

## 食管鳞癌原位模型小鼠肠道菌群分析

张玉双<sup>1</sup>, 于富洋<sup>2</sup>, 吴忠冰<sup>2</sup>, 王一然<sup>2</sup>, 李晶<sup>1, 2\*</sup>



扫描二维码  
查看原文

**【摘要】** 背景 随着肠道菌群高通量测序技术的应用与发展,越来越多的研究证实肠道菌群与多种肿瘤的发生、发展密切相关。食管鳞癌是威胁我国人民健康的常见肿瘤,其与肠道菌群的关系备受关注。**目的** 分析比较食管鳞癌原位模型小鼠与正常小鼠肠道菌群的多样性,筛选出食管鳞癌特异性改变的菌属。**方法** 2020年8月至2021年5月,将20只雌性SPF级C57BL/6小鼠适应性喂养1周后随机分为对照组(DZ组)和模型组(MX组),每组10只。DZ组小鼠常规喂养并给予普通饮用水32周, MX组小鼠按照造模方法常规喂养并给予含0.1 mg/ml 诱癌剂4-硝基喹啉-1-氧化物(4NQO)的饮用水喂养16周,之后给予普通饮用水喂养至32周。收集两组小鼠粪便,提取DNA,应用聚合酶链式反应(PCR)扩增后进行高通量测序,获得的测序数据聚类成为基于序列间相似度的分类操作单元(OTU),并根据物种注释情况进一步分析Alpha多样性、Beta多样性、物种丰度。**结果** 两组小鼠在实验过程中未出现死亡, MX组小鼠均造模成功。MX组与DZ组相比,拟杆菌门(*Bacteroidota*)及厚壁菌门(*Firmicutes*)比例升高,而疣微菌门(*Verrucomicrobiota*)及变形菌门(*Proteobacteria*)比例降低。Alpha多样性结果显示, MX组小鼠肠道菌群Shannon指数低于DZ组( $P<0.05$ )。Beta多样性分析中PCoA图显示, MX组与DZ组样本分别聚集在不同的象限,相距较远,样本间多样性差异较大( $t=22.444, P=0.004$ )。在门水平, MX组 *Unidentified\_Bacteria*、蓝细菌(*Cyanobacteria*)、易感微生物(*Elusimicrobia*)、弯曲杆菌(*Campilobacterota*)丰度高于DZ组( $P<0.05$ )。在属水平, MX组普雷沃菌科\_UCG-003(*Prevotellaceae\_UCG-003*)、拟杆菌属(*Bacteroides*)、毛螺菌科\_NK4A136组(*Lachnospiraceae\_NK4A136\_group*)、瘤胃球菌属(*Ruminococcus*)、普雷沃菌科\_UCG-001(*Prevotellaceae\_UCG-001*)、普雷沃菌属(*Prevotella*)、大肠埃希菌(*Colidextribacter*)、毛螺菌科\_UCG-006(*Lachnospiraceae\_UCG-006*)丰度高于DZ组,罗姆布茨菌(*Romboutsia*)、土杆菌属(*Turicibacter*)丰度低于DZ组( $P<0.05$ )。LEfSe分析结果显示,在属水平上, *Prevotellaceae\_UCG-003*、埃希菌-志贺菌属(*Escherichia-Shigella*)、*Bacteroides*、*Lachnospiraceae\_NK4A136\_group*在MX组丰度增高( $P<0.05$ );而 *Romboutsia* 丰度在DZ组增高( $P<0.05$ )。**结论** 食管鳞癌原位模型小鼠与正常小鼠相比肠道菌群物种多样性降低,存在特异性差异菌属,其中 *Prevotellaceae\_UCG-003*、*Bacteroides*、*Lachnospiraceae\_NK4A136\_group* 和 *Romboutsia* 可作为食管鳞癌诊断的生物标志物。

**【关键词】** 食道鳞癌;食管肿瘤;胃肠道微生物组;肠道菌群;小鼠;生物多样性

**【中图分类号】** R 735.1 R 378.2 **【文献标识码】** A DOI: 10.12114/j.issn.1007-9572.2021.01.501

张玉双, 于富洋, 吴忠冰, 等. 食管鳞癌原位模型小鼠肠道菌群分析 [J]. 中国全科医学, 2022, 25(8): 945-951. [www.chinagp.net]

ZHANG Y S, YU F Y, WU Z B, et al. Analysis of gut flora in a mouse model of esophageal squamous cell carcinoma in situ [J]. Chinese General Practice, 2022, 25(8): 945-951.

**Analysis of Gut Flora in a Mouse Model of Esophageal Squamous Cell Carcinoma in Situ** ZHANG Yushuang<sup>1</sup>, YU Fuyang<sup>2</sup>, WU Zhongbing<sup>2</sup>, WANG Yiran<sup>2</sup>, LI Jing<sup>1, 2\*</sup>

1. Department of Traditional Chinese Medicine, the Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China

2. College of Integrated Chinese and Western Medicine, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China

\*Corresponding author: LI Jing, Chief physician, Professor, Doctoral supervisor; E-mail: lijingtiger@163.com

**【Abstract】** **Background** With the application and development of high-throughput sequencing-based approaches for gut flora analysis, increasing studies have confirmed that gut flora is closely related to the development of various cancers. The relationship of gut floras with esophageal squamous cell carcinoma (ESCC), a common cancer threatening the health of Chinese people, has attracted extensive attention. **Objective** To analyze the diversity of gut floras between a rat model of ESCC in situ and normal mice, to identify the carcinoma-specific bacterial genus in ESCC. **Methods** From August 2020 to May 2021, 20 female SPF C57BL/6 mice were randomly and equally divided into control group and model group. Rice in control group

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81973761)

1.050011 河北省石家庄市, 河北医科大学第四医院中医科 2.050000 河北省石家庄市, 河北医科大学中西医结合学院

\*通信作者: 李晶, 主任医师, 教授, 博士生导师; E-mail: lijingtiger@163.com

本文数字出版日期: 2022-01-27

were routinely fed and given ordinary drinking water for 32 weeks, and those in model group were routinely fed and received water containing 0.1 mg/ml cancer inducer 4-nitroquinoline-1-oxide for 16 weeks, and then only fed with ordinary drinking water for another 16 weeks. Stool samples of both groups were collected, and DNA in faeces was extracted and amplified by PCR, followed by high-throughput sequencing. The obtained sequencing data were divided into operational taxonomic units (OTU) based on the similarity between sequences. The  $\alpha$ -diversity,  $\beta$ -diversity and species abundance were further analyzed according to species annotation. **Results** No death occurred in the experiment, and the modeling of ESCC was successfully established in model group. Compared with control group, the proportion of *Bacteroidota* and *Firmicutes* increased, while the proportion of *Verrucomicrobiota* and *Proteobacteria* decreased in model group. Analysis showed that the  $\alpha$ -diversity measured by Shannon Diversity Index in model group was lower than that of control group ( $P<0.05$ ). As for  $\beta$ -diversity analysis, PCoA diagram showed that the gut floras of control and model groups clustered in different quadrants, suggesting a significant discrepancy between the groups ( $t=22.444, P=0.004$ ). At the phylum level, the abundances of unidentified bacteria, *Cyanobacteria*, *Elusimicrobia* and *Campilobacterota* were higher in model group than those in control group ( $P<0.05$ ). At the genus level, the abundances of *Prevotellaceae\_UCG-003*, *Bacteroides* and *Lachnospiraceae\_NK4A136\_group*, *Ruminococcus*, *Prevotellaceae\_UCG-001*, *Prevotella*, *Colidextribacter*, *Lachnospiraceae\_UCG-006* were higher while those of *Romboutsia* and *Turicibacter* were lower in model group than those in control group ( $P<0.05$ ). LEfSe analysis showed that, at the genus level, the abundances of *Prevotellaceae\_UCG-003*, *Escherichia-Shigella*, *Bacteroides*, *Lachnospiraceae\_NK4A136\_group* were increased significantly in model group ( $P<0.05$ ), but the abundance of *Romboutsia* was increased significantly in control group DZ ( $P<0.05$ ). **Conclusion** By comparing the composition of gut flora, we identified the rat model of ESCC may have less diversity of species and specially differentiated bacteria, and *Prevotellaceae\_UCG-003*, *Bacteroides*, *Lachnospiraceae\_NK4A136\_group*, and *Romboutsia* could be used as biomarkers for ESCC.

**【Key words】** Esophageal squamous cell carcinoma; Esophageal neoplasms; Gastrointestinal microbiome; Intestinal flora; Mice; Biodiversity

最新的《全球癌症统计报告》数据显示, 2020 年全球食管癌新发病例数为 60.4 万例, 死亡病例数为 54.4 万例, 分别占全球癌症新发、死亡总病例数的 3.1%、5.5%<sup>[1]</sup>。食管癌发病风险地域差异较大, 我国是食管癌发病高风险国家, 据统计 2020 年我国新发食管癌病例数为 32.4 万例, 死亡病例数为 30.1 万例, 分别占全球食管癌新发、死亡总病例数的 53.7%、55.3%<sup>[2]</sup>。我国食管癌患者病理类型以鳞癌为主, 早期行根治术后预后较好, 但由于相当多的食管癌患者确诊时已处于中晚期, 失去了手术机会, 因此提高食管癌早期诊断率仍具有十分重要的意义。

随着高通量测序技术的应用与发展, 肠道微生态研究已成为目前肿瘤领域研究的热点之一。有研究证实肠道菌群在肿瘤的发生、发展中具有重要作用, 食管鳞癌患者口腔、癌组织及癌旁正常组织中菌群结构发生了改变并与食管癌的发生有关<sup>[3-4]</sup>。因肠道菌群的影响因素较多, 本研究特选取饲养环境可控的食管鳞癌原位模型小鼠, 以观察与食管鳞癌相关的肠道菌群结构变化、筛选出特异性改变的肠道菌属, 为食管鳞癌的早期筛查提供参考。

## 1 材料与方 法

1.1 实验动物 从北京维通利华实验动物技术有限公司购买雌性 SPF 级 C57BL/6 小鼠 20 只 [合格证号: SCXK(京)2016-0006], 体质量 14~17 g, 鼠龄 6 周。适应性喂养 1 周后将所有小鼠随机分为对照组 (DZ 组) 和模型组 (MX 组), 每组 10 只。所有实验操作严格

### 本研究背景:

已有研究表明肠道菌群与多种肿瘤的发生、发展和治疗密切相关, 尤其在结直肠癌、肝癌方面的研究较多。食管癌是我国的高发肿瘤, 其发病率与死亡率均为世界平均水平的 2 倍以上。我国以食管鳞癌为主, 早期行根治术后预后较好, 但相当多的患者就诊时已处于中晚期, 失去手术机会。因此寻找简便易取材的检验方法, 提高食管癌早期诊断率并予以干预措施十分重要。

### 本研究创新点:

(1) 高比例成功制备了食管鳞癌原位模型小鼠, 模拟了食管鳞癌发生、发展的过程, 为同类研究提供了基础。(2) 选择饲养环境一致的小鼠作为研究对象, 可以减少因为饮食、环境等因素对菌群研究结果造成的误差。(3) 通过初步对食管癌差异菌属的筛选, 为下一步探讨机制研究提供基础。

遵照河北医科大学实验动物中心指南执行, 遵守动物保护、动物伦理原则及相关规定。本实验时间为 2020 年 8 月至 2021 年 5 月。

1.2 干预方法 DZ 组小鼠常规喂养 32 周, 全程给予普通饮用水; MX 组小鼠按照造模方法常规喂养并给于含 0.1 mg/ml 的诱癌剂 4-硝基喹啉-1-氧化物 (4NQO) 饮用水喂养 16 周, 之后给予普通饮用水喂养至 32 周。4NQO 饮用水制备方法: 将诱癌剂 4NQO (购自 Sigma-Aldrich 公司, 型号: N8141) 溶解于 1, 2 丙二醇, 配

制成浓度为 2% 的母液并保存于 -20 °C 冰箱，使用时按照 0.1 mg/ml 浓度比例混入饮用水中。

**1.3 粪便的无菌收集与处理** 喂养 32 周后收集两组小鼠粪便：在笼具里面放入干净的滤纸后将小鼠依次放入，每笼 1 只；用镊子轻轻刺激小鼠下腹和肛门，待小鼠排便后立即用冻存管进行收集；将冻存管做好标记后放入液氮中，5 min 后再将冻存管放入 -80 °C 冰箱中保存。最终共收集到 20 个粪便标本，每组 10 个。上述操作均在灭菌超净台上进行，且所用材料均采用紫外线灭菌处理。

**1.4 粪便样本检测与数据分析** 采用十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB 法) 提取粪便标本基因组 DNA，应用 16SV34 区域引物序列 341F: CCTAYGGGRBGCASCAG、806R: GGACTACNNGGATCTAAT 进行聚合酶链式反应 (PCR) 扩增；将 PCR 产物进行磁珠纯化，并根据 PCR 产物浓度进行等量混样，充分混匀后使用 2% 琼脂糖凝胶电泳，然后采用胶回收试剂盒回收目的条带以纯化产物；最后使用 TruSeq® DNA PCR-Free Sample PrePreparation Kit 文库试剂盒进行文库构建，经 Qubit、Q-PCR 定量检测构建文库合格后使用 NovaSeq6000 进行上机测序。

通过对测序序列 (Reads) 进行拼接、质控和过滤，以 97% 的一致性将序列聚类成为基于序列间相似度的分类操作单元 (operational taxonomic units, OTU)，然后参照 Silva138 数据库对得到的 OTU 序列进行物种注释，并根据物种注释情况进一步分析 Alpha 多样性、Beta 多样性、物种丰度。

**Alpha 多样性分析** 包括：(1) 稀释曲线：是描述样本多样性的曲线，能够直接反映样本相关测序数据量的合理性，并间接反映样本中物种的丰富程度。(2) Shannon 指数：为菌群物种 Alpha 多样性分析常用的指数，反映不同样本间物种多样性和均一性的差别，Shannon 指数越大说明菌群多样性越高。

**Beta 多样性分析**：是对两组样品间的菌群构成情况进行比较分析。主坐标分析 (PCoA) 是常用的 Beta 多样性分析方法，其基于 Unweighted Unifrac 距离来进行分析，样本间距离越远代表样本间多样性差异越大。

物种丰度分析采用 T-test 检验和 LEfSe 分析，其中 LEfSe 分析是一种软件分析，其能够找到组间有统计学差异的生物标志物。

**1.5 食管组织苏木素 - 伊红 (HE) 染色** 完成粪便收集后处死两组小鼠，剥取其食管组织并采用 4% 多聚甲醛溶液固定，之后进行石蜡包埋、切片、HE 染色，观察两组小鼠食管组织病理改变。

**1.6 统计学方法** 采用 SPSS 21.0 统计学软件进行数据分析。符合正态分布的计量资料以 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示，先进行方差齐性分析，之后进行 T-test 检验。Anosim 相似

性分析用于检验组间差异是否大于组内，判断实验分组是否存在意义。基于两两样本间的距离值排序获得的秩 (组间的为 Between，组内的为 Within)，这样任一两两样本的比较可以获得 3 个分类的数据，并进行箱线图的展示 (若两个箱的凹槽互不重叠，则表明两样本的中位数有显著差异)。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 食管组织病理改变** 两组小鼠在实验过程中未出现死亡，MX 组小鼠均造模成功。DZ 组小鼠食管组织正常，MX 组小鼠食管组织可见鳞状上皮增殖、癌巢形成且癌巢内可见角化珠 (图 1)。

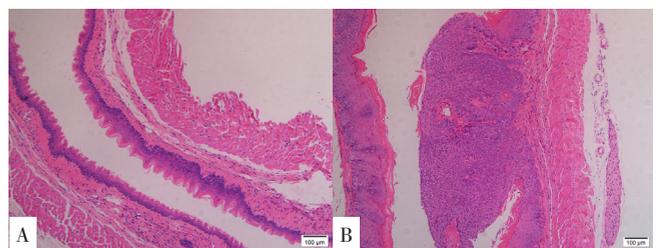
**2.2 肠道菌群测序数据质量评估与 OTU 分析** 对两组小鼠共 20 例粪便标本进行 16S rDNA 基因测序，对检测的原始数据进行拼接、过滤，得到有效数据，平均每样品测得 86 110 条 tags，经过质控平均得到 83 261 条有效数据，质控有效数据量达 54 489，质控有效率达 63.16%。然后基于有效数据进行分析共得到 2 314 个 OTU，再用 OTU 序列进行物种注释。结果共有 862 个 OTU 注释到物种属水平。

基于 OTU 的 Venn 图中，2 种不同颜色的圆对应两组小鼠粪便所含的菌群，重叠部分则为两组共同含有的菌群，DZ 组较 MX 组肠道菌群物种丰富程度明显增加，两组小鼠的肠道菌群结构存在差异，见图 2。同时选择 DZ 组与 MX 组在门水平上丰度排名前 10 的物种，绘制物种相对丰度柱状图 (图 3)，由图可见，在门水平上两组小鼠样本部分物种丰度存在明显差异，MX 组与 DZ 组相比，拟杆菌门 (*Bacteroidota*) 及厚壁菌门 (*Firmicutes*) 比例升高，而疣微菌门 (*Verrucomicrobiota*) 及变形菌门 (*Proteobacteria*) 比例降低。

## 2.3 两组小鼠肠道菌群 Alpha 多样性分析

**2.3.1 两组小鼠肠道菌群物种多样性曲线** 两组小鼠菌群稀释曲线均趋于平坦，则说明目前样本测序数据量渐进合理，即使增加数据量也只会产生少量新的物种，见图 4。

**2.3.2 两组小鼠肠道菌群 Alpha 多样性指数组间差异分析** MX 组肠道菌群 Shannon 指数低于 DZ 组，差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )，见表 1。



注：A 为对照组 (DZ 组)，B 为模型组 (MX 组)；HE 染色 = 苏木精 - 伊红染色

图 1 两组小鼠食管组织 HE 染色结果 ( $\times 200$ )

Figure 1 HE staining results of esophagus tissues two groups of mice

2.4 两组小鼠肠道菌群 Beta 多样性指数组间差异分析 PCoA 图显示, MX 组与 DZ 组样本基本上分别聚集在不同的象限, 相距较远, 样本间多样性差异较大 ( $t=22.444, P=0.004$ ), 见图 5。

2.5 两组小鼠肠道菌群组间差异物种分析

2.5.1 两组小鼠肠道菌群组间与组内差异性分析 Anosim 相似性分析结果显示, 两组小鼠肠道菌群差异组间大于组内, 差异有统计学意义 ( $R=0.476, P=0.001$ ), 见图 6。

2.5.2 肠道菌群差异物种分析 在门水平, MX 组未明确细菌 (*Unidentified\_Bacteria*)、蓝细菌 (*Cyanobacteria*)、易感微生物 (*Elusimicrobia*)、弯曲杆菌 (*Campilobacterota*)

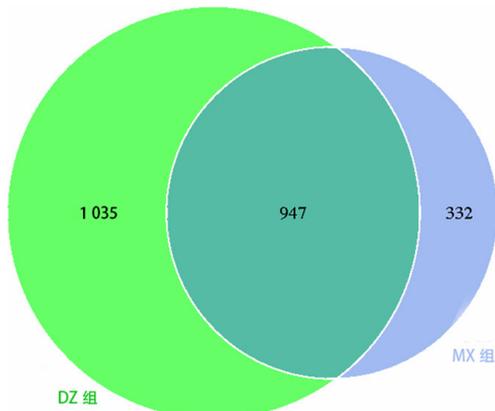


图 2 两组小鼠肠道菌群 Venn 图

Figure 2 Venn diagram of intestinal flora between two groups of mice

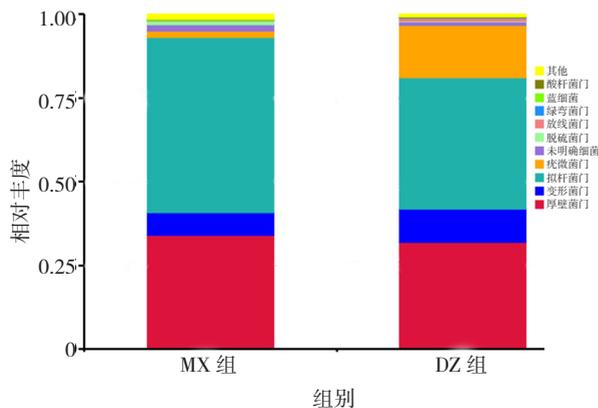


图 3 两组小鼠肠道菌群门水平物种相对丰度柱状图

Figure 3 Relative abundance of species at phylum level intestinal flora of mice between two groups

表 1 两组小鼠肠道菌群 Shannon 指数比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 Shannon Diversity Index analysis of intestinal flora between two groups of mice

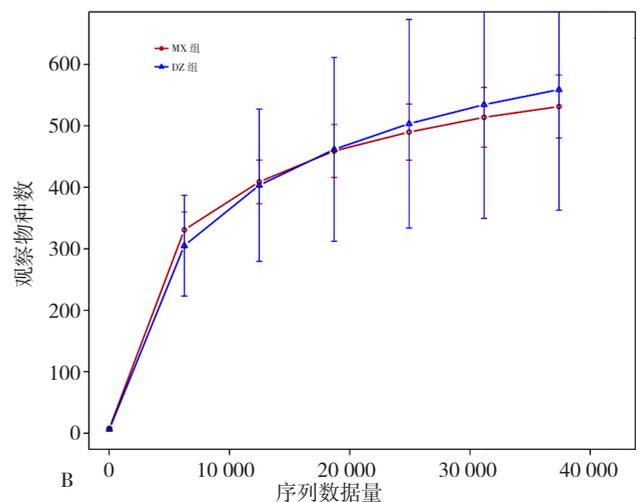
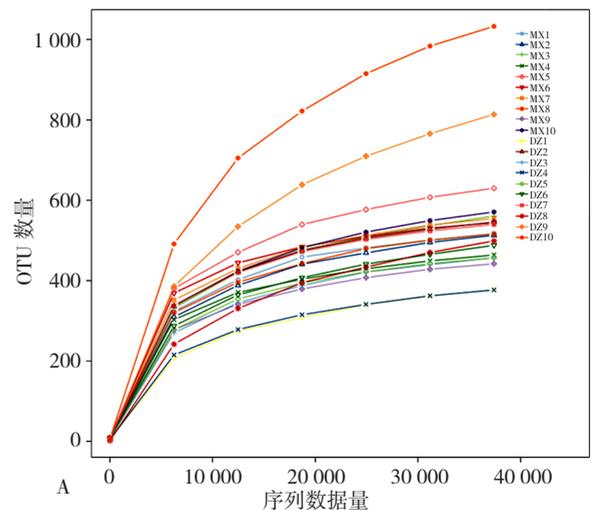
组别	只数	Shannon 指数
DZ 组	10	5.807 ± 0.461
MX 组	10	4.549 ± 1.450
<i>t</i> 值		2.614
<i>P</i> 值		0.024

注: DZ 组 = 对照组, MX 组 = 模型组

丰度高于 DZ 组, 差异有统计学意义 ( $P$  均  $<0.05$ ), 见图 7。

在属水平, 共有 27 类菌的丰度在两组小鼠肠道菌群内有差异 ( $P$  均  $<0.05$ )。丰度较高的前 10 位肠道菌群: MX 组普雷沃菌科\_UCG-003 (*Prevotellaceae\_UCG-003*)、拟杆菌属 (*Bacteroides*)、毛螺菌科 NK4A136 组 (*Lachnospiraceae\_NK4A136\_group*)、瘤胃球菌属 (*Ruminococcus*)、普雷沃菌科\_UCG-001 (*Prevotellaceae\_UCG-001*)、普雷沃菌属 (*Prevotella*)、大肠埃希菌 (*Colidextribacter*)、毛螺菌科\_UCG-006 (*Lachnospiraceae\_UCG-006*) 丰度高于 DZ 组, 罗姆布茨菌 (*Romboutsia*)、土杆菌属 (*Turicibacter*) 丰度低于 DZ 组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见图 8。

2.5.3 两组小鼠肠道菌群 LEfSe 分析 LEfSe 分析结果显示, 两组共有 21 种肠道菌群丰度有差异, 其中梭状芽孢杆菌纲 (*Clostridia*)、普雷沃菌科 (*Prevotellaceae*)、



注: A 为按样品分析物种稀释曲线, B 为按组分析物种稀释曲线; OTU= 分类操作单元

图 4 两组小鼠菌群物种稀释曲线

Figure 4 Rarefaction curve of intestinal flora between two groups of mice

毛螺菌科 (*Lachnospiraceae*)、毛螺菌目 (*Lachnospirales*)、*Prevotellaceae*\_UCG-003、肠杆菌目 (*Enterobacteriales*)、肠杆菌科 (*Enterobacteriaceae*)、埃希菌-志贺菌属 (*Escherichia-Shigella*)、大肠埃希菌种 (*Escherichia coli*)、颤螺旋菌目 (*Oscillospirales*)、拟杆菌科 (*Bacteroidaceae*)、*Bacteroides*、*Lachnospiraceae*\_

NK4A136\_group、颤螺旋菌科 (*Oscillospiraceae*)、瘤胃球菌科 (*Ruminococcaceae*) 丰度在 MX 组升高, 另外 *Peptostreptococcales\_Tissierellales*、*Romboutsia\_ilealis*、*Romboutsia*、消化链球菌科 (*Peptostreptococcaceae*)、丹毒丝菌科 (*Erysipelotrichaceae*)、丹毒丝菌目 (*Erysipelotrichales*) 丰度在 DZ 组升高 ( $P < 0.05$ )。在属水平上, *Prevotellaceae*\_UCG-003、*Escherichia-Shigella*、*Bacteroides*、*Lachnospiraceae*\_NK4A136\_group 在 MX 组丰度增高; *Romboutsia* 丰度在 DZ 组增高 ( $P < 0.05$ ), 见图 9。

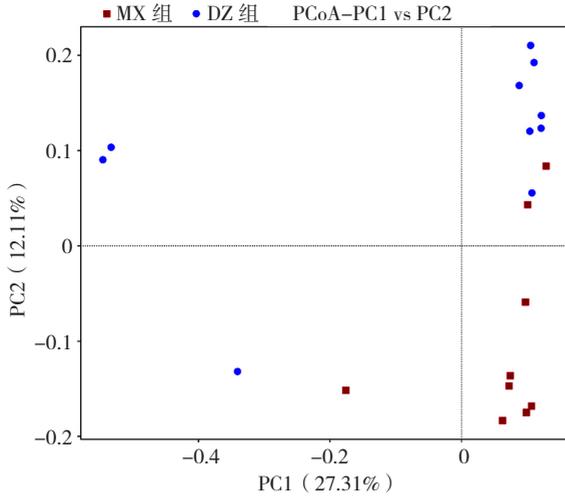


图 5 两组小鼠肠道菌群 Beta 多样性 PCoA 图

Figure 5 PCoA diagram of Beta diversity in intestinal flora between two groups of mice

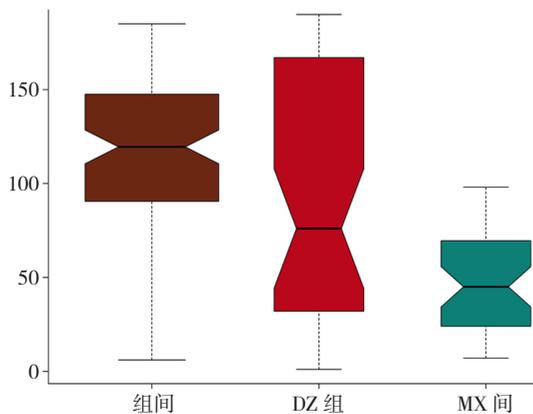


图 6 两组小鼠肠道菌群 Anosim 组间差异分析

Figure 6 Analysis of similarities (ANOSIM) of intestinal flora between two groups of mice

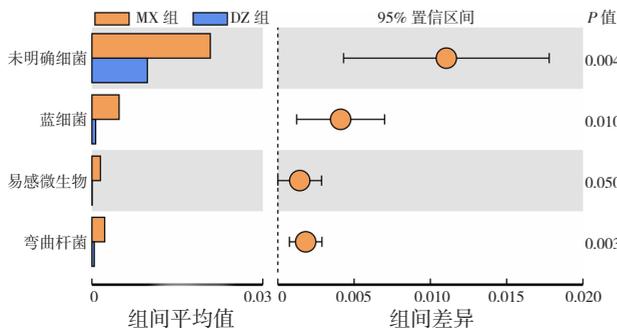
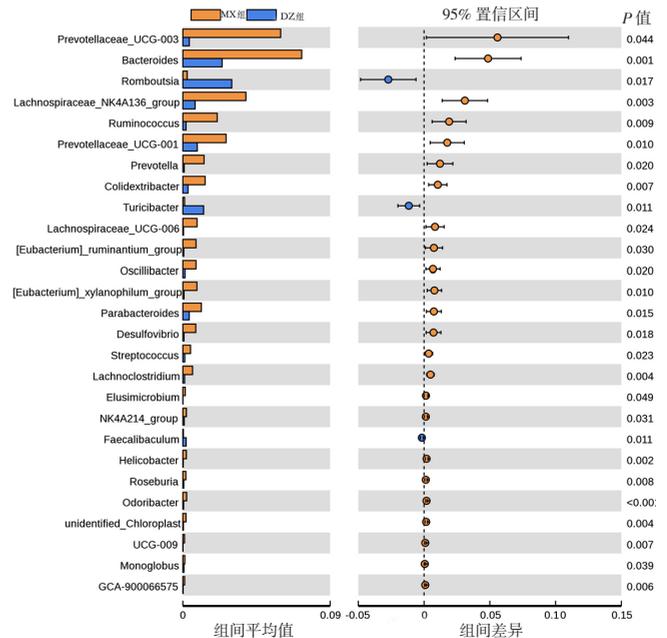


图 7 两组小鼠肠道菌群门水平差异分析

Figure 7 Differential species analysis of intestinal flora at the phylum level between two groups of mice

### 3 讨论

肠道是一个复杂的微生态系统, 其拥有一个密集而多样的微生物群落, 称之为肠道菌群, 该菌群与宿主共同进化以建立相互关系<sup>[5]</sup>。肠道菌群对宿主健康的主要作用表现在分解不可消化的碳水化合物<sup>[6]</sup>、合成维生素<sup>[7]</sup>、调节宿主防御<sup>[8]</sup>及调控肿瘤<sup>[9]</sup>, 尤其在肿瘤生长过程中发挥了重要作用。已有研究表明肠道菌群与多种肿瘤的发生、发展和治疗效果密切相关, 如结肠直肠癌<sup>[10-11]</sup>、肺癌<sup>[12]</sup>、胃癌<sup>[13]</sup>、肝癌<sup>[14]</sup>、黑色素瘤<sup>[15-16]</sup>等。目前有关肠道菌群在结肠直肠癌方面的研究



注: *Prevotellaceae*\_UCG-003= 普雷沃菌科\_UCG-003, *Bacteroides*= 拟杆菌属, *Romboutsia*= 罗姆布茨菌, *Lachnospiraceae*\_NK4A136\_group= 毛螺菌科 NK4A136 组, *Ruminococcus*= 瘤胃球菌属, *Prevotellaceae*\_UCG-001= 普雷沃菌科\_UCG-001, *Prevotella*= 普雷沃菌属, *Colidextribacter*= 大肠埃希菌, *Turicibacter*= 土杆菌属, *Lachnospiraceae*\_UCG-006= 毛螺菌科\_UCG-006, [*Eubacterium*]<sub>ruminantium\_group</sub>= 真杆菌属-反刍动物组, *Oscillibacter*= 颤杆菌属, [*Eubacterium*]<sub>xylanophilum\_group</sub>= 嗜木聚糖真杆菌属, *Parabacteroides*= 副杆菌属, *Desulfovibrio*= 脱硫弧菌属, *Streptococcus*= 链球菌属, *Lachnoclostridium*= 腔隙杆菌, *Elusimicrobium*= 淋溶菌, *Helicobacter*= 幽门螺杆菌, *Roseburia*= 罗斯菌属

图 8 两组小鼠肠道菌群属水平差异分析

Figure 8 Differential species analysis of intestinal flora at the genus level between two groups of mice

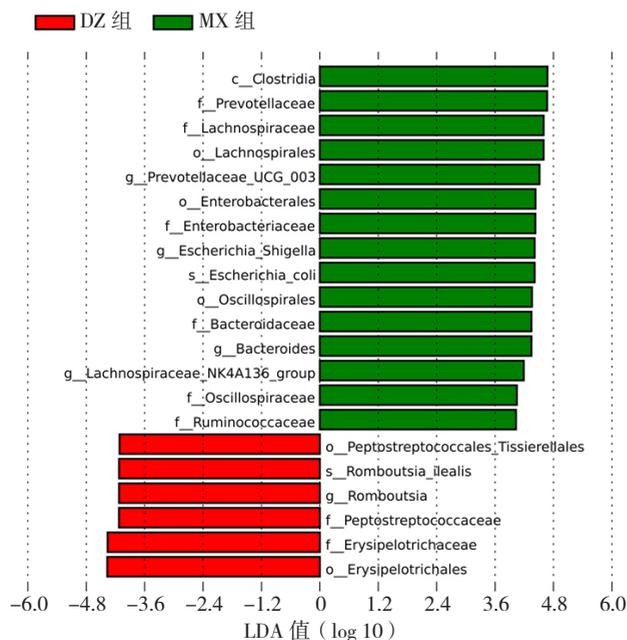
较多,已发现部分特异性差异菌群,并进行了深入的机制研究,如研究发现 *Colidextribacter* 通过增加癌基因 *bcl-2* 和 *bcl-xl* 的表达,抑制结肠细胞凋亡,从而促进肿瘤的形成<sup>[17]</sup>。产肠毒素脆弱拟杆菌可产生脆弱拟杆菌毒素,与结肠上皮细胞相互作用,激活调节性T淋巴细胞并降低白介素(IL)-2水平,随着IL-2水平的下降,辅助性T淋巴细胞(Th17)的产生导致IL-17水平升高,促进癌细胞存活和增殖<sup>[18]</sup>。双歧杆菌能增强树突状细胞功能,导致肿瘤微环境中CD8<sup>+</sup>T细胞的启动和聚集介导效应,从而增加程序性死亡受体-配体1(PD-L1)特异性抗体治疗效果,抑制结肠癌的发展<sup>[19]</sup>。

关于肠道菌群和食管鳞癌相关性的研究较少,目前文献已报道的差异菌群多为从口腔取材,肠道菌群报道较少。位俊敏等<sup>[20]</sup>研究发现食管癌患者口腔中卟啉菌属表达升高。ZHAO等<sup>[4]</sup>报道食管癌患者唾液菌群中显著增加的菌群为 *Firmicutes*、革兰阴性菌门(*Negativicutes*)、硒单胞菌门(*Selenomonadales*)、*Prevotellaceae*、*Prevotella* 和韦荣菌科(*Veillonellaceae*),而 *Proteobacteria*、β-变形杆菌门(*Betaproteobacteria*)、奈瑟菌目(*Neisseriales*)、奈瑟菌科(*Neisseriaceae*)

和奈瑟菌属(*Neisseria*)则显著减少。而DENG等<sup>[21]</sup>研究发现在属水平上,食管鳞癌患者粪便中链球菌(*Streptococcus*)、双歧杆菌(*Bifidobacterium*)、*Subdoligranulum*、布劳特菌属(*Blautia*)、*Romboutsia*、柯林斯菌属(*Collinsella*)、*Paeniclostridium*、多尔菌属(*Dorea*)和阿托波菌属(*Atopobium*)丰度显著增加,而毛螺菌属(*Lachnospira*)、*Bacteroides*、*Agathobacter*、*Lachnoclostridium*、副拟杆菌属(*Parabacteroides*)、帕拉普菌属(*Paraprevotella*)等菌属丰度降低。可见上述研究报道的菌群存在很大差别,纵观之前文献报道的虽为同一类型肿瘤患者,但肠道菌群中检测出的具有统计学意义的菌群差别也较大,考虑肠道菌群是一个复杂的微环境,容易受到患者饮食、情志、基础疾病及药物等的影响,故本研究选取4NQO原位诱导食管癌模型小鼠粪便为检测标本,最大限度使饮食、环境等外界因素达到统一性,尽量避免误差。

本研究结果显示, MX组与DZ组相比肠道菌群的物种丰富度和多样性明显降低。两组肠道菌群差异物种分析显示, MX组小鼠粪便中 *Prevotellaceae*\_UCG-003、*Bacteroides*、*Lachnospiraceae*\_NK4A136\_group、*Ruminococcus*、*Prevotellaceae*\_UCG-001、*Prevotella*、*Colidextribacter*、*Lachnospiraceae*\_UCG-006 丰度高于DZ组, *Romboutsia*、*Turicibacter* 丰度低于DZ组。LEfSe分析结果显示,在属水平上, *Prevotellaceae*\_UCG-003、埃希菌-志贺菌属(*Escherichia-Shigella*)、*Bacteroides*、*Lachnospiraceae*\_NK4A136\_group 在MX组丰度明显增高, *Romboutsia* 丰度在DZ组明显降低。两种检验分析中均有统计学差异的菌属为 *Prevotellaceae*\_UCG-003、*Bacteroides*、*Lachnospiraceae*\_NK4A136\_group 和 *Romboutsia*, 这4种菌属可能更具有生物标志物意义。*Bacteroidota* 是肠道菌群的主要成分,其与 *Firmicutes* 约占肠道菌群的90%以上,研究证实拟杆菌属(*Bacteroidetes*) 在结直肠癌患者粪便菌群中丰度明显增高<sup>[22-23]</sup>, 并有研究发现拟杆菌属在食管鳞癌诊断中准确率较高<sup>[21]</sup>; *Prevotellaceae* 在食管癌患者口腔菌群中及结直肠癌患者粪便菌群中丰度虽有明显增高<sup>[4, 24]</sup>, 但本研究结果与其一致。但 *Lachnospiraceae*\_NK4A136\_group 及 *Romboutsia* 在结直肠癌及胃癌等肿瘤患者中丰度虽有明显变化<sup>[21, 25-26]</sup>, 但本研究结果与之不同,因此还需进一步研究检测确定。

综上所述,食管鳞癌原位模型小鼠肠道菌群物种多样性降低,存在特异性差异菌属,可为食管癌的诊断提供参考。虽然本研究发现了MX组较DZ组小鼠肠道菌群显著改变,但16SrDNA为半定量检测,故仍需宏基因组学或靶向微生物学的研究进一步明确差异菌群,并进行更加深入的机制研究来进行验证,寻找食管鳞癌特异性的靶菌群。



注:柱状图显示LDA值>4的菌群,即有统计学差异的生物标志物;*Clostridia*=梭状芽孢杆菌纲, *Prevotellaceae*=普雷沃菌科, *Lachnospiraceae*=毛螺菌科, *Lachnospirales*=毛螺菌目, *Enterobacterales*=肠杆菌目, *Enterobacteriaceae*=肠杆菌科, *Escherichia-Shigella*=埃希菌-志贺菌属, *Escherichia\_coli*=大肠埃希菌, *Oscillospirales*=颤螺旋菌目, *Bacteroidaceae*=拟杆菌科, *Lachnospiraceae*\_NK4A136\_group=毛螺菌科NK4A136组, *Oscillospiraceae*=颤螺旋菌科, *Ruminococcaceae*=瘤胃球菌科, *Peptostreptococcaceae*=消化链球菌科, *Erysipelotrichaceae*=丹毒丝菌科, *Erysipelotrichales*=丹毒丝菌目

图9 两组小鼠肠道菌群LEfSe分析柱状图

Figure 9 Histogram of LEfSe analysis of intestinal flora between two groups of mice

作者贡献: 张玉双、李晶进行文章的构思与设计, 负责文章的质量控制及审校; 张玉双、于富洋、吴忠冰、王一然进行数据收集; 张玉双、于富洋、吴忠冰整理数据; 于富洋、吴忠冰进行统计学处理; 张玉双负责结果的分析与解释、撰写与修订论文; 李晶对文章整体负责, 监督管理。

本文无利益冲突。

#### 参考文献

- [1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249. DOI:10.3322/caac.21660.
- [2] 刘宗超, 李哲轩, 张阳, 等. 2020 全球癌症统计报告解读 [J]. 肿瘤综合治疗电子杂志, 2021, 7(2): 1-13. DOI:10.12151/JMCM.2021.02-01.
- [3] GAO S G, LI S G, MA Z K, et al. Presence of Porphyromonas gingivalis in esophagus and its association with the clinicopathological characteristics and survival in patients with esophageal cancer [J]. Infect Agent Cancer, 2016, 11: 3. DOI:10.1186/s13027-016-0049-x.
- [4] ZHAO Q F, YANG T, YAN Y F, et al. Alterations of oral microbiota in Chinese patients with esophageal cancer [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2020, 10: 541144. DOI:10.3389/fcimb.2020.541144.
- [5] 王丽群, 庞日朝, 胡晓敏, 等. 肠道菌群对色氨酸代谢的影响研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(4): 129-136. DOI:10.3969/j.issn.1671-7856.2021.04.019.
- [6] RAKOFF-NAHOUM S, FOSTER K R, COMSTOCK L E. The evolution of cooperation within the gut microbiota [J]. Nature, 2016, 533(7602): 255-259. DOI:10.1038/nature17626.
- [7] YATSUNENKO T, REY F E, MANARY M J, et al. Human gut microbiome viewed across age and geography [J]. Nature, 2012, 486(7402): 222-227. DOI:10.1038/nature11053.
- [8] MAYNARD C L, ELSON C O, HATTON R D, et al. Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system [J]. Nature, 2012, 489(7415): 231-241. DOI:10.1038/nature11551.
- [9] WU Y L, CHEN Y N, LU Y F, et al. Structural features, interaction with the gut microbiota and anti-tumor activity of oligosaccharides [J]. RSC Adv, 2020, 10(28): 16339-16348. DOI:10.1039/d0ra00344a.
- [10] LV J, JIA Y T, LI J, et al. Gegen Qinlian Decoction enhances the effect of PD-1 blockade in colorectal cancer with microsatellite stability by remodelling the gut microbiota and the tumour microenvironment [J]. Cell Death Dis, 2019, 10(6): 415. DOI:10.1038/s41419-019-1638-6.
- [11] BULLMAN S, PEDAMALLU C S, SICINSKA E, et al. Analysis of Fusobacterium persistence and antibiotic response in colorectal cancer [J]. Science, 2017, 358(6369): 1443-1448. DOI:10.1126/science.aal5240.
- [12] ROUTY B, LE CHATELIER E, DEROSA L, et al. Gut microbiome influences efficacy of PD-1-based immunotherapy against epithelial tumors [J]. Science, 2018, 359(6371): 91-97. DOI:10.1126/science.aan3706.
- [13] EUN C S, KIM B K, HAN D S, et al. Differences in gastric mucosal microbiota profiling in patients with chronic gastritis, intestinal Metaplasia, and gastric cancer using pyrosequencing methods [J]. Helicobacter, 2014, 19(6): 407-416. DOI:10.1111/hel.12145.
- [14] MA C, HAN M J, HEINRICH B, et al. Gut microbiome-mediated bile acid metabolism regulates liver cancer via NKT cells [J]. Science, 2018, 360(6391): eaan5931. DOI:10.1126/science.aan5931.
- [15] GOPALAKRISHNAN V, SPENCER C N, NEZI L, et al. Gut microbiome modulates response to anti-PD-1 immunotherapy in melanoma patients [J]. Science, 2018, 359(6371): 97-103. DOI:10.1126/science.aan4236.
- [16] MATSON V, FESSLER J, BAO R Y, et al. The commensal microbiome is associated with anti-PD-1 efficacy in metastatic melanoma patients [J]. Science, 2018, 359(6371): 104-108. DOI:10.1126/science.aao3290.
- [17] COUGNOUX A, DALMASSO G, MARTINEZ R, et al. Bacterial genotoxin colibactin promotes colon tumour growth by inducing a senescence-associated secretory phenotype [J]. Gut, 2014, 63(12): 1932-1942. DOI:10.1136/gutjnl-2013-305257.
- [18] CHENG W T, KANTILAL H K, DAVAMANI F. The mechanism of Bacteroides fragilis toxin contributes to colon cancer formation [J]. Malays J Med Sci, 2020, 27(4): 9-21. DOI:10.21315/mjms2020.27.4.2.
- [19] SIVAN A, CORRALES L, HUBERT N, et al. Commensal Bifidobacterium promotes antitumor immunity and facilitates anti-PD-L1 efficacy [J]. Science, 2015, 350(6264): 1084-1089. DOI:10.1126/science.aac4255.
- [20] 位俊敏, 李锐锋, 杨冬阳, 等. 食管鳞癌患者唾液菌群的研究 [J]. 中山大学学报 (医学科学版), 2020, 41(2): 313-320. DOI:10.13471/j.cnki.j.sun.yat-sen.univ (med.sci).2020.0043.
- [21] DENG Y L, TANG D R, HOU P F, et al. Dysbiosis of gut microbiota in patients with esophageal cancer [J]. Microb Pathog, 2021, 150: 104709. DOI:10.1016/j.micpath.2020.104709.
- [22] DEJEA C M, FATHI P, CRAIG J M, et al. Patients with familial adenomatous polyposis harbor colonic biofilms containing tumorigenic bacteria [J]. Science, 2018, 359(6375): 592-597. DOI:10.1126/science.aah3648.
- [23] KEKU T O, DULAL S, DEVEAUX A, et al. The gastrointestinal microbiota and colorectal cancer [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2015, 308(5): G351-363. DOI:10.1152/ajpgi.00360.2012.
- [24] WANG T T, CAI G X, QIU Y P, et al. Structural segregation of gut microbiota between colorectal cancer patients and healthy volunteers [J]. ISMEJ, 2012, 6(2): 320-329. DOI:10.1038/ismej.2011.109.
- [25] ZHANG Z C, CAO H Y, SONG N, et al. Long-term hexavalent chromium exposure facilitates colorectal cancer in mice associated with changes in gut microbiota composition [J]. Food Chem Toxicol, 2020, 138: 111237. DOI:10.1016/j.fct.2020.111237.
- [26] SEOL M, LEE Y R, KIM K M, et al. The difference of the gut microbiota of gastric cancer in relation to Helicobacter pylori negativity and positivity [J]. J Clin Oncol, 2019, 37(4\_suppl): 10. DOI:10.1200/jco.2019.37.4\_suppl.10.

(收稿日期: 2021-08-31; 修回日期: 2022-01-12)

(本文编辑: 毛亚敏)