



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109266766 B

(45) 授权公告日 2021.10.19

(21) 申请号 201811175998.3

(22) 申请日 2018.10.10

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 109266766 A

(43) 申请公布日 2019.01.25

(73) 专利权人 中国人民解放军第三〇二医院
地址 100039 北京市丰台区西四环中路100号

(72) 发明人 贾晓东 陆荫英 卢姗姗

(74) 专利代理机构 北京预立生科知识产权代理有限公司 11736
代理人 朱萍 李红伟

(51) Int. Cl.

C12Q 1/689 (2018.01)

C12Q 1/04 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

C12R 1/01 (2006.01)

C12R 1/225 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 107847530 A, 2018.03.27

WO 2010124387 A1, 2010.11.04

于鑫等. 结直肠腺瘤与息肉患者肠道菌群变化的病例对照研究.《复旦学报(医学版)》.2018, 第45卷(第5期), 第658-663页.

蒋姗姗等. 乙肝相关性慢性肝病患者肠道菌群的比较及核苷类抗病毒药物对其的影响.《中国优秀硕士学位论文全文数据库 医药卫生科技辑》.2017, (第2期), 第E061-70页.

L.M.T.Dicks等. Lactobacillus and Bifidobacterium Diversity in Horse Feces, Revealed by PCR-DGGE.《Curr Microbiol》.2009, 第59卷第651-655页.

W.Abu Al-Soud等. DNA of Helicobacter spp. and common gut bacteria in primary liver carcinoma.《Digestive and Liver Disease》.2008, 第126-131页.

审查员 王艳丽

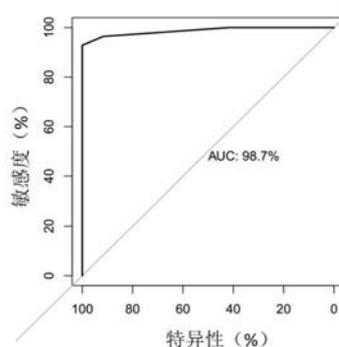
权利要求书1页 说明书9页
序列表1页 附图5页

(54) 发明名称

肠道微生物作为胆管细胞癌诊断标志物的用途

(57) 摘要

本发明公开了粪便中的肠道细菌在胆管细胞癌的筛查、诊断或辅助诊断中的应用。本发明通过提取粪便中细菌的DNA并测序从而获得细菌种类和丰度的特征,并以细菌的丰度特征为基础进行胆管细胞癌的诊断。与目前已用于临床或申请专利的筛选胆管细胞癌的方法相比,本发明完全无创,而且能更准确的预测诊断胆管细胞癌。



1. 检测标志物的试剂在制备用于诊断胆管细胞癌的产品中的应用,所述标志物是Lactobacillus属肠道微生物和Alloscardovia属肠道微生物。
2. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于,所述产品包括试剂盒、芯片或高通量测序平台。
3. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于,所述试剂包括引物、探针、反义寡核苷酸、适配体或抗体。

肠道微生物作为胆管细胞癌诊断标志物的用途

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术、疾病诊断和生物医药领域,具体涉及胆管细胞癌的微生物标志物及其应用。

背景技术

[0002] 肝脏占位性病变可以是良性或恶性的肿瘤,恶性肿瘤可以是转移的或原发的。原发性肝癌(primary carcinoma of the liver)是我国常见恶性肿瘤之一。原发性肝癌主要类型为肝细胞肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)和肝内胆管细胞癌(intrahepatic cholangiocarcinoma, ICC)。目前对于原发性肝癌手术后患者进行病理学诊断的原则主要根据手术切除肿瘤组织的组织学检查和患者临床检查等做出。由于肝细胞肝癌和肝内胆管细胞癌组织形态相近、免疫表型交叉,在临床病理诊断中常常出现困难;另一方面,两者的治疗方式和预后均不同,肝内胆管细胞癌发展更快,预后更差,需要更好地区别两类肿瘤,对患者进行针对性治疗,从而提高病人生活质量和减轻患者经济负担。

[0003] 现有鉴别肝细胞肝癌和肝内胆管细胞癌的标记物有AFP/CA199/Hep Par1/CK19等,但是由于其敏感性和特异性不高,目前在临床诊疗中应用价值有限,往往难以解决病理诊断问题。

[0004] 肠道微生物是存在于人体肠道中的微生物群落,是人体的“第二基因组”。人肠道菌群和宿主构成一个相互关联的整体,具有重要作用,包括形成微生物屏障防止病原菌定植、执行免疫调节及代谢功能。肠道微生物数量、结构及稳定性的改变,尤其是菌群的失衡会改变机体的免疫状态。研究表明肠道菌群失衡与某些疾病的发生发展息息相关,包括糖尿病、帕金森症等,然而有时肠道菌群失衡并不直接导致疾病的表达,而作为疾病标记。随着人体基因组测序完成及高通量测序技术的高速发展,基因筛查成为诊断的方向。因此通过对肠道菌群的研究筛选出与胆管细胞癌相关性高的生物标志物有重要意义。一方面,利用胆管细胞癌有关的生物标记物可以提供诊断胆管细胞癌的方法。另一方面,通过将获得的生物标志物中的某些保护性微生物进行分离、纯化、培养和加上制成益生菌,可以用于改善并恢复肠道微生物平衡,对于胆管细胞癌治疗具有重要意义。

[0005] 目前,尚无研究阐述胆管细胞癌相关的肠道菌群生物标志物。

发明内容

[0006] 本发明的目的是提供特异性的针对胆管细胞癌的肠道微生物标志物,为早期胆管细胞癌的检测和评估提供一种非侵入式的,无创的方法。另外,通过将获得的肠道微生物标志物中的某些保护性微生物进行分离、纯化、培养和加工制成益生菌,可以用于改善并恢复肠道微生物平衡,对于降低有害微生物,减少毒性物质的产生,减轻胆管细胞癌的症状具有重要意义。

[0007] 本发明的第一个方面提供了一种胆管细胞癌标志物,所述标志物是Lactobacillus属肠道微生物和/或Alloscardovia属肠道微生物。

[0008] 本发明的第二个方面提供了前面所述的标志物在制备诊断胆管细胞癌的产品中的应用。

[0009] 进一步,所述产品包括能检测出前面所述的标志物的试剂,包含所述试剂的试剂盒、芯片或高通量测序平台。

[0010] 更进一步,所述试剂包括引物、探针、反义寡核苷酸、适配体或抗体。

[0011] 本发明的第三个方面提供了一种诊断胆管细胞癌的产品,所述产品能够检测Lactobacillus属肠道微生物和/或Alloscardovia属肠道微生物。

[0012] 优选地,所述产品能够检测Lactobacillus属肠道微生物和/或Alloscardovia属肠道微生物的丰度。

[0013] 进一步,所述产品包括能检测出前面所述的标志物的试剂,包含所述试剂的试剂盒、芯片或高通量测序平台。

[0014] 更进一步,所述试剂包括引物、探针、反义寡核苷酸、适配体或抗体。

[0015] 本发明的第三个方面提供了一种干预胆管细胞癌的食物、益生菌或者药物,所述食物、益生菌或者药物能够促进或者增加Alloscardovia属肠道微生物的量。

[0016] 具体地,所述食物、益生菌或者药物包含Lactobacillus属肠道微生物和/或Alloscardovia属肠道微生物。

[0017] 本发明的第四个方面提供了Lactobacillus属肠道微生物和/或Alloscardovia属肠道微生物在制备前面所述的食物、益生菌或者药物中的应用。

[0018] 本发明的第五个方面提供了一种筛选干预胆管细胞癌的食物、益生菌或者药物的方法,所述方法包括检测所述食物、益生菌或者药物干预之前和干预之后的Lactobacillus属肠道微生物和/或Alloscardovia属肠道微生物的丰度或者含量。

[0019] 所述方法具体包括:

[0020] (1) 采集所述的食物、益生菌或药物治疗或干预前后的个体粪便样本并妥善保存;

[0021] (2) 从个体粪便中提取DNA;

[0022] (3) 以粪便DNA为模板,对16s rRNA基因进行PCR扩增和建库;

[0023] (4) 对16s rRNA基因进行测序,获得测序结果;

[0024] (5) 对测序结果进行生物信息学分析,确定所述个体的粪便中所述肠道微生物标志物的量。

[0025] 本发明的第五个方面提供了检测粪便中肠道微生物的方法,该方法包括:比较受试者粪便样本和健康对照组粪便样本中Lactobacillus属肠道微生物和/或Alloscardovia属肠道微生物的比例或者相对数量。

[0026] 可通过任何合适的方法,包括物理方法、化学方法或两者的组合,进行细胞裂解和/或从细胞中提取核酸。可使用剪切方法从生物样品中分离核酸,该方法保持了基因组DNA的完整性和连续性。

[0027] 本发明使用的核酸样品可包括全部类型的DNA和RNA。核酸长度可为约100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、9000、10,000、20,000、30,000、40,000、50,000、60,000、70,000、80,000、90,000、100,000、200,000、300,000、400,000、500,000、600,000、700,000、800,000、900,000、1,000,000、2,000,000、3,000,000、4,000,000、5,000,000、6,000,000、7,000,000、8,000,000、9,000,000或10,

000,000个核苷酸或碱基对长度。

[0028] 扩增子方法可用于制备DNA以供微生物谱分析。该方法可包括若干步骤,例如,PCR、样品定量(例如,Qubit、nanodrop、生物分析仪等)、Blue Pippin大小选择、0.5x Ampure纯化、样品定量、DNA末端修复、0.5x Ampure纯化、平端衔接子连接、外切核酸酶处理、两个0.5x Ampure纯化和最后的Blue Pippin大小选择。

[0029] 本发明可使用诸如长读长单分子测序等测序方法进行检测。长读测序可在低至每种微生物的菌株分辨率水平上提供微生物分类。本发明内容可用于实现长读长的测序技术的实例包括,来自Pacific Biosciences的SMRT测序系统、长读长Sanger测序、长读总体测序方法,例如,Illumina/Moleculo测序和潜在的其他单分子测序方法,如Nanopore测序技术。

[0030] 长读测序可包括提供例如长于500个碱基、长于800个碱基、长于1000个碱基、长于1500个碱基、长于2000个碱基、长于3000个碱基或长于4500个碱基的连续序列读取的测序。

[0031] 可通过任何合适的方法,例如克隆合适的序列和直接化学合成来制备本发明中使用的引物。引物还可从商业来源获得。此外,可利用计算机程序设计引物。

[0032] 定义

[0033] 如本文所述的术语“探针”指能与另一分子的特定序列或亚序列或其它部分结合的分子。除非另有指出,术语“探针”通常指能通过互补碱基配对与另一多核苷酸(往往称为“靶多核苷酸”)结合的多核苷酸探针。根据杂交条件的严谨性,探针能和与该探针缺乏完全序列互补性的靶多核苷酸结合。探针可作直接或间接的标记,其范围包括引物。杂交方式包括,但不限于:溶液相、固相、混合相或原位杂交测定法。

[0034] 如本文所述的术语“引物”的意思是,能够形成与模板链互补的碱基对(base pair),并且起到用于复制模板链的起始点作用的7个~50个核酸序列。引物通常合成而得,但也可以使用自然生成的核酸。引物的序列并不一定需要与模板的序列完全相同,只要充分互补而能够与模板杂交即可。可以混入不改变引物的基本性质的追加特征。作为可以混入的追加特征的例子,有甲基化、带帽、一个以上的核酸被同系物取代和核酸间的修饰,但不限于此。

[0035] 如本文所述的术语“丰度差异”是指与健康对照或肝细胞癌或肝硬化的体内水平相比,在患有胆管细胞癌的患者体内得到更高或更低水平的微生物。

[0036] 如本文所用术语“微生物”可指细菌、古细菌、真核生物(例如原生动物、真菌、酵母)和病毒,包括细菌病毒(即噬菌体)。

[0037] 如本文所用的术语“益生菌”可指一种或多种微生物,其在适当施用时可以给宿主或受试者带来健康益处。益生菌的一些非限制性实例包括:Akkermansia muciniphila、Anaerostipes caccae、青春双歧杆菌、双歧双歧杆菌、婴儿双歧杆菌、长双歧杆菌、溶纤维丁酸弧菌、丙酮丁醇梭菌、嗜胺梭菌、拜氏梭菌、丁酸梭菌、鹌鹑梭菌、吡啶梭菌、园环梭菌、尿肠球菌、霍氏真杆菌、直肠真杆菌、普氏粪杆菌、产琥珀酸丝状杆菌、嗜酸乳杆菌、短乳杆菌、保加利亚乳杆菌、干酪乳杆菌、高加索乳杆菌、发酵乳杆菌、瑞士乳杆菌、乳酸杆菌、植物乳杆菌、路氏乳杆菌、鼠李糖乳杆菌、吉氏颤螺菌、Roseburia cecicola、Roseburia inulinivorans、生黄瘤胃球菌、活泼瘤胃球菌、卵瘤胃球菌、酪链球菌、尿链球菌、婴儿链球菌、变异链球菌、嗜热链球菌、Anaerofustis stercorihominis、Anaerostipes

hadrus、Anaerotruncus colihominis、生孢梭菌、破伤风梭菌、粪球菌属、规则粪球菌、柱状真杆菌、长真杆菌、凸腹真杆菌、Rose buria faeccis、Rose buria hominis、Rose buriaintestinalis及其任意组合。

[0038] 如本文所用的术语“测序”是指测定核酸分子(例如,DNA或RNA核酸分子)中的核苷酸碱基——A、T、C、G和U——的顺序的测序方法。

[0039] 如本文所用的术语“芯片”可指具有附着有吸附剂的、一般为平面的表面的固体基底。生物芯片的表面可包含多个可寻址的位置,其中每个位置可结合有吸附剂。生物芯片适合于接合探针接口,并因此用作探针。蛋白质生物芯片适用于捕获多肽,并可包含在可寻址位置处附着有层析或生物特异性吸附剂的表面。微阵列芯片一般用于DNA和RNA基因表达检测。

[0040] 如本文所用的术语“16S”、“16S核糖体亚基”和“16S核糖体RNA(rRNA)”可在本文中互换使用,并且可指原核生物(例如细菌、古细菌)核糖体小亚基(例如30S)的组分。16S rRNA在微生物物种之间在进化上是高度保守的。因此,16S核糖体亚基的测序可用于鉴定和/或比较样品中存在的微生物(例如微生物组)。

[0041] 如本文所用的术语“受试者”是指任何动物受试者,包括:人、实验室动物、家畜和家养宠物。受试者可以寄居有多种微生物。受试者可在其身体之上和之内的各种生境中具有不同的微生物组。受试者可被诊断出疾病或被怀疑具有患病的高风险。受试者可具有导致疾病的微生物组状态(生态失调)。在一些情况下,受试者不一定被诊断出疾病或被怀疑具有患病的高风险。在一些情况下,受试者可以遭受感染或有发生感染或将感染传播给他人的风险。

[0042] 如本文所用术语“生物标志物”应做广义理解。其包括任何能够反映异常状态的任何可检测生物指标,可以包含基因标志物、物种标志物(种标志物、属标志物)以及功能标志物(KO标志物)。其中,基因标志物的含义并不局限于现有可以表达为且有生物活性的蛋白质的基因,还包括任何核酸片段,可以为DNA,也可以为RNA,可以是经修饰的DNA或者RNA,也可以为未经修饰的DNA从或者RNA。在本文中基因标志物有时也可以称为特征片段。特别地,本发明的生物标志物为微生物标志物。

[0043] 如本文所用的术语“诊断”是指确认病理状态的存在或者特征,而本发明的目的不仅在于确认胆管细胞癌的发病与否,还包括判断受试者将来患有胆管细胞癌的风险,以及经过胆管细胞癌的治疗后,对应个体是否发生复发、转移、药物反应性、耐药性等。

[0044] 如本文所用的术语“诊断胆管细胞癌”包括诊断区分胆管细胞癌与肝硬化、诊断区分胆管细胞癌与肝细胞癌、诊断区分胆管细胞癌与健康人。

[0045] 如本文所用的术语“治疗”可指用于获得有益的或期望的结果的方法,该结果包括但不限于治疗性益处和/或预防性益处。治疗性益处可意指正在被治疗的潜在疾病的根除或改善。另外,治疗性益处也能如下实现:根除或改善与潜在病症相关的一种或多种生理学症状,使得在受试者中观察到改善,尽管该受试者可能仍受到该潜在病症的折磨。预防性效果包括延缓、防止或消除疾病或病状的出现,延缓或消除疾病或病状的症状发作,减慢、终止或逆转疾病或病状的进展,或其任意组合。对于预防性益处,具有发展成特定疾病的风险的受试者或报告疾病的一种或多种生理学症状的受试者可接受治疗,即使可能尚未作出该疾病的诊断。

[0046] 如本文所用的术语“干预”包括预防或者治疗。

附图说明

[0047] 图1显示Lactobacillus属微生物的丰度变化统计图；

[0048] 图2显示Alloscardovia属微生物的丰度变化统计图；

[0049] 图3显示Lactobacillus属区分胆管细胞癌与肝细胞癌的ROC曲线；

[0050] 图4显示Lactobacillus属区分胆管细胞癌与肝硬化的ROC曲线；

[0051] 图5显示Lactobacillus属区分胆管细胞癌与正常人的ROC曲线；

[0052] 图6显示Alloscardovia属区分胆管细胞癌与肝细胞癌的ROC曲线；

[0053] 图7显示Alloscardovia属区分胆管细胞癌与肝硬化的ROC曲线；

[0054] 图8显示Alloscardovia属区分胆管细胞癌与正常人的ROC曲线。

[0055] 图9显示Lactobacillus属和Alloscardovia属联合区分胆管细胞癌与肝细胞癌的ROC曲线；

[0056] 图10显示Lactobacillus属和Alloscardovia属联合区分胆管细胞癌与肝硬化的ROC曲线；

[0057] 图11显示Lactobacillus属和Alloscardovia属联合区分胆管细胞癌与正常人的ROC曲线。

具体实施方式

[0058] 下面将结合附图和实施例对本发明的实施方案进行详细描述。除另外定义，本文所用的所有科技术语一般具有本发明所属领域普通技术人员所通常理解的含义。一般地，本文所用的命名和实验方法是公知的，并且在本领域中常规使用。使用标准技术进行的所有操作通常是按照仪器耗材生产商的产品说明书和常规技术要求以及本文中提供的参考资料进行的。需要注意的是，本领域技术人员将理解，下列附图和实施例仅用于说明本发明，而不是对本发明的范围的限定。根据附图和优选实施方案的下列详细描述，本发明的目的和由此带来的有利方面对于本领域技术人员来说是显而易见的。

[0059] 实施例1检测胆管细胞癌、肝细胞癌、肝硬化、健康人的肠道微生物菌群的丰度差异

[0060] 1、研究对象

[0061] 收集胆管细胞癌、肝细胞癌和肝硬化患者，均通过肝脏穿刺病理结果进行确诊。

[0062] 患者信息和健康人信息见表1所示。

[0063] 表1临床信息

变量	胆管细胞癌 (28 例)	肝细胞癌 (28 例)	肝硬化 (16 例)	健康人 (12 例)
性别 (男/女)	19/9	23/5	12/4	6/6
年龄	55.32 ± 8.76	57.11 ± 8.97	47.88 ± 6.97	45.32 ± 7.11
谷草转氨酶 (U/mL)	41.30 ± 20.78	41.30 ± 22.30	27.38 ± 12.64	
[0064] 谷丙转氨酶 (U/mL)	34.93 ± 22.72	31.43 ± 15.64	23.88 ± 13.77	
碱性磷酸酶 (U/mL)	148.36 ± 66.72	122.04 ± 47.99	90.75 ± 40.65	
总胆固醇	4.11 ± 1.19	3.79 ± 1.04	3.66 ± 0.83	
总胆红素 (mg/dL)	13.77 ± 6.91	16.23 ± 8.82	17.18 ± 12.33	
直接胆红素 (mg/dL)	6.43 ± 4.63	7.73 ± 6.12	6.98 ± 4.90	
总蛋白	65.04 ± 6.71	65.18 ± 5.98	64.44 ± 5.23	
白蛋白	35.29 ± 4.61	36.04 ± 3.70	36.04 ± 5.20	
[0065] 球蛋白	29.82 ± 6.87	28.89 ± 5.98	27.06 ± 2.98	
白球比	1.24 ± 0.33	1.32 ± 0.34	1.40 ± 0.27	

[0066] 2、粪便采集和处理

[0067] 采集新鲜的,中后段粪便样本,立即冻存于-80℃冰箱。

[0068] 3、核酸提取

[0069] 粪便样本DNA根据MOBIO PowerSoil® DNA Isolation Kit 12888-100说明书进行操作提取。大致步骤如下所示:

[0070] (1) 加入0.25g粪便样品到一个powerBead Tubes中,轻轻涡旋混匀;

- [0071] (2) 加入60 μ l Solution C1,上下颠倒数次混匀;
- [0072] (3) 把powerBead Tubes固定在涡旋仪适配器上,最大转速涡旋连续震荡10min;
- [0073] (4) 室温1000g,离心30s;
- [0074] (5) 转移上清至一个干净的2ml Collection Tube中;
- [0075] (6) 加入250 μ l Solution C2到上清中,涡旋混匀5s,4 $^{\circ}$ C孵育5min;
- [0076] (7) 室温1000g,离心1min;
- [0077] (8) 避开沉淀小珠,转移上清 \leq 600 μ l到一个新的收集管中;
- [0078] (9) 加入200 μ l Solution C3到上清中,涡旋混匀.4 $^{\circ}$ C孵育5min;
- [0079] (10) 室温10000g离心1min;
- [0080] (11) 避开沉淀小珠,转移上清 \leq 750 μ l到一个新的收集管中;
- [0081] (12) Solution C4使用前先摇匀.加入1200 μ l Solution C4到上清中,涡旋混匀5s;
- [0082] (13) 加载约675 μ l上清到Spin Filter中,室温10000g离心1min.弃去滤液,继续加载675 μ l上清,室温10000g离心1min.重复直至过滤完所有上清;
- [0083] (14) 加入500 μ l Solution C5到Spin Filter中,室温10000g离心30s;
- [0084] (15) 弃去上清;
- [0085] (16) 室温10000g离心1min;
- [0086] (17) 小心转移Spin Filter到2ml Collection Tube;
- [0087] (18) 加入100 μ l Solution C6到白色滤膜中心;
- [0088] (19) 室温10000g离心30s;
- [0089] (20) 弃去Spin Filter,收集管中的DNA可直接用于下游实验,无需进一步纯化。

[0090] 4、DNA浓度测定

[0091] 从抽提的DNA样品中取1 μ l,以NANO DROP 2000仪器测浓度和OD260/OD280的比值,比值1.8~2.0的继续用于后续实验。所有DNA样品置于-20 $^{\circ}$ C保存,用于后续PCR扩增和高通量菌群测序。

[0092] 5、PCR扩增

[0093] 设计合成16S rRNA基因V4区扩增引物,引物序列如下:

[0094] 515F:5' -GTGYCAGCMGCCGCGTAA-3' (SEQ ID NO.1);

[0095] 806R:5' -GGACTACNVGGGTWTCTAAT-3' (SEQ ID NO.2)。

[0096] PCR扩增体系如表2所示。

[0097] 表2 PCR扩增体系

成分	体积 (50 μ L)
[0098] 正向引物 (10 μ M)	1
反向引物(10 μ M)	1
DNA 模板	4

	dNTPs (2.5 mM)	5
[0099]	10 × EasyPfu Buffer	1
	Easy Pfu DNA Polymerase	1
	双蒸水	37

[0100] PCR反应程序如表3所示。

[0101] 表3 PCR反应程序

	步骤	程序	循环数
	预变性	95 °C, 5 min	1
[0102]	变性	94 °C, 30 s	
	退火	60 °C, 30 s	30
	延伸	72 °C, 40 s	
	终延伸	72 °C, 4 min	1

[0103] 6、测序

[0104] 16S rRNA基因V4区采用Illumina MiSeq平台进行高通量测序。

[0105] 7、数据分析

[0106] 测序得到的原始数据经过Adapter removing和低质量碱基去除步骤等优化得到Pass filtered data,再利用Mothur软件 (V.1.34.0<http://www.mothur.org/>) 拼接并除去引物。拼接后得到测序序列。运用UCLUST方法,以97%序列相似性进行OTU聚类;对每个OTU选择一条代表性序列,使用BLAST基于Greengene数据库注释文件对代表性序列进行物种分类注释,得到OTU对应的物种分类信息,并在界、门、纲、目、科、属分类水平统计每个样本的群落组成,比对数据为Greengenes 16S (13_8 release <http://greengenes.secondgenome.com/>)。基于每个注释物种得到的reads丰度,利用ANOVA (analysis of variance) 方法计算疾病组与健康对照组在不同分类层次物种注释上的丰度差异情况。 $P < 0.05$ 即定义为丰度差异显著。

[0107] 8、实验结果

[0108] 图1结果显示,Lactobacillus属在胆管细胞癌组 (Group C) Alloscardovia属丰度显著高于肝细胞癌组 (Group H)、肝硬化组 (Group L)、健康对照组 (Group N),差异具有统计学意义, $P < 0.05$ 。

[0109] 图2结果显示Alloscardovia属在胆管细胞癌组 (Group C) Alloscardovia属丰度

显著高于肝细胞癌组 (Group H)、肝硬化组 (Group L)、健康对照组 (Group N), 差异具有统计学意义, $P < 0.05$ 。

[0110] 实施例2 *Lactobacillus*属和*Alloscardovia*属的临床诊断价值

[0111] 根据实施例1获得的丰度数据, 制作ROC曲线, 分析*Lactobacillus*属和*Alloscardovia*属的临床诊断价值。

[0112] 结果:

[0113] 图3结果显示,*Lactobacillus*属区分胆管细胞癌与肝细胞癌时, AUC为0.429;

[0114] 图4显示*Lactobacillus*属区分胆管细胞癌与肝硬化时, AUC为0.729;

[0115] 图5显示*Lactobacillus*属区分胆管细胞癌与正常人时, AUC为0.679;

[0116] 图6显示*Alloscardovia*属区分胆管细胞癌与肝细胞癌时, AUC为0.798;

[0117] 图7显示*Alloscardovia*属区分胆管细胞癌与肝硬化时, AUC为0.729;

[0118] 图8显示*Alloscardovia*属区分胆管细胞癌与正常人时, AUC为0.694。

[0119] 图9显示*Lactobacillus*和*Alloscardovia*属联合区分胆管细胞癌与肝细胞癌时, AUC为96.8%;

[0120] 图10显示*Lactobacillus*和*Alloscardovia*属联合区分胆管细胞癌与肝硬化时, AUC为96.5%;

[0121] 图11显示*Lactobacillus*和*Alloscardovia*属联合区分胆管细胞癌与正常人时, AUC为98.7%。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 中国人民解放军第三〇二医院
- [0003] <120> 肠道微生物作为胆管细胞癌诊断标志物的用途
- [0004] <160> 2
- [0005] <170> SIPOSequenceListing 1.0
- [0006] <210> 1
- [0007] <211> 19
- [0008] <212> DNA
- [0009] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0010] <400> 1
- [0011] gtgycagcmg ccgcggtaa 19
- [0012] <210> 2
- [0013] <211> 20
- [0014] <212> DNA
- [0015] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0016] <400> 2
- [0017] ggactacnvg ggtwtctaat 20

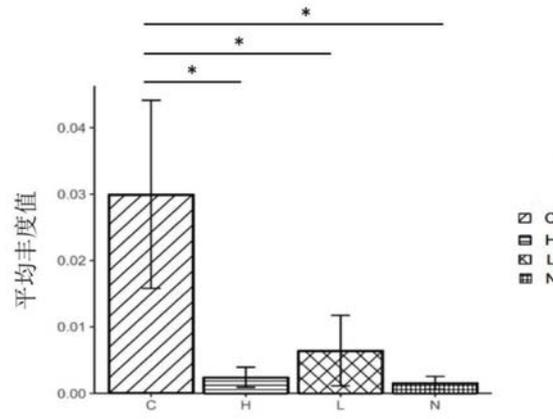


图1

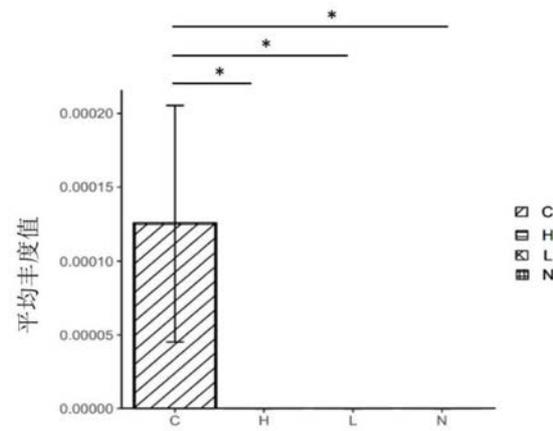


图2

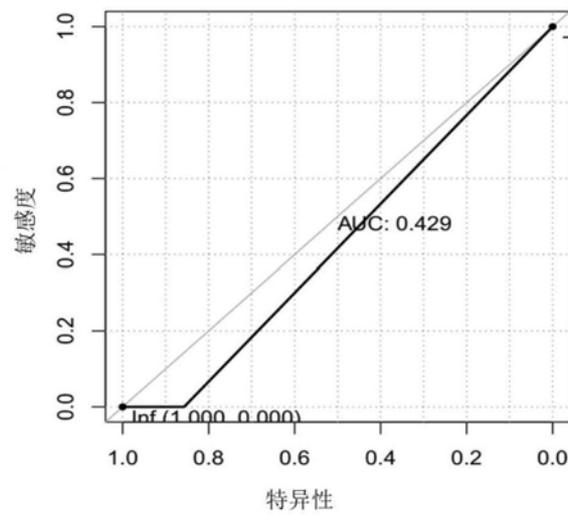


图3

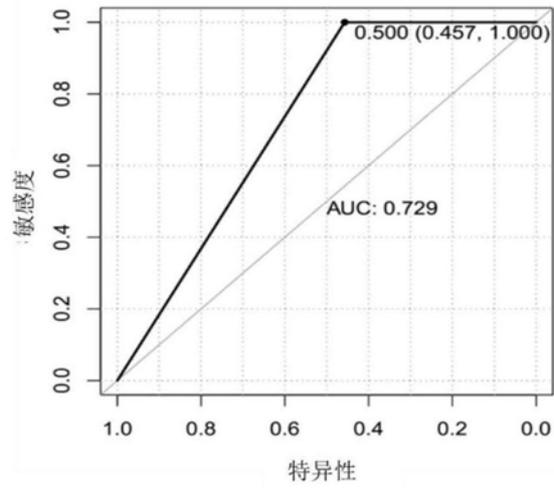


图4

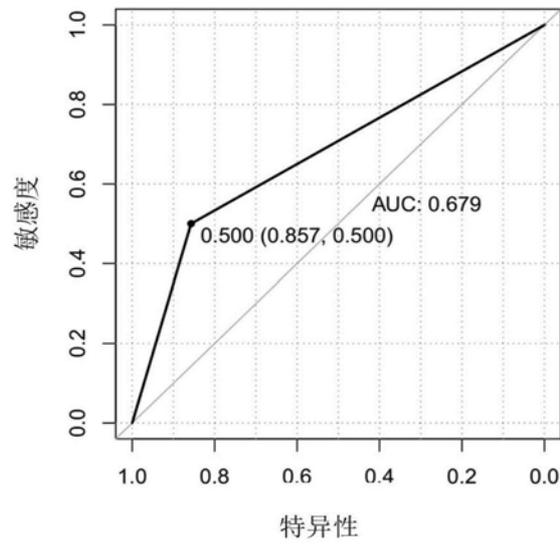


图5

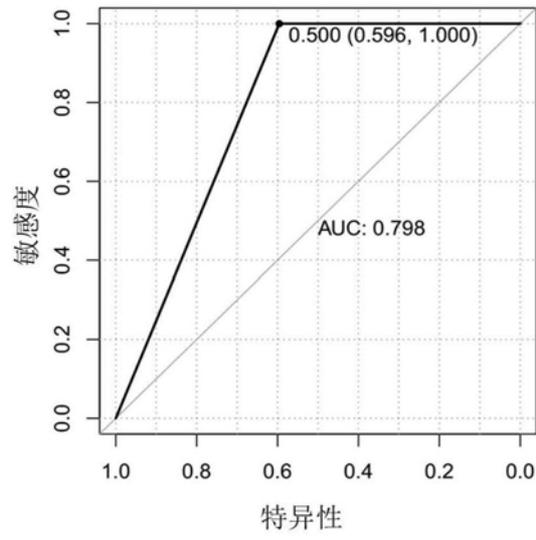


图6

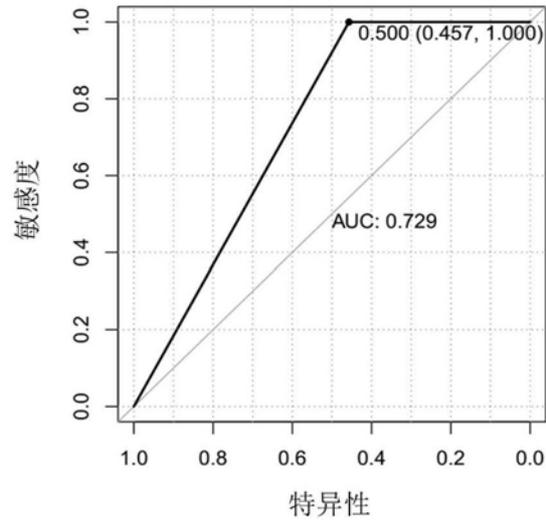


图7

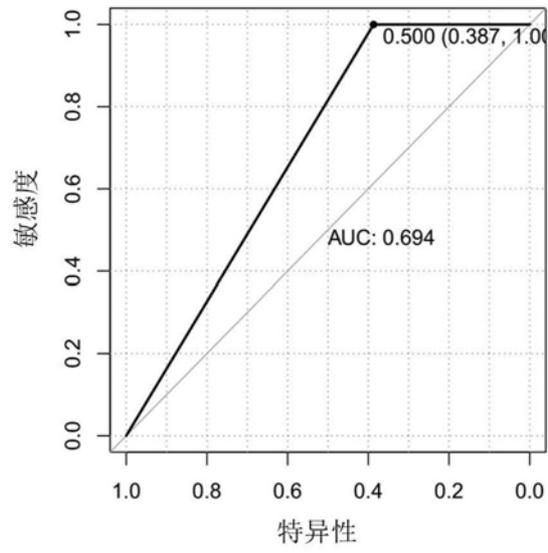


图8

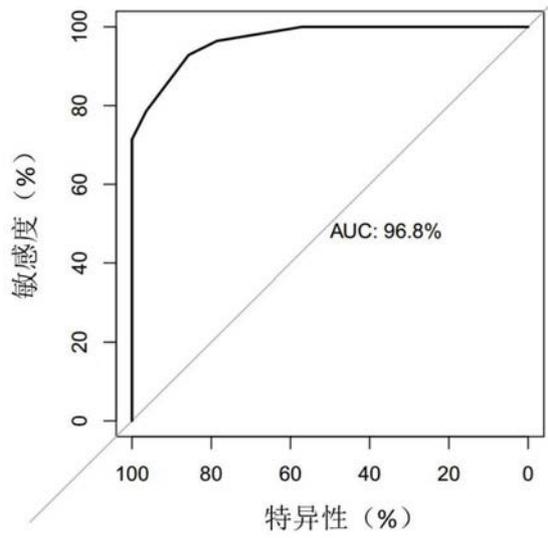


图9

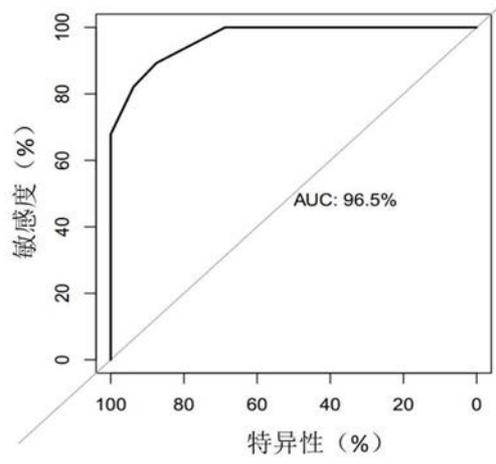


图10

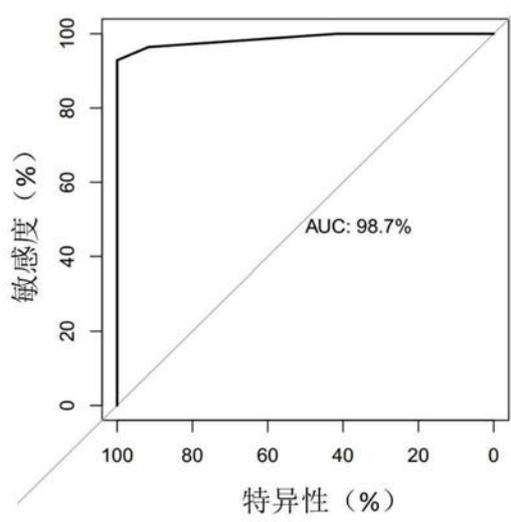


图11