

文章编号 1006-8147(2019)06-0551-05

论 著

结直肠癌患者肠道菌群促进 $Apc^{min/+}$ 小鼠肠道腺瘤进展的研究

李璐, 李晓飞, 孙悦, 刘天宇, 王邦茂, 曹海龙, 姜葵
(天津医科大学总医院消化科, 天津 300052)

摘要 目的:探讨结直肠癌患者的肠道菌群对 $Apc^{min/+}$ 小鼠肠道腺瘤进展的作用。方法:将4周龄雌性 $Apc^{min/+}$ 小鼠随机分为PBS组(灌服无菌磷酸盐缓冲液, PBS)、FMT-H组(灌服健康人菌液)和FMT-C组(灌服结直肠癌患者菌液), 每组10只。给予3d抗生素鸡尾酒预处理后, 进行为期8周的粪菌移植。光学显微镜下观察并记录每只小鼠肠道腺瘤负荷。收集肠道组织进行免疫组化评价肿瘤细胞增殖水平及Wnt信号通路活化情况。结果:与FMT-H组相比, FMT-C组腺瘤数量和肠道肿瘤组织中Ki-67阳性细胞百分比显著增加。FMT-C组中Wnt信号通路关键蛋白 β -catenin出现异位表达, 下游的细胞周期蛋白(cyclinD1)表达增多。结论:结直肠癌患者的肠道菌群可诱导肠道慢性低度炎症、活化Wnt信号通路、促进 $Apc^{min/+}$ 小鼠肠道腺瘤进展。

关键词 结直肠癌; 粪菌移植; $Apc^{min/+}$ 小鼠

中图分类号 R574.6+R730

文献标志码 A

Gut microbiota from patients with colorectal cancer promotes the progression of intestinal adenoma in $Apc^{min/+}$ mice

LI Lu, LI Xiao-fei, SUN Yue, LIU Tian-yu, WANG Bang-mao, CAO Hai-long, JIANG Kui

(Department of Gastroenterology and Hepatology, General Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China)

Abstract Objective: To investigate the efficacy of gut microbiota from patients with colorectal cancer (CRC) on the progression of intestinal adenomas in $Apc^{min/+}$ mice. **Methods:** The female $Apc^{min/+}$ mice aged 4 weeks were divided into three groups: PBS group (gavage of sterile phosphate buffered solution, PBS), FMT-H group (gavage of mixed fecal samples from healthy people) and FMT-C group (gavage of mixed fecal samples from patients with CRC), 10 mice in each group. After receiving antibiotic cocktails in drinking water for three days, the mice were inoculated with a total of 16 times transfer experiments over the subsequent 8 weeks. The intestinal adenoma burden of each mouse was observed and recorded under an optical microscope. Intestinal tissue was collected for immunohistochemistry to evaluate tumor cell proliferation and Wnt signaling pathway activation. **Results:** Compared with FMT-H group, the number of adenomas and the percentage of ki-67 positive cells in intestinal tumor tissues in the FMT-C group significantly increased. Heterotopic expression of β -catenin and expression of downstream cyclin (cyclinD1) were increased in the FMT-C group. **Conclusion:** Gut microbiota of CRC patients promotes intestinal adenoma progression in $Apc^{min/+}$ mice by inducing chronic low-grade intestinal inflammation and activating Wnt signaling pathway.

Key words colorectal cancer; fecal microbiota transplantation; $Apc^{min/+}$ mice

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是世界范围内常见的恶性肿瘤之一,其发病率和死亡率位居第3位^[1]。CRC的危险因素包括遗传因素、年龄、性别、肥胖、生活方式以及环境因素等^[2]。CRC是一种多因素多步骤导致的疾病,约95%的肠道肿瘤由腺瘤进展而来,其病因尚未完全阐明^[3-4]。近期的研究表明结直肠癌和肠道菌群关系密切^[5-6]。健康的肠道里居住着大量的微生物,包括细菌、真菌及病毒等,保持在一个动态平衡中。肠道微生物参与食物的消化吸收,还能增强肠道防御功能,促进免疫系统成熟^[7]。

当动态平衡被打破,紊乱的肠道微生物群落可能会诱发多种疾病,包括结直肠癌、炎症性肠病及代谢综合征等^[8-10]。最近的研究表明结直肠癌患者与健康人的肠道微生物群落有显著差异^[11],但是肠道菌群失调与结直肠癌的因果关系尚不明确。腺瘤性息肉病基因(adenomatous polyposis coli, Apc)突变是腺瘤形成的早期事件^[3], Apc 基因第850号密码子发生等位突变可自发形成肠道多发腺瘤,伴或不伴低级别上皮内瘤变。因此 $Apc^{min/+}$ 小鼠是研究肠道肿瘤较为理想的动物模型。本研究采用粪菌移植的方法探索紊乱的肠道菌群在肠道腺瘤进展过程的作用及机制。

1 资料与方法

1.1 实验设计

1.1.1 菌液制备 收集10名确诊为结直肠癌患者

基金项目 国家自然科学基金(81570478, 81741075);天津市自然科学基金(17JCYBJC24900)

作者简介 李璐(1993-),女,硕士在读,研究方向:肠道微生态;通信作者:姜葵, E-mail: kjiang@tmu.edu.cn。

的新鲜粪便,每份取等量粪便按1:5的比例与无菌的PBS混合,置于搅拌器中,充分搅拌后进行初始过滤,把滤液转移到匀浆器中进行匀质处理,然后依次通过孔径为2.0 mm、1.0 mm、0.5 mm和0.25 mm的滤网进行层层过滤,滤液收集到50 mL的离心管中,以800×g的转速离心2 min收集上清液,分离纯化收集粪菌液,分装后保存在-80℃冰箱备用^[12-13]。收集10名健康人的新鲜粪便,同样的方法制备健康人的粪菌液。每种菌液的制备采用一套独立的设备,所有材料设备均经高压蒸汽灭菌。

1.1.2 动物分组 4周龄雌性Apc^{min/+}小鼠(30只)购自南京大学模式动物研究所,体质量在15~18 g。小鼠饲养于天津医科大学实验动物中心SPF级实验室,严格按照操作流程进行饲养。小鼠随机分为3组:PBS组(灌服无菌PBS),FMT-H组(灌服健康人菌液)和FMT-C组(灌服肠癌患者菌液),每组10只小鼠。适应1周后,小鼠进行为期3d的预处理,给予混合抗生素饮用水,去除肠道原籍菌群,构建“伪无菌”动物模型。抗生素鸡尾酒为200 mg/L氨苄西林、200 mg/L甲硝唑、200 mg/L新霉素和100 mg/L万古霉素的混合物^[14]。预处理后的8周共进行16次FMT。第1周1天灌胃1次,共7次;第2周隔天灌胃,共3次;之后的6周,1周灌胃1次,每次每只鼠灌服菌液剂量为0.2 mL(0.2 mL/次/只)^[15]。所有小鼠自由进食饮水,每天观察小鼠状态、饮食及饮水情况,每周称重1次。

1.1.3 动物处理 第9周处死小鼠,取出全部肠道,用PBS冲洗干净。把小肠平均分为近、中、远段,结直肠作为第4段。将肠道沿纵行剖开展平,在盲法下使用光学显微镜测量息肉大小,按最大径(<0.1 cm、0.1~0.2 cm、>0.2 cm)与部位(近、中、远段小肠及结肠)记录肠道息肉数量并拍照。将肠道远段沿横轴卷起,用大头针固定置于4%甲醛溶液中。肠道近端保存于-80℃医用冰箱。

1.2 实验方法

1.2.1 HE染色 小鼠肠道组织保存于4%甲醛溶液固定24 h后,经脱水、石蜡包埋处理后制成组织石蜡切片,行HE染色。在光学显微镜下观察肠道肿瘤病理类型。

1.2.2 免疫组化 采用链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶染色法进行免疫组织化学染色。石蜡包埋的组织制成厚约5 μm的切片,经二甲苯脱蜡后梯度浓度的乙醇脱水,3% H₂O₂室温下孵育10 min,枸橼酸盐缓冲液(pH=6.0)进行组织抗原修复后自然冷却至室温,山羊血清工作液封闭30 min,滴加一抗

置于4℃冰箱过夜。次日室温恢复后,滴加二抗37℃孵育30 min。每步骤均用PBS冲洗3次,每次5 min。DAB反应显色,自来水冲洗后,苏木素复染,脱水干燥封片。

1.2.3 原位末端转移酶标记技术 使用In Situ Cell Death Detection试剂盒采用荧光标记法检测肿瘤组织细胞凋亡。将石蜡包埋后的切片进行脱蜡、水化,放入PBS溶液中洗涤,加入反应液置于湿盒中于37℃孵育1 h,将玻片置于洗涤缓冲液中终止反应;滴加FITC反应液避光孵育10 min,再次洗涤PI复染后封片。

1.2.4 提取RNA及实时荧光定量聚合酶链反应 将冻存于-80℃的组织取出,加入TRIzol细胞裂解液,冰上研磨,严格按照说明书提取RNA,检测样本浓度和纯度保证在可用范围内。使用逆转录试剂盒将RNA逆转录成cDNA。由江苏金维智生物科技有限公司负责引物合成。引物浓度稀释至20 μmol/L。20 μL的反应体系由2 μL的cDNA、1 μL的正向引物、1 μL的反向引物、6 μL的灭菌双蒸水和10 μL的SYBR Green PCR Master Mix组成。

1.3 结果判读

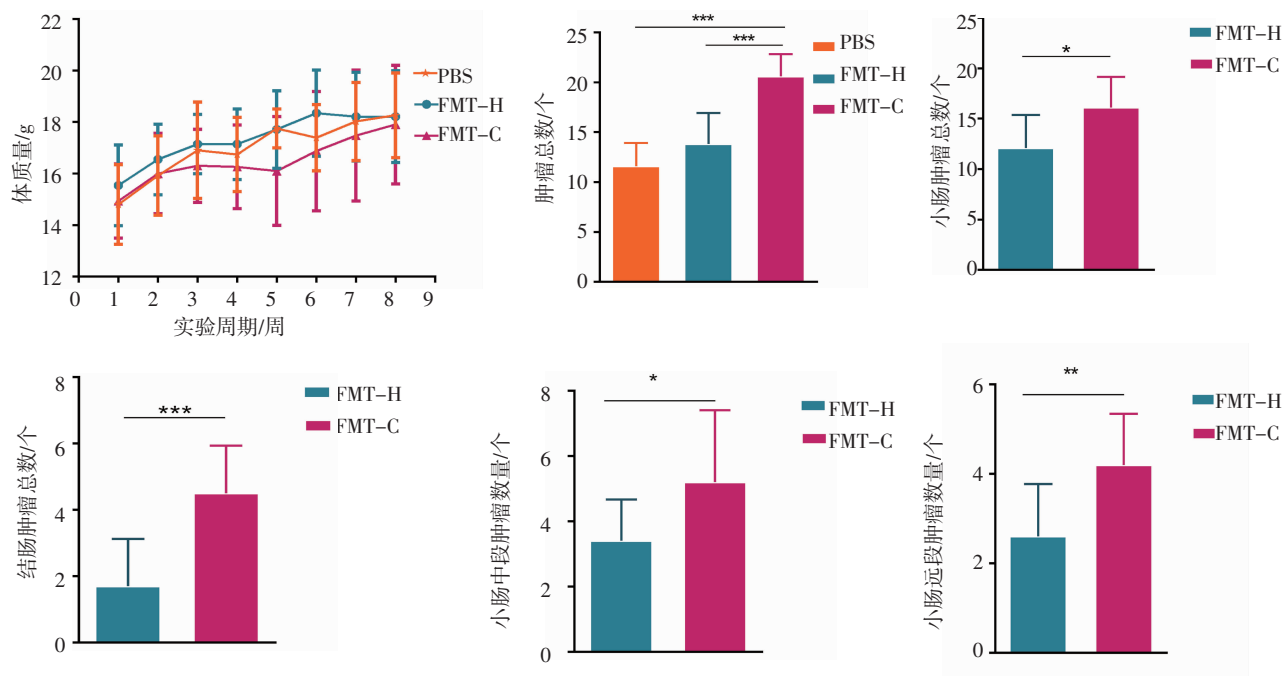
1.3.1 免疫组化 Ki-67和Cyclin D1正常表达定位在细胞核,染色后细胞核呈棕黄色即为阳性细胞。在正常情况下,β-catenin表达定位在细胞膜,沿细胞膜呈棕黄色连续性着色。当在细胞浆和细胞核出现棕黄色着色时,即为异位表达。出现异位表达的细胞即为阳性细胞。每张切片随机选取5个不同视野计数高倍显微镜下阳性细胞数所占百分比。

1.3.2 原位末端转移酶标记技术 处理后的切片用荧光显微镜拍照。凋亡细胞被特异性标记,显示出黄绿色荧光。同一视野下拍摄黄绿色荧光和蓝色荧光照片。每张切片随机选择5个高倍视野,随机计数视野内100个细胞中凋亡细胞个数,计算凋亡细胞百分比。

1.4 统计学分析 使用SPSS 22.0软件对数据进行统计学分析。正态分布的计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间参数比较采用独立样本t检验,3组间参数比较采用单因素方差分析,正态分布的计数资料采用卡方检验; $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠的一般状态 小鼠的体质量随周龄缓慢增长(见图1)。在8周的实验周期里,小鼠耐受良好。PBS组无明显肉眼血便,FMT-H组2只小鼠和FMT-C组6只小鼠在第8周出现血便及稀便。



*** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$

图1 肠癌患者菌液对小鼠体重及肿瘤数量的影响

Fig 1 Effect of gut microbiota from CRC patients on body weight and tumor number in mice

2.2 肠癌患者菌液对小鼠肠道腺瘤的影响

2.2.1 肠癌患者菌液促进 *Apc^{min/+}* 小鼠肠道腺瘤数量增加 FMT-C 组腺瘤总数明显高于 FMT-H 组和 PBS 组 ($P < 0.01$)。与 FMT-H 组相比, FMT-C 组小肠腺瘤总数增加 $[(16.10 \pm 0.96)$ 个比 (12.10 ± 1.04) 个, $P < 0.05$]。其中, 小肠中段腺瘤数量增加 $[(5.20 \pm 0.70)$ 个比 (3.40 ± 0.40) 个, $P < 0.05$]。小肠远段腺瘤数量显著增加 $[(4.20 \pm 0.36)$ 个比 (2.60 ± 0.37) 个, $P < 0.01$]。在小肠近段, FMT-C 组腺瘤数量虽然比 FMT-H 组略有增加, 但是无显著差异 $[(6.70 \pm 0.56)$ 个比 (6.10 ± 0.84) 个, $P > 0.05$]。在 FMT-C 组中, 不仅小肠腺瘤总数增加, 结肠腺瘤数量也明显增加 ($P < 0.01$) (见图 1)。

2.2.2 肠癌患者菌液对 *Apc^{min/+}* 小鼠肠道腺瘤大小的影响 小鼠肠道腺瘤数量按照最大径 < 0.1 cm、 $0.1 \sim 0.2$ cm 和 > 0.2 cm 进行比较。FMT-C 组最大径为 $0.1 \sim 0.2$ cm 及 > 0.2 cm 的腺瘤总数均高于 FMT-H 组 ($P < 0.05$)。FMT-C 组最大径为 $0.1 \sim 0.2$ cm 的小肠腺瘤数量显著增加, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。在结肠中, FMT-C 组最大径 < 0.1 cm 和直径 > 0.2 cm 的腺瘤明显增多, 差异均具有统计学意义 ($P < 0.01$)。

2.2.3 肠癌患者菌液促进 *Apc^{min/+}* 小鼠肠道腺瘤进展 PBS 组及 FMT-H 组小鼠肠道可见些许散在的小息肉, FMT-C 组小鼠肠道可见较多息肉, 部分小鼠结肠可见巨大息肉生长, 突出腔内。在 FMT-H

组, 小鼠息肉病理分型多为管状腺瘤、绒毛-管状腺瘤和绒毛状腺瘤伴或不伴低级别上皮内瘤变, 仅有 1 只小鼠出现管状腺瘤伴发高级别上皮内瘤变。FMT-C 组中 70% 的小鼠出现管状腺瘤、绒毛-管状腺瘤或绒毛状腺瘤伴发高级别上皮内瘤变 (见图 2)。

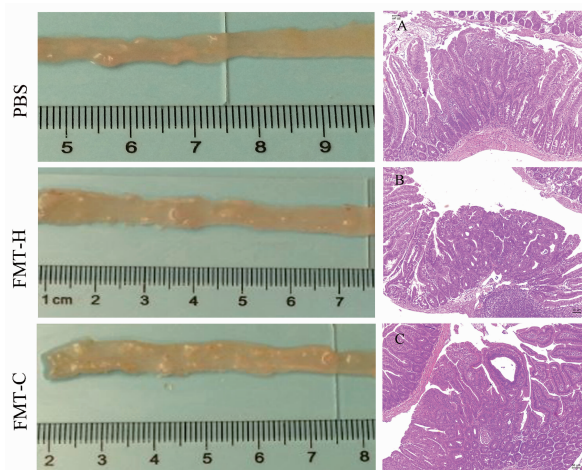


图2 肠癌患者菌液促进小鼠肠道腺瘤进展 (HE 染色, $\times 100$)

Fig 2 Gut microbiota from CRC patients promotes the deterioration of intestinal adenoma in mice (Hematoxylin-eosin staining, $\times 100$)

2.3 肠癌患者菌液促进 *Apc^{min/+}* 小鼠肠道肿瘤细胞增殖并抑制凋亡 与 FMT-H 组相比, FMT-C 组小鼠肠道肿瘤组织 Ki-67 阳性细胞百分比明显增加 ($P < 0.01$), 肠道肿瘤组织凋亡细胞百分比明显减少

($P < 0.01$) (见图 3)。

2.4 肠癌患者菌液诱导 $Apc^{min/+}$ 小鼠肠道低度慢性炎症 FMT-H 组和 FMT-C 组小鼠肠道组织 HE 染色未见明显炎症细胞浸润。实时荧光定量聚合酶链反应显示, 与 FMT-H 组相比, FMT-C 组中炎性细胞因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 均表达上调($P < 0.01$)。

2.5 肠癌患者菌液诱导 $Apc^{min/+}$ 小鼠肠道 Wnt 信号通路活化 FMT-H 组中 β -catenin 表达多定位于细胞膜, FMT-C 组 β -catenin 出现异位表达, 阳性细胞百分比显著增加 ($P < 0.01$)。与 FMT-H 组相比, FMT-C 组 cyclinD1 阳性细胞百分比显著增加, 差异有统计学意义($P < 0.01$) (见图 4)。

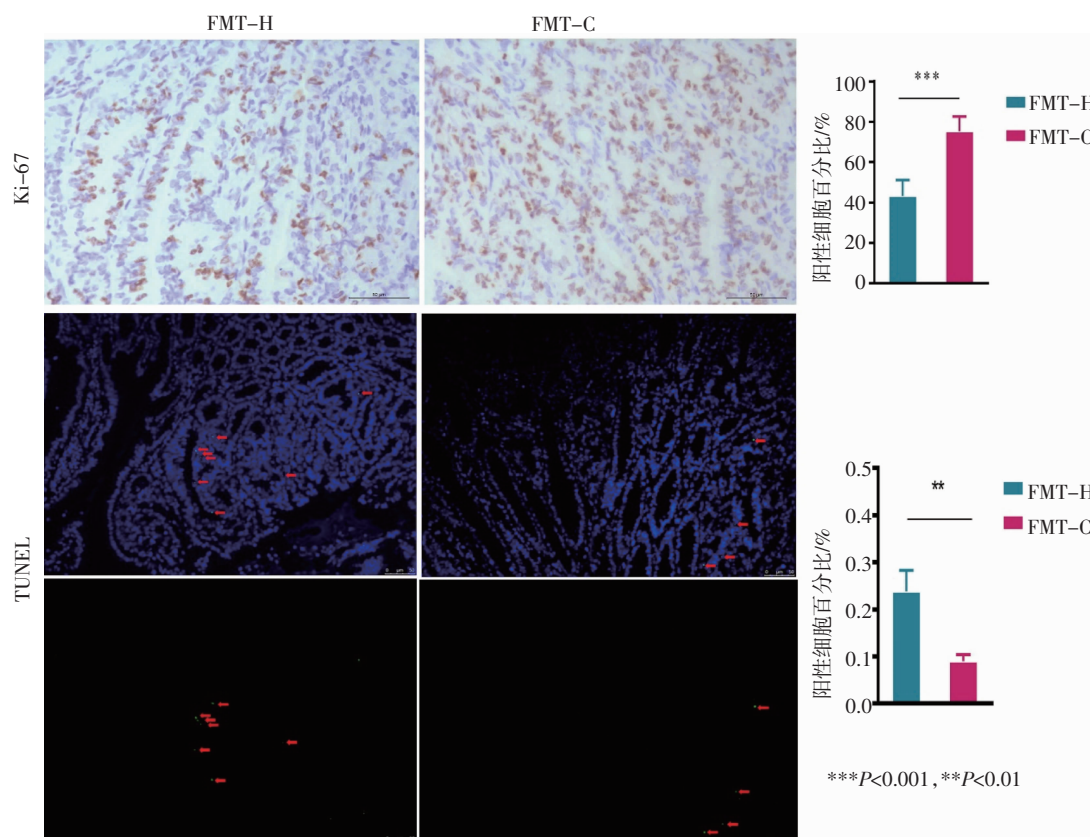


图 3 肠癌患者菌液促进小鼠肠道肿瘤细胞增殖、抑制凋亡(免疫组织化学染色, $\times 200$; 原位末端转移酶标记技术, $\times 200$)

Fig 3 Gut microbiota from CRC patients promotes proliferation and inhibited apoptosis in intestinal tumors (immunohistochemical staining, $\times 200$; TUNEL assay, $\times 200$)

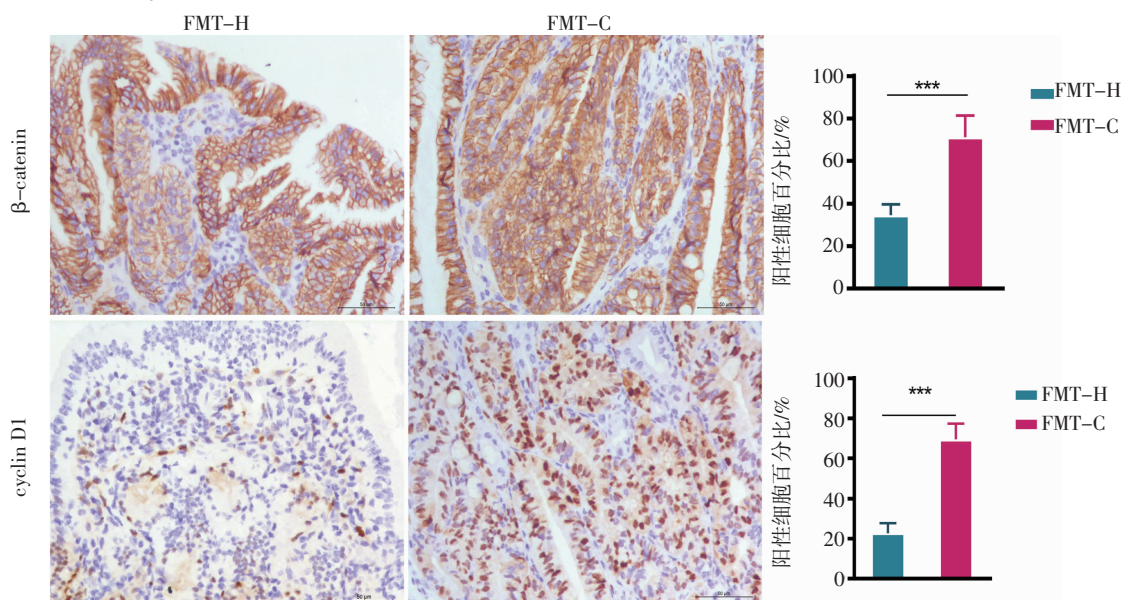


图 4 肠癌患者菌液上调小鼠肠道 Wnt 信号通路(免疫组织化学染色, $\times 400$)

Fig 4 Gut microbiota from CRC patients up-regulates Wnt signaling pathway(Immunohistochemical staining, $\times 400$)

3 讨论

近年来,结直肠癌的患病率越来越高,越来越多的研究表明肠道菌群紊乱是结直肠癌发生发展的重要因素,从某种程度上说,结直肠癌可能是一种细菌相关性疾病。肠道菌群与遗传和环境等因素协同作用,塑造一个有益于肿瘤发生发展的环境^[6]。特定细菌的共同作用促进肠道炎症及癌症发生,细菌形成的生物膜为癌细胞提供了庇护所^[7]。有文献表明具核梭杆菌与CRC关系密切,在肠癌发生、发展、转移及预后都扮演重要角色。具核梭杆菌产生的FadA黏附素与E-钙粘蛋白结合,促进 β -catenin异位表达,激活Wnt信号通路促进CRC发生^[18]。本研究将CRC患者的肠道菌群移植到*Apc^{min/+}*小鼠体内,免疫组织化学染色结果显示 β -catenin出现明显的异位表达,下游的细胞周期蛋白cyclinD1表达增多,提示结直肠癌患者的肠道菌群激活Wnt通路促进腺瘤进展。

新近研究发现肠癌患者的菌液能诱导化学致癌剂氧化偶氮甲烷诱导的结肠肿瘤模型小鼠肠道肿瘤发生以及无菌小鼠结肠细胞增殖,同时还促进氧化偶氮甲烷诱导的小鼠及无菌小鼠的炎症基因和致癌因子表达增加及免疫细胞浸润^[14]。本研究将CRC患者的肠道菌群移植到*Apc^{min/+}*小鼠体内,探索在遗传因素背景下,肠道菌群失衡在肠道腺瘤进展过程中的作用。研究发现肠癌患者的菌液通过诱导肠道慢性低度炎症,促进肿瘤细胞增殖,抑制细胞凋亡等途径促进肠道腺瘤进展。

CRC患者的肠道菌群里脆弱拟杆菌、具核梭杆菌和消化链球菌等菌株富集及双歧杆菌、罗氏菌和毛螺旋菌等益生菌及产丁酸菌减少^[19-20],益生菌对肠道腺瘤的预防作用有待进一步研究。本研究采用粪菌移植的方法从整体水平上初步探索肠道菌群诱导腺瘤进展的作用,暂未具体到特定菌株及其代谢产物的作用,有待今后进一步完善。

综上所述,本研究发现CRC患者肠道菌群引起慢性低度炎症,促进肿瘤细胞增殖,抑制细胞凋亡。紊乱的肠道菌群可以促进*Apc^{min/+}*小鼠肠道腺瘤进展。进一步拟研究某些特定菌株及其代谢产物在肠道腺瘤进展过程中的作用,以及探索益生菌对肠道腺瘤进展的预防作用。针对肠道微生物群的CRC防治新策略,肠道微生物群的靶向治疗将成为CRC的一个有前景的治疗策略。

参考文献:

[1] Siegel R L, Miller K D, Jemal A. Cancer statistics, 2018[J]. CA Cancer J Clin, 2018,68(1):7

- [2] Chen D, Wu J, Jin D, et al. Fecal microbiota transplantation in cancer management: current status and perspectives [J]. Int J Cancer, 2018, doi: 10.1002/ijc.32003 [Epub ahead of print]
- [3] Beaugerie L, Itzkowitz S H. Cancers complicating inflammatory bowel disease[J]. N Engl J Med, 2015,372(15):1441
- [4] Chakradhar S. Colorectal cancer: 5 big questions[J]. Nature, 2015, 521(7551):S16
- [5] Raskov H, Burchard J, Pommergaard H C. Linking gut microbiota to colorectal cancer[J]. J Cancer, 2017,8(17):3378
- [6] Yu T, Guo F, Yu Y, et al. Fusobacterium nucleatum promotes chemoresistance to colorectal cancer by modulating autophagy [J]. Cell, 2017,170(3):548
- [7] Gao R, Gao Z, Huang L, et al. Gut microbiota and colorectal cancer[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2017,36(5):757
- [8] Lynch S V, Pedersen O. The human intestinal microbiome in health and disease[J]. N Engl J Med, 2016,375(24):2369
- [9] O'Keefe S J. Diet, microorganisms and their metabolites, and colon cancer[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2016,13(12):691
- [10] Coker O O, Nakatsu G, Dai R Z, et al. Enteric fungal microbiota dysbiosis and ecological alterations in colorectal cancer[J]. Gut, 2019, 68(4):654
- [11] Yu J, Feng Q, Wong S H, et al. Metagenomic analysis of faecal microbiome as a tool towards targeted non-invasive biomarkers for colorectal cancer[J]. Gut, 2017,66(1):70
- [12] Le R T, Llopis M, Lepage P, et al. Intestinal microbiota determines development of non-alcoholic fatty liver disease in mice[J]. Gut, 2013,62(12):1787
- [13] Zheng P, Zeng B, Zhou C, et al. Gut microbiome remodeling induces depressive-like behaviors through a pathway mediated by the host's metabolism[J]. Mol Psychiatry, 2016,21(6):786
- [14] Wong S H, Zhao L, Zhang X, et al. Gavage of fecal samples from patients with colorectal cancer promotes intestinal carcinogenesis in germ-free and conventional mice[J]. Gastroenterology, 2017, 153(6): 1621
- [15] Cao H, Xu M, Dong W, et al. Secondary bile acid-induced dysbiosis promotes intestinal carcinogenesis[J]. Int J Cancer, 2017,140(11):2545
- [16] Kho Z Y, Lal S K. The human gut microbiome—a potential controller of wellness and disease[J]. Front Microbiol, 2018,9:1835
- [17] 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
- [18] Rubinstein M R, Wang X, Liu W, et al. Fusobacterium nucleatum promotes colorectal carcinogenesis by modulating E-cadherin/ β -catenin signaling via its FadA adhesin[J]. Cell Host Microbe, 2013, 14(2):195
- [19] Tny K, Wang X, Nakatsu G, et al. Association between bacteremia from specific microbes and subsequent diagnosis of colorectal cancer[J]. Gastroenterology, 2018,155(2):383
- [20] Seidel D V, Azcárate-Peril M A, Chapkin R S, et al. Shaping functional gut microbiota using dietary bioactives to reduce colon cancer risk[J]. Semin Cancer Biol, 2017,46:191

(2019-01-25 收稿)