

## · 论著 ·

DOI: 10.3969/j.issn.0253-9802.2024.06.004

# 海藻希瓦菌对小鼠结直肠腺瘤发生发展及其免疫微环境的影响

徐微微<sup>1</sup>, 阳柳思<sup>1</sup>, 徐婧<sup>1</sup>, 周有连<sup>2</sup>, 王红<sup>1,2</sup>✉

(1. 华南理工大学医学院, 广东 广州 510006; 2. 华南理工大学医学院附属第二医院消化内科, 广东 广州 510180)

**【摘要】** **目的** 明确海藻希瓦菌 (*S.algae*) 对小鼠结直肠腺瘤发生发展的影响及探讨其对免疫微环境的调控作用。**方法** 将 24 只小鼠分为 3 组: 对照组、偶氮甲烷 (AOM) / 葡聚糖硫酸钠 (DSS) 组、AOM/DSS+*S.algae* 组。比较各组小鼠的生存状态和结直肠腺瘤情况。取 AOM/DSS 组、AOM/DSS+*S.algae* 组小鼠结直肠组织进行转录组测序, 利用基因集富集分析和免疫浸润分析其免疫相关通路、免疫细胞和免疫因子的变化。**结果** 与 AOM/DSS 组相比, AOM/DSS+*S.algae* 组小鼠体质量、存活率均下降, 血便情况加重, 生存状态较差、结直肠长度缩短 ( $P < 0.05$ ), 平均腺瘤数量及大小增多 ( $P < 0.05$ )。与 AOM/DSS 组相比, AOM/DSS+*S.algae* 组炎症反应增强 ( $P < 0.05$ ), 促炎细胞因子白介素 (IL) -2、IL-6、IL-12、IL-17、干扰素、肿瘤坏死因子 ( $P < 0.05$ ) 和 IL-1 $\beta$  的产生呈上升趋势, 抑炎细胞因子 IL-4、IL-10、IL-13 ( $P < 0.05$ ) 和转化生长因子  $\beta$  呈抑制趋势, 初始 B 细胞和效应 B 细胞 ( $P < 0.05$ ) 呈增多趋势, 且激活小鼠体内核因子  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 信号通路。**结论** *S.algae* 可能通过激活免疫信号 (如活化 B 细胞和激活 NF- $\kappa$ B 通路), 形成促肿瘤免疫微环境, 进而促进结直肠腺瘤发展。

**【关键词】** 海藻希瓦菌; 结直肠腺瘤; 免疫微环境; NF- $\kappa$ B; B 细胞

## Effect of *Shewanella algae* on the incidence and progression of colorectal adenoma and immune microenvironment in mice

XU Weiwei<sup>1</sup>, YANG Liusi<sup>1</sup>, XU Jing<sup>1</sup>, ZHOU Youlian<sup>2</sup>, WANG Hong<sup>1,2</sup>✉

(1. School of Medicine, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China; 2. Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital, School of Medicine, South China University of Technology, Guangzhou 510180, China)

Corresponding author: WANG Hong, E-mail: eywanghong@scut.edu.cn

**【Abstract】** **Objective** To investigate the effect of *Shewanella algae* (*S.algae*) on the occurrence and development of colorectal adenoma and its regulatory effect on the immune microenvironment in mice. **Methods** Twenty-four mice were divided into three groups: control group, azoxymethane (AOM) / dextran sodium sulfate (DSS) group, AOM/DSS+*S.algae* group. The survival status and colorectal adenoma of mice were compared among three groups. Colorectal tissues in the AOM/DSS group and AOM/DSS+*S.algae* group were collected for high-throughput RNA-seq. Gene set enrichment analysis (GSEA) and cell-type identification by estimating relative subsets of RNA transcripts (CIBERSORT) were used to analyze the changes of immune-related pathways, immune cells and immune factors. **Results** Compared with the AOM/DSS group, the body weight ( $P < 0.05$ ) and survival rate were decreased, the hematochezia was aggravated, the survival status was worsened, the colorectal length was shortened (all  $P < 0.05$ ), and the average number and size of adenomas were significantly increased (both  $P < 0.05$ ) in the AOM/DSS+*S.algae* group. Compared with the AOM/DSS group, the inflammatory responses were significantly enhanced in AOM/DSS+*S.algae* group ( $P < 0.05$ ). The production of pro-inflammatory cytokines including interleukin (IL) -2, IL-6, IL-12, IL-17, interferon (IFN), tumor necrosis factor (TNF) (all  $P < 0.05$ ) and IL-1 $\beta$  showed an upward trend in the AOM/DSS+*S.algae* group, while the production of anti-inflammatory cytokines including IL-4, IL-10, IL-13 (all  $P < 0.05$ ) and transforming growth factor  $\beta$  showed an inhibitory trend. Both naive B cells and plasma cells (both  $P < 0.05$ ) were increased in AOM/DSS+*S.algae* group, and the nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) signaling pathway

收稿日期: 2024-03-27

基金项目: 广东省自然科学基金 (2021A1515012536)

作者简介: 徐微微, 硕士研究生, 研究方向: 肠道菌群与消化系统疾病, E-mail: 1203577570@qq.com; 王红, 通信作者, 教授, 博士生导师, 研究方向: 结直肠癌及癌前病变与肠道菌群相关性研究, E-mail: eywanghong@scut.edu.cn

was activated. **Conclusion** *S.algae* may form a tumor-promoting immune microenvironment by activating immune signals, such as activation of B cells and activation of the NF- $\kappa$ B pathway, and then promote the development of colorectal adenoma.

**[ Key words ]** *Shewanella algae*; Colorectal adenoma; Immune microenvironment; NF- $\kappa$ B; B cell

结直肠癌 (colorectal cancer, CRC) 是全球癌症相关死亡的第二大原因, 在最新发布的全球癌症统计中, 2022 年全球估计有 2 000 万例新发病例和 970 万例癌症死亡。其中在 2 000 万例新发病例中 CRC 占 9.6% (仅次于肺癌和女性乳腺癌), 在 970 万例癌症死亡病例中 CRC 占 9.3% (仅次于肺癌)<sup>[1]</sup>。在美国每年约有 15 万例 CRC 新发病例<sup>[2]</sup>, 近年来, 由于饮食及生活方式的改变, 我国 CRC 发病率和病死率逐年上升, 发病模式也逐渐接近发达国家<sup>[3]</sup>。结直肠腺瘤 (colorectal adenoma, CRA) 是由正常结直肠黏膜组织逐渐演变为异常增生 (息肉、腺瘤), 被公认为 CRC 癌前病变<sup>[4]</sup>。“腺瘤-癌”为大多数 CRC 的发生模式<sup>[5]</sup>。

肠道菌群失衡已被证实是与 CRA 形成及 CRC 发生发展密切相关的重要因素<sup>[6-7]</sup>。课题组前期研究发现, 作为 CRC 的早期事件, CRA 患者亦存在肠菌失衡现象, 进展期 CRA 患者肠道菌群结构显著区别于正常人和 CRC 患者<sup>[8-9]</sup>, 其中, 海藻希瓦菌 (*Shewanella algae*, *S.algae*) 的过度增殖与 CRA 形成和 CRC 发生发展呈正相关<sup>[10]</sup>, 提示 *S.algae* 在 CRA 的发病机制中可能发挥关键作用。

*S.algae* 的相关临床研究很少, 对结直肠的作用不清楚, 其真正临床意义尚未可知。本研究通过对结直肠腺瘤小鼠模型灌胃 *S.algae*, 明确 *S.algae* 在 CRA 发生发展中的作用及对肠道炎症微环境的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

24 只 C57BL/6J 小鼠 (雄性; 8~9 周龄; 体质量 20~24 g) 均购买于斯贝福 (北京) 生物技术有限公司。所有程序均根据动物护理指导方案进行, 并经华南理工大学医学院第二附属医院的动物伦理机构委员会批准 (批件号: K-2021-139)。小鼠饲养在特定的无病原体条件下, 并处于稳定的温度 (22±2) °C 和湿度 (40%~70%) 屏障系统中, 具有 12 h 的光/暗循环, 并提供食物和水。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 实验设计

将 24 只小鼠随机分为 3 组 (每组  $n = 8$ ): 对照组 (Control)、偶氮甲烷 (azoxymethane, AOM)/葡聚糖硫酸钠 (dextran sodium sulfate, DSS) 组、AOM/DSS+*S.algae* 组。除 Control 组外, 其余小鼠于实验开始当日予 AOM (10 mg/kg), 方式为腹腔注射。休息 1 周, 根据小鼠此时体质量重新分组。之后饮用 2.5% 的 DSS 6 d 后, 改用正常饮用水 (高压灭菌) 2 周<sup>[11]</sup>, AOM/DSS+*S.algae* 组在饮用 DSS 日开始每隔 1 d 灌胃 *S.algae* ( $1 \times 10^8$  CFU/mL, 0.2 mL) 1 次, 直至实验终点 (28 d), 对照组小鼠予等体积生理盐水灌胃。

#### 1.2.2 细菌培养

*S.algae* 购买于北纳生物, 并在 2216E 培养基中生长, 培养于 37 °C 培养箱中。将对数生长期 ( $OD_{600\text{nm}}=0.6\sim 1.0$ ) 的细菌以 5 000 r/min 离心 10 min, PBS 洗涤 2 次后, 在细菌沉淀加入适量生理盐水至  $OD_{600\text{nm}}=1.0$ , 此时重悬液中菌液的浓度约为  $1 \times 10^8$  CFU/mL, 用于小鼠灌胃。

#### 1.2.3 生存分数记录

每周测量小鼠体质量 1~2 次, 根据表 1 进行生存评分并记录。

表 1 小鼠生存评分  
Table 1 Survival score of the mice

生存评分指标	0 分	1 分	2 分
精神状态	良好	一般	差
进食饮水量	正常	略有减少	明显减少
腹泻	无	轻微	严重
便血	无	轻微	严重

#### 1.2.4 小鼠取材

第 28 日通过腹膜内注射戊巴比妥 (50 mg/kg) 麻醉实验小鼠进行肠组织和脾的取样。用预冷的 1% 牛血清白蛋白清洗肠道, 测量肠道长度, 称量大肠质量及脾质量。用剪刀沿长轴方向剖开肠腔, 拍照记录腺瘤的有无、数量、生长位置和大小等。

### 1.2.5 RNA 抽提和文库构建

采用 TRIzol 试剂依照说明书提取总 RNA。使用 NanoDrop 2000 分光光度计 (Thermo Scientific, 美国) 鉴定 RNA 纯度和定量, 使用 Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, 美国) 评估 RNA 完整性。使用 VAHTS Universal V5 RNA-seq Library Prep 试剂盒依照说明书构建转录组文库。转录组测序和分析由上海欧易生物技术有限公司 (上海, 中国) 进行。

### 1.2.6 RNA 测序和差异表达基因分析

采用 Illumina Novaseq 6000 测序平台对文库进行测序, 并生成 150 bp 双端 reads。采用 fastp 软件对 fastq 格式的 raw reads 进行处理, 去除低质量 reads 后获得 clean reads 用于后续数据分析。使用 HISAT2 软件进行参考基因组比对, 并进行基因表达量 (fragments per kilobase million, FPKM)<sup>[12]</sup> 计算, 并通过 HTSeq-count 获得每个基因的 reads 计数 (counts)。使用基因集富集分析 (gene set enrichment analysis, GSEA)<sup>[13-14]</sup> 软件进行基因集富集分析, 使用预定义的基因集, 将基因按照在 2 类样本中的差异表达程度排序, 然后检验预先设定的基因集是否在这个排序表的顶端或者底端富集。

### 1.2.7 免疫浸润分析

CIBERSORT (cell-type identification by estimating relative subsets of RNA transcripts)<sup>[15]</sup> 是一种常用的免疫浸润分析方法, 该方法基于已知参考数据集, 默认提供 22 种免疫细胞亚型的基因表达特征集: LM22。

### 1.3 统计学处理

应用 GraphPad Prism 9、Adobe Illustrator 2023 进行分析与绘图。计量资料采用 Shapiro-Wilk 进行正态性检验, 实验数据均符合正态分布, 以  $\bar{x} \pm s$  表示, 2 组间比较采用独立样本 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 *S.algae* 对结直肠腺瘤小鼠生存状态的影响

在 AOM/DSS 基础上对小鼠进行 *S.algae* 的灌胃, 可以发现灌胃后, AOM/DSS+*S.algae* 组体质量较 AOM/DSS 组有所下降, 其中在第 26 日和第 28 日, AOM/DSS+*S.algae* 与 AOM/DSS 组体质量

有较大差异 ( $P$  均  $< 0.01$ ), 在其他天数时, 差异无统计学意义 (图 1A)。与 AOM/DSS 组相比, AOM/DSS+*S.algae* 组精神状态明显较差、毛色不光泽, 进食和饮水有下降, 同时有严重的血便现象 (图 1B、C), 对末次即第 26 日的生存分数进行分析, 各单项指标的差异均无统计学意义, 但 AOM/DSS+*S.algae* 组的生存总分低于 AOM/DSS 组的总分 ( $P < 0.05$ , 表 2)。在实验终点结束前, AOM/DSS+*S.algae* 组生存率有下降, 而 AOM/DSS 组和野生对照组生存率都没有变化, 未有小鼠死亡现象的发生 (图 1D)。

### 2.2 *S.algae* 对小鼠结直肠腺瘤发生发展的影响

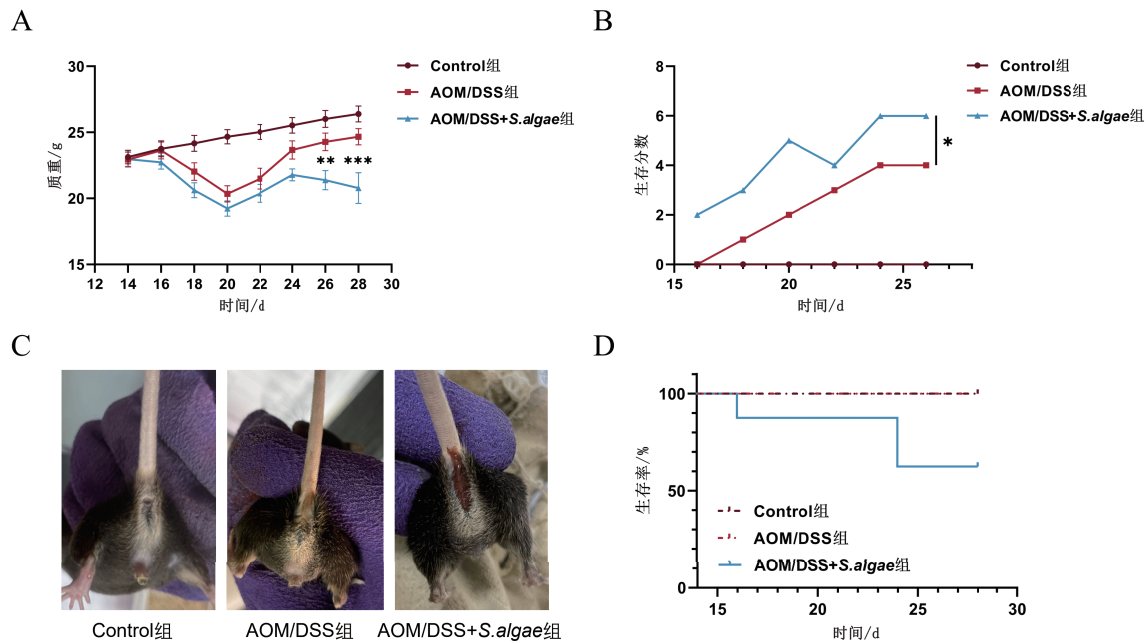
对各组小鼠结直肠段和脾取材测量观察, AOM/DSS+*S.algae* 组和 AOM/DSS 组的脾质量和肠质量均高于 Control 组, 差异均有统计学意义。AOM/DSS 组和 AOM/DSS+*S.algae* 组的脾和肠质量差异虽无统计意义, 但与 AOM/DSS 组相比, AOM/DSS+*S.algae* 组的脾和肠质量显示出更重的趋势 (表 3)。而结直肠长度 AOM/DSS+*S.algae* 组和 AOM/DSS 组较 Control 组有所下降, 其中 AOM/DSS+*S.algae* 组下降得更为明显 (表 3 和图 2A)。把肠道清洗后纵向剖开, 肉眼观察到与 AOM/DSS 组相比, AOM/DSS+*S.algae* 组腺瘤数量增多 ( $P < 0.05$ , 图 2B、C), 在肠道的上中下段都有分布而且体积也较大。与 AOM/DSS 组相比, AOM/DSS+*S.algae* 组直径大于 2 mm 的腺瘤数量较多 ( $P < 0.001$ , 图 2D)。

### 2.3 *S.algae* 促进小鼠体内炎症反应

用 AOM/DSS+*S.algae* 组和 AOM/DSS 组的小鼠结肠部分提取总 RNA 构建 cDNA 文库, 通过高通量测序检测差异基因与变化的通路。对测序结果进行 GSEA 分析, 结果显示, 与 AOM/DSS 组相比, AOM/DSS+*S.algae* 组中炎症反应通路活化程度更高 ( $P < 0.001$ , 图 3A), 此外还显示出 AOM/DSS+*S.algae* 组 B 细胞的增殖较高 ( $P = 0.004$ , 图 3B)。结果提示与 AOM/DSS 组相比, 加入 *S.algae* 后, 小鼠体内的炎症反应可能有所增强。

### 2.4 *S.algae* 干预后小鼠体内免疫微环境的改变

利用 CIBERSORT 法评估小鼠结直肠腺瘤组织免疫浸润情况。CIBERSORT 可通过不同免疫细胞中标志基因的差异表达分析出样品中各种免疫细胞的种类和分布, 提供 22 种免疫细胞亚型的基因表达特征集。结果显示, 初始 B 细胞、M0 巨噬细胞、M1 巨噬细胞、M2 巨噬细胞、肥大细胞、自



注:  $n = 5-8$ ; A 为 3 组小鼠体质量比较; B 为小鼠生存分数; C 为小鼠便血情况; D 为小鼠生存率; 与 AOM/DSS 组比较,  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ ,  $***P < 0.001$ 。

图 1 *S.algae* 加重小鼠生存状态

Figure 1 Aggravation of survival status of mice by *S.algae*

表 2 小鼠第 26 日生存状态评分

Table 2 Scores of the survival status of the mice at day 26

组别	精神状态	进食饮水量	腹泻	便血	总分
Control 组 ( $n=5$ )	0	0	0	0	0
AOM/DSS 组 ( $n=5$ )	$1.60 \pm 0.55$	$1.00 \pm 0.00$	$1.00 \pm 0.71$	$0.40 \pm 0.55$	$4.00 \pm 0.71^a$
AOM/DSS+S. <i>algae</i> 组 ( $n=5$ )	$1.80 \pm 0.45$	$2.00 \pm 0.00$	$1.60 \pm 0.55$	$0.60 \pm 0.89$	$6.00 \pm 1.58^b$

注: 与 Control 组比较,  $^aP < 0.001$ ; 与 AOM/DSS 组比较,  $^bP < 0.05$ 。

表 3 3 组小鼠脾质量、结直肠质量和长度比较

Table 3 Comparison of spleen weight, colorectal weight and length in each group of mice

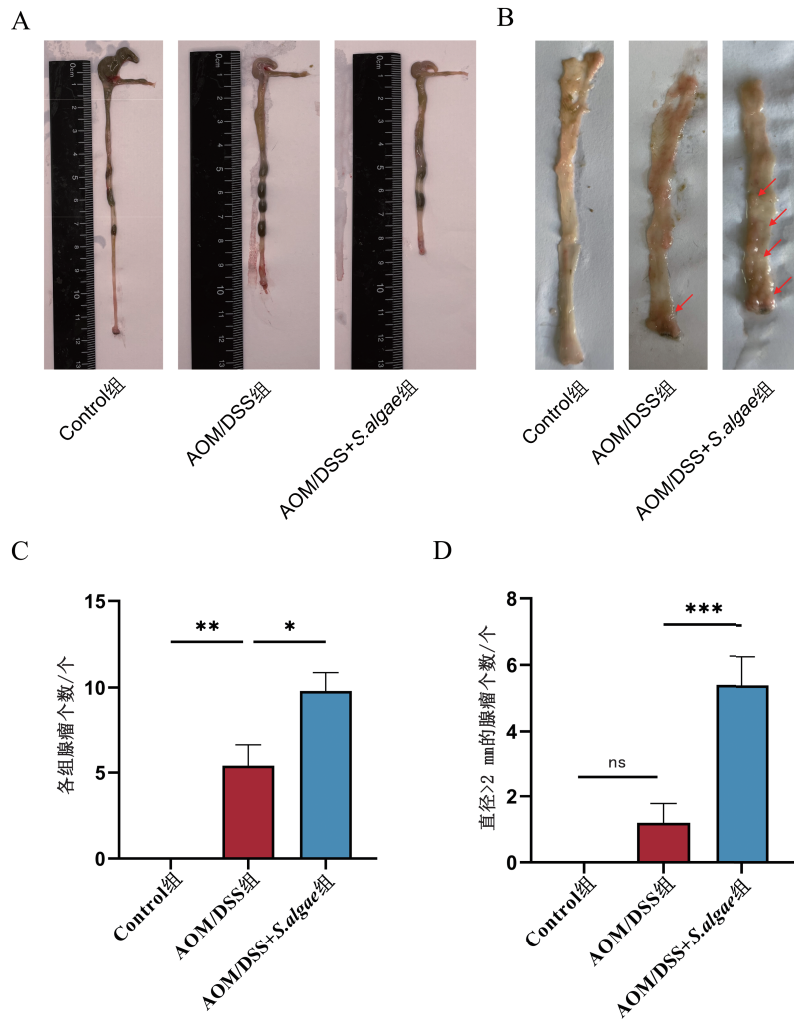
组别	脾质量 /g	结直肠质量 /g	结直肠长度 /cm
Control 组 ( $n=5$ )	$0.06 \pm 0.01$	$0.17 \pm 0.02$	$10.08 \pm 0.48$
AOM/DSS 组 ( $n=5$ )	$0.15 \pm 0.04^a$	$0.25 \pm 0.05^a$	$8.60 \pm 0.60^a$
AOM/DSS+S. <i>algae</i> 组 ( $n=5$ )	$0.17 \pm 0.01^a$	$0.28 \pm 0.03^a$	$8.12 \pm 0.40^a$

注: 与 Control 组比较,  $^aP < 0.05$ 。

然杀伤 (natural killer, NK) 细胞和浆细胞 (效应 B 细胞) 占比较高 (图 4A)。AOM/DSS+S.*algae* 组与 AOM/DSS 组初始 B 细胞比较差异虽无统计学意义, 但 AOM/DSS+S.*algae* 组有增多的趋势 (图 4B)。与 AOM/DSS 组相比, AOM/DSS+S.*algae* 组效应 B 细胞增多 ( $P < 0.05$ , 图 4C)。与上述 GSEA 分析中显示 AOM/DSS+S.*algae* 组 B 细胞增殖较高

的结果一致 (图 3B), 推测加入 *S.algae* 后可能促进了 B 细胞的增殖。

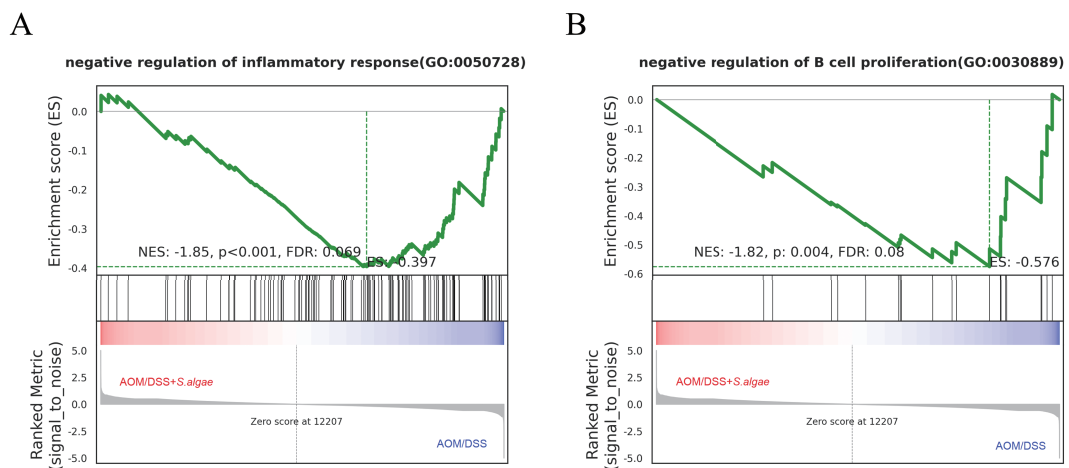
进一步对免疫微环境中细胞因子分析, GSEA 结果显示, 与 AOM/DSS 组相比, AOM/DSS+S.*algae* 组中促炎细胞因子 IL-1 $\beta$ 、IL-2、IL-6、IL-12、IL-17、IFN 和 TNF 的产生都呈上升趋势 (图 5A、B), 而抑炎细胞因子 IL-4、IL-10、IL-13 和转化生长因



注:  $n = 5$ ; A 为各组小鼠结肠长度测量; B 为结肠纵向剖开观察腺瘤; C 为各组小鼠腺瘤个数; D 为各组小鼠腺瘤直径大于 2 mm 的个数; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , ns  $P > 0.05$ 。

图 2 肠道长度与腺瘤形成情况

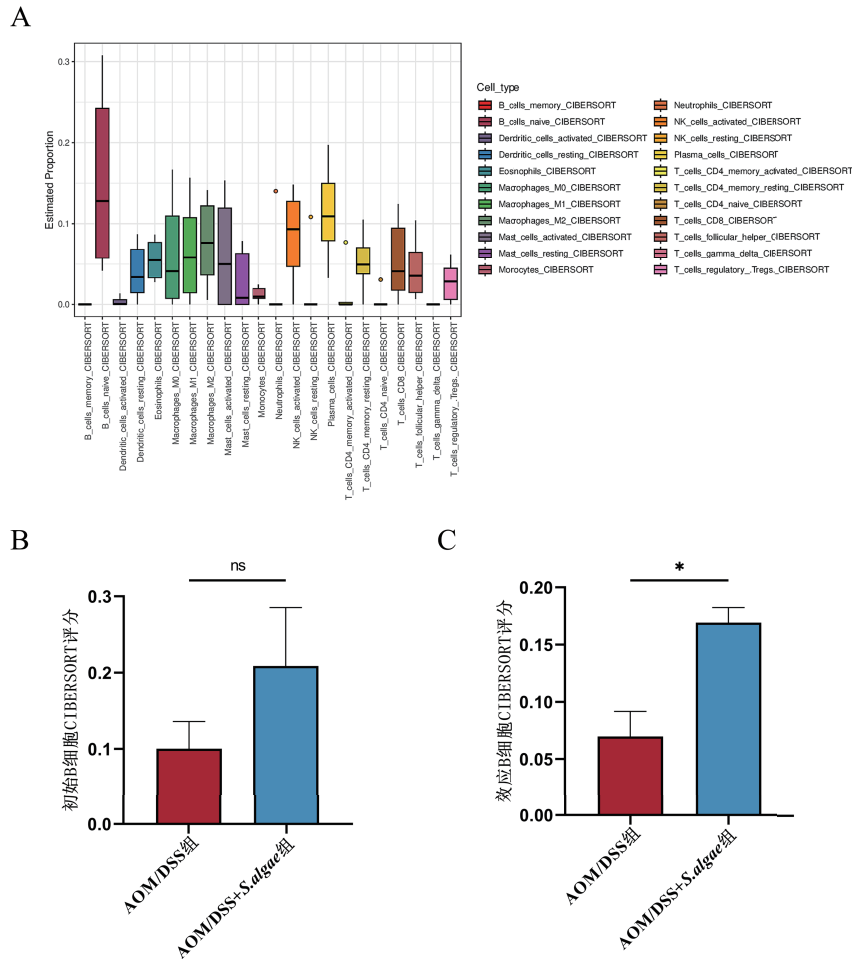
Figure 2 Bowel length and adenoma formation



注: A 为 GSEA 分析炎症反应负调控; B 为 GSEA 分析 B 细胞增殖负调控。

图 3 AOM/DSS 组与 AOM/DSS+S.algae 组体内炎症与 B 细胞增殖的激活

Figure 3 Activation of inflammation and B cell proliferation *in vivo* in AOM/DSS group and AOM/DSS+S.algae group



注:  $n = 3$ ; A 为 CIBERSORT 箱线图; B 为初始 B 细胞的 CIBERSORT 评分; C 为效应 B 细胞的 CIBERSORT 评分; ns  $P > 0.05$ , \* $P < 0.05$ 。

**图 4 CIBERSORT 法分析灌胃 *S.algae* 后小鼠结肠腺瘤组织免疫浸润情况**  
**Figure 4 Immune infiltration of colorectal adenoma tissue in mice after gavage of *S.algae***

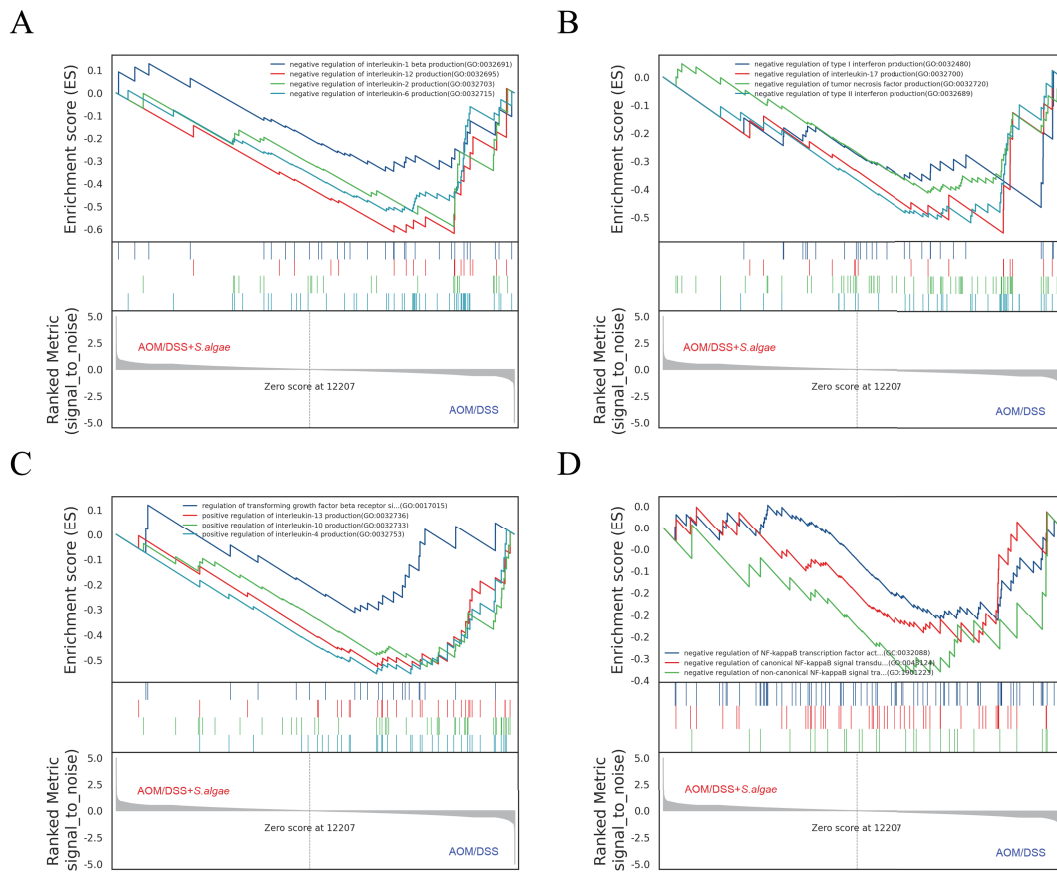
子  $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ , TGF- $\beta$ ) 呈现下降趋势 (图 5C)。同时也发现 AOM/DSS+S.*algae* 组中核因子- $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B) 活性上升和 NF- $\kappa$ B 诱导激酶 (NF- $\kappa$ B-inducing kinase, NIK) 及 Kappa B 抑制因子激酶 (inhibitor of kappa B kinase, IKK) 被激活 (图 5D), 表明加入 *S.algae* 后可能激活了小鼠体内 NF- $\kappa$ B 信号通路。*S.algae* 可能通过细胞因子活化 B 细胞和激活 NF- $\kappa$ B 通路, 形成促肿瘤免疫微环境, 进而促进结肠腺瘤发生发展。

### 3 讨论

CRC 的发病率和病死率在世界范围内呈上升趋势<sup>[16]</sup>, 一直威胁着人群健康, 给社会经济和患

者家庭带来了沉重的负担<sup>[17]</sup>。CRC 有多种病理类型, 其中最常见的是腺癌<sup>[18]</sup>。CRA 是公认的 CRC 癌前病变, 大约 85% 的 CRC 是由 CRA 演变而来的<sup>[19]</sup>。因此, 深入了解 CRA 发生发展的过程, 是实现 CRC 早期预防和早期治疗中亟待解决的关键问题, 具有重要的临床意义。

人类结肠定植了一种由微生物组成的共生群落, 估计有  $10^{14}$  个细菌, 与哺乳动物细胞的总数近似<sup>[20]</sup>。一些细菌可能通过产生微生物基因毒素引入致癌突变<sup>[21]</sup>, 而另一些细菌则产生干扰癌细胞核心代谢过程的代谢物<sup>[22]</sup>。此外, 肠道内的细菌种类会改变局部和全身的细胞或代谢特征, 从而影响治疗效果<sup>[23]</sup>。微生物群对肿瘤发生的广泛影响导致其成为癌症的标志物<sup>[24]</sup>。通过前期工作, 我们发现与正常结肠组织相比, *S.algae* 在



注：A、B为GSEA分析促炎细胞因子表达情况；C为GSEA分析抑炎细胞因子表达情况；D为GSEA分析NF- $\kappa$ B通路激活情况。

图5 *S.algae* 激活炎症相关细胞因子和NF- $\kappa$ B通路

Figure 5 Activation of inflammation-related cytokines and the NF- $\kappa$ B pathway by *S.algae*

CRA 中含量升高, *S.algae* 在 CRA 发病中可能发挥关键作用。*S.algae* 是一种革兰阴性菌, 它的致病性现已确定, 主要感染于体弱患者, 可能与高病死率有关<sup>[25]</sup>。在临床中, *S.algae* 经常与腐败希瓦氏菌 (*Shewanella putrefaciens*, *S.putrefaciens*) 相混淆, 但似乎有越来越多的证据表明, 在 *S.algae* 和 *S.putrefaciens* 之间, *S.algae* 引起的人类疾病最多, 此外对小鼠的致病性研究也表明, *S.algae* 似乎是毒性更强的物种<sup>[26]</sup>。但 *S.algae* 一般是个案报道, 相关研究较少, 临床意义及致病机制不太清楚且与结直肠疾病的关系仍未知。本研究为探索 *S.algae* 对 CRA 发生发展的作用, 我们在 AOM/DSS 组小鼠的基础上进行 *S.algae* 灌胃, 结果显示与 AOM/DSS 组相比, AOM/DSS+*S.algae* 组小鼠生存状态更差, 血便和体质量下降都很严重, 同时, 结直肠长度缩短且显示出更多更大的腺瘤, 因此 *S.algae* 加重了疾病, 促进了 CRA 的发生、发展。

19 世纪中期, Rudolf Virchow 首先根据癌症起

源于慢性炎症的部位, 提出了炎症和癌症之间的相关性<sup>[27]</sup>。事实上, 慢性、失调、持续和未解决的炎症与恶性肿瘤的风险增加以及大多数类型癌症的恶性进展相关<sup>[28-29]</sup>。从正常结肠上皮发展为结直肠癌需要一系列遗传和炎症免疫学因素来促成和塑造致瘤环境。结直肠癌发生过程中涉及的炎症特征包括炎症小体的激活<sup>[29]</sup>和 NF- $\kappa$ B 通路的激活<sup>[30]</sup>, 这两者都可以通过对微生物刺激或细胞因子的反应而发生。在本研究中, 我们发现对小鼠进行 *S.algae* 干预后, 小鼠体内炎症与免疫反应明显增强, 进一步分析发现 AOM/DSS+*S.algae* 组促炎因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-17 和 TNF 等的水平都呈现出高表达, 抑炎细胞因子 IL-4、IL-10 和 TGF- $\beta$  水平显示出低表达。同时 AOM/DSS+*S.algae* 组中 B 细胞表现出更高的增殖和浸润占比。尽管迄今为止的免疫疗法研究主要集中在 T 细胞上, 但越来越多的证据表明, 肿瘤浸润性 B 细胞和浆细胞在肿瘤控制中具有至关重要的协同作用, 在疾病

的诊断和治疗中显示出很强的预测和预后意义<sup>[31]</sup>。此外我们还发现 *S.algae* 干预后, 小鼠体内 NF- $\kappa$ B 通路明显被激活。NF- $\kappa$ B 是一种多效性转录因子, 在先天性和适应性免疫中起关键作用, 是各种促炎因子表达所必需的<sup>[32]</sup>。除了在炎症中的关键功能外, NF- $\kappa$ B 激活还可以通过增加细胞增殖和血管生成、抑制细胞死亡以及促进细胞侵袭和转移来支持癌变<sup>[33]</sup>。Greten 等<sup>[34]</sup> 研究表明, 阻断肠上皮细胞中的 NF- $\kappa$ B 激活可显著降低 CRC 的发生率。结肠炎期间 IL-6 和 TNF- $\alpha$  等细胞因子的释放可以促进肿瘤生长, 而 TGF- $\beta$  和 IL-10 等免疫抑制细胞因子的低表达会加剧这一过程。

在健康的结肠组织中, 即使是轻微的炎症, 在结肠向发育不良结肠的转化中也起着重要作用。随着隐窝的发育异常, 微生物群与固有层免疫细胞之间的屏障被破坏, 进而促进细菌移位, 最终使免疫原性微生物暴露于上皮细胞和抗原呈递细胞<sup>[35]</sup>。细菌刺激激活免疫信号通路导致体内平衡丧失, 从而驱动促肿瘤炎症环境<sup>[36]</sup>。综上所述, 在结肠直肠癌发生发展过程中, *S.algae* 可能通过激活免疫信号(如活化B细胞和激活NF- $\kappa$ B通路), 形成促肿瘤免疫微环境, 进而促进结肠直肠癌的发生发展。

## 参 考 文 献

- [1] BRAY F, LAVERSANNE M, SUNG H, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2024, 74(3): 229-263. DOI: 10.3322/caac.21834.
- [2] SIEGEL R L, MILLER K D, FUCHS H E, et al. Cancer statistics, 2022[J]. CA Cancer J Clin, 2022, 72(1): 7-33.
- [3] 王露尧, 张鹭鹭. 中国结直肠癌发病和死亡情况及防控策略[J]. 解放军医院管理杂志, 2021, 28(12): 1195-1197. DOI: 10.16770/j.cnki.1008-9985.2021.12.036.  
WANG L Y, ZHANG L L. Incidence and mortality of colorectal cancer and prevention-control strategies in China[J]. Hosp Adm J Chin People's Liberation Army, 2021, 28(12): 1195-1197. DOI: 10.16770/j.cnki.1008-9985.2021.12.036.
- [4] TERZIC J, GRIVENNIKOV S, KARIN E, et al. Inflammation and colon cancer[J]. Gastroenterology, 2010, 138(6): 2101-2114.e5.
- [5] FENG Q, LIANG S, JIA H, et al. Gut microbiome development along the colorectal adenoma-carcinoma sequence[J]. Nat Commun, 2015, 6: 6528. DOI: 10.1038/ncomms7528.
- [6] LIU W, ZHANG R, SHU R, et al. Study of the relationship between microbiome and colorectal cancer susceptibility using 16SrRNA sequencing[J]. Biomed Res Int, 2020, 2020: 7828392. DOI: 10.1155/2020/7828392.
- [7] VACANTE M, CIUNI R, BASILE F, et al. Gut microbiota and colorectal cancer development: a closer look to the adenoma-carcinoma sequence[J]. Biomedicine, 2020, 8(11): 489. DOI: 10.3390/biomedicine8110489.
- [8] WANG W J, ZHOU Y L, HE J, et al. Characterizing the composition of intestinal microflora by 16S rRNA gene sequencing[J]. World J Gastroenterol, 2020, 26(6): 614-626. DOI: 10.3748/wjg.v26.i6.614.
- [9] ZHOU J X, YANG Z, XI D H, et al. Enhanced segmentation of gastrointestinal polyps from capsule endoscopy images with artifacts using ensemble learning[J]. World J Gastroenterol, 2022, 28(41): 5931-5943. DOI: 10.3748/wjg.v28.i41.5931.
- [10] 周俊潇, 李俊彦, 刘凯杰, 等. 海藻希瓦氏菌及其特异性脂多糖对结肠直肠癌的影响及机制[J]. 实用医学杂志, 2021, 37(21): 2717-2726. DOI: 10.3969/j.issn.1006-5725.2021.21.004.  
ZHOU J X, LI J Y, LIU K J, et al. The effect of lipopolysaccharide from *Shewanella algae* on the occurrence and development of colorectal adenoma[J]. J Pract Med, 2021, 37(21): 2717-2726. DOI: 10.3969/j.issn.1006-5725.2021.21.004.
- [11] ANGELOU A, ANDREATOS N, ANTONIOU E, et al. A novel modification of the AOM/DSS model for inducing intestinal adenomas in mice[J]. Anticancer Res, 2018, 38(6): 3467-3470. DOI: 10.21873/anticancer.12616.
- [12] ROBERTS A, TRAPNELL C, DONAGHEY J, et al. Improving RNA-Seq expression estimates by correcting for fragment bias[J]. Genome Biol, 2011, 12(3): R22. DOI: 10.1186/gb-2011-12-3-r22.
- [13] SUBRAMANIAN A, TAMAYO P, MOOTHA V K, et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102(43): 15545-15550. DOI: 10.1073/pnas.0506580102.
- [14] MOOTHA V K, LINDGREN C M, ERIKSSON K F, et al. PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes[J]. Nat Genet, 2003, 34(3): 267-273. DOI: 10.1038/ng1180.
- [15] ZENG D, YE Z, SHEN R, et al. IOBR: multi-omics immunology biological research to decode tumor microenvironment and signatures[J]. Front Immunol, 2021, 12: 687975. DOI: 10.3389/fimmu.2021.687975.
- [16] MURPHY C C, ZAKI T A. Changing epidemiology of colorectal cancer-birth cohort effects and emerging risk factors[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2024, 21: 25-34. DOI: 10.1038/s41575-023-00841-9.
- [17] FAVORITI P, CARBONE G, GRECO M, et al. Worldwide burden of colorectal cancer: a review[J]. Updates Surg, 2016, 68(1): 7-11. DOI: 10.1007/s13304-016-0359-y.
- [18] 黄庆, 邹旻红, 蒋叶, 等. 结肠黏液腺癌术后患者的预后影响因素分析[J]. 新医学, 2021, 52(1): 26-31. DOI: 10.3969/j.issn.0253-9802.2021.01.006.

- HUANG Q, ZOU M H, JIANG Y, et al. Analysis of prognostic factors in patients with colorectal mucinous adenocarcinoma after radical surgery [ J ]. *J New Med*, 2021, 52 ( 1 ): 26-31. DOI: 10.3969/j.issn.0253-9802.2021.01.006.
- [19] BAILE-MAXÍA S, MANGAS-SANJUÁN C, LADABAUM U, et al. Risk factors for metachronous colorectal cancer or advanced adenomas after endoscopic resection of high-risk adenomas [ J ]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2023, 21 ( 3 ): 630-643. DOI: 10.1016/j.egh.2022.12.005.
- [20] SENDER R, FUCHS S, MILO R. Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body [ J ]. *PLoS Biol*, 2016, 14 ( 8 ): e1002533. DOI: 10.1371/journal.pbio.1002533.
- [21] PLEGUEZUELOS-MANZANO C, PUSCHHOF J, ROSENDAHL H A, et al. Mutational signature in colorectal cancer caused by genotoxic pks+*E. coli* [ J ]. *Nature*, 2020, 580 ( 7802 ): 269-273. DOI: 10.1038/s41586-020-2080-8.
- [22] BELL H N, REBERNICK R J, GOYERT J, et al. Reuterin in the healthy gut microbiome suppresses colorectal cancer growth through altering redox balance [ J ]. *Cancer Cell*, 2022, 40 ( 2 ): 185-200.e6. DOI: 10.1016/j.ccell.2021.12.001.
- [23] GOPALAKRISHNAN V, HELMINK B A, SPENCER C N, et al. The influence of the gut microbiome on cancer, immunity, and cancer immunotherapy [ J ]. *Cancer Cell*, 2018, 33 ( 4 ): 570-580. DOI: 10.1016/j.ccell.2018.03.015.
- [24] HANAHAN D. Hallmarks of cancer: new dimensions [ J ]. *Cancer Discov*, 2022, 12 ( 1 ): 31-46. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-21-1059.
- [25] PAGNIEZ H, BERCHE P. Opportunistic infections caused by *Shewanella*, new emergent bacteria [ J ]. *Med Mal Infect*, 2005, 35 ( 4 ): 186-191. DOI: 10.1016/j.medmal.2005.03.008.
- [26] KHASHE S, JANDA J M. Biochemical and pathogenic properties of *Shewanella* alga and *Shewanella putrefaciens* [ J ]. *J Clin Microbiol*, 1998, 36 ( 3 ): 783-787. DOI: 10.1128/JCM.36.3.783-787.1998.
- [27] BALKWILL F, MANTOVANI A. Inflammation and cancer: back to Virchow [ J ]. *Lancet*, 2001, 357 ( 9255 ): 539-545. DOI: 10.1016/S0140-6736 ( 00 ) 04046-0.
- [28] COUSSENS L M, WERB Z. Inflammation and cancer [ J ]. *Nature*, 2002, 420 ( 6917 ): 860-867.
- [29] ELINAV E, NOWARSKI R, THAISS C A, et al. Inflammation-induced cancer: crosstalk between tumours, immune cells and microorganisms [ J ]. *Nat Rev Cancer*, 2013, 13 ( 11 ): 759-771. DOI: 10.1038/nrc3611.
- [30] KARIN M, GRETEN F R. NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression [ J ]. *Nat Rev Immunol*, 2005, 5 ( 10 ): 749-759. DOI: 10.1038/nri1703.
- [31] LAUMONT C M, BANVILLE A C, GILARDI M, et al. Tumour-infiltrating B cells: immunological mechanisms, clinical impact and therapeutic opportunities [ J ]. *Nat Rev Cancer*, 2022, 22 ( 7 ): 414-430. DOI: 10.1038/s41586-022-00466-1.
- [32] HÄCKER H, KARIN M. Regulation and function of IKK and IKK-related kinases [ J ]. *Sci STKE*, 2006, 2006 ( 357 ): re13. DOI: 10.1126/stke.3572006re13.
- [33] NAUGLER W E, KARIN M. NF-kappaB and cancer-identifying targets and mechanisms [ J ]. *Curr Opin Genet Dev*, 2008, 18 ( 1 ): 19-26. DOI: 10.1016/j.gde.2008.01.020.
- [34] GRETEN F R, ECKMANN L, GRETEN T F, et al. IKK  $\beta$  links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer [ J ]. *Cell*, 2004, 118 ( 3 ): 285-296. DOI: 10.1016/j.cell.2004.07.013.
- [35] BRENNAN C A, GARRETT W S. Gut microbiota, inflammation, and colorectal cancer [ J ]. *Annu Rev Microbiol*, 2016, 70 : 395-411. DOI: 10.1146/annurev-micro-102215-095513.
- [36] LOUIS P, HOLD G L, FLINT H J. The gut microbiota, bacterial metabolites and colorectal cancer [ J ]. *Nat Rev Microbiol*, 2014, 12 ( 10 ): 661-672. DOI: 10.1038/nrmicro3344.

( 责任编辑: 杨江瑜 )