

王敦方,朱琳,冯雪,等. AOM/DSS 结肠癌模型优化及其肠道菌群变化探究 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(2): 151-160.
WANG D F, ZHU L, FENG X, et al. Optimization of the azomethane oxide and dextran sodium sulfate model of colitis-associated colon cancer and changes in the intestinal microbiota [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(2): 151-160.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.02.002

AOM/DSS 结肠癌模型优化及其肠道菌群变化探究

王敦方¹,朱琳^{1,2},冯雪¹,张彩娟¹,刘海帆¹,刘雅清¹,刘滨^{1,2},刘丽¹,杨伟鹏^{1*}

(1. 中国中医科学院中药研究所,北京 100700;2. 黑龙江中医药大学,哈尔滨 150040)

【摘要】 目的 优化氧化偶氮甲烷(azoxymethane, AOM)联合葡聚糖硫酸钠(dextran sodium sulfate, DSS)造模结肠炎相关性结肠癌(colitis-associated colorectal cancer, CAC)方法并探究肠道菌群在CAC中的发病机制。方法 通过AOM不同注射次数联合自由饮用DSS的方法建立A(AOM 1次注射)和B(AOM 2次注射)模型组,正常组采用腹腔注射生理盐水联合饮用纯净水,每组10只。造模结束后通过DAI评分、结肠长度、成瘤率及死亡率等指标综合评估,选择最佳的造模方案。然后对B模型组小鼠进行实验,取血清以ELISA法检测白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)及肿瘤标志物CA199、CEA、CA724含量;同时进行HE染色观察结肠病变;并对小鼠粪便进行16S rDNA高通量基因测序法分析,以探究CAC小鼠肠道菌群的变化。结果 单次和加强AOM注射联合DSS均能诱导CAC小鼠模型。但与A模型组相比,B模型组小鼠结肠内增生物较大,排列紧密且形态大小较一致,成瘤率达到100%。与正常组相比,B模型组IL-6显著升高($P < 0.05$),TNF- α 含量升高($P > 0.05$);肿瘤标志物除CA724外,CA199和CEA含量均明显升高($P < 0.05$);HE病理结肠内炎性细胞的浸润,并伴有管腔表面显示出高级别上皮内肿瘤样改变。菌群结果显示,与正常组相比,CAC小鼠肠道菌群物种多样性及丰度降低,疣微菌门和放线菌门增多($P < 0.05$),拟杆菌门和弯曲菌门减少($P < 0.05$)。阿克曼菌、普雷沃菌、瘤胃球菌、双歧杆菌等显著增多($P < 0.05$);罗氏菌属、*Muribaculaceae*、理研菌属、厌氧原体属等显著减少($P < 0.05$)。结论 AOM 2次注射联合自由饮用1.5%(1.5 g/100 mL)DSS诱导的CAC模型小鼠结肠成瘤率高、肿瘤形态大小均一、死亡率低,可作为药效学实验评价的优选造模方案。多种肠道菌群紊乱或功能失调,造成的通透性增高,肠黏膜屏障功能破坏,进而诱发肠源性内毒素释放,导致持续的炎症反应或是诱发CAC发病的间接或直接原因。

【关键词】 结直肠癌;动物模型;肠黏膜屏障;炎症;肠道菌群

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2024)02-0151-10

Optimization of the azomethane oxide and dextran sodium sulfate model of colitis-associated colon cancer and changes in the intestinal microbiota

WANG Dunfang¹, ZHU Lin^{1,2}, FENG Xue¹, ZHANG Caijuan¹, LIU Haifan¹, LIU Yaqing¹,
LIU Bin^{1,2}, LIU Li¹, YANG Weipeng^{1*}

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 2. Heilongjiang University of Chinese Medicine, Haerbin 150040, China)

Corresponding author: YANG Weipeng. E-mail: wpyang@icmm.ac.cn

【基金项目】 国家自然科学基金(82074328, 81473592), 中国中医科学院科技创新工程项目(CI2021A04604), 中国中医科学院中药研究所自选课题-人才引进项目(ZXKT20033)。

Funded by the National Natural Science Foundation of China (82074328, 81473592), Science and Technology Innovation Project of China Academy of Chinese Medical Sciences (CI2021A04604), the Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Selected a Project-Talent Introduction Project (ZXKT20033).

【作者简介】 王敦方,男,博士,研究方向:中药药理学研究。Email: wdf122644@126.com

【通信作者】 杨伟鹏,男,研究员,博士,研究方向:中药药理学研究。Email: wpyang@icmm.ac.cn

[Abstract] Objective To optimize the method of combining azomethane oxide (AOM) and dextran sodium sulfate (DSS) to create a colitis-associated colon cancer (CAC) model, and to explore the pathogenesis of the intestinal flora in CAC. **Methods** Model groups A and B were established by one and two injections of AOM, respectively, combined with free drinking of DSS, and a normal control group was injected intraperitoneally with normal saline combined with purified water ($n = 10$ mice per group). The better modeling scheme was selected by comprehensive evaluation of the disease activity index score, colon length, tumor rate, and mortality. Serum levels of interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α), and tumor markers CA199, CEA, and CA724 were detected by enzyme-linked immunosorbent assay. Colon lesions were evaluated by hematoxylin and eosin (HE) staining. Changes in the intestinal microbiota in CAC mice were detected by 16S rDNA high-throughput gene sequencing analysis of mouse feces. **Results** Both single and enhanced AOM injections combined with DSS induced CAC mice; however, colon growths were larger, more closely arranged, and their morphological size was more consistent in group B compared with group A, with a tumor-formation rate of 100%. IL-6 levels were increased in the model group compared with the normal group ($P < 0.05$). TNF- α levels were increased in the model group compared with the normal group ($P > 0.05$). The CA199 and CEA levels were also significantly increased ($P < 0.05$), but CA724 levels were not. Infiltration of inflammatory cells in the colon detected by HE pathology was accompanied by high-grade intraepithelial tumor-like changes on the surface of the lumen. The diversity and abundance of intestinal bacteria were decreased in CAC mice compared with normal mice; *phyla Verrucomicrobiota* and *Actinobacteriota* were significantly increased ($P < 0.05$), *Bacteroidota* and *Campilobacterota* were significantly decreased ($P < 0.05$). *Akkermansia*, *Prevotellaceae*, *Ruminococcus*, and *Bifidobacterium* were significantly increased ($P < 0.05$), and *Roseburia*, *Rikenellaceae_RC9_gut_group*, *Anaeroplasmata*, and *Muribaculaceae* were significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusions** Two injections of AOM combined with 1.5% (1.5 g/100 mL) DSS induced CAC model mice with a high colon-tumorigenesis rate, uniform tumor morphology, and low mortality, and may thus be the preferred modeling scheme for pharmacodynamic experiments. Disorders or dysfunction of the intestinal flora may lead to increased permeability, loss of intestinal mucosal barrier function, and the release of enterogenic endotoxins, Resulting in a sustained inflammatory response, as an indirect or direct cause of CAC pathogenesis.

[Keywords] colorectal cancer; animal model; intestinal mucosal barrier; inflammation; intestinal flora

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

结直肠癌 (colorectal cancer, CRC) 是常见的恶性肿瘤, 据统计, 我国 2022 年 CRC 新发病例, 在全球占新发癌症病例数的第三位。CRC 发病率及病死率均居于全球恶性肿瘤前三位^[1-2]。炎症性肠病 (inflammatory bowel disease, IBD) 是诱发结直肠癌的重要危险因素, 与健康人群相比, 克罗恩病 (Crohn's disease, CD) 和溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 等炎症性肠病患者患结直肠癌的风险更高^[3]。现阶段 IBD-CRC 动态演进过程的有关机制是科学研究的聚焦点。结肠炎相关性结直肠癌 (colitis-associated colorectal cancer, CAC) 的发病中, 肿瘤微环境的存在是诱发肿瘤细胞增殖的关键, 而要模拟肿瘤微环境的发生, 开展体内动物模型的研究很有必要^[4]。CAC 的发病涉及多个阶段, 呈现“炎症-不典型增生-癌变”的发展规律^[5]。AOM/DSS 诱导的小鼠模型是 CAC 的常见实验肿瘤模型, 可以在正常上皮-腺瘤-癌进展方面模拟 CAC 的非遗传特征^[6-7], 是研究结直肠癌发生和发展潜在机制的重要工具。但 AOM/DSS 小鼠模型构建易受到小

鼠品系、造模浓度的影响, 死亡率和成瘤率并不稳定^[8-9]。因此有必要在相关指南的基础上对 AOM/DSS 模型构建方法进一步优化。

研究证明, 肠道菌群改变可增加肠黏膜通透性, 使肠黏膜免疫功能受损, 加剧炎症反应, 进而创造利于肿瘤发生的免疫微环境^[10-11]。此外, 肠道菌群的改变也可通过促进结肠细胞的过度增殖来驱动癌变。肠道细菌在定植和繁殖过程中产生一系列代谢物, 这些代谢物对宿主的代谢和免疫反应有直接或间接的影响。肠道微生物群的扰动能促进有害细菌致癌产物的产生。因此, 肠道菌群失衡可以作为结直肠癌的一个直接病因^[12]。故建立适当的结肠炎癌转化模型, 明确肠道微生物在 CAC 中的作用, 对 CAC 的预防和临床治疗均具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

本研究选用 30 只 5 ~ 6 周龄 SPF 级雄性

C57BL/6J 小鼠, 体重 20 ~ 21 g, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供【SCXK(京)2021-0006】。所有小鼠均在中国中医科学院中药研究所动物实验室饲养【SYXK(京)2019-0003】, 各组小鼠饲喂普通维持饲料由科澳协力(天津)饲料有限公司提供。饲养环境: 温度 23.0 ± 1.5 °C, 相对湿度 $45\% \pm 15\%$, 符合标准的日夜交替养殖环境。动物实验通过中国中医科学院中药研究所伦理委员会批准(2022B117)。

1.1.2 主要试剂与仪器

AOM(麦克林, C14453858, 纯度 95%); 葡聚糖硫酸钠(DSS, 分子量 36 000 ~ 50000, S7708, 美国 MP 公司); 4% 组织细胞固定液(20221220)和 PBS(20220726)购自北京索莱宝科技有限公司; 肿瘤标志物检测试剂盒 CA724 (Sep2022)、CA199 (Oct2022)和 CEA(ml063107)均购自上海酶联生物科技有限公司; IL-6 (P334473)和 TNF- α 试剂盒(P342290)购自美国 RD 公司。

SpectraMax Paradigm[®] Plus 384 酶标仪(Molecular Devices 公司, 美国); -80 °C 超低温冰箱(Thermo Fisher Scientific 公司, 美国); J-301 Beckman 型高效冷冻离心机(Beckman 公司, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 分组及模型构建

经过 1 周适应性饲养后, 按体重随机分为 3 组: 正常组、A 模型组(注射 1 次 AOM)及 B 模型组(注射 2 次 AOM), 每组 10 只。A 模型组给予单次 1 mg/mL AOM 溶液(10 mg/kg)腹腔注射; B 模型组在 1 周内分别于第 1、5 天进行 1 mg/mL AOM 溶液(10 mg/kg)腹腔注射。A 模型组和 B 模型组小鼠均在首次 AOM 注射 7 d 后给予 1.5% (1.5 g/100 mL) DSS 溶液 1 周, 之后将 DSS 替换为纯净水饮用 2 周, 此为 1 个循环, 如此共重复 3 个循环。正常组小鼠同体积 AOM 腹腔注射生理盐水, 自由饮水。

1.2.2 炎症因子和肿瘤标志物的测定

3 个循环结束后, 采集正常组和 B 模型组小鼠血液, 3000 r/min, 4 °C 离心 15 min, 取上清, ELISA 法检测小鼠血清中的炎症因子 IL-6、TNF- α 以及肿瘤标志物 CA199、CEA、CA724 的表达。

1.2.3 结肠组织病理学检验

3 个循环结束后, 处死所有小鼠, 切除包括肛门在内的结肠组织, 进行结直肠部位肿瘤计数。并将正常组和 B 模型组小鼠结肠浸泡于 4% 多聚甲醛中

固定, 按规定步骤进行包埋切片, 切片厚度为 4 μ m, 其后进行 HE 染色, 在 400 倍高倍镜下进行观察。依据溃疡区域、炎症浸透情况、整体完整程度、组织病变等指标对结肠组织的病变程度进行评价。

1.2.4 粪便样品采集

完成 3 个循环后, 小鼠处死前收集正常组和 B 模型组小鼠的新鲜粪便, 取 3 ~ 5 粒, 立即放入已灭菌的离心管中, 并在超低温下保存, 以便进行肠道菌群分析。

1.2.5 高通量测序检测肠道菌群组成结构与丰度差异

对于每个组别, 提取粪便 DNA 并进行 PCR 扩增。扩增的目标区域为 16S rDNA 的 V3 ~ V4 可变区, 反应体系为 20 μ L。PCR 扩增的条件为: 95 °C 解链 3 min, 95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 45 s, 25 个循环, 72 °C 延伸 10 min。引物序列 338F: 5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3', 806R: 5'-GGACTAC HVGGGTWTCTAAT-3'。扩增过程重复 3 次。使用 Illumina MiSeq 测序平台进行双末端测序, 并使用 UPARSE7.1 软件聚类生成操作分类单元(OUT), 相似度为 97%。本实验使用了 Silva(SSU11516S)核糖体 RNA 数据库进行分类学比对, 采用的算法是 RDP Classifier, 置信阈值设置为 70%。

1.3 统计学分析

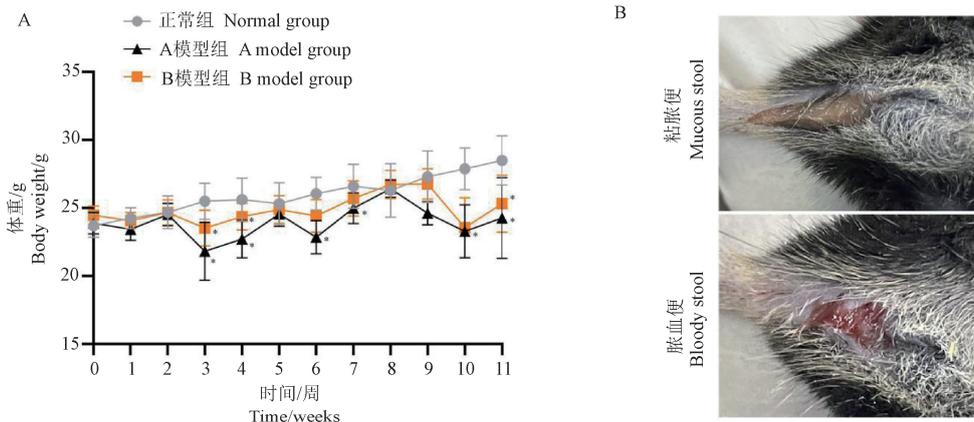
本实验使用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析。如果数据符合正态分布且方差齐, 则采用单因素方差分析进行统计检验; 如果数据不符合正态分布或方差不齐, 则采用秩和检验进行统计检验。P < 0.05 为具有统计学意义。

2 结果

2.1 生存情况分析

2.1.1 造模情况与疾病活动指数评估

A 模型组和 B 模型组首次注射 AOM 后, 体重 3 d 内均明显下降, 而后呈现上升趋势, 说明 AOM 注射对小鼠体重有一定影响。A 模型组和 B 模型组在第一循环自由饮用 1.5% DSS 后, 先后出现肉眼可见黏脓血便, 部分伴有毛发色泽灰暗、精神萎靡、懒动状况。A 模型组在服用了第 1 个周期 DSS 后, 体重有所降低, 多数呈稀软便, 仅有极少数呈脓血之便; B 模型组体重较 A 组下降明显(图 1A), 大部分小鼠出现脓血便, 严重者伴随脱肛症状, 与临床发病情况符合度较高(图 1B)。



注:与正常组相比, * P < 0.05。(下图/表同)

图 1 CAC 小鼠体重变化及大便情况

Note. Compared with normal group, * P < 0.05. (The same in the following figures and tables)

Figure 1 Changes of body weight and stool in CAC mice

2.1.2 CAC 模型小鼠成瘤率及死亡情况

A 模型组和 B 模型组小鼠在给予 DSS 自由饮用的初期均表现出结肠炎的症状,包括腹泻、嗜睡、食欲不振、体重减轻等,后期逐渐出现黏液便和血便;给予第二循环 DSS 后,小鼠开始出现一定的 DSS 耐受,症状表现较第一循环轻微;第三循环时,随着 DSS 在体内蓄积量的增加,小鼠便血状况加重。至造模结束,A 模型组和 B 模型组小鼠均无死亡。解剖小鼠并取出同位置肠段进行对比后发现,正常组小鼠结肠弹性良好,肠壁光滑无增生,肠内容粪便性状正常;A 模型组和 B 模型组小鼠结肠弹性丧失,肠壁变薄皱缩,且长度均短于正常组;A 模型组和 B 模型组两组小鼠之间结肠长度无明显变化,且偶见明显血丝,肠壁有大块成形的“菜花状”增生物,肠内容粪便质地黏稀伴血。A 模型组小鼠结肠内增生物少,成瘤大小不一致,成瘤率 70%;B 模型组小鼠结肠内增生物较大,多数形态大小较一致,且排列较密,成瘤率达到了 100%(见表 1,图 2)。与 A 模型组相比,B 模型组小鼠成瘤率更高,且较

一致的肿瘤形态更有利于药效实验的评价。因此,本实验优选 B 模型组小鼠开展 CAC 相关发病机制研究及指标测定。

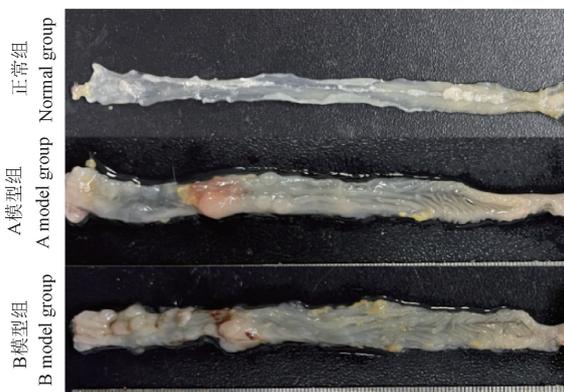


图 2 AOM/DSS 小鼠造模变化

Figure 2 AOM/DSS mouse modeling changes

2.2 CAC 小鼠模型结肠组织的病理学

小鼠结肠进行 HE 染色并镜下观察,发现正常组小鼠结肠组织内腺体排列规律整齐并呈长管状,空泡杯状细胞及隐窝结构正常(见图 3A);B 模型组

表 1 CAC 小鼠成瘤率及死亡率

Table 1 Tumorigenesis and mortality in CAC mice

分组 Groups	AOM ip 次数 AOM ip times	DSS	结肠长度 Colon length	成瘤数目 Number of tumors	成瘤率/% Tumorigenesis rate/%	死亡率/% Mortality/%
正常组 Normal group	-	-	9.28 ± 0.62	0.00 ± 0.00	0.0	0.0
A 模型组 A model group	1	1.5%	6.96 ± 0.96*	3.78 ± 3.42	70.0	0.0
B 模型组 B model group	2	1.5%	6.89 ± 0.65*	6.89 ± 1.83	100.0	0.0

小鼠大多数显示深达肌层的溃疡,结肠隐窝结构的紊乱,失去了原有的管状结构且部分腺体萎缩坏死,异质细胞和深核染色出现,且管腔表面显示出高级别上皮内肿瘤样改变;组织内炎性细胞浸润明显,主要表现为基底浆细胞增多,大量淋巴细胞和中性粒细胞数量也明显增加(见图 3B)。

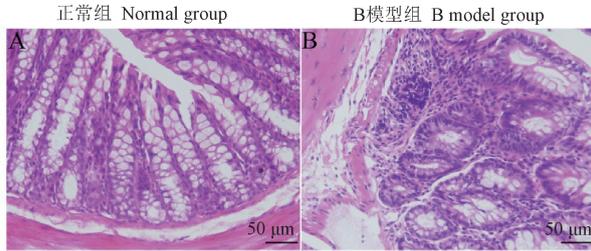


图 3 小鼠结肠组织病理

Figure 3 Mouse colon histopathology

2.3 CAC 小鼠血清中肿瘤标志物和炎症因子的表达

肿瘤标志物可以反映肿瘤存在和生长,是肿瘤诊断和治疗的重要指标之一。结直肠癌的早期诊断和判断预后常用 CA199、CEA 和 CA724 等标志物。这些标志物在结直肠癌患者的血液和尿液中存在,并随着疾病的进展而升高,因此可以用于监测疾病的进展和预后。与正常组相比,B 模型组小鼠中肿瘤标志物除 CA724 外,CA199 和 CEA 含量

均明显升高($P < 0.05$)(图 4A),这提示 CAC 小鼠体内肿瘤的发生与形成。炎症因子测定发现,B 模型组小鼠血清中 IL-6 含量显著高于正常组($P < 0.05$);TNF- α 含量高于正常组,但无统计学意义($P > 0.05$)(图 4B)。结合结肠病理组织中观察到的大量炎性细胞浸润及血清中升高的炎症因子,说明 CAC 小鼠肿瘤的形成伴有炎性发生的特征,这也从某种程度上体现了炎-癌的转变进程。

2.4 CAC 小鼠菌群分析

2.4.1 菌群的多样性分析

通过 alpha 和 beta 多样性分析,对正常组和 B 模型组小鼠菌群进行全面的表征和评估。香农指数(Shannon index)是评估样品中微生物多样性的指标,其数值越大,表示群落多样性越高^[13]。与正常组相比,B 模型组的群落多样性明显降低。Chao 和 Ace 指数是对细菌种群数量的评价,结果显示,B 模型组的种群数量低于正常组(见表 2,图 5A)。PCoA 主坐标分析的结果表明,两组菌群结构存在显著性差异(图 5B)。基于 β 多样性距离的非度量多维尺度分析(NMDS),通过点与点间的距离体现对不同样本间的差异程度,正常组和 B 模型组间样本未重叠(图 5C),表明组间肠道菌群构成有明显差异^[14]。

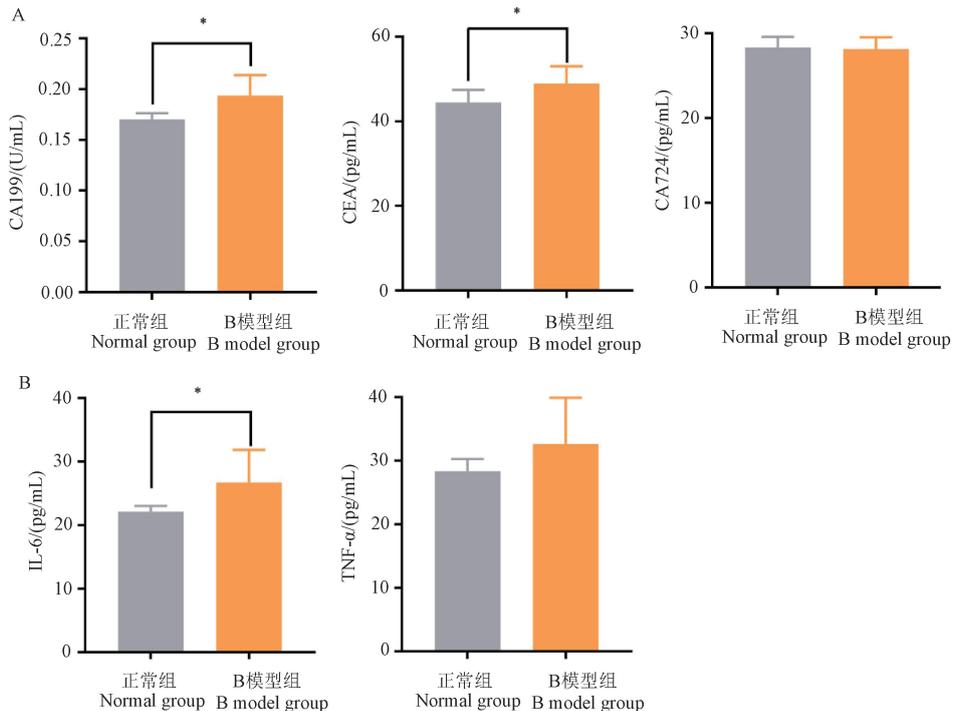


图 4 CAC 小鼠肿瘤标志物和炎症因子的表达

Figure 4 Expression of tumor markers and inflammatory factors in CAC mice

表 2 菌群多样性指数分析

Table 2 Analysis of microbiota diversity index

组别 Groups	Ace 指数 Ace index
正常组 Normal group	375.40 ± 37.91
B 模型组 B model group	346.41 ± 51.76

2.4.2 肠道菌群物种组成分析

如图 6 所示,在门水平上,正常组和 B 模型组优势菌门为厚壁菌门 (*Firmicutes*) 和拟杆菌门 (*Bacteroidota*),共占 90% 以上。其次为疣微菌门 (*Verrucomicrobiota*)、放线菌门 (*Actinobacteriota*)、弯曲菌门 (*Campilobacterota*) 和其他菌门(图 6A)。属水平上,*Muribaculaceae*、乳杆菌属 (*Lactobacillus*)、梭菌属 (*Clostridia*)、拟杆菌属 (*Bacteroides*)、普雷沃氏菌属 (*Prevotellaceae*) 和阿克曼菌属 (*Akkermansia*) 为主要优势菌属(图 6B)。

模型组中在所有样本中均检测出 *norank_f__Muribaculaceae*、螺杆菌属 (*Helicobacter*)、普雷沃菌属 (*Prevotellaceae*)、阿克曼菌属 (*Akkermansia*)、瘤胃球菌 (*Ruminococcus*)、双歧杆菌属 (*Bifidobacterium*),这 6 种菌属丰度之和在每个样本中均超过 20%,但无论是组内还是组间均存在明显的差异。这也说明了微生物群落的构成存在着较大的个体差异。

2.4.3 肠道菌群差异物种检验

如图 7 所示,在门水平上,与正常组相比,B 模型组疣微菌门 (*Verrucomicrobiota*)、放线菌门 (*Actinobacteriota*) 增多 ($P < 0.05$),拟杆菌门 (*Bacteroidota*)、弯曲菌门 (*Campilobacterota*) 门减少 ($P < 0.05$)(图 7A)。属水平上,B 模型组的阿克曼菌属 (*Akkermansia*)、普雷沃菌属 (*Prevotellaceae_NK3B31_group*)、*Prevotellaceae_UCG-001*、瘤胃球菌属 (*Ruminococcus*)、双歧杆菌属 (*Bifidobacterium*)、RF39、肠杆菌属 (*Enterorhabdus*)、*Gastranaerophilales*、

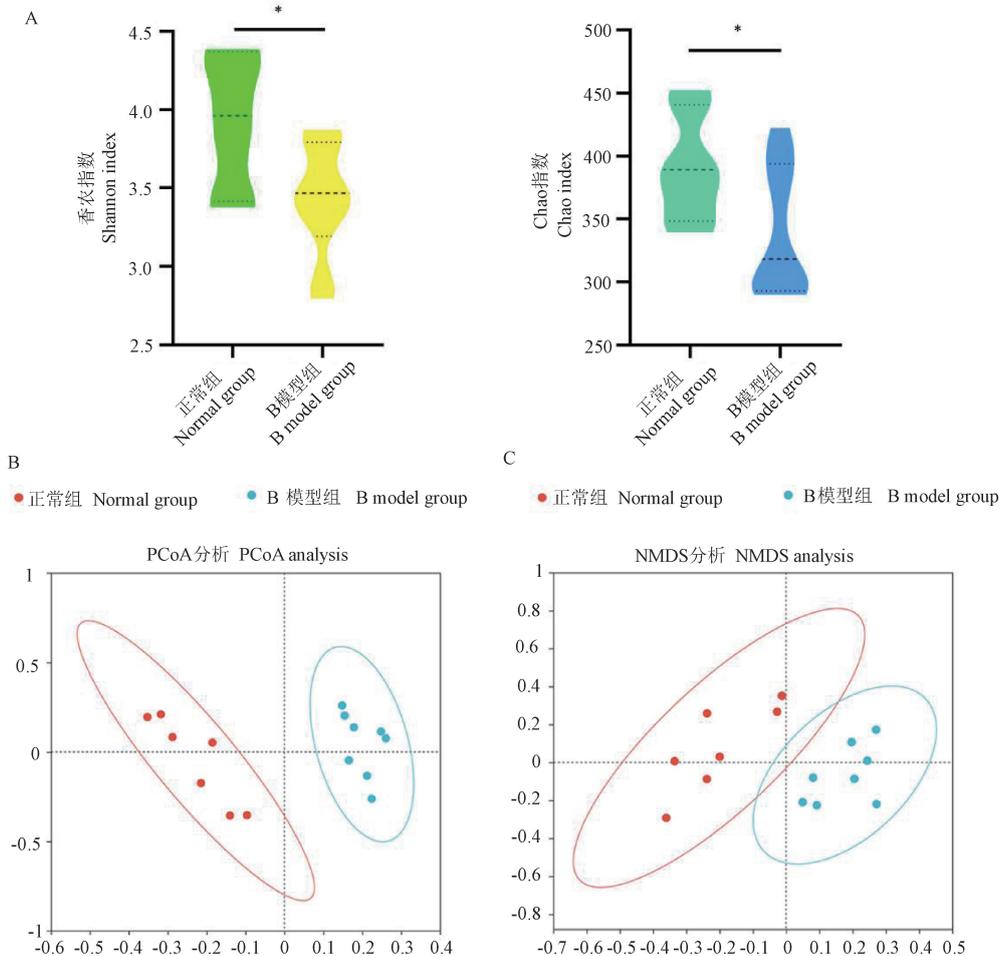


图 5 香农指数、Chao 指数分析及 PCoA 分析和 NMDS 分析

Figure 5 Shannon index and Chao index, PCoA analysis and NMDS analysis

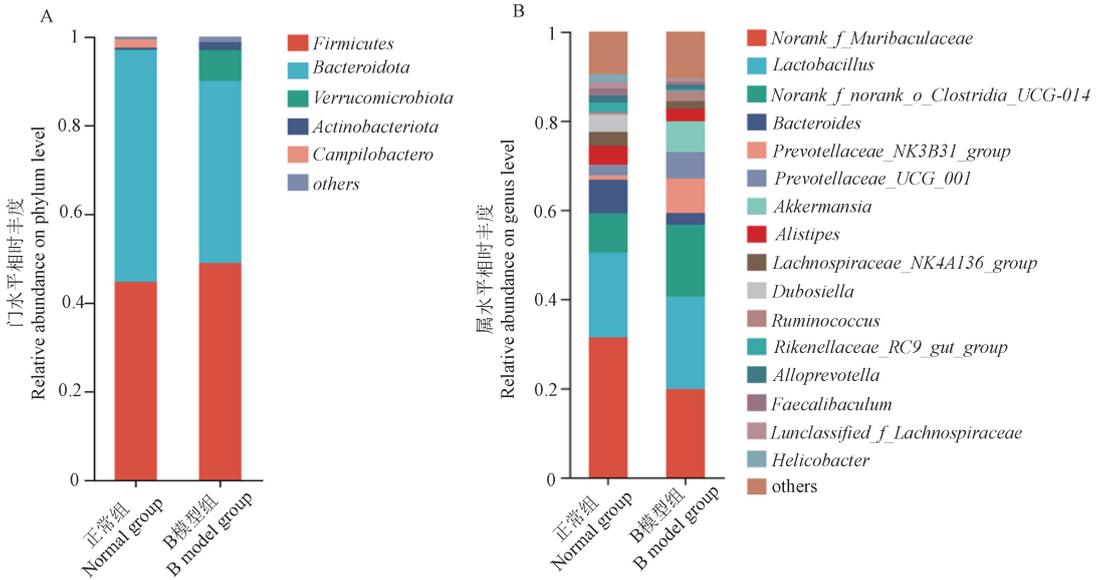


图 6 门和属水平的群落结构柱形图

Figure 6 Histogram of community structure at phylum level and genus level

Adlercreutz 显著增多 ($P < 0.05$); *Muribaculaceae*、理研菌属 (*Rikenellaceae_RC9_gut_group*)、螺杆菌属 (*Helicobacter*)、*Odoribacter*、厌氧原体属

(*Anaeroplasma*)、罗氏菌属 (*Roseburia*) 等显著减少 ($P < 0.05$) (图 7B)。这些结果说明, AOM/DSS 联合造模形成的 CAC 小鼠模型肠道菌群发生紊乱。

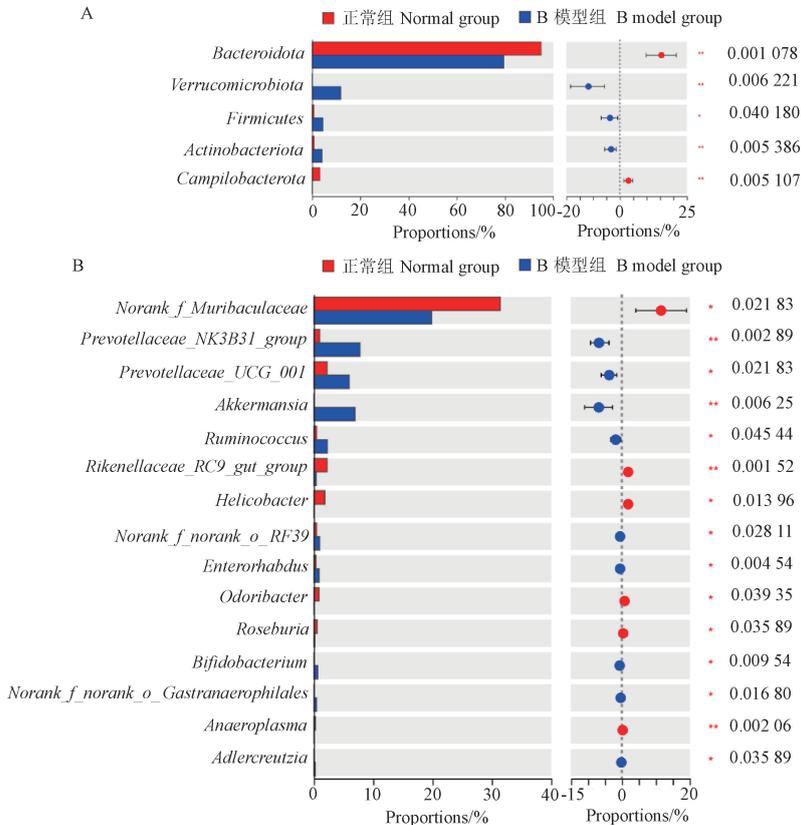


图 7 物种差异分析图

Figure 7 Analysis of species differences

LEfSe(LDA effect size)是一种差异分析方法,可以对所有微生物分类水平同时进行差异分析,并强调寻找组间稳健的差异物种,即生物标志物。这种方法可以更好地理解肠道微生物群落中的差异性,并发现潜在的生物标志物,从而为肠道微生物群落的研究提供新的思路和方法。如图 8,对 LDA 值前 15 的 LEfSe 分析进行展示,定义 LDA 值 > 4 为正常组和模型组两组间具有显著差异生物标志物,在属水平上检测出可以作为生物标志物主要是阿克曼菌属(*Akkermansia*)、普雷沃菌属(*Prevotellaceae* _ *NK3B31* _ *group*)、*Prevotellaceae* _ *UCG-001* 及 *Muribaculaceae*。

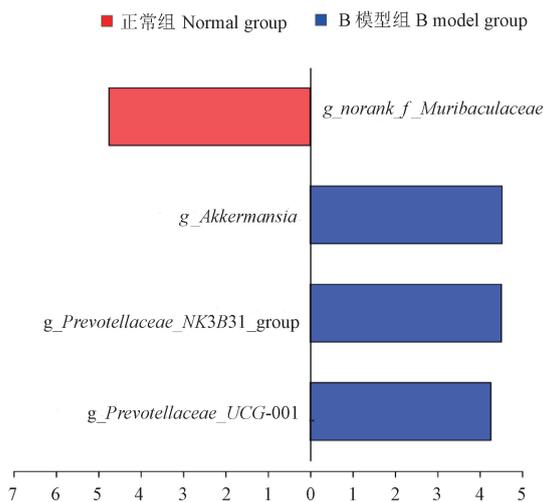


图 8 LDA 值分布柱状图

Figure 8 Histogram of LDA value distribution

3 讨论

AOM 联合 DSS 共同构建的小鼠结肠炎癌转化模型是研究 CAC 的有效工具。不同品系的小鼠对 AOM/DSS 耐受性、敏感性存在差异^[8]。C57BL/6 小鼠对 DSS 的耐受力低,诱发的炎症易持续,且迁延难愈,最终转变为慢性结肠炎^[15]。此外,C57BL/6 具有高度稳定的遗传背景,保证了实验数据的一致性^[16],为此,采用 C57BL/6 小鼠构建 CAC 研究模型。前期预实验发现,2%(2 g/100 mL)及以上 DSS 浓度给药,小鼠第三循环自由饮用时会出现不同程度的死亡,为此设置 1.5% DSS 给药浓度。检索文献发现^[17-18],不同的 AOM 注射次数会影响小鼠成瘤情况。为此本实验通过不同 AOM 注射次数对 CAC 造模方法进行了优化,结果发现,同为 1.5% DSS 浓度自由饮用的条件下,单次注射 AOM

注射小鼠成瘤率为 70%,而 AOM 加强注射 1 次后,实现了 100%成瘤率,且没有小鼠死亡。同时 HE 染色显示,B 模型组小鼠结肠内管腔表面出现高级别上皮内肿瘤样改变;血清中肿瘤标志物 CA199、CEA 显著性升高,验证 AOM/DSS 联合成功构建了 CAC 小鼠模型。为此,两次 AOM 腹腔注射(10 mg/kg)联合 1.5% DSS 自由饮用的给药方式可作为 CAC 造模的优选方案。

结直肠是人体中微生物大量聚集的部位,代谢尤为活跃。动物实验证实,无菌动物体内植入失调的肠道菌群,则罹患结肠炎和结肠癌的风险明显增加^[19]。本实验旨在研究 CAC 小鼠肠道微生物群落的变化,通过对 CAC 小鼠粪便进行肠道菌群分析,发现模型组与正常组之间存在显著性差异。结果显示,在模型组中,厚壁菌门和拟杆菌门是相对于正常组更为丰富的优势菌门,占比超过 90%,其次是疣微菌门、放线菌门和弯曲菌门,这与其他研究基本一致^[20-21]。CAC 模型小鼠肠道菌群的丰度和多样性降低,尤其拟杆菌门降低明显,作为肠道的优势菌群,拟杆菌门能够预防肠道炎症,维持肠道稳态等^[22],这提示 CAC 模型小鼠体内维持机体健康的菌群紊乱。

结肠微生物中,阿克曼菌属是疣微菌门唯一的菌属。作专性黏蛋白降解菌,小鼠肠道内增多的阿克曼菌消耗黏蛋白 MUC1,导致黏液层变薄,使得黏膜屏障通透性增加,病原体进一步入侵^[23-24]。推测 CAC 患者腹痛腹泻,黏液脓血便临床症状的发生与阿克曼菌丰度升高密切相关。普雷沃菌丰度和一系列的黏膜炎症因子如 IL-6、IL-23 等呈正相关^[25],并且是催化 IL-1 β 成熟的关键^[26]。此外,普雷沃菌增加还与黏蛋白 MUC 的降解呈现一定的正相关^[27]。为此,CAC 或许是肠道通透性增加和/或低度黏膜炎症的结果。瘤胃球菌能够作用于肠道屏障,激发肠道免疫细胞释放大量促炎细胞因子,具有很强的促炎作用^[28-29]。本研究发现 CAC 模型结肠组织内以淋巴细胞和中性粒细胞增多为特征的炎性细胞浸润,同时,CAC 模型小鼠血清中炎性因子 IL-6 和 TNF- α 升高。作为强促炎细胞因子,过度表达的 IL-6 使得肠道内环境失衡,刺激肠上皮通透性升高,进而募集大量中性粒细胞到肠道炎症部位^[30]。在炎症环境下 IL-6 能够抑制细胞凋亡,促进肠上皮细胞增生及肿瘤细胞增殖^[31-32]。临床研究证实,IL-6 在结肠癌患者血清和肿瘤组织中高表

达^[33]。由此可见,普雷沃菌/瘤胃球菌参与 CAC 的发病作用机制可能与其诱导的肠粘膜通透性增高,导致肠黏膜屏障功能受损,进而引发持续的炎症反应密切相关。

研究证实,主要由罗氏菌属及毛螺菌科 (*Lachnospiraceae*) 产生的短链脂肪酸具有一定的抗肿瘤特性,如抑制肿瘤细胞的增殖、介导其凋亡、维持 T 细胞稳态等功能^[34]。丁酸盐是短链脂肪酸的一种,有研究发现,人肠道内罗氏菌属参与丁酸盐生成,从而推断罗氏菌属数量的减少可能间接促进了结直肠癌的发展^[35]。*Muribaculaceae* 同样被认为是一种与短链脂肪酸产生相关的菌群,其丰度降低会诱导肠癌的发生^[36]。此外,炎症可以使 *Muribaculaceae* 耗竭^[37]。值得研究的是,通常被认为在 CAC 中起作用的其他益生菌,如双歧杆菌,在肿瘤组中并没有显示出丰度降低,这表明炎症诱导的结直肠癌发生过程中,肠道微生物组成的变化可能与传统 CRC 发生的变化不同。这些“异常”肠道菌群变化在 AOM/DSS 诱导的炎症 CAC 模型的背景下需进一步研究和讨论。

肠道的微生物群变化可能影响疾病的发生或发展,肠道菌群失调以及这种表型背后的机制需要阐明,在动物模型和人体中的诱发肿瘤作用尚需进一步证实。本研究进一步优化了 AOM/DSS 小鼠模型,研究了结肠直肠癌的肠道微生态,展示了肠道中不同丰度的微生物群,并确定与 CAC 之间的潜在关键关系。这些发现为阐明炎症介导的结直肠癌的发病机制提供指导。

参 考 文 献 (References)

- [1] 李清平. 中性鞘磷脂酶 2 经外泌体调控细胞间神经酰胺转移在再生肝组织抑制结直肠癌肝转移的作用及机制研究 [D]. 广州: 南方医科大学; 2023.
LI Q P. Investigation on the role and mechanism of neutral sphingomyelinase 2 inhibits colorectal cancer liver metastasis by exosomal regulation of intercellular ceramide transfer in regenerative liver tissues [D]. Guangzhou: Southern Medical University; 2023.
- [2] 邢艳丽, 尹星, 付民, 等. 结直肠癌组织和细胞中人整合素 $\alpha 6$ 的表达及作用分析 [J]. 中国实验诊断学, 2023, 27(3): 336-340.
XING Y L, YIN X, FU M, et al. Expression of human integrin $\alpha 6$ in colorectal cancer tissues and cells and function analysis [J]. Chin J Lab Diagn, 2023, 27(3): 336-340.
- [3] HUSSAIN S P, HARRIS C C. Inflammation and cancer: an ancient link with novel potentials [J]. Int J Cancer, 2007, 121(11): 2373-2380.
- [4] 褚志杰, 张敬涛, 马艳, 等. AOM/DSS 诱导小鼠结直肠癌炎症癌转化模型的研究进展 [J]. 山东医药, 2019, 59(17): 87-90.
CHU Z J, ZHANG J T, MA Y, et al. Research progress of AOM/DSS-induced colorectal cancer transformation model in mice [J]. Shandong Med J, 2019, 59(17): 87-90.
- [5] ANGELOU A, ANDREATOS N, ANTONIOU E, et al. A novel modification of the AOM/DSS model for inducing intestinal adenomas in mice [J]. Anticancer Res, 2018, 38(6): 3467-3470.
- [6] NEUFERT C, BECKER C, NEURATH M F. 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.
- [7] DEKKER E, TANIS P J, VLEUGELS J L A, et al. Colorectal cancer [J]. Lancet, 2019, 394(10207): 1467-1480.
- [8] PERŠE M, CERAR A. Dextran sodium sulphate colitis mouse model: traps and tricks [J]. J Biomed Biotechnol, 2012, 2012: 718617.
- [9] SUZUKI R, KOHNO H, SUGIE S, et al. Dose-dependent promoting effect of dextran sodium sulfate on mouse colon carcinogenesis initiated with azoxymethane [J]. Histol Histopathol, 2005, 20(2): 483-492.
- [10] KEKU T O, DULAL S, DEVEAUX A, et al. The gastrointestinal microbiota and colorectal cancer [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2015, 308(5): G351-G363.
- [11] BRENCHELEY J M, DOUEK D C. Microbial translocation across the GI tract [J]. Annu Rev Immunol, 2012, 30: 149-173.
- [12] 赖雪莹, 刘乐, 陈焯. 肠道菌群与结直肠癌的发生发展 [J]. 中国实用内科杂志, 2018, 38(9): 865-869.
LAI X Y, LIU L, CHEN Y. Current research progress on the gut microbiome and colorectal cancer [J]. Chin J Pract Intern Med, 2018, 38(9): 865-869.
- [13] 吴昊, 于小红, 王焕君, 等. 雷公藤对右旋葡聚糖硫酸钠诱导的溃疡性结肠炎小鼠肠道菌群的影响 [J]. 中草药, 2020, 51(2): 387-396.
WU H, YU X H, WANG H J, et al. Effect of *Tripterygium wilfordii* on intestinal flora in mice with ulcerative colitis induced by dextran sodium sulfate [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2020, 51(2): 387-396.
- [14] 徐航宇, 王彦礼, 王敦方, 等. 高通量测序技术研究黄芩汤对溃疡性结肠炎大鼠肠道菌群的影响 [J]. 药理学学报, 2017, 52(11): 1673-1682.
XU H Y, WANG Y L, WANG D F, et al. Effect of Huangqin Tang on the gut microbiota in rats with ulcerative colitis model determined by high-throughput sequencing [J]. Acta Pharm Sin, 2017, 52(11): 1673-1682.
- [15] MELGAR S, KARLSSON A, MICHAËLSSON E. Acute colitis induced by dextran sulfate sodium progresses to chronicity in C57BL/6 but not in BALB/c mice: correlation between symptoms and inflammation [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2005, 288(6): G1328-G1338.

- [16] JACKSTADT R, SANSOM O J. Mouse models of intestinal cancer [J]. *J Pathol*, 2016, 238(2): 141–151.
- [17] PAPANIKOLAOU A, WANG Q S, PAPANIKOLAOU D, et al. Sequential and morphological analyses of aberrant crypt foci formation in mice of differing susceptibility to azoxymethane-induced colon carcinogenesis [J]. *Carcinogenesis*, 2000, 21(8): 1567–1572.
- [18] NEUFERT C, BECKER C, NEURATH M F. 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.
- [19] ICAZA-CHÁVEZ M E. Gut microbiota in health and disease [J]. *Rev Gastroenterol Mex*, 2013, 78(4): 240–248.
- [20] MAHOWALD M A, REY F E, SEEDORF H, et al. Characterizing a model human gut microbiota composed of members of its two dominant bacterial phyla [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(14): 5859–5864.
- [21] MILLAN B, PARK H, HOTTE N, et al. Fecal microbial transplants reduce antibiotic-resistant genes in patients with recurrent *Clostridium difficile* infection [J]. *Clin Infect Dis*, 2016, 62(12): 1479–1486.
- [22] BROWN E M, KE X, HITCHCOCK D, et al. *Bacteroides*-derived sphingolipids are critical for maintaining intestinal homeostasis and symbiosis [J]. *Cell Host Microbe*, 2019, 25(5): 668–680. e7.
- [23] 韦忠红. Senoside A 影响肠道微生物的组成平衡损伤结肠黏膜屏障促进结肠癌发展 [D]. 南京: 南京中医药大学; 2019.
- WEI Z H. Senoside A upsets the balance of intestinal microbial composition and damages colonic mucosal barrier [D]. Nanjing: Nanjing University of Chinese Medicine; 2019.
- [24] SHIMBORI C, DE PALMA G, BAERG L, et al. Gut bacteria interact directly with colonic mast cells in a humanized mouse model of IBS [J]. *Gut Microbes*, 2022, 14(1): 2105095.
- [25] DILLON S M, LEE E J, KOTTER C V, et al. Gut dendritic cell activation links an altered colonic microbiome to mucosal and systemic T-cell activation in untreated HIV-1 infection [J]. *Mucosal Immunol*, 2016, 9(1): 24–37.
- [26] LUKENS J R, GURUNG P, VOGEL P, et al. Dietary modulation of the microbiome affects autoinflammatory disease [J]. *Nature*, 2014, 516(7530): 246–249.
- [27] QUEIPO-ORTUÑO M I, SEOANE L M, MURRI M, et al. Gut microbiota composition in male rat models under different nutritional status and physical activity and its association with serum leptin and ghrelin levels [J]. *PLoS One*, 2013, 8(5): e65465.
- [28] PAL D, NASKAR M, BERA A, et al. Chemical synthesis of the pentasaccharide repeating unit of the O-specific polysaccharide from *Ruminococcus gnavus* [J]. *Carbohydr Res*, 2021, 507: 108384.
- [29] SUN Y, CHEN Q, LIN P, et al. Characteristics of gut microbiota in patients with rheumatoid arthritis in Shanghai, China [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2019, 9: 369.
- [30] UNVER N, MCALLISTER F. IL-6 family cytokines: key inflammatory mediators as biomarkers and potential therapeutic targets [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2018, 41: 10–17.
- [31] HODGE D R, HURT E M, FARRAR W L. The role of IL-6 and STAT3 in inflammation and cancer [J]. *Eur J Cancer*, 2005, 41(16): 2502–2512.
- [32] GRIVENNIKOV S, KARIN E, TERZIC J, et al. IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer [J]. *Cancer Cell*, 2009, 15(2): 103–113.
- [33] GALIZIA G, ORDITURA M, ROMANO C, et al. Prognostic significance of circulating IL-10 and IL-6 serum levels in colon cancer patients undergoing surgery [J]. *Clin Immunol*, 2002, 102(2): 169–178.
- [34] YOSHIMOTO S, LOO T M, ATARASHI K, et al. Obesity-induced gut microbial metabolite promotes liver cancer through senescence secretome [J]. *Nature*, 2013, 499(7456): 97–101.
- [35] HUYCKE M M, ABRAMS V, MOORE D R. *Enterococcus faecalis* produces extracellular superoxide and hydrogen peroxide that damages colonic epithelial cell DNA [J]. *Carcinogenesis*, 2002, 23(3): 529–536.
- [36] ZHANG Z, CAO H, SONG N, et al. Long-term hexavalent chromium exposure facilitates colorectal cancer in mice associated with changes in gut microbiota composition [J]. *Food Chem Toxicol*, 2020, 138: 111237.
- [37] LANG M, BAUMGARTNER M, ROŽALSKA A, et al. Crypt residing bacteria and proximal colonic carcinogenesis in a mouse model of Lynch syndrome [J]. *Int J Cancer*, 2020, 147(8): 2316–2326.

[收稿日期] 2023-09-11