



专论与综述

结直肠癌相关致病菌的研究进展

张书铭 柳陈坚 吴边 李晓然*

昆明理工大学生命科学与技术学院 云南 昆明 650501

摘要: 肠道微生物群落与结直肠癌(Colorectal Cancer, CRC)有着十分密切的关系。肠道微生物的群落变化可能会伴随着 CRC 的发生,而一些有害菌的出现可能是导致 CRC 的直接原因。其中,具核梭杆菌(*Fusobacterium nucleatum*)、产肠毒素脆弱拟杆菌(*Enterotoxigenic Bacteroides fragilis*, ETBF)和 *pks* 阳性大肠杆菌(*pks*⁺ *Escherichia coli*)与 CRC 的发生最密切。本综述着重介绍了 *pks*⁺ *E. coli* 及 Colibactin 的致病原因、对肠道微生物组成的影响、Colibactin 的合成及怎样抑制或促进 *pks*⁺ *E. coli*。同时也对 ETBF 和 *F. nucleatum* 可能的致癌原因、对肠道微生物组成的影响及对二者的促进或抑制做出了介绍。

关键词: 肠道微生物群落, 结直肠癌, *pks* 阳性大肠杆菌, 脆弱拟杆菌, 具核梭杆菌

Research progress of colorectal cancer related pathogens bacteria

ZHANG Shuming LIU Chenjian WU Bian LI Xiaoran*

Faculty of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming, Yunnan 650501, China

Abstract: Intestinal microbiota is closely related to colorectal cancer (CRC). The change of intestinal microbial community may be accompanied by the occurrence of CRC, and the emergence of some harmful bacteria may be the direct cause of CRC. Among them, *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*), enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* (ETBF) and *pks*⁺ *Escherichia coli* (*pks*⁺ *E. coli*) were most closely associated with CRC. This review focuses on the pathogenic causes of *pks*⁺ *E. coli* and colibactin, the effects on intestinal microbial composition, the synthesis of colibactin and how to inhibit or promote *pks*⁺ *E. coli*. At the same time, the possible carcinogenic causes of ETBF and *F. nucleatum*, their effects on intestinal microbial composition and their promotion or inhibition were also introduced.

Keywords: intestinal microflora, colorectal cancer, *pks*⁺ *Escherichia coli*, *Bacteroides fragilis*, *Fusobacterium nucleatum*

结直肠癌(Colorectal Cancer, CRC)包括结肠癌和直肠癌,发生在人体下消化道结肠或直肠部位,是一种从结肠和直肠的腺上皮细胞发展而来的恶

性肿瘤。肿瘤发生早期可能无明显症状,但随着病情的发展,病人会出现排便习惯改变、大便性状异常、排便困难、腹部肿块、腹痛、贫血及体重

Foundation item: Project of Department of Science and Technology of Yunnan Province (2018FE001(-110))

*Corresponding author: E-mail: starkeyran@163.com

Received: 15-04-2021; **Accepted:** 20-05-2021; **Published online:** 23-06-2021

基金项目: 云南省科技厅项目(2018FE001(-110))

*通信作者: E-mail: starkeyran@163.com

收稿日期: 2021-04-15; 接受日期: 2021-05-20; 网络首发日期: 2021-06-23

减轻、低热、乏力等症状。根据世界卫生组织国际癌症研究机构(International Agency for Research on Cancer, IARC)在 2020 年发布的数据表明, CRC 已成为仅次于肺癌的全球第二大癌症。此外, 疾病史和家族史是 CRC 早期诊断的重要因素。CRC 的发病可能与溃疡性结肠炎、结直肠息肉、结直肠腺瘤、克罗恩病、血吸虫病等疾病相关。由此可见, CRC 已经对我国乃至世界人民的身体健康造成相当大的危害^[1]。一直以来, 人们认为引发 CRC 的主要原因归结于高脂饮食和家族遗传病史, 但随着研究的不断深入, 发现 CRC 与人肠道微生物的组成有着十分密切的联系。

1 人类肠道微生物的组成以及对 CRC 的影响

人类肠道微生物中既有对宿主健康有益的益生菌, 也有对宿主健康有害的致病菌。根据对人类粪便样本的分析发现: 人类肠道微生物主要由 5 种菌门组成, 包括厚壁菌门(*Firmicutes*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、放线菌门(*Actinobacteria*)、变形杆菌门(*Proteobacteria*)和梭杆菌门(*Fusobacteria*)^[2]。肠道中乳杆菌、双歧杆菌等为益生菌, 然而放线菌(*Actinomyces*)、奇异菌(*Atopobium*)、梭杆菌(*Fusobacterium*)、嗜血杆菌属(*Haemophilus*)及脆弱拟杆菌(*Bacteroides fragilis*)、戈登链球菌(*Streptococcus gordonii*)等有害菌在健康人的肠道中基本检测不到, 并与 CRC 有明显联系^[2]。

近些年来, 有关肠道微生物区系对 CRC 影响的研究急剧增多。这也证实了肠道微生物区系与 CRC 的发生和发展密切相关^[3]。肠道微生物区系可能通过 3 条主要途径造成宿主癌症风险: 改变宿主细胞的增殖或翻转; 影响免疫功能; 代谢摄入和宿主衍生的产物^[4]。然而肠道微生物区系可以通过改变免疫反应、上皮止血、代谢特征和活性、DNA 损伤以及结肠细胞中不规则的细胞和分子活动等诱发癌变^[3,5-6]。结肠息肉尤其是腺瘤性息肉是结肠癌前病变的指征之一。本课题组采用基

于 16S rRNA 基因的高通量测序技术, 对收集自云南省第一人民医院结肠息肉患者粪便样品的细菌群落结构进行分析研究, 发现不同患者粪便样品微生物群落具有较大差异, 其中拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、厚壁菌门(*Firmicutes*)及变形菌门(*Proteobacteria*)所占比例较高; 在科的水平上, 拟杆菌科(*Bacteroidaceae*)、毛螺菌科(*Lachnospiraceae*)、瘤胃菌科(*Ruminaceae*)及肠杆菌科(*Enterobacteriaceae*)占比较高; 在属的水平上, 所占比例较高的菌属为拟杆菌属(*Bacteroides*)、*Clostridium* XI Va、*Lachnospiraceae* 科未分类属及粪杆菌属(*Faecalibacterium*); 部分结肠息肉患者肠道细菌组成与健康人群存在较大差异, 所以我们认为分析结肠息肉患者肠道微生物群落组成有利于发现早期癌症病变指征, 为建立无创早期肿瘤诊断方法提供依据^[7]。之后又对患者手术前后细菌组成的变化以及癌组织和邻近正常组织之间细菌群落结构的差异进行了评价, 发现癌组织和癌旁正常组织的细菌组成相似, 手术前后患者粪便的细菌组成存在差异, 在菌门水平上, 从患者术前粪便中共鉴定出 10 种不同的菌门, 而术后从粪便中发现 15 种不同的菌门; 这可能是因为每位患者的遗传基因、饮食习惯和健康状况不同, 从而导致他们形成了具有自己特征的肠道细菌群落。Principal Component Analysis (PCA)表明, 手术后所有患者粪便中的细菌群落结构相似^[8]。

目前主要有 3 种细菌与 CRC 的发生有关, 并在 CRC 的发生过程中发挥潜在作用而备受关注。这 3 种细菌分别为具核梭杆菌(*Fusobacterium nucleatum*)、产肠毒素脆弱拟杆菌(*Enterotoxigenic Bacteroides fragilis*, ETBF)和 *pks*⁺ 阳性大肠杆菌(*pks*⁺ *Escherichia coli*)^[6]。

2 *pks*⁺ *E. coli* 对 CRC 的影响

2.1 *pks*⁺ *E. coli* 的致癌原因

在健康人中约 20%携带 *pks*⁺ *E. coli*, 炎症性肠病患者中约 40%携带 *pks*⁺ *E. coli*, 家族性腺瘤性息

肉病和 CRC 患者中约 60% 携带 *pks*⁺ *E. coli*。*pks*⁺ *E. coli* 具有 54 kb 的 *pks* 基因岛, 其主要存在于 B2 系的大肠杆菌中。*pks*⁺ *E. coli* 能够产生 Colibactin 毒素, *pks* 基因岛编码聚酮合成酶和非核糖体肽合成酶, 而它们是 Colibactin 毒素合成所必需的^[9-10]。*pks*⁺ *E. coli* 可在肠道中定殖, 并且与健康人相比在 CRC 患者中更常见。*pks*⁺ *E. coli* 无论是在体外还是体内都会使宿主细胞的 DNA 双链断裂, 导致 G1-S 和 G2-M 细胞周期停止。与 DNA 双链断裂所对应的是组蛋白 H₂AX 和细胞周期检查点激酶 2 (Cell Cycle Checkpoint Kinase 2, CHK2) 被共济失调毛细血管扩张突变基因 (Ataxia Telangiectasia-Mutated Gene, ATM) 磷酸化; 然后 CHK2 磷酸化抑制细胞分裂周期蛋白 25C (Cell Division Cycle 25C, CDC25C), 而 CDC25C 对于 G2-M 期细胞周期蛋白依赖性激酶 1 (Cyclin-Dependent Kinase 1, CDK1) 的激活是必需的。CDK 的作用是驱动细胞周期的进行, 所以会出现 G2-M 细胞周期停滞。ATM 会激活 P35 及其下游因子 P21, P21 会抑制 CDK2 从而导致 G1-S 期的停止。然而被少量细菌感染会导致细胞周期的短暂停滞和 DNA 不完全修复, 结果导致基因突变率升高和染色体不稳定。当高感染复数感染 (Multiplicity of Infection, MOI) 时细胞会出现衰老表型。衰老相关分泌表型 (Senescence-Associated Secretory Phenotype, SASP) 的衰老细胞开始分泌生长因子, 刺激未感染的邻近细胞增殖。其中一个因素是肝细胞生长因子 (Hepatocyte Growth Factor, HGF), 其能诱导细胞增殖, 并有助于肿瘤的生长。HGF 和 HGF 受体都与 CRC 有关。*pks*⁺ *E. coli* 能够促进由偶氮甲烷/右旋糖酐硫酸钠 (AOM/DSS) 导致的 CRC 小鼠模型, 这与 HGF mRNA 和 HGF 受体磷酸化水平的增加有关; 潜在的机制涉及 microRNA-20a-5p, 其以 SENP1 为靶标, SENP1 是调节 p53 去小泛素相关修饰物 (Small Ubiquitin-Related Modifier, SUMO) 的关键蛋白^[10]。

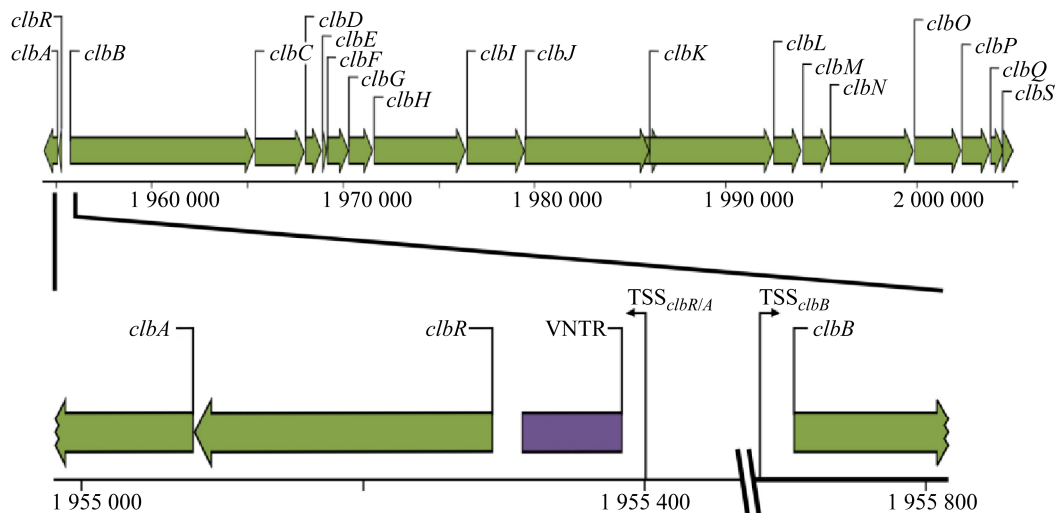
在 *pks*⁺ *E. coli* 作用下的哺乳动物细胞中会形成 Colibactin 腺嘌呤加合物。Colibactin 与 DNA 之间的反应已分析出 50 多种可识别的突变特征 (单个碱基替换的碱基、表征插入和删除等)^[11]。在最新的研究中发现, 通过在 5 个月内反复进行腔内注射, 将人类肠道类器官暴露于具有遗传毒性的 *pks*⁺ *E. coli*, 暴露前后的克隆类器官的全基因组测序揭示了独特的突变特征, 而等位性 *pks* 突变细菌注射的类器官无此突变特征。在 2 个独立队列的 5 876 个人类癌症基因组 (主要是在 CRC) 的子集中检测到了相同的突变特征, 从而证明了肠道中 *pks*⁺ *E. coli* 会致癌^[12]。

2.2 Colibactin 对肠道微生物的影响

现已有研究发现根据垂直母婴传播方案, 在小鼠出生第 15 天和第 35 天检测 Colibactin 对肠道微生物区系的影响发现, 第 15 天时带有遗传毒性大肠杆菌菌株的小鼠中, 变形杆菌门 (*Proteobacteria*) 和所有其他相关类群的丰度都显著低于对照组, 总体肠道微生物区系多样性未受到影响。总而言之, 大肠杆菌的基因毒性活动对肠道微生物区系产生了种类上的影响而不是功能上的影响。第 35 天时具有遗传毒性大肠杆菌菌株的感染与泽泻属 (*Alistipes*) 和理研菌科 (*Rikenellaceae*) 的相对丰度较高有关, 厚壁菌门 (*Firmicutes*) 和所有其他相关类群的丰度显著低于对照组。总体来说出生后 35 d 大肠杆菌的基因毒性活性在分类和功能水平上都对肠道微生物区系产生了深刻的影响, 并对肠道微生物区系产生了种间影响^[13]。

2.3 Colibactin 的合成及其各基因的作用

Colibactin 基因簇的编码基因从 *clbB* 开始到 *clbS* 结束, 调控基因为 *clbA* 和 *clbR* (图 1)^[14]。Colibactin 的生物合成是通过 *clbA* 激活非核糖体肽合成酶和聚酮合成酶开始的, 环丙烷 (C₃H₃) 的形成与 *clbH* 和 *clbI* 密切相关^[15-16], 而环丙烷是 Colibactin 诱导 DNA 烷基化的关键^[17]。*clbD-G* 酶负责合成和附着罕见的 *pks* 衍生物氨基丙二酰基

图1 *pks* 基因岛组成^[14]Figure 1 Construction of *pks* island^[14]

单位(Amino Malonyl, AM)^[18-19]。*clbG* 识别 AM 并将其传输到 *clbK*, *clbK* 将 AM 并入 Colibactin^[20]。*clbG* 可以将 AM 转移到 *clbC*、*clbK*、*clbO*、*clbI* 等多种酶上, 这表明 AM 可以不止一次被整合到 Colibactin^[18,20]。*clbR* 参与了 *pks* 基因岛转录的调控是 Colibactin 基因表达的转录激活因子。*clbR* 的表达直接受到铁离子供应的影响。*clbR* 和 *clbB* 之间具有数目可变串联重复序列(Variable Numbers of Tandem Repeats, VNTR)区域。VNTR 区域的大小会调节 *clbR* 的表达。*clbS* 是一种环丙烷水解酶, 通过打开其亲电的环丙烷环来增强对大肠菌素的抗性。*clbS* 以非特异性方式结合双链 DNA (Double-Stranded DNA, dsDNA) 和单链 DNA (Single-Stranded DNA, ssDNA), *clbS* 与 ssDNA 的亲合力大约是 dsDNA 的 40 倍。*clbS* 保护 DNA 免受脱氧核糖核酸酶的影响^[21]。

2.4 促进或抑制 *pks*⁺ *E. coli* 及 Colibactin

通过抑制 *pks*⁺ *E. coli* 及其产生的基因毒素 Colibactin 是当前治疗 CRC 的思路之一。现在已知的调节细菌铁离子稳态的 2 个主要调节因子——铁离子摄取调节因子(Fur)和小非编码 RNA-RyhB, 参与了 *clbA* 转录和 Colibactin 产生的调节。高铁离子通过依赖和独立于 Fur/RyhB 这 2 种途径, 抑制

clbA 的转录并导致 Colibactin 的合成减少^[22]。然而菊粉和低聚半乳糖则会增强 Colibactin 中 *clbA* 的表达, 从而促进 Colibactin 的表达, 并且低聚半乳糖还会使其细胞毒性增加^[23]。

现有研究表明肉桂醛和肉桂提取物对大肠杆菌 *clbB* 基因表达有抑制作用^[24]。*clbB* 基因是产生 Colibactin 的关键酶之一, 而多聚磷酸激酶 (Polyphosphate Kinase, PPK) 是 *clbB* 启动子活性和 Colibactin 产生所必需的, 这说明 PPK 是开发抗肿瘤蛋白和抗毒力策略的一个有前途的靶点^[25]。

在 Colibactin 中 *clbQ* 的缺失被证明可以消除 Colibactin 的细胞毒性^[26-27]。当 *clbR* 过表达后 Colibactin 的产量显著增加, 而 *clbR* 缺失则 Colibactin 不会表达; *clbR* 是 Colibactin 决定簇的特定关键转录调控因子, Colibactin 的产生在功能上与特定氨基酸和次生代谢物的生物合成或代谢途径有关^[14]。缺少 AM 生物合成机制任何成分的 *pks*⁺ *E. coli* 突变株不具有遗传毒性, 这表明 AM 的掺入对于构建具有遗传毒性的代谢物至关重要。

如今已经发现许多可以促进 *pks*⁺ *E. coli* 定殖和增加其遗传毒性的物质。例如: 脱氧雪腐镰刀菌烯醇(Deoxynivalenol, DON)是欧洲与北美污染食物的主要真菌毒素, 现发现 DON 会使 *pks*⁺ *E. coli*

的遗传毒性加剧^[28]。肝螺杆菌感染可促进 *pks*⁺ *E. coli* 在小鼠下肠粘膜的定殖^[29]。ETBF 亚型的脆弱拟杆菌与 *pks*⁺ *E. coli* 联合作用会促进 *pks*⁺ *E. coli* 定殖, ETBF 会产生脆弱拟杆菌肠毒素(*Bacteroides fragilis* Enterotoxin, BFT)导致产生了大量的白介素 17 (IL-17)诱导炎症产生, 使得 *pks*⁺ *E. coli* 更易定殖, 从而促进遗传性 CRC 的发生^[30-31]。然而从榄仁树、番石榴、仙都果等植物中提取出的丹宁酸、槲皮素可以抑制 *E. coli* ATCC-25922 产生的 Colibactin, 这些植物提取物和化合物会下调 Colibactin 生物合成所需的 5 个基因(*clbA*、*clbB*、*clbM*、*clbN* 和 *clbP*)的表达^[32], 并且在 *pks*⁺ *E. coli* 感染上皮细胞的过程中加入外源细菌或哺乳动物 DNA 可以保护细胞免受大肠杆菌的遗传毒性。

3 产肠毒素脆弱拟杆菌(*Enterotoxigenic Bacteroides fragilis*, ETBF)与 CRC

3.1 ETBF 可能致癌的原因

ETBF 亚型的脆弱拟杆菌可以产生脆弱拟杆菌毒素(BFT), 可能通过调节粘膜免疫应答和诱导上皮细胞改变而参与 CRC 的发生发展。已有研究表明粪便或结肠活检标本中 ETBF 的存在与活动性炎症性肠病和结直肠癌显著相关^[33-34]。BFT 是依赖锌的金属蛋白酶, 其能裂解细胞表面蛋白上皮细胞钙黏蛋白的胞外区, 导致上皮细胞钙黏蛋白的完全降解; 上皮细胞钙黏蛋白的胞质结构域与核信号蛋白 β -连环蛋白相关, 上皮细胞钙黏蛋白的丢失触发了 β -连环蛋白核信号, 诱导原癌基因表达^[35]。同时 BFT 还会导致 NF- κ B 信号转导增强、DNA 与上皮屏障的损伤以及 STAT3/Th17 免疫反应的激活。因此, ETBF 长期定殖于结肠上皮细胞可能增加患 CRC 的风险。以往的研究表明, CRC 晚期(III/IV 期)肿瘤和粪便标本中 ETBF 水平明显高于正常组织。

3.2 ETBF 的检出率及对肠道微生物的影响

对 60 例患有 CRC 的患者和 60 例健康人的粪便进行检测, 发现 ETBF 在 CRC 和对照组中的检

出率分别为 58.3%和 26.6%, CRC 患者 BFT 基因频率明显高于对照组; III期大肠癌患者 BFT 基因阳性率明显高于 I、II 期患者^[36]。在门水平上, 被 ETBF 定殖后的 AOM/DSS 小鼠模型的肠道微生物群落中疣微菌门(*Verrucomicrobia*)的占比明显升高, 出现少量拟杆菌门(*Bacteroidetes*), 对照组则未检测到拟杆菌门; 在科的水平上重点分析了毛螺菌科(*Lachnospiraceae*)、肠杆菌科(*Enterobacteriaceae*)、阿克曼藻科(*Ackermanniaceae*)和拟杆菌科(*Bacteroidaceae*), 与对照组相比乳杆菌科和阿克曼藻科发生了明显的变化, 乳杆菌科大幅减少而阿克曼藻科明显增加; 在属和种的水平上梭状芽胞杆菌 g24 (*Clostridia* g24)的占比有所下降; ETBF 定殖后出现了对照组没有的菌株, 增加了肠道微生物群落的多样性^[37]。

3.3 促进或抑制 ETBF

被 ETBF 定殖的特点是调节性 T 细胞(Tregs)和 IL17⁺T 细胞聚集在 ETBF 肿瘤发生的主要部位远端结肠。抑制 ETBF 诱导的结肠肿瘤的发生依赖于 IL17 炎症的减少, IL2 阻断可恢复 Treg 耗竭动物的 Th17 反应和肿瘤形成, Treg 限制了 IL2 在局部微环境中的可获得性, 允许 Th17 的发展会促进 ETBF 引发的肿瘤^[38]。高盐饮食(High Salt Diet, HSD)可以通过抑制结直肠炎症降低 ETBF 诱导的肿瘤生成, 小鼠体内 4%的 HSD 与人类摄入的 HSD 相似, 因此在研究中使用了 4% NaCl (4% HSD)和 8% NaCl (8% HSD), 发现服用 HSD 的 ETBF 感染小鼠体重减轻、脾脏肿大、结肠炎症减轻, 并且被 ETBF 感染小鼠的结肠组织中 IL-17A 和诱导型一氧化氮合酶(Inducible Nitricoxide Synthase, iNOS)的表达显著降低, HSD 通过抑制 IL-17A 和 iNOS 在结肠中的表达来降低 ETBF 诱导的肿瘤发生, 还会抑制 ETBF 感染 AOM/DSS 小鼠的结肠息肉数量^[39]。丁酸梭菌(*C. butyricum*)无细胞上清液(Cell Free Supernatant, CFS)对 ETBF 的生长起抑制作用; 丁酸梭菌的无细胞上清液显著下调了 ETBF

的毒力相关基因 *ompA* 和 *bmeB3* 的表达。所以丁酸杆菌可作为生物治疗剂使用,其机制是通过抑制 ETBF 的生长和生物被膜来达到治疗作用^[40]。

球姜酮(Zerumbone)不仅影响肠道微生物多样性和丰富度,还有助于促进肠道微生物组成的平衡,其显著降低了疾病活动指数(Disease Activity Index, DAI)评分及结肠炎症的几个参数,即结肠重量、结肠长度、盲肠重量和脾脏重量。现已经证明了球姜酮可以恢复被 ETBF 定殖 AOM/DSS 小鼠肠道微生物区系的组成,结肠和盲肠的炎症及增生也有所减轻;采用结晶紫生物膜法发现球姜酮对 ETBF 生物膜起抑制作用且呈浓度依赖性,并在转录水平上对外排泵基因具有抗菌作用,显著抑制了 *bmeB12* 的表达水平;球姜酮可显著抑制结肠息肉的数量并阻止大腺瘤的进展^[41]。球姜酮可作为一种很有前途的保护剂、抗菌药物,用于治疗 and 预防 ETBF 引起的生物被膜相关感染和对抗 ETBF 介导的 CRC^[37,41-42]。

4 具核梭杆菌(*Fusobacterium nucleatum*, *F. nucleatum*)与 CRC

4.1 *F. nucleatum* 可能致癌的原因

尽管具核梭杆菌在结直肠癌发生发展中的病原学作用已被阐明,但其诱导结直肠癌发生发展的特异性肿瘤分子尚不清楚。*F. nucleatum* 可引起炎症反应,损害 T 细胞介导的抗肿瘤免疫反应,促进肿瘤细胞增殖^[43]。TLR2、IL1B、IL6、IL8、miR-34a 和 miR-135b 在 CRC 肿瘤中的表达明显高于正常组织,在 CRC 样本中只有 2 个 miR-22 和 miR-28 的转录物被完全下调,IL1B、IL6、IL8 和 miR-22 的 mRNA 表达与 CRC 中 *F. nucleatum* 的定量呈正相关,miR-135b 的 mRNA 表达与 TNF 呈负相关^[44]。根据宏基因组分析表明,CRC 组织中富含 *F. nucleatum*,许多研究表明 *F. nucleatum* 与 CRC 的发生密切相关。已知的 *F. nucleatum* 毒力因子通过 FadA 和 Fap2 促进肠上皮细胞粘附,Fap2 还与免疫细胞结合导致免疫抑制。此外,*F. nucleatum* 招募

肿瘤浸润的免疫细胞,从而产生促炎症微环境,促进结直肠肿瘤的进展。*F. nucleatum* 还会通过介导 miRNA-18a、miRNA-4802 和自噬成分的分子网络增加 CRC 复发和化疗耐药^[45-46]。研究还表明 CRC 组织中的 *F. nucleatum* 与近端肿瘤位置、微卫星不稳定性、CpG 岛甲基化表型、肿瘤浸润性 CD3⁺ 细胞水平较低以及患者预后不良有关^[47]。与癌旁组织相比,miR-4474 和 miR-4717 在结直肠癌组织中表达上调,而 CREB 结合蛋白(cAMP-Response Element Binding Protein, CREBBP)、Signal Transducer and Activator of Transcription 1 (STAT1)、Protein Kinase cAMP- Dependent Catalytic Beta (PRKACB)、CAMKII BETA (CAMK2B)、JUN、Tumor Protein P53 (TP53)和 EWS RNA Binding Protein 1 (EWSR1)等与肿瘤信号通路相关的基因表达异常。生物信息学分析证实 CREBBP 是 *F. nucleatum* 诱导的结直肠癌中主要的异常表达基因。实时荧光定量 PCR (RT-qPCR)分析结果与芯片分析结果一致。此外,CREBBP 被确定为 miR-4474/4717 的一个新靶点,miR-4474 和 miR-4717 可能通过转录后调控靶基因 CREBBP 参与 *F. nucleatum* 诱导的结直肠癌的发生发展^[48]。

现有研究发现在结直肠癌发育的各个阶段,*F. nucleatum* 与肿瘤抑制基因(Tumor Suppressor Gene, TSG)启动子甲基化的相关性很高。此外,*F. nucleatum* 较高的丰度与较高的 TSG 启动子甲基化水平相关。*F. nucleatum* 与 Metastasis Suppressor Gene (MTSS1)、RNA-Binding Motif Protein 38 (RBM38)、Protein Kinase D 1 (PKD1)和 Protein Tyrosine Phosphatase Receptor Type T (PTPRT)的甲基化有关,并且 *F. nucleatum* 会提高结直肠细胞 DNA 甲基转移酶(DNA Methyltransferase, DNMT)的表达与活性^[49]。

4.2 *F. nucleatum* 的检出率及对肠道微生物组成和预后的影响

F. nucleatum 在 CRC 患者中检出率为 72.1%。肿瘤内 *F. nucleatum* 通过增加神经侵犯、血管癌栓

和微卫星突变对 CRC 预后影响很大^[50]。使用 qPCR 检测 101 例 CRC 患者癌组织和癌旁正常组织中的 *F. nucleatum*, 发现 CRC 组织中 *F. nucleatum* 检出率明显高于正常组织^[51]。从青岛地区收集 180 例大肠癌 I-IV 期患者肿瘤标本 16S rRNA 基因 V4 区扩增子文库, 将患者分为死亡组、复发组、存活组和未知组, 发现复发组中 *F. nucleatum* 的丰度高于存活组, 并且高丰度的 *F. nucleatum* 与更差的浸润深度显著相关; 在有无复发的 CRC 患者中, 肿瘤组织中 *F. nucleatum* 的丰度明显高于癌旁组织; CRC 复发患者肿瘤组织中 *F. nucleatum* 的丰度明显高于无复发患者, 说明 *F. nucleatum* 水平越高, 复发概率越高^[51]。许多研究还表明, *F. nucleatum* 是干扰 CRC 进展的潜在治疗靶点: *F. nucleatum* 的高丰度主要与 CRC 的 IV 期有关, 而与 I-III 期的 CRC 相关性较差^[52]。越来越多的证据表明 *F. nucleatum* 在 CRC 的发生和预后中起作用。通过评估 *F. nucleatum* 与 CRC 诊断后生存率的关系, 评估 *F. nucleatum* 作为预后生物标志物的价值。采用 qPCR 技术检测了相邻非恶性肿瘤和结直肠肿瘤组织中的 *F. nucleatum* DNA 拷贝, 应用 Cox 比例风险模型评估 *F. nucleatum*-DNA 与总生存率之间的关系, 并调整关键的混杂因素; 结直肠肿瘤组织中高水平的 *F. nucleatum* 水平与总生存率相关, 然而, 纳入 *F. nucleatum* 风险预测模型并不能提高识别患者死亡的能力^[51]。也有研究者指出, 在 CRC 患者中, *F. nucleatum* 的增加与较差的预后相关, 但作为预后生物标志物的临床相关性可能有限^[52]。

F. nucleatum 的定殖还通过增加小鼠体内的软壁菌门(*Tenericutes*)和疣微菌门(*Verrucomicrobia*)显著改变了管腔的微生物结构^[53]。有研究将 *F. nucleatum* 灌入 APCMin/+小鼠的肠道中, 发现会提高卡特菌(*Catabacter*)、真杆菌群(*Eubacterium-brachy-group*)、肠杆菌(*Enterobacter*)、瘤胃梭菌-6(*Ruminiclostridium-6*)的丰度, 相反地, *F. nucleatum*

使 *Butyricicoccus*、*Norank-Flavobacteriaceae*、*Ruminococcaceae*-UCG-009 的丰度降低^[54]。

4.3 抑制 *F. nucleatum*

F. nucleatum 定殖可能激活 JAK/STAT 和 MAPK/ERK 通路。小檗碱(Berberine, BBR)通过抑制 JAK/STAT 和 MAPK 信号通路的激活, 从而阻断了 *F. nucleatum* 诱导的小鼠结直肠肿瘤形成。BBR 对 CRC 的干预显著阻断了 *F. nucleatum* 引起的患者肠道微生物群失衡。*F. nucleatum* 通过调节小鼠肿瘤免疫微环境而促进肠道肿瘤的发生, 给小鼠灌入 *F. nucleatum* 后, IL-17F/21/22/23/31 和 CD40L 的水平增加, 表明 *F. nucleatum* 的定殖刺激了免疫细胞因子的分泌, 而 BBR 干预后, 小鼠 IL-21/22/31 和 CD40L 的分泌减少; 此外, 通过 BBR 处理, *F. nucleatum* 诱导的小鼠 p-stat3、p-stat5 和 p-ERK1/2 表达的增加显著减少, 表明 BBR 处理显著阻断了 *F. nucleatum* 诱导的 JAK/STAT 和 MAPK/ERK 通路的激活^[53]。

最新的研究发现, 通过给小鼠喂二甲双胍, 小鼠肿瘤细胞的增殖会减少, Ki-67⁺细胞比例降低。二甲双胍可以逆转由 *F. nucleatum* 诱导的肿瘤发生, 并且能够逆转由 *F. nucleatum* 改变的小鼠肠道微生物组成^[54]。同时, 研究发现 *F. nucleatum* 会加速癌细胞的转移, 上调 CARD3、LC3-II、Beclin1 和 Vimentin 的表达, 下调 E-cadherin 和 P62 的表达, 而通过 CQ 治疗、CARD3 基因敲除可以降低 CT26-luc 细胞在体内形成转移的能力^[55]。

5 总结与展望

本综述总结了 *pks*⁺ *E. coli*、ETBF 和 *F. nucleatum* 与 CRC 的联系。如今 CRC 已成为世界上第二大癌症, CRC 与肠道微生物的关系一直是人们关注的焦点, 而 *pks*⁺ *E. coli* 及其产生的基因毒素 Colibactin 已被证实与 CRC 的发生有直接的关系。本文充分论述了 Colibactin 对细胞的影响, 但其对人类肠道微生物的组成仍需我们进行更深入的研究。

Colibactin 前体产生需要 Colibactin 基因簇中的每一个生物合成基因,意味着其生物合成途径十分复杂。因此,现在对 Colibactin 的降解及其前体的研究十分关键,对防止 Colibactin 遗传毒性的方法还需要进一步的研究,这可能是攻克 CRC 的一个有力方向。ETBF 和 *F. nucleatum* 现在虽然尚未证明二者与 CRC 的发生有直接的关系,但种种迹象表明二者都与 CRC 有着紧密的联系,依然是攻克 CRC 的研究重点。

现在 CRC 的治疗大多基于氟嘧啶,如 5-氟尿嘧啶(5-Fluorouracil, 5-FU)、口服卡培他滨或 TAS-102,但只有 10%–15%的晚期大肠癌患者对单独使用 5-FU 有效,而 TAS-102 由细胞毒素三氟尿苷和胸苷磷酸化酶抑制剂嘧啶组成,替吡啶可阻止 5-氟尿嘧啶的快速代谢,提高 5-氟尿嘧啶的生物利用度,从而抑制肿瘤细胞的生长。此外,接受卡培他滨治疗的患者经常出现 3–4 级化疗毒性。对系统治疗的反应还取决于患者的二氢嘧啶缺乏症(Dihydropyrimidine Dehydrogenase, DPD)状态。DPD 是卡培他滨对大肠癌患者疗效的分子决定因素。由于二氢嘧啶不能处理胸腺嘧啶和尿嘧啶,DPD 患者会经历更多的化疗毒性作用。本课题组正在研究通过植物乳杆菌来干预由 *pks*⁺ *E. coli* 所引起的 CRC,希望通过植物乳杆菌来抑制 *pks*⁺ *E. coli* 从而能够起到对 CRC 的预防与治疗的效果。

REFERENCES

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2021, 71(3): 209-249
- [2] Hendler R, Zhang Y. Probiotics in the treatment of colorectal cancer[J]. Medicines, 2018, 5(3): 101
- [3] Hold GL. Gastrointestinal microbiota and colon cancer[J]. Digestive Diseases: Basel, Switzerland, 2016, 34(3): 244-250
- [4] Raskov H, Burchard J, Pommergaard HC. Linking gut microbiota to colorectal cancer[J]. Journal of Cancer, 2017, 8(17): 3378-3395
- [5] Meng CT, Bai CM, Brown TD, Hood LE, Tian Q. Human gut microbiota and gastrointestinal cancer[J]. Genomics, Proteomics & Bioinformatics, 2018, 16(1): 33-49
- [6] Garrett WS. The gut microbiota and colon cancer[J]. Science, 2019, 364(6446): 1133-1135
- [7] Shang Y, Liu CJ, Liu XX, Wu B, Yang X, Li XR. Bacterial community diversity in colorectal polyps patients by high-throughput sequencing[J]. Journal of Kunming University of Science and Technology: Natural Science Edition, 2018, 43(2): 71-78 (in Chinese)
尚云, 柳陈坚, 刘祥祥, 吴边, 杨雪, 李晓然. 基于高通量测序分析结肠息肉患者肠道细菌群落结构[J]. 昆明理工大学学报: 自然科学版, 2018, 43(2): 71-78
- [8] Liu CJ, Zhang YL, Shang Y, Wu B, Yang E, Luo YY, Li XR. Intestinal bacteria detected in cancer and adjacent tissue from patients with colorectal cancer[J]. Oncology Letters, 2019, 17(1): 1115-1127
- [9] Balskus EP. Colibactin: understanding an elusive gut bacterial genotoxin[J]. Natural Product Reports, 2015, 32(11): 1534-1540
- [10] Gagnaire A, Nadel B, Raoult D, Neefjes J, Gorvel JP. Collateral damage: insights into bacterial mechanisms that predispose host cells to cancer[J]. Nature Reviews Microbiology, 2017, 15(2): 109-128
- [11] Alexandrov LB, Kim J, Haradhvala NJ, Huang MN, Ng AWT, Wu Y, Boot A, Covington KR, Gordenin DA, Bergstrom EN, et al. The repertoire of mutational signatures in human cancer[J]. Nature, 2020, 578(7793): 94-101
- [12] Pleguezuelos-Manzano C, Puschof J, Huber AR, Van Hoeck A, Wood HM, Nomburg J, Gurjao C, Manders F, Dalmaso G, Stege PB, et al. Mutational signature in colorectal cancer caused by genotoxic *pks*⁺ *E. coli*[J]. Nature, 2020, 580(7802): 269-273
- [13] Tronnet S, Floch P, Lucarelli L, Gaillard D, Martin P, Serino M, Oswald E. The genotoxin colibactin shapes gut microbiota in mice[J]. mSphere, 2020. DOI: 10.1128/msphere.00589-20
- [14] Wallenstein A, Rehm N, Brinkmann M, Selle M, Bossuet-Greif N, Sauer D, Bunk B, Spröer C, Wami HT, Homburg S, et al. ClbR is the key transcriptional activator of colibactin gene expression in *Escherichia coli*[J]. mSphere, 2020. DOI: 10.1128/msphere.00591-20
- [15] Zha L, Jiang YD, Henke MT, Wilson MR, Wang JX, Kelleher NL, Balskus EP. Colibactin assembly line enzymes use S-adenosylmethionine to build a cyclopropane ring[J]. Nature Chemical Biology, 2017, 13(10): 1063-1065
- [16] Trautman EP, Healy AR, Shine EE, Herzon SB, Crawford JM. Domain-targeted metabolomics delineates the heterocycle assembly steps of colibactin biosynthesis[J]. Journal of the American Chemical Society, 2017, 139(11): 4195-4201
- [17] Healy AR, Vizcaino MI, Crawford JM, Herzon SB. Convergent and modular synthesis of candidate precolibactins. structural revision of precolibactin A[J]. Journal of the American Chemical Society, 2016, 138(16): 5195-5201

- 5426-5432
- [18] Zha L, Wilson MR, Brotherton CA, Balskus EP. Characterization of polyketide synthase machinery from the pks island facilitates isolation of a candidate precolibactin[J]. ACS Chemical Biology, 2016, 11(5): 1287-1295
- [19] Brachmann AO, Garcie C, Wu V, Martin P, Ueoka R, Oswald E, Piel J. Colibactin biosynthesis and biological activity depend on the rare aminomalonyl polyketide precursor[J]. Chemical Communications: Cambridge, England, 2015, 51(66): 13138-13141
- [20] Li ZR, Li J, Gu JP, Lai JYH, Duggan BM, Zhang WP, Li ZL, Li YX, Tong RB, Xu Y, et al. Divergent biosynthesis yields a cytotoxic aminomalonate-containing precolibactin[J]. Nature Chemical Biology, 2016, 12(10): 773-775
- [21] Molan K, Podlessek Z, Hodnik V, Butala M, Oswald E, Žgur Bertok D. The *Escherichia coli* colibactin resistance protein ClbS is a novel DNA binding protein that protects DNA from nucleolytic degradation[J]. DNA Repair, 2019, 79: 50-54
- [22] Tronnet S, Garcie C, Brachmann AO, Piel J, Oswald E, Martin P. High iron supply inhibits the synthesis of the genotoxin colibactin by pathogenic *Escherichia coli* through a non-canonical Fur/RyhB-mediated pathway[J]. Pathogens and Disease, 2017, 75(5): ftx066
- [23] Oliero M, Calve A, Fragoso G, Cuisiniere T, Hajjar R, Dobrindt U, Santos MM. Oligosaccharides increase the genotoxic effect of colibactin produced by *pks⁺ Escherichia coli* strains[J]. BMC Cancer, 2021, 21(1):172.
- [24] Kosari F, Taheri M, Moradi A, Hakimi Alni R, Alikhani MY. Evaluation of cinnamon extract effects on *clbB* gene expression and biofilm formation in *Escherichia coli* strains isolated from colon cancer patients[J]. BMC Cancer, 2020, 20(1): 1-8
- [25] Tang-Fichaux M, Chagneau CV, Bossuet-Greif N, Nougayrède JP, Oswald É, Branchu P. The polyphosphate kinase of *Escherichia coli* is required for full production of the genotoxin colibactin[J]. mSphere, 2020. DOI: 10.1128/msphere.01195-20
- [26] Cougnoux A, Dalmaso G, Martinez R, Buc E, Delmas J, Gibold L, Sauvanet P, Darcha C, Déchelotte P, Bonnet M, et al. Bacterial genotoxin colibactin promotes colon tumour growth by inducing a senescence-associated secretory phenotype[J]. Gut, 2014, 63(12): 1932-1942
- [27] Raisch J, Rolhion N, Dubois A, Darfeuille-Michaud A, Bringer MA. Intracellular colon cancer-associated *Escherichia coli* promote protumoral activities of human macrophages by inducing sustained COX-2 expression[J]. Laboratory Investigation, 2015, 95(3): 296-307
- [28] Payros D, Dobrindt U, Martin P, Secher T, Bracarense APFL, Boury M, Laffitte J, Pinton P, Oswald E, Oswald IP. The food contaminant deoxynivalenol exacerbates the genotoxicity of gut microbiota[J]. mBio, 2017. DOI: 10.1128/mbio.00007-17
- [29] Ge ZM, Feng Y, Sheh A, Gong GY, Muthupalani S, Chawanthayatham S, Essigmann JE, Fox JG. 758-*Helicobacter hepaticus* infection increases colonization of *pks⁺ Escherichia coli* and promotes mutagenesis in the lower bowel mucosa of RAG2^{-/-}/IL10^{-/-}/GPT mice in a sex- and IL-10-dependent manner[J]. Gastroenterology, 2018, 154(6): S-161
- [30] Dejea CM, Fathi P, Craig JM, Boleij A, Taddese R, Geis AL, Wu XQ, DeStefano Shields CE, Hechenbleikner EM, Huso DL, et al. Patients with familial adenomatous polyposis harbor colonic biofilms containing tumorigenic bacteria[J]. Science, 2018, 359(6375): 592-597
- [31] Chung L, Thiele Orberg E, Geis AL, Chan JL, Fu K, DeStefano Shields CE, Dejea CM, Fathi P, Chen J, Finard BB, et al. *Bacteroides fragilis* toxin coordinates a pro-carcinogenic inflammatory cascade via targeting of colonic epithelial cells[J]. Cell Host & Microbe, 2018, 23(2): 203-214.e5
- [32] Kaewkod T, Tobe R, Tragoolpua Y, Mihara H. Medicinal plant extracts protect epithelial cells from infection and DNA damage caused by colibactin-producing *Escherichia coli*, and inhibit the growth of bacteria[J]. Journal of Applied Microbiology, 2021, 130(3): 769-785
- [33] Yu LCH, Wei SC, Ni YH. Impact of microbiota in colorectal carcinogenesis: lessons from experimental models[J]. Intestinal Research, 2018, 16(3): 346-357
- [34] Dahmus JD, Kotler DL, Kastenber DM, Kistler CA. The gut microbiome and colorectal cancer: a review of bacterial pathogenesis[J]. Journal of Gastrointestinal Oncology, 2018, 9(4): 769-777
- [35] Viljoen KS, Dakshinamurthy A, Goldberg P, Blackburn JM. Quantitative profiling of colorectal cancer-associated bacteria reveals associations between *Fusobacterium* spp., enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* (ETBF) and clinicopathological features of colorectal cancer[J]. PLoS One, 2015, 10(3): e0119462
- [36] Haghi F, Goli E, Mirzaei B, Zeighami H. The association between fecal enterotoxigenic *B. fragilis* with colorectal cancer[J]. BMC Cancer, 2019, 19(1): 879
- [37] Cho HW, Rhee KJ, Eom YB. Zerumbone restores gut microbiota composition in ETBF colonized AOM/DSS mice[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2020, 30(11): 1640-1650
- [38] Geis AL, Fan HN, Wu XQ, Wu SG, Huso DL, Wolfe JL, Sears CL, Pardoll DM, Housseau F. Regulatory T-cell response to enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* colonization triggers IL17-dependent colon carcinogenesis[J]. Cancer Discovery, 2015, 5(10): 1098-1109
- [39] Hwang S, Yi HC, Hwang S, Jo M, Rhee KJ. Dietary salt administration decreases enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* (ETBF)-promoted tumorigenesis via inhibition of colonic inflammation[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(21): 8034
- [40] Kim HR, Rhee KJ, Eom YB. Anti-biofilm and antimicrobial effects of zerumbone against *Bacteroides fragilis*[J].

- Anaerobe, 2019, 57: 99-106
- [41] Shin DS, Rhee KJ, Eom YB. Effect of probiotic *Clostridium butyricum* NCTC 7423 supernatant on biofilm formation and gene expression of *Bacteroides fragilis*[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2020, 30(3): 368-377
- [42] Hwang S, Jo M, Hong JE, Park CO, Lee CG, Rhee KJ. Protective effects of zerumbone on colonic tumorigenesis in enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* (ETBF)-colonized AOM/DSS BALB/c mice[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(3): 857
- [43] Leung A, Tsoi H, Yu J. *Fusobacterium* and *Escherichia*: models of colorectal cancer driven by microbiota and the utility of microbiota in colorectal cancer screening[J]. Expert Review of Gastroenterology & Hepatology, 2015, 9(5): 651-657
- [44] Proença MA, Biselli JM, Succi M, Severino FE, Berardinelli GN, Caetano A, Reis RM, Hughes DJ, Silva AE. Relationship between *Fusobacterium nucleatum*, inflammatory mediators and microRNAs in colorectal carcinogenesis[J]. World Journal of Gastroenterology, 2018, 24(47): 5351-5365
- [45] Sun CH, Li BB, Wang B, Zhao J, Zhang XY, Li TT, Li WB, Tang D, Qiu MJ, Wang XC, et al. The role of *Fusobacterium nucleatum* in colorectal cancer: from carcinogenesis to clinical management[J]. Chronic Diseases and Translational Medicine, 2019, 5(3): 178-187
- [46] Wu J, Li Q, Fu XS. *Fusobacterium nucleatum* contributes to the carcinogenesis of colorectal cancer by inducing inflammation and suppressing host immunity[J]. Translational Oncology, 2019, 12(6): 846-851
- [47] Hamada T, Zhang XH, Mima K, Bullman S, Sukawa Y, Nowak JA, Kosumi K, Masugi Y, Twombly TS, Cao Y, et al. *Fusobacterium nucleatum* in colorectal cancer relates to immune response differentially by tumor microsatellite instability status[J]. Cancer Immunology Research, 2018, 6(11): 1327-1336
- [48] Feng YY, Zeng DZ, Tong YN, Lu XX, Dun GD, Tang B, Zhang ZJ, Ye XL, Li Q, Xie JP, et al. Alteration of microRNA-4474/4717 expression and CREB-binding protein in human colorectal cancer tissues infected with *Fusobacterium nucleatum*[J]. PLoS One, 2019, 14(4): e0215088
- [49] Xia XX, Wu WKK, Wong SH, Liu DB, Kwong TNY, Nakatsu G, Yan PS, Chuang YM, Chan MWY, Coker OO, et al. Bacteria pathogens drive host colonic epithelial cell promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in colorectal cancer[J]. Microbiome, 2020, 8(1): 108
- [50] Chen YL, Lu Y, Ke YT, Li YL. Prognostic impact of the *Fusobacterium nucleatum* status in colorectal cancers[J]. Medicine, 2019, 98(39): e17221
- [51] Lee SA, Liu F, Riordan SM, Lee CS, Zhang L. Global investigations of *Fusobacterium nucleatum* in human colorectal cancer[J]. Frontiers in Oncology, 2019, 9: 566
- [52] Kunzmann AT, Proença MA, Jordao HW, Jiraskova K, Schneiderova M, Levy M, Liska V, Buchler T, Vodickova L, Vymetalkova V, et al. *Fusobacterium nucleatum* tumor DNA levels are associated with survival in colorectal cancer patients[J]. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 2019, 38(10): 1891-1899
- [53] Yu YN, Yu TC, Zhao HJ, Sun TT, Chen HM, Chen HY, An HF, Weng YR, Yu J, Li M, et al. Berberine may rescue *Fusobacterium nucleatum*-induced colorectal tumorigenesis by modulating the tumor microenvironment[J]. Oncotarget, 2015, 6(31): 32013-32026
- [54] Huang XW, Hong XL, Wang JL, Sun TT, Yu T, Yu YN, Fang JY, Xiong H. Metformin elicits antitumour effect by modulation of the gut microbiota and rescues *Fusobacterium nucleatum*-induced colorectal tumorigenesis[J]. EBioMedicine, 2020, 61: 103037
- [55] Chen YY, Chen Y, Zhang JX, Cao P, Su WH, Deng YC, Zhan N, Fu XS, Huang Y, Dong WG. *Fusobacterium nucleatum* promotes metastasis in colorectal cancer by activating autophagy signaling via the upregulation of CARD3 expression[J]. Theranostics, 2020, 10(1): 323-339