



无菌鼠模型在结直肠癌研究中的应用

赵日升, 曹蕾, 于君*

(香港中文大学内科与药物治疗学系, 消化病学研究所, 香港中文大学消化疾病研究国家重点实验室, 香港)

【摘要】 越来越多的证据表明, 肠道微生物群的组成与结直肠癌的发生发展密切相关。无菌动物模型, 尤其是无菌鼠模型简单、易获得, 为研究微生物群、结直肠肿瘤及机体间的复杂关系提供了重要工具。无菌鼠模型的建立主要通过剖腹产及无菌隔离器饲养和繁育来实现。在此基础之上, 可以根据特定的研究目的, 建立转基因或药物诱导的特殊类型无菌鼠模型。目前, 无菌鼠模型在结直肠癌研究中已经得到了广泛应用。基于无菌鼠模型的研究结果表明, 微生物或微生物群可以激活免疫和诱发炎症, 从而促进结直肠癌的发生发展; 同时也证明, 微生态失衡与结直肠癌的发生发展相辅相成、互为因果关系。由于无菌鼠模型是研究微生态失衡所致的结直肠癌及相关疾病研究重要且有效的研究载体, 因此, 值得进一步推广应用。

【关键词】 无菌小鼠; 结直肠癌; 肠道微生物群

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2017) 06-0658-05

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2017.06.013

Application of germ-free mice in colorectal cancer research

ZHAO Ri-sheng, CAO Lei, YU Jun*

(Department of Medicine & Therapeutics, Institute of Digestive Disease, State Key Laboratory of Digestive Disease, The Chinese University of Hong Kong, Hong Kong)

【Abstract】 Accumulated evidence shows that gut microbial composition is closely related to the development of colorectal cancer. Germ-free animal models, especially germ-free murine models, have been shown to be simple and easy to access, which provide a valuable tool for studying the correlation between microbiota, colorectal neoplasms and the host. These models are mainly established by cesarean section followed by rearing and breeding the pups in sterile isolators. Similarly, some special models, such as transgenic and drug-induced murine models, can also be developed according to the study purposes. To date the germ-free murine models have been widely used in the field of colorectal cancer research, showing that certain microbes or microorganisms can promote the occurrence and development of colorectal cancer by activating immune response and inducing inflammation. Results from germ-free murine models have demonstrated that gut microbial dysbiosis and colorectal cancer development influence each other and are reciprocal causation. Taken together, germ-free murine models are important tools for investigating the mechanisms of the tumorigenesis in colon and rectum, especially dysbiosis-induced colorectal cancer.

【Key words】 Germ-free mice; Colorectal cancer; Gut microbiota

Corresponding author: YU Jun. Email: junyu@cuhk.edu.hk

在世界范围内, 结直肠癌是男性第三、女性第二常见的恶性肿瘤, 其在发达地区 (澳大利亚、新西兰、欧洲和北美洲) 的发病率显著高于不发达地区 (非洲和中南亚)^[1]。在中国, 结直肠癌的发病率和

死亡率分别约为 376.3/10 万和 191.0/10 万, 且城市明显高于农村; 而在香港, 结直肠癌的发病率更是位居癌症谱之首^[2, 3]。从数据中不难看出, 发达地区的结直肠癌发病率高于欠发达地区。因此, 在当

[基金项目] 国家 973 计划 (No. 2013CB531401)。

[作者简介] 赵日升, 男, 博士, 主要从事消化病研究。Email: zhaorsh@link.cuhk.edu.hk

[通讯作者] 于君, 女, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事消化病研究。Email: junyu@cuhk.edu.hk

前经济快速发展、民生不断改善的中国,随着人民生活水平的提高,结直肠癌对国人健康的威胁将会越来越大。

与其他肿瘤不同,结直肠肿瘤的特殊性在于其暴露于肠腔中,直接与数以千亿计的微生物群及其代谢产物接触,因此,结直肠肿瘤的微环境极其复杂。本团队率先对中国与外国人群的粪便微生物群进行了宏基因组学的比较分析,结果表明,尽管不同人群中肠道微生物群的组成不同,但部分菌群,如具核梭杆菌(*Fusobacterium nucleatum*)、消化链球菌(*Peptostreptococcus stomatis*)和微单胞菌(*Parvimonas micra*)等在多个人群队列中均明显升高,表明结肠癌可能导致相似的菌群失衡,并且此微生态失衡与肿瘤的发生密切相关^[4]。这种相关性并非偶然,我们通过自主建立的细菌标志物定量检测平台,在多个人群中检测了该宏基因组研究中发现的细菌的富集程度,结果发现,多个细菌标志物在结直肠癌的无创诊断中具备较高的应用价值,说明结直肠癌患者的微生态失衡存在普遍性和规律性^[5,6]。接着,基于上述宏基因组研究结果,我们对其中厌氧消化链球菌(*Peptostreptococcus anaerobius*)在结直肠癌中的功能机制进行了深入研究,证实厌氧消化链球菌可以显著增加小鼠肠黏膜的异型增生程度,促进共培养的结肠癌细胞的增殖,并激活 Toll 样受体 2(Toll-like receptor 2, TLR2)和 4(TLR4),增加细胞内的氧化应激反应,激活固醇调节元件结合蛋白 2(sterol regulatory element binding protein, SREBP2),促进胆固醇合成,从而发挥促癌功能^[7]。此外,我们通过 16S 核糖体核苷酸测序,进一步比较了正常肠黏膜、腺瘤性息肉以及腺癌组织的菌群组成,结果显示,不同结直肠癌发展阶段的肠道菌群亦有明显差异,其中部分菌群呈现逐渐富集的趋势^[8]。综合上述结果,肠道微生物群在结直肠癌发生发展过程中发挥着非常重要的作用,这一观点也逐渐得到了国内外研究的广泛支持。

虽然早期粪便或内镜筛查及多学科协作的治疗模式极大降低了结直肠癌的病死率,但进一步提高结直肠癌的防治水平仍然面临挑战,需要不断创新治疗手段,并落实更加全面的预防措施^[9]。系统深入地发掘并阐释特定微生物群在结直肠癌发生发展中的作用,将利于人们更加综合全面地认识结直肠癌的发病机制,为其预防、诊断和治疗开辟新的道路。然而,肠道微生物群是一个庞大、有机且复杂的

共生系统,欲了解其中特定微生物群的病理生理学功能并不容易。为此,研究人员常采用单种或联合使用多种抗生素来杀灭部分微生物群,从而观察微生物群变化对机体或代谢的影响^[10,11]。然而,受抗生素作用的广谱性和非特异性的限制,加之外界环境中微生物群的干扰,此种方法仅能用于粗略的观察研究,而较难得出确切结论;此外,药物需经肝肾代谢,也会引起实验动物本身一系列的病理生理改变,并可能对实验结果造成影响,因此,这种方法存在一定的局限性。无菌(germ-free, GF)动物模型,尤其是无菌鼠模型,恰好为突破这一研究瓶颈提供了简单、易行且有效的技术支撑。本文旨在对无菌鼠模型的建立及在结肠癌研究中的应用做一简单综述,以期该项技术在结直肠癌研究中的推广应用提供参考。

1 无菌鼠模型的建立

无菌动物是指动物从出生到死亡整个生命过程中,不携带可以通过现有技术检测的包括细菌、病毒、衣原体、支原体、立克次体、螺旋体、放线菌、真菌、原生生物和寄生虫在内的一切微生物。早在一个多世纪前,就有学者提出了无菌动物的概念,自此相关讨论和研究不断深入^[12]。1946 年,Reyniers 等^[13]首先成功饲养并繁育了健康的无菌大鼠;1959 年,Pleasant 等^[14,15]又成功建立了无菌小鼠模型,并在之后又进行了改良。无菌鼠模型需要隔离器为其提供一个与外界完全隔绝、不含任何微生物的封闭且洁净的独立环境。早期的无菌隔离器是由金属制成的,笨重且昂贵,不便使用。后来,逐渐衍生出了柔软的塑料薄膜隔离器,大大降低了成本,同时提高了使用的灵活性。此外,随着饲养技术的不断改进,无菌鼠模型得到了长足的发展和广泛的应用,现已成为研究微生物群和宿主相互作用的重要载体和工具。

1.1 无菌鼠模型建立所需的基本条件

理论上,任意品系鼠均可用于建立无菌鼠模型,其中较为常用的大鼠品系包括 F344、Wistar 和 Sprague-Dawley(SD)等;较为常用的小鼠品系包括 C57BL/6、BALB/c、Swiss Webster、Kunming 和 ICR 等。因此,可结合实验室条件及实验目的进行个体化选择。

由于无菌鼠模型的建立主要通过将剖腹产获得的仔鼠转移至无菌环境下饲养和繁育来实现,因此,

实验室需要拥有一定的设施和条件来保障这一建立过程。所需设施包括培育无菌鼠的专用无菌隔离器,与隔离器相匹配的传输容器,可以对装有食物(允许高压灭菌)、水、饲养笼和垫料等饲养所需物资灭菌的高压灭菌器,可用于表面消毒的 Clidox 等消毒剂,用于动物消毒的 1% 氯水等消毒剂,以及用于剖腹产的手术器械^[16]。

1.2 一般无菌鼠模型的建立方法

无菌鼠模型的建立主要包括以下几个步骤^[17]:(1)判断剖宫产日:通过阴道栓判断母鼠受孕成功后,根据经验或者以提前交配的同种鼠的孕产期为依据,推断出受孕母鼠的预产期。(2)行剖宫产术取子宫囊:于预产期前日,通过脱颈法处死母鼠,对母鼠进行充分消毒,然后按照无菌原则要求行剖腹产术。为了避免仔鼠污染,应在切取子宫前提前结扎两侧输卵管及宫颈底部,并完整分离子宫,注意谨慎操作,避免损伤子宫囊。(3)隔离器中剖取仔鼠:将包裹仔鼠的封闭子宫囊充分消毒后,迅速转移至无菌隔离器内,然后剪开子宫壁,分离胎盘,剪断脐带,取出仔鼠,用棉签擦拭清理仔鼠口鼻异物,并刺激仔鼠促其自主呼吸。(4)仔鼠的喂养:仔鼠由人工哺乳或无菌代乳鼠喂养;由于仔鼠生产过程到产后接触的均为无菌环境,包括乳汁、水和食物,因此,基本实现了无菌化。然而,母鼠并非无菌鼠,其体内的微生物群可能会通过胎盘传播给仔鼠,因此,不建议将第一代仔鼠用于无菌鼠实验。有时需重复数代才能成功建立无菌模型。(5)无菌鼠的监测:每 1 ~ 2 周,最迟 1 月,需要收集 1 次粪便和垫料,进行无菌状态监测。具体监测方法包括:革兰染色涂片并于显微镜下查找细菌;分别于有氧和无氧环境下,采用绵羊血平板或脑心肉汤培养基进行粪便培养,也可考虑使用 Sabouraud 培养基监测可能存在的真菌污染;提取粪便 DNA,采用聚合酶链式反应方法检测有无细菌污染^[16, 18]。若存在污染,则说明不满足无菌条件要求。

1.3 特殊无菌鼠模型的建立方法

1.3.1 针对宿主的特殊模型

基于一般无菌鼠模型的建立方法,可以进一步通过无菌繁育或特殊干预手段,建立特殊的结直肠癌无菌鼠模型。目前,常用的结直肠癌模型包括基因突变结直肠癌模型和药物诱导的结直肠癌模型^[19]。其中基因突变结直肠癌模型以 APC 单等位基因突变鼠最为常见,此基因突变可导致实

验鼠出生后 6 ~ 8 周出现自发性全肠道多发肿瘤(multiple intestinal neoplasia, MIN),因此,也被称作 APC^{min/+} 鼠模型。药物诱导的结直肠癌模型可以采用致癌剂 1,2-二甲基肼(1,2-Dimethylhydrazine, DMH)造模,连续皮下注射 12 周,每周 1 次,即可观察到结直肠癌形成^[20];或直接采用 DMH 代谢产物氧化偶氮甲烷(azoxymethane, AOM)连续腹腔注射 6 周,每周 1 次,30 周后实验鼠可稳定形成结直肠部位的特异性肿瘤;此外,还可以在单次注射 AOM 后,连续使用 3 个循环(每 3 周 1 个循环)的肠道促炎剂葡聚糖硫酸钠(dextran sulfate sodium, DSS),实验鼠一般在 AOM 注射后 70 ~ 80 d 可稳定形成远端结直肠癌,这也被称作炎症相关性肿瘤模型。需要注意的是不同品系动物对 AOM 和 DSS 的敏感性不同,需根据不同承受能力个体化调整 AOM 的剂量及每循环 DSS 的浓度和使用天数。

1.3.2 针对微生物群的特殊模型

在无菌鼠模型的基础上,可以通过定植一种或数种已知的微生物或微生物群,将其转化为悉生鼠(gnotobiotic mice)模型,以观察或验证特定微生物间或微生物与宿主间的相互作用关系,并探讨此相互作用在包括结直肠癌在内的疾病的发生发展过程中的作用。此外,还可以给予无菌鼠某种药物或物质,从而协助判断其对机体的影响是否需要微生物的代谢或参与。近年来,大量研究发现,不同微生物的代谢产物也与结直肠癌的发生密切相关^[21]。因此,给予无菌鼠模型一种或数种已知的微生物代谢产物,并观察这些特定代谢产物间或代谢产物与机体间的相互作用关系,可以为揭示这些物质直接引起的病理生理过程提供有效的研究手段。

2 无菌鼠模型在结直肠癌中的应用

无菌鼠模型本身是研究缺失所有微生物群对结直肠癌和机体影响的良好载体。有研究发现,无菌 APC^{min/+} 鼠或的肿瘤负荷明显低于无特定病原菌(specific pathogen free, SPF)鼠^[22];另有研究发现,致癌剂诱导的无菌鼠结直肠癌发生率亦明显低于肠道微生物群正常者^[23]。此外,Kado 等^[24]通过观察 T 细胞受体 β 链和 p53 基因双敲除无菌鼠发现,4 月龄时,无菌鼠未出现任何肿瘤;而将无菌鼠转出无菌环境饲养后,4 月龄时 70% 动物出现了结肠腺癌。Engle 等^[25]研究发现,转化生长因子缺陷鼠可由黏膜下炎症和增生性隐窝逐渐发展演变为结肠

癌,而转化生长因子缺陷的无菌鼠则未出现任何炎症、增生性隐窝或结肠癌病灶,但当重新定植肝螺旋杆菌后,无菌鼠肠道内重现了上述病变。这些研究均表明,肠道微生物群在结直肠肿瘤形成过程中扮演者重要角色。Horie 等^[26]通过将单种微生物定植到无菌鼠体内发现,定植不同微生物后的肿瘤发生率为 30%~68% 不等,进一步提示肠道微生物参与结直肠肿瘤的发生,并且不同微生物对结直肠癌发生的影响程度有所不同。

有研究表明,粪肠球菌和普通拟杆菌定植到无菌鼠体内,可以通过黏膜免疫细胞 Toll 样受体激活肠上皮细胞的坏死因子 κ B 信号通路,从而诱发结肠炎^[27];提示微生物可以通过诱发炎症及后续改变,促进结直肠肿瘤的发生。Wu 等^[28]研究表明,将脆弱拟杆菌定植到无菌 APC^{min/+} 鼠体内,可以激活 Th17 细胞,从而增加结直肠肿瘤的发生。针对某种微生物,如大肠埃希菌 (*E. coli*), Arthur 等^[29]发现,在无菌鼠模型中定植大肠埃希菌 NC101 菌株会促进 AOM 诱导的白介素 10 (IL-10) 基因敲除鼠的肿瘤数量和侵袭能力,而敲除大肠埃希菌 NC101 菌株中的聚酮合酶基因,则可以降低无菌鼠模型肿瘤的发生和侵袭;这表明,微生物确实可以通过表达某些基因毒性相关的蛋白影响机体,进而促进结直肠肿瘤的发生发展。

此外,有动物研究发现,含核苷酸结合寡聚化结构域蛋白 2 基因缺失会增加动物的肠炎程度和炎症相关结直肠肿瘤的发生;而将该动物的微生物群转移给无菌鼠,则会增加无菌鼠的肠炎程度和炎症相关结直肠肿瘤的发生^[30]。这说明微生物群与结直肠癌直接相关。另有研究也证明了这一结论,该研究将正常鼠与合并肿瘤鼠的微生物群分别转入无菌鼠体内,结果显示,合并肿瘤鼠的微生物群较正常鼠微生物群可显著增加炎症相关结直肠肿瘤的发生^[31]。同样地,本团队与第三军医大学合作通过灌胃,分别将健康人和结直肠癌患者的粪便灌入无菌鼠体内,每周 2 次,持续 32 周;与健康人相比,结直肠癌患者的微生物群会增加肠上皮的增殖程度,并上调促炎症基因的表达水平及肠上皮内 Th1 和 Th17 的比例,表明结直肠癌患者的微生物群对结直肠肿瘤的发生发展具有一定的促进作用^[32]。继发现结直肠癌患者的肠道微生态失衡后^[4,8],本团队证明了微生态失衡反过来可以促进结直肠肿瘤的发生。因此,微生态失衡与结直肠癌的发生发展相辅

相成、互为因果关系。

值得注意的是,由于肠道微生物广泛参与食物的代谢和吸收,无菌鼠因肠道中缺失微生物群而合并营养代谢障碍,表现为结直肠和盲肠通过代偿性增生增加营养的吸收,其中增生程度以盲肠表现最为明显。此外,无菌鼠中肠道微生物群的缺失会严重影响肠道相关免疫组织和淋巴细胞的发育,并导致先天性免疫应答减弱^[33,34]。因此,在应用无菌鼠模型时应考虑到这些可能影响实验结果的因素。

综上所述,随着生活水平的提高,结直肠癌的发病率呈上升趋势。越来越多的证据表明,肠道微生物群的组成与结直肠癌的发生密切相关。无菌动物模型,尤其是无菌鼠模型,简单且易获得,作为抗生素模型的验证和补充,正逐渐成为研究微生物群、结直肠肿瘤与机体间复杂关系的重要载体和工具。无菌鼠模型的建立主要通过剖腹产和无菌隔离器内饲养和繁育来实现。根据特定的研究目的,可以建立转基因或药物诱导的特殊类型无菌鼠模型。目前,无菌鼠模型在结直肠癌研究中已经得到了广泛应用,并表明微生物或微生物群可以激活免疫和诱发炎症,从而促进结直肠癌的发生发展;同时,也证明微生态失衡与结直肠癌的发生发展相辅相成、互为因果关系。未来,随着无菌鼠模型的推广应用,相信我们可以获得更多、更综合的证据,从而更加全面地认识微生物群与结直肠癌的相互作用关系及机制。

参 考 文 献

- [1] Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012 [J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2): 87–108.
- [2] Chen WQ, Zheng RS, Baade PD, et al. Cancer statistics in China [J], 2015. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115–132.
- [3] The Hong Kong Anti-Cancer Society. HK most common cancers [EB/OL]. <https://www.hkacs.org.hk/en/knowncancer.php>.
- [4] Yu J, Feng Q, Wong SH, et al. Metagenomic analysis of faecal microbiome as a tool towards targeted non-invasive biomarkers for colorectal cancer [J]. Gut, 2015, 66(1): 70–78.
- [5] Wong SH, Kwong TN, Chow TC, et al. Quantitation of faecal *Fusobacterium* improves faecal immunochemical test in detecting advanced colorectal neoplasia [J]. Gut, 2017, 66(8): 1441–1448.
- [6] Liang Q, Chiu J, Chen Y, et al. Fecal bacteria act as novel biomarkers for noninvasive diagnosis of colorectal cancer [J]. Clin Cancer Res, 2017, 23(8): 2061–2070.
- [7] Tsoi H, Chu ESH, Zhang X, et al. *Peptostreptococcus anaerobius* induces intracellular cholesterol biosynthesis in colon cells to induce proliferation and causes dysplasia in mice [J]. Gastroenterology, 2017, 152(6): 1419–1433.

- [8] Nakatsu G, Li X, Zhou H, et al. Gut mucosal microbiome across stages of colorectal carcinogenesis [J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 8727.
- [9] Byers T, Wender RC, Jemal A, et al. The American Cancer Society challenge goal to reduce US cancer mortality by 50% between 1990 and 2015: results and reflections [J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(5): 359–369.
- [10] Lindenbaum J, Rund DG, Butler VP, et al. Inactivation of digoxin by the gut flora: reversal by antibiotic therapy [J]. *N Engl J Med*, 1981, 305(14): 789–794.
- [11] Song XY, Gao HC, Lin YY, et al. Alterations in the microbiota drive interleukin-17C production from intestinal epithelial cells to promote tumorigenesis [J]. *Immunity*, 2014, 40(1): 140–152.
- [12] Gordon HA, Pesti L. The gnotobiotic animal as a tool in the study of host microbial relationships [J]. *Bacteriol Rev*, 1971, 35(4): 390–429.
- [13] Reyniers JA, Trexler PC, Ervin RF. Rearing germ-free albino rats [J]. *Lobund Reports*, 1946, (1): 1–84.
- [14] Pleasants JR. Rearing germfree cesarean-born rats, mice, and rabbits through weaning [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 1959, 78: 116–126.
- [15] Pleasants JR, Wostmann BS, Zimmerman DR. Improved hand rearing methods for small rodents [J]. *Lab Anim Care*, 1964, 14: 37–47.
- [16] Arvidsson C, Hallen A, Backhed F. Generating and analyzing germ-free mice [J]. *Curr Protoc Mouse Biol*, 2012, 2(4): 307–316.
- [17] Al-Asmakh M, Zadjali F. Use of germ-free animal models in microbiota-related research [J]. *J Microbiol Biotechn*, 2015, 25(10): 1583–1588.
- [18] Sjogren K, Engdahl C, Henning P, et al. The gut microbiota regulates bone mass in mice [J]. *J Bone Miner Res*, 2012, 27(6): 1357–1367.
- [19] Neufert C, Becker C, Neurath MF. An inducible mouse model of colon carcinogenesis for the analysis of sporadic and inflammation-driven tumor progression [J]. *Nat Protoc*, 2007, 2(8): 1998–2004.
- [20] Gurley KE, Moser RD, Kemp CJ. Induction of colon cancer in mice with 1,2-dimethylhydrazine [J]. *Cold Spring Harb Protoc*, 2015, 2015(9): pdb prot077453.
- [21] Louis P, Hold GL, Flint HJ. The gut microbiota, bacterial metabolites and colorectal cancer [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2014, 12(10): 661–672.
- [22] Li YH, Kundu P, Seow SW, et al. Gut microbiota accelerate tumor growth via c-jun and STAT3 phosphorylation in APC^{min/+} mice [J]. *Carcinogenesis*, 2012, 33(6): 1231–1238.
- [23] Reddy BS, Narisawa T, Wright P, et al. Colon carcinogenesis with azoxymethane and dimethylhydrazine in germfree rats [J]. *Cancer Res*, 1975, 35(2): 287–290.
- [24] Kado S, Uchida K, Funabashi H, et al. Intestinal microflora are necessary for development of spontaneous adenocarcinoma of the large intestine in T-cell receptor beta chain and P53 double-knockout mice [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(6): 2395–2398.
- [25] Engle SJ, Ormsby I, Pawlowski S, et al. Elimination of colon cancer in germ-free transforming growth factor beta 1-deficient mice [J]. *Cancer Res*, 2002, 62(22): 6362–6366.
- [26] Horie H, Kanazawa K, Okada M, et al. Effects of intestinal bacteria on the development of colonic neoplasm: an experimental study [J]. *Eur J Cancer Prev*, 1999, (3): 237–245.
- [27] Karrasch T, Kim JS, Muhlbauer M, et al. Gnotobiotic IL-10^{-/-};NF-κB [EGFP] mice reveal the critical role of TLR/NF-kappa B signaling in commensal bacteria-induced colitis [J]. *J Immunol*, 2007, 178(10): 6522–6532.
- [28] Wu S, Rhee KJ, Albesiano E, et al. A human colonic commensal promotes colon tumorigenesis via activation of T helper type 17 T cell responses [J]. *Nat Med*, 2009, 15(9): 1016–1022.
- [29] Arthur JC, Perez-Chanona E, Muhlbauer M, et al. Intestinal inflammation targets cancer-inducing activity of the microbiota [J]. *Science*, 2012, 338(6103): 120–123.
- [30] Couturier-Maillard A, Secher T, Rehman A, et al. NOD2-mediated dysbiosis predisposes mice to transmissible colitis and colorectal cancer [J]. *J Clin Invest*, 2013, 123(2): 700–711.
- [31] Zackular JP, Baxter NT, Iverson KD, et al. The gut microbiome modulates colon tumorigenesis [J]. *Mbio*, 2013; 4(6): e00692–13.
- [32] Wong SH, Zhao LY, Zhang X, et al. Gavage of fecal samples from patients with colorectal cancer promotes intestinal carcinogenesis in germ-free and conventional mice [J]. *Gastroenterology*, published online, doi: 10.1053/j.gastro.2017.08.028.
- [33] Falk PG, Hooper LV, Midtvedt T, et al. Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: What we know and need to know from gnotobiology [J]. *Microbiol Mol Biol R*, 1998, 62(4): 1157–1170.
- [34] Maslowski KM, Mackay CR. Diet, gut microbiota and immune responses [J]. *Nat Immunol*, 2011, 12(1): 5–9.

[收稿日期] 2017-10-09