

· 论 著 ·

结直肠癌放疗患者粪便具核梭杆菌变化研究^{*}连建春, 刘蓓蓓, 张媛媛, 陆俊忠, 张迎梅, 姜玉章, 张小云[△]

(南京医科大学附属淮安第一医院检验科, 江苏淮安 223300)

摘要: 目的 研究具核梭杆菌在结直肠癌放疗患者中的感染率, 以及放疗前后、肿瘤复发后的体内变化情况。方法 经肠镜证实无肠道疾病体检者 20 例纳入对照组, 收集粪便标本。40 例结直肠癌患者纳入研究组, 术前 3 d、术后 5 d、术后放疗 7 d、放疗 30 d 均收集粪便标本, 随访 1 年, 复发者也收集粪便标本。采用过滤收集菌液沉淀, 进行实时荧光定量 PCR 方法检测粪便标本中的核梭杆菌基因相对表达量。结果 40 例结直肠癌患者中粪便具核梭杆菌的阳性率为 30.0%, 对照组阳性率为 5.0%。12 例结直肠癌阳性患者在术前 3 d、术后 5 d、术后放疗 7 d、放疗 30 d 基因相对表达量分别为 8.50 ± 0.45 、 1.20 ± 0.22 、 5.2 ± 0.34 、 0.20 ± 0.15 。12 例 Fn 阳性患者在术后 5 d 的 Fn 基因相对表达量明显高于术前 3 d, 差异有统计学意义 ($t=10.419, P=0.001$), 放疗 7 d、放疗 30 d 的 Fn 基因相对表达量明显低于术前 3 d, 差异均有统计学意义 ($t=12.728, P=0.001; t=25.889, P=0.001$)。6 例患者在手术后 1 年内复发, Fn 基因相对表达量为 7.20 ± 0.56 , 复发时的 Fn 基因相对表达量较放疗后 7 d 明显升高, 差异有统计学意义 ($t=14.427, P=0.001$)。结论 具核梭杆菌感染可能是结直肠癌的高危因素, 其基因相对表达量的升高可能作为疾病复发的预警指标。

关键词: 结直肠癌; 具核梭杆菌; 放疗; 实时荧光定量 PCR**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2017.15.013**文献标识码:**A**文章编号:** 1673-4130(2017)15-2051-03**Changes of fusobacterium nucleatum in colorectal cancer patients after radiotherapy^{*}**LIAN Jianchun, LIU Beibei, ZHANG Yuanyuan, LU Junzhong, ZHANG Yingmei, JIANG Yuzhang, ZHANG Xiaoyun[△]

(Department of Clinical Laboratory, Huai'an First People's Hospital Affiliated to Nanjing

Medical University, Huai'an, Jiangsu 223300, China)

Abstract: Objective To study the infection rate of *fusobacterium nucleatum* cancer re appeared in patients with colorectal cancer before and after radiotherapy, and the changes after cancer recurrence. **Methods** A total of 20 persons receiving physical examination were recruited in the control group and collected the stool specimens, and 40 colorectal cancer patients were selected in the study group. All of the subjects in the study group were collected stool specimens before operation 3 days and after operation 5 day, after radiation therapy 7 days and 30 days. The patients were followed-up 1 year. The bacterial fluid was collected by filtration, and real-time fluorescence quantitative PCR was used to detect the expression of *fusobacterium nucleatum* gene in feces. **Results** The positive rate of fecal *fusobacterium nucleatum* was 30% in the study group and 5% in the control group. The gene relative expression of 12 colorectal cancer patients before operation 3 days and after operation 5 days, after radiation therapy 7 days and 30 days were 5.20 ± 0.34 , 8.50 ± 0.45 , 1.20 ± 0.22 , 0.20 ± 0.15 . The *fusobacterium nucleatum* gene expression of 12 patients with positive *fusobacterium* after operation 5 days was significantly increased compared with that before operation 3 days ($t = 10.419, P = 0.001$), which after radiation therapy 7 days and 30 days was significant lower than that before operation 3 days ($t = 12.728, P = 0.001; t = 25.889, P = 0.001$). Six patients recurred among 1 year, the *fusobacterium nucleatum* gene expression was 7.2 ± 0.56 , which was significant higher than that after radiation therapy 7 days. **Conclusion** The infection of *fusobacterium nucleatum* might be a risk factor for colorectal cancer, and the gene relative expression might be an early warning indicator of recurrence.

Key words: colorectal cancer; *fusobacterium nucleatum*; radiotherapy; real-time quantitative PCR

结直肠癌(CRC)是西欧、北美等发达国家最常见的恶性肿瘤, 也是我国常见恶性肿瘤之一。在过去 30 多年的时间里, 包括我国在内的多数国家或地区 CRC 发病率呈上升趋势, 我国 2015 年统计数据显示, CRC 发病率位居恶性肿瘤第 3 位, 病死率位居第 5 位^[1]。从流行病学的观点看, CRC 的发病与社会环境、生活方式(尤其是饮食习惯、缺乏体力活动)、遗传因素有关。年龄、结直肠息肉史、溃疡性结肠炎及胆囊切除史也是 CRC 的高危因素, 结直肠的非典型增生被认为是 CRC 的癌前病变。但总体而言, CRC 的病因仍不十分清楚。具核梭杆菌

(Fn) 是一种革兰阴性、无芽孢、专性厌氧菌^[2], 是广泛存在于人及多种动物消化道黏膜处的条件致病菌, 可引起牙周病, 与食管癌患者的预后相关, 与慢性阻塞性肺疾病(COPD)的发病也相关。存在于肠道组织中的 Fn 能黏附和侵入结肠上皮细胞, 促进细胞增殖, 抑制细胞凋亡, 介导炎症过程, 促进肿瘤形成, 且其在肠道中的丰度与 CRC 相关, 与 CRC 的发生和转移密切相关。手术治疗和术后放疗是 CRC 治疗首选方法, 但其是否能影响 Fn 的水平鲜有研究报道。本研究采用粪便富集的方法制备标本, 以实时荧光定量 PCR 检测肠道粪便中的

^{*} 基金项目: 南京医科大学科技发展基金资助项目(2016NJMU144)。

作者简介: 连建春, 男, 在读硕士研究生, 主要从事分子生物学与干细胞研究方向。 △ 通信作者, E-mail: xyzhang2009@126.com。

Fn,研究CRC放疗过程中Fn的变化情况。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本院2014年3月至2016年4月收治的40例CRC患者纳入研究组,其中结肠癌患者20例,平均(50.7±5.6)岁,男、女各10例,包括结肠癌Ⅱ期患者10例,Ⅲ期患者4例,Ⅳ期患者6例;直肠癌患者20例,平均(48.7±4.8)岁,男、女各10例,包括直肠癌Ⅱ期患者4例,Ⅲ期患者6例,Ⅳ期患者10例。研究组患者均留取放疗期间的粪便标本20 g。经肠镜证实无肠道疾病体检者20例纳入对照组,平均(52.3±3.6)岁,其中男、女各10例,均留取粪便标本20 g。

1.2 治疗方法 研究组患者均先采用手术治疗,手术治疗7 d后实行放疗,并定期随访,预约返院复查,复查内容包括血常规、粪便常规及隐血,并于术后3个月、6个月和1年行肠镜复查。

1.3 仪器与试剂 核酸提取采用Total RNA提取试剂盒,反转录采用日本TAKARA公司PrimeScript RT PCR试剂盒(DRR025A),实时荧光定量PCR采用日本TAKARA公司试剂盒(DRR086A),PCR引物委托大连宝生物有限公司设计,上海Invitrogen公司合成。实时荧光定量PCR采用美国Agilent Stratagene公司Mx3000P型Realtime PCR仪,核酸定量采用德国IMPLEN公司Nanophotometer Pearl型微量核酸、蛋白分析仪。

1.3 方法

1.3.1 标本留取 收集20 g粪便标本,采用50 mL灭菌生理盐水稀释后过300目无菌滤网,去除杂质后,3 000 r/min离心10 min收集菌液沉淀。样品液氮速冻5 s,置于-80 ℃冰箱保存。

1.3.2 RNA提取方法 采用Total RNA提取试剂盒提取RNA,具体实验步骤:(1)标本加入1 mL Trizol试剂反复用加样枪吹打以裂解细胞;(2)1 mL Trizol后加0.2 mL氯仿的量加入氯仿,盖上EP管盖子,在手中用力振荡15 s,在室温下放置2~3 min后,12 000×g(2~8 ℃)离心15 min;(3)取上层水相置于新EP管中,按照每1 mL Trizol加0.5 mL异丙醇的量加入异丙醇,在室温下放置10 min后,12 000×g(2~8 ℃)离心10 min;(4)弃上清,按照每1 mL Trizol加1 mL 75%乙醇进行洗涤,涡旋混合,7 500×g(2~8 ℃)离心5 min,弃上清;(5)让沉淀的RNA在室温下自然干燥;用无RNA酶灭菌水溶解RNA沉淀。

1.3.3 反转录合成cDNA 以2 μg RNA 25 μL反转录体系合成cDNA,反转录条件为:37 ℃ 15 min,85 ℃ 15 s。

1.3.4 实时荧光定量PCR 实时荧光定量PCR条件为:预变性95 ℃ 2 min;95 ℃ 30 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min,扩增25个循环。Fn引物序列,F:5'-CTT AGG AAT GAG ACA GAG ATG-3';R:5'-TGA TGG TAA CAT ACG AAA GG-3'。管家基因β-actin引物序列,F:5'-TGG CAC CCA GCA CAA TGA A-3';R:5'-CTA AGT CAT AGT CCG CCT AGA AGC A-3'。

1.4 统计学处理 采用SPSS19.0统计软件进行数据处理及统计学分析。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用t检验,计数资料以例数或百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 2组研究对象Fn检出率比较 研究组中12例检出Fn,

阳性率为30.0%,对照组中1例检出Fn,阳性率为5.0%,2组研究对象Fn检出率比较,差异有统计学意义($\chi^2=4.135, P=0.046$)。

2.2 12例Fn阳性患者在各不同检测时间点Fn基因相对表达量 12例Fn阳性患者术后5 d的Fn基因相对表达量明显高于术前3 d,差异有统计学意义($t=10.419, P=0.001$)。放疗7 d、放疗30 d后的Fn基因相对表达量明显低于术前3 d,差异均有统计学意义($t=12.728, P=0.001; t=25.889, P=0.001$)。在各时间点的基因相对表达量具体见表1及图1。

表1 12例Fn阳性患者在不同检测时间点Fn基因相对表达量($\bar{x}\pm s, n=12$)

检测时间	Fn基因相对表达量
术前3 d	5.20±0.34
术后5 d	8.50±0.45
放疗7 d	1.20±0.22
放疗30 d	0.20±0.15

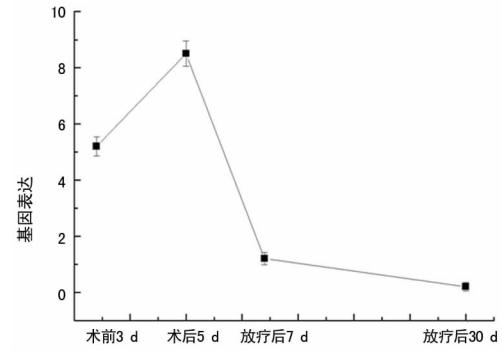


图1 12例Fn阳性患者在不同检测时间点Fn基因相对表达量

2.3 复发的CRC患者Fn基因相对表达量 6例患者在术后1年内复发,Fn基因相对表达量为7.20±0.56,回顾这6例复发患者在术前3 d、术后5 d、放疗后7 d的Fn基因相对表达量分别为5.40±0.43、8.00±0.52、1.50±0.34,复发时的Fn基因相对表达量较放疗后7 d明显升高,差异有统计学意义($t=14.427, P=0.001$)。

3 讨 论

在人类肠道中有超过1 000种微生物,包括有益菌和有害菌,在人类的健康和疾病中扮演着重要的角色。与健康人群相比,CRC患者的优势菌主要包括肠球菌属、埃希菌属/志贺菌属、克雷伯菌属、链球菌属、拟杆菌属-普氏菌属;而劣势菌包括产丁酸盐菌属(如罗氏菌属)、梭状芽孢杆菌等。肠道菌群紊乱可导致多种疾病,其中肠病(如CRC)最为直接,但尚没有特定细菌被证实是CRC的病因^[3-4]。至今,Fn促进CRC的发病机制还未确定,Fn是一种黏膜附着菌,可直接作用于宿主细胞,也可介导非侵入性细菌(如链球菌属和弯曲杆菌属等)进入细胞,导致炎症发生^[5],Fn可能通过释放黏附素FadA进入细胞,FadA与上皮细胞钙黏蛋白结合,激活β-连环蛋白通路促进癌基因表达,Fn在宿主细胞内存活,释放RNA,可激活核因子-κB^[6-8]。

大量的肿瘤浸润T细胞已经被用于提高肿瘤患者的生存^[9],即使确切机制尚不清楚,但是适应性免疫系统可能扮演

了抑制肿瘤的重要角色。肿瘤浸润性 T 细胞是机体对于肿瘤反应的指标,也可能成为肿瘤免疫治疗的方向,以及无痛肿瘤治疗的信息网。文献[10]报道 T 细胞亚群(CD3⁺、CD8⁺、CD45RO⁺ 和 FOXP3⁺)与 CRC 患者的预后相关,同样 Fn 在结肠癌中的作用机制可能通过 microRNA-21 增加白细胞介素(IL)-10 和前列腺素 E₂ 的分泌,抑制 T 细胞的增殖,促进 T 细胞的凋亡。此外,Fn 的致癌作用可能与自噬作用相关,自噬是由 Ashford 和 Porter 在 1962 年发现细胞内有“自己吃自己”的现象后提出的,是指从粗面内质网的无核糖体附着区脱落的双层膜包裹部分胞质和细胞内需降解的细胞器、蛋白质等成分形成自噬体,并与溶酶体融合形成自噬溶酶体,降解其所包裹的内容物,以实现细胞本身的代谢需要和某些细胞器的更新。在 Caco-2 细胞模型中,Fn 感染引起自噬功能受损,通过使用自噬药物抑制剂(3-甲基腺嘌呤,巴弗洛霉素 A1)或 Caco-2 细胞中基本自噬基因(ATG5 或 ATG12)中的 RNA 干扰等方法证明了 Fn 诱导的自噬损伤机制是增强 ROS 在 Caco-2 细胞中促炎细胞因子的表达。

本研究中 Fn 在 CRC 组中的检出率为 30.0%,高于相关文献报道^[11],可能原因为 Fn 与 CRC 的淋巴转移相关。对于口腔菌群如何定居到 CRC 中,有研究认为是由于 CRC 肿瘤组织能够表达特异性糖链,可以与 Fn 结合,从而引起其在 CRC 周围富集^[12]。

本研究发现在手术后 5 d 粪便中的 Fn 基因相对表达量增加,可能原因是局部的微环境变化,更有利于厌氧菌的短期增殖,同时放疗能明显降低患者的 Fn 基因相对表达量。但放疗是否对肠道中的菌群结构和有益菌有影响,是下一步的研究方向,故对手术患者术前及术后肠道微生物的比较,以及放疗前与放疗后肠道微生物的比较可能会很有意义。同时有研究显示血清抗 FnIgA 和 IgG 抗体在 CRC 患者体内明显升高,其联合传统的癌胚抗原(CEA)和糖类抗原(CA)199 可以增加对 CRC 诊断的灵敏度^[13]。

本研究对复发患者的 Fn 感染情况也进行了研究,复发患者均检测到 Fn 的再感染。有研究认为 CRC 组织中 Fn 的 DNA 量与较短的存活相关,Fn 的感染与疾病的临床分期相关,因而其可能作为潜在的判断预后的生物标志物,与本研究结果相一致^[14-15]。但在化疗同时口服抗菌制剂是否能够降低复发率,值得后续研究。

综上所述,Fn 感染可能是 CRC 的高危因素,其基因相对表达量的升高可能作为疾病复发的预警指标。

参考文献

- [1] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132.
- [2] Bhattacharyya S, Ghosh SK, Shokeen B, et al. FAD-I, a fusobacterium nucleatum cell Wall-Associated diacylated lipoprotein that mediates human beta defensin 2 induction through Toll-Like receptor-1/2 (TLR-1/2) and TLR-2/6 [J]. Infect Immun, 2016, 84(5): 1446-1456.
- [3] Sonnenburg JL, Angenent LT, Gordon JI. Getting a grip on things: how do communities of bacterial symbionts be-
- come established in our intestine? [J]. Nat Immunol, 2004, 5(6): 569-573.
- [4] Li YY, Ge QX, Cao J, et al. Association of fusobacterium nucleatum infection with colorectal cancer in Chinese patients[J]. World J Gastroenter, 2016, 22(11): 3227-3233.
- [5] Tahara T, Yamamoto E, Suzuki H, et al. Fusobacterium in colonic flora and molecular features of colorectal carcinoma[J]. Cancer Res, 2014, 74(5): 1311-1318.
- [6] Mara RR, Wang XW, Liu WD, 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): 195-206.
- [7] Noh EJ, Kang MJ, Jeong YJ, et al. Withaferin a inhibits inflammatory responses induced by fusobacterium nucleatum and aggregatibacter actinomycetemcomitans in macrophages[J]. Mol Med Rep, 2016, 14(1): 983-988.
- [8] Mendes RT, Nguyen D, Stephens D, et al. Endothelial cell response to fusobacterium nucleatum[J]. Infect Immun, 2016, 84(7): 2141-2148.
- [9] Noshio K, Sukawa Y, Adachi Y, et al. Association of fusobacterium nucleatum with immunity and molecular alterations in colorectal cancer[J]. World J Gastroenter, 2016, 22(2): 557-566.
- [10] Tang B, Wang K, Jia YP, et al. Fusobacterium nucleatum-induced impairment of autophagic flux enhances the expression of proinflammatory cytokines via ROS in Caco-2 Cells[J]. PLoS One, 2016, 11(11): e0165701.
- [11] Yu JH, Chen YY, Fu XS, et al. Invasive fusobacterium nucleatum May play a role in the carcinogenesis of proximal colon cancer through the serrated neoplasia pathway [J]. Intern J Cancer, 2016, 139(6): 1318-1326.
- [12] Abed J, Engard JE, Zamir G, et al. Fap2 mediates fusobacterium nucleatum colorectal adenocarcinoma enrichment by binding to tumor-expressed Gal-GalNAc[J]. Cell Host Microbe, 2016, 20(2): 215-225.
- [13] Wang HF, Li LF, Guo SH, et al. Evaluation of antibody level against Fusobacterium nucleatum in the serological diagnosis of colorectal cancer[J]. Sci Rep, 2016, 6(6): 33440.
- [14] Kei M, Katsuhiko N, Yasutaka S, et al. Association of Fusobacterium species in pancreatic cancer tissues with molecular features and prognosis[J]. Oncotarget, 2015, 6(9): 7209-7220.
- [15] Flanagan L, Schmid J, Ebert M, et al. Fusobacterium nucleatum associates with stages of colorectal neoplasia development, colorectal cancer and disease outcome[J]. Europ J Clin Microb Infect Dis, 2014, 33(8): 1381-1390.