2型糖尿病肿瘤小鼠模型的建立及其肠道菌群分析

康洁^{1,2†}, 李春青^{1,2†}, 高雪惠^{1,2}, 许慧彬, 陈川^{1,2*}, 罗都强^{1,2*}

1. 河北大学生命科学学院, 保定 071002;

2. 河北大学生命科学与绿色发展研究院, 保定 071002

† 同等贡献

* 联系人, E-mail: duqiangluo@163.com; hyperchuan@163.com

收稿日期: 2021-05-15; 接受日期: 2021-06-01; 网络版发表日期: 2021-09-14

国家重点研发计划(批准号: 2017YFD0201400, 2017YFD0201401)资助

摘要 研究发现, 糖尿病患者会增加罹患某些癌症的风险, 并且这两种疾病都会影响宿主肠道菌群的平衡. 本文通过构建2型糖尿病-肿瘤小鼠模型来研究肿瘤和糖尿病的关系, 并通过16S rRNA基因分析小鼠的肠道菌群变化, 以及肠道菌群对疾病的影响. 研究使用链脲佐霉素(streptozocin, STZ)和高脂饲料构建小鼠2型糖尿病模型, 随后接种肝癌细胞系(HuH-7), 构建好的糖尿病肿瘤模型血糖明显升高并且肿瘤生长迅速. 糖尿病肿瘤模型小鼠的肿瘤生长速度明显高于对照肿瘤组, 证明糖尿病确实可以促进肝癌细胞的生长. 进一步研究发现, 糖尿病肿瘤小鼠的炎症以及相关因子如TNF α , IL-1 β , IL-6, TLR4和MCP1的表达明显升高. 肠道菌群分析发现, 糖尿病组厚壁菌门显著升高, 拟杆菌门显著降低, 糖尿病肿瘤组的炎症和糖尿病相关的菌群*Lachnospiraceae*, *Blautia*, *Lachnospiraceae_UCG-006*, *Ruminiclostridium_9*, *norank_f_Ruminococcaceae*和*Oscillibacter*的水平显著升高, 而*Alistipes*显著降低, 但是肿瘤组的菌群变化不明显, 揭示肠道菌群变化可能会促进小鼠肿瘤和糖尿病的进展. 肠道短链脂肪酸和炎症与糖尿病密切相关. 本研究发现, 与肿瘤组相比, 糖尿病肿瘤组的肠道短链脂肪酸, 如乙酸、丙酸和异丁酸浓度明显降低, 戊酸和异戊酸水平没有变化, 而丁酸浓度明显升高. 本研究构建了糖尿病肿瘤模型并研究其肠道菌群的组成变化, 对于研究糖尿病和肿瘤的关系有一定意义, 为通过肠道菌群干预疾病奠定了基础.

关键词 糖尿病, 肿瘤, 肝癌, 肠道菌群, 短链脂肪酸

糖尿病和癌症是两种常见的、慢性的、多因素诱发并具有潜在致命性的疾病. 研究人员发现糖尿病患者有明显的患癌风险, 并一直在探索这两种疾病的关系^[1]. 多项研究表明, 两种疾病的共患风险涉及基因和表观遗传等多水平变化^[2]. 在2型糖尿病患者中胰岛素

抵抗状态下, 肥胖相关的高胰岛素血症和循环中胰岛素样生长因子1的水平升高被认为是致癌机制中的关键因素^[3]. 2型糖尿病患者的高血糖会增加许多恶性肿瘤的患病率和死亡率^[4]. 糖尿病患者罹患癌症的风险增加, 主要包括乳腺癌、肝癌、膀胱癌、胰腺癌、结

引用格式: 康洁, 李春青, 高雪惠, 等. 2型糖尿病肿瘤小鼠模型的建立及其肠道菌群分析. 中国科学: 生命科学, 2021, 51: 1308–1318
Kang J, Li C Q, Gao X H, et al. Establishment of a type 2 diabetes-tumor mouse model and analysis of its intestinal flora (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2021, 51: 1308–1318, doi: [10.1360/SSV-2021-0186](https://doi.org/10.1360/SSV-2021-0186)

直肠癌、子宫内膜癌等^[5~7]。高血糖、高胰岛素血症、外周胰岛素抵抗和中心性肥胖之间似乎存在一种关键的相互作用, 从而形成一种低级别的慢性炎症状态, 这种炎症状态也能促进肿瘤的生长^[2]。目前发现2型糖尿病是肝细胞癌的已知危险因素^[8], 但是利用小鼠模型研究糖尿病和肝癌的关系还未见报道。

肠道菌群位于肠道内, 多种微生物定殖并持续暴露于其中, 与宿主形成复杂的共生关系。肠道不仅是人类消化吸收营养物质的重要场所, 也是人体的免疫器官, 可以维持人体正常的免疫防御功能^[9]。还有证据表明, 肠道微生物群和大脑之间存在双向联系, 这被称为微生物群-肠道-大脑轴^[10]。肠道菌群影响着宿主多种生理功能, 如免疫、代谢和炎症。目前发现人类多种疾病(糖尿病、肥胖、抑郁症、癌症、帕金森病和亨廷顿病)与肠道菌群失调有关^[11~14]。肠道微环境通过肠道菌群及其产物对疾病产生特定的促进作用, 而特定疾病又会调节和影响肠道菌群的组成。肠道微环境可通过使用益生菌或微生物移植重建, 起到重新校准免疫稳态的作用, 同时也有助于疾病的治疗或改善^[15]。

本实验构建了糖尿病肿瘤小鼠模型, 发现糖尿病组能显著促进肿瘤的生长。为了探究肠道微生物在此过程中的作用, 本团队分别采集了不同处理组5, 9, 11周裸鼠粪便进行16S rRNA测序, 分析肠道菌群组成变化。本实验基于肠道菌群的方法研究糖尿病促肿瘤生长的机制, 对糖尿病患者预防肿瘤的发展有一定的科学意义。

1 材料与方法

1.1 建立糖尿病裸鼠模型

所有的动物实验方案在河北大学医学院动物伦理委员会的监督和批准下完成, 实验在充分考虑动物福利的原则下开展。购买3周龄雄性BALB/c-nu裸鼠48只, 体重9~12 g, 由北京华福康生物科技公司提供, 每笼3只, 分16笼饲养, 严格控制12 h光照/12 h黑暗, 环境温度设定为相对湿度60%±5%, 温度22℃±2℃, 期间小鼠自由进食和进水, 饮水为自制蒸馏水, 饮食为免疫缺陷动物专用常规饲料。动物房每天一次严格消毒, 动物垫料每4天更换一次, 在独立通气笼(individual ventilated cage, IVC)中饲养一周, 观察小鼠生长情况。一周适应期结束后, 将12只裸鼠随机分为2组, 每组6只, 分别用正常鼠料与Co60高脂鼠料(high fat diet, HFD)维

持饲养(无菌), 每周记录裸鼠体重。Co60高脂饲料喂养4周后, 注射链脲佐霉素(streptozocin, STZ), 小鼠禁食不禁水12 h, 按体重50 mg/kg, 腹腔注射1% STZ, STZ注射后一周通过尾静脉采血测定禁食5 h血糖值, 连续2次血糖值≥11.1 mmol/L, 即认为模型构建成功, 模型稳定一周后接瘤(图1)。

1.2 裸鼠异种移植瘤的构建

使用75%酒精对裸鼠右侧腋窝皮肤消毒, 用1 mL无菌注射器吸取100 μL肝癌细胞系(HuH-7)细胞, 将细胞注射于裸鼠腋下。每日观察已接种裸鼠的肿瘤生长情况, 对裸鼠称重, 待长出肿瘤后, 每隔两日用游标卡尺测量肿瘤长径 L 和与短径 W , 计算肿瘤体积 $V=1/2 \times L \times W^2(\text{mm}^3)$ 。接种1周后移植瘤大小约50~100 mm³。

1.3 RT-QPCR

使用Invitrogen TRIzol试剂(美国)提取RNA, 使用南京诺唯赞试剂盒HiScript II Q RT SuperMix for qPCR进行反转录, 使用南京诺唯赞AceQ qPCR SYBR Green Master Mix进行定量PCR, 20 μL体系。使用罗氏(瑞典)的LightCycler96实时荧光定量PCR仪检测荧光定量反应。本文所用引物序列见表1。

1.4 裸鼠粪便短链脂肪酸的测定

称取一定量粪便样品, 按10 mL/g加入0.05%的磷酸水溶液, 旋涡混匀后, 超声10 min, 低温高速离心20 min, 上清液过0.22 μm滤膜, 滤液用于短链脂肪酸(short-chain fatty acids, SCFA)的测定。短链脂肪酸采用Waters E2695型高效液相色谱仪(配备四元泵和2489紫外检测器)进行测定。色谱柱为Unitary C18反相柱, 5 μm, 100 Å, 4.6 mm×250 mm; 流速为1 mL/min; 检测波长为210 nm; 柱温为37℃, 样品室温度15℃; 进样量为20 μL。流动相: A为0.05%的磷酸水溶液, B为乙腈; 梯度洗脱程序为: 0~10 min, 97% A; 10~38 min, 90% A; 39~40 min, 97% A。

图1 小鼠模型构建的时间线

Figure 1 Timeline of mouse model construction

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

基因名	引物(5'→3')
<i>TNFα</i>	GCCAGGAGGGAGAACAGAACTC GGCCAGTGAGTGAAAGGGACA
<i>IL1β</i>	TCCAGGATGAGGACATGAGCAC GAACGTCACACACCAGCAGGTTA
<i>IL6</i>	CCACTTCACAAGTCGGAGGCTTA CCAGTTTGGTAGCATCCATCAATTC
<i>MCP1</i>	AGCAGCAGGTGTCCCAAAGA GTGCTGAAGACCTTAGGGCAGA
<i>TLR4</i>	GGGCTAAACCCAGTCTGTTTG CTTCTGCCCGTAAGGTCCA
<i>GAPDH</i>	TGTGTCCGTCGTGGATCTGA TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG

分别取甲酸、乙酸、丙酸、正丁酸、异丁酸、正戊酸、异戊酸标准品(分析纯, Aladdin, 上海), 用0.05%磷酸配制成1 g/L标准混合储备液(使用前配制). 用0.05%磷酸将该标准储备液分别稀释为0, 25, 50, 100, 250, 500和1000 mg/L的标准品混合液, 以标准品浓度为横坐标, 相应的峰面积为纵坐标绘制标准曲线.

1.5 肠道微生物检测和生物信息学分析

利用美吉生物(上海)的高通量测序测定小鼠粪便中肠道细菌中16S rRNA的V3和V4序列. 为了使信息分析的结果更加准确、可靠, 首先对测序得到的原始数据进行拼接、序列质量进行质控过滤, 得到有效数据(clean data). 以97%相似度为阈值, 进行OTUs(operational taxonomic units)聚类 and 物种分类分析. 借助美吉生物I-Sanger云平台, 根据OTUs聚类结果, 对每个OTU的代表序列做物种注释, 得到对应的物种信息和丰度分布情况并进行比较.

1.6 统计学分析

两组样本间显著性通过Student's *t*-test检验, 不同组之间的显著性通过One way ANOVA进行判断(Tukey's 检验), 数据利用SPSS 19.0软件进行统计学分析, $P<0.05$ 则认为差异显著.

2 结果

2.1 糖尿病促进小鼠肿瘤的生长

糖尿病和荷瘤小鼠的构建示意图见图1. 裸鼠2型

糖尿病模型建成后, 接种HuH-7肝癌细胞系构建肿瘤模型, 这样就得到糖尿病肿瘤模型(diabetes-tumor model, DT), 其对照肿瘤组只接种肿瘤(tumor model, T). 为了研究鼠糖尿病和肿瘤生长的关系, 在构建的模型的第5, 9和11周取样测定肠道菌群. 实验结果显示(图2), 糖尿病组的血糖明显升高, 证明模型构建成功. 糖尿病组裸鼠肿瘤体积显著高于血糖正常组, 说明糖尿病模型对肿瘤有显著促生长作用.

2.2 不同处理组肠道菌群16S rRNA生物信息学分析

(1) Alpha多样性分析. 研究中常用Alpha多样性分析确定特定生境的群落多样性, 包含丰富度和均匀度两方面内容. Chao和Sobs指数反映群落的丰富度; Simpson和Shannon指数反映群落的均匀度. 本研究利用16S rRNA的V3和V4高变区的高通量测序分析糖尿病裸鼠肠道菌群的组成, 并利用上述指数来观察肠道

图 2 糖尿病肿瘤模型、肿瘤模型血糖和肿瘤体积比较. *t*检验, **: $P<0.01$. 鼠龄11周, 每组各6只

Figure 2 Comparison of blood glucose, tumor volume between tumor diabetes mellitus and tumor models. *t*-test, **: $P<0.01$. Rats aged 11 weeks, 6 in each group

菌群的整体变化。Chao和Sobs指数显示出糖尿病肿瘤组和肿瘤组的群落丰富度差异显著,也就是说糖尿病显著影响了物种的丰富性(图3)。而两个模型间的Simpson和Shannon指数无明显差异,说明两种处理都有一定的物种多样性(图3)。简言之,糖尿病小鼠模型显著影响了小鼠肠道的群落丰富度。

(2) Beta多样性分析。Beta多样性分析是计算两个样本群落间的差异分析。本研究对糖尿病肿瘤组和肿瘤组的肠道菌群进行了NMDS分析(Beta多样性分析的一种)。图4中不同颜色、不同形状的点代表不同分组的样本,两个样本点越接近,表明其物种组成越相似。横纵坐标表示相对距离,可以看出,糖尿病肿瘤组与肿瘤组在NMDS1坐标轴明显分开。这证明糖尿病肿瘤组与肿瘤组在NMDS水平物种群落组成存在显著差异。图中stress表示检验NMDS分析结果的优劣,当 $\text{stress} < 0.1$ 时,可认为分类结果较好,所以用NMDS进行样本比较分析是可信的。

(3) 物种群落组成分析。本研究在门水平上比较了两个模型组的肠道菌群变化。研究结果显示,小鼠肠道菌群主要由拟杆菌门(Bacteroidetes)、厚壁菌门(Firmicutes)、变形菌门(Proteobacteria)、螺旋体菌门(Saccharibacteria)、放线菌门(Actinobacteria)等组成。起初小鼠分组后两组间的物种水平没有太大差异(图5A)。在糖尿病模型构建成功时,糖尿病组厚壁菌门显著升高,拟杆菌门显著降低(图5B和C)。在比较不同模型构建的不同周数时,发现肿瘤组物种的门水平没有变化,但是糖尿病肿瘤组几乎所有的门水平的物种都发生了显著变化(图5D和E)。以上结果说明,糖尿病模型显著影响了肠道菌群的平衡。

(4) 物种差异分析。LEfSe多级物种差异判别分析用于估算每个模型组物种丰度对差异效果影响的大小。糖尿病肿瘤组中*Bacteroides*, *Alistipes*, *Christensenellaceae*, *xylanophilum*, *Ruminococcaceae*等菌群丰度对物种差异效果影响较大。肿瘤组中*Blautia*, *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae*等菌群丰度对物种差异效果影响较大(图6)。对糖尿病肿瘤组和肿瘤组进行属占比的数量分析,发现糖尿病肿瘤组*Lachnospiraceae*, *Blautia*, *Lachnospiraceae_UCG-006*, *Ruminiclostridium_9*, *norank_f_Ruminococcaceae*, *Oscillibacter*的水平显著升高,而*Alistipes*显著降低(图6)。分别比较糖尿病肿瘤组和肿瘤组各自模型不同时期的菌落组成,发

图3 肠道菌群Alpha多样性分析. **: $P < 0.01$. DT11: 糖尿病肿瘤组第11周; T11: 肿瘤组第11周

Figure 3 Analysis of Alpha diversity of intestinal flora. **: $P < 0.01$. DT11: diabetes-tumor group at 11 weeks; T11: tumor group at 11 weeks

图4 基于Bray-Curtis距离的NMDS分析(属水平). DT11: 糖尿病肿瘤组第11周; T11: 肿瘤组第11周

Figure 4 NMDS analysis based on Bray-Curtis distance (at genus level). DT11: diabetes-tumor group at 11 weeks; T11: tumor group at 11 weeks

现肿瘤组在属水平上的三个时间(第5, 9和11周)的主要菌群都没有显著的变化,而糖尿病肿瘤组则在*norank_f_Bacteroidales_S24-7_group*, *Blautia*, *unclassi-*

图5 小鼠模型组肠道群落物种组成分析(门水平). DT5, 9, 11: 糖尿病肿瘤组第5, 9, 11周. T5, 9, 11: 肿瘤组第5, 9, 11周. 组间比较使用Kruskal-Wallis H进行检验. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$

Figure 5 Analysis of the composition of intestinal bacteria at the phylum level. DT5, 9, 11: diabetes-tumor groups at 5, 9, 11 weeks; T5, 9, 11: tumor groups at 5, 9, 11 weeks. Kruskal-Wallis H test was used among groups. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$

fied_f_Lachnospiraceae, *Lachnospiraceae_UCG-006*, *Ruminiclostridium_9*, *norank_f_Ruminococcaceae*, *Ruminiclostridium*, *Anaerotruncus*, *Oscillibacter*, *Tyzzereella* 等属发生了显著的变化(图7). 这些结果说明, 糖尿病模型能显著影响小鼠肠道菌群的组成, 肿瘤模型则影响不显著.

2.3 不同模型组的短链脂肪酸含量变化

SCFA是肠道细菌代谢的主要最终产物, 主要由厌氧微生物发酵难消化的碳水化合物形成. 越来越多的证据表明, SCFA在维持肠道和代谢健康方面发挥着重要作用^[16]. 通过检测裸鼠粪便中短链脂肪酸含量发现, 与肿瘤组相比, 糖尿病肿瘤组中的短链脂肪酸, 如乙酸、丙酸和异丁酸含量显著下降, 丁酸含量升高, 戊酸和异戊酸的含量没有太大变化(图8).

2.4 不同模型组的炎症因子水平变化

糖尿病的发生往往伴随着慢性、低度的炎症, 这是糖尿病的代谢并发症. 肿瘤的进展也和炎症相关. 本研究检测了肝脏和附睾脂肪垫中的炎症因子, 如肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor α , $TNF\alpha$)、白介素 1β (Interleukin- 1β , $IL-1\beta$)和白介素6($IL-6$)的mRNA表达情况, 同时也检测了炎症相关的Toll样受体(Toll-like receptor 4, $TLR4$)和单核细胞趋化因子1(monocyte chemoattractant protein-1, $MCP1$)的mRNA表达情况. 结果如图9所示, 炎症相关基因在肝脏和附睾脂肪垫等不同组织中的表达量不同. 糖尿病肿瘤组中 $TNF\alpha$, $IL-1\beta$, $IL-6$, $TLR4$ 和 $MCP1$ 的mRNA在肝脏和脂肪组织中的表达水平显著高于肿瘤组, 说明糖尿病会显著促进小鼠的炎症因子表达.

图6 糖尿病肿瘤组和肿瘤组的LEfSe及线性判别分析和差异属分析。线性判别分析由线性判别分析效应大小(LEfSe)分析产生,显示生物标记分类群(LDA得分>2,通过Wilcoxon符号秩检验确定显著性 $P<0.05$)。组间差异使用Wilcoxon signed-rank test检验。*: $P<0.05$ 。DT11: 糖尿病肿瘤组第11周; T11: 肿瘤组第11周

Figure 6 Analysis of LefSe, linear discriminant analysis (LDA) and the composition of intestinal bacteria at genus level between tumor diabetes mellitus and tumor models. LDA scores (k) and the cladogram (l) were generated from linear discriminate analysis effect size (LEfSe) analysis, showing the biomarker taxa (LDA score of >2 and a significance of $P<0.05$ determined by the Wilcoxon signed-rank test). This test was used to test the difference between groups. *: $P<0.05$. DT11: diabetes-tumor group at 11 weeks; T11: tumor group at 11 weeks

3 讨论

糖尿病和癌症是最常见和最复杂的疾病之一。流行病学证据表明,患有糖尿病的患者罹患某些癌症的风险明显升高^[17]。这种相互作用涉及多层次的改变,如基因表观遗传学的改变,转录水平的改变,以及信号通路的改变。本研究使用STZ和高脂饲料构建2型糖尿病模型,构建成功后选用肝癌细胞系(HuH-7)构建异种移植瘤模型,实验结果表明,糖尿病会促进小鼠肿瘤细胞的生长。本研究发现,糖尿病肿瘤小鼠的炎症因子和血糖水平明显升高,这种升高作用可能导致了肿瘤的快速生长。

近年来,大量研究指出肠道菌群参与能量代谢的过程,即与2型糖尿病的发生发展密切相关^[18]。本研究

通过16S rRNA基因V3和V4区的扩增和测序,研究了糖尿病肿瘤对小鼠肠道菌群的影响。群落多样性对生态系统的稳定性和效率至关重要,肠道微生物群落多样性的降低以前曾在各种疾病,如2型糖尿病和心血管疾病中观察到。本研究采用Shannon指数等Alpha多样性指标来评价肠道微生物群落的丰富度和均匀度。与以往报道一致,本研究发现,糖尿病肿瘤小鼠肠道菌群的丰富度明显降低,而均匀度不变。

本研究对糖尿病肿瘤组和肿瘤组小鼠的肠道菌群进行了菌群变化分析,发现肿瘤组的肠道菌群变化并不显著,而糖尿病肿瘤组的肠道菌群变化极为显著。Beta多样性分析显示,肿瘤组和糖尿病肿瘤组肠道菌群变化明显不同。虽然以往有研究报道肿瘤会影响肠道菌群的平衡^[19,20],但是本研究结果中并未发现有显

图7 小鼠模型组肠道群落物种组成分析(属水平). DT 5, 9, 11: 糖尿病肿瘤组第5, 9, 11周; T: 肿瘤组第5, 9, 11周. 组间比较使用Kruskal-Wallis H进行检验. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$

Figure 7 Analysis of the composition of intestinal bacteria at the genus level. DT5, 9, 11: diabetes-tumor groups at 5, 9, 11 weeks; T5, 9, 11: tumor groups at 5, 9, 11 weeks. Kruskal-Wallis H test was used among groups. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$

图8 肠道菌群短链脂肪酸含量检测. 用高效液相色谱法检测各种短链脂肪酸的含量. 两组样本间显著性通过Student's t -test 检验. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$

Figure 8 Short-chain fatty acid concentrations of intestinal flora. Using high performance liquid chromatography (HPLC) for the detection of SCFA content. The significance between the two groups was tested by Student's t -test. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$

图 9 糖尿病肿瘤组和肿瘤组的肝脏和脂肪垫中炎症相关因子的表达。提取肝脏和附睾脂肪垫的mRNA，用qRT-PCR检测TNFα, IL-1β, IL-6, TLR4和MCP1的mRNA的表达水平，以GAPDH标准化。两组样本间显著性通过Student's *t*-test检验。**: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$

Figure 9 Expression of inflammatory-related factors in liver and fat pad of the diabetic tumor and tumor groups. The mRNA levels of TNFα, IL-1β, IL-6, TLR4, and MCP1 were detected by qRT-PCR. Expression was normalized against GAPDH. The significance between the two groups was tested by Student's *t*-test. **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$

著的影响，这可能与本研究选用裸鼠进行实验有关，并且肝癌细胞HuH-7的生长可能对小鼠肠道菌群影响效果小。本实验结果还显示，糖尿病组厚壁菌门显著升高，拟杆菌门显著降低，这与以前的报道结果一致^[21]。本研究以时间轴为线比较不同模型组在不同时间的肠道菌群变化，发现糖尿病模型对小鼠菌群影响较大，而移植瘤对小鼠的菌群影响较小。本研究对糖尿病肿瘤组在构建糖尿病模型的第5, 9, 11周进行了肠道菌群的比较，发现糖尿病肿瘤组肠道菌群属变化最大是norank_f_Bacteroidales_S24-7_group, Blautia, unclassified_f_Lachnospiraceae, Lachnospiraceae_UCG-006, Ruminiclostridium_9, norank_f_Ruminococcaceae, Ruminiclostridium, Oscillibacter和Alistipes等。随后比较了糖尿病肿瘤组和肿瘤组的肠道菌群差异，发现两组中不同周数的肠道菌群变化基本一致。Blautia^[22], unclassified_f_Lachnospiraceae^[23], Oscillibacter^[24,25]和Lachnospiraceae_UCG-006^[26]与肥胖小鼠糖尿病的发生、胰岛素抵抗或者高脂饲养密切相关。这些菌在糖尿病肿瘤组中的比例明显升高，这之前报道一致。以往研究发现，Bacteroidales_S24-7_group具有抗炎、调节免疫功能的作用，一

些炎症模型的小鼠肠道菌群中Bacteroidales_S24-7_group的数量明显降低^[27,28]。本研究发现，糖尿病肿瘤组炎症因子明显升高，Bacteroidales_S24-7_group的含量明显降低，与原来报道一致。

肠道微生物可以发酵复杂碳水化合物(如抗性淀粉、菊粉)产生SCFA，包括醋酸盐、丙酸盐和丁酸盐。SCFA生成的减少，有毒微生物代谢物的产生以及黏膜屏障功能的中断会促进宿主的免疫失调^[29]。最近的研究发现，SCFAs与2型糖尿病密切相关，而糖尿病人体内产生SCFAs的细菌异常导致SCFA的异常^[30,31]。本实验糖尿病肿瘤组中的短链脂肪酸，如乙酸、丙酸和异丁酸含量显著下降，丁酸含量升高，戊酸和异戊酸的含量没有太大变化。Alistipes被认为是肠道内SCFA的产生菌^[32]，在糖尿病患者中显著降低^[24]，本实验发现Alistipes显著降低，这可能与糖尿病肿瘤小鼠的SCFA降低有关。

Yan等人^[33]发现，Ruminiclostridium_9在STZ制备的2型糖尿病的小鼠模型中明显减少。本研究结果表明，Ruminiclostridium_9在糖尿病模型中明显增高。Ruminococcaceae在肠道微生物群相对丰富，其中的Ruminiclostridium_9中是其重要的一个成员，这个家族可

产生短链脂肪酸, 短链脂肪酸可作为结肠细胞的能量底物, 减轻肠道炎症。 *Ruminiclostridium_9*被认为是丁酸的主要产生菌^[34]。多囊性卵巢综合征的小鼠中*Ruminiclostridium_9*数量增加, 有可能与炎症因子相关^[35]。其他研究也发现, *Ruminiclostridium_9*与从肠道释放炎症和细胞毒性因子以维持稳定的肠道微生态有关^[36]。本实验发现, 2型糖尿病肿瘤小鼠中肠道中丁酸和组织中炎症因子的含量明显增高, 这有可能和*Ruminiclostridium_9*, *norank_f_Ruminococcaceae*的增高有关, 并且*Ruminiclostridium_9*可能会促进小鼠炎症因子的表

达。该结论需要经过实验进一步论证。

总的来说, 本研究构建了糖尿病肿瘤模型, 发现糖尿病明显促进小鼠的肿瘤增殖, 并促进组织炎症因子的表达水平。通过分析小鼠肠道菌群发现, 糖尿病显著影响了小鼠肠道菌群的平衡, 而接入肿瘤对肠道菌群的影响较小, 并且肠道菌群平衡的紊乱使得肠道菌群中短链脂肪酸的含量明显减少, 但是丁酸异常升高。本研究构建糖尿病肿瘤模型并研究其肠道菌群的组成变化, 对于研究糖尿病和肿瘤的关系有一定意义, 并为通过肠道菌群干预疾病奠定了基础。

参考文献

- 1 Lu S, Wang A, Miao S, et al. Association between type 2 diabetes and cancer incidence in China: data in hospitalized patients from 2006 to 2013. *Ann Transl Med*, 2020, 8: 176
- 2 Gristina V, Cupri M G, Torchio M, et al. Diabetes and cancer: A critical appraisal of the pathogenetic and therapeutic links. *Biomed Rep*, 2015, 3: 131–136
- 3 Rahman I, Athar M T, Islam M. Type 2 diabetes, obesity, and cancer share some common and critical pathways. *Front Oncol*, 2020, 10: 600824
- 4 Li W, Zhang X, Sang H, et al. Effects of hyperglycemia on the progression of tumor diseases. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38: 327
- 5 Garg S K, Maurer H, Reed K, et al. Diabetes and cancer: two diseases with obesity as a common risk factor. *Diabetes Obes Metab*, 2014, 16: 97–110
- 6 Farias A J, Wu A H, Porcel J, et al. Diabetes-related complications and pancreatic cancer incidence in the multiethnic cohort. *JNCI Cancer Spectr*, 2020, 4: pkaa035
- 7 Miller B, Chalfant H, Thomas A, et al. Diabetes, obesity, and inflammation: impact on clinical and radiographic features of breast cancer. *Int J Mol Sci*, 2021, 22: 2757
- 8 Tateishi R, Matsumura T, Okanoue T, et al. Hepatocellular carcinoma development in diabetic patients: a nationwide survey in Japan. *J Gastroenterol*, 2021, 56: 261–273
- 9 Narasimhan H, Ren C C, Deshpande S, et al. Young at Gut—turning back the clock with the gut microbiome. *Microorganisms*, 2021, 9: 555
- 10 Osadchiy V, Martin C R, Mayer E A. The gut-brain axis and the microbiome: mechanisms and clinical implications. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2019, 17: 322–332
- 11 Liu S, Gao J, Zhu M, et al. Gut microbiota and dysbiosis in Alzheimer's disease: implications for pathogenesis and treatment. *Mol Neurobiol*, 2020, 57: 5026–5043
- 12 Zhang Z, Tian T, Chen Z, et al. Characteristics of the gut microbiome in patients with prediabetes and type 2 diabetes. *PeerJ*, 2021, 9: e10952
- 13 Abenavoli L, Scarpellini E, Colica C, et al. Gut microbiota and obesity: a role for probiotics. *Nutrients*, 2019, 11: 2690
- 14 Aho V T E, Pereira P A B, Voutilainen S, et al. Gut microbiota in Parkinson's disease: Temporal stability and relations to disease progression. *Ebiomedicine*, 2019, 44: 691–707
- 15 Zhou B, Yuan Y, Zhang S, et al. Intestinal flora and disease mutually shape the regional immune system in the intestinal tract. *Front Immunol*, 2020, 11: 575
- 16 Blaak E E, Canfora E E, Theis S, et al. Short chain fatty acids in human gut and metabolic health. *Benef Microbes*, 2020, 11: 411–455
- 17 Dong S, Wang Z, Shen K, et al. Metabolic syndrome and breast cancer: prevalence, treatment response, and prognosis. *Front Oncol*, 2021, 11: 629666
- 18 Ma Q, Li Y, Li P, et al. Research progress in the relationship between type 2 diabetes mellitus and intestinal flora. *Biomed Pharmacother*, 2019, 117: 109138
- 19 Sepich-Poore G D, Zitvogel L, Straussman R, et al. The microbiome and human cancer. *Science*, 2021, 371: eabc4552

- 20 Chen Y C, Miao Z F, Yip K L, et al. Gut fecal microbiota transplant in a mouse model of orthotopic rectal cancer. *Front Oncol*, 2020, 10: 568012
- 21 Larsen N, Vogensen F K, van den Berg F W J, et al. Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults. *PLoS ONE*, 2010, 5: e9085
- 22 Yang G, Wei J, Liu P, et al. Role of the gut microbiota in type 2 diabetes and related diseases. *Metabolism*, 2021, 117: 154712
- 23 Kameyama K, Itoh K. Intestinal colonization by a *Lachnospiraceae* bacterium contributes to the development of diabetes in obese mice. *Microb Environ*, 2014, 29: 427–430
- 24 Thingholm L B, Rühlemann M C, Koch M, et al. Obese individuals with and without type 2 diabetes show different gut microbial functional capacity and composition. *Cell Host Microbe*, 2019, 26: 252–264.e10
- 25 Song Y, Wu M S, Tao G, et al. Feruloylated oligosaccharides and ferulic acid alter gut microbiome to alleviate diabetic syndrome. *Food Res Int*, 2020, 137: 109410
- 26 Zheng J, Zhu L, Hu B, et al. 1-Deoxynojirimycin improves high fat diet-induced nonalcoholic steatohepatitis by restoring gut dysbiosis. *J Nutr Biochem*, 2019, 71: 16–26
- 27 Su L, Mao C, Wang X, et al. The anti-colitis effect of *Schisandra chinensis* polysaccharide is associated with the regulation of the composition and metabolism of gut microbiota. *Front Cell Infect Microbiol*, 2020, 10: 519479
- 28 Wei D, Xie L, Zhuang Z, et al. Gut microbiota: a new strategy to study the mechanism of electroacupuncture and moxibustion in treating ulcerative colitis. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2019, 2019: 1–16
- 29 Ormerod K L, Wood D L A, Lachner N, et al. Genomic characterization of the uncultured Bacteroidales family S24-7 inhabiting the guts of homeothermic animals. *Microbiome*, 2016, 4: 36
- 30 Barko P C, McMichael M A, Swanson K S, et al. The gastrointestinal microbiome: a review. *J Vet Intern Med*, 2018, 32: 9–25
- 31 Qin J, Li Y, Cai Z, et al. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature*, 2012, 490: 55–60
- 32 Yu J C, Hale V L, Khodadadi H, et al. Whole body vibration-induced omental macrophage polarization and fecal microbiome modification in a murine model. *Int J Mol Sci*, 2019, 20: 3125
- 33 Yan Z, Wu H, Zhou H, et al. Integrated metabolomics and gut microbiome to the effects and mechanisms of naoxintong capsule on type 2 diabetes in rats. *Sci Rep*, 2020, 10: 10829
- 34 Bui T P N, Shetty S A, Lagkouravdos I, et al. Comparative genomics and physiology of the butyrate-producing bacterium *Intestinimonas butyriciproducens*. *Environ Microbiol Rep*, 2016, 8: 1024–1037
- 35 Zhu Y, Li Y, Liu M, et al. Guizhi Fuling Wan, Chinese herbal medicine, ameliorates insulin sensitivity in PCOS model rats with insulin resistance via remodeling intestinal homeostasis. *Front Endocrinol*, 2020, 11: 575
- 36 Xiao L, Chen B, Feng D, et al. TLR4 may be involved in the regulation of colonic mucosal microbiota by vitamin A. *Front Microbiol*, 2019, 10: 268

Establishment of a type 2 diabetes-tumor mouse model and analysis of its intestinal flora

KANG Jie^{1,2}, LI ChunQing^{1,2}, GAO XueHui^{1,2}, XU HuiBin^{1,2}, CHEN Chuan^{1,2} & LUO DuQiang^{1,2}

¹ School of Life Sciences, Hebei University, Baoding 071002, China;

² Institute of Life Sciences and Green Development, Hebei University, Baoding 071002, China

Studies have found that diabetic patients have a greater risk of cancer, and both diseases affect the balance of host intestinal flora. We used streptozotocin and a high-fat diet to establish a mouse model of type 2 diabetes then inoculated the nude mice with hepatoma cell lines (Huh-7). The tumor volume of the diabetic tumor mice model was significantly higher than that of the control tumor group, which proved that diabetes could indeed promote liver tumor growth. Further study found that the mRNA expression of inflammation and related factors, such as TNF α , IL-1 β , IL-6, TLR4, and MCP1, significantly increased in diabetic tumor mice. Intestinal microflora analysis showed that Firmicutes in the diabetic tumor group significantly increased and Bacteroides significantly decreased. In the diabetic tumor group, the microflora associated with inflammation and diabetes, namely, *Lachnospiraceae*, *Blautia*, *lachnospiraceae_UCG-006*, *Ruminiclostridium_9*, *norank_f_Ruminococcaceae*, and *Oscillibacter*, significantly increased. In contrast, the levels of *Alistipes* significantly decreased. However, intestinal flora changes in the tumor group were not obvious, which indicated that the changes of intestinal flora caused by diabetes could promote the progress of tumor and diabetes in mice. Intestinal short-chain fatty acids and inflammation were closely related to diabetes. Compared with the tumor group, the concentrations of propionic and isobutyric acids significantly decreased in the diabetic tumor group, while the levels of valeric and isobutyric acids remain unchanged, but the concentration of butyric acid significantly increased in the diabetic tumor group. Therefore, we constructed a diabetic tumor model and studied the compositional changes of its intestinal flora, which has certain significance for studying the relationship between diabetes and tumor and lays the foundation for the intervention of diseases through the intestinal flora.

type 2 diabetes, tumor, liver cancer, intestinal flora, short-chain fatty acids

doi: [10.1360/SSV-2021-0186](https://doi.org/10.1360/SSV-2021-0186)