

肿瘤多学科研究专题

肿瘤组织中具核梭杆菌丰度作为
II期结直肠癌预后标志物的临床研究

李东霖, 郭怀娟, 王颖, 严雪冰, 陆美玲

(扬州大学附属医院 肿瘤科, 江苏 扬州, 225000)

摘要: 目的 评估肿瘤组织中具核梭杆菌(Fn)丰度对II期结直肠癌(CRC)患者预后的影响。方法 收集2013年1月—2018年12月151例在扬州大学附属医院接受手术治疗的II期CRC患者的肿瘤标本,通过定量聚合酶链反应检测肿瘤组织中Fn的基因相对表达水平,并通过中位数法将其分为Fn高丰度组和Fn低丰度组。采用卡方检验分析Fn丰度与临床特征的相关性。采用Kaplan-Meier生存曲线分析Fn丰度对患者肿瘤特异性生存期(CSS)和无病生存期(DFS)的影响。基于Cox风险比例回归模型的单因素和多因素明确Fn丰度是否为预后的独立影响因素。结果 Fn丰度与II期CRC患者临床特征均无显著相关性($P>0.05$)。II期CRC患者中,Fn丰度与患者的CSS及DFS呈负相关($P=0.01$)。单因素及多因素分析结果表明,Fn丰度为影响II期CRC患者CSS及DFS的独立影响因素($P<0.05$)。亚组分析结果表明,Fn丰度与II期低危患者的CSS及DFS无显著相关性($P=0.22, 0.47$),但与高危患者的CSS及DFS呈负相关($P<0.01$)。单因素及多因素分析结果表明,Fn丰度为II期高危CRC患者CSS及DFS的独立影响因素。结论 肿瘤组织中Fn丰度为II期高危CRC患者预后不良的独立影响因素,靶向Fn有望成为防治CRC术后复发转移的新策略。

关键词: 具核梭杆菌; 丰度; 结直肠癌; 预后; 复发; 转移; 化疗; 生物标志物

中图分类号: R 735.3; R 730.5 文献标志码: A 文章编号: 1672-2353(2023)09-025-07 DOI: 10.7619/jcmp.20230271

Clinical investigation in abundance
of *Fusobacterium nucleatum* in tumor tissues as a
prognostic biomarker for stage II colorectal cancer

LI Donglin, GUO Huaijuan, WANG Ying, YAN Xuebing, LU Meiling

(Department of Oncology, the Affiliated Hospital of Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu, 225000)

Abstract: Objective To evaluate the prognostic impact of abundance of *Fusobacterium nucleatum* (Fn) in the tumor tissues in stage II colorectal cancer (CRC) patients. **Methods** Tumor specimen of 151 CRC stage II patients receiving surgical treatment at Affiliated Hospital of Yangzhou University between January 2013 and December 2018 were collected. The relative levels of Fn gene in the CRC tissues were detected using quantitative real-time polymerase chain reaction, and were divided into highFn level group and low Fn abundance group using the median method. The chi-square test was used to analyze the correlation between Fn abundance and clinical features. The Kaplan-Meier survival analysis was used to clarify the impacts of Fn abundance on the cancer-specific survival (CSS) and disease-free survival (DFS) of the patients. The univariate and multivariate analysis based on the Cox proportional hazard model was used to identify whether Fn abundance was an independent prognostic factor. **Results** No significant correlation was observed between Fn abundance in the CRC tissues and any of clinical features ($P>0.05$). In the stage II CRC patients, Fn abundance was negatively correlated

收稿日期: 2023-02-06 修回日期: 2023-04-17

基金项目: 国家自然科学基金(81902422); 江苏省卫生健康委面上项目(M2020024);

江苏省研究生科研与实践创新计划项目(SJGX21-1646, SJCX22-1815);

江苏省科协青年科技人才托举工程(TJ-2022-022); 江苏省扬州市重点研发项目(社会发展)(YZ2020078);

扬州大学医学创新转化专项基金临床转化研究项目(AHYZUZHXM 202104)

通信作者: 陆美玲, E-mail: 676216881@qq.com

with the CSS and DFS ($P=0.01$). The univariate and multivariate analysis revealed Fn abundance was an independent unfavorable factor affecting CSS and DFS ($P < 0.05$). Subgroup analysis showed that Fn abundance had no relation with the CSS or DFS of low-risk stage II patients ($P = 0.22, 0.47$), but was negatively correlated with that of high-risk stage II patients ($P < 0.01$). The univariate and multivariate analysis revealed Fn abundance was an independent factor affecting CSS and DFS in the high-risk stage II CRC patients. **Conclusion** Fn abundance in the CRC tissues is identified as an independent influencing factor for high-risk stage II CRC patients. Targeting Fn may be a novel strategy to the prevent postoperative recurrence and progression of CRC.

Key words: *Fusobacterium nucleatum*; abundance; colorectal cancer; prognosis; recurrence; metastasis; chemotherapy; biomarker

结肠癌(CRC)作为常见消化系统恶性肿瘤,近10年来在中国发病率逐年增高^[1]。研究^[2]表明,肠道菌群可作为CRC诊断及治疗的潜在标志物。具核梭杆菌(Fn)作为口腔来源的厌氧菌,在CRC的发生发展中扮演重要角色^[3]。本课题组前期通过宏基因组测序发现,Fn在CRC患者肠道中丰度显著高于健康人群,且Fn可通过促进CRC细胞代谢产生环氧十八碳烯酸介导上皮-间质转化(EMT)^[4]。在临床研究^[5]中,Fn丰度与CRC患者的总生存期(OS)、无病生存期(DFS)及肿瘤特异性生存期(CSS)呈显著负相关。尽管II期CRC术前不伴有淋巴结及远处转移,但是仍有相当一部分患者术后易发生复发或转移,因而寻找可靠预后标志物对于改善II期CRC患者的总体预后显得尤为重要^[6]。本研究通过回顾性研究明确Fn丰度对II期CRC患者预后的影响,为肠道菌群标志物在CRC诊疗中的应用提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集2013年1月—2018年12月在扬州大学附属医院手术切除的CRC样本及匹配的临床信息。临床信息包括性别、年龄、肿瘤部位、TNM分期、清扫淋巴结数目、神经侵犯、组织分化程度、肿瘤最大直径、粪便隐血(OB)试验结果、血清癌胚抗原(CEA)、肿瘤组织Ki-67表达水平及随访资料。纳入标准:①未进行术前新辅助化疗或放疗者;②符合美国癌症分期联合委员会(AJCC)第8版术后病理TNM分期为II期的CRC者;③临床资料完整者;④知情同意使用临床样本及资料者。排除标准:①伴有其他未治愈的原发恶性肿瘤者;②术后因感染、心血管疾病或其他

非肿瘤原因死亡的患者;③术前半年行抗生素治疗者。本研究已经通过扬州大学附属医院伦理委员会审批。

1.2 主要试剂和仪器

组织DNA提取试剂盒购自德国QIAGEN公司,实时荧光定量试剂盒(SYBR Premix Ex Taq)购自日本TAKARA公司。Fn的基因及内参 β -actin引物购自上海生工生物工程公司,Fn的基因引物上游:5'-AAGCGCGTCTAGGTGGTTATGT-3',下游:5'-TG TAGTTCGCTTACCTCTCCAG-3'; β -actin基因引物上游:5'-TAGTTGCGTTACACCTTTCTTG-3',下游:5'-TCACCTTCACCGTTCCAGTTT-3'。荧光定量聚合酶链反应分析仪购自美国应用生物系统公司。

1.3 定量聚合酶链反应

根据DNA提取试剂盒说明书配置缓冲液buffer ATL、buffer AL、buffer AW1及buffer AW2。将组织样本加入buffer ATL和磷酸盐缓冲液(PBS)混合溶液中研磨,随后加入蛋白酶K并充分振荡。将样本置于水浴锅中至组织完全裂解,加入RNase A去除残存RNA,加入buffer AL和无水酒精充分混匀。将样本置于离心管中,加入buffer AW2溶液,室温离心3 min(12 000 g)。采用紫外分光光度计检测DNA质量及浓度。聚合酶链反应扩增体系配置如下:SYBR Premix Ex Taq溶液(10.0 μ L),上游及下游引物(均0.4 μ L),DNA模板(2.0 μ L),加入无RNA酶的水至总体积为20 μ L。聚合酶链反应条件如下:95 $^{\circ}$ C预变性10 min,95 $^{\circ}$ C变性1 min,60 $^{\circ}$ C退火20 s,56 $^{\circ}$ C延伸60 s,共40个循环。以内参基因 β -actin作为对照,根据Ct值进行数据分析,通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算Fn的基因相对表达量,根据中位数法确定Fn高丰度组和Fn低丰度组。

1.4 评价指标

该研究起点为患者手术日期,终点为疾病进展日期、因 CRC 死亡日期或最后一次随访日期,最终评价指标包括 CSS 和 DFS。CSS 定义为手术日期至因肿瘤死亡或随访截止日期,DFS 定义为手术日期至肿瘤进展日期。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 25.0 统计软件进行数据分析。Fn 丰度与患者临床病理特征关系采用 χ^2 检验,采用 Kaplan-Meier 法在 GraphPad Prism 8 软件上绘制生存曲线并进行 Log-rank 生存检验。通过单因素及多因素 Cox 风险比例回归模型分析 Fn 丰度与 CRC 患者 CSS 及 DFS 的关系, $P < 0.05$ (双侧)为

差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肿瘤组织中 Fn 丰度与 II 期 CRC 患者临床特征的相关性

151 例 II 期 CRC 患者中,肿瘤组织 Fn 高丰度组及 Fn 低丰度组分别包括 76、75 例患者。Fn 丰度与性别 ($P = 0.57$)、年龄 ($P = 0.16$)、肿瘤部位 ($P = 0.89$)、T 分期 ($P = 0.94$)、肿瘤直径 ($P = 0.92$)、清扫淋巴结数目 ($P = 0.54$)、神经/血管侵犯 ($P = 0.17$)、组织分化 ($P = 0.74$)、OB 试验结果 ($P = 0.37$)、血清 CEA 水平 ($P = 0.57$) 及 Ki-67 表达 ($P = 0.95$) 均无显著相关性。见表 1。

表 1 Fn 丰度与 II 期 CRC 患者临床病理特征的相关性 [$n(\%)$]

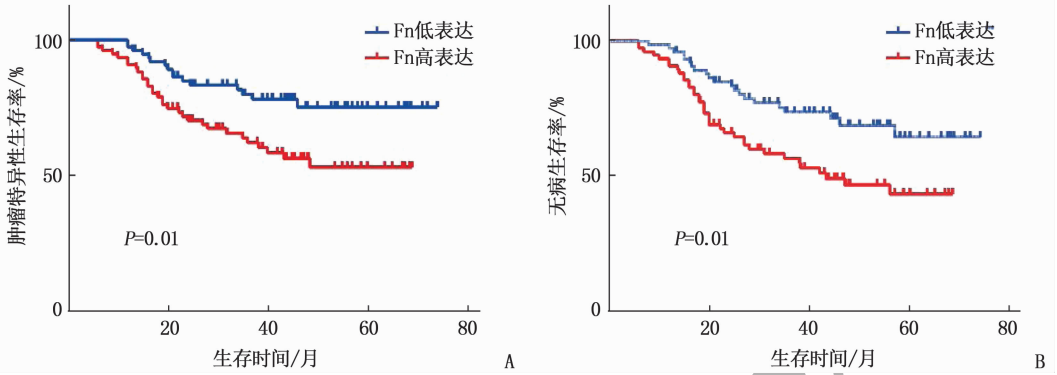
临床特征	分类	总例数($n = 151$)	Fn 低丰度组($n = 75$)	Fn 高丰度组($n = 76$)	χ^2	P
性别	女	74	35(46.67)	39(51.32)	0.33	0.57
	男	77	40(53.33)	37(48.68)		
年龄	≤ 60 岁	35	21(28.00)	14(18.42)	1.95	0.16
	> 60 岁	116	54(72.00)	62(81.58)		
肿瘤部位	结肠	112	56(74.67)	56(73.68)	0.02	0.89
	直肠	39	19(25.33)	20(26.32)		
T 分期	T3 期	81	40(53.33)	41(53.95)	0.01	0.94
	T4 期	70	35(46.67)	35(46.05)		
肿瘤直径	≤ 5 cm	94	47(62.67)	47(61.84)	0.01	0.92
	> 5 cm	57	28(37.33)	29(38.16)		
淋巴结数目	≥ 12 枚	126	64(85.33)	62(81.58)	0.39	0.54
	< 12 枚	25	11(14.67)	14(18.42)		
神经/血管侵犯	无	120	63(84.00)	57(75.00)	1.87	0.17
	有	31	12(16.00)	19(25.00)		
组织分化	高/中	115	58(77.33)	57(75.00)	0.11	0.74
	低	36	17(22.67)	19(25.00)		
OB 试验	阴性	70	32(42.67)	38(50.00)	0.82	0.37
	阳性	81	43(57.33)	38(50.00)		
CEA	≤ 5 ng/mL	80	38(50.67)	42(55.26)	0.32	0.57
	> 5 ng/mL	71	37(49.33)	34(44.74)		
Ki-67	$< 30\%$	97	48(64.00)	49(64.47)	0.01	0.95
	$\geq 30\%$	54	27(36.00)	27(35.53)		

OB: 隐血; CEA: 癌胚抗原。

2.2 肿瘤组织中 Fn 丰度对 II 期 CRC 患者 CSS 及 DFS 的影响

151 例 II 期 CRC 患者中,生存分析曲线表明,Fn 高丰度组较 Fn 低丰度组 CSS 和 DFS 更短,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。见图 1。单因素 COX 回归分析表明,清扫淋巴结数目、神经侵犯、组织分化及 Fn 丰度与 II 期 CRC 患者 CSS 显著相关 ($P < 0.05$),而与性别、年龄、肿瘤部位、T 分期、肿瘤直径、OB 试验结果、CEA 水平及 Ki-67 表达均无相关性 ($P > 0.05$)。多因素 COX

回归分析表明,清扫淋巴结数目 < 12 枚、神经/血管侵犯、低分化及 Fn 高丰度是影响患者 CSS 的独立预后不良因素。见表 2。单因素分析表明,II 期 CRC 患者 DFS 与清扫淋巴结数目、神经侵犯、组织分化及 Fn 丰度显著相关,而与性别、年龄、肿瘤部位、T 分期、肿瘤直径、OB 试验结果、CEA 水平及 Ki-67 表达均无显著相关性。多因素分析表明,清扫淋巴结数目 < 12 枚、神经/血管侵犯、低分化及 Fn 高丰度是影响 II 期 CRC 患者 DFS 的独立危险因素。见表 3。



A: II 期 CRC 患者肿瘤特异性生存率; B: II 期 CRC 患者无疾病生存率。
图 1 Fn 丰度对 II 期 CRC 患者肿瘤特异性生存率和无疾病生存率的影响

表 2 II 期 CRC 患者 CSS 的单因素及多因素分析

变量	HR	95% CI	P	HR	95% CI	P
性别	1.34	0.75 ~ 2.38	0.33	—	—	—
年龄	1.77	0.79 ~ 3.96	0.16	—	—	—
肿瘤部位	1.18	0.63 ~ 2.20	0.61	—	—	—
T 分期	1.74	0.98 ~ 3.10	0.06	—	—	—
肿瘤直径	1.20	0.67 ~ 2.15	0.54	—	—	—
OB 试验	1.49	0.83 ~ 2.68	0.19	—	—	—
CEA	0.98	0.55 ~ 1.74	0.94	—	—	—
Ki-67	0.63	0.33 ~ 1.19	0.15	—	—	—
清扫淋巴结数目	2.46	1.32 ~ 4.61	0.01	3.41	1.78 ~ 6.54	<0.01
神经/血管侵犯	3.16	1.72 ~ 5.83	<0.01	3.04	1.58 ~ 5.88	<0.01
组织分化	2.45	1.34 ~ 4.45	<0.01	2.16	1.15 ~ 4.06	0.02
Fn 丰度	2.20	1.20 ~ 4.02	0.01	2.19	1.19 ~ 4.02	0.01

表 3 II 期 CRC 患者 DFS 的单因素及多因素分析

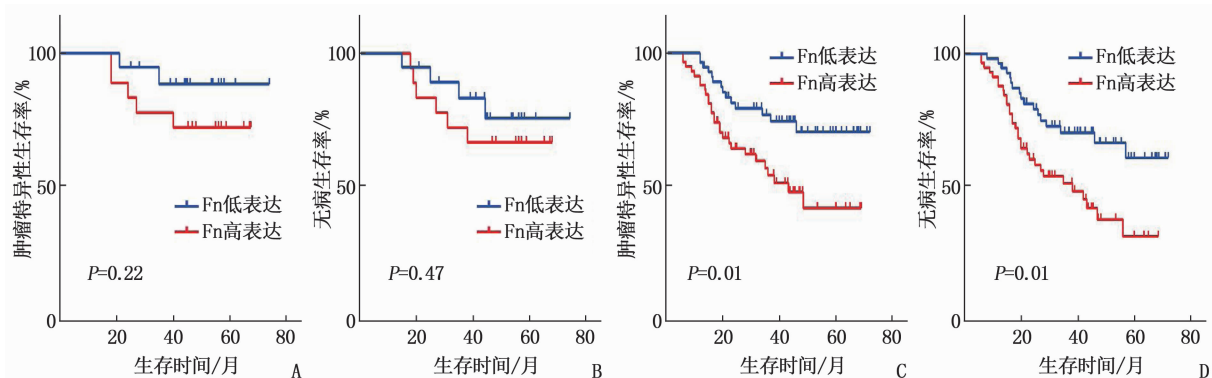
变量	HR	95% CI	P	HR	95% CI	P
性别	1.69	0.99 ~ 2.86	0.05	—	—	—
年龄	1.77	0.87 ~ 3.61	0.12	—	—	—
肿瘤部位	1.49	0.87 ~ 2.56	0.15	—	—	—
T 分期	1.42	0.84 ~ 2.37	0.19	—	—	—
肿瘤直径	1.19	0.70 ~ 2.02	0.52	—	—	—
OB 试验	1.43	0.84 ~ 2.42	0.19	—	—	—
CEA	1.02	0.61 ~ 1.71	0.94	—	—	—
Ki-67	0.72	0.41 ~ 1.26	0.25	—	—	—
清扫淋巴结数目	2.21	1.24 ~ 3.93	<0.01	2.87	1.58 ~ 5.21	<0.01
神经/血管侵犯	2.43	1.36 ~ 4.35	<0.01	2.36	1.27 ~ 4.39	<0.01
组织分化	2.23	1.28 ~ 3.88	<0.01	2.04	1.15 ~ 3.64	0.02
Fn 丰度	2.03	1.19 ~ 3.48	<0.01	2.00	1.17 ~ 3.43	0.01

2.3 亚组分析

将 II 期 CRC 患者分为高危组 ($n = 114$) 和 low 危组 ($n = 37$), 其中高危组患者至少含有以下 1 个高危因素: ① T 分期为 T4 期; ② 清扫淋巴结数目 < 12 枚; ③ 伴有血管神经侵犯; ④ 组织分化为低分化。在 II 期低危组中, 生存分析表明, 肿瘤组织中 Fn 丰度与患者的 CSS 和 DFS 无显著相关性 ($P = 0.22, P = 0.47$)。II 期高危组中, 生

存分析表明, 肿瘤组织中 Fn 丰度与 CRC 患者的 CSS 和 DFS 呈负相关 ($P < 0.01$)。见图 2。

在 II 期高危组 CRC 患者中, 单因素分析表明, 清扫淋巴结数目、神经侵犯、组织分化及 Fn 丰度与患者 CSS 显著相关, 而与性别、年龄、肿瘤部位、T 分期、肿瘤直径、OB 试验结果、CEA 水平及 Ki-67 表达均无相关性。多因素分析结果表明, 清扫淋巴结数目、神经侵犯、组织分化及 Fn 丰度是



A: 低危组 II 期 CRC 患者的肿瘤特异性生存曲线; B: 低危组 II 期 CRC 患者的无疾病生存曲线; C: 高危组 II 期 CRC 患者的肿瘤特异性生存曲线; D: 高危组 II 期 CRC 患者的无疾病生存曲线。

图 2 Fn 丰度对 II 期低危和高危 CRC 患者预后的影响

影响患者 CSS 的独立不良预后因素。见表 4。单因素分析表明,高危组 II 期 CRC 患者 DFS 与清扫淋巴结数目、神经侵犯、组织分化及 Fn 丰度显著相关,而与性别、年龄、肿瘤部位、T 分期、肿瘤直径、

OB 试验结果、CEA 水平及 Ki-67 表达均无相关性。多因素分析结果表明,清扫淋巴结数目 < 12 枚、神经/血管侵犯、低分化及 Fn 高丰度是影响高危组 II 期 CRC 患者 DFS 的独立不良预后因素。见表 5。

表 4 高危组 II 期 CRC 患者 CSS 的单因素及多因素分析

变量	HR	95% CI	P	HR	95% CI	P
性别	1.33	0.71 ~ 2.47	0.37	—	—	—
年龄	1.68	0.71 ~ 3.99	0.24	—	—	—
肿瘤部位	1.09	0.57 ~ 2.11	0.79	—	—	—
T 分期	1.18	0.63 ~ 2.21	0.61	—	—	—
肿瘤直径	1.13	0.60 ~ 2.11	0.71	—	—	—
OB 试验	1.14	0.61 ~ 2.11	0.69	—	—	—
CEA	1.25	0.68 ~ 2.31	0.48	—	—	—
Ki-67	0.94	0.48 ~ 1.81	0.84	—	—	—
清扫淋巴结数目	1.95	1.02 ~ 3.73	0.04	3.19	1.57 ~ 6.45	< 0.01
神经/血管侵犯	2.47	1.31 ~ 4.66	< 0.01	2.81	1.42 ~ 5.56	< 0.01
组织分化	1.89	1.01 ~ 3.52	0.04	2.04	1.06 ~ 3.92	0.03
Fn 丰度	2.31	1.21 ~ 4.42	0.01	2.20	1.15 ~ 4.22	0.02

表 5 高危组 II 期 CRC 患者 DFS 的单因素及多因素分析

变量	HR	95% CI	P	HR	95% CI	P
性别	1.48	0.83 ~ 2.64	0.18	—	—	—
年龄	1.81	0.81 ~ 4.05	0.15	—	—	—
肿瘤部位	1.28	0.71 ~ 2.31	0.41	—	—	—
T 分期	1.04	0.58 ~ 1.84	0.91	—	—	—
肿瘤直径	1.08	0.60 ~ 1.94	0.80	—	—	—
OB 试验	1.11	0.63 ~ 1.98	0.71	—	—	—
CEA	1.59	0.90 ~ 2.80	0.11	—	—	—
Ki-67	1.00	0.55 ~ 1.82	0.99	—	—	—
清扫淋巴结数目	1.86	1.02 ~ 3.40	0.04	2.81	1.46 ~ 5.40	< 0.01
神经/血管侵犯	1.99	1.09 ~ 3.65	0.03	2.24	1.17 ~ 4.30	0.02
组织分化	1.84	1.03 ~ 3.29	0.04	1.99	1.08 ~ 3.65	0.03
Fn 丰度	2.24	1.23 ~ 4.05	0.01	2.13	1.17 ~ 3.86	0.01

3 讨论

CASTELLARIN M 等^[7]通过 RNA 测序发现,

Fn 显著富集于 CRC 组织,且其丰度与淋巴结转移显著相关。本课题组前期发现 Fn 丰度与接受化疗的 III/IV 期 CRC 患者的预后呈显著负相关,

而与 EMT 及肿瘤干细胞分子表型呈正相关^[8]。研究^[9]显示, Fn 上调 CRC 细胞中长链非编码 RNA 表达并介导下游 EMT 转录因子的翻译, 最终促进肿瘤转移。Fn 还可以通过促进脂肪酸氧化减少 CRC 干细胞的脂质积累, 进而增强其自我更新能力^[10]。Fn 通过激活 Toll 样受体 4 信号通路调控下游微小 RNA-18a/4802 表达水平, 进而介导 CRC 细胞发生自噬并对化疗药物产生抵抗^[11]。既往研究^[12]表明, 15% ~ 25% 的 II 期 CRC 患者会在术后 5 年内出现疾病复发或因肿瘤死亡, 因而亟需寻找可靠生物标志物用于识别术后预后不良的高风险人群。鉴于前期证据表明 Fn 在 CRC 恶性进展及耐药中发挥重要作用, 本研究拟通过回顾性分析明确其是否可以作为 II 期 CRC 患者预后评估的生物标志物。

本研究的卡方分析结果表明, Fn 丰度与常见临床参数如年龄、性别、肿瘤位置等无显著相关性, 上述结果与 XIE Y X 等^[13]最新研究结果一致。在生存分析中, Fn 高丰度组患者较 Fn 低丰度组患者有着更差的 CSS 和 DFS, 提示其可能与 CRC 术后复发转移相关。最后, 单因素及多因素分析表明, Fn 丰度为 II 期 CRC 患者预后不良的独立影响因素, 提示 Fn 具有成为预后生物标志物的潜能。一项纳入 3 626 例 CRC 患者的循证医学研究^[14]表明, Fn 高丰度不仅与远处转移、分化程度及微卫星不稳定显著相关, 而且提示更差的总生存期 (OS) 和 DFS。然而, 也有研究^[15]发现, Fn 丰度与肿瘤位置相关, 但与 CRC 患者 OS 无显著相关性。在转移性结肠癌中, 尽管 Fn 在右半结肠的丰度与 OS 无显著相关性, 但是与一线及二线治疗后的无进展生存期 (PFS) 呈负相关^[16]。本研究发现, Fn 丰度与 CRC 患者免疫治疗效果呈正相关, 暗示 Fn 有可能通过改变肿瘤免疫微环境发挥抑癌效应^[17]。因此, Fn 是否能够成为可靠的 CRC 预后标志物仍有待于更多的临床研究确认。此外, 最新研究^[18]发现, 唾液 Fn 丰度与 CRC 患者的预后显著相关, 因此动态检测上述临床样本中 Fn 丰度是否能够成为监测 CRC 复发的新非侵袭诊断方法也是未来值得探索的方向。

II 期 CRC 高危患者是指伴有 T4、肿瘤低分化、血管侵犯等因素的风险人群, 但传统临床病理因素并不能充分预测这类患者的预后, 进而导致治疗不足或治疗过度^[19]。此外, 临床研究^[20]甚至发现, 部分 II 期高危患者的术后生存率显著低

于部分 III 期患者, 因而寻找可靠预后标志物对于改善 II 期高危患者的总体预后显得尤为关键。本研究亚组分析表明, Fn 丰度为 II 期高危 CRC 患者预后不良的独立影响因素。由于多数 II 期高危 CRC 患者接受术后辅助化疗, 因此推断 Fn 感染可能导致传统辅助化疗后肿瘤复发或进展。在接受新辅助化疗的局部进展期直肠癌患者中, 肿瘤组织中 Fn 丰度与肿瘤复发呈正相关^[21]。在接受 5-Fu 为基础的化疗方案的 CRC 患者中, 肿瘤组织中高 Fn 丰度提示更短的无疾病复发生存时间^[22]。在相关机制研究中, Fn 感染可介导 CRC 细胞发生自噬现象, 进而增强细胞对化疗药物的抵抗能力^[11, 23]。HONG X L 等^[24]研究发现, Fn 感染可通过激活 Hedgehog 信号通路增强 CRC 细胞的干性, 进而介导化疗抵抗。本研究团队前期通过流式细胞术筛选出 CRC 干细胞 CD133⁺ CD44⁺ 亚群, 进一步研究发现, Fn 感染可通过介导 EMT 增强上述细胞亚群内外恶性潜能^[25]。已知肿瘤干细胞在促进 CRC 化疗抵抗中扮演着重要角色, 因此本研究推断 Fn 感染也可通过影响 CRC 干细胞的生物学特性来降低肿瘤对化疗药物的敏感性^[26]。

本临床研究存在如下局限性: 首先, 受样本量所限, Fn 在 II 期及其他分期 CRC 患者中的临床价值仍待于更多大样本回顾性研究来确证; 其次, 本研究聚焦于肿瘤组织中 Fn 丰度与临床结局的相关性, 但粪便中 Fn 丰度是否与 CRC 复发进展相关尚未清楚; 再次, 能否基于 Fn 丰度及 II 期高危因素构建优于传统 TNM 分期体系的新型预后评估模型也是未来值得探索的方向。最后, 亟需前瞻性临床试验明确是否能够通过微生态干预手段 (如抗生素、益生菌/益生元、粪菌移植等) 影响肠道中 Fn 丰度, 进而降低 II 期 CRC 患者术后复发风险。

综上所述, 肿瘤组织中 Fn 丰度与 II 期 CRC 患者 CSS 及 DFS 呈负相关, 并且可作为预后不良的独立影响因素。Fn 丰度与 II 期低危患者预后无显著相关性, 但是可作为评估 II 期高危患者预后不良的独立影响因素。上述研究成果不仅为 II 期 CRC 患者预后风险分层提供新的生物标志物, 而且进一步推动肠道菌群基础研究成果向肿瘤临床诊疗的转化。

参考文献

- [1] LI Q R, WU H L, CAO M M, *et al.* Colorectal cancer bur-

- den, trends and risk factors in China: a review and comparison with the United States[J]. *Chung Kuo Yen Cheng Yen Chiu*, 2022, 34(5): 483–495.
- [2] ZHENG Z M, HOU X X, BIAN Z X, *et al.* Gut microbiota and colorectal cancer metastasis[J]. *Cancer Lett*, 2023, 555: 216039.
- [3] WANG N, FANG J Y. *Fusobacterium nucleatum*, a key pathogenic factor and microbial biomarker for colorectal cancer[J]. *Trends Microbiol*, 2023, 31(2): 159–172.
- [4] KONG C, YAN X B, ZHU Y F, *et al.* *Fusobacterium nucleatum* promotes the development of colorectal cancer by activating a cytochrome P450/epoxyoctadecenoic acid axis via TLR4/Keap1/NRF₂ signaling[J]. *Cancer Res*, 2021, 81(17): 4485–4498.
- [5] KIM Y, CHO N Y, KANG G H. Prognostic and clinicopathological significance of *Fusobacterium nucleatum* in colorectal cancer: a systemic review and meta-analysis[J]. *J Pathol Transl Med*, 2022, 56(3): 144–151.
- [6] PARENT P, COHEN R, RASSY E, *et al.* A comprehensive overview of promising biomarkers in stage II colorectal cancer[J]. *Cancer Treat Rev*, 2020, 88: 102059.
- [7] CASTELLARIN M, WARREN R L, FREEMAN J D, *et al.* *Fusobacterium nucleatum* infection is prevalent in human colorectal carcinoma[J]. *Genome Res*, 2012, 22(2): 299–306.
- [8] YAN X B, LIU L G, LI H, *et al.* Clinical significance of *Fusobacterium nucleatum*, epithelial-mesenchymal transition, and cancer stem cell markers in stage III/IV colorectal cancer patients[J]. *Onco Targets Ther*, 2017, 10: 5031–5046.
- [9] LU X X, XU Q L, TONG Y N, *et al.* Long non-coding RNA EVADR induced by *Fusobacterium nucleatum* infection promotes colorectal cancer metastasis[J]. *Cell Rep*, 2022, 40(3): 111127.
- [10] LIU H Y, DU J F, CHAO S S, *et al.* *Fusobacterium nucleatum* promotes colorectal cancer cell to acquire stem cell-like features by manipulating lipid droplet-mediated numb degradation[J]. *Adv Sci*, 2022, 9(12): e2105222.
- [11] YU T, GUO F F, YU Y N, *et al.* *Fusobacterium nucleatum* promotes chemoresistance to colorectal cancer by modulating autophagy[J]. *Cell*, 2017, 170(3): 548–563. e16.
- [12] LI J A, MEI S W, ZHOU S C, *et al.* Perineural invasion is a prognostic factor in stage II colorectal cancer but not a treatment indicator for traditional chemotherapy: a retrospective cohort study[J]. *J Gastrointest Oncol*, 2022, 13(2): 710–721.
- [13] XIE Y X, JIAO X Y, ZENG M, *et al.* Clinical significance of *Fusobacterium nucleatum* and microsatellite instability in evaluating colorectal cancer prognosis[J]. *Cancer Manag Res*, 2022, 14: 3021–3036.
- [14] HUANGFU S C, ZHANG W B, ZHANG H R, *et al.* Clinicopathological and prognostic significance of *Fusobacterium nucleatum* infection in colorectal cancer: a meta-analysis[J]. *J Cancer*, 2021, 12(6): 1583–1591.
- [15] EISELE Y, MALLEA P M, GIGIC B, *et al.* *Fusobacterium nucleatum* and clinicopathologic features of colorectal cancer: results from the ColoCare study[J]. *Clin Colorectal Cancer*, 2021, 20(3): e165–e172.
- [16] LEE J B, KIM K A, CHO H Y, *et al.* Association between *Fusobacterium nucleatum* and patient prognosis in metastatic colon cancer[J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 20263.
- [17] GAO Y H, BI D X, XIE R T, *et al.* Correction To: *Fusobacterium nucleatum* enhances the efficacy of PD-L1 blockade in colorectal cancer[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6(1): 434.
- [18] ZHANG X, ZHANG Y P, GUI X R, *et al.* Salivary *Fusobacterium nucleatum* serves as a potential biomarker for colorectal cancer[J]. *iScience*, 2022, 25(5): 104203.
- [19] PETRELLI F, LABIANCA R, ZANIBONI A, *et al.* Assessment of duration and effects of 3 vs 6 months of adjuvant chemotherapy in high-risk stage II colorectal cancer: a subgroup analysis of the TOSCA randomized clinical trial[J]. *JAMA Oncol*, 2020, 6(4): 547–551.
- [20] DE ROBLES M S, ONEILL R S, MOURAD A P, *et al.* Survival in stage II B/C compared to stage III A rectal cancer: an Australian experience affirming that size does matter[J]. *ANZ J Surg*, 2021, 91(9): 1866–1873.
- [21] SERNA G, RUIZ-PACE F, HERNANDO J, *et al.* *Fusobacterium nucleatum* persistence and risk of recurrence after preoperative treatment in locally advanced rectal cancer[J]. *Ann Oncol*, 2020, 31(10): 1366–1375.
- [22] ZHANG S, YANG Y Z, WENG W H, *et al.* *Fusobacterium nucleatum* promotes chemoresistance to 5-fluorouracil by up-regulation of BIRC3 expression in colorectal cancer[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1): 14.
- [23] LIU Y, BABA Y, ISHIMOTO T, *et al.* *Fusobacterium nucleatum* confers chemoresistance by modulating autophagy in oesophageal squamous cell carcinoma[J]. *Br J Cancer*, 2021, 124(5): 963–974.
- [24] HONG X L, YU T C, HUANG X W, *et al.* Metformin abrogates *Fusobacterium nucleatum*-induced chemoresistance in colorectal cancer by inhibiting miR-361-5p/sonic hedgehog signaling-regulated stemness[J]. *Br J Cancer*, 2023, 128(2): 363–374.
- [25] 郭怀娟, 茅静贤, 陶明阳, 等. 具核梭杆菌介导的上皮细胞间质转化对结肠直肠癌干细胞恶性潜能的影响[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2022, 29(17): 1256–1263.
- [26] LEI X, HE Q L, LI Z Q, *et al.* Cancer stem cells in colorectal cancer and the association with chemotherapy resistance[J]. *Med Oncol*, 2021, 38(4): 43.

(本文编辑: 周冬梅 钱锋)