白介素-22与具核梭杆菌在结直肠癌发生发展中的协同作用

陆诗媛, 严婷婷, 郭方方, 陈萦昶, 洪洁*, 房静远*

上海交通大学医学院附属仁济医院消化科, 上海市消化疾病研究所, 上海 200001

* 联系人, E-mail: fangjingyuan_new@163.com; jiezhong97@163.com

收稿日期: 2018-01-08; 接受日期: 2018-03-23; 网络版发表日期: 2018-05-31

国家自然科学基金(批准号: 87320108024)资助

摘要 结直肠癌是威胁全球和我国公民健康的恶性肿瘤之一。近年来,越来越多的报道揭示了肠道微生物和免疫微环境在维持肠稳态中的重要作用;其中,具核梭杆菌介导的肠道微生态失调和免疫紊乱是近期研究热点之一。但是,少有研究关注肠道细菌和免疫炎症因子在致癌过程中的相互作用。本课题组发现,具核梭杆菌可以增高白介素-6 (IL-6)和IL-22等免疫因子的表达,从而参与大肠癌的发生发展,且与大肠癌化疗疗效相关。IL-22和具核梭杆菌可能有协同促癌作用。

关键词 IL-22, IL-6, 具核梭杆菌, 结直肠癌

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是全球发病率和肿瘤相关死亡率位列前五的恶性肿瘤之一,并有近期报道提示我国结直肠癌患者近年仍有增加。外科手术和放化疗等治疗条件较前改善,结直肠镜的筛查和干预效果有所进展,但中晚期结直肠癌的生存率无明显提高^[1-3]。结直肠癌仍是我国民众健康的重要威胁因素。

近年来,肠道菌群在结直肠癌的发生、进展、转移和耐药等过程中的作用日益被研究与认识。其中,具核梭杆菌(*F. nucleatum*, Fn)是近期的研究重点之一,其致癌机制涉及通过FadA/E-cadherin作用黏附并侵入结肠上皮细胞、激活Toll样受体4 (Toll-like receptor 4, TLR4)通路、调节肿瘤微环境、刺激肠道慢性炎症

等^[4-7]。慢性炎症激活肿瘤相关信号通路在结直肠癌的“炎-癌”途径中亦有不可忽视的作用,白介素-22 (interleukin-22, IL-22)和IL-6等炎症因子是最为广泛认可的“trigger”因素^[8-11]。

本课题组前期研究发现,具核梭杆菌丰度在结直肠癌患者中升高,并与患者的化疗敏感性和预后相关^[10];也发现IL-22水平的增高和下游STAT3通路的激活在结直肠癌的发生发展中有明显促进作用^[8]。基于肠道微生物与肠道微环境,特别是炎症环境有密切关联,本课题旨在探究具核梭杆菌和IL-22等炎症因子致癌机制中的相互关系,以期抗炎治疗在预防结直肠癌中应用提供可能的临床依据。

引用格式: 陆诗媛, 严婷婷, 郭方方, 等. 白介素-22与具核梭杆菌在结直肠癌发生发展中的协同作用. 中国科学: 生命科学, 2018, 48: 684-691
Lu S Y, Yan T T, Guo F F, et al. Interleukin-22 and *Fusobacterium nucleatum* cooperate in promoting colorectal cancer (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2018, 48: 684-691, doi: [10.1360/N052018-00010](https://doi.org/10.1360/N052018-00010)

1 材料和方法

1.1 菌株来源与培养

本研究使用的具核梭杆菌由美国模式培养物集存库ATCC购买(ATCC 25586). 具核梭杆菌在厌氧操作台(DG250, Don Whitley Scientific, 美国)以BHC培养基(详见参考文献[8,12]) 37℃恒温培养过夜备用, 以对应MOI (感染复数)计算所需的无血清培养基配比后用于细胞实验^[8,12].

1.2 细胞培养和实验处理

人类结直肠癌细胞株HCT116和HT29由美国模式培养物集存库ATCC购买, 并在细胞培养箱(37℃, 5% CO₂)中标准培养. 细胞培养基使用MyCo5A (GIBCO, 美国); 完全培养基以胎牛血清配置. 所有体外功能实验所用细胞均于前一天换液备用, 各实验方法如下.

1.3 药品来源与准备

奥沙利铂, 顺铂和伊立替康(Selleck Chemicals订购)以无血清培养基配比为对应浓度后用于细胞实验. IL-22 (R&D公司, 美国)和IL-6 (R&D公司)以无血清培养基配比后用于细胞实验.

1.4 动物组织标本留取

本课题组前期研究使用C57BL/6小鼠(*Mus musculus*)建立结直肠癌模型, 标准流程处死并解剖小鼠, 计量大肠成瘤情况后^[8], 每只小鼠留取正常组织和肿瘤组织各一份, 留存于-80℃, 由本次研究课题使用. 所有涉及小鼠的实验均得到中国交通大学附属仁济医院实验中心动物伦理委员会的管理与批准.

1.5 蛋白免疫印迹实验

按标准流程提取并制备小鼠肠黏膜和细胞的蛋白

样本(Pierce™ BCA Protein Assay Kit ,Thermo Scientific™), 经10% SDS-PAGE电泳液电泳, PVDF膜转膜, 5%牛血清蛋白(bovine albumin, BSA)封闭, 抗体孵育后以化学发光免疫法(Thermo Scientific™, 美国)检测待测蛋白表达水平, 使用抗体名称、属性及来源详见表1.

1.6 细胞增殖活性检测和成球实验

HCT116和HT29细胞以2×10³/孔种植于96孔板. 用于细胞增殖曲线测定的细胞, 分别以IL-6 (40 ng/mL), IL-22 (40 ng/mL)和普通培养基培养0, 24, 48, 72 h后, 使用CCK8检测法, 在450 nm处测定吸光值并计算细胞相对值. 细胞化疗药敏感度用于成球实验的细胞以IL-6 (40 ng/mL), IL-22 (40 ng/mL)和普通培养基培养10天后显微镜下计数成球个数(每组处理计数10个视野后取 $\bar{x}$)^[10,13].

1.7 化疗药物敏感性测定

HCT116和HT29细胞以2×10³/孔种植于96孔板. 分别以IL-6 (40 ng/mL), IL-22 (40 ng/mL)和普通培养基培养24 h后, 换为含不同浓度化疗药的培养基, 培养48 h后进行检测. 以CCK8检测法测定吸光值并计算为相对细胞存活率表示(每组中化疗药物浓度为0的细胞对应的平均吸光值, 设为相对存活率=1.0). 顺铂实验浓度设定为0, 1, 2 μg/mL, 伊立替康实验浓度设定为0, 1.25, 2.5 μmol/L, 奥沙利铂实验浓度设定为0, 2, 4 μmol/L.

1.8 转录组测序和信号通路分析

HT29细胞以40 ng/mL IL-22共培养24 h, 按标准流程提取细胞RNA, 以RNeasy Mini Column (Qiagen, 美国)和DNA酶纯化, 并通过Agilent 2100 Bioanalyzer质

表 1 Western blot抗体属性

抗体名称(一抗)	种属	商品货号	订购公司
IL22	兔(<i>Leporidae</i>)	ab181007	Abcam
IL6	鼠	12912S	Cell Signaling Technology, Inc.
STAT3	鼠	9139S	Cell Signaling Technology, Inc.
p-STAT3	兔	9145L	Cell Signaling Technology, Inc.

量检测合格, 最终以Illumina HiSeq 2000测序. 以TopHat v2.0.11 (<http://tophat.cbcb.umd.edu>)比对测序结果和人类基因组序列(hg19, Ensembl_GRCh37)^[14], 在Cuffdiff上做基因差异表达分析(<http://cufflinks.cbcb.umd.edu>, 具体步骤见Trapnell等人^[15,16]的研究). 最后在CummeRbund (<http://compbio.mit.edu/cummeRbund/>)上对筛选的差异基因做基因表达谱聚类分析(GSEA). 本研究RNA测序数据均已上传至GEO (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>).

1.9 数据统计和图表绘制

本研究按实验设计分组, 使用IBM SPSS Statistics 20.0 (BM Inc, 美国)做Student's *t*检验(所有检验均为双尾检验, *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$). 所有图表均使用GraphPad Prism 6 software (GraphPad Inc, 美国)绘制.

2 实验结果

2.1 具核梭杆菌刺激小鼠肠黏膜上皮IL-6, IL-22表达和STAT3通路激活

本课题组在一项前期课题中, 使用C57BL/6小鼠建立结直肠癌和具核梭杆菌(Fn)作用模型, 标准流程分离小鼠结直肠组织, 测量肠道成瘤个数、大小, 再次得出了Fn促进结直肠癌发生的支持证据^[8], 并留取相关组织样本. 为探求其分子机制, 课题组利用前期留取的组织样本, 进一步以蛋白免疫印迹检测实验小鼠肠黏膜上皮相关炎症因子表达水平和癌症相关通路活性的变化. 结果显示, 与PBS对照组(control组)相比, 具核梭杆菌处理(Fn+PBS组)的小鼠黏膜组织中, 炎症因子IL-6, IL-22和STAT3通路激活标志p-STAT3的蛋白表达量显著增高(图1A和B). 同样地, Fn+DMH组IL-6, IL-22及p-STAT3蛋白表达显著高于DMH组(图1C和D). 此结果提示, 具核梭杆菌可能刺激小鼠肠道组织IL6和IL22的表达, 继而激活p-STAT3通路, 以此促进

图1 具核梭杆菌刺激IL-6, IL-22表达和STAT3通路激活

A~D: PBS对照组, PBS+Fn组, DMH组和DMH+Fn组小鼠肠黏膜Western blot结果. 具核梭杆菌刺激后IL-6, IL-22和p-STAT3蛋白表达水平可见增高

结直肠癌的发生.

2.2 IL6和IL22提高结直肠癌细胞干性和细胞增殖活性

为验证白介素分子在结直肠癌发生发展中的作用, 本课题组以常见人类结直肠癌细胞株HCT116和HT29行细胞增殖活性检测和肿瘤成球实验. 结直肠癌细胞计数种植后分别以含有IL-6 (40 ng/mL)和IL-22 (40 ng/mL)培养基培养, 并以普通培养基为对照, 分别测定0, 24, 48, 72 h后细胞活性. 细胞增殖曲线显示, IL6和IL22刺激后, 结直肠癌细胞的增殖能力显著提高($P<0.05$), 且IL22作用更为明显(图2A和B). 肿瘤细胞成球实验用于验证细胞干性, 接种的细胞分别以含有

IL-6 (40 ng/mL)和IL-22 (40 ng/mL)培养基培养, 并以普通培养基为对照, 可以发现, IL22作用下肿瘤细胞的成球数目有明显增加并有显著的统计学差异($P<0.01$), IL6作用后成球数可见增加趋势但无统计学意义(图2C和D).

2.3 IL6和IL22降低肿瘤细胞化疗敏感性

已有实验验证肠黏膜具核梭杆菌丰度增高的结直肠癌患者化疗耐药率和复发率, 预后相对较差^[5]. 为探究Fn刺激增高的细胞因子在结直肠癌化疗耐药中的作用, 本课题组在结直肠癌细胞株中检测IL6和IL22对细胞化疗反应性的影响. 实验结果显示, 白介素刺激后的HCT116和HT29肿瘤细胞在化疗药物作用下的相对

图 2 IL6和IL22提高肿瘤细胞干性和增殖活性

A和B: 不同实验组HCT116和HT29细胞增殖曲线. IL-6, IL-22处理后细胞增殖活性较对照组显著增加. C和D: 不同实验组HCT116和HT29成球情况(20×光学显微镜)和平均成球个数统计图. IL22作用的细胞成球个数明显增加($P<0.01$), 肿瘤细胞干性增强. IL6作用的肿瘤细胞成球较对照组有所增加

存活率均有显著提高,并在顺铂、伊立替康和奥沙利铂等药物中有较好的重复性(图3A~F)。此结果提示,IL6和IL22可以降低结直肠癌细胞对化疗药物的敏感性,在化疗耐药中有一定的作用。

2.4 IL22激活Toll样受体和STAT3通路协同具核梭杆菌致癌作用

鉴于结直肠癌是遗传、环境和肠道微生态的共同作用,本课题组尝试探究炎症因子对具核梭杆菌的协

同增强作用。用IL22刺激HT29细胞后提取细胞RNA送检,对mRNA测序结果行相关信号通路的基因富集分析,发现处理后的细胞中有Toll样受体(TLR)、STAT3和细胞因子受体等通路的激活(图4A和B)。Fn刺激细胞过程中,TLR4通路的激活有重要意义^[4,5,17],而IL22-pSTAT3通路调控结直肠癌细胞分裂增殖和细胞干性等基因表达^[8,10],因此推测IL22与具核梭杆菌在结直肠癌发生发展中有协同增强作用。此外,GSEA分析结果提示,Fn-IL22-STAT3通路或为Fn促进结直肠癌发生发

图3 IL6和IL22降低肿瘤细胞化疗敏感性

A~F: 各实验组HCT116细胞(A~C)和HT29细胞(D~F)在不同浓度顺铂、伊立替康、奥沙利铂作用下的细胞相对存活率。各组IL-22处理的结直肠癌细胞相对存活率有显著提高($P < 0.01$),提示IL22可能提高肿瘤细胞耐药性;而IL6作用无明显统计学意义

图 4 IL22激活TLR和STAT3通路(网络版彩图)

A和B: IL22刺激后HT29细胞RNA测序结果的基因富集分析. GSEA分析可见细胞内TLR和JAK-STAT通路的激活

展的机制之一.

3 讨论

结直肠癌的发生发展是机体、环境和肠道微生态等因素共同作用的结果. 具核梭杆菌与结直肠癌的发生、转移和复发等均有关联^[4-6,17]. 肠道微环境中, 免疫细胞和炎症因子在癌症相关通路中的调节作用也广为认可. IL-6和IL-22等在肿瘤患者组织和血液中表达量增高, 与癌症的发生、化疗疗效和预后有关^[10,12,18,19]. JAK-STAT3调控Bcl家族、细胞周期家族、炎症因子等基因的转录, 是明确的肿瘤相关信号通路^[9,12,18].

本研究结果提示, 具核梭杆菌可以增加结直肠癌组织中IL6和IL22的表达、激活STAT3通路; 而功能实验结果显示, IL22和IL6对肿瘤细胞的增殖、干性和化疗耐药有促进作用. IL22主要由Th17, Th22等细胞分泌, 而趋化因子CCL20对CCR6的趋化作用是该类免疫细胞迁移的重要信号^[20,21]. 此前研究提示, 多种肿瘤中癌细胞表面CCL20表达增高, CCR6/CCL20的相互作用在促进肿瘤增殖、迁移和免疫逃逸等方面均有体现^[22-24]. 本课题组前期研究也发现, 有CCR6阳性T细胞在结直肠癌患者黏膜环境中聚集, 并通过分泌IL22提高肿瘤细胞增殖活性和干性; 还在小鼠模型中验证了CCL20在黏膜上皮表达增高^[10]. 因此推测, Fn一方面通过趋化特定免疫细胞迁移并分泌炎症因子, 提高实验小鼠肠道黏膜组织IL6和IL22等表达, 从而进一步激活IL6/IL22-STAT3通路发挥致癌作用; 另一方面, Fn可能通过上调CCL20等趋化因子受体表达, 促进上述作用. 此外, 有研究报道幽门螺杆菌感染的胃黏膜上皮表面有TLR和炎症因子表达增高^[25,26], 而抗生素治疗后小鼠败血症模型肝细胞表面TLR和炎症因子表达下调^[22], 还有研究提示白介素等炎症因子可能作为TLR等模式识别受体激活的佐剂^[23], 但肠道细菌对结直肠上皮TLR表达作用少有研究. 本课题组发现, IL22刺激后细胞模式识别受体(pattern recognition receptor, PRR)相关通路激活. 结合以上研究结果, 推测Fn和炎症因子可能上调肠上皮细胞PRR表达与下游信号分子, 增加具核梭杆菌的定植力和致病性; 同时刺激免疫细胞迁移并表达IL6/IL22等免疫因子, 提高肠上皮细胞的增殖活性及干性, 从而促进结直肠癌的发生发展. 此外, 由本实验结果可见, IL22在结直肠癌中的作用可能比IL6更为重要, 鉴于IL6抑制剂在一些临床肿瘤患者治疗中有所疗效^[8,11,18], 未来或可尝试IL22抑制剂在结直肠癌患者治疗中的应用.

本研究揭示了肠道细菌和免疫-炎症系统在致癌机制中的协同作用, 或可提示肠道细菌丰度检测和炎症因子检测并用在结直肠癌诊断、监测和预后判断中的应用意义, 也提示了抗炎治疗和肠道微生态制剂等在结直肠癌治疗中的应用前景.

参考文献

- 1 Douillard J Y, Rong A, Sidhu R. *RAS* mutations in colorectal cancer. *N Engl J Med*, 2013, 369: 2159–2160

- 2 Chen W Q, Zheng R S, Zuo T T, et al. National cancer incidence and mortality in China, 2012. *Chin J Cancer Res*, 2016, 28: 1–11
- 3 Siegel R L, Miller K D, Jemal A. Cancer Statistics, 2017. *CA Cancer J Clin*, 2017, 67: 7–30
- 4 Bullman S, Pedamallu C S, Sicinska E, et al. Analysis of *Fusobacterium* persistence and antibiotic response in colorectal cancer. *Science*, 2017, 358: 1443–1448
- 5 Yu T C, Guo F, Yu Y, et al. *Fusobacterium nucleatum* promotes chemoresistance to colorectal cancer by modulating autophagy. *Cell*, 2017, 170: 548–563.e16
- 6 Kostic A D, Chun E, Robertson L, et al. *Fusobacterium nucleatum* potentiates intestinal tumorigenesis and modulates the tumor-immune microenvironment. *Cell Host Microbe*, 2013, 14: 207–215
- 7 Rubinstein M R, Wang X, Liu W, et al. *Fusobacterium nucleatum* promotes colorectal carcinogenesis by modulating E-cadherin/ β -catenin signaling via its FadA adhesin. *Cell Host Microbe*, 2013, 14: 195–206
- 8 Yu Y N, Yu T C, Zhao H J, et al. Berberine may rescue *Fusobacterium nucleatum*-induced colorectal tumorigenesis by modulating the tumor microenvironment. *Oncotarget*, 2015, 6: 32013–32026
- 9 Yu H, Pardoll D, Jove R. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9: 798–809
- 10 Kryczek I, Lin Y, Nagarsheth N, et al. IL-22⁺CD4⁺ T cells promote colorectal cancer stemness via STAT3 transcription factor activation and induction of the methyltransferase DOT1L. *Immunity*, 2014, 40: 772–784
- 11 Waldner M J, Foersch S, Neurath M F. Interleukin-6—a key regulator of colorectal cancer development. *Int J Biol Sci*, 2012, 8: 1248–1253
- 12 Rhee K J, Wu S, Wu X, et al. Induction of persistent colitis by a human commensal, enterotoxigenic bacteroides fragilis, in wild-type C57BL/6 mice. *Infect Immun*, 2009, 77: 1708–1718
- 13 Kryczek I, Liu S, Roh M, et al. Expression of aldehyde dehydrogenase and CD133 defines ovarian cancer stem cells. *Int J Cancer*, 2012, 130: 29–39
- 14 Trapnell C, Pachter L, Salzberg S L. TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. *Bioinformatics*, 2009, 25: 1105–1111
- 15 Trapnell C, Hendrickson D G, Sauvageau M, et al. Differential analysis of gene regulation at transcript resolution with RNA-seq. *Nat Biotechnol*, 2013, 31: 46–53
- 16 Trapnell C, Roberts A, Goff L, et al. Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nat Protoc*, 2012, 7: 562–578
- 17 Yang Y, Weng W, Peng 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- κ B, and up-regulating expression of microRNA-21. *Gastroenterology*, 2017, 152: 851–866.e24
- 18 Kitamura H, Ohno Y, Toyoshima Y, et al. Interleukin-6/STAT3 signaling as a promising target to improve the efficacy of cancer immunotherapy. *Cancer Sci*, 2017, 108: 1947–1952
- 19 Zeng J, Tang Z H, Liu S, et al. Clinicopathological significance of overexpression of interleukin-6 in colorectal cancer. *World J Gastroenterol*, 2017, 23: 1780
- 20 Zhuang Y, Peng L S, Zhao Y L, et al. Increased intratumoral IL-22-producing CD4⁺ T cells and Th22 cells correlate with gastric cancer progression and predict poor patient survival. *Cancer Immunol Immunother*, 2012, 61: 1965–1975
- 21 黄永红, 曹云飞, 高枫, 等. Th22细胞及相关因子在结直肠癌的表达. *免疫学杂志*, 2014, (9): 813–815
- 22 Rubie C, Frick V O, Ghadjar P, et al. CCL20/CCR6 expression profile in pancreatic cancer. *J Transl Med*, 2010, 8: 45
- 23 Hu D, Du C, Xue W, et al. The expression of chemokine receptors CCR6, CXCR2 and CXCR4 is not organ-specific for distant metastasis in colorectal cancer: a comparative study. *Histopathology*, 2013, 63: 167–173
- 24 陈斌, 路雨明, 陶磊, 等. 趋化因子受体CCR6及CCR7在喉鳞状细胞癌中表达的研究-R. 《临床耳鼻咽喉头颈外科杂志》, 2010, 24: 975–979
- 25 Moura S B, Almeida L R, Guerra J B, et al. Toll-like receptor (*TLR2*, *TLR4* and *TLR5*) gene polymorphisms and *Helicobacter pylori* infection in children with and without duodenal ulcer. *Microbes Infect*, 2008, 10: 1477–1483
- 26 Lagunes-Servin H, Torres J, Maldonado-Bernal C, et al. Toll-like receptors and cytokines are upregulated during *Helicobacter pylori* infection in children. *Helicobacter*, 2013, 18: 423–432

Interleukin-22 and *Fusobacterium nucleatum* cooperate in promoting colorectal cancer

LU ShiYuan, YAN TingTing, GUO FangFang, CHEN YingXuan, FANG JingYuan & HONG Jie

Shanghai Institute of Digestive Disease, Department of Gastroenterology, Renji Hospital Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200001, China

Colorectal cancer is one of the most common malignant tumors that threaten human health worldwide. Growing research has revealed the significant role of gut microbe and immune microenvironment in maintaining intestinal hemostasis, among which *Fusobacterium nucleatum*-mediated microbial disequilibrium and immune imbalance is one of the research hotspots. Few researches, however, explored the interaction between inflammatory and immune cytokines and gut microbiota. The results in our study indicated that *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*) may elevate the expression of interleukin-6 and interleukin-22, resulting in the progression of colorectal cancer (CRC). Moreover, *F. nucleatum* seemed to influence the chemotherapeutic response in colorectal cancer cell. Therefore, we assume that interleukin 22 and *F. nucleatum* could cooperate in CRC development.

IL-22, IL-6, *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum* (*F. nucleatum*, Fn), colorectal cancer (CRC)

doi: [10.1360/N052018-00010](https://engine.scichina.com/doi/10.1360/N052018-00010)