胶质瘤中微生物菌群分类及其免疫关联性

胡宏荣^{1†}, 梁桥星^{2†}, 杨晴^{1†}, 王译辉¹, 王江煌¹, 李聪^{1*}, 魏来^{2*}, 李博^{1*}

1. 中山大学中山医学院生化教研室, 广州 510080;

2. 中山大学中山眼科中心, 眼科学国家重点实验室, 广州 510060

† 同等贡献

* 联系人, E-mail: licong28@hotmail.com; weilai@gzoc.com; libo47@mail.sysu.edu.cn

收稿日期: 2020-07-06; 接受日期: 2020-08-18; 网络版发表日期: 2020-09-09

国家自然科学基金优秀青年科学基金(批准号: 81622034)、国家自然科学基金面上项目(批准号: 81572508)、广东省自然科学基金(批准号: 2016A030313260, 2018A030313754)和广州市科技计划项目科学研究专项(批准号: 201707010169)资助

摘要 胶质瘤是最常见的原发性恶性脑瘤, 患者预后很差. 胶质瘤一般都会复发, 并且经常对放疗和化疗产生抗性. 微生物群体可通过调节中枢神经系统的炎症反应影响治疗抗性, 但其分子机制和具体过程未知. 为研究这个问题, 本团队对2个胶质瘤患者的多区域肿瘤组织和癌旁组织样本进行了转录组和宏基因组测序. 结果在胶质瘤中鉴定到若干微生物群体, 这些微生物各自偏好肿瘤微环境中不同类型的免疫细胞, 并可能与胶质瘤的发生发展相关. 据悉, 这是首次在颅内肿瘤内详细定义微生物种群, 并揭示细菌群体在肿瘤和邻近癌旁组织中具有不同的丰度分布. 本团队的发现有助于人们更好地理解微生物群体如何与胶质瘤微环境互动并促进化疗抵抗. 期待将来可以开发出新型细菌疗法(单独应用或与免疫治疗联合应用), 用于改善肿瘤患者的预后.

关键词 宏基因组, 胶质瘤, 微生物菌群, 免疫微环境

胶质瘤是致命的恶性脑肿瘤, 也是最难治愈的肿瘤之一. 胶质瘤通常具有较强的浸润性和侵袭性, 是最常出现在成人脑半球的肿瘤^[1]. 因为胶质瘤本质上具有高度浸润性, 神经外科手术的完全切除几乎是不可能的, 并且残留肿瘤极易导致复发和恶化, 复发经历的时间因胶质瘤的级别不同而差异较大^[2,3]. 一些低级别的胶质瘤会在几个月内进展为胶质母细胞瘤(glioblastomas, GBM)(WHO IV级胶质瘤). 最大限度的手术切除, 辅以替莫唑胺化疗及一定剂量的放射治疗是胶质瘤的标准疗法, 但临床上有相当一部分患者对化疗不敏感^[4], 而化疗耐药被证明与人体内的微生物

有关^[5,6].

人体内部和表面的微生物数量比人类自身细胞还要多, 而且越来越多的研究表明, 微生物与恶性肿瘤的关系远比人们预想的要大. 过往研究较多的恶性肿瘤相关微生物有乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)、人乳头瘤病毒(human papilloma virus, HPV)、EB病毒(Epstein-Barr virus, EBV)、人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)、埃及血吸虫(*Schistosoma haematobium*)和幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*)等^[7]. 幽门螺杆菌会引起宿主的炎症反应, 是世界卫生组织国际癌症研究中心最早认定的致

引用格式: 胡宏荣, 梁桥星, 杨晴, 等. 胶质瘤中微生物菌群分类及其免疫关联性. 中国科学: 生命科学, 2020, 50: 1132–1140

Hu H R, Liang Q X, Yang Q, et al. The microbiota in human glioma and its association with immune microenvironment (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2020, 50: 1132–1140, doi: 10.1360/SSV-2020-0029

癌物,也是致癌机制研究较深入的一种微生物.幽门螺杆菌可以改变宿主一些重要基因的甲基化程度,还能改变某些信号通路的活性,例如通过激活*c-fos*和*c-jun*原癌基因上调有丝分裂及其他一系列信号通路^[8].病毒、寄生虫和细菌都可以通过某些机制诱导肿瘤发生或促进肿瘤发展^[9].病毒可将自己的基因组整合到人类基因组中,细菌感染人体后引起炎症反应,损伤体细胞/胚系DNA,进而诱导肿瘤发生^[10].大多数情况下,肿瘤相关细菌是整个微生物组里占绝大多数的.有时这些细菌只是单纯偏好对自身有利的肿瘤微环境,它们可能与肿瘤发生无关;而有时即使丰度较低的微生物也可能引起基因的突变,从而在肿瘤发生发展中起关键作用.

有关微生物和中枢神经系统肿瘤之间联系的报道非常少,因为大脑受到血脑屏障的保护而部分地与血液内容物隔离,从而免受大部分微生物群体的攻击.大脑一般被认为是无菌器官,能够穿透血脑屏障的细菌和病毒会导致危及生命的颅内炎症,所以在人类大脑中出现细菌通常是很糟的临床表型.近年来受到关注的肠脑轴(gut-brain axis)是沟通肠道和脑的一种复杂的双向通信系统,由神经元、免疫细胞和肠嗜铬细胞等释放的激素、免疫和神经信号所介导^[11,12],其具体作用机制尚不清楚,但是可以确定肠道微生物组的调节与改变可以影响脑功能和行为^[13].近期报道的肠道细菌可能通过分布于肠道的神经穿透血脑屏障进入大脑,引起了学术界的广泛讨论和争议^[14].研究人员发现,在多发硬化症小鼠模型中,由肠道细菌产生的膳食色氨酸的代谢物会抑制非神经元细胞(包括小神经胶质细胞和星形胶质细胞)的促炎症活性,而且对多发硬化症脑组织的进一步研究表明,人脑内也存在类似的机制^[15].

早期的微生物学研究只能检测和鉴定单个物种,现在利用高通量深度测序技术,以及计算生物学和生物信息学的辅助,人们可以从宏观层面研究包括病原微生物和共生微生物在内的整个微生物群落的特征^[16].人类个体间存在恶性肿瘤易感性的差异,这种差异可能是通过营养代谢、解毒、激素稳态、免疫耐受、炎症等途径,由人体和微生物之间的共生关系来部分调节的^[17,18].微生态失衡是指与疾病相关的微生物群体的改变,以及随之导致的共生微生物群体的免疫和补偿反应.微生态失衡相关的免疫反应,以及乙

醛和亚硝基化合物等化学致癌物的产生,是人体微生物群体参与肿瘤发生的可能机制^[17].宏基因组学可能是探索微生物与恶性肿瘤关联的最佳方法,已有研究人员从TCGA数据库中挖掘到部分微生物与卵巢癌、胶质母细胞瘤、急性髓细胞性白血病、结直肠癌以及胃癌有显著关联^[19-22].为了探索胶质瘤内微生物的丰度、种类以及和免疫微环境之间的相互作用,本团队将宏基因组测序和转录组测序结合起来,具体来说:选择若干例胶质瘤样本做RNA和宏基因组测序,并结合癌旁、血浆等样本和阴性对照进行综合分析,验证脑胶质瘤中微生物存在的可能性,探索微生物相关的免疫反应在胶质瘤和癌旁组织中的分布情况.

1 材料与方法

1.1 样本收集

本团队创建了一个收集多组学样本和全面临床指标的胶质瘤生物样本库GliomaID,方便以转录组和宏基因组等多组学技术手段研究胶质瘤.本团队在未接受药物治疗或放化疗的胶质瘤患者手术后15 min内收集组织,并立即在-80℃冷冻,每个肿瘤组织对应的癌旁组织、血清、血浆也收集存于-80℃.每块肿瘤组织在干冰上被切割成8~18块不等的亚样本,每个亚样本组织病理学由病理学家根据中枢神经系统肿瘤WHO分类进行分级.同时,收集每个组织供体的人口统计学特征和临床信息,包括年龄、性别、临床分级、切除边缘状态、诊断的存活时间和是否接受过辅助放化疗.样本收集协议由中山大学肿瘤防治中心的伦理委员会审查和批准,且所有参与者均签署了知情同意书.本研究从GliomaID中选取了2例胶质瘤患者G09和G22,通过肿瘤样本活检确定了胶质瘤的诊断和分级.G09是WHO I级的毛细胞型星形细胞瘤(pilocytic astrocytoma, PA),G22是WHO IV级的GBM.

1.2 RNA测序和免疫微环境预测

两块胶质瘤样本,都各自分成6份亚样本,加上各自癌旁组织,一共14份样本,使用RNeasy Mini Kit (Qiagen, 德国)提取总RNA,所有样本的总RNA质量全部大于500 ng(RINe>8).然后用TruSeq Stranded mRNA Library Prep Kit(Illumina, Inc., 美国)制备RNA文库,操作步骤参照厂商说明书,纯化并片段化mRNA(messen-

ger RNA), 使用随机hexamere和ProtoScript II逆转录酶(New England BioLabs Inc., 美国)进行第一链cDNA(complementary DNA)合成, 随后将cDNA的3'末端腺苷酸化, 连接头(adapter), PCR扩增. 文库用Quantus荧光计(Promega, 美国)上的Promega QuantiFluor dsDNA系统定量. Agilent 2200 TapeStation上的高灵敏度D1000检查文库的大小和纯度. 将文库归一化, 合并, 根据制造商的说明书在HiSeq2500测序仪(Illumina)上进行150 bp双端测序.

下机fastq文件(raw reads)通过FastQC工具质控, 然后用bwa工具比对到人类基因组(NCBI hg19/GRCh37), 以Cufflinks套装(<http://cole-trapnell-lab.github.io/cufflinks/>)以及bedtools工具(<http://cole-trapnell-lab.github.io/cufflinks/>)构建转录本, 计算表达丰度FPKM(fragments per kilobase of exon model per million mapped fragments)值^[23]. G0904RNA样本FPKM值明显低于其他样本, 因此后续免疫分析中去除G0904RNA(图1). 进而以转录组数据为基础, 用EPIC软件分析每个样本的免疫微环境, 提取免疫细胞相关表达基因的FPKM值, 预测免疫细胞组分比例^[24].

图1 RNA测序各样本丰度FPKM值. G09为WHO I级的毛细胞型星形细胞瘤样本, G22为WHO IV级的胶质母细胞瘤样本. G0904RNA样本FPKM值明显低于其他样本, 因此后续免疫分析中去除此样本

Figure 1 FPKM value of each sub-samples that went through RNA-Seq. G09 patient was WHO grade I pilocytic astrocytoma (PA), and G22 was WHO grade IV glioblastomas (GBM). The FPKM value of sub-sample G0904 was apparently lower than the others, the sub-sample was therefore excluded from the subsequent analysis

1.3 宏基因组测序和数据分析

用于宏基因组测序的胶质瘤样本需要严格执行无菌操作. 每个胶质瘤病人的肿瘤经无菌器械低温切割得到6份肿瘤样本, 另有1份癌旁、1份血浆, 2份空白培养皿阴性对照(与切割肿瘤标本所用培养皿同一批次). 取样时用生理盐水冲洗样本, 空白培养皿加入此生理盐水作为完整的阴性对照. 共20份样本进行宏基因组测序.

使用Bioruptor(Diagenode, 比利时)将每份样品提取的100 ng DNA超声处理成300~400 bp的片段, 并用VAHTS Nano DNA Library Prep Kit for Illumina (Vazyme, 南京), 按照制造商提供的标准流程进行测序文库制备. 使用HiSeq PE Cluster Kit v4和HiSeq SBS V4 250 cycle kit(Illumina)在Illumina HiSeq2500测序仪上对DNA文库进行测序, 每个样品深度为10~50 M reads, 下机数据用CASAVA(v1.8.2, Illumina)初步处理. 所有reads先质控, 然后非人类序列使用Kraken(预构建4 GB数据库作为参照, 包含了至2014年12月8日RefSeq中的完整细菌、古细菌和病毒基因组)进行群落分析, 鉴定肿瘤样本中的微生物种类和丰度(图2).

1.4 统计分析

统计分析工具主要是R语言3.3.0和Originpro软件. 两组连续变量的比较使用Student's *t*检验或者方差分析(analysis of variance, ANOVA), $P < 0.05$ 作为显著性阈值. 根据免疫细胞百分比和微生物丰度之间的相关性分析计算Spearman相关系数. 应用主坐标分析(principal co-ordinates analysis, PCoA)和随机森林(random forest)估算对样本分类贡献最大的微生物种类, 以及各类微生物的平均精确率减少值(mean decrease accuracy, MDA).

2 结果与讨论

2.1 利用转录组数据预测胶质瘤免疫微环境

肿瘤相关巨噬细胞在肿瘤发生发展中扮演着重要角色, 尤其在中枢神经系统肿瘤中是最主要的肿瘤相关非癌细胞^[25]. 大脑的巨噬细胞可以分为三类: 小胶质细胞、中枢神经系统常驻巨噬细胞和循环来源的单

图 2 宏基因组分析流程图. 测序下机数据首先要经过质控环节, Trimmomatic和Prinseq过滤去除一些无用的序列, 如接头和引物等, 然后去除包含宿主(人)基因组序列的reads. 非人类序列使用Kraken进行群落分析, 鉴定肿瘤样本中的微生物种类和丰度, 过滤掉阴性对照中富集的物种, 最终鉴定出肿瘤组织中特有的物种(网络版彩图)

Figure 2 Flow chart of metagenome. Quality control was first carried out for the raw data, useless reads (i.e. adapters and primers) were filtered out by Trimmomatic and Prinseq, and the host reads were removed then by computation subtraction. Microbiota analysis was performed by Kraken to identify microbes and their abundance. Finally, after species enriched in the negative controls were filtered out, species specifically existing in the tumor tissues were identified (color online)

核细胞. 通过比较小胶质细胞的marker, 例如*ITGAM*, *AIF1*等基因在胶质瘤G09和G22的所有亚样本的转录水平发现, 这些基因相比癌旁组织都有显著的高表达, 说明在这两个肿瘤组织中小胶质细胞是免疫响应的主要活性细胞成分.

EPIC工具可基于基因表达对胶质瘤免疫微环境进行预测, 并定量分析肿瘤相关的成纤维细胞和免疫细胞组分(图3). 可以发现, 无论是PA型的G09, 还是GBM型的G22的癌旁组织(G09APRNA和G22APRNA), 其激活的巨噬细胞成分均明显低于各个肿瘤亚样本, 这与之前的报道相符^[26-28]. 同时, B细胞和在其他类型实体瘤中发挥主要免疫功能的T细胞(包括CD4

和CD8)未明显激活, 其活性细胞组分跟癌旁组织相比无明显差异. G09和G22肿瘤亚样本中的CD4⁺ T细胞都比巨噬细胞多, 但是在癌和癌旁中没有差异, 因此本团队推论胶质瘤中发挥主要免疫功能的仍然是巨噬细胞. 同时本团队注意到, G09不同亚样本的各种免疫组分类似, 说明该样本免疫微环境异质性相对较低, 而G22亚样本的免疫组分含量相差较大, 说明该样本免疫微环境异质性相对较高. 这可能与GBM基因组的异质性高于PA有关.

2.2 利用宏基因组数据鉴定胶质瘤相关的微生物组

通过宏基因组测序, 本团队在20份样品中共检测到470种微生物, 包括细菌、古细菌和病毒, 并计算了所有470种微生物在所有样本中的相对丰度(网络版附表1), 发现每个物种至少存在于一份样品之中(网络版附表2). 从附表2中可以看到, 癌旁鉴定出的微生物种类明显多于肿瘤组织, 而血浆中鉴定出的种类更多. 另外, 本研究中的空白阴性对照无论是鉴定为微生物的reads数还是最终鉴定的种类, 都超过其他组织样本. 两个对照所含微生物的种类均超过了1000种, 这可能是由于样本收集环境没有免疫系统杀伤微生物所致. 通过比较G09和G22的肿瘤亚样本、癌旁、血浆发现, G22的物种数均高于G09, 但没有显著差异($P>0.05$).

本团队通过对20个样本的主坐标分析发现, 主导分布模式的可能是组织类别, 其次能区分样本的可能是肿瘤和癌旁中丰度差异较大的细菌(图4). 本研究采用两种不同的过滤标准筛选这些微生物, 其中较严格的为Filter-1标准: 肿瘤、癌旁、血浆三种组织的平均相对丰度 $\geq$ 阴性对照, 且肿瘤组织平均相对丰度 $>$ 癌旁组织. 通过Filter-1标准筛选得到7种微生物(表1), 相对丰度以及在每个样本中的分布见网络版附表3. 其中, *Propionibacterium phage Stormborn*是一种双链DNA噬菌体, 丰度在肿瘤和癌旁中差异最大, 但是在癌旁和阴性对照中是一样的水平, *Staphylococcus hyicus*的丰度也是类似情况. 两种微生物可能只是样本处理或测序过程中产生的污染信号, 对胶质瘤不存在偏好, 跟胶质瘤的免疫微环境之间也无关联. 经过BLAST验证, *Pseudomonas alcaligenes*部分序列更接近其他的细菌, *Pseudomonas syringae*的序列被分配到其他物种, 因此这两种细菌的分型结果可信度不高. *Acinetobacter baumannii*在肿瘤与癌旁组织中的丰度比值为1.52,

图3 免疫细胞组分预测。包括巨噬细胞、T细胞(CD8和CD4)、B细胞等。根据RNA测序的结果还预测了成纤维细胞、内皮细胞以及自然杀伤细胞,但这三种细胞组分含量很低,因此未在图中展示

Figure 3 Prediction of immune cell composition. Macrophages, T cells (CD8 and CD4 T cells) and B cells were included in the prediction. Fibroblasts, endothelial cells and natural killer (NK) cells were also predicted based on the RNA-Seq, but not shown here because of very low abundance

表1 通过Filter-1的微生物在各种样本类型中的丰度及比值^{a)}

Table 1 Abundance and ratio of microbes in each type of samples filtered by Filter-1^{a)}

物种	T/ANT	T/NC	ANT/NC	S/NC	Tumor	ANT	Serum	NC
<i>Propionibacterium</i> phage Stormborn	100.21	100.21	1.00	1.00	0.10	0.00	0.00	0.00
<i>Staphylococcus hyicus</i>	83.51	83.51	1.00	1.00	0.08	0.00	0.00	0.00
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	5.87	7.06	1.20	12.12	0.22	0.04	0.38	0.03
<i>Marmoricola scoriae</i>	2.22	5.79	2.61	3.76	0.12	0.06	0.08	0.02
<i>Pseudomonas syringae</i>	1.77	2.43	1.37	4.65	0.22	0.12	0.42	0.09
<i>Acinetobacter baumannii</i>	1.52	2.35	1.54	1.61	0.23	0.15	0.16	0.10
<i>Rhodococcus</i> sp. PBTS 2	1.32	20.34	15.35	3.49	0.12	0.09	0.02	0.01

a) T(Tumor): 肿瘤组织丰度均值; ANT(adjacent normal tissues): 癌旁组织丰度均值; NC(negative controls): 阴性对照丰度均值; S(Serum): 血浆丰度均值

Rhodococcus sp. PBTS2的比值为1.32, *Marmoricola scoriae*(序列相似性85%左右)的比值为2.22, 这三种细菌的序列都得到了BLAST验证, 可能是主导分布模式的主要微生物物种。

之后, 采用较宽松的Filter-2标准(肿瘤组织平均相对丰度≥阴性对照, 且肿瘤组织平均相对丰度>癌旁组织)分析, 得到159种细菌(网络版附表4)。进一步用随机

森林分析Filter-2微生物的贡献度, 根据分类贡献度(importance)鉴定与胶质瘤相关的微生物(图5, 详细结果见网络版附表5): *Acinetobacter junii*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*和*Brevundimonas diminuta*。其中, *Acinetobacter baumannii*与Filter-1结果重合, 该菌也是存在于最多样本中的细菌(网络版附表2)。文献报道*Acinetobacter baumannii*是一种好氧革兰

图 4 470种微生物主坐标分析. 主坐标分析是多种因素共同作用的结果, 肿瘤和癌旁、血浆组织中的分布具有一定的规律, 从阴性对照、血浆、癌旁, 再到肿瘤组织, 微生物种类逐渐减少. PCO1主轴分开的是肿瘤和其他样本(癌旁、血浆和阴性对照)

Figure 4 Principal coordinate analysis of 470 microbes. The principal coordinate analysis was the interplay of a variety of factors. There was a certain pattern of the distribution of tumors, adjacent tumor tissues, and plasma. From the negative control, plasma, adjacent tumors, to tumor tissues, the numbers of microbes gradually decreased. The PCO1 spindle separates tumors from the other samples (adjacent tumor tissues, plasma, and negative controls)

氏阴性不动杆菌, 与胶质母细胞瘤内发生的脓肿有关^[29], 不动杆菌包含几种多重耐药菌, 普遍被认为是

非致病的, *Acinetobacter baumannii*是最常见的一种, 生存于各种物体表面, 如皮肤和食物; 医院感染的菌群中也发现过*Acinetobacter baumannii*, 它能感染免疫力低下的脑瘤患者^[30].

2.3 宏基因组和免疫微环境的相关性分析

本团队已基于测序数据预测了各类免疫细胞组分的百分比, 以及470种微生物的相对丰度. 接下来将两个组学的数据合并在一起计算秩相关系数, 网络版附表6列出了所有相关系数高于0.5的物种及其偏好的免疫细胞环境. 有5种细菌(*Pseudomonas* sp. UW4, *Pseudomonas* sp. BS-2016, *Delftia* sp. HK171, *Delftia* sp. Cs1-4, *Pseudomonas reinekei*)的丰度与B细胞、T细胞正相关, 而与成纤维细胞和巨噬细胞呈负相关, 且相关系数排名最高, 说明它们更偏好具有淋巴细胞活性的胶质瘤. 而在高巨噬细胞活性的肿瘤微环境中, 它们的丰度较低. 另外, *Sphingomonas* sp. NIC1是一种鞘氨醇单胞菌, 它可容忍B细胞和CD8⁺ T细胞, 不偏好巨噬细胞, 这跟前面5种细菌有些类似. 而*Brevundimonas diminuta*是我们较感兴趣的一种短波单胞菌, 它虽与巨噬细胞无显著关联, 但偏好B细胞和CD8⁺ T细胞, 与成纤维细胞也是负相关, 在随机森林分析中是主要分类的贡献者(图5). *Methylobacterium persicinum*是一种甲基杆菌, 不喜巨噬细胞和成纤维细胞环境. *Kosakonia*

图 5 随机森林分析. 平均精确率减少值是随机森林的一种特征选择方法, 通过随机选择和排除特征, 度量每个特征对模型精确率的影响. 对于越重要的变量来说, 若排除该变量, 模型的精度将下降越多. 为减少单次计算带来的数值不稳定, 本图展示的是重复计算100次后, 平均MDA大于1的4类微生物物种

Figure 5 Random forests analysis. Mean decrease accuracy (MDA) was a feature selection method for random forests. By randomly including and excluding features, it measured the impact of each feature on the accuracy of the model. For more important variables, the accuracy of the model would decrease more if the variable was excluded. In order to reduce the numerical instability caused by a single calculation, this figure shows four types of microbes with an average MDA greater than 1 after 100 times repeated calculations

*radicincitans*是一种较罕见的细菌, 厌恶B细胞, 而偏好巨噬细胞环境, 前人报道它可导致血液感染^[31]. 假单胞菌*Pseudomonas brassicacearum*偏好CD8⁺ T细胞, 厌恶巨噬细胞. 拟色球藻菌*Chroococcidiopsis thermalis*偏好成纤维细胞, 厌恶CD8⁺ T和B细胞.

综合来看, 相关系数排名靠前的细菌都不亲近巨噬细胞, 但在B细胞和T细胞较多的环境中丰度很高. 细菌的存在和分布可以侧面证明巨噬细胞在胶质瘤免疫反应中的独特作用. 本研究采用的深度测序方法十分敏感, 极低程度的污染都能测到大量reads, 因此阴性对照总是能测到很多物种. 采样和建库全程都可能引入污染(背景信号), 比如采样或处理样本的耗材不够洁净, 或测序试剂不够洁净. 不幸的是, 现阶段的实验条件只能减少污染, 而不可能完全消除. 从数据来看, 污染能够多大程度上影响本研究的结论难以判断, 但是以上讨论的细菌都存在瘤内分布的偏好, 而且通过较严格的Filter-1标准过滤得到的细菌种类有相当高的可信度. 近期美国神经科学学会的一篇摘要报道的“大脑微生物组”存在的可能^[14], 以及本研究主坐标分析的结果(图4), 都不能单纯地用环境污染来解释.

3 结论

本研究是首次结合宏基因组和RNA深度测序, 综合分析胶质瘤的免疫微环境和微生物群体, 以及两者间可能的关联. 根据RNA测序的结果结合分析工具的预测, 胶质瘤微环境中含有较多的T细胞, 但进行抗肿瘤免疫活动的主要是巨噬细胞. 本团队对每位患者的4种组织样本进行了宏基因组测序, 结果发现, 组织中的微生物物种数按肿瘤组织、癌旁、血浆、阴性对照的顺序呈增多趋势, 说明样本类型是主导样本分布的. 三

种细菌*Acinetobacter baumannii*, *Rhodococcus* sp. PBTS2和*Marmoricola scoriae*可能是次要的主导分布模式的细菌, 其中*Acinetobacter baumannii*可能与GBM恶性进展相关^[29,30]. 免疫微环境和某些种类的细菌丰度的关联, 还需要排除更多的背景信号, 以及做进一步的深入研究才能确定.

胶质瘤特别是高级别胶质瘤的血管网络会不断增生和渗透, 是有能力破坏血脑屏障的, 因此, 这在理论上为细菌侵入和成长提供了机会. 本团队猜测, 像G22这样快速生长的GBM, 细菌甚至可能与肿瘤竞争营养资源; 相比G22的癌旁和血浆组织, *Acinetobacter baumannii*更偏好肿瘤组织, 可能是因为肿瘤组织的特殊代谢能产生此类细菌更需要的营养物. 本研究样本量较小, 仅有两例胶质瘤病人的标本, 得到的结论可能具有较大偏差, 要建立更明确的微生物和肿瘤的联系是极富挑战的. 根据以往的肿瘤宏基因组研究经验, 细菌和病毒占主导作用, 但是也不能排除真菌、原生动物等的作用, 本研究的宏基因组测序只给出了细菌、古细菌、病毒这三种微生物的数据, 未与真菌和原生动物的参考基因组比对. 未来本团队计划收集更大规模的多中心组织样本, 更好地改进实验流程和生物信息分析方法, 减少环境污染的影响, 并与所有已知类型的微生物进行比对.

宏基因组测序是一种高分辨筛查和鉴定微生物的分析手段. 应用宏基因组测序评估胶质瘤微生物的分布、丰度、种类, 对理解胶质瘤发生发展的过程和机制至关重要. 如果某些微生物经常性地存在于胶质瘤内部和微环境中, 那么它们可能在调节胶质瘤的生物学活动中发挥关键作用. 我们期待微生物组和胶质瘤的关联研究能够转化为实际应用, 例如加速胶质瘤的诊断预防, 提高经典疗法效果并降低治疗毒性, 最终实现通过微生物助力免疫疗法治疗恶性脑肿瘤.

参考文献

- 1 Ostrom Q T, Gittleman H, Farah P, et al. CBTRUS statistical report: Primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2006-2010. *Neuro Oncol*, 2013, 15: ii1-ii56
- 2 Zhang J W, Fan W H, Fang S, et al. Effect of knockdown of eIF4A1 by shRNA on the biological characteristics of glioma cells (in Chinese). *Sci Sin Vitae*, 2019, 49: 987-995 [张俊文, 范文华, 方胜, 等. shRNA干扰eIF4A1基因对胶质瘤细胞体内外生物学特征的影响. 中国科学: 生命科学, 2019, 49: 987-995]
- 3 Fang S, Zhang J W, Dong C Y, et al. P4HA1 regulates EMT to affect glioma invasion (in Chinese). *Sci Sin Vitae*, 2020, 50: 446-457 [方胜, 张俊

文, 董程远, 等. P4HA1调控EMT影响脑胶质瘤侵袭性研究. 中国科学: 生命科学, 2020, 50: 446–457]

- 4 Brada M, Hoang-Xuan K, Rampling R, et al. Multicenter phase II trial of temozolomide in patients with glioblastoma multiforme at first relapse. *Ann Oncol*, 2001, 12: 259–266
- 5 Vogtmann E, Goedert J J. Epidemiologic studies of the human microbiome and cancer. *Br J Cancer*, 2016, 114: 237–242
- 6 Helmink B A, Khan M A W, Hermann A, et al. The microbiome, cancer, and cancer therapy. *Nat Med*, 2019, 25: 377–388
- 7 Sarid R, Gao S J. Viruses and human cancer: from detection to causality. *Cancer Lett*, 2011, 305: 218–227
- 8 Kim S S, Ruiz V E, Carroll J D, et al. Helicobacter pylori in the pathogenesis of gastric cancer and gastric lymphoma. *Cancer Lett*, 2011, 305: 228–238
- 9 Robinson K M, Dunning Hotopp J C. Mobile elements and viral integrations prompt considerations for bacterial DNA integration as a novel carcinogen. *Cancer Lett*, 2014, 352: 137–144
- 10 Lax A J, Thomas W. How bacteria could cause cancer: one step at a time. *Trends Microbiol*, 2002, 10: 293–299
- 11 Rhee S H, Pothoulakis C, Mayer E A. Principles and clinical implications of the brain-gut-enteric microbiota axis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2009, 6: 306–314
- 12 Carabotti M, Scirocco A, Maselli M A, et al. The gut-brain axis: interactions between enteric microbiota, central and enteric nervous systems. *Ann Gastroenterol*, 2015, 28: 203–209
- 13 Foster J A. Gut feelings: bacteria and the brain. *Cerebrum*, 2013, 2013: 9
- 14 Roberts R C, Farmer C B, Walker C K. The human brain microbiome; there are bacteria in our brains! In: Neuroscience Meeting Planner. San Diego, CA: Society for Neuroscience. 2018
- 15 Rothhammer V, Borucki D M, Tjon E C, et al. Microglial control of astrocytes in response to microbial metabolites. *Nature*, 2018, 557: 724–728
- 16 Cheng S C, Wang X P, Yu L. Recent progress in convergent molecular evolution of animals based on multi-omics studies (in Chinese). *Sci Sin Vitae*, 2019, 49: 874–887 [程绍臣, 王晓萍, 于黎. 基于多组学水平的动物分子趋同演化研究新进展. 中国科学: 生命科学, 2019, 49: 874–887]
- 17 Sheflin A M, Whitney A K, Weir T L. Cancer-promoting effects of microbial dysbiosis. *Curr Oncol Rep*, 2014, 16: 406
- 18 Brennan C A, Garrett W S. Gut microbiota, inflammation, and colorectal cancer. *Annu Rev Microbiol*, 2016, 70: 395–411
- 19 Robinson K M, Crabtree J, Mattick J S A, et al. Distinguishing potential bacteria-tumor associations from contamination in a secondary data analysis of public cancer genome sequence data. *Microbiome*, 2017, 5: 9
- 20 Lu S Y, Yan T T, Guo F F, et al. Interleukin-22 and *Fusobacterium nucleatum* cooperate in promoting colorectal cancer (in Chinese). *Sci Sin Vitae*, 2018, 48: 684–691 [陆诗媛, 严婷婷, 郭方方, 等. 白介素-22与具核梭杆菌在结直肠癌发生发展中的协同作用. 中国科学: 生命科学, 2018, 48: 684–691]
- 21 Yang L, Liang X J. Advances in the study of intestinal microecology and colorectal cancer (in Chinese). *Chin J Clin Oncol*, 2018, 45: 1239–1242 [杨柳, 梁新军. 肠道菌群微生态与结直肠癌的研究进展. 中国肿瘤临床, 2018, 45: 1239–1242]
- 22 Shao D T, Wei W Q. Progress in research of human microbiota for upper gastrointestinal tumors and precancerous lesions (in Chinese). *Chin J Epidemiol*, 2018, 39: 382–386 [邵丹彤, 魏文强. 上消化道癌及其癌前病变微生物菌群研究进展. 中华流行病学杂志, 2018, 39: 382–386]
- 23 Rojas-Peña M L, Vallejo A, Herrera S, et al. Transcription profiling of malaria-naïve and semi-immune colombian volunteers in a *Plasmodium vivax* sporozoite challenge. *PLoS Negl Trop Dis*, 2015, 9: e0003978
- 24 Racle J, de Jonge K, Baumgaertner P, et al. Simultaneous enumeration of cancer and immune cell types from bulk tumor gene expression data. *eLife*, 2017, 6: e26476
- 25 Wang L N, Zheng G G. Role of tumor-associated macrophages in hematological malignancies (in Chinese). *Sci Sin Vitae*, 2017, 47: 1264–1271 [王丽娜, 郑国光. 血液系统恶性疾病中巨噬细胞的研究进展. 中国科学: 生命科学, 2017, 47: 1264–1271]
- 26 Engler J R, Robinson A E, Smirnov I, et al. Increased microglia/macrophage gene expression in a subset of adult and pediatric astrocytomas. *PLoS ONE*, 2012, 7: e43339
- 27 Gabrusiewicz K, Rodriguez B, Wei J, et al. Glioblastoma-infiltrated innate immune cells resemble M0 macrophage phenotype. *JCI Insight*, 2016, 1
- 28 Ye X, Xu S, Xin Y, et al. Tumor-associated microglia/macrophages enhance the invasion of glioma stem-like cells via TGF- β 1 signaling pathway. *J Immunol*, 2012, 189: 444–453
- 29 Jho D H, Spiliopoulos K, Stein T D, et al. Concomitant presentation of a glioblastoma multiforme with superimposed abscess. *World Neurosurg*,

2011, 75: 126–131

- 30 Liu P Y, Tsuei Y S, Shi Z Y. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* brain abscess. *J Neurosurg*, 2010, 112: 216; author reply 216-7
- 31 Bhatti M D, Kalia A, Sahasrabhojane P, et al. Identification and whole genome sequencing of the first case of *Kosakonia radicincitans* causing a human bloodstream infection. *Front Microbiol*, 2017, 8: 62

The microbiota in human glioma and its association with immune microenvironment

HU HongRong¹, LIANG QiaoXing², YANG Qing¹, WANG YiHui¹, WANG JiangHuang¹, LI Cong¹,
WEI Lai² & LI Bo¹

1 Department of Biochemistry and Molecular Biology, Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China;
2 State Key Laboratory of Ophthalmology, Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510060, China

Gliomas are the most common primary malignant brain tumors, with grim prognosis and poor patient survival. Gliomas frequently recur, and are notoriously resistant to radiation and chemotherapy. Microbiota may play a role in the resistance development through modulating inflammatory responses in the central nervous system, yet the detailed mechanisms involved are poorly understood. To explore this issue, we performed transcriptomic and metagenomic sequencing analyses in biopsies of multiple tumor and adjacent normal tissues collected from two glioma patients. We identified a group of microbes in the glioma tissues exhibiting strong preferences for different types of immune cells in the tumor microenvironment, which may correlate with glioma carcinogenesis and progression. Moreover, to our knowledge, these findings for the first time thoroughly define the microbiota distribution within intracranial tumors, revealing different bacterial abundance in tumors and adjacent normal counterparts. These results may help us better understand how microbiota are involved in the tumor microenvironment and contribute to glioma chemoresistance. We are looking forward to the development of novel bacteria-based therapies for this malignancy, either singly or in combination with modern immunotherapeutics.

metagenomics, glioma, microbiota, immune microenvironment

doi: [10.1360/SSV-2020-0029](https://doi.org/10.1360/SSV-2020-0029)