bp、146 bp、253 bp、333 bp、398 bp、400 bp、469 bp所代表的菌群贯穿于整个放疗周期中。鼻咽部菌群结构随放疗时间变化而改变,至放疗结束时T-RFs数量下降46%,香农指数(H)下降5%,均匀度指数(E)增高5%,辛普森指数(D)变化趋势不明显。**结论:**放疗可影响鼻咽癌患者鼻咽部菌群的生长,致群落中的T-RFs数目减少,优势细菌分布发生变化,菌群结构多样化程度下降。

关键词 鼻咽癌;放射治疗;细菌群落结构

中图分类号:R739.63

文献标志码:A

文章编号:1005-930X(2017)03-0359-05

DOI:10.16190/j.cnki.45-1211/r.2017.03.009

Dynamic changes of nasopharyngeal microbiome during radiotherapy in nasopharyngeal carcinoma patients

Zhang Yong, Huang Tingting, Chen Jingshan, He Feng. (The First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Department of Radiotherapy, Nanning 530021, China)

Abstract Objective: To reveal the dynamic changes of nasopharyngeal microbiome during radiotherapy in nasopharyngeal carcinoma (NPC) patients. **Methods:** The nasopharyngeal swabs samples were collected from 7 NPC patients during radiotherapy at different time points. The structural changes of microbiome in nasopharynx were analyzed by terminal restriction fragment length polymorphism technology (T-RFLP). **Results:** Among 115 terminal restriction fragments (T-RFs) obtained in total, 91 T-RFs were yield from the pharyngeal swabs before treatment and 49 T-RFs at the end of radiotherapy. The bacterial T-RFs with 62 bp, 65 bp, 77 bp, 120 bp, 146 bp, 253 bp, 333 bp, 398 bp, 400 bp and 469 bp existed through the course of radiotherapy. The percentage of T-RFs was decreased to 46% at the end of radiotherapy, the Shannon index was decreased to 5%, and the evenness index was increased to 5%. No significant change was observed in Simpson index. **Conclusion:** Radiotherapy might influence the growth of bacteria in nasopharynx, the proportion of dominant members varied during the time while the diversity of the microbiome was slightly decreased after treatment.

Keywords nasopharyngeal carcinoma; radiotherapy; microbiome

放射治疗是鼻咽癌的主要治疗手段,同时也易引起溃疡性黏膜炎、放射性中耳炎、牙龈炎、口腔念珠菌感染等相关并发症^[1-3]。这些并发症的发生不仅干扰鼻咽癌正常治疗计划的实施,严重时甚至须

中断治疗,对患者的生活质量和预后产生严重影响。此外,鼻咽癌并发症的发生,提示了放疗可能通过影响患者鼻咽部细菌群落的生长甚至改变其构成,进而加剧照射野局部的炎症反应。因此,对鼻咽癌患者病灶细菌群落的研究有助于进一步了解放疗对局部微环境的影响及提高对局部并发症的控制意识。传统的微生物培育技术难以全面、准确地描述研究对象的微生物多样性。近年来,一种建立在原核生

* 基金项目:广西医科大学青年科学基金项目

(No. GXMUYSF201203)

收稿日期:2016-06-13

物 16S 核糖体 RNA(16SrRNA)基因的末端限制性酶切片段长度多态性分析技术(T-RFLP)逐渐应用于微生物群落结构的研究中,为人体细菌群落研究提供了新的视角。T-RFLP 综合运用了末端荧光标记 PCR、产物的限制性酶切等技术,通过分析末端限制性片段的长度多态性而对特定样本的微生物群落组成进行解析。目前,对鼻咽癌患者局部细菌群落的研究多通过唾液或牙齿菌斑样本分析,而对原发病灶且是高能射线照射区域的鼻咽部细菌群落的研究鲜有报道。本研究通过对初治的鼻咽癌患者在接受放射治疗的多个时点进行鼻咽部的样本收集,利用 T-RFLP 技术分析其共生细菌群落结构的动态变化,探索可能规律,以期初步了解放射治疗对鼻咽癌患者局部共生菌群的影响,为进一步探索与放射治疗敏感性相关的鼻咽部共生菌群等研究提供参考依据。

1 对象与方法

1.1 研究对象

收集 2013 年 10 月至 2014 年 5 月在广西医科大学第一临床附属医院放疗科经病理确诊的 7 例初治鼻咽癌患者为研究对象,年龄 18~70 岁,KPS 评分>90 分,近 1 个月内未使用抗生素、激素及免疫抑制剂。所有患者均采用调强适形放疗技术进行治疗,放疗剂量为 6 840~7 400 cGy/30~33 f,治疗时间约为 6~7 周。

1.2 样本采集与 DNA 的提取

使用灭菌鼻咽拭子加套管的方法对患者的鼻咽部进行样本采集,避免了操作过程中来自鼻腔的污染,确保样本可靠性,真实地反映局部细菌群落的情况。对研究对象在放疗前(S0)、放疗第 1~6 周(W1~6)及放疗结束(SE)各个时点进行鼻咽部采样。使用玻璃珠机械破碎法、溶菌酶裂解法结合核酸提取试剂盒法提取 DNA^[4]。

1.3 T-RFLP 分析技术

1.3.1 荧光标记 PCR 扩增 利用引物 8F 和 1492R 进行 16SrRNA 基因可变区扩增。正向引物 8F:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3',荧光标记 FAMTM;反向引物 1492R:5'-GYTACCTGT-TACGACTT-3',荧光标记 CY3。PCR 扩增条件:95 ℃ 1 min;95 ℃ 30 s,55 ℃ 45 s,72 ℃ 90 s,共 32 个循环;72 ℃ 5 min。取 16SrRNA 特异性 PCR 扩增产物用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒进行目的片段纯化回收。

1.3.2 酶切反应及测序 选择 HhaI/MspI 两种限制性内切酶^[5]分别对纯化后的 PCR 产物进行酶切,酶切位点分布:HhaI(GCGC),MspI(CCGG)。将酶切终产物在 ABI 3100 遗传分析仪上进行测序,取荧光强度 50 RFU 为基线,得到的 T-RFLP 图谱使用 GeneScan version 3.7 进行分析。

1.4 统计学方法

在 T-RFLP 图谱中,每个峰代表一种末端限制性片段(T-RF),相对应的峰面积为 T-RF 的相对丰度,通过 BI0-DAP 程序计算鼻咽癌患者鼻咽部菌群结构的多样性参数:香农指数(Shannon index,H)、辛普森指数(Simpson index,D)、均匀度指数(evenness index,E)。使用统计软件 SPSS 21.0 对不同时期的细菌类群进行聚类分析。

2 结果

2.1 鼻咽癌患者鼻咽部的优势菌群分布及动态变化

对各个时期的 T-RFLP 图谱进行分析显示,在 7 例鼻咽癌患者的各时点鼻咽拭子样本中共得到 115 种不同的 T-RFs 片段,以 S0 时数量最多(91 个),SE 时数量最少(49 个),见表 1。按 T-RF 片段的相对丰度>1%可视为该菌群的优势片段^[6],放疗前期的优势片段共 22 个;片段 62 bp、65 bp、77 bp、120 bp、146 bp、253 bp、333 bp、398 bp、400 bp、469 bp 所代表的菌属贯穿于整个放疗周期(不同时期的样本中均被检测出),片段 T-RF153、T-RF252、T-RF368、T-RF470 则是偶尔出现在某一时期的样品中;片段 T-RF64、T-RF152、T-RF160、T-RF235、T-RF366、T-RF399、T-RF401、T-RF402 所代表的菌群含量相对较低,其在前期的样本中出现,到后期逐渐消失,如 T-RF153 在 S0 时为优势片段(相对丰度为 2.9%),到 W1 时减少至 1.8%,W2 后消失,见图 1。

表 1 7 例鼻咽癌患者鼻咽部菌群的多样性指数

时间	H	D	E	T-RFs 数量
S0	3.421	0.951	0.758	91
W1	2.951	0.910	0.758	70
W2	3.278	0.947	0.814	56
W3	3.212	0.937	0.788	59
W4	3.221	0.943	0.766	67
W5	3.163	0.943	0.813	55
W6	3.208	0.946	0.769	65
SE	3.263	0.943	0.800	49

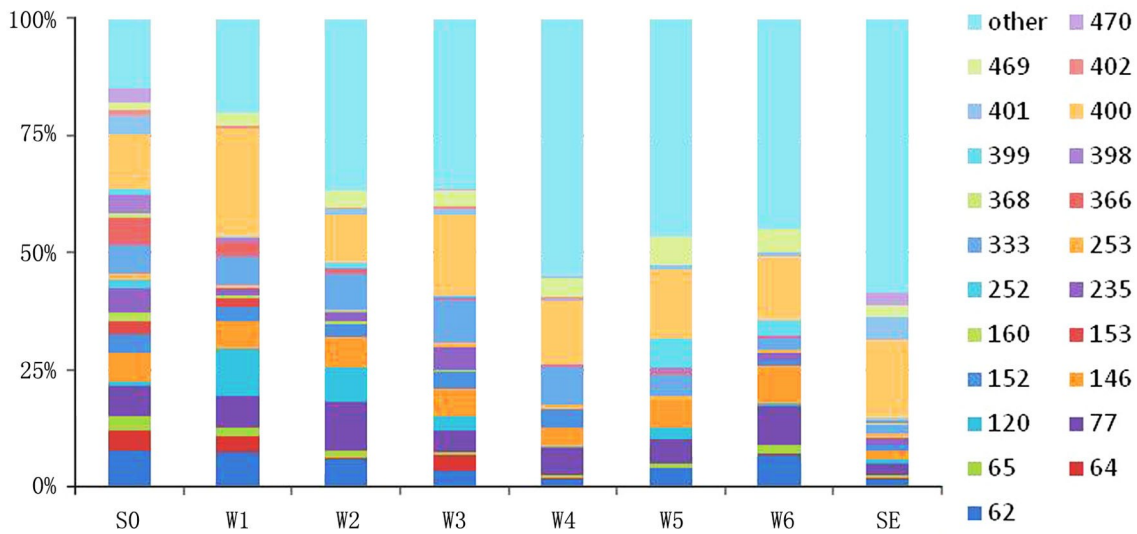


图 1 鼻咽癌患者鼻咽部优势 T-RFs 在放疗过程中的动态变化

2.2 鼻咽癌患者放疗过程中鼻咽部细菌结构多样性指数情况分析

根据 T-RFLP 图谱中末端限制性片段的数目及其相对峰面积,分别计算每个时期鼻咽细菌群落的多样性指数。S0 时期 H、D、T-RFS 数值最高,W3 时 E 最高。说明鼻咽癌患者在未治疗前鼻咽部菌群结构复杂,细菌类群丰富,多样性程度高,物种的优势度大,而在放疗过程中,这些多样性指数会随放疗时间的变化而呈现不同改变,见表 1。多元统计方法聚类分析显示,放疗过程中各个时期的相似性系数区间范围为 0.02~0.99,治疗第 2 周与治疗结束时鼻咽部菌群相似性最高,相似性系数为 0.99。治疗前与第 4 周鼻咽菌群相似性最低,相似性系数为 0.02,见表 2。结合不同时期样本间进行聚类分析(图 2),发现鼻咽部菌群结构随放疗时间呈随机性

动态变化。放疗结束后,T-RFs 数量、H、D 均较治疗前不同程度下降,提示放疗可能影响了鼻咽部共生菌的生长,导致群落中的 T-RFs 数目减少约 46%,群落结构的多样化程度下降了 5%,群落较治疗前更为均匀分布,比值增加了 5%,但代表物种优势程度的 D 则变化不明显。

表 2 基于不同时期的 T-RFLP 图谱的样品间相似性系数

	S0	W1	W2	W3	W4	W5	W6	SE
S0	1							
W1	0.36	1						
W2	0.49	0.97	1					
W3	0.23	0.62	0.44	1				
W4	0.02	0.38	0.18	0.87	1			
W5	0.21	0.89	0.93	0.37	0.33	1		
W6	0.91	0.03	0.16	0.61	0.363	0.46	1	
SE	0.57	0.94	0.99	0.33	0.95	0.91	0.28	1

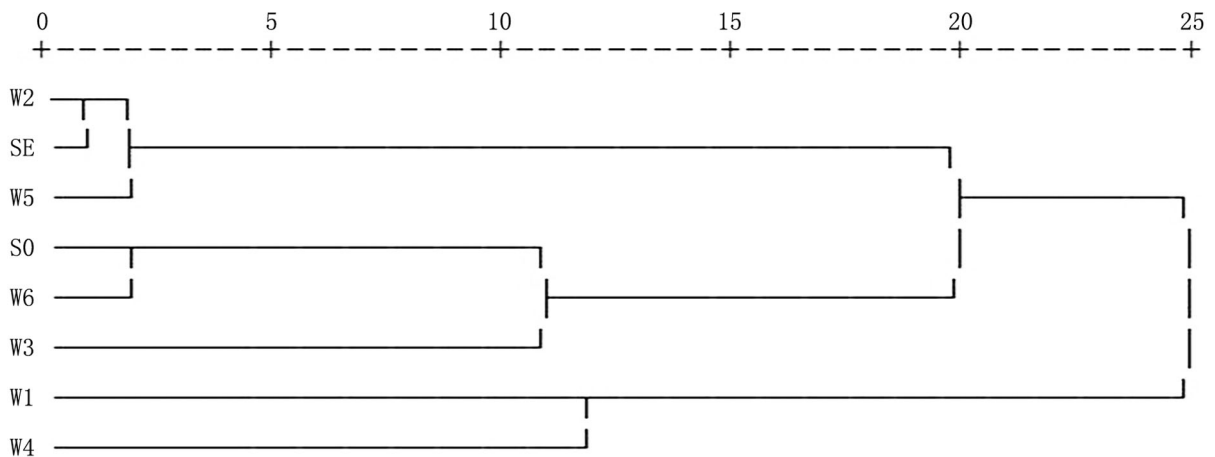


图 2 基于不同时期的 T-RFLP 图谱样本间聚类

3 讨论

本研究采用基于 16SrRNA 基因的 T-RFLP 分析技术首次对鼻咽癌患者在放疗期间多个时点的鼻咽部样本进行检测,发现在各个时点的 T-RFs 数量和构成都发生了显著的变化,提示了鼻咽部菌群的整体结构发生了相应的改变。7 例鼻咽癌患者的细菌群落结构组成较复杂,其中的优势类群以 62 bp、65 bp、77 bp、120 bp、146 bp、253 bp、333 bp、398 bp、400 bp、469 bp 为代表,随着治疗时间的推进,患者局部接受的放射剂量逐渐累加,鼻咽部细菌的结构也随之发生动态变化。放疗结束时,鼻咽癌患者鼻咽部的 T-RFs 数量减少近一半,细菌物种的多样性降低,优势片段分布发生不同改变。刘坤等^[7]对 32 例鼻咽癌患者放疗前后的唾液样本进行采样培养,发现与放疗前相比,放疗后照射区域的链球菌属、葡萄球菌属、白色念珠菌和绿脓杆菌检出增加,而放线菌属和奈瑟菌属检出减少,说明对鼻咽癌患者进行放疗可影响咽部的微生态平衡,从而为预防和治疗疾病提供理论依据。Muthu 等^[8]及 Tong 等^[9]发现放疗前后,咽部不同种菌群皆有不同程度的变化,进一步证实了放疗对微生物菌群的数量改变起着重要的作用。Shao 等^[10]曾用变性梯度凝胶电泳 (denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE) 和 16SrDNA 测序的方法研究鼻咽癌放疗后口腔菌群的改变,发现射线照射不仅可导致口腔菌群发生改变,还可使腮腺损伤和唾液减少。这些研究结果均表明,在放疗过程中鼻咽癌患者出现的相关并发症可能与优势菌属丰度的改变、菌落结构的变化存在某种关联。

本研究首次发现随放疗时间变化,鼻咽部的总体菌属数量逐渐呈下降趋势,不同优势菌群的相对丰度有上升或下降趋势,而对比以往刘坤等^[7]、陈幼华等^[11]的传统培育方法得出的结论,尽管菌群结构都发生了显著改变,但往往是放疗结束后菌属检出率增加。对于得出不同的结论,其可能原因:(1)实验方法的不同,由于有 95%~99% 的微生物种群因传统培育方法的局限性未被分离和认识,故不能全面地分析研究对象整体菌属丰度的上升或下降趋势。本研究采用了基于 16SrRNA 基因的非培养技术,有助于加深对鼻咽癌人群鼻咽部微生物结构的多样性及变化的客观;(2)采样方法的不同,本研究

采用拭子加套管的方法直接对患者的鼻咽部进行取样,相关研究报道则多采用收集唾液、牙齿菌斑等方法进行菌群结构分析。研究样本的不同也可能导致实验结论的不同,本研究的采样方法能更真实、客观地反映患者鼻咽部的菌群结构;(3)样本量较少,考虑到本研究为前期探索,样本量较小亦可能带来结果的偏倚。

此外,由于 T-RFLP 技术主要针对菌落结构变化及其多样性特点进行分析,尚不能对研究菌属定性分析,还需结合其他分子生物学实验技术才能进一步获取更详实、准确的微生物群落信息。下一代测序技术(next generation sequencing, NGS)具有高通量、大数据产出的优点,可以实现对大样本的靶基因文库的深度测序,甚至对样本转录组和基因组的扫描分析,配合多种功能强大的生物信息学分析方法,业已成为目前国际上最前沿、最可靠的人体微生物群落研究方法。因此,本组计划在现有数据的指导下,扩大样本量,采用高通量测序技术进一步对鼻咽癌患者鼻咽部微生物构成及变化进行探索,以期阐明鼻咽癌患者鼻咽部共生菌与放射治疗的交互作用,为提高放射治疗疗效、降低患者治疗后并发症及改善生活质量的研究提供线索及基础数据。

参考文献:

- [1] AGUIAR GP, JHAM BC, MAGALHAES CS, et al. A review of the biological and clinical aspects of radiation caries[J]. *Contemp Dent Pract*, 2009, 10(4): 83-89.
- [2] LALLA RV, LATORTUE MC, HONG CH, et al. A systematic review of oral fungal infections in patients receiving cancer therapy [J]. *Support Care Cancer*, 2010, 18(8): 985-992.
- [3] NAGLER RM. The enigmatic mechanism of irradiation induced damage to the major salivary glands[J]. *Oral Dis*, 2002, 8(3): 141-146.
- [4] 明慧馨, 何峰, 陈静珊, 等. 拭子提取黏膜部细菌 DNA 方法的优化[J]. *广西医科大学学报*, 2015, 32(2): 165-168.
- [5] SAKAMOTO M, TAKEUCHI Y, UMEDA M, et al. Application of terminal RFLP analysis to characterize oral bacterial flora in saliva of healthy subjects and patients with periodontitis[J]. *Journal of Medical Microbiology*, 2003, 52(1): 79-89.
- [6] YOUSSEF N, SHEIK CS, KRUMHOLZ LR, et al. Comparison of species richness estimates obtained u-

- sing nearly complete fragments and simulated pyrosequencing-generated fragments in 16SrRNA gene-based environmental surveys[J]. Applied & Environmental Microbiology Aem, 2009, 75(16):5227-5236.
- [7] 刘 坤,王冀川,王 捷,等.鼻咽癌放疗后咽部菌群的变化[J]. 肿瘤预防与治疗, 2008, 21(4):415-417.
- [8] MUTHU K, RAMAN R, GOPALAKRISHNAN G. Oropharyngeal flora changes in patients with head and neck malignancy post radiotherapy[J]. Medical Journal of Malaysia, 2004, 59(5):585-590.
- [9] TONG HC, GAO XJ, DONG XZ. Non-mutans streptococci in patients receiving radiotherapy in the head and neck area[J]. Caries Res, 2003, 37(4):261-266.
- [10] SHAO ZY, TANG ZS, YAN C, et al. Effects of intensity-modulated radiotherapy on human oral microflora[J]. Journal of Radiation Research, 2011, 52(6):834-839.
- [11] 陈幼华,罗晋卿,陶健萍,等.鼻咽癌患者放疗期间口咽细菌动态变化及耐药性分析[J]. 中国全科医学, 2012, 15(50):1613-1616.

(本文编辑:韦所苏)

广西医科大学学报 2017 Mar;34(3)

EORTC 评分系统在非肌层浸润性膀胱癌预后评估中的应用*

颜海标,谭宝飞,甘兆凯,付伟金,刘德云,米 华,汪小明,李天宇,梁艺耀,李生华,张 鑫,陈 涛

(广西医科大学第一附属医院泌尿外科,南宁 530021)

摘要 目的:探讨欧洲癌症研究与治疗组织(EORTC)建议的膀胱癌预后评分系统在非肌层浸润性膀胱癌(NMIBC)患者预后评估中的应用价值。方法:选取2008年1月至2014年1月在广西医科大学第一附属医院行经尿道膀胱肿瘤切除术(TUR-BT)的107例NMIBC患者,根据EORTC评分标准对患者的预后风险进行评分,并按术后复发和进展评分进行分组(复发总分为4组:0分组、1~4分组、5~9分组、10~17分组;进展总分为0分组、2~6分组、7~13分组、14~23分组)。随访1年和5年后,将各组的实际复发率和进展率分别与EORTC评分系统的预测值进行比较。结果:各组1年实际复发率和5年实际复发率分别与EORTC风险评分系统的1年预测复发率和5年预测复发率比较,差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。各组1年实际进展率和5年实际进展率分别与EORTC评分系统的1年预测进展率和5年预测进展率比较,差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。结论:EORTC评分系统能准确预测NMIBC患者的预后情况,值得临床推广应用。

关键词 EORTC风险评估表;膀胱肿瘤;预后

中图分类号:R737.14

文献标志码:A

文章编号:1005-930X(2017)03-0363-04

DOI:10.16190/j.cnki.45-1211/r.2017.03.010

Application of European Organization of Research and Treatment of Cancer scoring system in the evaluation of prognosis of patients with non-muscle invasive bladder cancer

Yan Haibiao, Tan Baofei, Gan Zhaokai, Fu Weijin, Liu Deyun, Mi Hua, Wang Xiaoming, Li Tianyu, Liang Yiyao, Li Shenghua, Zhang Xin, Chen Tao. (Department of Urology, The 1st Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

Abstract Objective: To assess the clinical value of European Organization of Research and Treatment of Cancer (EORTC) scoring system for the evaluation of prognosis of patients with non-muscle invasive bladder cancer (NMIBC). **Methods:** 107 patients with NMIBC undergoing transurethral resection of bladder tumor (TUR-BT) in our hospital from January 2008 to January 2014 were selected and divided into recurrence group and progress group according to EORTC prognostic risk scores. After one-year and five-year follow-up, the actual recurrence rate and

* 基金项目:广西医疗卫生适宜技术研究和开发项目
(No. S201302-02)

收稿日期:2016-05-29

recurrence rate and progress group according to EORTC prognostic risk scores. After one-year and five-year follow-up, the actual recurrence rate and