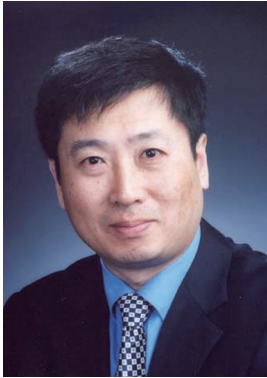


DOI: 10.13376/j.cblls/2017087

文章编号: 1004-0374(2017)07-0636-08



房静远, 1996年获上海第二医科大学消化科博士学位, 美国NIH博士后和密歇根大学客座研究员。上海市消化疾病研究所所长, 上海交通大学医学院附属仁济医院消化科主任兼大内科主任、二级教授、主任医师、博导, 上海市重中之重临床医学中心(消化内科)主任、上海市消化内科临床质控中心主任, 卫生部内科消化重点实验室主任、癌基因及相关基因国家重点实验室PI。中华消化学会常委兼副秘书长和肿瘤组长、中国医师协会消化医师分会副会长、上海市消化学会主任委员。国家杰出青年基金获得者、教育部“长江学者”特聘教授、NSFC创新研究群体和教育部创新团队带头人、国务院学位委员会学科评议组成员、国家自然科学基金委咨询委员。主要研究方向是胃癌肠癌发生、预警、早诊和治疗及预防中的表观遗传学信号通路-肠微生态研究。以第一负责人承担了15项相关国家级项目(包括NSFC杰青、重点、国合重大、创新群体等)。发表SCI论文133篇, 主编和副主编大肠肿瘤和表观遗传学方面专著6部。

## 微生物组学与肠道肿瘤

陈慧敏, 房静远\*

(上海交通大学医学院附属仁济医院消化科, 上海市消化疾病研究所, 上海 200001)

**摘要:** 肠道肿瘤的发病是宿主、环境等多因素共同作用的结果。宿主与其体内生活的肠道微生物有着密不可分的互利共生关系。随着高通量测序等研究技术的进一步成熟, 肠道微生态的功能、组成以及与肠道肿瘤发生、发展、诊治间的关系日趋明朗。确定的和肿瘤相关微生物的异质性可能被开发为筛选肠道肿瘤风险的有力工具, 而对菌群的干预和改变可能成为肠道肿瘤预防和治疗策略的重要环节之一。

**关键词:** 肠道肿瘤; 肠道微生物; 高通量测序; 菌群干预

**中图分类号:** Q93; R735.3      **文献标志码:** A

## Microbiomics and intestinal tumors

CHEN Hui-Min, FANG Jing-Yuan\*

(Division of Gastroenterology and Hepatology, Renji Hospital, School of Medicine,  
Shanghai Jiao Tong University, Shanghai Institute of Digestive Disease, Shanghai 200001, China)

**Abstract:** Both host and environmental factors contribute to the intestinal tumors development. The intestinal microbiota (IM) plays a significant role in the maintenance of good health in the host. With the development of high-throughput sequencing technology on IM research, the relationship between the intestinal microorganisms and their metabolites, and the development, diagnosis and treatment of colorectal cancer (CRC) become much clearer. Determining the tumor-associated microbial heterogeneity could be a powerful tool for CRC screening. Also, microbial manipulation and microbially-driven cancer immunotherapy could be a potential way to influence host health, prevent and treat CRC.

**Key words:** intestinal tumors; intestinal microbiota (IM); high-throughput sequencing; microbial manipulation

收稿日期: 2016-09-11

基金项目: 国家自然科学基金创新研究群体项目(81421001)

\*通信作者: E-mail: fangjingyuannew@163.com

根据世界卫生组织统计, 每年全球大肠癌新发逾百万, 每年因结直肠癌 (colorectal cancer, CRC) 死亡的人数高达 50 万人次<sup>[1]</sup>。随着我国人民生活水平的提高、生活方式的西化以及饮食结构的改变, 大肠癌的发病率逐年升高; 虽然外科扩大根治范围, 化疗放疗条件及设备也有所改善, 但大肠癌的总生存率却未见提高。究其原因, 一方面是早期发现治疗的患者比例并未显著增高; 另一方面则为外科技术的限制、放疗欠敏感与化疗易产生耐药及对复发转移者缺乏有效方法等。因此, 大肠癌的预防、早期发现及提高疗效显得极为重要。

大肠癌的发病是宿主、环境等多因素共同作用的结果。近年来的观点认为, 人体与其体内生活的肠道微生物有着密不可分的互利共生关系, 肠道微生物本身及其代谢产物不仅广泛参与人体的许多基本生理代谢活动, 调节人体健康, 更在膳食和宿主之间起到了重要的桥梁作用。同时, 肠道微生态的特征对疾病的治疗效果也有指示作用。本文总结近年来关于肠道微生物研究技术、肠道微生物的结构功能以及肠道微生物与大肠肿瘤发生及诊治的关系的研究进展, 以期为未来的肠道微生物研究提供一定的参考。

## 1 肠道微生物组学的研究方法及进展

肠道细菌、肠道病毒组与真菌等一起构成了肠道微生物组。作为人体最庞大、最复杂的微生态系统, 肠道微生物群在不同解剖部位丰度不同, 其物种数量和种类从胃到结肠逐步增加<sup>[2-3]</sup>。成人肠道内的微生物数量高达  $1 \times 10^{14}$ , 接近人体体细胞数量的 10 倍; 质量达 1.2 kg, 接近人体肝脏重量; 其包含的基因数目约是人体自身基因的 100 倍<sup>[4]</sup>。

肠道菌群传统的分析方法主要是选择性培养基计数 (尤其是厌氧菌培养)。但由于肠道内可培养的细菌只占总细菌的 30%, 局限于纯培养的方法具有很多不足之处。首先, 体外培养体系难以模拟微生物在肠道中自然生长繁殖的条件, 对于那些生长条件还不明确, 与宿主或者别的微生物关系极其密切的细菌以及真菌、病毒等其他肠道微生物很难进行研究; 其次, 仅仅依靠形态学和生理生化检测也不能对菌株进行准确的鉴定。

### 1.1 高通量测序及宏基因组研究

随着分子生物学技术的发展, 运用成熟的实时荧光定量 PCR (real-time polymerase chain reaction, RT-PCR)、寡肽探针、末端限制性长度多态性分析

(T-RFLP)、变性梯度凝胶电泳 (denatured gradient gel electrophoresis, DGGE) 等技术方法来研究肠道微生物的多样性, 越来越多的尚未能培养的微生物被发现, 肠道微生物的多态性分析及定性定量研究取得了重大突破<sup>[5]</sup>。近年来, 随着第二代高通量测序手段的成熟, 组学思想成为热点。2007 年底, 美国国立卫生研究院 (NIH) 率先启动了 1.15 亿美元预算的“人类微生物组计划” (Human Microbiome Project)。2008 年 4 月, 欧盟启动肠道元基因组第七框架项目 (MetaHIT), 耗资约 2 770 万美元。肠道微生物组学研究被 *Nature Medicine* 杂志评为 2011 年度八大生物医学研究进展之一, 被 *Science* 杂志评为 2011 年度十大科学突破之一。

高通量测序以及用于高度复杂数据分析计算的工具有开发使得深入研究微生物, 对一个物种的转录组和基因组进行细致全貌的分析成为可能。微生物的 DNA 或 RNA 可以加工成下一代测序 (next-generation sequencing, NGS) 高通量序列库; 此外, 微生物群落的计算工具, 如定量分析微生物生态学 QIIME Knight 实验室)、mothur (Schloss 实验室), bioBakery 分析工具 (Huttenhower 实验室) 以及其他分析微生物生态的软件包 (ALM 实验室) 等可用来实现后续分析<sup>[6]</sup>。

### 1.2 分析宿主-微生物相互作用的动物模型及体外“人造肠道”

宏基因组分析可以提供丰富数据, 以此来推断微生物物种的相对丰度和不同健康状态之间的联系。但海量菌群数据只能提供种群丰度相关性, 指出某种疾病可能的相关性。为了确定原因, 分析宿主-微生物相互作用的细节, 研究人员需要利用可以操纵不同的变量的模型进一步研究。随着模式动物、基因工程动物模型的开发, 出现了更多基于动物模型的肠道微生物功能研究<sup>[7]</sup>。此外, Wilmes 研究小组设计了 HuMiX, 这一基于微流控技术模拟肠道的条件和流程的体外模型, 实时观察细菌与人类肠道细胞交流时的相互作用。HuMiX 具有三个隔离层, 第一层用于基质灌注; 第二层用于人类上皮细胞培养; 第三层用于微生物培养。隔离层由模拟健康上皮细胞层的多孔膜分开, 以操纵培养基的物理化学参数。该设备还包含氧传感器, 并能容纳一个电极来测量经上皮电阻, 用以描述细胞的生长和分化。这一模型使得对影响人类-微生物相互作用的变量参数进行系统操纵成为可能。

研究人员对设备内的共培养条件进行优化, 用

于有氧和厌氧条件,重复了以前公布的人类和动物实验,并比较了由此产生的转录组和代谢产物,验证显示 HuMiX 能够概括正常的肠道反应,“可作为一个优秀的人类肠道模型”。下一步, HuMiX 可能促进用于癌症生物标记物的鉴定,筛选药物和调查药物动力学,分析益生菌、膳食化合物对人体机能的影响<sup>[8]</sup>。

### 1.3 基因和代谢组技术促进菌株水平分析

我国学者研究表明,以磁共振为基础的代谢组分析,可在尿液等样本中鉴定出与疾病表型相关代谢产物;而以新计算机算法可在宏基因组数据中组装特定菌株基因组草图;今后应在菌株水平做后续研究,只有通过确切的后续机制研究确立因果关系,特定菌株才有可能成为诊断生物标志物和治疗靶标<sup>[9]</sup>。

## 2 肠道微生物组学的结构功能

### 2.1 肠道菌群组学的结构功能

不同人之间肠道菌群宏基因组的差别很大,列出充分的保持健康所必需的核心菌群的组成,是发展针对菌群的疗法的第一步。2005年, Eckburg 等<sup>[2]</sup>的工作是人体肠道菌群多样性研究的一个里程碑。他们对3例健康个体盲肠、升结肠、横结肠、降结肠、乙状结肠和直肠6个部位的肠道黏膜菌及粪便菌群构建21个16S rRNA基因克隆文库,共获得11 831条细菌序列,根据99%序列同源性组成395个细菌种类(phylo type),其中244个都是新的、未知的细菌种类。系统发育分析显示人体肠道菌群主要由7大门组成:厚壁菌门(Firmicutes)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、变形菌门(Proteobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)、梭杆菌门(Fusobacteria)、疣微球菌门(Verrucomicrobia)以及与蓝细菌(Cyanobacteria)较接近的未分类细菌<sup>[2]</sup>。加上之前人们已经鉴定出的螺旋体门(Spirochaetes)和 VadinBE97 门,到目前为止人体肠道内已鉴定出的细菌共9个门,其中人体肠道内最优势的两个门是厚壁菌门和拟杆菌门<sup>[10-11]</sup>,占98%以上的序列,而其他门的比例只有1%左右。这种高一级的分类单元(division)数目相对较少,但种以下(subspecies)水平的高多样性的特点,使得肠道菌群在系统进化树上表现出独特的扇形系统发育结构。粪便样品中肠道细菌重量占30%左右,即每粪便样品中含有1 011个细胞,主要为拟杆菌(*Baeterioiaes*)、拟球梭菌(*Clostridium coccoides*)和柔嫩梭菌(*Clostridium leptum*)<sup>[12]</sup>。2010年,欧盟 MetaHIT 项目组在 *Nature* 发表人体肠道

微生物的基因目录。据测定,人类肠道中至少存在着1 000~1 150种细菌,平均宿主体内约含有160种优势菌种,肠道元基因组集共约330万有效参考基因<sup>[13]</sup>。不同人群肠道微生物大致可分为三种亚类,即拟杆菌型(*Bacteroides*)、普氏菌型(*Prevotella*)及瘤胃球菌型(*Ruminococcus*)<sup>[14]</sup>。高通量DNA测序技术的出现——最初根据细菌和古细菌16S rRNA扩增子序列的聚类读取,现在通过调整全基因组到所有结构域——允许样本无须培养,直接进行测序分类。这些技术进步提供了分析来自不同环境中的复杂的微生物群落并随着时间的推移分析群落结构变化的可靠方法。虽然微生物组成具有个体差异性及随着时间具有波动性,核心功能始终存在于定植宿主体内的微生物群落。

### 2.2 肠道真菌组学的结构功能

真菌参与影响宿主健康或疾病状态。随着技术的精进,包括新一代测序等应用,相关研究已经揭示胃肠道和驻地真菌群落(mycobiota)之间复杂多面的关系。健康个体宿主真菌基因组(mycobiome)中包含66个真菌属和184个真菌种,其中念珠菌(*Candida*)是最主要的真菌属<sup>[15]</sup>。该研究总结了胃肠疾病,包括炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)及移植物抗宿主病等患者存在不同的真菌表型,真菌菌群紊乱导致炎症反应的加重,从而加重病情。2016年, Wheeler 等<sup>[16]</sup>研究了肠道真菌失衡造成的免疫学后果,发表在 *Cell Host & Microbe*。此研究中,给小鼠口服抗真菌药物加剧了急、慢性结肠炎的严重程度,并加剧了呼吸道过敏性疾病的发展。进一步菌群分析发现,药物导致真菌群落的结构调整:假丝酵母菌属(*Candida spp.*)减少,曲霉属、节担菌属、附球菌属(*Aspergillus amstelodami*、*Epicoccum nigrum*和*Wallemia sebi*)增加。口服补充曲霉属、节担菌属、附球菌属三种真菌混合制剂后足以加剧呼吸道过敏性疾病。这些结果表明,共生真菌失调能影响局部和外周免疫响应,加剧相关疾病状态。目前人类对于真菌组对宿主健康和疾病贡献的认识尚处于起步阶段,解决这些问题,需要进一步依赖新技术方法的涌现,从而防治、管理急慢性胃肠疾病。

### 2.3 肠道病毒组

人体病毒组包括了能够感染真核细胞的病毒及噬菌体;病毒与宿主基因网络互作,影响人体的健康与疾病。唯有增加对人类的病毒组多样性的理解,才能深入完整理解整个微生物组-宿主的作用网络。



值得注意的是, 美国 2012—2014 年间投入在微生物研究的课题经费约 920 万美元, 仅有 3% 研究经费用于病毒组学 (viromes)<sup>[17]</sup>。根据研究数据粗略估计, 约有 32 万哺乳动物体内病毒等待进一步研究<sup>[18]</sup>。除此以外, 地球上据估约有数量高达  $10^{31}$  的噬菌体, 10 倍超过其感染的细菌宿主<sup>[19]</sup>, 长期以来, 宿主相关的病毒组对人体生理的重要性被忽视了。

下一步的宏基因组分析将继续细化分类真核病毒和噬菌体组。研究病毒组与细菌组及宿主间相互作用网络, 需要依赖包括小鼠等体内和组织体外培养感染模型表征真核细胞病毒, 以及噬菌体感染细菌宿主等经典的实验方法。这两种策略都极具挑战性, 很大程度依靠病毒分离纯度和易感宿主模型的可用性及可重复性。同时, 目前靠计算方法来预测噬菌体-宿主关系匹配成功率尚很低, 仅在 10%~40% 的病例有将 1 个噬菌体对应分配到 1~4 个可能的细菌宿主的能力<sup>[20]</sup>。只有随着未来计算方法的进一步成熟, 机理研究也需要噬菌体在易感宿主细菌中的有效可复制生长, 才能逐步加深人类对“病毒-基因, 噬菌体-病毒”相互作用整体联动网络的理解。

最近研究工作表明, 胃肠道噬菌体的数量与炎症性肠病患者体内细菌数量变化成反比<sup>[21]</sup>。这一证据提示了肠道微生物组在 IBD 的细菌生态失调中起推波助澜的作用。将病毒组交互网络与其他细菌-哺乳动物宿主相互作用网络集成在一起, 有助于我们评估更复杂的生物场景。

### 3 肠道微生物组与肠道肿瘤

当考虑微生物组在哪些疾病模型中的作用比既往认识到的更重要, 首先映入脑海的是癌症风险。目前观点认为选择性的微生物组可以介导慢性炎症性环境, 从而促进结直肠癌的进展。

#### 3.1 肠道微生物失调与肠道肿瘤的发生发展相关

目前已知的是环境因素很大程度影响结直肠癌的发生发展。人体表面受到持续的来自外界环境的刺激。感染、外伤、饮食因素、种系突变等均可能破坏机体的黏膜屏障。大多数情况下, 被破坏的黏膜屏障迅速修复, 恢复组织稳态。而少数情况下, 受损的宿主或微生物稳态无法修复, 屏障持续破坏, 导致动态失衡, 肿瘤形成。某些微生物已被证明增加 CRC 风险, 但没有明确的 CRC 相关的菌群结构被确认。衰老及抗生素、吸烟、激素、饮食等环境因素可能造成肠道生态失调, 从而增加患癌几率<sup>[22]</sup>。不同细菌群落可能调节宿主代谢, 影响肿瘤的发

生<sup>[23-25]</sup>。

Flemer 等<sup>[26]</sup>发表在 2016 年 *Gut* 上的观察性研究分析了 59 位结直肠癌患者、21 位肠息肉的患者、56 位健康人对照的粪便和黏膜样品, 发现结肠癌患者可以根据肠菌丰度的不同分为四组 CAGs (mucosal-associated bacterial co-abundance groups), 类似之前研究提出的“enterotypes”的概念。其中, 拟杆菌群 1 (Bacteroidetes Cluster 1) 和厚壁菌群 1 (Firmicutes Cluster 1) 在 CRC 黏膜丰度减少, 而拟杆菌群 2 (Bacteroidetes Cluster 2)、厚壁菌群 2 (Firmicutes Cluster 2)、病原集群 (Pathogen Cluster) 和集群普氏菌 (Prevotella Cluster) 在肠癌黏膜中丰度增加。肠癌相关的 CAGs 不同程度地与宿主免疫炎症相关基因的表达相关。CRC 患者中黏膜定植微生物群的变化并不限于癌性组织区域, 与肿瘤组织距离不同的部位里微生物组成也不尽相同。CRC 相关性细菌簇差异不同程度地与肠黏膜基因表达图谱相关。同时, 该研究对比黏膜肠道菌群与粪便菌群发现, 后者只是部分反映了大肠肿瘤患者黏膜定植的菌群。

类似地, Nakatsu 等<sup>[27]</sup>发表在 *Nat Commun* 的研究以 16S rRNA 测序测定正常黏膜组织 (61 例)、大肠腺瘤黏膜 (47 对腺瘤及配对腺瘤相邻的黏膜) 以及大肠癌黏膜组织 (52 对癌和癌旁黏膜配对样本) 的肠道微生态, 通过配对样本和微生物的关系进一步分析, 揭示在大肠肿瘤发生进展的不同阶段, 人体内肠道黏膜的菌群组成不同, 肠道黏膜病变部位与病变邻近部位的菌群组成不同; 并且, 肠道黏膜中的口腔微生物组成与结肠直肠癌的发生相关。研究证明了沿着腺瘤-大肠癌序列途径, 相应的黏膜微生物群落可以建立自己的微型生态系统, 肠道微生物生态失调促进结直肠癌的发展。近年来, *Fusobacterium*<sup>[28-30]</sup> 和 *B. fragilis*<sup>[31]</sup> 以及特定肠癌中富集的肠菌, 如 *Gemella*、消化链球菌 (*Peptostreptococcus*) 和 *Parvimonas* 的识别, 扩大了参与 CRC 发展的细菌族谱。上述三者以及其他口腔来源的微生物一起形成密切共生网络结构。今后研究将进一步应用小鼠模型等研究 CRC 相关集合群落, 从而明确这些候选菌群的潜在致癌作用及可能机制。

流行病学研究表明, 腹腔感染及抗生素的使用与大肠癌发病风险正相关<sup>[32]</sup>。在小鼠模型中, 减少或选择性地改变肠道微生物影响肿瘤发生率和其进展情况<sup>[23]</sup>。肠道微生物不仅影响局部肿瘤的风险, 也通过改变炎症性及代谢通路影响远处肿瘤进展。肠道菌群与宿主免疫系统之间的平衡让宿主能够对病

原体起到保护性的应答, 并且对无害的抗原形成耐受。在高收入国家, 抗生素的过度使用、饮食的改变、线虫等寄生生物的消除, 可能导致肠道菌群的多样性降低, 难以建立平衡的免疫反应<sup>[33]</sup>。

最近主流的观念认为, 肠道微生物影响肿瘤发生发展、肿瘤治疗应答效果及肿瘤相关并发症主要通过以下三大类机制: (1) 将致癌基因整合进宿主基因组, 影响宿主基因组稳定性, 生成可能致癌的蛋白, 从而改变宿主细胞的增殖和死亡的平衡; (2) 指导免疫系统应答, 菌群与宿主免疫系统之间的平衡被打破而产生的炎症反应可能导致癌症的发生, 菌群对宿主免疫系统的抑制也可能提高患癌概率; (3) 影响宿主摄取食物或药品的代谢过程<sup>[34]</sup>。

### 3.2 肠道微生物、膳食、益生菌/益生元与肠道肿瘤

膳食在腺瘤-癌序列中的作用引起了特别的兴趣。有研究表明, 个体膳食和特异性肠道菌群通过免疫和代谢物介导双重机制影响结肠的促炎症状态及肠道肿瘤的发生。观察显示, 生活在乡村的非洲土著人的癌症患病率低于非裔美国人, 这可能是由于前者的膳食中含有更高含量的不可消化的多糖成分。未消化的多糖主要以食物纤维形式进入肠道, 被微生物群代谢为短链脂肪酸后进一步转化为乙酸、丙酸和丁酸。后两者抑制细胞内组蛋白去乙酰化酶活性, 进一步调节促炎因子(白介素6和12)及诱导T细胞分化为调节T细胞。这一过程导致结肠内炎症介质减少<sup>[35]</sup>。类似的研究表明, 非裔美国人患结肠癌的比例显著高于生活在乡村的南非人<sup>[36]</sup>。高结肠癌比例与非裔美国人摄入的更多动物蛋白和脂肪、更少的纤维、更多的次级胆汁酸以及更少的结肠短链脂肪酸相关。红肉以及加工过的肉制品中含有的高含量蛋白及亚铁血红素, 以及被肠道菌群消化后产生的亚硝胺等对结肠直肠癌的发病有促进作用<sup>[37]</sup>。我国学者对比大肠腺瘤、大肠癌患者膳食纤维摄入量及粪肠道菌群变化发现, 高纤维膳食模式及后续生产一致性的短链脂肪酸和健康的肠道菌群与肠癌风险降低有关<sup>[38]</sup>。

目前, 饮食对肠道菌群的组成究竟有何种程度的影响以及饮食需要多久改变肠道微生态, 这一问题仍存在争议。Wu等<sup>[39]</sup>通过对美国同一市区环境的15位素食主义者和6位杂食者进行比较, 研究饮食对肠道菌群和宿主代谢的影响, 相关发表在*Gut*杂志上。两组人群在血浆代谢上的较大差异与其明显的饮食差别相关。但令人惊讶的是, 不同的饮食对肠道菌群组成上的影响并不是很大。这个结

果说明, 如果世界上不同人种的肠道菌群组成是因饮食不同而产生了显著的差异, 那么这一差异是需要经历几代人的演变才能形成的, 或是需要人们很早就暴露在不同饮食这一影响因素下才能形成。换句话说, 独立于饮食影响, 环境因素在“塑造”肠道菌群的组成中发挥着重要作用。而另一些研究表明, 使用人类肠道菌群可使无菌小鼠肠道人源化, 且证实从以植物为基础的膳食转换为西式高脂肪高糖饮食可导致肠道菌群的明显改变, 这一转变发生很快<sup>[40]</sup>。后来的人体试验显示, 膳食可在1天内改变肠道微生物群<sup>[41]</sup>。

有专家认为, 不当饮食加上菌群失调, 构成了结直肠癌的“食谱”。越来越多研究表明, 肠道菌群是饮食影响宿主代谢状态的调节子, O'Keefe等<sup>[36]</sup>进一步研究表明, 改变食物组成后, 非裔美国人的肠道菌群及肠道代谢组都发生了改变, 黏膜癌症危险度的生物标记物也随之发生改变。Schulz等<sup>[42]</sup>给予K-ras突变小鼠高脂饮食, 促进小肠肿瘤发生, 且与肥胖无关。高脂饮食与K-ras突变共同改变肠道菌群组成, 后者与宿主抗菌防御下降相关。进一步分析显示, 将摄入高脂饮食并带有肠道肿瘤的小鼠粪便移植到不摄入高脂饮食的K-ras突变的小鼠体内, 可诱导后者发生小肠癌。

综上所述, 肠道菌群通过影响宿主的一系列生理过程, 引起结肠炎症, 增加癌症发病风险; 正因如此, 可以通过选择性膳食, 或利用益生菌、益生元或合生元调节肠道菌群组成, 从而调节免疫系统以预防炎症及结肠直肠癌的发生<sup>[43-44]</sup>。相关的流行病学数据、动物模型及人体实验都证实了益生菌和益生元的益处<sup>[45]</sup>。但并非所有研究都支持, 而针对人的实验极少; 在已有的临床实验中, 有一些在结肠直肠癌中短期应用益生菌及益生元的成功案例, 但益生菌的长期作用有待研究<sup>[46]</sup>。但目前疗效判定不一致等问题导致益生菌临床研究难以标准化。欧洲食品安全局目前尚拒绝明确宣布益生菌与健康的相关性<sup>[47]</sup>。通过近年来一系列膳食及其对肠道微生物组影响的研究, 最主要的是提供了我们看待疾病治疗的另一角度可能性——除了给予药物, 可以开始考虑将膳食作为肠道肿瘤治疗的一种辅助方法。然而, 关于补充益生菌/益生元预防结肠直肠癌的临床应用剂量、疗程、疗效判断等尚需进一步大规模研究证实。

### 3.3 肠道微生物失调与肠道肿瘤的预防相关

研究表明, 在小鼠模型和人的结直肠癌中, 肠



道上皮细胞自噬被激活。而肠道上皮细胞的 Atg7 失活抑制 Apc<sup>+/-</sup> 小鼠体内的癌前病变。Atg7 缺失导致伴随着代谢缺陷的应激反应, 肠道微生物通过影响免疫反应, 可抑制肠道中的 Atg7, 防止肿瘤发生, 并抑制肿瘤生长<sup>[48]</sup>。

使用毛细血管扩张性失调小鼠模型研究表明, 肠道菌群通过影响系统性炎症状态、氧化应激及白细胞基因毒性来调节淋巴瘤发生率、潜伏期、寿命、分子氧化应激以及系统性白细胞基因毒性。易患癌的小鼠体内可见约氏乳杆菌 (*Lactobacillus johnsonii*) 的缺失, 而短期口服补充约氏乳杆菌的小鼠可见系统性白细胞基因毒性的降低<sup>[49]</sup>。

### 3.4 肠道微生物失调与肠道肿瘤的治疗应答相关

越来越多证据表明, 除了肿瘤细胞基因及表观基因调控、宿主免疫反应、肿瘤微环境等因素以外, 宿主微生物群影响肿瘤的干预效果并在预测患者治疗反应中起重要作用。肠道微生物组成及丰度的不同, 不仅促发不同局部免疫应答, 还调节全身免疫并影响其恶变风险; 同时, 在癌症治疗过程中, 不同的治疗方法可能改变肠道菌群的组成, 而肠道菌群也可能影响各种疗法的效果。利用抗生素、益生菌或益生元改变肠道菌群的组成可能是提高肿瘤疗效未来值得关注的方面。

常见的抗肿瘤药物包括选择性的环磷酰胺、5-氟尿嘧啶和伊立替康, 或同种异体干细胞移植等, 显著影响肠道微生态的组成<sup>[23]</sup>, 进而通过改变免疫应答或导致免疫耐受等影响肿瘤对治疗的反应。比如, 环磷酰胺改变肠道菌群的组成, 导致革兰氏阴性菌移位次级淋巴器官, 致病性 Th17 和 Th1 记忆细胞被激活; 环磷酰胺对无菌小鼠或用抗生素杀死革兰氏阴性菌的小鼠无效, 产生肿瘤耐药性<sup>[50]</sup>。抗生素杀灭革兰氏阳性菌, 破坏肠道菌群, 也通过改变肿瘤微环境中髓样细胞, 影响 CpG 寡核苷酸的免疫治疗和环磷酰胺疗效。要使肿瘤治疗达到期望的疗效, 需要完整的共生菌群来调节肿瘤微环境中的髓系来源细胞的功能<sup>[51]</sup>。

2015 年, *Science* 杂志发表研究表明, CTLA-4 免疫抑制剂的抗癌作用有赖于肠道菌群: 双歧杆菌的使用增强机体对黑色素瘤的抗肿瘤免疫, 通过改变树突细胞活性增强 PD-L1 和 aCTLA-4 单克隆抗体治疗效果, 改善抗原特异性 CD8<sup>+</sup> T 细胞功能; 而这些功效在使用氨苄西林、多黏菌素、链霉素后降低, 而在使用万古霉素增强拟杆菌定植浓度后, 疗效增强<sup>[52]</sup>。同期的小鼠模型研究表明, 双歧杆菌

能增强 CD8<sup>+</sup> 阳性细胞启动和肿瘤微环境聚集的树突状细胞功能, 增强抗 PD-L1 抗肿瘤效果, 只口服双歧杆菌, 就能提高同剂量抗 PD-L1 治疗效果, 联合治疗几乎完全抑制肿瘤生长<sup>[53]</sup>。此外, 肠道菌群的组成可以很好地预测同种异体干细胞移植的疗效<sup>[54]</sup>。这些数据强调肠道共生菌对治疗应答的影响。

正因如此, 可否通过选择性地操纵肠道微生态, 从而降低肿瘤易感性、降低肿瘤发生率和 (或) 改善一些抗癌疗法的应答率, Zitvogel 等<sup>[22]</sup> 提出了 4 种不同的方法, 用于操纵肠道菌群以提高癌症治疗效果: (1) 优先使用选择性作用于不良细菌物种的抗生素; (2) 使用益生菌; (3) 使用益生元刺激健康肠道菌群的定植; (4) 使用 postbiotics (即体外无活性, 经宿主肠道微生物代谢产生活性的产品)。针对这一系列研究, 2016 年 *Science* 上亦发表了相关评论, 强调了利用肠道菌群来预防和治疗肿瘤的机遇, 利用肠道菌群造成免疫系统的平衡在癌症疗法中有很好的前途。与之同时, 文章同时指出, 小鼠模型中的实验结果很难直接应用于临床治疗中<sup>[55]</sup>。

### 3.5 检测肠道微生物有助于提高肠道肿瘤的早期诊断率

结肠直肠癌中存在肠道菌群组成的改变。临床工作中可利用这一改变, 将粪肠道菌群发展为 CRC 的潜在生物标记物。Baxter 等<sup>[56]</sup> 分析 490 名患者粪便样本, 利用肠道菌群相对丰度及粪便中血红蛋白浓度构建模型, 发现该模型可在传统粪便免疫化学检测未能检测出的结肠病变中, 检测出 70% 的结直肠癌及 37.7% 腺瘤患者, 提高了结直肠癌病变的检测敏感度。具核酸杆菌和致病性大肠杆菌构成的肠微生态可能用于大肠癌的筛查<sup>[57]</sup>。大肠癌组织中具核梭杆菌含量高者预后差<sup>[58]</sup>。

微生物组学研究方兴未艾, 随着技术的进一步进步, 其功能及组成以及与肠道肿瘤发生发展以及诊治之间的关系会日趋明朗。确定的 CRC 相关微生物的异质性可能被开发为健康个体筛选大肠肿瘤风险的有力工具。而对菌群的干预和改变可能成为 CRC 的预防和治疗策略的一个重要环节。

### [参 考 文 献]

- [1] Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*, 2015, 65: 87-108
- [2] Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, et al. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*, 2005, 308: 1635-8
- [3] Donaldson GP, Lee SM, Mazmanian SK. Gut

- biogeography of the bacterial microbiota. *Nat Rev Microbiol*, 2016, 14: 20-32
- [4] Sender R, Fuchs S, Milo R. Are we really vastly outnumbered? Revisiting the ratio of bacterial to host cells in humans. *Cell*, 2016, 164: 337-40
- [5] Dumas ME. Metabolic profiling reveals a contribution of gut microbiota to fatty liver phenotype in insulin-resistant mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 12511-6
- [6] Rooks MG, Garrett WS. Gut microbiota, metabolites and host immunity. *Nat Rev Immunol*, 2016, 16: 341-52
- [7] Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, et al. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell*, 2004, 118: 229-41
- [8] Shah P, Fritz JV, Glaab E, et al. A microfluidics-based *in vitro* model of the gastrointestinal human-microbe interface. *Nat Commun*, 2016, 7: 11535
- [9] Zhang C, Zhao L. Strain-level dissection of the contribution of the gut microbiome to human metabolic disease. *Genome Med*, 2016, 8: 41
- [10] Bäckhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, et al. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science*, 2005, 307: 1915-20
- [11] Ley RE, Peterson DA, Gordon JI. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell*, 2006, 124: 837-48
- [12] Nicholson JK, Holmes E, Wilson ID. Gut microorganisms, mammalian metabolism and personalized health care. *Nat Rev Microbiol*, 2005, 3: 431-8
- [13] Qin J, Li R, Raes J, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, 2010, 464: 59-65
- [14] Arumugam M, Raes J, Pelletier E, et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*, 2011, 473: 174-80
- [15] Mukherjee PK, Sendid B, Hoarau G, et al. Mycobiota in gastrointestinal diseases. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2015, 12: 77-87
- [16] Wheeler ML, Limon JJ, Bar AS, et al. Immunological consequences of intestinal fungal dysbiosis. *Cell Host Microbe*, 2016, 19: 865-73
- [17] Stulberg E, Fravel D, Proctor LM, et al. An assessment of US microbiome research. *Nat Microbiol*, 2016, 1: 15015
- [18] Anthony SJ, Epstein JH, Murray KA, et al. A strategy to estimate unknown viral diversity in mammals. *MBio*, 2013, 4: e00598-13
- [19] Clokie MR, Millard AD, Letarov AV, et al. Phages in nature. *Bacteriophage*, 2011, 1: 31-45
- [20] Edwards RA, McNair K, Faust K, et al. Computational approaches to predict bacteriophage-host relationships. *FEMS Microbiol Rev*, 2016, 40: 258-72
- [21] Norman JM, Handley SA, Baldrige MT, et al. Disease-specific alterations in the enteric virome in inflammatory bowel disease. *Cell*, 2015, 160: 447-60
- [22] Zitvogel L, Galluzzi L, Viaud S, et al. Cancer and the gut microbiota: an unexpected link. *Sci Transl Med*, 2015, 7: 271ps1
- [23] Dejea CM, Wick EC, Hechenbleikner EM, et al. Microbiota organization is a distinct feature of proximal colorectal cancers. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111: 18321-6
- [24] Johnson CH, Dejea CM, Edler D, et al. Metabolism links bacterial biofilms and colon carcinogenesis. *Cell Metab*, 2015, 21: 891-7
- [25] Liu J, Prindle A, Humphries J, et al. Metabolic co-dependence gives rise to collective oscillations within biofilms. *Nature*, 2015, 523: 550-4
- [26] Flemer B, Lynch DB, Brown JM, et al. Tumour-associated and non-tumour-associated microbiota in colorectal cancer. *Gut*, 2017, 66: 633-43
- [27] Nakatsu G, Li X, Zhou H, et al. Gut mucosal microbiome across stages of colorectal carcinogenesis. *Nat Commun*, 2015, 6: 8727
- [28] Kostic AD, Gevers D, Pedamallu CS, et al. Genomic analysis identifies association of *Fusobacterium* with colorectal carcinoma. *Genome Res*, 2012, 22: 292-8
- [29] Castellarin M, Warren RL, Freeman JD, et al. *Fusobacterium nucleatum* infection is prevalent in human colorectal carcinoma. *Genome Res*, 2012, 22: 299-306
- [30] Tahara T, Yamamoto E, Suzuki H, et al. *Fusobacterium* in colonic flora and molecular features of colorectal carcinoma. *Cancer Res*, 2014, 74: 1311-8
- [31] Boleij A, Hechenbleikner EM, Goodwin AC, et al. The *Bacteroides fragilis* toxin gene is prevalent in the colon mucosa of colorectal cancer patients. *Clin Infect Dis*, 2015, 60: 208-15
- [32] Wang JL, Chang CH, Lin JW, et al. Infection, antibiotic therapy and risk of colorectal cancer: a nationwide nested case-control study in patients with type 2 diabetes mellitus. *Int J Cancer*, 2014, 135: 956-67
- [33] Belkaid Y, Hand TW. Role of the microbiota in immunity and inflammation. *Cell*, 2014, 157: 121-41
- [34] Garrett WS. Cancer and the microbiota. *Science*, 2015, 348: 80-6
- [35] Louis P, Hold GL, Flint HJ. The gut microbiota, bacterial metabolites and colorectal cancer. *Nat Rev Microbiol*, 2014, 12: 661-72
- [36] O'Keefe SJ, Li JV, Lahti L, et al. Fat, fibre and cancer risk in African Americans and rural Africans. *Nat Commun*, 2015, 6: 6342
- [37] Vippera K, O'Keefe SJ. Diet, microbiota, and dysbiosis: a 'recipe' for colorectal cancer. *Food Funct*, 2016, 7: 1731-40
- [38] Chen HM, Yu YN, Wang JL, et al. Decreased dietary fiber intake and structural alteration of gut microbiota in patients with advanced colorectal adenoma. *Am J Clin Nutr*, 2013, 97: 1044-52
- [39] Wu GD, Compher C, Chen EZ, et al. Comparative metabolomics in vegans and omnivores reveal constraints on diet-dependent gut microbiota metabolite production. *Gut*, 2016, 65: 63-72
- [40] Turnbaugh PJ, Ridaura VK, Faith JJ, et al. The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice. *Sci Transl Med*, 2009, 1: 6ra14

- [41] David LA, Maurice CF, Carmody RN, et al. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*, 2014, 505: 559-63
- [42] Schulz MD, Atay C, Heringer J, et al. High-fat-diet-mediated dysbiosis promotes intestinal carcinogenesis independently of obesity. *Nature*, 2014, 514: 508-12
- [43] Hold GL. Gastrointestinal microbiota and colon cancer. *Dig Dis*, 2016, 34: 244-50
- [44] Slavin J. Fiber and prebiotics: mechanisms and health benefits. *Nutrients*, 2013, 5: 1417-35
- [45] Ambalam P, Raman M, Purama RK, et al. Probiotics, prebiotics and colorectal cancer prevention. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2016, 30:119-31
- [46] Zhu Y, Michelle Luo T, Jobin C, et al. Gut microbiota and probiotics in colon tumorigenesis. *Cancer Lett*, 2011, 309:119-27
- [47] Warusavitarne J, Stebbing J. Probiotics and cancer: ready for meal time? *Lancet Oncol*, 2015, 16: 371-2
- [48] Lévy J, Cacheux W, Bara MA, et al. Intestinal inhibition of Atg7 prevents tumour initiation through a microbiome-influenced immune response and suppresses tumour growth. *Nat Cell Biol*, 2015,17: 1062-73
- [49] Yamamoto ML, Maier I, Dang AT, et al. Intestinal bacteria modify lymphoma incidence and latency by affecting systemic inflammatory state, oxidative stress, and leukocyte genotoxicity. *Cancer Res*, 2013, 73: 4222-32
- [50] Viaud S, Saccheri F, Mignot G, et al. The intestinal microbiota modulates the anticancer immune effects of cyclophosphamide. *Science*, 2013, 342: 971-6
- [51] Iida N, Dzutsev A, Stewart CA, et al. Commensal bacteria control cancer response to therapy by modulating the tumor microenvironment. *Science*, 2013, 342: 967-70
- [52] Vetizou M, Pitt JM, Daillere R, et al. Anticancer immunotherapy by CTLA-4 blockade relies on the gut microbiota. *Science*, 2015, 350: 1079-84
- [53] Sivan A, Corrales L, Hubert N, et al. Commensal *Bifidobacterium* promotes antitumor immunity and facilitates anti-PD-L1 efficacy. *Science*, 2015, 350: 1084-9
- [54] Snyder A, Pamer E, Wolchok J. Could microbial therapy boost cancer immunotherapy? *Science*, 2015, 350: 1031-2
- [55] Erdman SE. Gut microbiota: microbes offer engineering strategies to combat cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2016, 13: 125-6
- [56] Baxter NT, Ruffin MT, Rogers MA, et al. Microbiota-based model improves the sensitivity of fecal immunochemical test for detecting colonic lesions. *Genome Med*, 2016, 8: 37
- [57] Leung A, Tsoi H, Yu J. *Fusobacterium* and *Escherichia*: models of colorectal cancer driven by microbiota and the utility of microbiota in colorectal cancer screening. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 2015, 9: 651-7
- [58] Mima K, Nishihara R, Qian ZR, et al. *Fusobacterium nucleatum* in colorectal carcinoma tissue and patient prognosis. *Gut*, 2015, 65: 1973-80