

高通量测序技术用于肠道菌群结构与大肠癌发生关系的研究

何磊 李敏

【摘要】 大肠癌是威胁人类的第三大恶性肿瘤。除了遗传因素外,肠道菌群在大肠癌发生中也起着重要作用,并逐渐成为研究热点。高通量测序技术的发展解析了在大肠癌发生中肠道菌群结构变化的规律并找到潜在致病菌。本文总结了特定肠道细菌在大肠癌发展中可能的作用及其机制,解析了肠道菌群介导大肠癌的两种发病模型,并探讨了肠道菌群的高通量测序技术用于大肠癌疾病监测的可能性。(中华检验医学杂志,2014,37:736-738)

【关键词】 结直肠肿瘤; 胃肠道; 微生物群; 高通量核苷酸测序

Application of high-throughput sequencing on gut microbiota for the diagnosis of colorectal cancer

He Lei, Li Min. Department of Clinical Laboratory, Ren Ji Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200127, China

Corresponding author: Li Min, Email: ruth_limmin@126.com

【Abstract】 Human colorectal cancer (CRC) presents a considerable disease burden worldwide. Besides the genetic factor, gut microbiota could be another important factor resulting in CRC and has become a hot research topic. Along with the increasing accessibility of high-throughput sequencing, the role of structure of microbiota and potential pathogens in colorectal carcinogenesis have become more and more clear. In this review, the recent insights into contributions of the microbiota and candidate CRC-potentiating species to CRC were discussed. Moreover, new findings on the role of candidate pathogens in cancer causation were highlighted. Two pathogenic models were introduced in this review. High-throughput sequencing of gut microbiota will assist us in understanding the pathogenesis of CRC, providing a theoretical basis for disease surveillance. (Chin J Lab Med, 2014, 37: 736-738)

【Key words】 Colorectal neoplasms; Gastrointestinal tract; Microbiota; High-throughput nucleotide sequencing

大肠癌又称结直肠癌(colorectal cancer, CRC), 是世界上最常见的恶性肿瘤之一, 其发病率和死亡率在全球范围内均高居第 3 位^[1]。众所周知, 遗传因素是 CRC 发生发展的一大重要原因^[2]。另一方面, 肠道内的菌群多样性及种群动态变化与 CRC 的发生有着千丝万缕的关系, 可能比 CRC 相关基因扮演着更为重要的角色。

近年来随着高通量组学的发展, 肠道菌群以及特定肠道致病菌与 CRC 发生的相关性成为研究的热点。通过基于 16S rDNA 的高通量测序技术, 人们可以更为深入直观地研究 CRC 患者肠道菌群结构组成, 了解肠道菌群在人体肠道甚至整个人体中的相互作用和动态变化很可能与 CRC 的发生发展相关, 并找到一些肠道相关潜在致病菌^[3-5]。此后在细胞和动物模型上的研究加深了对特定肠道细菌介导 CRC 发生作用机制的理解^[6-7]。研究者提出了关于肠道菌群在 CRC 中作用的模型, 从不同角度阐述肠道菌群在 CRC 发生发展中的作用及结构变化^[8-9]。

一、肠道菌群结构高通量测序揭示其与大肠癌相关性

DOI:10.3760/cma.j.issn.1009-9158.2014.10.005

基金项目: 国家自然科学基金(81322025, 81171623, 81371875); 上海市卫生系统优秀青年人才计划(XYQ2011039); 上海市曙光人才计划项目(12SG03)

作者单位: 200127 上海交通大学医学院附属仁济医院检验科

通信作者: 李敏, 电子信箱: ruth_limmin@126.com

肠道菌群结构紊乱与许多疾病,诸如糖尿病、肥胖、肿瘤、炎症性肠病等有关。肠道菌群异常改变及其与 CRC 相关性的研究是近年的研究热点。

Eckburg 等^[10]最早分析了粪便和大肠黏膜组织中菌群的组成,并提出了研究肠道菌群介导 CRC 发病的关键问题所在:由于技术条件、培养条件的严苛性,肠道中的大部分微生物都是无法被培养的细菌,因此肠道菌群与 CRC 的相关性研究主要依赖于各种分子生物学方法。

如用变性梯度凝胶电泳(denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)和限制性片段长度多样性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)及生物芯片等方法对肠道菌群多样性及其动态变化进行研究,但是这些方法都存在一定的缺陷,如 DGGE 和 RFLP 实验操作繁琐,耗时耗力;生物芯片只能验证已知,却无法探索未知。高通量测序技术可以对数百万个 DNA 分子同时进行测序。该技术以其数字化信号、高数据通量、高测序深度、高准确率等优点,被广泛应用于肠道菌群的研究中。其出现和应用,改变了肠道菌群结构研究的基本策略,简化了研究步骤,缩短了研究周期,同时得到的数据更加丰富。

基于高通量测序技术的肠道菌群-CRC 相关性研究首先发现 CRC 患者的肠黏膜和粪便中肠道菌群组成与健康对照组相比存在差异^[11]。其次,肿瘤宿主的癌组织和癌旁正常组织肠黏膜的菌群组成也存在很大差异^[3,4]。再次,CRC 患者的癌组织、肠腔黏膜以及粪便样本中肠道菌群组成与健康对照组相比存在差异^[12]。这些研究能帮助我们阐明特定的微生物关系,为癌症诊断提供基础。通过高通量测序检测肠道菌群结构的改变,有望成为大肠癌的早期筛查、治疗以及预后的工具。

二、肠道特定菌种与大肠癌的相关性

多项研究表明,CRC 发生可能与特定的肠道细菌感染有关^[13],早期的研究发现解链食子酸链球菌^[14]、粪肠球菌^[15]、产肠毒素型脆弱拟杆菌^[16]、大肠埃希菌^[17]均与 CRC 的发病存在一定关联。高通量测序结果表明梭杆菌属是潜在的 CRC 致病菌,并很有可能成为 CRC 的诊断监测指标和治疗靶标。几乎所有研究都发现相比于癌旁组织,梭杆菌属在 CRC 患者的癌组织中出现显著聚集^[3,4]。其中,具核梭杆菌是肠癌发生过程中的最优势细菌。推测在肿瘤形成过程中,梭杆菌可能更加适应微生态的改变,利用有利条件进入肠癌细胞中。近期,Rubinstein 等^[7]证实具核梭杆菌通过分泌特异细胞表面黏附因子 FadA,刺激 CRC 细胞产生炎症反应并促进 CRC 形成。同时,Kostic 等证明具核梭杆菌能加速癌细胞聚集,诱导促炎反应和致癌作用,促进大肠癌发生^[6]。

三、肠道菌群导致大肠癌分子模型

目前有两种肠道菌群-CRC 发病模型。

1. 基于 ETBF 的 Alpha-bug 模型:Sears 等^[8]提出某些特定肠道固有菌作为“Alpha-bug”一直存在于肠上皮细胞(colonic epithelial cells, CECs)中,通过直接(如分泌毒素蛋白直接促进 CRC)或间接(如改变肠道菌群使其更易引起黏膜免疫防御和 CECs 的变化从而诱发 CRC)方式使 CECs 发生基因突变,并将其他有益菌挤掉,促使多种共同致病菌更容易出现,引发 CRC。

2. 基于高通量测序的 Driver-passenger 模型:Marchesi 等^[5]发现 CRC 患者癌组织黏膜中有益菌高表达,而潜在致病菌却呈现低表达;癌旁正常组织黏膜中致病菌的表达量反而高于癌组织。基于此,Tjalsma 等^[9]提出肠道菌群致癌的“Driver-passenger”模型,该模型认为某些特定肠道固有菌作为 drivers 诱发 CECs DNA 损伤,促进癌变,使得肠道微生态改变,固有的 drivers(如粪肠球菌、大肠埃希菌、ETBF 等)会被一些更适宜在肠道肿瘤微生态中生存的机会致病菌甚至有益菌所替代,这些替代者被定义为 passengers(如梭杆菌、解链食子酸链球菌等)。该模型较好地解释了 CRC 晚期患者的癌组织和癌旁组织中菌群的构成和差异。

四、肠道菌群结构高通量测序在疾病监测中的应用

目前国内外主要采用的是肠道菌群的高通量测序和代谢组学相结合的方法进行包括 CRC 在内的健康监测研究。国内外多学科交叉研究团队完成了一个四世同堂的中国家庭 7 位成员的肠道菌群结构和人体代谢特征的详细分析,发现尽管属于同一个家庭,遗传背景彼此相关、生活环境相似,但每一个个体仍然具有其特有的肠道菌群结构特征;并且发现中国人的肠道菌群结构在种的水平和以往报道的 5 个美国人有明显的差异,提示我们在比较不同国家疾病发生的风险时,除了考虑遗传差异,还必须考虑肠道菌群的差异^[18]。正常情况下,人体肠道菌群处于稳定状态,在一定的饮食结构及生活模式下其结构一般不会发生改变。但是

当宿主健康情况变化时,共生的肠道菌群结构会出现相应改变。

因此,人们有望利用肠道菌群结构变化作为分子标记,诊断人类是否患有 CRC,从而使得 CRC 的筛查更加简单方便。

五、肠道菌群结构高通量测序的局限性和展望

尽管肠道菌群结构的高通量测序具有诸多优势,但其局限性不容忽视。第一,技术本身的局限性:由于其测序样本是 PCR 扩增产物,而 PCR 的通用引物并不能对所有肠道细菌进行等效扩增,有的细菌可能扩增不出来;第二,对于分析人员的要求:海量测序数据分析要求分析人员具有强大的生物信息学背景;第三,对于患者的成本:高通量测序技术不适合小规模测序,目前一个反应测序价格仍需上千元,一般患者较难接受;第四,对于医院的成本:高通量测序仪器本身价格昂贵,大多上百万元;最后,高通量测序技术能解释的生物学现象和机制有限,因此如何更好地利用组学信息,是一个很长远的问题。

高通量测序技术的发展日新月异,现有的测序平台都依赖生化反应,从而限制了测序速度。非光学显微镜成像、纳米孔和生物孔等直接测序技术是未来发展的方向^[19]。

通过研究肠道菌群在大肠癌发生中的作用,研究者正在慢慢揭开大肠癌的环境致病因素。结构失调的肠道菌群在 CRC 发生发展中具有十分重要的作用,因此肠道细菌的结构可被用作 CRC 诊断的依据;调控其结构可被用作抵抗 CRC 的武器。利用组学技术,可以筛选 CRC 早期诊断和预后判断的肠道菌群标志物,构建 CRC 的诊断标准,用于指导临床进行个体化治疗。随着高通量测序成本的进一步降低和对海量数据处理及分析能力的不断提高,未来有条件的检验科将有可能将该技术纳入常规检测项目,利用该技术建立快速检测的分子分型平台,以粪便肠道菌群结构变化作为标记来认识和早期筛查 CRC,通过监测肠道菌群的比例组成进行 CRC 患者的治疗疗效评估,为临床提供有价值的诊断、监测以及预后信息;同时临床上可以以肠道菌群结构作为潜在靶点,通过介入调整或药物干涉,为 CRC 的个体化治疗提供新的方向。

参 考 文 献

- [1] Markowitz SD, Bertagnolli MM. Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer[J]. N Engl J Med, 2009, 361:2449-2460.
- [2] 沈胤晨,王建飞,杨红鹰,等. 结直肠癌患者 BRAF 基因突变检测及其临床意义[J]. 中华检验医学杂志, 2012, 35:993-999.
- [3] Castellari M, Warren RL, Freeman JD, et al. Fusobacterium nucleatum infection is prevalent in human colorectal carcinoma[J]. Genome Res, 2012, 22:299-306.
- [4] Kostic AD, Chun E, Robertson L, et al. Fusobacterium nucleatum potentiates intestinal tumorigenesis and modulates the tumor-immune microenvironment[J]. Cell Host Microbe, 2013, 14:207-215.
- [5] Marchesi JR, Dutilh BE, Hall N, et al. Towards the human colorectal cancer microbiome[J]. PLoS One, 2011, 6:e20447.
- [6] Kostic AD, Gevers D, Pedamallu CS, et al. Genomic analysis identifies association of Fusobacterium with colorectal carcinoma[J]. Genome Res, 2012, 22:292-298.
- [7] Rubinstein MR, Wang X, Liu W, et al. Fusobacterium nucleatum promotes colorectal carcinogenesis by modulating E-cadherin/beta-catenin signaling via its FadA adhesin[J]. Cell Host Microbe, 2013, 14:195-206.
- [8] Sears CL, Pardoll DM. Perspective: alpha-bugs, their microbial partners, and the link to colon cancer[J]. J Infect Dis, 2011, 203:306-311.
- [9] Tjalsma H, Boleij A, Marchesi JR, et al. A bacterial driver-passenger model for colorectal cancer: beyond the usual suspects[J]. Nat Rev Microbiol, 2012, 10:575-582.
- [10] Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, et al. Diversity of the human intestinal microbial flora[J]. Science, 2005, 308:1635-1638.
- [11] Ahn J, Sinha R, Pei Z, et al. Human gut microbiome and risk for colorectal cancer[J]. J Natl Cancer Inst, 2013, 105:1907-1911.
- [12] Wang T, Cai G, Qiu Y, et al. Structural segregation of gut microbiota between colorectal cancer patients and healthy volunteers[J]. ISME J, 2012, 6:320-329.
- [13] Hill MJ, Drasar BS, Hawksworth G, et al. Bacteria and aetiology of cancer of large bowel[J]. Lancet, 1971, 1:95-100.
- [14] Boleij A, Dutilh BE, Kortman GA, et al. Bacterial responses to a simulated colon tumor microenvironment[J]. Mol Cell Proteomics, 2012, 11:851-862.
- [15] Wang X, Allen TD, May RJ, et al. Enterococcus faecalis induces aneuploidy and tetraploidy in colonic epithelial cells through a bystander effect[J]. Cancer Res, 2008, 68:9909-9917.
- [16] Soler AP, Miller RD, Laughlin KV, et al. Increased tight junctional permeability is associated with the development of colon cancer[J]. Carcinogenesis, 1999, 20:1425-1431.
- [17] Nougayrede JP, Homburg S, Taieb F, et al. Escherichia coli induces DNA double-strand breaks in eukaryotic cells[J]. Science, 2006, 313:848-851.
- [18] Li M, Wang B, Zhang M, et al. Symbiotic gut microbes modulate human metabolic phenotypes[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105:2117-2122.
- [19] Zhou X, Ren L, Meng Q, et al. The next-generation sequencing technology and application[J]. Protein Cell, 2010, 1:520-536.

(收稿日期:2014-04-16)

(本文编辑:韩锟)