

·临床研究·

食管鳞状细胞癌肿瘤组织内菌群检测及特征分析

洗博鸿^{1,2}, 位俊敏^{1,2}, 乔贵宾³, 陈晓辉^{1,2}, 徐方平⁴, 骆新兰⁴, 陈翼翔^{1,2}, 李子俊^{2,1}

(1. 南方医科大学第二临床医学院, 广东 广州 510515; 2. 广东省人民医院消化内科, 广东 广州 510080;

3. 广东省人民医院胸外科, 广东 广州 510080; 4. 广东省人民医院病理科, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】分析食管鳞癌患者(ESCC组)与健康对照组(HC组)肿瘤组织菌群多样性, 筛选出食管鳞癌患者肿瘤组织中特异性细菌。【方法】收集105例食管鳞癌患者肿瘤组织标本和54例健康对照者的食管组织标本, 提取标本总DNA, 用PCR方法扩增16S rDNA V4区, 后行高通量测序, 将数据做OTU聚类及多样性分析筛选食管鳞癌组织内特征菌。最后用定量PCR(Q-PCR)扩增方法验证筛选结果。【结果】多样性分析表明ESCC组肿瘤标本和HC组正常食管组织标本内菌群多样性及组成存在明显差异, 物种分析表明ESCC组以梭杆菌属(*Fusobacterium*)、孪生球菌属(*Gemella*)、奈瑟菌属(*Neisseria*)、卟啉单胞菌属(*Porphyromonas*)、链球菌属(*Streptococcus*)为主, HC组以梭杆菌属(*Fusobacterium*)、放线杆菌属(*Actinobacillus*)、链球菌属(*Streptococcus*)、普雷沃氏菌属(*Prevotella*)为主, LEfSe分析表明ESCC组卟啉单胞菌、梭杆菌属丰度升高, 且具有统计学差异($P < 0.05$)。Q-PCR验证结果表明食管鳞癌组织内牙龈卟啉单胞菌、具核梭杆菌拷贝数明显升高。【结论】食管癌肿瘤组织有其特征性的菌群组成, 与健康对照组相比, 食管鳞癌肿瘤组织中牙龈卟啉单胞菌、具核梭杆菌拷贝数明显升高, 可能是其特征性的细菌。

关键词: 食管鳞状细胞癌; 细菌; 卟啉单胞菌属; 梭杆菌属

中图分类号: R735.1

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2022)03-0480-08

DOI: 10.13471/j.cnki.j.sun.yat-sen.univ(med.sci).2022.0316

Characterization of Microbiota in Tumor Tissues of Esophageal Squamous Cell Carcinoma

XIAN Bo-hong^{1,2}, WEI Jun-min^{1,2}, QIAO Gui-bin³, CHEN Xiao-hui^{1,2},XU Fang-ping⁴, LUO Xin-lan⁴, CHEN Yi-xiang^{1,2}, LI Zi-jun^{2,1}

(1. The Second School of Clinical Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; 2. Department of

Gastroenterology, Guangdong Provincial People's Hospital, Guangzhou 510080, China; 3. Department of Thoracic

Surgery, Guangdong Provincial People's Hospital, Guangzhou 510080, China; 4. Department of Pathology,

Guangdong Provincial People's Hospital, Guangzhou 510080, China)

Correspondence to: LI Zi-jun; E-mail: zijunli2005@aliyun.com

Abstract:【Objective】To analyze the difference in esophageal microbiome between the patients with esophageal squamous cell carcinoma (ESCC group) and the healthy controls (HC group), and to screen out the characteristic bacteria in tumor tissues of patients with esophageal squamous cell carcinoma.【Methods】Esophageal tissues were collected from 105 patients with esophageal squamous cell carcinoma and 54 healthy controls. The total DNA of the samples was extracted, and the 16S rDNA V4 region was amplified by PCR, followed by high-throughput sequencing. The data were subjected to OTU clustering and diversity analysis to screen the characteristic bacteria in the ESCC group. Finally, the screening results were to be verified by Q-PCR amplification.【Results】Diversity analysis showed that there were differences in diversity and composition between the ESCC group and the HC group. Species analysis showed that the main components of micro-

收稿日期: 2022-01-29

基金项目: 广州市科技计划项目(201804010458)

作者简介: 洗博鸿, 硕士生, 住院医师, 研究方向: 微生物与食管癌, E-mail: 494600652@qq.com; 李子俊, 通信作者, 主任医师, 研究方向: 微生物与食管癌, E-mail: zijunli2005@aliyun.com

biome in the ESCC group were *Fusobacterium*, *Gemella*, *Neisseria*, *Porphyromonas* and *Streptococcus*. While in the HC group the main components of microbiome were *Fusobacterium*, *Actinobacillus*, *Streptococcus* and *Prevotella*. The LEfSe analysis showed that the expression of porphyrin and *Fusobacteria* in the ESCC group increased and the difference is statistically significant ($P < 0.05$). The results of Q-PCR showed that the presence of *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum* in the ESCC group significantly increased.【Conclusions】 Esophageal cancer has its characteristic flora composition. *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum* in esophageal squamous cell carcinoma tumor tissue are the characteristic bacteria.

Key words: esophageal squamous cell carcinoma; bacteria; *Porphyromonas*; *Fusobacterium*

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2022, 43(3): 480-487]

食管鳞状细胞癌是一种发生率高、死亡率高的癌症。2020年报道食管癌在全球发病率排名第六,死亡率排名第六,5年生存率为20%,仅次于“癌中之王”胰腺癌^[1-2]。其中53%的食管癌发生在中国,而在中国90%食管癌是食管鳞状细胞癌^[3]。因此,食管鳞状细胞癌是中国特色癌,其中又以山西、广东潮汕、河北、江苏、四川、河南为6个高发区^[4],说明食管鳞癌具有地区特色。目前,食管鳞癌的病因尚未明确,多认为与吸烟、饮酒、生活习惯、饮食习惯相关。近年来,由于生物学高通量测序技术的发展,肿瘤微生态的研究已成为目前热点之一。多项研究表明,不同肠道微生物群的组成能通过影响细胞代谢和免疫功能参与肿瘤的发生发展。类似于幽门螺杆菌引起胃癌,近年来研究发现在多种肿瘤组织及其癌旁正常组织中普遍存在细菌,这些细菌的种类差异与PD-1等免疫治疗疗效相关。而小鼠结直肠癌组织测序研究也表明:原发癌灶和转移灶标本中微生物群保持着一定的稳定性^[5]。另外,也有研究发现鼠沙门氏菌^[6]、牙龈卟啉单胞菌^[7-9]等通过局部炎症反应、调节免疫等途径在胃肠道肿瘤的发展中发挥重要的作用。在食管癌中,最近研究发现食管鳞状细胞癌可能与具核梭杆菌、牙龈卟啉单胞菌感染相关,但缺乏验证,也未对其具体功能及作用途径进行研究^[10]。目前食管微生物群落和食管鳞状细胞癌关系的研究样本量均较少,并且只有横断面的研究^[11]。因此,有关食管鳞状细胞癌中食管微生物群落分布及功能作用值得深入进一步研究。基于以上发现,我们使用16s rDNA测序方法研究广东食管鳞癌患者组织中的微生物菌群,期望在食管鳞癌患者癌组织中找出其特征性的细菌,为下一步研究细菌在食管鳞癌发病中的作用提供依据。

1 材料与方法

1.1 研究对象

入选标准:纳入于2014年1月-2015年12月所有就诊于广东省人民医院初诊为食管鳞癌的患者。同期挑选每年体检未发现器质性疾病、口腔疾病、肿瘤家族史的健康人食管组织作为健康对照组。排除标准:①合并其他部位肿瘤、器质性疾病、HBV、HCV疾病;②手术前4周内感染性疾病史;③手术前4周内使用抗生素或PPI或其他抑酸药物;④手术前4周内服用激素、调节肠道菌群相关药物,如培菲康、金双歧、适怡等微生态制剂。两组在年龄、性别比例以及民族3项指标匹配。本课题已经在广东省人民医院(广东省医学科学院)医学研究伦理委员会申请并通过审批,纳入的研究对象均已签署知情同意书。患者和健康受试者随机分为筛查组和验证组。所有食管癌患者组织均经病理活检证实为食管鳞状细胞癌。

1.2 研究方法

1.2.1 组织标本收集 食管癌组织标本来源于广东省人民医院胸外科及病理科,每例标本取癌灶中心组织,用中性缓冲福尔马林液固定,石蜡包埋,连续切片5张,厚度4 μm ,分别置于涂有防脱片剂的玻片上备用。健康受试者取本院体检对象并行内镜检查者,在内镜下观察食管黏膜正常的中段位置,活检组织两块,用中性缓冲福尔马林液固定后立即存放于-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

1.2.2 DNA提取及储存 使用UltraClean[®] Microbial DNA Isolation Kit(美国,MOBI公司)试剂从组织切片中提取细菌DNA,具体提取方法按照试剂盒说明书进行。收集滤液,保存在-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱。要求DNA总量 ≥ 150 ng;DNA浓度 > 5 ng/ μL ;有明显主

带,无降解、无RNA和蛋白质等杂质污染。

1.2.3 16s rDNA 测序和数据处理 对合格的DNA样品取适量置于离心管中,根据V4区使用带Barcode的引物515F和806R,进行PCR,PCR在缓冲液中进行,另外加入2×Premix Taq引物酶及dNTP,然后进行热循环,在94℃条件下变性5 min,再进行30个扩增循环(包括94℃变性30 s,52℃退火30 s及72℃延伸30 s),再于72℃充分延伸10 min。最后置于4℃保存。用1%琼脂糖凝胶电泳检测PC产物的片段长度和浓度,主带长度在正常范围内的样品可用于进一步的研究。利用GeneTools Analysis Software对PCR产物进行浓度对比后,按照等质量原则计算各样品所需体积,将各PCR产物进行混合。使用E.Z.N.A.GelExtractionKit凝胶回收试剂盒回收PCR混合产物,TE缓冲液洗脱回收目标DNA片段。按照NEBNextUltraD-NA Library Prep Kit for Illumina®标准流程进行建库操作。使用Illumina HiSeq2500平台对构建的扩增子文库进行PE250测序。利用Trimmomatic软件对测序数据进行Paired-end raw Reads过滤,利用FLASH对每对PE reads进行拼接,利用Mothur软件进行Raw Tags序列质量过滤,最终得到有效的拼接片段(Clean Tags)。

1.2.4 生物信息学分析 使用UPARSE软件(V10)将所有样品的全部cleantag进行聚类,以97%的一致性将序列聚类成OTUs (operational taxonomic units)。将其中具有代表性的序列进行物种分类注释,最后进行Alpha多样性分析、Beta多样性分析及LEfSe分析。

1.2.5 Q-PCR方法验证靶细菌 通过Q-PCR检测靶细菌的表达水平。根据筛选出来的靶细菌设计特异性引物序列,用紫外分光光度计测定阳性重组质粒的浓度。然后将质粒稀释10倍,分别用 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 等浓度的样品绘制标准曲线,然后作为DNA标准品置于-20℃保存。将SYBR Mix 10 μL、上游引物0.6 μL、下游引物0.6 μL、DNA模板1 μL混合,加入无菌水至共20 μL。上机后第一步在95℃下反应30 s共1个循环,第二步在95℃下反应5 s后在60℃下反应30 s共40个循环。最后将每份样品的DNA稀释到100 ng/μL下检测DNA的含量,每次样品检测重复3次,取平均值,通过标准曲线计算目标细菌在样品中的表达量,以拷贝数表示。

1.3 统计学方法

采用SPSS 22.0软件进行统计分析, $P<0.05$ 认为差异有统计学意义。采用Mann-Whitney *U*检验比较细菌相对丰度的差异,差异采用独立样本*t*检验比较年龄和细菌拷贝数量的差异,采用卡方检验检测性别、吸烟、饮酒、拷贝数的差异,使用对数转换使拷贝数具有方差齐性。LEfSe分析上首先采用多组比较的秩和检验检测不同分组间丰度差异显著的物种,有统计学意义的组间进行两两比较,最后用线性判别分析(LDA)来实现降维和评估差异显著物种的影响大小(LDA Score),设置该大小的筛选值 ≥ 2 。利用SPSS 22.0软件绘制ROC曲线。

2 结果

2.1 患者情况

本研究纳入ESCC患者共105例,健康对照组共54例,均为汉族,其中筛选组纳入ESCC患者42例,健康对照组37例;验证组纳入ESCC患者63例,健康对照组17例。

2.2 16SrDNA 测序筛选靶细菌

2.2.1 OTU 构建及物种分析 通过对筛选组样品提取的序列进行拼接,过滤掉低质量序列后,ESCC组和健康对照组的组织样本共获得29 281 618条序列,平均每个样本为532 393条。ESCC组获得序列平均为523 243条,健康对照组获得序列平均为543 372条。以97%的一致性将序列聚类为OTU。

对样本OTU聚类进行分析,在phylum(门)和genus(属)水平统计分析各样本的群落组成。物种分析表明,在门水平上,两组相对丰度 $\geq 1\%$ 的优势菌门相同,均为放线菌门(*Actinobacteria*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、厚壁菌门(*Firmicutes*)、梭杆菌门(*Fusobacteria*)变形菌门(*Proteobacteria*)、螺旋体门(*Spirochaetes*),虽然两组的物种组成差异不大,但丰度比例却不相同。ESCC组与HC组相比,厚壁菌门、拟杆菌门及梭杆菌门丰度升高,而放线菌门及变形菌门丰度明显降低(图1)。

在属水平,ESCC组以梭杆菌属(*Fusobacterium*)、孪生球菌属(*Gemella*)、奈瑟菌属(*Neisseria*)、卟啉单胞菌属(*Porphyromonas*)、链球菌属(*Streptococcus*)为主,健康对照组以梭杆菌属(*Fusobacterium*)、放线杆菌属(*Actinobacillus*)、链球菌属(*Streptococcus*)、普雷沃氏菌属(*Prevotella*)为主,其中相比

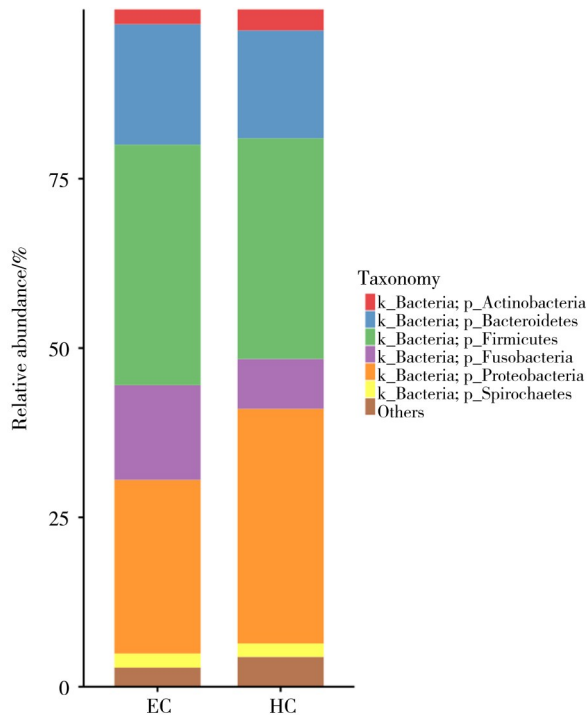
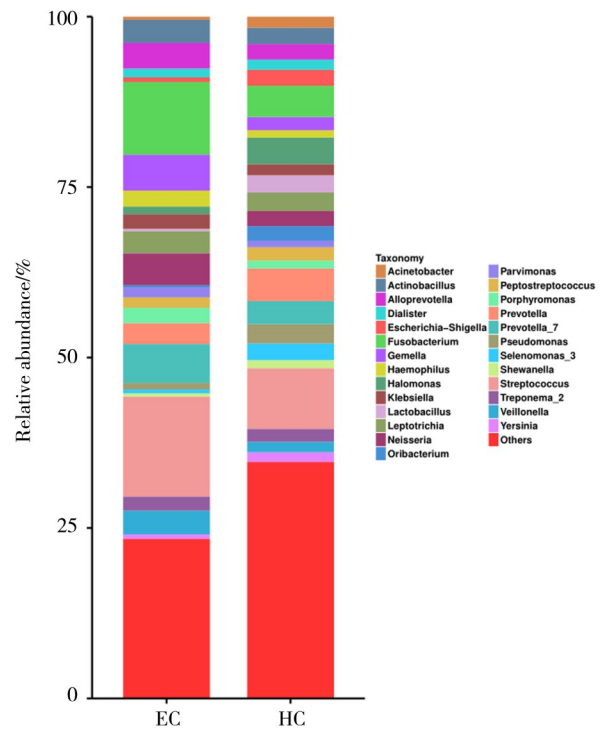


图1 ESCC组和HC组在门水平的相对丰度柱形图

Fig. 1 Histogram of relative abundance of ESCC group and HC group at phylum level

于健康对照组, ESCC组放线杆菌属(*Actinobacillus*)、梭杆菌属(*Fusobacterium*)、微单胞菌属(*Parvimonas*)、嗜血杆菌属(*Haemophilus*)、奈瑟菌属(*Neisseria*)、卟啉单胞菌属(*Porphyromonas*)、链球菌属(*Streptococcus*)、韦荣氏球菌属(*Veillonella*)丰度明显升高,嗜盐单胞菌属(*Halomonas*)、罗伊氏乳杆菌属(*Lactobacillus*)、棒状杆菌属(*Oribacterium*)、月单胞菌属(*Selenomonas*)、普雷沃氏菌属(*Prevotella*)丰度明显降低(图2)。

2.2.2 多样性分析 通过 α 多样性及 β 多样性评估两组样本序列中物种多样性差异。 α 多样性(Al-



EC: esophageal cancer; HC: healthy control.

图2 ESCC组和HC组在属水平的相对丰度柱形图

Fig. 2 Histogram of relative abundance of ESCC group and HC group at genus level

pha diversity)是对单个样品中物种多样性的分析,统计参数包括 Observedspecies 指数、Chao1 指数、Shannon 指数、Simpson 指数以及 PD wholetree 等。Chao1 和 Observedspecies 数值表示所测样品中群落的丰度,其值越高,则物种丰度越高,经统计学分析两组物种丰度差异无统计学意义($P>0.05$)。Shannon 指数、simpson 指数以及 PD_whole_tree 值代表群落多样性程度,其值越高,则多样性越高,差异均无统计学意义(表1)。

表1 ESCC组和HC组样本 α 多样性参数比较

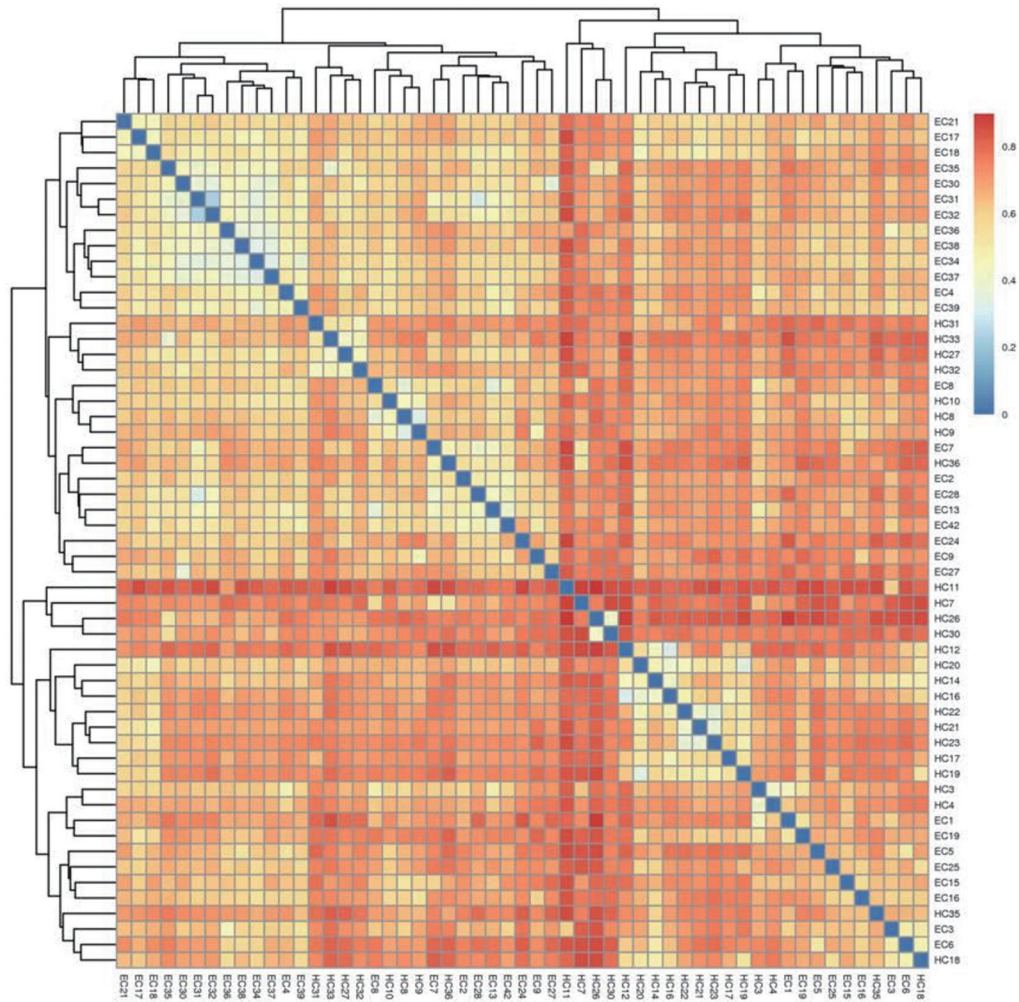
Table 1 Comparison of alpha diversity parameters between ESCC group and HC group

Groups	PD_whole_tree	Chao1	Observed_species	Shannon	Simpson
EC	76.37±33.93	1 348.41±528.52	1 074.40±521.92	5.45±0.85	0.91±0.05
HC	100.00±3.99	1 857±521.00	1 562.36±667.47	6.37±3.07	0.94±9.48
P	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05

EC: esophageal cancer; HC: healthy control.

通过分析样本序列的β多样性(Beta Diversity)比较两组样本间微生物群落构成的差异,统计所有 OTU 在不同样品中的相对丰度,之后利用 Bray-Curtis 距离公式计算不同样品间的间相异系数矩阵,对矩阵进行层级聚类及样本距离 heatmap 图,颜

色越红表明样本间距离越远。在绘制出的 heatmap 图中,我们可以发现 ESCC 组与 HC 组对比样本距离远,ESCC 组中各样本的平均样本距离为 0.502,而 EC 组与 HC 组中各样本的平均距离为 0.685,说明两组细菌群落构成存在差异(图 3)。



EC: esophageal cancer; HC: healthy control; the red color indicates the farther the distance between the samples, and the blue color indicates the distance between the samples.

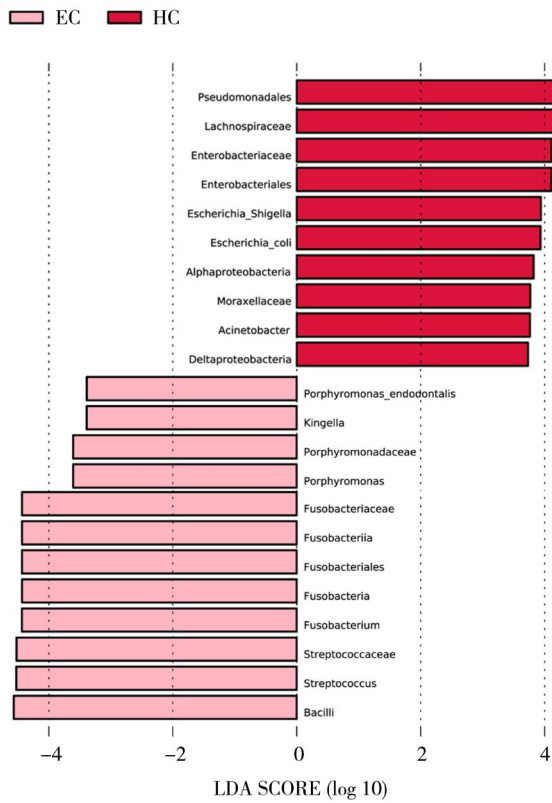
图3 ESCC组和HC组样本距离 heatmap 图

Fig. 3 Heatmap of sample distance between ESCC group and HC group

2.2.3 LEfSe 分析 最后,使用 LEfSe 分析寻找两组之间具有统计学差异的物种。LEfSe 分析得出 ESCC 组中明显升高的差异菌群共有 22 种,其中包括卟啉单胞菌属、链球菌属、梭杆菌属在内的 12 种菌在 ESCC 组中显著增多($P < 0.05$),而在 HC 组中,包括极毛杆菌目、毛螺菌科、肠杆菌目等 10 种菌明显升高($P < 0.05$;图 4)。

2.3 Q-PCR 方法验证靶细菌

根据筛选结果,发现卟啉单胞菌属、梭杆菌属在 ESCC 组样本中显著增高,后选择该菌属中既往研究有意义的具核梭杆菌和牙龈卟啉单胞菌作为靶细菌,用 Q-PCR 测序的方法验证筛选结果。对不符合正态分布的拷贝数数据进行对数转换,其中 ESCC 患者和健康人具核梭杆菌和牙龈卟啉单胞菌的平均拷贝数及对数转换后数据分别见表 2-3。并



EC: esophageal cancer; HC: healthy control.

图4 部分序列 LDA 值分布柱状图

Fig. 4 Histogram of partial sequence LDA value distribution

以此绘制 ROC 曲线,验证 ESCC 患者和健康人群中具核梭杆菌和牙龈卟啉单胞菌的拷贝数差异,结果显

示,与健康对照组相比,ESCC 组牙龈卟啉单胞菌及具核梭杆菌的拷贝数显著升高 ($P < 0.05$)。绘制的 ROC 曲线中,牙龈卟啉单胞菌、具核梭杆菌的 AUCs 分别为 0.902、0.708,与截断值相关的敏感性和特异性分别为 80.0%、5.9% 以及 45.8%、10.0% (图 5)。

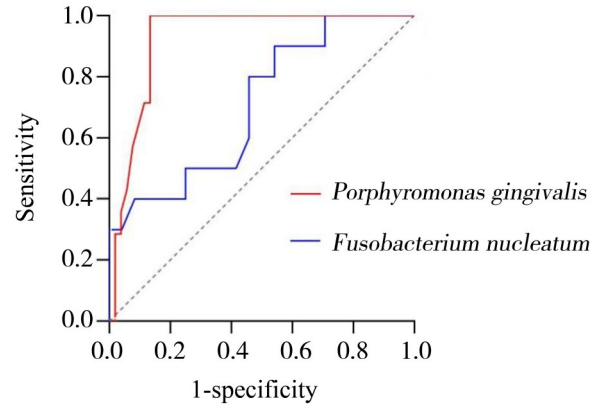


图5 牙龈卟啉单胞菌及具核梭杆菌差异 ROC 曲线

Fig. 5 ROC curve of *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum*

3 讨论

食管癌特别是食管鳞癌在中国发病率最高,也成为我国肿瘤疾病中影响国人健康的重要负担之一。目前食管癌的病因尚未明确,针对病因的治疗和预防措施乏力^[12]。近来研究表明,组织微环境中的胞内菌在癌症发病及治疗应答中起重要作用^[13]。

表2 ESCC 组与 EC 组牙龈卟啉单胞菌及具核梭杆菌拷贝数

Table 2 Copy numbers of *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum* in ESCC group and EC group

($\bar{x} \pm s$)

Groups	ESCC group	HC group
F. nucleatum	$3.45 \times 10^4 \pm 1.41 \times 10^4$	$1.52 \times 10^4 \pm 9.41 \times 10^3$
P. gingivalis	$1.85 \times 10^3 \pm 1.52 \times 10^3$	$5.33 \times 10^2 \pm 79.56$

EC: esophageal cancer; HC: healthy control.

表3 ESCC 组与 EC 组牙龈卟啉单胞菌及具核梭杆菌对数转换后

Table 3 Copy numbers of *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum* in ESCC group and EC group

($\bar{x} \pm s$)

Groups	n	ESCC group	HC group	t	P
F. nucleatum	52	4.11 ± 0.22	3.94 ± 0.17	2.067	0.047
P. gingivalis	52	3.16 ± 0.30	2.72 ± 0.66	9.679	<0.005

EC: esophageal cancer; HC: Healthy control.

Binder Gallimidi 等^[14]报道在4-硝基喹啉-1-氧化物(4NQO)诱导口腔鳞癌模型中发现牙龈卟啉单胞菌感染能够刺激口腔上皮细胞的TLR受体,激活IL-6/STAT3信号通路,进而促进口腔鳞状细胞癌生长。另外,有学者发现具核梭杆菌能通过调节结肠癌组织内T细胞的分布、PD-L1的表达影响肿瘤的发生发展^[15-16]。而使用抗生素杀灭具核梭杆菌后,则可以抑制结肠癌细胞的生长^[17]。王晴萱等^[18]经牙龈卟啉单胞菌和具核梭杆菌单独或联合感染人口腔表皮样癌细胞(KB细胞),发现牙龈卟啉单胞菌感染KB细胞能抑制细胞周期,促进KB细胞分泌IL-6和IL-8,引起促进口腔鳞状细胞癌生长和引起免疫炎症反应。这些研究均表明牙龈卟啉单胞菌、具核梭杆菌在肿瘤发病中的作用。

目前对于食管癌组织菌群的研究报道较少,我们在前期研究中通过对食管癌患者口腔唾液研究发现食管鳞癌患者唾液中牙龈卟啉单胞菌属相对于健康对照组表达明显升高^[19]。并且,在体外细胞实验中,我们发现牙龈卟啉单胞菌能通过激活NF- κ B信号通路促进食管鳞癌进展^[20]。

基于以上研究,我们使用16s rDNA测序方法检测了食管鳞癌患者组织中的菌群谱,通过 α 多样性参数分析比较发现ESCC组与健康对照组在各参数差异没有统计学意义,提示两组菌群多样性上没有显著差异。但在物种分析上,我们发现在ESCC组中以梭杆菌属(*Fusobacterium*)、孪生球菌属(*Gemella*)、奈瑟菌属(*Neisseria*)、卟啉单胞菌属(*Porphyromonas*)、链球菌属(*Streptococcus*)为主,LEfSe分析表明ESCC组中卟啉单胞菌属、链球菌属、梭杆菌属丰度显著升高,且差异且有统计学意义。

此外,我们还首次通过Q-PCR方法分析发现食管癌患者组织内菌群构成与健康对照组有明显差异,菌群组成具有特征性。ESCC组卟啉单胞菌属、梭杆菌属相对于同组其他菌属来讲表达明显升高,以牙龈卟啉单胞菌、具核梭杆菌为代表,且差异明显。前期我们在食管癌口腔唾液研究中也发现具核梭杆菌和牙龈卟啉单胞菌是口腔的常见菌。以往有研究表明牙龈卟啉单胞菌在食管鳞状细胞癌组织中增多,本研究进一步细化并发现具核梭杆菌、牙龈卟啉单胞菌均为食管鳞状细胞癌的特征性菌群,在致癌机制上可能存在相互促进的作用。

具核梭杆菌和牙龈卟啉单胞菌二者均为革兰氏阴性严格厌氧杆菌,可释放多种毒力因子,是重要牙周病致病菌。有研究还发现具核梭杆菌可以提高牙龈卟啉单胞菌对上皮细胞的黏附和入侵,进而加强牙龈卟啉单胞菌的致病性^[21-22]。我们在前期研究中,也发现具核梭杆菌联合牙龈卟啉单胞菌共感染食管癌细胞可上调PD-L1表达水平。此外,也有其他研究报道牙龈卟啉单胞菌细胞壁成分肽聚糖被细菌外膜囊泡吸收入细胞,内化肽聚糖触发胞质受体通过RIP2依赖的方式诱导PD-L1在口腔癌中的表达^[23]。这些研究依据表明牙龈卟啉单胞菌、具核梭杆菌在食管鳞状细胞癌中富集,可能对食管鳞状细胞癌具有促进其恶性行为及对免疫治疗疗效可能起调节作用。因此,下一步我们将对牙龈卟啉单胞菌和具核梭杆菌联合调节食管鳞状细胞癌PD1免疫治疗应答的机制作进一步深入研究。研究其致癌及诱导免疫耐药的机制,结果为食管鳞状细胞癌筛选的生物靶标及提高临床免疫治疗效果作有益探索。

参考文献

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3):209-249.
- [2] Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, et al. Cancer statistics[J]. Jemal ACA Cancer J Clin 2021, 2021, 71(1):7-33.
- [3] Liang H, Fan JH, Qiao YL. Epidemiology, etiology, and prevention of esophageal squamous cell carcinoma in China[J]. Cancer Biol Med, 2017, 14(1):33-41.
- [4] 林璜, Au William W, 欧利民. 食管癌流行现状及潮汕食管癌病因学研究[J]. 中国实用医药 2015, 10(32):277-279.
Lin H, Au William W, Ou LM, et al. Epidemic status of esophagus cancer and etiological research of esophagus cancer in chaoshan[J]. Chin Prac Med, 2015, 10(32):277-279.
- [5] Geller LT, Barzily-Rokni M, Danino T, et al. Poten-

- tial role of intratumor bacteria in mediating tumor resistance to the chemotherapeutic drug gemcitabine [J]. *Science*, 2017, 357(6356):1156–1160.
- [6] Zheng JH, Nguyen VH, Jiang SN, et al. Two-step enhanced cancer immunotherapy with engineered salmonella typhimurium secreting heterologous flagellin [J]. *Sci Transl Med*, 2017, 9(376):eaak9537.
- [7] Aral K, Milward MR, Gupta D, et al. Effects of *porphyromonas gingivalis* and *fusobacterium nucleatum* on inflammasomes and their regulators in H400 cells [J]. *Mol Oral Microbiol*, 2020, 35(4):158–167.
- [8] Zhou Y, Luo GH. *Porphyromonas gingivalis* and digestive system cancers [J]. *World J Clin Cases*, 2019, 7(7):819–829.
- [9] Chen MF, Lu MS, Hsieh CC, et al. *Porphyromonas gingivalis* promotes tumor progression in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Cell Oncol (Dordr)*, 2021, 44(2):373–384.
- [10] Gao S, Li S, Ma Z, et al. Presence of *porphyromonas gingivalis* in esophagus and its association with the clinicopathological characteristics and survival in patients with esophageal cancer [J]. *Infect Agent Cancer*, 2016, 11(1) 1–9.
- [11] Gao SG, Yang JQ, Ma ZK, et al. Preoperative serum immunoglobulin G and A antibodies to *porphyromonas gingivalis* are potential serum biomarkers for the diagnosis and prognosis of esophageal squamous cell carcinoma [J]. *BMC Cancer*, 2018, 18(1):1–8.
- [12] Hsu PK, Chien LI, Huang CS, et al. Treatment patterns and outcomes in patients with esophageal cancer: an analysis of a multidisciplinary tumor board database [J]. *Ann Surg Oncol*, 2022, 29(1):572–585.
- [13] Yu T, Guo F, Yu Y, et al. *Fusobacterium nucleatum* promotes chemoresistance to colorectal cancer by modulating autophagy [J]. *Cell*, 2017, 170(3):548–563. e16.
- [14] Binder Gallimidi A, Fischman S, Revach B, et al. Periodontal pathogens *porphyromonas gingivalis* and *fusobacterium nucleatum* promote tumor progression in an oral-specific chemical carcinogenesis model [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(26):22613–22623.
- [15] Mima K, Sukawa Y, Nishihara R. *Fusobacterium nucleatum* and T-cells in colorectal carcinoma [J]. *JAMA Oncol*, 2015, 1(5):653–661.
- [16] Masugi Y, Nishihara R, Yang J, et al. Tumour CD274 (PD-L1) expression and T cells in colorectal cancer [J]. *Gut*, 2017, 66(8):1463–1473.
- [17] Geller LT, Barzily-Rokni M, Danino T, et al. Potential role of intratumor bacteria in mediating tumor resistance to the chemotherapeutic drug gemcitabine [J]. *Science*, 2017, 357:1156–1160.
- [18] 王晴萱,刘俊超,潘亚萍,等.具核梭杆菌调控牙龈卟啉单胞菌感染对口腔鳞状细胞癌KB细胞周期和细胞因子分泌的研究.[J]口腔医学研究,2016,3:211–215.
- Wang QX, Liu JC, Pan YP, et al. Impact of *Fusobacterium Nucleatum* and *porphyromonas Gingivalis* Modulation on the cell cycle and cytokines production of KB cells [J]. *J Oral Sci Res*, 2016,3:211–215
- [19] Wei, J, Li, R, Lu, Y, et al. Salivary microbiota may predict the presence of esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Genes Dis*, 2021. doi: 10.1016/j.gendis.2021.02.006.
- [20] Meng F, Li R, Ma L, et al. *Porphyromonas gingivalis* promotes the motility of esophageal squamous cell carcinoma by activating NF- κ B signaling pathway [J]. *Microbes Infect*, 2019, 21(7):296–304.
- [21] Stokowa-Soltys K, Wojtkowiak K, Jagiełło K. *Fusobacterium nucleatum* – Friend or foe? [J]. *J Inorg Biochem*, 2021, 224:111586.
- [22] Binder Gallimidi A, Fischman S, Revach B, et al. Periodontal pathogens *porphyromonas gingivalis* and *fusobacterium nucleatum* promote tumor progression in an oral-specific chemical carcinogenesis model [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(26):22613–22623.
- [23] Sahler JM, Eade CR, Altier C, et al. *Salmonella enterica* serovar typhimurium increases functional PD-L1 synergistically with gamma interferon in intestinal epithelial cells via *Salmonella* pathogenicity island 2 [J]. *Infect Immun*, 2018, 86(5):e00674–17.