

本文引文格式:刘程宇,李跃峰,仝瑞兵,等.结直肠癌患者病变组织和正常组织的菌群和代谢产物的差异研究[J].右江民族医学院学报,2025,47(3):438-442.

【论著与临床报道】

## 结直肠癌患者病变组织和正常组织的菌群和代谢产物的差异研究

刘程宇<sup>1</sup>,李跃峰<sup>2</sup>,仝瑞兵<sup>2</sup>,刘岩<sup>1</sup>,李荣双<sup>1</sup>,李广<sup>1</sup>,王行宏<sup>2</sup>

- (1. 内蒙古科技大学包头医学院,内蒙古 包头 014000;  
2. 内蒙古科技大学包头医学院第一附属医院,内蒙古 包头 014000)

**摘要:**目的 对比结直肠肿瘤患者癌变组织和正常组织中菌群变化及代谢产物的变化。方法 菌群采用微生物多样性分析,代谢产物采用非靶向代谢组学技术分析,比较 30 例结直肠肿瘤患者病变肠道组织和健康肠道组织菌群和代谢产物的变化。结果 ①病变组对比正常组之间肠道微生物的丰度有差异( $P < 0.05$ )。②通过检测,发现病变组织代谢产物发生了显著变化,鉴定了 20 种代谢物作为生物标志,揭示了这些代谢产物在结直肠肿瘤患者中的潜在诊断价值。结论 结直肠肿瘤患者病变组织相较于正常组织代谢产物及一些菌群种类会发生变化,且有显著差异,继续深入研究有助于了解和发现菌群与结直肠肿瘤发生、发展及机制的关系,并且还可以发现结直肠肿瘤筛查和治疗的新方向。

**关键词:**结直肠肿瘤;肠道微生物;代谢组学;微生物多样性

中图分类号:R735.34 文献标识码:A 文章编号:1001-5817(2025)03-0438-05

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2025.03.011

### Differential study on intestinal microbiota and metabolites between lesional and normal tissues in colorectal cancer patients

LIU Chengyu<sup>1</sup>, LI Yuefeng<sup>2</sup>, TONG Ruibing<sup>2</sup>, LIU Yan<sup>1</sup>,  
LI Rongshuang<sup>1</sup>, LI Guang<sup>1</sup>, WANG Xinghong<sup>2</sup>

- (1. Baotou Medical College, Inner Mongolia University of Science & Technology, Baotou 014000, Inner Mongolia, China; 2. The First Affiliated Hospital of Baotou Medical College, Inner Mongolia University of Science & Technology, Baotou 014000, Inner Mongolia, China)

**Abstract:** **Objective** To compare the changes in intestinal microbiota and metabolites between lesional and normal tissues in patients with colorectal cancer. **Methods** Microbiota was analyzed using microbial diversity analysis, and metabolites were analyzed using non-targeted metabolomics technology. Changes in microbiota and metabolites were compared between lesional and healthy intestinal tissues from 30 colorectal cancer patients. **Results** ① There were differences in the abundance of intestinal microbiota between the lesional group and the normal group ( $P < 0.05$ ). ② Through detection, significant changes in metabolites were observed in lesional tissues. Twenty metabolites were identified as biomarkers, revealing their potential diagnostic value in colorectal cancer patients. **Conclusion** Compared with normal tissues, lesional tissues of colorectal cancer patients exhibit significant changes in metabolites and certain microbiota species. Further research may help clarify the relationship between intestinal microbiota and the occurrence, development, and mechanism of colorectal cancer, and identify new directions for colorectal cancer screening and treatment.

**Key words:** colorectal cancer; intestinal microbiota; metabolomics; microbial diversity

基金项目:内蒙古自治区科技创新引导项目(CXYD2021BT03)

第一作者:刘程宇,在读硕士研究生,研究方向:胃肠道肿瘤,E-mail:1079009528@qq.com

通讯作者:王行宏,博士,副主任医师,硕士研究生导师,研究方向:胃肠道肿瘤,E-mail:2283861205@qq.com

结直肠癌是一种源自结直肠上皮细胞的恶性肿瘤,已成为全球第三大常见恶性肿瘤<sup>[1]</sup>。依据《2020 年中国癌症统计数据》的报告显示,结直肠癌的发病率在中国位居第二,并呈现出逐年递增的趋势<sup>[2]</sup>。在特定条件下,肠道微生物群落与内稳态的紊乱被认为能够促进结直肠癌发生以及肿瘤的进展。人体肠道内环境的正常运行,仅在肠道微生物群落的种类多样性、数量密度以及组成比例处于动态平衡状态时才能得以确保<sup>[3]</sup>。所以肠道微生态的紊乱成为了结直肠肿瘤发生发展的主要环境因素。本研究采用肠道微生物非靶向代谢组学技术和微生物多样性检测比较结直肠癌患者病变组织和正常组织代谢产物和菌群的变化,进而了解肠道微生态失衡在结直肠癌发病过程中的作用原理,为今后从调控肠道菌群的新角度,探索结直肠癌的预防策略、早期发现方法以及治疗手段提供了创新思路。

## 1 资料与方法

1.1 研究对象 30 例结直肠肿瘤患者均来自 2023 年 1 月至 2024 年 5 月间内蒙古科技大学包头医学院第一附属医院胃肠外科住院患者。样本的纳入标准为:选取 30 例符合 2023 年中国临床肿瘤学会指南的左半结肠肿瘤患者,患者肿瘤的浸润深度、病理类型等特征尽量相似,且均衡(30 例患者 TNM 分期均为 T2-T3 且都是中低分化腺癌);年龄为 40~85 岁(含 40 岁和 85 岁),性别不限。要求在过去 3 个月内未腹泻或便秘。排除标准为:先前已接受放疗或化疗的肿瘤患者;近 1 个月内曾使用抗生素或益生菌类药物;同时伴有炎症性肠病,如:溃疡性结肠炎或克罗恩病;有糖尿病病史<sup>[4]</sup>;患者有酗酒史。在参与研究之前,每位参与者均事先获得了充分的知情同意,并理解了其权利与义务。此项研究经内蒙古科技大学包头医学院第一附属医院医学伦理委员会的正式许可,伦理审批号:2024 伦理审查第(K022-01)号。

1.2 标本采集 入院后要求患者清淡饮食和禁烟、酒,手术前均已完善肠道准备,标本均为手术中离体后 30 min 内采集,收集样本时,用无菌组织剪从标本病变中央剪取 0.5~1 cm 的肿瘤组织放入无菌标本袋,−80 °C 冷冻(后续简称为病变组)。然后取距离病变组织 5 cm 以内的正常组织 0.5~1 cm,放入无菌标本袋,−80 °C 冷冻(后续简称为正常组)。

1.3 组织菌群分析 病变组和正常组的组织样本由上海美吉生物医药科技有限公司进行分析,根据 Fast-Pure Stool DNA Isolation Kit (MJYH, Shanghai, China)说明书中微生物群落总基因组 DNA 提取流程,采用 1% 琼脂糖凝胶电泳评估 DNA 完整性,使用 NanoDrop 2000 测定 DNA 浓度和纯度<sup>[5]</sup>。以上提

取的 DNA 为模版,采取带有标识序列的 5' 端引物,针对 16S rRNA 基因的 V3-V4 变异区段执行 PCR 扩增操作。整个流程最终步骤是在 4 °C 低温环境下对设备进行妥善保存(PCR 仪器型号:Applied Biosystems GeneAmp<sup>®</sup> 9700)。4.0 Thermo Fisher Scientific (美国)进行了针对回收产物的精确检测与量化分析。

1.4 组织代谢物分析 组织代谢产物由上海美吉生物医药科技有限公司进行分析,将 100 mg 固体样本置于 2 mL 的离心管内,并投入一颗直径为 6 mm 的磨砂珠。随后,加入 400  $\mu$ L 按照 4:1 比例(体积比)混合的提取液(甲醇与水的混合物),其中含有浓度为 0.02 mg/mL 的内标物质(L-2-氯苯丙氨酸),以提取代谢产物。接着,把样本溶液放置在冷冻组织研磨器中,于−10 °C、50 Hz 下研磨 6 min。研磨完成后,将样本在 5 °C 的温度下,以 40 千赫兹的频率进行低温超声波提取,持续时间为 30 min。将样本放置于−20 °C 的环境中静置 30 min,随后在 4 °C 条件下以 13 000 g 的力度离心 15 min,之后取出上层的液体并转移到设有进样管的专用小瓶里,准备进行仪器分析。之后取上述制备的样本 2  $\mu$ L 通过 HSST3 色谱柱进行分离处理,随后导入质谱进行分析,样本在分析过程中,采用正负离子模式全面扫描采集质谱数据。

1.5 数据处理及分析 组织菌群数据分析:菌群数据分析工作均在上海美吉生物医药科技有限公司云平台(<https://cloud.majorbio.com>)上进行,具体如下:采用 mothur 软件<sup>[6]</sup>计算 Alpha 多样性指数等,通过实施 Wilcoxon 秩和检验法来剖析 Alpha 多样性的组别间差异;借助 bray-curtis 距离算法的主坐标分析(PCoA)来探究样本间微生物群落的相似度,同时运用 PERMANOVA 非参数检验法评估样本组别间微生物群落结构的显著性差异。用 LEfSe 分析(Linear discriminant analysis Effect Size)<sup>[7]</sup>( $LDA > 2, P < 0.05$ )识别并确定在门到属水平上,不同群体之间细菌丰度表现出显著差异的菌群类别。基于 Spearman 相关性 $|r| > 0.6, P < 0.05$  挑选物种进行相关性网络图分析<sup>[8]</sup>。组织代谢物分析:上机完成之后,将 LC-MS 原始数据导入代谢组学处理软件 Progenesis Q1 (Waters Corporation, Milford, USA)然后通过 HMDB(<http://www.hmdb.ca/>)和 Metlin(<https://metlin.scripps.edu/>)以及上海美吉生物医药科技有限公司自建库进行匹配,得到代谢物信息。搜库完成后的数据上传到上海美吉生物医药科技有限公司云平台上(<https://cloud.majorbio.com>)进行数据分析。之后在上海美吉生物医药科技有限公司云平台上进行差异代谢物的鉴定之后,通过整合利用 KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)数据库进行深入的

代谢通路注释,以此揭示这些代谢物在生物体内所参与的具体代谢途径及其功能作用。采用 R 软件 stats 包进行通路富集分析<sup>[8]</sup>,通过应用 Fisher 精确检验方法,旨在识别与特定实验干预措施最为显著相关的生物学途径<sup>[9]</sup>。

## 2 结果

2.1 组织菌群检测结果 将 30 份肠道组织样本进行菌群高通量测序总共得到了 1 884 538 条 reads。病变组和正常组在门水平上共检测到 16 个门,其中:厚壁菌门、变形菌门、拟杆菌门、梭杆菌门、放线菌门为优势菌,见图 1。样本的组织菌群构成不同的个体间有明显差异,两组样本的菌群门水平上相对丰度相似。检

测的所有样本的优势菌门全部都为厚壁菌门、变形菌门、拟杆菌门、梭杆菌门、放线菌门,在病变组和正常组中丰度比较:厚壁菌门(35%比 41%,  $P > 0.05$ )、变形菌门(28%比 31%,  $P > 0.05$ )、拟杆菌门(15%比 14%,  $P > 0.05$ )、梭杆菌门(17%比 4%,  $P < 0.05$ )、放线菌门(2%比 5%,  $P > 0.05$ )。在菌种/属水平,病变组样本和正常组样本菌群有 5 种细菌出现显著差异。在结直肠癌患者病变组织中梭杆菌属(*Fusobacterium*)、鱼腥菌属(*Branchiibius*)、类诺卡氏菌属(*Nocardioides*)菌群的比例显著提升,而吞菌弧菌属(*Peredibacter*)、细杆菌属(*Microbacterium*)丰度显著降低,但差异无统计学意义( $P < 0.05$ ),见表 1。

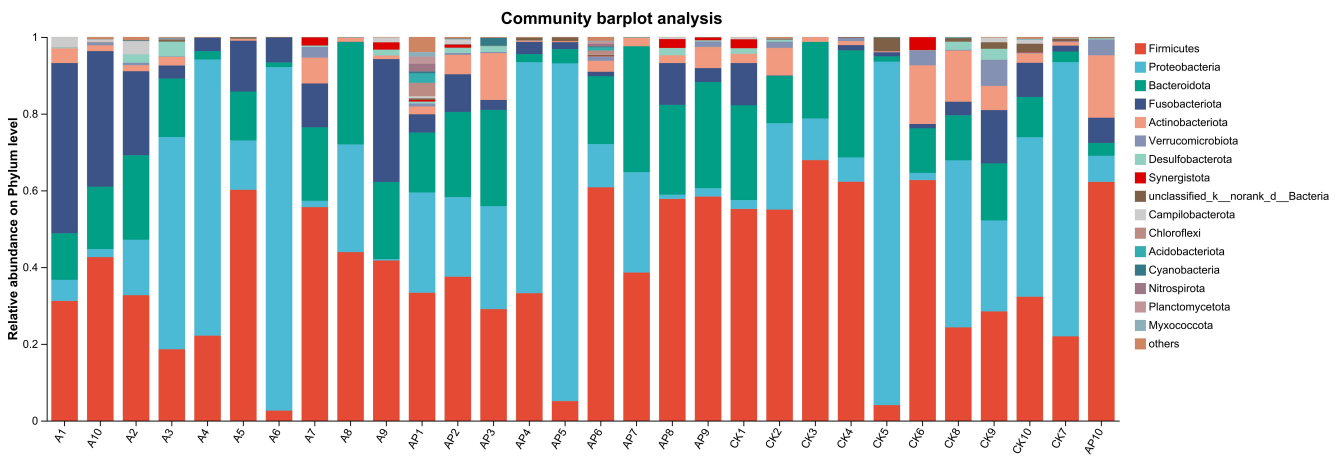
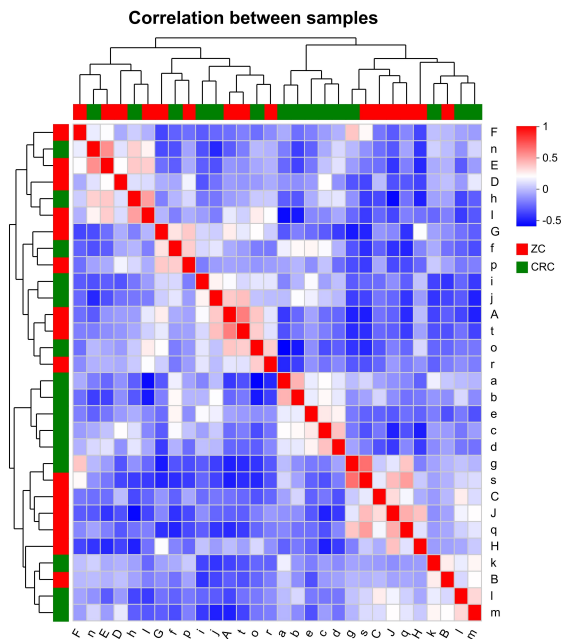


图 1 结直肠癌患者病变组织和正常组织菌群结构图

表 1 病变组与正常组组织菌群丰度比较表

菌种/属	病变组丰度均值/%	正常组丰度均值/%	P
梭杆菌属	15.21	2.91	0.021
鱼腥菌属	3.73	0.27	0.041
吞菌弧菌属	0.32	1.37	0.021
类诺卡氏菌属	1.10	0.03	0.035
细杆菌属	0.88	4.30	0.035

2.2 组织样本代谢组学 组织代谢产物的样本检测结果显示,病变组与正常组之间的代谢产物相关性低,见图 2。病变组 S-半胱氨酸琥珀酸、腐胺、谷氨酸、苯丙氨酸、牛磺酸、花生四烯酰肉碱、腺苷、棕榈酰肉碱、缬氨酸和胆碱显著高于正常组,甲噻嘧啶、芥酸酰胺、乙酰乙酰胺替苯胺、谷氨酰胺、脯氨酸、亮氨酸、佛手柑内酯、胸苷、麦角硫因和聚核糖磷酸酯 10 种产物明显降低( $P$  均 $< 0.05$ ),见表 2。



注:图中的右侧和下侧为样本名(大写字母为正常组织,小写字母为同一患者所对应的病变组织),图中每个格子表示两个样本之间的相关性,不同颜色代表样本间相关系数的相对大小,聚类树枝的长度表示样本间相对距离的远近,同一枝上的样本中比较相似。

图 2 病变组与正常组代谢产物相关性热图

表 2 病变组与正常组组织代谢物比较

代谢产物	病变组升高倍数	P	代谢产物	病变组降低倍数	P
S-一半胱氨酸琥珀酸	1.17	<0.05	甲噻嘧啶	0.91	<0.05
腐胺	1.64	<0.05	芥酸酰胺	0.97	<0.05
谷氨酸	1.73	<0.05	乙酰乙酰替苯胺	0.72	<0.05
苯丙氨酸	1.18	<0.05	谷氨酰胺	0.84	<0.05
牛磺酸	1.08	<0.05	脯氨酸	0.84	<0.05
花生四烯酰肉碱	1.12	<0.05	亮氨酸	0.84	<0.05
腺苷	1.10	<0.05	佛手柑内酯	0.95	<0.05
棕榈酰肉碱	1.05	<0.05	胸苷	0.84	<0.05
缬氨酸	1.10	<0.05	麦角硫因	0.82	<0.05
胆碱	1.04	<0.05	聚核糖磷酸酯	0.93	<0.05

### 3 讨论

该项研究指出,在宏观层面,结直肠癌患者病变部位与正常组织中的微生物丰富度基本一致。然而,在微观分类上,病变组织与正常组织间微生物构成差异显著,众多微生物的种类和数量出现了显著变化,例如本次试验结果中,梭杆菌属在病变组中明显富集,而吞菌弧菌属丰度明显低于正常组,这些菌群的变化表明肠道微生态发生紊乱,而肠道微生态却与结直肠肿瘤的发生发展有着密切联系。肠道微生态的紊乱可能与外伤、感染、饮食等多方面的因素有关,这些外界环境的刺激会使肠道黏膜屏障破坏,但在大部分情况下肠道屏障会及时的修复,但结直肠肿瘤患者就是在修复过程中因为外界环境的持续刺激使屏障无法修复,进而导致微生态的持续紊乱,促进了肿瘤的生成。目前已知的普雷沃菌能分解膳食纤维,其在病变组织中的含量降低,可能与患者膳食纤维摄入量不足存在联系。本研究发现,黏蛋白降解细菌 *Akkermansia muciniphila* 在结直肠肿瘤患者癌变组织中富集等。黏蛋白降解细菌是结直肠微生物中一种常见的共生菌,起初的研究指出,在肠易激综合症及克罗恩病患者体内, *Akkermansia muciniphila* 的数量有所下降。然而,最新的研究发现,这种菌类在溃疡性结肠炎患者的隐窝炎中却呈现出上升趋势,这似乎暗示着它与炎症性肠病引发的结直肠癌之间可能存在一定的关联。柠檬酸盐作为唯一碳源被 *Citrobacter farmeri* 这一细菌所利用,且在病态样本中其含量有所上升。此类细菌涵盖了若干致病性菌株,例如沙门氏菌和志贺氏菌等,它们能够激活芳基胺 N-乙酰转移酶,进而推动结直肠癌的进程<sup>[10]</sup>。

液相色谱-质谱联用技术是代谢组学研究的重要手段,本研究通过此技术有效鉴别出结直肠癌患者与正常人群组织代谢物之间的差异,对于深入探索结直肠癌的机制、早期筛查及发掘新型代谢异常途径或靶标具有显著的应用价值。目前,肠道微生物群失衡在

结直肠癌发病机制中的作用尚不明确,然而,微生物群的失衡无疑会导致患者体液、排泄物或组织内特定终末代谢产物的改变。本研究发现病变组织中的氨基酸代谢产物与正常组织存在显著差异,通过对比分析,病变组织相较于正常组织在代谢产物中呈现出 5 种氨基酸含量的上升,而导致组织氨基酸浓度上升的因素复杂多样:①炎症作用使得营养素摄取降低;②癌细胞自体吞噬过程促使肿瘤细胞内自由氨基酸的聚集;③在结直肠癌患者的肠道末端,特定菌群对膳食蛋白进行分解,进而导致病变区域某些氨基酸代谢物的生成,如胺、氨、甲酚和苯酚等;④肿瘤细胞可以表现出导致谷氨酰胺转化为谷氨酸的谷氨酰胺酶活性增强,结直肠癌患者谷氨酸增多<sup>[11-12]</sup>。

关于肠道菌群及代谢产物与结直肠肿瘤关系的研究取得了一定的进展,但仍存在许多不足之处。在研究方法上,虽然微生物检测、代谢组学以及宏基因组学等技术为人们深入了解肠道菌群提供了有力的工具,但这些技术也存在一定的局限性。测序深度和准确性可能影响对肠道菌群组成和功能分析,不同的测序平台和分析方法可能导致结果的差异。对肠道菌群代谢产物的检测方法也有待进一步完善,目前的检测技术可能无法全面准确地分析肠道内复杂的代谢产物谱。在研究内容上,虽然已经发现了一些与结直肠肿瘤相关的肠道菌群和代谢产物,但对于它们之间的具体作用机制仍不完全清楚。所以说,进一步探索结直肠肿瘤患者肠道微生物群落的结构变异,有望为结直肠癌的诊断方法、潜在生物标记物的识别以及个性化治疗策略的制定,提供前所未有的科学依据与创新见解。梭状杆菌与结直肠肿瘤之间的关联揭示了肠道微生物组作为结直肠癌及癌前病变早期诊断的潜在生物标记物的独特价值,其可能助力于识别高风险个体。借助微生物学和代谢组学的综合分析方法,不仅能够预见结直肠癌及其癌前病变的发生,而且为这一领域提供了创新性的预防与治疗策略的方向。此研究进一

步强调了肠道微生物组在结直肠癌疾病预防、诊断与治疗中的重要性,标志着该领域多学科整合研究的新开端。鉴于肠道菌群数量繁多且受多种复杂因素的影响<sup>[13]</sup>,这无疑为菌群研究带来了巨大的挑战。然而,伴随着宏基因组学以及第二代测序技术的持续发展,对于结直肠肿瘤与肠道微生物群之间的相互作用的认知有望得到深化,这可能会为结直肠癌的预防和治疗带来全新的理论基础。在后续研究中,拟通过宏基因组学技术深入分析结直肠肿瘤患者的肠道微生物群落,并特别注重增加样本量与细化分层变量,旨在追求更为精准且具有临床指导意义的发现<sup>[15]</sup>。

#### 4 结论

①结直肠肿瘤患者的肠道菌群失调,多样性下降;②结直肠肿瘤患者的菌群代谢产物丰度发生变化;③结直肠肿瘤患者所特有的差异代谢产物作为生物标志物,在结直肠肿瘤的早期筛查与诊断中具有巨大的应用潜力,有助于实现对 CRC 的早发现、早诊断,从而改善患者预后。

#### 参考文献:

- [1] 郑莹,王泽洲. 全球结直肠癌流行数据解读[J]. 中华流行病学杂志,2021,42(1):149-152.
- [2] 国家卫生健康委员会医政司,中华医学会肿瘤学分会. 中国结直肠癌诊疗规范(2023 版)[J]. 消化肿瘤杂志(电子版),2023,15(3):177-206.
- [3] 张威,姜可伟. 肠道菌群在结直肠癌发生发展及治疗中的作用[J]. 中华胃肠外科杂志,2020,23(5):516-520.
- [4] 孟静. 健康人、结直肠癌未转移患者及结直肠癌肝转移患者肠道细菌多样性对比分析[D]. 昆明:昆明医科大学,2020.
- [5] LIU C S,ZHAO D F,MA W J,et al. Denitrifying sulfide removal process on high-salinity wastewaters in the presence of *Halomonas* sp[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2016,100(3):1421-1426.

- [6] SCHLOSS P D,WESTCOTT S L,RYABIN T,et al. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities[J]. Appl Environ Microbiol, 2009,75(23):7537-7541.
- [7] SEGATA N,IZARD J,WALDRON L,et al. Metagenomic biomarker discovery and explanation[J]. Genome Biol, 2011,12(6):R60.
- [8] 郭文秀. 基于肠道菌群和代谢产物探讨大黄附子汤治疗高脂血症重症急性胰腺炎的机理[D]. 沈阳:辽宁中医药大学,2023.
- [9] BARBERÁN A,BATES S T,CASAMAYOR E O,et al. Using network analysis to explore co-occurrence patterns in soil microbial communities[J]. ISME J, 2012, 6(2): 343-351.
- [10] 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.
- [11] SHUMILOVA V N,GONCHAROV A E,LATARIYA E L,et al. The role of the gut microbiota in the development of colorectal cancer[J]. Fundamental'naâ I Kliničeskâ Medicina,2024,9(1):112-123.
- [12] 李洪,杨艺钒,伍勇. 肠道菌群与结直肠癌关系的研究进展[J]. 中华预防医学杂志,2022,56(6):864-870.
- [13] 章菲菲,毛凌燕,蔡娟,等. 结直肠癌患者的肠道菌群变化情况分析[J]. 中国社区医师,2022,38(9):90-92.
- [14] REN Y,YU G,SHI C P,et al. Majorbio Cloud: a one-stop, comprehensive bioinformatic platform for multiomics analyses[J]. Imeta,2022,1(2):e12.
- [15] TORSHIZI ESFAHANI A,ZAFARJAFARZADEH N,VAKILI F,et al. Gut microbiome in colorectal cancer: metagenomics from bench to bedside[J]. JNCI Cancer Spectr,2025,9(3):pkaf026.

收稿日期:2025-03-20;修回日期:2025-04-05

(本文编辑 覃洪含)