

结直肠癌患者维生素 D 受体对血浆促炎性细胞因子和肠道菌群的影响

于鑫¹, 张永镇^{2,3}, 于恩达², 王娜¹, 帅群², 闫飞虎², 蒋露芳¹, 王和兴¹, 刘健翔¹, 陈跃⁴, 李兆申², 蔡全才², 姜庆五¹

(1.复旦大学公共卫生学院/教育部公共卫生安全重点实验室, 上海 200032; 2.第二军医大学附属长海医院, 上海 200433; 3.中国人民解放军 92914 部队医院, 海南 临高 571833; 4.加拿大渥太华大学, 加拿大 渥太华 K1G 5Z3)

摘要: [目的] 研究结直肠癌患者维生素 D 受体(VDR)表达对血浆促炎性因子以及肠道菌群的影响情况。[方法] 纳入初次诊断为结直肠癌的患者 130 例和年龄、性别成组匹配的对照(无结直肠癌疾病的受检者)130 名, 采用免疫组化的方法测量结直肠癌患者癌组织中的 VDR 表达水平, 并将患者分为 VDR 高表达组以及 VDR 低表达组。检测研究对象血浆中促炎性细胞因子白介素-6(IL-6)、C 反应蛋白(CRP)和肿瘤坏死因子受体 2(sTNFR II)水平, 对研究对象粪便样本中细菌的 16S rDNA 进行测序得到肠道菌群构成与丰富度。[结果] VDR 低表达组患者血浆 sTNFR II 与 CRP 显著高于对照组($P<0.001$)。VDR 低表达组 sTNFR II 显著高于 VDR 高表达组 ($P=0.027$)。VDR 低表达组与高表达组分别与对照组相比得到的差异细菌不同, VDR 低表达患者体内 *Fusobacterium varium*, *Ruminococcus torques* 等 6 种细菌有显著升高。[结论] 结直肠癌患者体内 VDR 受体表达可能影响了血浆促炎性因子和肠道菌群变化。

关键词: 维生素 D; 维生素 D 受体; 促炎性细胞因子; 肠道菌群; 结直肠癌

中图分类号: R735.3 文献标识码: A 文章编号: 1004-0242(2018)05-0382-05

doi: 10.11735/j.issn.1004-0242.2018.05.A012

Effect of Vitamin D Receptor on Plasma Pro-inflammatory Cytokines Levels and Gut Microbiota in Patients with Colorectal Cancer

YU Xin¹, ZHANG Yong-zhen^{2,3}, YU En-da², et al.

(1.School of Public Health, Fudan University/Key Laboratory of Public Health Safety of Ministry of Education, Shanghai 200032, China; 2.Changhai Hospital of Second Military Medical University of Chinese PLA, Shanghai 200433, China; 3.The 92914th Military Hospital of PLA, Lingao 571833, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the effects of vitamin D receptor (VDR) on plasma pro-inflammatory cytokine levels and the gut microbiome in colorectal cancer (CRC) patients. [Methods] One hundred thirty CRC patients and 130 gender and age-matched healthy controls were included in the study. The expression of VDR protein in the tissue samples of 130 CRC patients was tested by immunohistochemical technique. The plasma levels of pro-inflammatory cytokines IL-6, C-reactive protein(CRP) and soluble tumor necrosis factor receptor II (sTNFR II) were examined. Composition and abundance of microbiota in stool were determined by 16S rDNA sequencing. [Results] Among 130 patients, there were 74 patients with low expression of VDR [VDR(-) group] and 56 patients with high expression of VDR [VDR(+) group]. The plasma sTNFR II and CRP levels were significantly increased in VDR(-) group compared with control group ($P<0.001$). The level of sTNFR II in VDR(-) group was significantly higher than that in VDR(+) group ($P=0.027$). The elevated abundance of *Fusobacterium varium*, *Ruminococcus torques*, and other four species was observed in VDR(-) group. [Conclusion] The expression of VDR in CRC patients may be associated with the changes in plasma pro-inflammatory cytokines and gut microbiota.

Key words: vitamin D; vitamin D receptor; pro-inflammatory cytokines; gut microbiota; colorectal cancer

结直肠癌是常见的消化道肿瘤之一, 每年新发

病例数约 34.8 万人, 死亡人数约 16.5 万人, 并呈现逐年上升的趋势^[1]。结直肠癌的发病可能与肠道菌群以及机体炎症反应有关^[2]。维生素 D 受体(vitamin D receptor, VDR)能够介导维生素 D 发挥对结直肠

收稿日期: 2018-01-01; 修回日期: 2018-02-14

基金项目: 国家自然科学基金项目(81473045, 81273154)

通讯作者: 蔡全才, E-mail: qccai@smmu.edu.cn;

姜庆五, E-mail: jiangqw@fudan.edu.cn

癌的抗癌作用。VDR 抗结直肠癌机制可能与肠道微生物以及炎症反应的相互作用有关^[3],但人群研究较缺乏。本文对结直肠癌患者 VDR 表达与血浆中促炎因子以及肠道菌群的关系进行研究。

1 资料与方法

1.1 研究对象

本研究纳入 2014~2015 年期间,初次在第二军医大学附属长海医院进行结直肠镜检查的研究对象 260 例,其中包括:130 例由结直肠镜检明确诊断为结直肠癌患者(病例组),130 名无结直肠疾病的受检者(对照组)。对照组在性别与年龄上与病例组成组匹配。本研究通过上海长海医院伦理委员会审核。

病例组研究对象纳入标准如下:①患者在长海医院初次被诊断为结直肠癌;②年龄 ≥ 40 周岁;③汉族;④无肠道相关手术史,无其他器官肿瘤病史;⑤过去 6 个月未使用过抗生素;⑥能同时获得治疗前粪便标本并填写调查问卷表;⑦同意参加本课题研究。对照组除被确认为无结直肠癌相关病变以外,与病例组在纳入标准上保持一致。

1.2 样本的收集与处理

所有研究对象均完成一份调查问卷,包括年龄、性别、生活习惯(包括吸烟、饮酒)、疾病既往史等。计算身体质量指数(body mass index,BMI),并根据 WHO 针对亚洲人的标准界定肥胖/超重情况。患者癌组织标本经由肠镜取得,由于伦理学原因,无法采集对照组标本。采用免疫组化结合人工判读的方法对结直肠癌患者标本的 VDR 表达情况进行检测,并由两位资深病理科工作人员完成结果判读,按照 VDR 核表达染色情况与占视野细胞阳性率,将淡黄色染色且阳性细胞占比 $\geq 75\%$ 、棕黄色与棕褐色染色 $\geq 25\%$ 划分为 VDR 高表达组,其他为 VDR 低表达组。

血浆 25-羟基维生素 D[25(OH)D]以及促炎性细胞因子,包括白介素 6(IL-6)、C 反应蛋白(CRP)和肿瘤坏死因子受体 2(sTNFR II)采用酶联免疫吸附法按照厂商提供的说明书标准方法进行检测(25-hydroxy Vitamin D ELISA 96T、Human CRP ELISA Kit 96T、Human IL-6 ELISA Kit 96T、Human sTNFR

II ELISA Kit 96T)。

研究对象的新鲜粪便样本($\geq 1\text{g}$)于结直肠镜检查肠道准备之前取得。粪便样本细菌的 DNA 使用 OMEGA-soil DNA kit (USA Omega Bio-Tek)试剂盒按照说明书进行提取。使用通用引物 338F 5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3'与 806R 5'-GGAC-TACHVGGGTWTCTAAT-3',经过 PCR 扩增之后,对细菌的 16S rDNA 的高可变区 V3~V4 片段进行测序。测序由上海美吉生物医药科技有限公司在 Illumina MiSeq 平台完成。

1.3 生物信息学分析与统计分析

以 97%相似度聚类得到操作分类单元(operational taxonomic units,OTU),挑选出每个 OTU 的代表序列并应用 SINTAX 算法^[4]比对 RDP training set v16 with species names 数据库,得到每个 OTU 的群落名称。对门、纲、目、科、属级别的置信阈值为 0.8,对种级别的置信阈值为 0.5。

α 多样性(ace、Shannon、Simpson)的计算在 QI-ME 平台完成^[5]。为比较结直肠癌患者 VDR 表达水平对肠道菌群的影响,在属与种两个分类级别先取非参数检验(White's non-parametric *t*-test,STAMP)按照调整后 $P<0.05$ 的标准挑选差异微生物,再运用随机森林变量筛选的策略^[6]进一步挑选。多组定量数据比较采用单因素方差分析以及 Tukey 事后检验,分类资料比较采取卡方检验或 Fisher 确切概率法。使用 R v3.3.2 进行统计分析,检验均为双侧检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 研究对象的基本情况与病理因素比较

VDR 高表达组、低表达组以及对照组的性别、年龄、BMI、TNM 分期和病变部位均无统计学差异,130 例患者中有 74 例是 VDR 低表达患者,56 例为 VDR 高表达患者。

2.2 血浆中促炎性细胞因子与 25(OH)D 含量比较

与对照组相比,VDR 低表达组患者血浆中 sTNFR II 与 CRP 显著升高($P<0.001$),VDR 高表达组 CRP 显著高于对照组($P<0.001$),VDR 低表达组 sTNFR II 显著高于 VDR 高表达组($P=0.027$)。各组 IL-6 和 25(OH)D 差异均无统计学意义($P>0.05$)(Figure 1)。

Table 1 Distribution of demographic and clinical factors among participants in the study (%)

		VDR(-) (N=74)	VDR(+) (N=56)	Controls (N=130)	P
Gender	Male	40(54.1)	25(44.6)	65(50.0)	0.57*
	Female	34(45.9)	31(55.5)	65(50.0)	
Age(years old)		61.5±10.3	59.3±9.1	58.6±8.9	0.11 [△]
BMI(kg/m ²)	<23.9	39(52.7)	30(53.6)	74(56.9)	0.63 [#]
	24~27.9	31(41.9)	20(35.7)	43(33.1)	
	>28	4(5.4)	6(10.7)	13(10.0)	
TNM stage	0	0(0)	1(1.8)	—	0.72 [#]
	1	17(23.0)	10(17.9)	—	
	2	31(41.9)	24(42.9)	—	
	3	26(35.1)	21(37.5)	—	
Lesion position	Proximal	27(36.5)	18(32.1)	—	0.61*
	Distal	47(63.5)	38(67.8)	—	

Note:*,P values were calculated by χ^2 test; [△]:P value was calculated by ANOVA; [#]:P values were calculated by Fisher's exact test. VDR(-):patients with low expression of VDR;VDR(+):patients with high expression of VDR.

2.3 粪便菌群一般描述

260 个样本中共得到 1736 个 OTU,根据物种分类可以分为 13 个门,23 个纲,34 个目,70 个科,147 个属,288 个种 (纳入条件: 相对丰富度>0.001%)。VDR 高表达组与低表达组患者相比, α 多样性无统计学差异 (ace: $P=0.506$;Shannon: $P=0.273$;Simpson: $P=0.418$)。

2.4 VDR 低表达组、VDR 高表达组与对照组肠道细菌的比较

与对照组相比,VDR 高表达组患者在卟啉单胞菌属(*Porphyromonas*)等 6 种菌属,以及中间普雷沃菌(*Prevotella intermedia*) 等 18 种菌种有显著性升

高,在挑剔真杆菌(*Eubacterium eligens*)、庞大真杆菌(*Eubacterium hadrum*)两种菌种有显著性下降 (Figure 2A,2B)。与对照组相比,VDR 低表达组患者在卟啉单胞菌属(*Porphyromonas*)等 9 种菌属,以及不解糖卟啉单胞菌(*Porphyromonas asaccharolytica*) 等 16 种菌种有显著性升高,在挑剔真杆菌(*Eubacterium eligens*)有显著性下降(Figure 2C,2D)。

3 讨论

本研究为基于医院资料为基础的病例对照研究设计,对首次诊断的结直肠癌患者 VDR 表达与血浆促炎性因子以及伴随的肠道菌群的变化进行分析。

VDR 是一种配体依赖的核转录因子,维生素 D 通过与 VDR 结合介导调节钙—磷代谢以及抑制细胞增殖、分化的作用^[3,7]。流行病学研究表明,维生素 D 缺乏与包括结直肠癌在内的多种癌症的死亡率与发生率有关^[8,9]。对动物模型研究发现,维生素 D 及其类似物通过抗增殖、促分化、促凋亡、抗血管生成以及免疫调节一系列机制发挥抗癌的作用^[10,11]。而高水平的血浆维生素 D 浓度被认为与结直肠癌更好的预后以及更低的死亡率有关^[12-14]。

炎症反应在结直肠癌的发生发展中扮演了重要的角色。有研究认为,通过与 VDR 结合,维生素 D 能影响信号通路的调控发挥抗炎作用从而产生抗肿

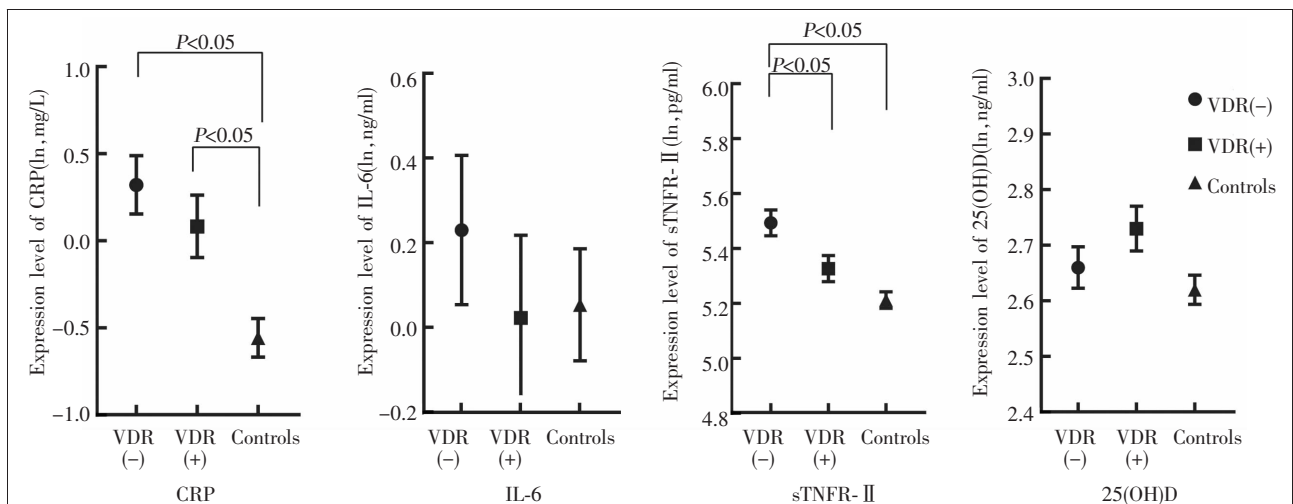
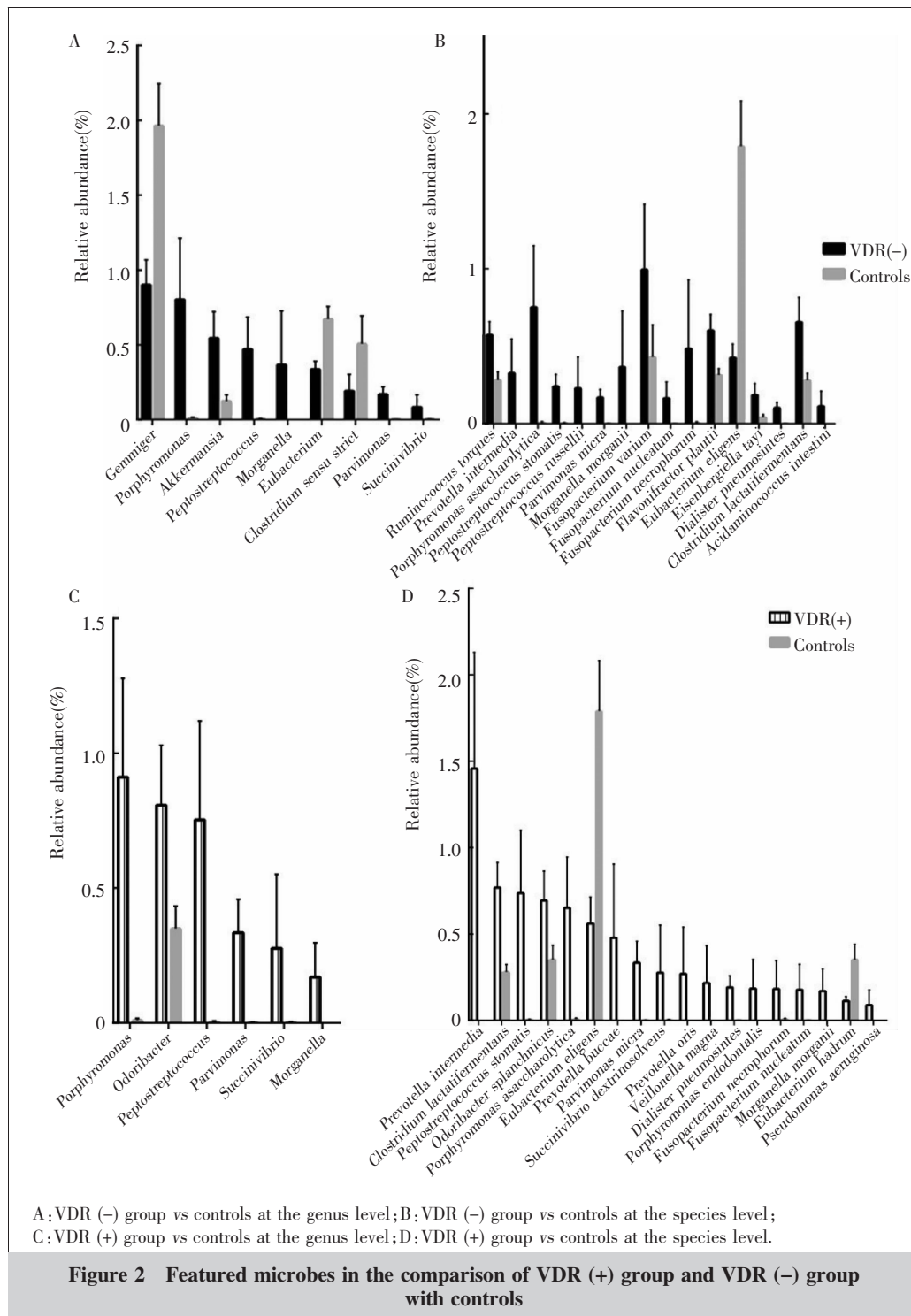


Figure 1 Comparison of plasma pro-inflammatory cytokines and 25(OH)D among VDR(+) group,VDR(-) group and controls



瘤的作用。维生素 D 与 VDR 结合能够诱导促分裂原活化蛋白激酶磷酸酶 5 (MKP5) 表达并抑制 p38 激酶造成 IL-6 的下降^[15]; 维生素 D 还能抑制核转录因子- κ B (NF- κ B) 信号通路的激活并减少 TNF- α 、IL-6 等促炎性细胞因子产生^[16]。本研究发现, 血浆

sTNFR II 在 VDR 低表达组中显著高于高表达组和对照组, 高表达组和对照组之间无统计学差异; VDR 低表达组患者 CRP 和 IL-6 平均值均高于高表达组。与既往 VDR 抑制细菌刺激产生 NF- κ B 并降低 IL-6 水平发挥抗炎作用的实验结果相符^[16,17]。这提示, VDR 可能参与结直肠癌患者血浆促炎性细胞因子水平的调节。

肠道菌群是栖息于人类消化道内的大量微生物, 越来越多的研究表明^[2,18,19], 肠道菌群变化以及伴随的炎症反应改变在结直肠癌的发生与发展过程中起到了关键的作用。VDR 表达能够影响肠道菌群的组成结构, Wu 等^[16]发现, VDR 能抑制 NF- κ B 信号通路减轻沙门氏菌 (*Salmonella*) 感染引起的小鼠体内的有害细菌数量与死亡率。Wang 等^[20]通过

GWAS 分析发现, 菌群的整体变化以及单个菌种的变化与 VDR 基因表达有关。本研究发现, 与对照组相比, VDR 高表达组与低表达组患者粪便中的差异菌群有所重合, 既往研究^[21,22]较多的具核梭杆菌 (*Fusobacterium nucleatum*)、*Parvimonas micra* 等细菌

在两组患者粪便中均有显著上升。我们只在 VDR 低表达组患者粪便中发现,与溃疡性结肠炎有关的 *F. varium*^[23]、与自闭症谱系障碍有关系的 *Ruminococcus torques* 等 6 种细菌有显著升高。而只在 VDR 高表达组患者粪便发现有显著增加的细菌有引起口腔与全身病变的口腔普雷沃菌(*Prevotella oris*)与牙周病有关的牙髓卟啉单胞菌(*Porphyromonas endodontalis*)等 8 种细菌。说明结直肠癌患者 VDR 可能造成肠道菌群的差异。

目前在人群中开展的结直肠癌 VDR 表达情况与血浆炎症因子以及肠道菌群变化的相关研究较缺乏。维生素 D 补充剂在预防癌症以及辅助癌症治疗有潜在作用,维生素 D 类似物如 EB1089 能够激活 VDR 并发挥抗癌特性而不引起高钙血症等不良反应,但完善的临床试验仍然较少^[7,10]。通过分析不同 VDR 表达情况的结直肠癌患者体内肠道菌群和炎症因子变化的差异,本研究为结直肠癌发生发展中 VDR 的作用机制提供了来自人群的证据,对维生素 D 预防与治疗结直肠癌的相关机制进行了初步探索。

综上所述,本研究发现结直肠癌患者癌组织 VDR 表达可能影响血浆 CRP、sTNFR II 水平和特定肠道菌群的变化。更深入的机制探讨以及其对患者生存期或预后的影响,仍需进一步的研究。

参考文献:

- [1] Chen WQ,Zheng RS,Zhang SW,et al. Report of cancer incidence and mortality in China,2013[J]. China Cancer,2017,26(1):1-7.[陈万青,郑荣寿,张思维,等. 2013 年中国恶性肿瘤发病和死亡分析[J]. 中国肿瘤,2017,26(1):1-7.]
- [2] Brennan CA,Garrett WS. Gut microbiota,inflammation, and colorectal cancer[J]. Annu Rev Microbiol,2016,70:395-411.
- [3] Sun J. The role of Vitamin D and Vitamin D receptors in colon cancer[J]. Clin Transl Gastroenterol,2017,8(6):e103.
- [4] Edgar R. SINTAX:a simple non-Bayesian taxonomy classifier for 16S and ITS sequences[J]. BioRxiv,2016.[Epub ahead of print]
- [5] Caporaso JG,Kuczynski J,Stombaugh J,et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data[J]. Nat Methods,2010,7(5):335-336.
- [6] Kursu MB,Rudnicki WR. Feature selection with the boruta package[J]. J Stat Softw,2010,36(11):1-13.
- [7] Wang KW,Dong M. Vitamin D receptor and colorectal cancer [J]. World Chinese Journal of Digestology,2013(33):3688-3694.[王科伟,董明. 维生素 D 受体在结直肠肿瘤中的研究进展 [J]. 世界华人消化杂志,2013(33):3688-3694.]
- [8] Giovannucci E. Vitamin D status and cancer incidence and mortality[J]. Adv Exp Med Biol,2008,624:31-42.
- [9] Ng K,Meyerhardt JA,Wu K,et al. Circulating 25-hydroxyvitamin D levels and survival in patients with colorectal cancer[J]. J Clin Oncol,2008,26(18):2984-2991.
- [10] Krishnan AV,Feldman D. Mechanisms of the anti-cancer and anti-inflammatory actions of vitamin D [J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol,2011,51:311-336.
- [11] Dou R,Ng K,Giovannucci EL,et al. Vitamin D and colorectal cancer:molecular,epidemiological and clinical evidence[J]. Br J Nutr,2016,115(9):1643-1660.
- [12] Ma Y,Zhang P,Wang F,et al. Association between vitamin D and risk of colorectal cancer;a systematic review of prospective studies [J]. J Clin Oncol,2011,29(28):3775-3782.
- [13] Toriola AT,Nguyen N,Scheitler-Ring K,et al. Circulating 25-hydroxyvitamin D levels and prognosis among cancer patients;a systematic review [J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev,2014,23(6):917-933.
- [14] Li M,Chen P,Li J,et al. Review:the impacts of circulating 25-hydroxyvitamin D levels on cancer patient outcomes;a systematic review and meta-analysis [J]. J Clin Endocrinol Metab,2014,99(7):2327-2336.
- [15] Nonn L,Peng L,Feldman D,et al. Inhibition of p38 by vitamin D reduces interleukin-6 production in normal prostate cells via mitogen-activated protein kinase phosphatase 5:implications for prostate cancer prevention by vitamin D[J]. Cancer Res,2006,66(8):4516-4524.
- [16] Wu S,Liao AP,Xia Y,et al. Vitamin D receptor negatively regulates bacterial-stimulated NF-kappaB activity in intestine[J]. Am J Pathol,2010,177(2):686-697.
- [17] Chen J,Waddell A,Lin Y,et al. Dysbiosis caused by vitamin D receptor deficiency confers colonization resistance to *Citrobacter rodentium* through modulation of innate lymphoid cells[J]. Mucosal Immunol,2014,8(3):618-626.
- [18] Vogtmann E,Goedert JJ. Epidemiologic studies of the human microbiome and cancer[J]. Br J Cancer,2016,114(3):237-242.
- [19] Yang T,Owen JL,Lightfoot YML,et al. Microbiota impact on the epigenetic regulation of colorectal cancer [J]. Tren Mol Med,2013,19(12):714-725.
- [20] Wang J,Thingholm LB,Skieevien J,et al. Genome-wide association analysis identifies variation in vitamin D receptor and other host factors influencing the gut microbiota[J]. Nat Genet,2016,48(11):1396-1406.
- [21] Kostic AD,Chun E,Robertson L,et al. *Fusobacterium nucleatum* potentiates intestinal tumorigenesis and modulates the tumor-immune microenvironment [J]. Cell Host Microbe,2013,14(2):207-215.
- [22] Flynn KJ,Baxter NT,Schloss PD. Metabolic and community synergy of oral bacteria in colorectal cancer [J]. mSphere,2016,1(3):e00102-00116.
- [23] Ohkusa T,Yoshida T,Sato N,et al. Commensal bacteria can enter colonic epithelial cells and induce proinflammatory cytokine secretion;a possible pathogenic mechanism of ulcerative colitis [J]. J Med Microbiol,2008,58 (Pt 5):535-545.