·临床研究·

粪便 Fn 与 miR-20a 在结直肠癌患者中的表达及对其发生的预测价值

陈卫丰，谢何杰，熊燕，陈芳玲

【摘要】目的　探讨粪便具核梭杆菌（Fn）与 miR-20a 在结直肠癌（CRC）患者中的表达及对其发生的预测价值。**方法**　收集 2023 年 1 月至 2024 年 2 月丽水市第二人民医院收治的 CRC 患者 100 例（CRC 组），化疗疗效评估结束后入组。另选同期来院就诊的结直肠良性腺瘤患者 100 例（良性组）及健康体检者 100 例（对照组）。采用 qRT-PCR 检测 3 组受试者粪便 Fn 相对丰度和 miR-20a 的水平；3 组分别随机抽取 20 例，采用 16S rRNA 对粪便肠道菌群进行测序，分析粪便肠道菌群多样性（Chao1 指数、Ace 指数及 Shanon 指数）；采用酶联免疫吸附法检测 3 组血清肿瘤坏死因子（TNF-α）、白细胞介素-6（IL-6）和 IL-1β的表达水平；采用受试者工作特征曲线（ROC）分析粪便 Fn 和 miR-20a 水平对 CRC 发生的预测效能。**结果**　对照组、良性组及 CRC 组 Chao1 指数依次降低，但差异无统计学意义（$P > 0.05$），Simpson 指数依次升高（$P < 0.05$），Shannon 指数依次降低（$P < 0.05$）。对照组有分类操作单元 540 个，良性组 473 个，CRC 组 841 个；相对于对照组和良性组，CRC 组肠道最优势菌为 Fn。3 组粪便总细菌含量差异无统计学意义（$P > 0.05$），CRC 组 Fn 含量及 miR-20a 水平均显著高于对照组及良性组（均 $P < 0.05$）。CRC 组血清 TNF-α、IL-6 及 IL-1β水平均显著高于对照组与良性组（均 $P < 0.05$）。ROC 曲线分析显示，粪便 Fn、miR-20a 单独及两者联合预测 CRC 发生的 *AUC* 分别为 0.842、0.888 及 0.912，两者联合预测 CRC 发生的价值更高。**结论**　CRC 患者粪便肠道菌群多样性显著下降，Fn 可能调控慢性炎症和 miR-20a 表达参与 CRC 发生、发展；粪便 Fn 含量及 miR-20a 水平对 CRC 发生预测准确率较高，两者联合有助于提高 CRC 早期无创诊断效率。

【关键词】　结直肠癌；具核梭杆菌；miR-20a；表达
doi:10.3969/j.issn.1671-0800.2024.10.006
【中图分类号】　R735.3　**【文献标志码】**　A　**【文章编号】**　1671-0800(2024)10-1285-05

结直肠癌（colorectal cancer，CRC）是全世界癌症死亡的第二大病因[1]，一般需经历结直肠良性腺瘤、慢性炎症后才转变为恶性腺瘤，故早期诊断意义重大[2]。研究证实，肠道菌群在 CRC 的发生、发展和转移中扮演重要角色[3]。高通量测序分析结果显示，肠道关键功能菌具核梭杆菌（fusobacterium nucleatum，Fn）在 CRC 患者肠道菌群中含量升高，其能长期介导宿主肠道黏膜炎症级联反应，可能在 CRC 炎癌转变过程中发挥重要作用，且 Fn 高含量与 CRC 患者化疗耐药程度具备一定相关性[4]。MicroRNA（miRNA）芯片检测结果表明，与癌旁组织相比，miR-20a 在 CRC 组织中明显升高。肠道中 Fn 丰度变化可能加速 CRC 的形成，从而改变 miR-20a 在粪便中的含量[5]。本研究拟探讨粪便 Fn 与 miR-20a 在 CRC 患者中的表达及对其发生的预测价值，现报道如下。

1　资料与方法

1.1　一般资料　收集 2023 年 1 月至 2024 年 2 月丽水市第二人民医院收治的 CRC 患者 100 例（CRC 组），纳入标准：（1）临床资料完整，（2）经病理检查确诊为 CRC，（3）近 3 个月内未接受过抗生素治疗，（4）认知功能正常。排除标准：（1）近 3 个月内接受过侵入性医疗干预者，（2）长期素食者，（3）合并肠道炎性疾病或其他类型癌症者，（4）合并其他重大器官障碍性疾病者。另选同期来院就诊的结直肠良性腺瘤患者 100 例（良性组）及健康体检者 100 例（对照组），良性组均经结肠镜检查及病理活检检查确诊。CRC 组患者均采用统一的标准化疗方案（mFOLFOX6 方案），定期监测血液学指标，化疗疗效评估结束后入组。本研究获得浙江省丽水市第二人民医院医学伦理委员会批准，所有研究对象均同意参加本研究并签署书面知情同意书。

基金项目：　浙江省医药卫生科技计划项目（2023RC315）
作者单位：　323000 浙江省丽水，丽水市第二人民医院
通信作者：　陈卫丰，Email：chwf20190118@163.com

1.2 方法

1.2.1 标本采集 采集每位受试者晨起粪便样本30g，置于无菌采集管中，并立即转移至−80℃储存。

1.2.2 粪便细菌DNA和miRNA提取 采用QIAamp® DNA Stool Mini Kit No. 51504（德国凯杰生物工程有限公司）抽提粪便样本（0.2 g）的细菌DNA，实验过程操作参照试剂盒说明书。采用琼脂糖电泳检测粪便总DNA的完整性，抽提获得的DNA保存于−20℃备用。将粪便样本在Trizol LS试剂中匀浆化，再加入200 μl氯仿，涡旋混匀。参照miRNeasy Mini试剂盒（德国凯杰生物工程有限公司）说明书，从Trizol LS-氯仿混合物中提取总RNA（含miRNA）。使用50 μl RNase-free水洗脱溶解获得的总RNA。

1.2.3 qRT-PCR检测粪便Fn相对丰度 采用定制TaqMan探针/引物对Fn进行荧光定量PCR分析，FAM探针：5’-GTTGACTTTACAGAAGGAGATT-ATGTAAAAATC-3’；实验使用引物为F：5’-CAAC-CATTACTTTAACTCTACCATGTTCA-3’，R: 5’-GTTGACTTTACAGAAGGAGATTATGTA-AAAATC-3’。以E.coli ATCC 25922作为参考进行定量，构建标准曲线，以总细菌作为参照计算Fn的相对丰度，总细菌引物为F：5’- TCCTACGGGAGG-CAGCAGT-3’，R：5’-GGACTACCAGGGTAT-CTATCCTGTT-3’。使用ABI 7900HT定量PCR仪（美国赛默飞世尔科技公司）进行扩增和检测。每个样本进行3次重复检测，取平均值。

1.2.4 qRT-PCR检测粪便miR-20a的水平 采用TaqMan miRNA逆转录试剂盒（美国赛默飞世尔科技公司）对粪便提取的DNA进行逆转录。使用TaqMan has-miR-20a方法（成熟序列：UAAAG-UGCUUAUAGUGCAGGUAG；测试ID：000580）（美国赛默飞世尔科技公司）进行miR-20a表达水平检测，并使用7500实时定量PCR系统（美国赛默飞世尔科技公司）进行扩增和检测。每个样本进行3次重复检测，依据Ct值计算相对表达水平。

1.2.5 粪便菌群高通量测序 3组分别随机抽取20例，将1 g患者粪便样本转移至采样管，后转移至厌氧箱中操作，添加0.9%氯化钠注射液（1 g∶10 ml）后涡漩混匀。对菌悬液进行过滤后提取菌液基因组DNA，采用16S V3～V4区特异性引物进行PCR扩增。使用建库试剂盒（美国illumina公司）构建文库，质检合格后，在Nova Seq 6000测序仪中进行测序。对测序序列进行质控、拼接、过滤和物种注释，以97%一致性标准将测序序列聚类为分类操作单元（operational taxonomic units，OTU）。采用QIME2软件分析Alpha多样性（包括Chao1指数、Ace指数及Shanon指数）和群落组成。采用LEfSe法探究组间差异菌群。肠道菌群16S rRNA测序由北京百迈客生物科技有限公司完成。

1.2.6 炎症因子检测 患者血清肿瘤坏死因子（tumor necrosis factor α，TNF-α）、白细胞介素-6（interleukin-6，IL-6）和IL-1β的表达水平采用酶联免疫吸附法检测，使用试剂盒购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司。

1.3 统计方法 数据采用SPSS 20.0软件分析，正态分布计量资料采用均数±标准差表示，采用F检验或LSD-t检验；非正态分布计量资料采用$M(P_{25},P_{75})$表示，采用Wilcoxon秩和检验。计数资料采用例数表示，采用χ^2检验。采用受试者工作特征曲线（ROC）分析粪便Fn和miR-20a水平对CRC发生的预测效能。$P<0.05$表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 基线资料比较 3组性别、年龄及体质量指数（BMI）差异均无统计学意义（$P>0.05$），见表1。

2.2 肠道菌群Alpha多样性分析 对照组、良性组及CRC组Chao1指数依次降低，但差异无统计学意义（$P>0.05$），Simpson指数依次升高（$P<0.05$），Shannon指数依次降低（$P<0.05$），见表2。

2.3 肠道菌群OTU分析 对照组有OTU 540个，良性组473个，CRC组841个。相对于对照组和良性组，CRC组肠道最优势菌为Fn，见图1。

2.4 粪便Fn和miR-20a水平比较 3组粪便总细菌含量差异无统计学意义（$P>0.05$）。CRC组Fn含量及miR-20a水平均显著高于对照组及良性组（均$P<0.05$），见图2。

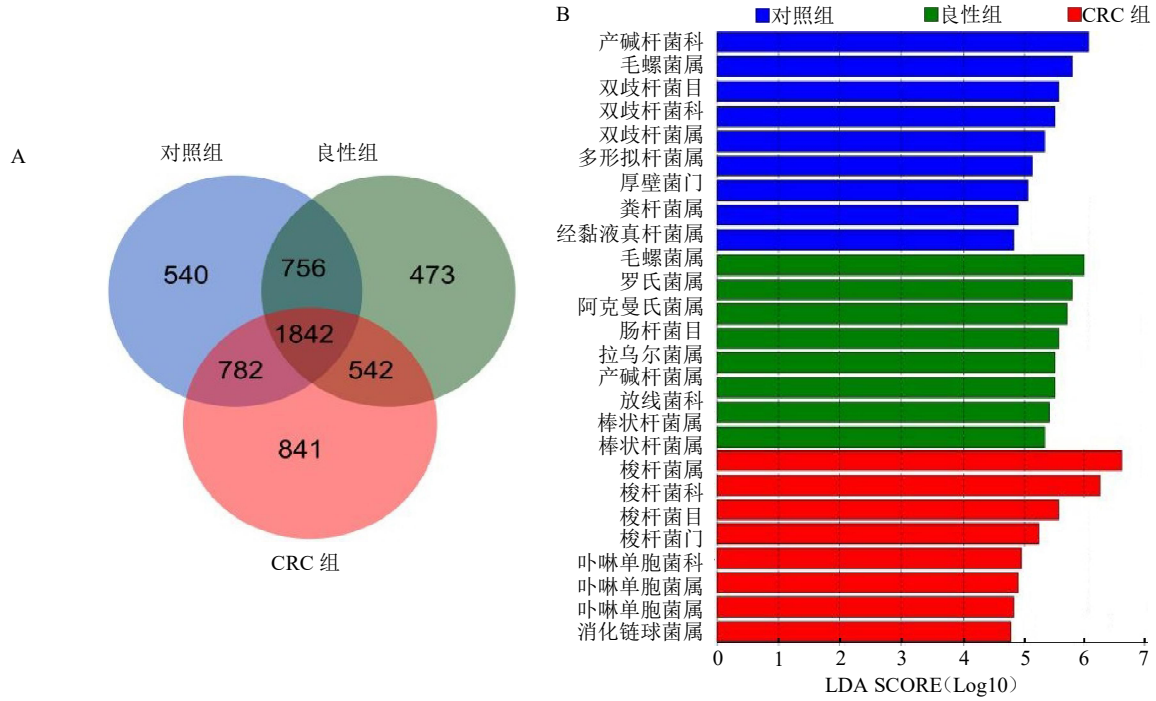
2.5 血清炎症因子水平比较 3组TNF-α、IL-6及IL-1β水平差异均有统计学意义（均$P<0.05$），CRC组血清TNF-α、IL-6及IL-1β水平均显著高于对照组与良性组（$t\geq13.88$，均$P<0.05$），见表3。

表 1　3 组基线资料比较

组别	例数	性别（男/女，例）	年龄（岁）	体质量指数（kg /m²）
对照组	100	58/42	53.5±12.3	26.51±3.52
良性组	100	64/36	53.4±12.5	26.36±3.47
CRC 组	100	67/33	53.3±12.6	26.48±3.49
$F(\chi^2)$值		（1.80）	0.00	0.05
P 值		＞ 0.05	＞ 0.05	＞ 0.05

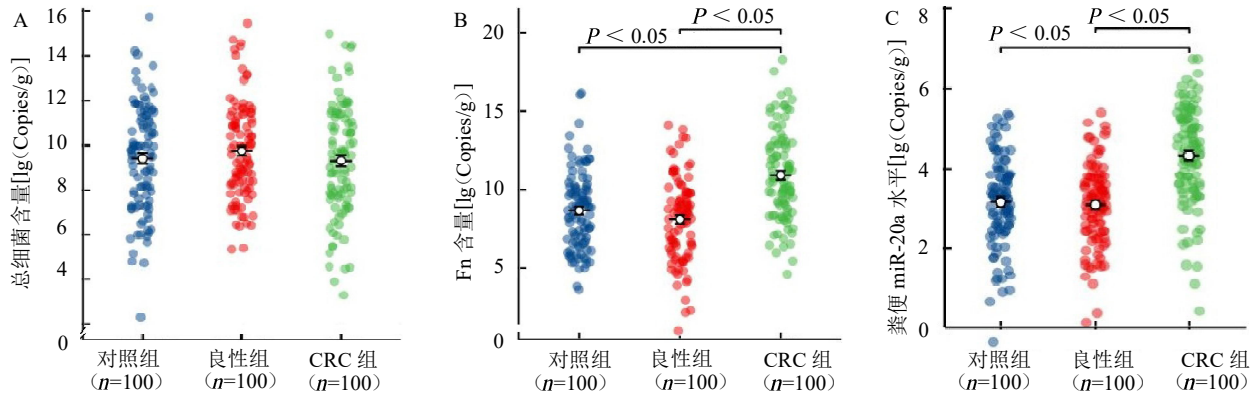
表 2　3 组肠道菌群 Alpha 多样性分析

组别	例数	Chao1 指数	Simpson 指数	Shannon 指数
对照组	20	945.79±289.45	0.77（0.65，0.86）	6.89±1.46
良性组	20	937.38±274.17	0.86（0.74，0.92）	6.57±1.43
CRC 组	20	924.52±268.32	0.95（0.91，0.99）	5.78±1.41
$F(Z)$值		0.03	（3.65）	3.17
P 值		＞ 0.05	＜ 0.05	＜ 0.05



注：A 为 OTU 交集韦恩图，B 为组间差异分析

图 1　粪便菌群高通量测序 OTU 情况和差异分析



注：A 为粪便总细菌含量比较，B 为粪便 Fn 含量比较，C 为粪便 miR-20a 水平比较

图 2　3 组粪便总细菌、Fn 及 miR-20a 水平比较

2.6　粪便 Fn 及 miR-20a 水平对 CRC 发生的预测价值　结果显示，粪便Fn、miR-20a单独及两者联合预测 CRC 发生的 *AUC* 分别为 0.842（95%*CI*：0.804 ～ 0.879）、0.888（95%*CI*：0.856 ～ 0.920）及 0.912（95%*CI*：0.896 ～ 0.923），敏感度对应为 0.736、0.748 及 0.853，特异度对应为 0.822、0.846 及 0.818，准确率对应为 0.779、0.797 及 0.836。粪便 Fn 和 miR-20a 水平对预测 CRC 发生准确性较高，两者联合可进一步预测价值（$P < 0.05$），见图 3。

3　讨论

CRC 是临床常见恶性肿瘤[6]，83%患者确诊时已属中晚期，其中 44%患者已发生肺、肝等组织转移，较低的早期诊断率是提高 CRC 预后的瓶颈[7]。目前，结肠镜联合病理检查是 CRC 筛查的“金标准”，但不适合大规模人群筛查。肠道菌群也是肠道肿瘤微环境的重要组成部分，其与 CRC 的生长和扩散密切相关。国内外学者通过分子生物学手段发现，CRC 患者呈现肠道菌群显著失衡状态[8]。

Alpha 多样性主要通过 Chao1、shannon 及 Simpson 指数来反映物种均匀性和丰富度。Chao1 指数为估计物种总数的生态学常用指标，可用于估计群落 OTU 数目[9]。本研究结果显示，对照组有 OTU 540 个，良性组 473 个，CRC 组 841 个。相对于对照组和良性组，CRC 组肠道最优势菌为 Fn。Simpson 指数是用来估算微生物多样性的指数之一，其值越大，表明群落物种多样性越低。Shannon 指数同样也是反映微生物多样性的指数之一，其值越大，表明群落物种多样性越高。本研究结果显示，对照组、良性组及 CRC 组 Chao1 指数依次降低，但差异无统计学意义（$P > 0.05$），Simpson 指数依次升高（$P < 0.05$），Shannon 指数依次降低（$P < 0.05$）。这表明相对于对照组，CRC 组患者肠道菌群物种多样性下降，肠道菌群生态失调。

Fn 被发现在 CRC 患者结肠黏膜和粪便中高度富集，Fn 能入侵机体肠道组织，诱发肠道炎症疾病的发生[10]。部分研究表明，CRC 患者的肠道组织中 Fn 水平显著升高。另外，Fn 可通过调控细胞自噬促进 CRC 化疗耐药[11]。本研究显示，CRC 组肠道最优势菌为 Fn。miRNA 在 CRC 的发生、发展中也发挥着非常重要的调节作用，约半数 miRNA 的上游基因位于染色体内与肿瘤相关的区域中[12]。表达谱芯片研究发现，miR-20a 可能是 CRC 一种潜在的生物标志物，miR-20a 可通过下调 E-钙黏蛋白诱导上皮-间质转化，从而介导结直肠癌细胞迁移和肿瘤转移。本研究结果显示，CRC 组 miR-20a 水平显著高于对照

表 3　3 组血清炎症因子水平比较　　ng/L

组别	例数	TNF-α	IL-6	IL-1β
对照组	100	12.67±3.27	21.38±4.79	14.38±2.12
良性组	100	12.64±3.38	22.04±4.68	14.26±2.34
CRC 组	100	19.79±3.95	34.78±6.52	26.42±4.31
F 值		134.96	195.92	512.92
P 值		＜ 0.05	＜ 0.05	＜ 0.05

注：TNF-α为肿瘤坏死因子，IL-6 为白细胞介素-6，IL-1β为白细胞介素-1β

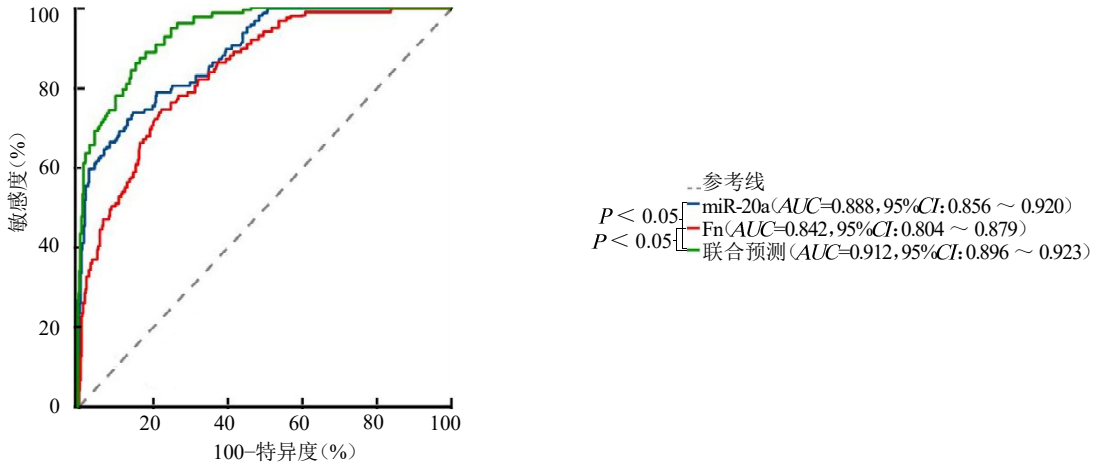


图 3　粪便 Fn 和 miR-20a 水平预测 CRC 发生的 ROC 曲线

组和良性组，说明 miR-20a 在 CRC 的发病机制中起作用。miR-20a 的表达是否与肠道菌群如 Fn 等的变化有关尚不明确，miR-20a 与 Fn 联合检测可能在 CRC 诊断和预后评估中具有重要的应用价值。本研究结果显示，粪便 Fn 水平单独、miR-20a 水平单独及两者联合预测 CRC 发生的 *AUC* 分别为 0.842、0.888 及 0.912，两者联合预测可显著提高粪便 Fn 和 miR-20a 对 CRC 的临床预测价值。Fn 不仅本身能作为一种致癌的因素，引起宿主炎症反应，而且还能改变微生物菌群的结构并使之作为一个整体进一步促进宿主炎症反应，诱发上皮细胞恶性增殖[13]。酶联免疫分析结果显示，CRC 组血清 TNF-α、IL-6 及 IL-1β 水平显著高于对照组与良性组（均 $P < 0.05$）。

综上所述，CRC 患者粪便肠道菌群多样性显著下降，Fn 可能调控慢性炎症和 miR-20a 表达参与 CRC 发生、发展；粪便 Fn 含量及 miR-20a 水平对 CRC 发生预测准确率较高，两者联合有助于提高 CRC 早期无创诊断效率。

利益冲突　所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明　谢何杰、熊燕：实验操作、论文撰写；陈卫丰、陈芳玲：数据整理、统计学分析；陈卫丰：研究指导、论文修改、经费支持

参 考 文 献

[1] 杜杨斌,郭文文,何震宇.线粒体 DNA 含量在结直肠癌中的预后价值[J].南京医科大学学报(自然科学版),2024,44(5):681-687.

[2] 陈佳栋,孙强,沈浩,等.GNRI 联合 PNI 对老年结直肠癌患者营养状况的预测价值[J].中国老年学杂志,2024,44(9):2074-2077.

[3] 高菡璐,俞晓芳,吕乐彬,等.多靶点粪便 DNA、肠道菌群、癌胚抗原及水果摄入对结直肠癌风险的交互作用研究 [J]. 预防医学,2024,36(3):219-223,227.

[4] ZHAO T D, WANG X P, FU L W, et al. Fusobacterium nucleatum: A new player in regulation of cancer development and therapeutic response[J]. Cancer Drug Resist, 2022, 5(2): 436-450.

[5] RATNADIWAKARA M, BAHRUDEEN M N, AIKIO E, et al. SRSF3 shapes the structure of miR-17-92 cluster RNA and promotes selective processing of miR-17 and miR-20a[J]. EMBO Rep, 2023, 24(7): e56021.

[6] 周兰妮,欧阳富盛,郭保亮,等.细胞外体积分数联合临床指标构建的列线图预测结直肠癌 p53 表达[J].临床放射学杂志,2024,43(5):776-782.

[7] 吴艳芬,冯美静.健康人群恶性肿瘤的检出分布对肿瘤筛检策略的警示[J].中国全科医学,2020,23(21):2658-2663.

[8] SONG M Y, CHAN A T, SUN J. Influence of the gut microbiome, diet, and environment on risk of colorectal cancer[J]. Gastroenterology, 2020, 158(2): 322-340.

[9] 王伟杰,赵晓芬,马硕,等.基于 16S rRNA 和非靶向代谢组测序分析结直肠癌患者肠道菌群及代谢物的变化 [J]. 中国微生态学杂志,2024,36(3):307-312,326.

[10] YANG Y Z, WENG W H, PENG J J, et al. Fusobacterium nucleatum increases proliferation of colorectal cancer cells and tumor development in mice by activating toll-like receptor 4 signaling to nuclear factor-κB, and up-regulating expression of microRNA-21[J]. Gastroenterology, 2017, 152(4): 851-866.

[11] GAO Y H, BI D X, XIE R T, et al. Fusobacterium nucleatum enhances the efficacy of PD-L1 blockade in colorectal cancer[J]. Signal Transduct Target Ther, 2021, 6(1): 398.

[12] YAU T O, WU C W, TANG C M, et al. MicroRNA-20a in human faeces as a non-invasive biomarker for colorectal cancer[J]. Oncotarget, 2016, 7(2): 1559-1568.

[13] REPASS J, MAHERALI N, OWEN K, et al. Registered report: Fusobacterium nucleatum infection is prevalent in human colorectal carcinoma[J]. eLife, 2016, 5: e10012.

收稿日期：2024-05-20

（本文编辑：钟美春）