

基于 PacBio SMRT 测序技术分析食管癌特征性肠道菌群及其生物标志物

万萍, 沈伟涛, 彭珍燕, 刘冉

东南大学, 公共卫生学院/环境医学工程教育部重点实验室, 江苏 南京 210009



DOI 10.11836/JEOM22065

摘要:

[背景] 食管癌是常见的消化道肿瘤, 中国是食管癌高发地区。有研究提示, 肠道菌群与肿瘤等多种疾病的发生发展相关。受测序读长所限, 传统的 16S rDNA 测序技术只能鉴定到属。

[目的] 本研究基于 PacBio 单分子实时(SMRT)测序技术在种水平筛选与食管癌相关的特征性微生物标志。

[方法] 招募首次诊断为食管癌的新发病例 120 例, 和性别、年龄匹配的健康对照 60 例。采集所有研究对象的新鲜粪便样本。利用第三代测序 PacBio SMRT 技术对 4 例食管癌患者及 1:1 匹配的健康对照者样本进行 16S rDNA 全长测序, 基于测序结果分析其肠道菌群结构差异。采用 PICRUSt 软件进行功能预测。通过线性判别分析和群落差异分析筛选差异肠道微生物进行大样本人群验证, 识别食管癌相关肠道微生物。

[结果] 基于测序样本, α 多样性分析中食管癌组的 Ace、Chao1、Simpson Diversity、Shannon Wiener 指数均高于健康对照组($P < 0.05$), β 多样性分析显示食管癌组和健康对照组散点簇分离, 二者肠道菌群结构存在差异。在门水平上, 食管癌组肠道菌群中变形菌门、拟杆菌门、厚壁菌门丰度升高。在属水平上, 食管癌组毛螺菌属、巴氏杆菌属、罗斯氏菌属和拟杆菌属相对丰度增加。在种水平上, 食管癌组相对丰度增加的微生物是肠杆菌 *E.20*、卵形拟杆菌 V975、普氏栖粪杆菌等 11 种, 丰度降低的微生物是皮氏罗尔斯通氏菌、肠杆菌未分类、唾液链球菌 *JIM8777* 3 种。PICRUSt 功能注释后发现食管癌组与健康组在丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢(map00250)、肽聚糖生物合成(map00550)、叶酸一碳单位库(map00670)、硫酸素代谢(map00730)、氨基酸的生物合成(map01230)通路上存在差异。对验证人群的分析结果显示, 与健康对照人群相比, 食管癌人群的肠杆菌 *E.20*、马赛拟杆菌的丰度升高, 唾液链球菌 *JIM8777* 的丰度降低, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。建立受试者工作特征分析发现, 肠杆菌 *E.20*、唾液链球菌 *JIM8777*、马赛拟杆菌联合诊断的曲线下面积(AUC)为 0.779, 高于单一诊断结果(AUC 分别为 0.610、0.608、0.659)。

[结论] 食管癌组的肠道菌群与健康对照组存在差异。肠杆菌 *E.20*、唾液链球菌 *JIM8777*、马赛拟杆菌的联合应用对食管癌的诊断具有潜在应用价值。

关键词: PacBio 单分子实时测序技术; 食管癌; 肠道菌群; 16S rDNA; 生物标志物

Characteristic intestinal flora and associated biomarkers in esophageal cancer based on PacBio SMRT sequencing WAN Ping, SHEN Weitao, PENG Zhenyan, LIU Ran (School of Public Health/Key Laboratory of Environment Medicine Engineering, Ministry of Education, Southeast University, Nanjing, Jiangsu 210009, China)

Abstract:

[Background] Esophageal cancer is a common gastrointestinal tumor with a high incidence in China. Some studies suggest that intestinal flora is significantly related to the occurrence and development of tumors and other diseases. Traditional 16S rDNA sequencing technology only provides taxonomic resolution at genus level.

[Objective] Based on PacBio single molecule real time (SMRT) sequencing technology to identify characteristic microbial biomarkers associated with esophageal cancer at the species level.

[Methods] A total of 120 newly diagnosed cases of esophageal cancer were recruited and 60 healthy patients with matched sex and age were recruited as the control group. Fresh stool samples were collected from all subjects. Full-length 16S rDNA sequencing was performed on samples from 4 patients with esophageal cancer and 1:1 matched healthy controls using the third-generation sequencing PacBio SMRT technology, and the structural differences of intestinal flora were

基金项目

国家自然科学基金项目(82173479, 81872579)

作者简介

万萍(1997—), 女, 硕士生;
E-mail: pingwan1997@163.com

通信作者

刘冉, E-mail: ranliu@seu.edu.cn

伦理审批 已获取

利益冲突 无申报

收稿日期 2022-02-25

录用日期 2022-05-23

文章编号 2095-9982(2022)09-1011-10

中图分类号 R117

文献标志码 A

引用

万萍, 沈伟涛, 彭珍燕, 等. 基于 PacBio SMRT 测序技术分析食管癌特征性肠道菌群及其生物标志物 [J]. 环境与职业医学, 2022, 39(9): 1011-1020.

本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.11836/JEOM22065

Funding

This study was funded.

Correspondence to

LIU Ran, E-mail: ranliu@seu.edu.cn

Ethics approval Obtained

Competing interests None declared

Received 2022-02-25

Accepted 2022-05-23

To cite

WAN Ping, SHEN Weitao, PENG Zhenyan, et al. Characteristic intestinal flora and associated biomarkers in esophageal cancer based on PacBio SMRT sequencing[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2022, 39(9): 1011-1020.

Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.11836/JEOM22065

analyzed based on the sequencing results. Function prediction was performed by PICRUSt software. Large population samples were validated by screening different gut microbes by linear discriminant analysis and linear discriminant analysis effect size to identify esophageal cancer-associated gut microbes.

[Results] Based on sequencing samples, the results of α diversity analysis showed that the Ace, Chao1, Simpson Diversity, and Shannon Wiener indices of the esophageal cancer group were higher than those of the healthy control group ($P < 0.05$), and the results of β diversity showed that the scattered clusters of the esophageal cancer group and the healthy control group were separated, which meant that there were differences in the structure of intestinal flora between the two groups. It was found at the phylum level that the abundances of Proteobacteria, Bacteroidetes, and Firmicutes in the intestinal flora of the esophageal cancer group were increased. At the genus level, the relative abundances of *Spirospira*, *Pasteurella*, *Roxella*, and *Bacteroides* in the esophageal cancer group were increased. At the species level, there were 11 microbial species with increased relative abundances in the esophageal cancer group, including *Enterobacter* sp. E.20, *Bacteroides ovatus* V975, and *Faecalibacterium prausnitzii*, and the microbial species with decreased relative abundances in the esophageal cancer group were *Ralstonia pickettii*, *Enterobacter unclassified*, and *Streptococcus salivarius* JIM8777. The PICRUSt functional annotation found differences in alanine, aspartate and glutamate metabolism (map00250), peptidoglycan (map00550), one carbon pool by folate (map00670), thiamine metabolism (map00730), and biosynthesis of amino acids (map01230) between the two groups. The results of the population validation study showed that the abundances of *Enterobacter* sp. E.20 and *Bacteroides massiliense* in the esophageal cancer group were increased, the abundance of *Streptococcus salivarius* JIM8777 was decreased, and the differences between the two groups were statistically significant ($P < 0.05$). By establishing receiver operating characteristic analysis for representative species level biomarkers, the area under curve (AUC) of combining *Enterobacter* sp. E.20, *Streptococcus salivarius* JIM8777, and *Bacteroides massiliense* was 0.779, higher than single diagnosis (AUC=0.610, 0.608, and 0.659, respectively).

[Conclusion] There are significant differences in gut microbiota between the esophageal cancer group and the healthy control group. The combination of *Enterobacter* sp. E.20, *Streptococcus salivarius* JIM8777, and *Bacteroides Massiliense* has potential application value for the diagnosis of esophageal cancer.

Keywords: PacBio single molecule real time sequencing; esophageal cancer; gut microbiota; 16S rDNA; biomarker

食管癌是一种常见的消化道恶性肿瘤,是全球癌症死亡的第六大常见原因,给全人类带来了沉重的疾病负担^[1-2]。我国是食管癌高发地区,每年新发病例占全球的一半以上,死亡率也位居世界前列^[3-4]。目前对食管癌的病因学研究主要集中在外环境及遗传因素上,但是人体内环境因素对疾病的作用也同样重要,研究发现人体内环境与众多疾病相关,因此维持人体内环境稳态也具有重要的意义,而肠道菌群则是人体内环境稳态的重要组成部分^[5]。

人类肠道上附着有数以亿万计的微生物,统称肠道菌群^[6]。正常的肠道菌群可以保护肠道屏障,降低肠道屏障受到损伤的频率和程度,从而降低炎症和癌症的发生,因此肠道菌群的动态平衡对于维持人体内稳态,保持肠道健康具有重要的意义。当肠道菌群的稳态被破坏,就会发生肠道菌群紊乱,肠道菌群的保护作用被削弱^[7]。近期研究发现肠道菌群与众多疾病相关,肠道菌群紊乱是癌症的早期危险因素^[8]。研究显示食管癌患者存在肠道菌群失调,具有特征性肠道微生物群,其肠道菌群的结构与丰度同健康对照组相比具有差异^[9]。一项日本的研究发现球形梭菌亚群和脆弱拟杆菌等专性厌氧菌在食管癌患者肠道菌群中占主导地位^[10]。此外,另一项针对晚期食管癌患者的肠道菌群研究发现,柔嫩梭菌亚群和拟球梭菌亚群在其肠道微生物群落中占主导地位^[11]。国内的一项研究建立

了基于拉氏螺旋体、拟杆菌、链球菌和双歧杆菌的属水平受试者工作曲线分析,在食管癌诊断中显示出较高的准确性^[9]。而对于肠道菌群与食管癌的机制研究发现,食管癌患者肠道菌群丰富度增加,其中脂多糖产生菌的丰度增加,细菌内毒素和炎症因子破坏肠道屏障,吸收入血远距离迁移至靶器官出现慢性暴露,从而影响食管癌的进程^[9]。

受测序读长所限,传统的 16S rDNA 测序技术只能选取细菌的 16S rDNA 9 个高变区其中 1 个或 2 个进行测序,而每个高变区提供的菌种信息存在差别,因此通常仅能鉴定到属^[12]。而基于 PacBio 单分子实时 (single molecule real time, SMRT) 的全长测序可对全部高变区测序,因此可鉴定到种水平,真实还原样本微生物群落结构原貌^[13]。基于此,本研究采用病例-对照研究,应用 PacBio SMRT 技术的 16S rDNA 全长测序方法来评估食管癌患者和健康人群肠道菌群结构在种水平的差异,旨在探索食管癌相关的肠道微生物,并进一步在大人组的粪便样本中进行验证。

1 对象与方法

1.1 研究对象的选择及分组

招募 2020 年 7—12 月江苏省淮安市第一人民医院首次被诊断为食管癌的病人 120 例。同时招募 60 例性别相同、年龄相近的健康志愿者,作为对照组。在样

本采集之前所有研究对象都未接受过任何治疗。病例组的入选标准:居住在淮安当地超过 20 年的汉族居民;依据《中国食管癌诊治指南 2020》被确诊为食管癌;未经过任何放疗化疗的首次入院者。病例组的排除标准:慢性便秘或腹泻;胃肠疾病;近一个月使用益生菌、酸奶、中药、抗生素或其他影响肠道菌群的药物;有其他肿瘤者。健康对照组的入选标准:年龄相近(± 5 岁)、性别相同且来自同社区的健康个体;居住在淮安当地超过 20 年的汉族居民。健康对照组的排除标准:慢性便秘或腹泻;近一个月使用过益生菌、酸奶、中药或抗生素。本研究经东南大学附属中大医院临床研究伦理委员会批准(2021ZDKYSB004)。调查开始前,所有入选者都签署了书面知情同意书。

1.2 研究方法

1.2.1 临床资料收集 收集所有受试者的人口学特征资料(性别、年龄、吸烟史、饮酒史、饮食习惯等)及病理学资料(肿瘤分期、分化、转移等)。调查问卷由受访者现场填写,病例组病理学资料则由调查员查阅病历获得。

1.2.2 粪便采集 本研究收集首次诊断为食管癌、未经放化疗和抗生素治疗的新入院患者和健康对照的晨起粪便标本约 5 g,置于具盖粪便样本盒中,密封冷链转运至实验室, -80°C 保存。用时去除表面粪便,深挖表层下 0.3 cm 粪便样本,准确称量 0.2 g 用于微生物基因组 DNA 提取。其余样本随即保存于 -80°C 冰箱中以便后期使用。

1.2.3 粪便基因组 DNA 提取 粪便中细菌基因组 DNA 提取按照粪便 DNA 提取试剂盒(DP328, 中国天根)进行。利用质量体积分数 1%琼脂糖凝胶电泳检测抽提的基因组 DNA 的完整性。

1.2.4 全长 16S rDNA 序列扩增及 PacBio SMRT 测序技术 用聚合酶链反应和引物 27F 5'-AGRGTTYGATYMTGGCTCAG-3'和 1492R 5'-RGYTACCTTGTTACGACTT-3'扩增 16S rDNA 基因的 V1~V9 区。采用第三代测序平台 PacBio 对 4 例食管癌患者(从 120 例食管癌患者中随机选取)及 1:1 匹配的健康对照者样本进行全长 16S rDNA 测序后,通过 SMRTLINK(v9)获得环形一致性序列。

1.2.5 操作分类单元(operational taxonomic uni, OUT)聚类和物种注释 采用 Uparse 软件(版本 7.0.1001)进行 OUT 聚类。以 97%的一致性将所有样品的有效数据聚类成相同的 OTU。对于每个代表性序列,使用 Silva 数据库(<http://www.arb-silva.de/>)来注释分类信息,比对阈值设置为 70%,获得各个分类水平的分类学信息:界、门、纲、目、科、属、种。为了研究不同 OTU 的系

统发育关系,以及不同样品中优势物种的差异,采用 MUSCLE 软件(版本 3.8.31)进行多序列比对。

1.2.6 食管癌特征肠道微生物的验证 采用 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 法检测首次诊断为食管癌的新发病例 120 例和性别、年龄匹配的健康对照 60 例中的食管癌特征性肠道微生物肠杆菌 *E.20*、唾液链球菌 *JIM8777*、马赛拟杆菌。引物序列见表 1。实时荧光定量 PCR 反应体系:SYBR® Green qPCR Master Mix 10 μL ;上下游引物各 0.4 μL ;DNA 模板 2 μL ;无菌水 7.2 μL 。扩增条件: 95°C 预变性 2 min; 95°C 变性 15 s,引物退火温度退火 30 s, 72°C 延伸 30 s(40 个循环);熔解曲线(60°C ~ 95°C 每升温 0.3°C 收集荧光)。每次实验设置标准品和灭菌双蒸水阴性对照同时进行扩增,各待测样品检测时设置 3 个平行复孔。反应结束后根据熔解曲线分析反应产物的特异性。

表 1 荧光定量 PCR 细菌引物

Table 1 Real-time PCR primers

引物名称 (Primer)	上游引物 (Forward primer) (5'-3')	下游引物 (Reverse primer) (5'-3')	熔解温度 (Melting temperature)/ $^{\circ}\text{C}$	产物大小 (Product)/bp
肠杆菌 <i>E.20</i> (<i>Enterobacter</i> <i>sp. E.20</i>)	GCGGTCTGTCAAGT CGGATGTG	TCTACGCATTTTCACG CTACACCTG	61.7	119
唾液链球菌 <i>JIM8777</i> (<i>Streptococcus</i> <i>salivarius</i> <i>JIM8777</i>)	GAAAGCGGCTCTCT GGTCTGTAAAC	CTCATCGTTTACGG CGTGGACTAC	60.1	97
马赛拟杆菌 (<i>Bacteroides</i> <i>massiliensis</i>)	GGGAGCGTAGATG GGTTGTTAAGTC	CGCCTACCTCAACT GTACTCAAGAC	59.6	99

1.3 统计学分析

采用 SPSS 25.0 软件对研究数据进行统计分析。组间比较采用 *t* 检验或 Wilcoxon 秩和检验。采用 mothur(v.1.30.1)分析 α 多样性指数,包括 Chao1^[14]、Ace^[15]、Shannon Wiener^[16]和 Simpson Diversity^[17]。利用 QIIME 软件(v.1.8.0)基于 UniFrac 上的距离进行 β 多样性分析。采用线性判别分析(linear discriminant analysis, LDA)、组间群落差异分析(linear discriminant analysis effect size, LEfSe)、Kruskal-Wallis 检验对组间肠道菌群的菌种差异进行分析。利用 PICRUSt(v.2.3.0-b)软件,根据京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)数据库,对测序数据进行 KEGG 基因注释,并预测相关通路和功能。应用 R(版本 2.15.3)和 Cytoscape(<http://www.cytoscape.org>)分析两组中的优势菌群物种(丰度排名前 30%)的相关性,并绘制相关性网络图。检验水准 $\alpha=0.05$ 。应

用受试者工作曲线分析差异微生物的诊断价值。

2 结果

2.1 临床样本组间差异

本研究纳入食管癌患者 120 例,匹配的健康对照 60 例。食管癌组平均年龄为 66.3 岁,健康对照组平均年龄为 64.9 岁,病例组与健康对照组的人口学特征资料及病理学资料如表 2 所示。两组人群年龄、性别构成及饮食习惯方面差异均无统计学意义($P>0.05$)。

表 2 食管癌患者和健康对照人群的人口学特征
Table 2 Demographic characteristics of patients with esophageal cancer and healthy controls

特征(Demographic characteristic)	食管癌组(Esophageal cancer group)(n=120)	健康对照组(Healthy control group)(n=60)	P
年龄(Age, years)	66.3±4.7	64.9±4.0	0.153
性别,男/女 (Sex, male/female)	100/20	50/10	—
吸烟(Tobacco smoking), n(%)	72(61.3)	28(46.6)	0.091
饮酒(Alcohol intake), n(%)	67(55.8)	31(51.6)	0.599
饮食习惯 (Dietary habits), n(%)			
嗜辣(Spicy food)	49(40.8)	21(35.0)	0.452
嗜烫(Hot food)	41(34.2)	14(23.3)	0.138
嗜冷(Cold food)	9(7.5)	2(3.3)	0.274
嗜硬(Hard food)	21(17.5)	5(8.3)	0.100
嗜酸(Sour food)	16(13.1)	4(6.7)	0.182
嗜咸(Salty food)	42(34.8)	19(30.4)	0.658
油炸(Fried food)	0(0)	0(0)	—
肿瘤分期(Tumor stage), n(%)			
1	5(4.2)	—	—
2	19(15.8)	—	—
3	71(59.1)	—	—
无信息(No information)	25(20.8)	—	—
肿瘤分化 (Tumor differentiation), n(%)			
低分化(Poor)	12(10.0)	—	—
中分化(Moderate)	66(55.0)	—	—
高分化(Well)	7(5.8)	—	—
无信息(No information)	35(29.1)	—	—
肿瘤转移 (Tumor metastasis), n(%)			
转移(Metastasis)	49(40.8)	—	—
未转移(Non-metastasis)	57(47.5)	—	—
无信息(No information)	14(11.6)	—	—

2.2 测序基本信息及多样性

本研究基于 PacBio SMRT 测序技术对食管癌患者及匹配的健康对照的菌群结构进行解析。聚类后得到 OTU 代表序列 796 个,并进行数据库比对及物种注释。

样本的稀释曲线(图 1A)显示,随着测序数量的增加,稀释曲线趋于平坦,表明样本的测序结果是具有代表性的。样本的 α 多样性指数如表 3 所示,食管癌组的 Ace、Chao1、Simpson Diversity、Shannon Wiener 指数均高于健康对照组($P<0.05$)。

对食管癌患者及匹配的健康对照进行 β 多样性分析,主坐标分析(图 1B)发现食管癌组和健康对照组散点簇分离,两组间菌群分布有差异。同时,基于食管癌组和健康对照组之间聚类树分析(图 1C)显示食管癌患者的肠道微生物物种组成与健康对照人群差异有统计学意义。

2.3 肠道菌群组成结构

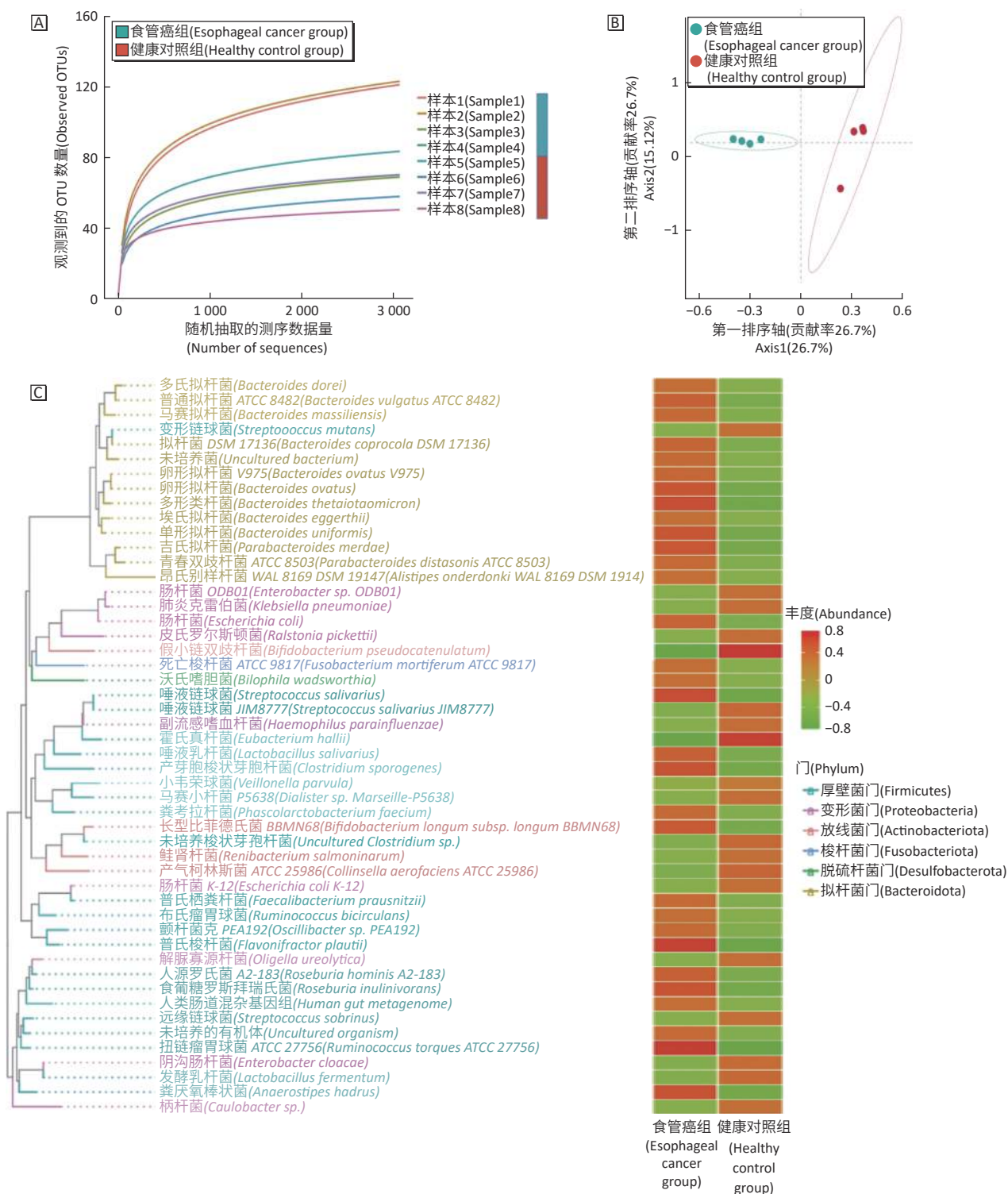
进一步分析两组人群肠道菌群在不同水平上的微生物组成,发现食管癌患者肠道微生物组成及丰度与健康个体明显不同。两组人群不同菌群在菌门水平上的相对丰度如图 2A 所示。食管癌组共检出 8 个门,健康对照组共检出 7 个门。食管癌组中以厚壁菌门、拟杆菌门、变形菌门为最优势门。健康对照组中以梭杆菌门、放线菌门和拟杆菌门为最优势门。与健康对照组相比,食管癌病人肠道菌群中,变形菌门、拟杆菌门、厚壁菌门丰度增加,梭杆菌门丰度降低,差异具有统计学意义($P<0.05$)。

不同菌群在菌属水平上的相对丰度如图 2B 所示,所有样本中总共检测到 103 个属。食管癌组中的优势菌属为埃希氏-志贺氏菌属、拟杆菌属和考拉杆菌属。健康对照组中以埃希氏-志贺氏菌属、链球菌属、克雷伯氏菌属、肠杆菌属、青枯菌属为优势菌属。选取食管癌组和健康对照组丰度最高的 20 个属进行差异分析,经统计学检验发现 4 位食管癌患者的肠道菌群与健康对照相比菌属相对丰度有差异且有统计学意义的有 5 个,其中相对丰度增加的有 4 个,分别是毛螺旋菌属、巴氏杆菌属、罗斯氏菌属和拟杆菌属。和健康组相比,青枯菌属在食管癌组丰度降低。

不同菌群在菌种水平上的相对丰度如图 2C 所示,所有样本共检测到 227 个种水平的细菌,食管癌组特有的种为 119 个,健康对照组特有的种为 56 个。与健康对照人群相比,食管癌患者具有更高的菌种特异性。食管癌组的优势菌种包括大肠杆菌、粪考拉杆菌、单形拟杆菌。健康对照组中以大肠杆菌、肺炎克雷伯菌、唾液链球菌、肠杆菌 DB01、皮氏罗尔斯通氏菌为优势菌种。经统计学检验(表 4),4 位食管癌患者的肠道菌群与健康对照相比,菌种相对丰度有差异且有统计学意义的有 14 个,其中相对丰度增加的有 11 个,分别是肠杆菌

E.20、卵形拟杆菌未分类、副沙门氏菌不可培养物、卵形拟杆菌 V975、拟杆菌未分类、拟杆菌不可培养物、普氏栖粪杆菌、肠杆菌不可培养物、食葡萄糖罗氏菌

菌、罗氏菌未分类、马赛拟杆菌($P < 0.05$)。在健康人肠道菌群中相对丰度更高的分别是皮氏罗尔斯通氏菌、肠杆菌未分类、唾液链球菌 *JIM8777*($P < 0.05$)。



[注] A: 测序样本的稀释曲线; B: 食管癌组和健康对照组之间 OTU 相对丰度不同的主坐标分析图, Axis1 的贡献率为 26.7%, Axis2 的贡献率为 15.12%; C: 食管癌组和健康对照组之间的聚类树分析。

[Note] A: Dilution curve of sequencing samples; B: Principal coordinate analysis map with different relative abundances of OTUs between the esophageal cancer group and the healthy control group, the contribution rate of Axis1 is 26.7%, and the contribution rate of Axis2 is 15.12%; C: The aggregation tree between the esophageal cancer group and the healthy control group.

图 1 食管癌患者及匹配的健康对照肠道菌群测序的基本信息及多样性分析

Figure 1 Basic information and diversity analysis of gut microbiota sequencing in patients with esophageal cancer and matched healthy controls

表 3 食管癌患者及健康对照组 α 多样性分析

Table 3 Analysis of alpha diversity in patients with esophageal cancer and healthy controls

α多样性 (α diversity)	食管癌组(Esophageal cancer group)(n=4)	健康对照组(Healthy control group)(n=4)	P
Ace	352.54±386.18	72.15±14.50	0.015
Chao1	304.81±303.78	71.18±14.12	0.015
Shannon Wiener	5.31±1.44	3.87±0.35	0.031
Simpson Diversity	0.94±0.04	0.82±0.08	0.015

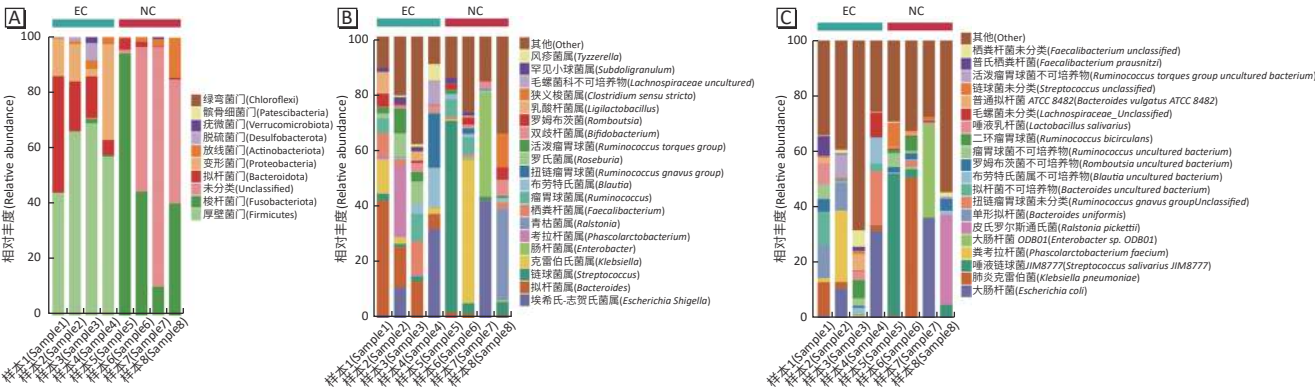


图 2 食管癌患者及匹配的健康对照组肠道菌群的门(A)、属(B)、种(C)水平组成

Figure 2 The phylum (A), genus (B), and species (C) level compositions of gut microbiota in patients with esophageal cancer and matched healthy controls

表 4 食管癌患者及健康对照组差异菌种丰度

Table 4 Abundances of different species of gut microbiota in patients with esophageal cancer and healthy controls

菌种 (Species)	食管癌组 (Esophageal cancer group)(n=4)	健康对照组 (Healthy control group)(n=4)	P
皮氏罗尔斯通氏菌 (<i>Ralstonia pickettii</i>)	0.00±0.00	248.75±247.75	0.018
肠杆菌E.20 (<i>Enterobacter</i> sp. E.20)	2.50±0.29	0.00±0.00	0.019
卵形拟杆菌 (<i>Bacteroides ovatus</i>)	25.00±14.44	0.00±0.00	0.020
副沙门氏菌不可培养物 (<i>Parasutterella</i> _uncultured bacterium)	8.25±4.23	0.00±0.00	0.020
卵形拟杆菌V975 (<i>Bacteroides ovatus</i> V975)	22.75±19.44	0.00±0.00	0.021
拟杆菌未分类 (<i>Bacteroides</i> _Unclassified)	27.75±3.07	0.00±0.00	0.021
拟杆菌不可培养物 (<i>Bacteroides</i> _uncultured bacterium)	153.25±110.04	0.00±0.00	0.021
肠杆菌未分类 (<i>Enterobacter</i> _unclassified)	0.00±0.00	9.50±5.44	0.021
普氏栖粪杆菌 (<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>)	91.50±65.92	0.00±0.00	0.021
肠杆菌不可培养物 (<i>Enterobacter</i> _uncultured bacterium)	21.75±14.30	0.00±0.00	0.021
食葡萄罗斯拜瑞氏菌 (<i>Roseburia inulinivorans</i>)	46.75±25.33	0.00±0.00	0.021
罗氏菌未分类 (<i>Roseburia</i> _unclassified)	49.25±21.58	0.00±0.00	0.021
唾液链球菌JIM8777 (<i>Streptococcus salivarius</i> JIM8777)	0.00±0.00	449.75±370.88	0.021
马赛拟杆菌 (<i>Bacteroides massiliensis</i>)	23.50±20.85	0.00±0.00	0.047

2.4 食管癌特征性肠道微生物

食管癌组和健康组差异有统计学意义的种水平肠道微生物数量分别为 23 和 10。LEfSe 分析发现,在 LDA 评分≥3 时,两组间微生物群落有较大的差异,如图 3 所示。在食管癌组富集人源罗氏菌、肠杆菌不可培养物、拟杆菌不可培养物等;在健康对照组富集皮氏罗尔斯通氏菌、肠杆菌未分类、产气柯林斯菌 ATCC25986 等($P<0.05$)。

2.5 肠道菌群间相关性

食管癌患者肠道微生物内部的相关性网络分析图如图 4A 所示,健康人肠道微生物间的相关性网络分析如图 4B 所示,由图可以发现,食管癌病人肠道细菌间的相互联系不同于健康对照。食管癌患者与健康对照肠道菌群内部优势菌种的相关系数大多为正,这表明优势菌种之间存在协同作用,存在互相共生共存。

2.6 肠道菌群功能预测分析

肠道菌群功能预测结果如图 5。发现食管癌组与健康组在丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢(map00250)、肽聚糖生物合成(map00550)、叶酸一碳单位库(map00670)、硫胺素代谢(map00730)、氨基酸的生物合成(map01230)通路的差异具有统计学意义($P<0.05$)。

2.7 食管癌特征性肠道微生物的验证分析

基于 LEfSe 分析、差异菌种分析、相关性网络分析筛选核心菌群,发现肠杆菌 E.20、马赛拟杆菌、唾液链球菌 JIM8777 出现在三种筛选结果的交集,如图 6A。利用 120 例食管癌患者和 60 例健康人群的大样本进行实时荧光定量 PCR 检测进一步验证。实验结果如图 6B,在验证人群的研究中,与健康对照人群相比,食管癌人群的肠杆菌 E.20、马赛拟杆菌的丰度升高,唾

液链球菌 *JIM8777* 的丰度降低, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.8 联合评分诊断食管癌的受试者工作曲线分析

基于肠杆菌 *E.20*、唾液链球菌 *JIM8777*、马赛拟杆菌的判别模型结果如图 7 所示, 在受试者工作曲线

中曲线下面积 (area under curve, AUC) 为 0.779, 95% 置信区间 (confidence interval, CI): 0.699~0.859, 效果优于单一菌种的判别模型 (判别模型肠杆菌 *E.20*、唾液链球菌 *JIM8777*、马赛拟杆菌受试者工作曲线中 AUC 分别为 0.610、0.608、0.659)。

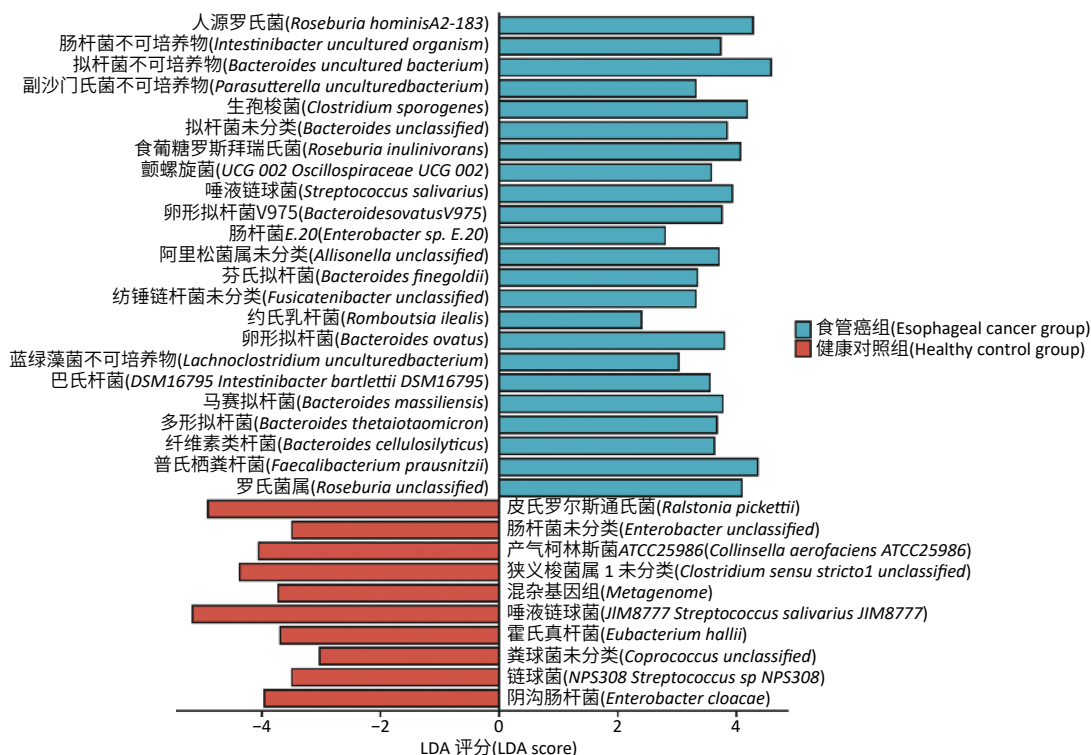
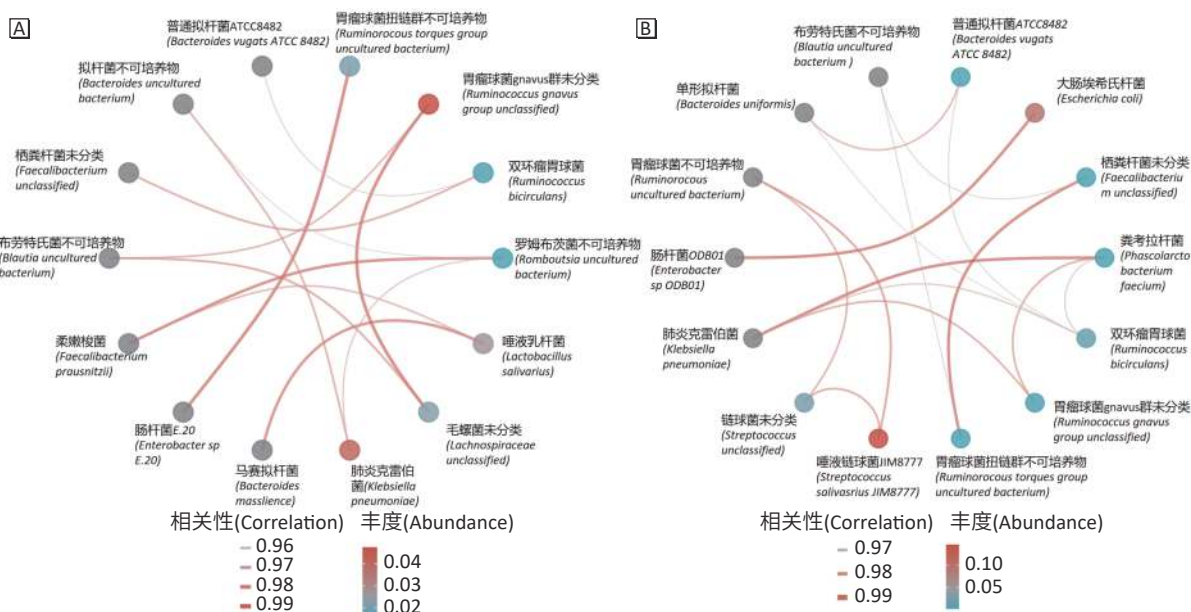


图 3 食管癌组与健康组的 LefSe 分析

Figure 3 LefSe analysis of esophageal cancer group and healthy control group

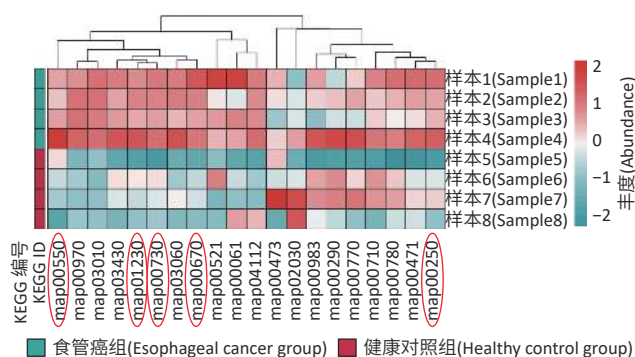


[注] 每点代表不同菌种, 点之间线的颜色表示相关性的差异, 圆圈的颜色表示微生物的相对丰度。

[Note] Each dot represents a specific species. The color of the line between the dots represents the difference in correlation. The color of the circle represents the relative abundance of a specific microorganism.

图 4 食管癌患者 (A) 和健康对照 (B) 肠道菌群间的相关性分析

Figure 4 Co-occurrence network analysis of gut microbiota in patients with esophageal cancer (A) and healthy controls (B)

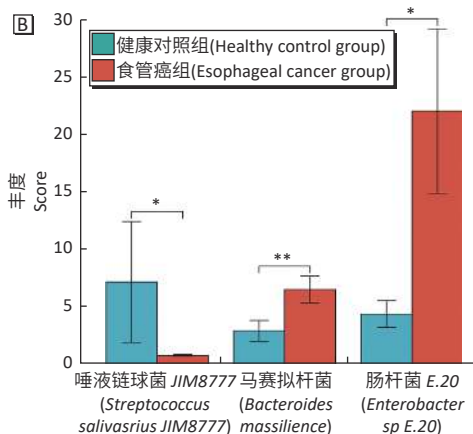
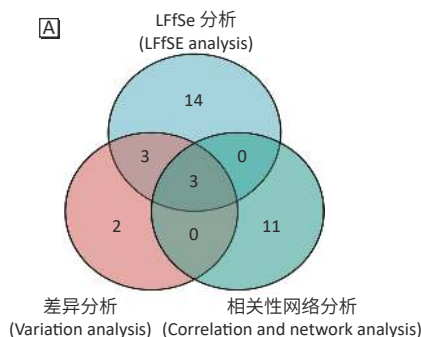


[注] 横坐标为富集到的 KEGG 数据库主要的代谢通路, 纵坐标表示各测序样本, 热图的颜色表示各样品富集到通路的相对丰度, 颜色越红表示相对丰度越高, 越蓝表示相对丰度越低。两列间连线为功能聚类结果, 按相似程度距离远近划分。两者距离越近, 其功能越相似。

[Note] The abscissa represents the main metabolic pathway of the KEGG. The ordinate coordinate represents each sample. The color of the heat map indicates the relative abundance of the sample enriched to the pathway. The redder the color, the higher the relative abundance, and the bluer, the lower the relative abundance. The connection between two columns is a functional clustering result, divided according to the degree of similarity and distance. The closer the two are, the more similar their functions are.

图 5 肠道菌群功能预测差异分析

Figure 5 Differential analysis of gut microbiota function prediction



[注] *: $P < 0.05$. A: 基于差异分析、相关性网络分析及 LfSe 分析核心筛选核心菌群; B: 核心菌群相对丰度的大样本人群验证。

[Note] *: $P < 0.05$. A: Screening of important microbiota based on variation analysis, co-occurrence network analysis and LfSe analysis; B: Validation of important microbial relative abundance by large population samples.

图 6 核心菌群的筛选及其相对丰度的大样本人群验证

Figure 6 Screening of important microbiota and validation of relative abundance by large population samples

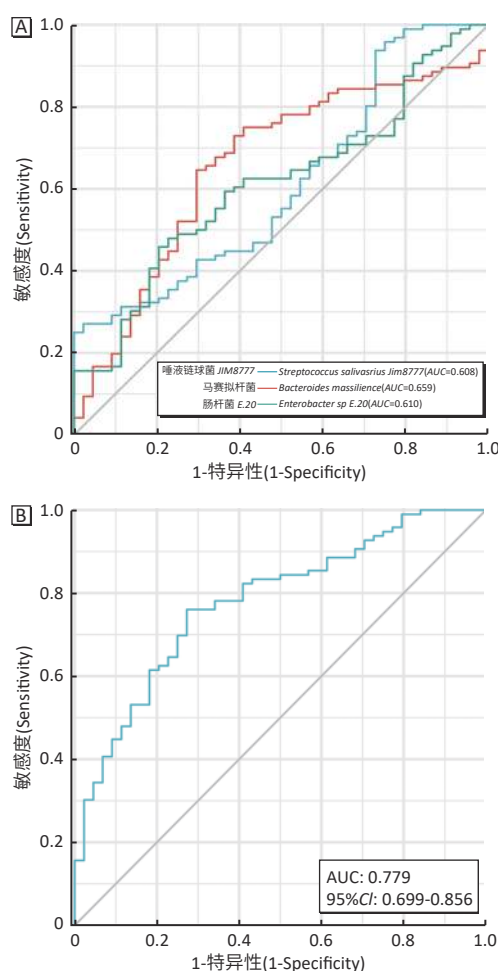


图 7 单独 (A) 及联合 (B) 评分诊断食管癌的受试者工作曲线分析

Figure 7 Receiver operating characteristic curve analysis of single (A) and combined (B) scores in diagnosis of esophageal cancer

3 讨论

食管癌是中国区域性高发的肿瘤。食管癌高发区江苏淮安的病理-对照研究分析发现, 食管癌患者的肠道菌群结构发生了显著变化, 在 α 多样性分析时发现食管癌患者肠道菌群的物种丰富度和均匀度增加, 其多样性也增加, 而肠道菌群多样性的增加是肠道菌群失衡的典型表现。肠道菌群因其对健康的重要作用又被称为“人体第二基因组”。正常情况下, 肠道菌群之间保持动态平衡, 共同维持机体健康^[18]。肠道菌群失衡与许多肠外疾病甚至肿瘤相关, 如乳腺癌、肝细胞癌、胃癌与结肠癌等^[19-20]。

本研究发现食管癌患者肠道菌群中厚壁菌门和拟杆菌门丰度增加。厚壁菌门和拟杆菌门作为人和动物肠道的优势菌门, 在维持宿主肠道微生物环境中发挥着重要作用, 也有文献报道厚壁菌门和拟杆菌门丰度的增加与体内持续低浓度炎症相关^[21]。肠道微生物

可通过诱导炎症,调节免疫系统-微生物-肿瘤轴,影响新陈代谢,改变肿瘤微环境,影响癌症的发生发展^[22]。

本研究发现食管癌患者体内毛螺旋菌属、巴氏杆菌属、马赛拟杆菌、食葡萄糖罗斯拜瑞氏菌、普氏栖粪杆菌等短链脂肪酸产生菌丰度增高。有研究表明短链脂肪酸是微生物介导的能量代谢过程中最常见的代谢物^[23],主要包括醋酸盐、丙酸盐和丁酸盐,由胃肠道的常驻细菌产生,是宿主细胞中炎症、分化和凋亡的重要调节因子,在细菌能量代谢和肠道健康中起着关键作用^[24],且短链脂肪酸中的丁酸能够激活脂代谢相关信号通路,通过肠-脑轴调控糖脂代谢。目前报道中发现结直肠癌患者的肠道细菌分泌的丁酸盐能够激活磷脂酰肌醇-3-激酶-蛋白激酶途径,产生次级胆汁酸与细菌毒素,来促进结肠肿瘤的形成^[8,11]。毛螺旋菌属是肥胖相关代谢异常的差异性肠道菌群标志物,对2型糖尿病和肥胖的发展起重要作用,具有代谢色氨酸等氨基酸的能力^[25]。普氏栖粪杆菌与肥胖和糖尿病有关,且与热量摄入无关。一项研究发现肥胖儿童的普氏栖粪杆菌水平高于非肥胖对照者^[26],本研究PICRUST预测也发现食管癌组与健康组在氨基酸代谢、糖代谢及维生素代谢等的变化相符。在筛选出的差异菌属中,拟杆菌属丰度增加,目前报道中也发现其与乳腺癌有关联^[27],本研究发现与食管癌有关联,提示拟杆菌可能和肿瘤的关系比较密切。拟杆菌的代谢产物包括短链脂肪酸、石胆酸、雌激素等,可能引起上皮间质转化并调节线粒体代谢来影响癌细胞生长。

本研究经大样本人群验证发现肠杆菌 *E.20*、马赛拟杆菌在食管癌患者肠道菌群中富集。肠杆菌 *E.20* 作为脂多糖产生菌与垂体腺癌相关,其产生的代谢产物脂多糖能够激活 Toll 样受体 4 介导自噬,促进食管鳞癌细胞增殖与细胞周期 S 期阻滞^[28-29]。马赛拟杆菌在肠外疾病如帕金森的患者的肠道菌群富集,甚至与前列腺癌等多种肿瘤呈正相关关系^[30]。唾液链球菌 *JIM8777* 是来源于唾液中的一类益生菌,很少有报道其与疾病相关^[31]。

本研究筛选的食管癌特征肠道微生物肠杆菌 *E.20*、唾液链球菌 *JIM8777*、马赛拟杆菌联合诊断对健康人和食管癌患者有较好的区分能力。这项研究首次将食管癌患者肠道菌群注释到种水平,来获得更准确更灵敏的生物标志物。未来可通过进一步研究探讨不同分期、分化、转移程度食管癌患者肠道菌群的结构,进一步筛选出可用于判断食管癌诊断及预后的最佳生物标志物。

参考文献

- [1] ARNOLD M, ABNET CC, NEALE RE, et al. Global burden of 5 major types of gastrointestinal cancer[J]. *Gastroenterology*, 2020, 159(1): 335-349.e15.
- [2] KITAGAWA Y, UNO T, OYAMA T, et al. Esophageal cancer practice guidelines 2017 edited by the Japan Esophageal Society: part 1[J]. *Esophagus*, 2019, 16(1): 1-24.
- [3] CHEN W, SUN K, ZHENG R, et al. Cancer incidence and mortality in China, 2014[J]. *Chin J Cancer Res*, 2018, 30(1): 1-12.
- [4] GBD 2017 Oesophageal Cancer Collaborators. The global, regional, and national burden of oesophageal cancer and its attributable risk factors in 195 countries and territories, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017[J]. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 2020, 5(6): 582-597.
- [5] JANDHYALA SM, TALUKDAR R, SUBRAMANYAM C, et al. Role of the normal gut microbiota[J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21(29): 8787-8803.
- [6] HOLLISTER EB, GAO C, VERSALOVIC J. Compositional and functional features of the gastrointestinal microbiome and their effects on human health[J]. *Gastroenterology*, 2014, 146(6): 1449-1458.
- [7] SHEN W, TANG D, DENG Y, et al. Association of gut microbiomes with lung and esophageal cancer: a pilot study[J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2021, 37(8): 128.
- [8] Okumura S, Konishi Y, Narukawa M, et al. Gut bacteria identified in colorectal cancer patients promote tumourigenesis via butyrate secretion[J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 5674.
- [9] Deng YL, Tang DR, Hou PF, et al. Dysbiosis of gut microbiota in patients with esophageal cancer[J]. *Microb Pathog*, 2021, 150(1): 104709.
- [10] TANAKA K, YANO M, MOTOORI M, et al. Impact of perioperative administration of synbiotics in patients with esophageal cancer undergoing esophagectomy: a prospective randomized controlled trial[J]. *Surgery*, 2012, 152(5): 832-842.
- [11] MOTOORI M, YANO M, MIYATA H, et al. Randomized study of the effect of synbiotics during neoadjuvant chemotherapy on adverse events in esophageal cancer patients[J]. *Clin Nutr*, 2017, 36(1): 93-99.
- [12] SINGER E, BUSHNELL B, COLEMAN-DERR D, et al. High-resolution phylogenetic microbial community profiling[J]. *ISME J*, 2016, 10(8): 2020-2032.
- [13] 唐勇, 刘旭. SMRT 测序技术及其在微生物研究中的应用[J]. *生物技术通报*, 2018, 34(6): 48-53.
- [13] TANG Y, LIU X. SMRT sequencing and its application in microorganism studies[J]. *Biotechnol Bull*, 2018, 34(6): 48-53.
- [14] CHAO A. Nonparametric estimation of the number of classes in a population[J]. *Scand J Stat*, 1984, 11(4): 265-270.
- [15] CHAO A, MA MC, YANG MC K. Stopping rules and estimation for recapture debugging with unequal failure rates[J]. *Biometrika*, 1993, 80(1): 193-201.
- [16] SHANNON CE. The mathematical theory of communication. 1963[J]. *MD Comput*, 1997, 14(4): 306-317.
- [17] CASO C, GIL MA. The Gini-Simpson index of diversity: estimation in the stratified sampling[J]. *Commun Stat Theory Methods*, 1988, 17(9): 2981-2995.
- [18] TÖZÜN N, VARDARELI E. Gut microbiome and gastrointestinal cancer: les liaisons dangereuses[J]. *J Clin Gastroenterol*, 2016, 50 Suppl 2: S191-S196.
- [19] YUSUF E, WYBO I, PIÉRARD D. Case series of patients with *Fusobacterium nucleatum* bacteremia with emphasis on the presence of cancer[J]. *Anaerobe*, 2016, 39: 1-3.

- [20] XU J, LIU K, MA Z, et al. Exploration of inflammation, oxidative stress, adiponectin and intestinal flora in patients with Hepatitis B, liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma[J]. *Minerva Gastroenterol* (Torino), 2021, doi: 10.23736/S2724-5985.21.03063-1.
- [21] FROHNERT BI, REWERS MJ. Metabolomics in childhood diabetes[J]. *Pediatr Diabetes*, 2016, 17(1): 3-14.
- [22] ERTZ-ARCHAMBAULT N, KEIM P, VON HOFF D. Microbiome and pancreatic cancer: a comprehensive topic review of literature[J]. *World J Gastroenterol*, 2017, 23(10): 1899-1908.
- [23] ZHANG Y, YU K, CHEN H, et al. Caecal infusion of the short-chain fatty acid propionate affects the microbiota and expression of inflammatory cytokines in the colon in a fistula pig model[J]. *Microb Biotechnol*, 2018, 11(5): 859-868.
- [24] SINGH N, GURAV A, SIVAPRAKASAM S, et al. Activation of Gpr109a, receptor for niacin and the commensal metabolite butyrate, suppresses colonic inflammation and carcinogenesis[J]. *Immunity*, 2014, 40(1): 128-139.
- [25] HENNEKE L, SCHLICHT K, ANDREANI NA, et al. A dietary carbohydrate - gut *Parasutterella* - human fatty acid biosynthesis metabolic axis in obesity and type 2 diabetes[J]. *Gut Microbes*, 2022, 14(1): 2057778.
- [26] JENSEN BA H, HOLM JB, LARSEN IS, et al. Lysates of *Methylococcus cap-*
sulatus Bath induce a lean-like microbiota, intestinal FoxP3⁺RORγt⁺IL-17⁺ Tregs and improve metabolism[J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 1093.
- [27] Parida S, Wu SG, Siddharth S, et al. A procarcinogenic colon microbe promotes breast tumorigenesis and metastatic progression and concomitantly activates Notch and beta-catenin axes[J]. *Cancer Discov*, 2021, 11(5): 1138-1157.
- [28] ISHII S, AMARASIRI M, HASHIBA S, et al. Genome sequence of *Enterobacter cloacae* strain SENG-6, a bacterium producing Histo-blood group antigen-like substances that can bind with human noroviruses[J]. *Genome Announc*, 2016, 4(4): e00893-16.
- [29] YIN WF, PURMAL K, CHIN S, et al. Long chain *N*-acyl homoserine lactone production by *Enterobacter* sp. isolated from human tongue surfaces[J]. *Sensors (Basel)*, 2012, 12(11): 14307-14314.
- [30] SHA S, NI L, STEFIL M, et al. The human gastrointestinal microbiota and prostate cancer development and treatment[J]. *Investig Clin Urol*, 2020, 61(Suppl 1): S43-S50.
- [31] Liu RX, Hong J, Xu XQ, et al. Gut microbiome and serum metabolome alterations in obesity and after weight-loss intervention[J]. *Nat Med*, 2017, 23(7): 859-868.

(英文编辑: 汪源; 责任编辑: 汪源)

· 告知栏 ·

《环境与职业医学》被 Scopus、DOAJ 数据库同时收录

由上海市疾病预防控制中心主办的《环境与职业医学》杂志(*Journal of Environmental and Occupational Medicine, JEOM*)被国际数据库 Scopus 和 DOAJ 同时收录!这是继本刊进入《世界期刊影响力指数报告》和 EBSCO 数据库后的又一重要进展。

《环境与职业医学》由上海市疾病预防控制中心主办,主要着眼于发表环境因素(自然、社会)、职业因素与人群健康的流行病学、毒理学内容的重要研究,以刊登中文文献为主(含英文摘要),月刊。所有被录用的稿件均经过同行专家评议。目前保持 CSCD(核心库)、北大核心、科技核心全收录。杂志主页: www.jeom.org。

作为中文期刊,《环境与职业医学》提供 700 字左右英文长摘要。被两大国际数据库 Scopus 和 DOAJ 同时收录,意味着本刊的期刊方针、声望、学术内容等获得了国际数据库的认可,促进了本刊国际传播的力度,提高论文在国内外的被引频次,提高作者、期刊、工作单位在国内外的学术地位和知名度。

特别感谢支持《环境与职业医学》的各位专家、作者及读者,我们将不忘初心,砥砺前行!

Scopus(<https://www.scopus.com/>)数据库是由全球最大的出版社——爱思唯尔(Elsevier)推出的科研管理、学科规划数据库,是目前全球规模最大的文摘和引文数据库,具有严格的评审标准。期刊被 Scopus 数据库收录将有利于提升其国际知名度和影响力,打通与国际主流学术平台交流的通道,增强国际学术话语权。

DOAJ(<https://doaj.org/about/>)由瑞典隆德大学图书馆设立于 2003 年 5 月,收录经同行评审的开放存取期刊,涵盖了科学、技术、医学、社会科学、艺术和人文的所有领域。DOAJ 的使命是在全球范围内提高高质量、经同行评审的开放性学术研究期刊的知名度、可及性、声誉、使用率和影响力,不受学科、地理或语言的限制。

《环境与职业医学》编辑部

2022 年 9 月 25 日