

胆道菌群与胆结石病相关性的研究进展

周陈阳, 任利*

青海大学附属医院肝胆胰外科, 青海 西宁

收稿日期: 2023年3月7日; 录用日期: 2023年4月1日; 发布日期: 2023年4月14日

摘要

胆结石病是一种常见的胃肠道良性疾病, 近年来, 随着人民生活水平的提高与饮食习惯的改变, 其发病率也逐步升高, 胆结石病目前仍然是一个高成本、具有社会意义的公共卫生问题。胆结石病是一种由多种致病因素引起的疾病, 胆结石生成的具体病因及发病机制目前仍未完全明晰。而随着对人类及动物模型进行的大量研究, 证实了胆道菌群在胆结石发病机制中的存在着重要意义。本文即对胆道菌群及其各影响因素、菌群及其代谢产物参与结石形成的详细机制等相关研究成果进行综述, 旨在为胆结石病的预防及治疗提供新的方向。

关键词

胆道菌群, 胆结石病综述

Research Progress on the Relationship between Biliary Flora and Gallstone Disease

Chenyang Zhou, Li Ren*

Department of Hepatopancreatobiliary Surgery, Affiliated Hospital of Qinghai University, Xining Qinghai

Received: Mar. 7th, 2023; accepted: Apr. 1st, 2023; published: Apr. 14th, 2023

Abstract

Cholelithiasis is a common benign gastrointestinal disease. In recent years, with the improvement of people's living standards and changes in their eating habits, its incidence rate has gradually increased. Cholelithiasis is still a high cost and socially significant public health problem. Cholelithiasis is a disease caused by a variety of pathogenic factors. The specific cause and pathogenesis of gallstone formation are still unclear. With a large number of studies on human and animal

*通讯作者。

models, it has been confirmed that the existence of biliary flora in the pathogenesis of gallstones is of great significance. In this paper, we will review the research results of bile duct flora and its influencing factors, and the detailed mechanism of the flora and its metabolites involved in the formation of gallstones, in order to provide a new direction for the prevention and treatment of gallstones.

Keywords

Biliary Flora, Cholelithiasis Review

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

胆结石病是消化道的一种常见疾病,是发生在胆囊与胆管内结石的统称。根据胆结石所处部位的不同,胆结石病分为:胆囊结石、肝内胆管结石、肝外胆管结石。根据胆结石的成分又可分为胆固醇胆结石、胆色素胆结石及混合型胆结石[1]。临床上,胆结石病可以是无症状的,随着疾病的发展,也可引起胆绞痛、急性胆囊炎、黄疸、急性胆管炎等并发症,严重威胁患者的健康和整体生活质量[2]。胆结石病是世界范围内的常见病,根据流行病学的统计分析,在美国和欧洲,成人胆结石病的发病率为10%~15%[3],我国的发病率为5%~12%,且随着生活水平的提高及饮食习惯的改变,近年来有逐渐增加的趋势[4]。胆结石病的发病机制复杂,涉及遗传因素和环境因素的相互作用包括:性别、年龄、胆固醇和胆红素高分泌、胆汁淤积、肠道因素、代谢因素、饮食因素、药物、相关疾病等[5][6]。随着技术的发展以及高通量测序技术的应用,越来越多的研究发现,胆道菌群在结石的生成中有着重要作用。Maki [7]首先发现了细菌感染在胆色素胆结石发病机制中的作用,在后续的研究中,细菌被证明也是胆固醇胆结石的致病因素之一[8]。学者 Sharma 等[9]更是通过模拟胆汁环境,发现细菌可以在体外环境下导致胆结石凝固并加速胆结石的成核过程,进而增强疾病的严重程度。因此,本文旨在对胆道菌群及其影响因素、菌群及其代谢产物参与结石形成的详细机制等相关研究成果进行综述,强化对胆道菌群的认识,为胆结石病的预防及治疗提供新的方向。

2. 胆道菌群

由于胆道系统与胆汁的抗菌特性,传统观点认为健康人类的胆道是无菌的[10]。然而随着技术的发展,通过高通量测序技术,也称下一代测序技术(next-generation sequencing, NGS),以及生物信息学的分析,改变了我们对胆道环境的认识。Jiménez 等[11]分析了健康猪的胆汁、胆囊粘液和粘膜微生物组,在所有培养样品中都证实了细菌存在,每个样品鉴定的细菌物种数量从3到20个不等。研究从不同样本中均分离出葡萄球菌、链球菌、不动杆菌,这表明它们可能是猪胆道的核心菌群成员。Shen [12]通过对15名胆结石病患者的胆汁进行全宏基因组霰弹枪(whole-metagenome shotgun, WMS)测序和16S rRNA 测序,在患者胆汁样本中的鉴定出173种细菌种类以及编码胆汁抵抗相关的蛋白质的基因。这项研究不仅证实了胆道菌群的存在,还解释了菌群在胆道的生存机制。接下来的研究工作中, Ye 等人[13]对胆结石病人的胆道、肠道、胃和口腔的细菌群落进行了分析,发现胆道菌群与十二指肠菌群的物种相似性更高,但多样性较低。由于上述大部分研究的胆汁样本是由侵入性手术获取,如内镜逆行胰胆管造影(ERCP)、经皮胆

道引流, 通常只能在诊断或怀疑胆道疾病时进行, 不能排除疾病与手术的影响因素[14]。2020年 Molinero 等[15]从肝脏移植手术的供体者中获取了健康人群的胆汁样本, 使用基于 16S rRNA 基因的测序分析评估微生物谱, 16S 核糖体 RNA 测序显示, 在没有胆结石的受试者的胆汁样本和胆囊组织中, 放线菌门、厚壁菌门、拟杆菌门均普遍存在。与胆结石患者相比, 丙酸杆菌科和鞘单胞菌属的丰度也有显著增加。这项研究提供了有关健康人类存在胆道微生物群的证据。胆道菌群稳定存在的假设得到证实, 可能会彻底改变我们对胆道疾病发展的认识。消化道的菌群在维持人体正常生理功能意义重大, 正如前文所述, 正常人类胆道中也存在菌群的分布, 或许正是在各种因素的影响下改变了胆道的正常菌群结构从而导致了结石的形成。

3. 胆道菌群影响因素

3.1. 胆道系统对胆道菌群的影响

胆道系统与胆道内环境密切相关, 当各种因素影响其正常结构或功能时, 将会引起内环境的理化性质改变, 继而导致菌群的失衡。曹等[16]采用高通量测序技术研究壶腹周围憩室(PAD)对胆道菌群的影响, 发现在 PAD 组患者胆道中, 致病性细菌如卟啉单胞菌属、嗜胆菌属等较对照组丰度增高, 而乳杆菌属等益生菌或弱致病性细菌丰度下降。其通过对 2 组患者结石成分进行分析, 发现 PAD 组结石中胆红素含量明显高于非 PAD 组, 而在 Song [17]的研究中也证明了 PAD 与胆色素结石的形成有关。因此可见, PAD 可能是胆色素型结石形成的主要解剖异常原因。在健康的胆道系统中, 胆管细胞不仅参与胆汁形成, 在受到外源性或内源性刺激后, 胆管细胞积极增殖并释放促炎分子, 组织巨噬细胞和肝脏库普弗细胞负责杀灭微生物。胆管细胞本身也可激活先天免疫反应, 对抗通过肝肠循环到达肝脏的肠道来源微生物或细菌产物, 胆道细胞完整性是防止致病性细菌侵入的一个重要的机械屏障[18]。Liu 等[19]研究发现, 胆道损伤和无胆道损伤的患者细菌丰度差异有统计学意义, 其中普雷沃氏菌、卟啉单胞菌、梭杆菌群在病例组中更为富集。原发性硬化性胆管炎(primary sclerosing cholangitis, PSC)是一种主要影响胆管的疾病, 主要表现为胆管进行性纤维化狭窄和胆管粘膜溃疡性病变。在 Liwinski [20]的研究中, PSC 患者的上消化道和胆管中的微生物群落出现了生态失调, 其中胆汁中的变化最为显著, 包括生物多样性减少和病原性粪肠球菌增加。而在更多的研究[21][22]中, 各种因素导致胆道解剖结构改变, 以及胆道支架的置入都会引起胆道环境的改变、分泌功能异常、胆道内菌群变化, 继而导致结石的发生或复发。

3.2. 奥迪括约肌对胆道菌群的影响

奥迪括约肌位于胆管、胰管和十二指肠相连接之处, 由胆道括约肌、胰管括约肌及十二指肠括约肌等 3 组不同的肌群共同构成, 其所构成的管腔是胆汁与胰液流向肠道的通路。当其出现功能障碍或损伤时, 肠道内容物可通过胆管回流进入胆道, 从而改变胆道环境。早期的研究表明, 由腐蚀性肠内容物反流引起的胆道微生物群变化和炎症反应可能是胆管结石形成的关键[23]。胆管微生物群和胆汁成分是胆管微环境的重要组成部分, 通过对微生物组与代谢组学的综合分析, Zhang 等[24]发现奥迪括约肌松弛(SOL)患者与具有正常奥迪括约肌功能的患者相比表现出显著的不同的微生物组和代谢组, SOL 是手术后胆总管结石复发的关键危险因素。梭状芽胞杆菌的存在可能与 SOL 诱导的胆总管结石复发有关。在后续研究中, 这一结论也得到了证实, SOL 与胆道微生物群相互作用并促进胆道结石的发展[25]。十二指肠括约肌切开术(EST)是一种针对胆总管结石的常用治疗技术, 然而由于其术式造成了十二指肠括约肌功能的丧失, 使得胆总管结石复发率高达 39% [26]。研究发现, 有 EST 手术史的胆结石患者的胆道中胃肠道细菌组成更为富集, EST 诱导胆道微生物组成的发生了变化[27]。这或许提示我们应谨慎考虑对于胆总管结石患者的术式选择, 尽量保留括约肌的功能, 减少胆总管结石的复发。

除上述胆道解剖与疾病因素外, 饮食、华支睾吸虫、血吸虫病等也在导致胆道菌群的紊乱中有重要的作用[28] [29]。但目前能确切明确及恢复胆道菌群正常分布的方案尚未探明, 仍需较多的临床和基础研究来揭示改善胆道菌群以预防胆结石发作与复发的策略。

4. 胆道菌群参与胆结石的形成机制

细菌在胆结石形成中的作用机制在很久以前就已被提出。早在 1966 年, Maki [7] 首先注意到胆道细菌感染在色素性胆结石形成中的重要性。他首次提出了细菌在促进胆色素胆结石凝固中的作用, 这是胆色素胆结石形成的基础步骤。存在于血液中的胆红素在排泄到胆汁中之前在肝脏中酯化形成水溶性葡萄糖苷酸。在细菌存在 β -葡萄糖醛酸酶活性的情况下, 胆红素葡萄糖苷酸水解释放游离胆红素, 游离胆红素与钙结合形成胆红素钙, 一种水不溶性的化合物。这种不溶性胆红素钙可作为色素结石形成的病灶。在后续的研究中, 在色素性胆结石患者的样本中经常发现表达 β -葡萄糖醛酸酶的细菌[30]。不仅如此, 其他的细菌酶, 如磷脂酶和胆汁酸水解酶, 后来也被证明了与胆色素胆结石形成具有类似机制[31] [32]。因此, 细菌在色素性胆结石发病机制中的作用被广泛接受。

β -葡萄糖醛酸酶最初被证实由大肠杆菌产生, 随后被证实也能由产气荚膜梭菌和拟杆菌种分泌[30]。然而, 在胆结石和胆汁中发现的一些常见胆道细菌如肠球菌、肠杆菌和假单胞菌不能产生这类细菌酶[33]。这一现象表明细菌可能在胆结石形成过程中存在其他机制。随着对胆道细菌研究的深入, 学者 Stewart 等发现细菌黏液也参与了胆结石的形成。细菌黏液的主要成分是黏蛋白, 其化学本质是高分子量阴离子糖蛋白, 可通过相互凝集构成的网状支架将胆汁中的胆红素钙、棕榈酸钙沉淀, 甚至将细菌微菌落聚集在一起而形成结石。其通过分别检测胆色素胆结石患者胆道内的细菌源性 β -葡萄糖醛酸酶和细菌黏液, 发现黏液比 β -葡萄糖醛酸酶在结石形成中具有更重要的作用[34]。上述细菌的这些不同致石机制或许正是不同成分胆结石的形成原因。学者 Kawai 等[35]检查了 69 例不同患者的胆结石(30 种胆色素胆结石, 21 种纯胆固醇胆结石和 18 种混合型胆结石), 从胆结石的核心中提取细菌 DNA, 通过 PCR 产物的 DNA 测序鉴定出了胆结石中的细菌种类。胆色素胆结石中百分之八十的细菌是革兰阴性杆菌或厌氧菌。相比之下, 纯胆固醇胆结石中 100% 的细菌都是革兰阳性球菌。混合型胆结石中的细菌由 40% 革兰阳性球菌, 50% 革兰阴性菌和 10% 厌氧菌组成。在随后的研究中, 学者 Stewart 等通过对 351 例胆结石疾病患者的 382 例独特胆结石进行分析, 此项研究检查了所有类型胆结石中的细菌特性, 证明了细菌特性与形成的结石类型之间的相关性。产生 β -葡萄糖醛酸酶、磷脂酶和黏液的细菌主要诱导胆色素胆结石的形成, 促进混合型胆结石的细菌主要产生 β -葡萄糖醛酸酶和磷脂酶, 仅产生黏液(或不产生结石形成因子)的细菌经常促进胆固醇胆结石的形成[33]。伴随着时代发展与技术进步, 基于下一代高通量测序技术的宏基因组学为我们更深的揭示了胆道菌群的代谢和作用机制。2018 年, Kose 等[36]通过比较胆色素胆结石和胆固醇胆结石, 发现了结石菌群在功能宏基因组上的差异。革兰阳性细菌在大多数检查的胆固醇胆结石中占主导地位, 而在色素结石中没有发现。在胆色素胆结石中发现高比例的参与碳水化合物代谢的基因, 而主导蛋白质代谢的基因在胆固醇胆结石中更活跃。尽管对菌群的此类研究仍较少, 但使我们从另一个角度了解胆道菌群成为可能, 从而发现菌群与宿主健康之间的联系, 并确定导致结石的菌群特征。

综上所述, 胆道菌群在参与胆结石形成过程中发挥着重大作用, 参与胆结石发病机制的细菌因素应得到更多的研究。上述细菌因素或许只是细菌作用机制中的一部分, 还需要更多的数据来确认参与结石形成的细菌种类以及参与机制。细菌与胆结石形成之间的关系需要我们继续探索。

5. 小结

胆结石病作为一种常见的消化道疾病, 因其高发病率、易复发的特点严重影响着患者的身心健康和

生活质量。目前的研究表明胆结石病与胆道菌群密切相关, 随着分子组学和高通量测序技术的发展, 胆道菌群在胆结石发病过程中的诸多作用已被证实, 以胆道菌群为靶点为胆结石的预防和治疗提供了新的视角和前景。然而, 由于胆道菌群数量庞大、种类繁多且胆道菌群参与胆结石具体发病机制尚不完善, 未来还需进一步探索研究。

参考文献

- [1] 李太想, 史光军. 胆石病病因的研究进展[J]. 临床普外科电子杂志, 2018, 6(4): 20-24.
- [2] Littlefield, A. and Lenahan, C. (2019) Cholelithiasis: Presentation and Management. *Journal of Midwifery & Women's Health*, **64**, 289-297. <https://doi.org/10.1111/jmwh.12959>
- [3] Di Ciaula, A., Wang, D.Q.H. and Portincasa, P. (2018) An Update on the Pathogenesis of Cholesterol Gallstone Disease. *Current Opinion in Gastroenterology*, **34**, 71-80. <https://doi.org/10.1097/MOG.0000000000000423>
- [4] 宋睿, 杜国平. 胆石症的研究进展与新认识[J]. 医学理论与实践, 2018, 31(10): 1427-1428+1436.
- [5] 王云超, 张维璐, 王新华. 我国胆石病相关危险因素概述[J]. 中华老年多器官疾病杂志, 2018, 17(8): 636-640.
- [6] Swarne, E., Srikanth, M.S, Shreyas, A, et al. (2021) Recent Advances, Novel Targets and Treatments for Cholelithiasis; a Narrative Review. *European Journal of Pharmacology*, **908**, Article 174376. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.174376>
- [7] Maki, T. (1966) Pathogenesis of Calcium Bilirubinate Gallstone: Role of *E. coli*, β -Glucuronidase and Coagulation by Inorganic Ions, Polyelectrolytes and Agitation. *Annals of Surgery*, **164**, 90-100. <https://doi.org/10.1097/0000658-196607000-00010>
- [8] Vitetta, L., Best, S.P. and Sali, A. (2000) Single and Multiple Cholesterol Gallstones and the Influence of Bacteria. *Medical Hypotheses*, **55**, 502-506. <https://doi.org/10.1054/mehy.2000.1101>
- [9] Sharma, R., Sachan, S.G. and Sharma, S.R. (2020) *In Vitro* Analysis of Gallstone Formation in the Presence of Bacteria. *Indian Journal of Gastroenterology*, **39**, 473-480. <https://doi.org/10.1007/s12664-020-01055-6>
- [10] Verdier, J., Luedde, T. and Sellge, G. (2015) Biliary Mucosal Barrier and Microbiome. *Visceral Medicine*, **31**, 156-161. <https://doi.org/10.1159/000431071>
- [11] Jiménez, E., Sánchez, B., Farina, A., et al. (2014) Characterization of the Bile and Gall Bladder Microbiota of Healthy Pigs. *Microbiology Open*, **3**, 937-949. <https://doi.org/10.1002/mbo3.218>
- [12] Shen, H., Ye, F., Xie, L., et al. (2015) Metagenomic Sequencing of Bile from Gallstone Patients to Identify Different Microbial Community Patterns and Novel Biliary Bacteria. *Scientific Reports*, **5**, Article 17450. <https://doi.org/10.1038/srep17450>
- [13] Ye, F., Shen, H., Li, Z., et al. (2016) Influence of the Biliary System on Biliary Bacteria Revealed by Bacterial Communities of the Human Biliary and Upper Digestive Tracts. *PLOS ONE*, **11**, e0150519. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150519>
- [14] Chen, B., Fu, S.W., Lu, L., et al. (2019) A Preliminary Study of Biliary Microbiota in Patients with Bile Duct Stones or Distal Cholangiocarcinoma. *BioMed Research International*, **2019**, Article ID: 1092563. <https://doi.org/10.1155/2019/1092563>
- [15] Molinero, N., Ruiz, L., Milani, C., et al. (2019) The Human Gallbladder Microbiome Is Related to the Physiological State and the Biliary Metabolic Profile. *Microbiome*, **7**, Article No. 100. <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0712-8>
- [16] 曹洁, 李天亚, 周静, 等. 壶腹周围憩室对胆总管结石患者结石成分及胆道菌群的影响[J]. 中国微生态学杂志, 2022, 34(3): 300-305.
- [17] Song, M.E., Chung, M.J., Lee, D.J., et al. (2016) Cholecystectomy for Prevention of Recurrence after Endoscopic Clearance of Bile Duct Stones in Korea. *Yonsei Medical Journal*, **57**, 132-137. <https://doi.org/10.3349/ymj.2016.57.1.132>
- [18] Sung, J.Y., Costerton, J.W. and Shaffer, E.A. (1992) Defense System in the Biliary Tract Against Bacterial Infection. *Digestive Diseases and Sciences*, **37**, 689-696. <https://doi.org/10.1007/BF01296423>
- [19] Liu, Y., Sun, L.Y., Zhu, Z.J., et al. (2020) Bile Microbiota: New Insights into Biliary Complications in Liver Transplant Recipients. *Annals of Translational Medicine*, **8**, 354-354. <https://doi.org/10.21037/atm.2020.02.60>
- [20] Liwinski, T., Zenouzi, R., John, C., et al. (2020) Alterations of the Bile Microbiome in Primary Sclerosing Cholangitis. *Gut Microbiota*, **69**, 665-672. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2019-318416>
- [21] 李松财, 汤武亨, 金海, 等. 胆道疾病患者胆道感染的病原学特征及危险因素[J]. 中华医院感染学杂志, 2020,

30(21): 3321-3325.

- [22] Kaneko, J., Kawata, K., Watanabe, S., *et al.* (2018) Clinical Characteristics and Risk Factors for Stent-Stone Complex Formation Following Biliary Plastic Stent Placement in Patients with Common Bile Duct Stones. *Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences*, **25**, 448-454. <https://doi.org/10.1002/jhbp.584>
- [23] Toouli, J. (2009) Sphincter of Oddi: Function, Dysfunction, and Its Management. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, **24**, S57-S62. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2009.06072.x>
- [24] Zhang, Q., Ye, M., Su, W., *et al.* (2020) Sphincter of Oddi Laxity Alters Bile Ductmicrobiota and Contributes to the Recurrence of Choledocholithiasis. *Annals of Translational Medicine*, **8**, 1383. <https://doi.org/10.21037/atm-20-3295>
- [25] Liu, L., Zhao, Z., Hou, X., *et al.* (2022) Effect of Sphincter of Oddi Dysfunction on the Abundance of Biliary Microbiota (Biliary Microecology) in Patients with Common Bile Duct Stones. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, **12**, Article 1001441. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.1001441>
- [26] Li, Y., Tan, W.H., Wu, J.C., *et al.* (2022) Microbiologic Risk Factors of Recurrent Choledocholithiasis Post-Endoscopic Sphincterotomy. *World Journal of Gastroenterology*, **28**, 1257-1271. <https://doi.org/10.3748/wjg.v28.i12.1257>
- [27] Shen, H., Zhu, J., Ye, F., *et al.* (2021) Biliary Microbial Structure of Gallstone Patients with a History of Endoscopic Sphincterotomy Surgery. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, **10**, Article 594778. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.594778>
- [28] Gutiérrez-Díaz, I., Molinero, N., Cabrera, A., *et al.* (2018) Diet: Cause or Consequence of the Microbial Profile of Cholelithiasis Disease? *Nutrients*, **10**, Article 1307. <https://doi.org/10.3390/nu10091307>
- [29] Saltykova, I.V., Petrov, V.A., Logacheva, M.D., *et al.* (2016) Biliary Microbiota, Gallstone Disease and Infection with *Opisthorchis felineus*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, **10**, e0004809. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004809>
- [30] Leung, J.W., Liu, Y., Leung, P.S.C., *et al.* (2001) Expression of Bacterial β -Glucuronidase in Human Bile: An *in Vitro* Study. *Gastrointestinal Endoscopy*, **54**, 346-350. <https://doi.org/10.1067/mge.2001.117546>
- [31] Gumucio, J.J. and Ostrow, J.D. (1991) Brown Pigment Gallstones: The Role of Bacterial Hydrolases and Another Missed Opportunity. *Hepatology*, **13**, 607-609. <https://doi.org/10.1002/hep.1840130335>
- [32] Nakano, T., Yanagisawa, J. and Nakayama, F. (1988) Phospholipase Activity in Human Bile. *Hepatology*, **8**, 1560-1564. <https://doi.org/10.1002/hep.1840080615>
- [33] Stewart, L., Grifiss, J.M., Jarvis, G.A., *et al.* (2006) Biliary Bacterial Factors Determine the Path of Gallstone Formation. *The American Journal of Surgery*, **192**, 598-603. <https://doi.org/10.1016/j.amjsurg.2006.08.001>
- [34] Stewart, L. (2000) Pigment Gallstone Pathogenesis: Slime Production by Biliary Bacteria Is More Important than Beta-Glucuronidase Production. *Journal of Gastrointestinal Surgery*, **4**, 547-553. [https://doi.org/10.1016/S1091-255X\(00\)80100-6](https://doi.org/10.1016/S1091-255X(00)80100-6)
- [35] Kawai, M., Iwahashi, M., Uchiyama, K., *et al.* (2002) Gram-Positive Cocci Are Associated with the Formation of Completely Pure Cholesterol Stones. *The American Journal of Gastroenterology*, **97**, 83-88. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2002.05425.x>
- [36] Kose, S.H., Grice, K., Orsi, W.D., *et al.* (2018) Metagenomics of Pigmented and Cholesterol Gallstones: The Putative Role of Bacteria. *Scientific Reports*, **8**, Article 11218. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29571-8>