

· 综 述 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2020.20.038

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20200608.1909.022.html\(2020-06-09\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20200608.1909.022.html(2020-06-09))

肠道菌群在肿瘤免疫治疗中的新作用*

斯仔恬,应昊轩,游丹铭 综述,张 健[△]审校

(南方医科大学珠江医院肿瘤中心,广州 510280)

[摘要] 共生微生物菌群的活动对人类健康有重大的影响,并与包括癌症在内的许多疾病的发展相关。无菌动物模型表明,微生物菌群可以对宿主的生理活动产生许多影响,包括免疫应答的形成和调节。最近的研究表明,微生物菌群可以对癌症免疫治疗的结果产生更特别的影响。本文就宿主微生物菌群相互作用的基本方法和注意事项,肠道微生物菌群组成与免疫治疗效果之间存在的因果关系,调控微生物菌群对免疫治疗效果影响的可能机制进行综述,并对潜在生物学机制深入的了解,将微生物菌群效应与其他参与调节免疫治疗过程的因素相结合,从而优化治疗效果。

[关键词] 免疫治疗;肠道微生物菌群;亚基因组学;无菌小鼠;基于微生物菌群的治疗

[中图分类号] R246.5;R73

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2020)20-3486-05

New roles of intestinal flora in tumor immunotherapy*

SI Yutian, YING Haoxuan, YOU Danming, ZHANG Jian[△]

(Tumor Center of Zhujiang Hospital, Southern Medical University,

Guangzhou, Guangdong 510280, China)

[Abstract] The activities of commensal microbiota have a significant impact on human health and are associated with the development of many diseases, including cancer. The gnotobiotic animal models have shown that microbiota can generate many effects on the host physiological activities. The recent studies have shown that microbiota can have a more specific impact on the outcome of cancer immunotherapy. This review summarizes the basic methods and precautions for the host-microbiota interactions, the causal relationship between intestinal microbiota composition and immunotherapeutic effects and possible mechanisms governing the microbiota-mediated impact on immunotherapy efficacy. Therefore it is needed to deeply understand the underlying biological mechanisms, and combine the microbiota effect with other factors participating in regulating immunotherapy process, thus optimize the treatment effect

[Key words] immunotherapy; gut microbiota; subgenomics; germ-free mice; microbiome-based therapy

人体是一个复杂的生态系统,存在着大量、种类众多的微生物菌群落并受到它们的影响,包括细菌、真菌等,它们共同构成了共生微生物菌群。动物体内的肠道微生物可帮助宿主调控黏膜免疫发育,赋予机体抵御病原体入侵的能力。健康状态下,共生菌和病原菌之间存在完美平衡,与免疫系统相互作用以维持肠道稳态^[1-2]。在癌症研究中,已经证明了某些特定细菌参与了癌变过程^[2]。有研究表明,微生物菌群的调节可能会成为一个能提高癌症免疫治疗疗效的新策略,特别是针对细胞毒性 T 淋巴细胞相关蛋白 4 (CTLA-4)和程序性死亡受体 1(PD-1)途径的免疫检

查点阻断治疗^[3]。

1 人类宿主体内共生细菌定植的建立

在成年人体内,微生物菌群大约由 12 个门组成,其中硬毛菌和拟杆菌占了大部分,除此之外还有放线菌、变形杆菌等,这些细菌的相对占比在个体之间及解剖位置之间是有差异的。肠道中存在着各种各样的细菌,虽然其细菌密度在所有生态环境里最大,但是类别却是最简单的,主要有噬纤维菌-黄杆菌-拟杆菌^[4]。人类出生时是无菌的,但是在出生后的极短时间内肠道会迅速定植细菌。因此,人类分娩的方式(顺产或者剖宫产)、喂养方式(母乳或者配方奶粉)、

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81871859,81672267);广东大学生科技创新培育专项资金(“攀登计划”:pdjh2019b0104);大学生创新创业训练计划资助(S201912121088,201912121192,201912121213,201912121216)。 作者简介:斯仔恬(1998—),本科,主要从事肿瘤研究。

[△] 通信作者, E-mail: blacktiger@139.com。

抗生素的使用等许多因素都会直接影响肠道菌群结构。由于新生儿体内的微生物群会随着不同部位的特异性而发生选择性分化,到 3 岁时,便会形成了一个以厚壁菌或类杆菌为主的成熟肠道微生物菌群^[5],这个年龄之后,健康个体的微生物组分达到一个相对稳定的状态,但在疾病状态或使用抗生素时,可能会出现强烈且长期的扰动^[6]。在物种水平上,肠道微生物菌群存在巨大的个体间异质性,因此,评估微生物菌群的功能能力是一个更适用于定义核心健康微生物菌群的指标^[7]。

2 下一代测序方法在微生物研究中的应用

随着分子生物学技术的进步,核糖体 RNA 16S 测序和全基因组测序已经在鉴定哺乳动物肠道微生物群的巨大生物多样性中发挥了作用,可以应用这类高通量方法进行细菌的分离和鉴定,为进一步操作和进行机制研究做准备^[8]。

目前,对复杂细微生物菌群落进行分类鉴定最常用的方法是对编码 16S RNA 的部分基因进行选择性的扩增和测序。这项技术将序列相似性高于某个阈值的扩增子称为操作分类单位(OTU),然后通过对现有数据库进行交叉引用来为 OTU 中的代表性扩增子分配一个分类学标识。基因多拷贝导致的定量不准确和扩增造成的偏差仍是目前使用 16S RNA 分析需要考虑的因素,不过此技术的低成本特点和高通量潜力还是使其成了最常用的初始描述性数据^[8]。

由全基因组鸟枪法测序产生的小片段可代表样品中的整个基因组含量,但它需要更大的数据存储,更强的计算能力和更复杂的分析管道。由于在全基因组鸟枪测序的过程中将多个标记基因序列用于分类注释,因此,与 16S rRNA 基因扩增子测序相比,全基因组鸟枪测序可实现从物种到菌株的高分辨率识别^[9]。此外,全基因组鸟枪测序可以使用基因预测工具和数据库对微生物菌群的功能进行表征,而 16S rRNA 扩增子测序数据只能间接推断微生物菌群的功能能力^[9]。这些测序方法中,每一种都有其局限性,但可以将二者相结合以提高细菌鉴定和定量的准确性。

3 无菌小鼠的免疫特点及其实际应用

无菌小鼠是体内不含有任何可检测出的细菌、真菌等微生物的小鼠,可使研究人员通过直接接种感兴趣的微生物来控制动物体内微生物群的存在方式^[10]。肠道微生物菌群与局部黏膜免疫的发育和调节密切相关,可帮助机体抵抗外源病原体,赋予肠道定植抗力,同时通过调控固有免疫与获得性免疫来保护机体^[11]。这已在无菌小鼠身上得到了证实,其胃肠道免疫缺陷的例子包括:(1)肠系膜淋巴结较小和异常的高内皮小静脉;(2)生发中心的 Peyer 斑较少;(3)肠

固有层缺乏淋巴滤泡,在微生物菌群定植后新生隐斑可以发育成具有功能的孤立淋巴滤泡;(4)肠道黏液层更薄,黏液成分异常^[12]。这些局部免疫缺陷伴随着肠固有层 CD4⁺ T 细胞、血浆细胞数量的减少和 IgA 生成的减少,导致肠屏障功能进一步受损。再者,机体的固有免疫调节也受共生微生物菌群的影响,有研究表明其对树突状细胞、巨噬细胞和中性粒细胞的功能有促进作用^[13]。此外,细菌代谢物及微生物菌群的代谢产物与刺激树突状细胞在骨髓中的产生及其吞噬能力有关^[14],共生细菌的存在也会刺激全身的适应性免疫,尤其是促进远处(非黏膜)淋巴组织的正常发育(如脾脏和外周淋巴结)。

在实际应用无菌小鼠模型时,小鼠和人类的某些差异可能会影响人类肠道微生物菌群植入小鼠的效率或它们在整个胃肠道的空间分布。例如,在小鼠体内存在的非腺体前胃中的菌群为乳酸杆菌,而人类的胃内主要的菌群是链球菌、普雷沃菌和幽门螺杆菌^[15]。除此之外,环状皱褶、盲肠阑尾等结构差异,可能会影响人类微生物菌群转移到小鼠体内的保真度;小鼠肠道内整体较低的 pH 值和氧张力及黏液聚糖分布的差异也可能影响肠道转移细菌的生长。使用无菌小鼠作为人类微生物群受体的替代方法是使用经抗生素治疗的无特定病原体(SPF)小鼠,使用抗生素后移植效果可以得到实质性的改善。在解释用无菌小鼠实验的结果时,还应考虑尽管无菌小鼠没有可检测到的活菌群,但可暴露于无菌饮食和垫料中来自死亡细菌的微生物残留物^[16],若数量足够,这些分子理论上对免疫功能的影响与完整活菌对免疫功能的影响相似。

4 肠道菌群与免疫治疗的相关性

4.1 肠道菌群与癌症免疫治疗效果的相关性

多项研究表明,肠道微生物可以深刻影响免疫治疗疗效^[17-21],以及一些具有免疫刺激功能的化疗效果^[22-23]。肠道微生物组中的特定细菌会影响机体对化疗和免疫疗法的响应^[24]。在小鼠模型中证实了特定微生物对免疫检查点阻断免疫治疗的贡献,影响免疫疗法的细菌菌株可通过抑制或增强细胞程序性死亡-配体 1(PD-L1)阻滞,刺激 T 细胞或刺激细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原阻滞来实现^[24]。据报道,在皮下注射黑素瘤和膀胱癌的小鼠中,与非双歧杆菌治疗的小鼠相比,抗 PD-L1 疗法的反应率与双歧杆菌治疗显著相关,这主要是由于树突状细胞成熟的增强,从而提高了肿瘤特异性 CD8⁺ T 细胞的活性^[25]。肠道微生物群与癌症患者的免疫治疗效果相关,对在免疫检查点阻断治疗前采集的 DNA 或粪便标本进行测序,由此确定了良好的微生物组分与随后的治疗反应之间的关联。在应答者患者中,存在特异的细菌类群被

过度表达,且有较多的细菌种类^[26]。

4.2 微生物介导免疫调节的生物学机制

在探讨微生物群介导的抗肿瘤免疫调节机制时,有两个普遍的问题。(1)从胃肠道向肿瘤和(或)引流淋巴结传递信号的信使,其本质是什么?这样的信使能够进入血液循环,以进入较远的肿瘤区域,可将它们分类为微生物群或宿主衍生细胞(活的微生物或宿主免疫细胞)或分子[微生物相关的或病原体相关分子模式(MAMPs/PAMPs)、微生物代谢物或宿主细胞因子]。(2)信使在肿瘤内所产生的免疫效应的本质是什么?免疫抑制的作用可以通过增强免疫调节功能(调节性 T 细胞、骨髓来源的抑制性细胞、肿瘤相关巨噬细胞)或直接抑制抗肿瘤免疫功能来实现;减轻免疫调节功能或刺激抗肿瘤的 T 细胞应答可以达到免疫刺激的作用。微生物群介导的影响肿瘤生长和免疫治疗效果的确切机制目前尚不清楚。

当活细菌或 MAMPs/PAMPs 作为信使时,细菌迁移的过程中通过同时提供外来抗原和佐剂,活细菌进入脾脏、淋巴结或肿瘤,进而启动强烈的免疫反应。针对细菌抗原的交叉反应性 T 细胞可以通过提供帮助($CD4^+$ T 细胞)或直接杀伤($CD8^+$ T 细胞)来发挥抗肿瘤作用。在癌症的情况下,细菌脂多糖在全身放疗增强小鼠过继性 T 细胞活性治疗后异常地进入循环^[27],此时 MAMPs/PAMPs 可具有佐剂性。肠道菌群能产生各种生物活性分子作为其代谢的副产物,这些代谢物可以对宿主表现出各种各样的作用,其中包括调节免疫系统。短链脂肪酸(SCFAs)是目前已知的能影响宿主免疫的最具特征性的微生物代谢物种类之一^[28],它可以影响细胞因子的产生^[29]、巨噬细胞和树突状细胞的功能及 B 细胞类别的转换。在免疫治疗的条件下,通过将代谢产物作为药物的方法,或者通过进行基因操作从而对治疗方案进行临床管理,都可以观察到微生物群的代谢在免疫治疗过程中发挥的作用,这可能有助于制订新的治疗策略。肠道菌群调节全身免疫应答的另一种潜在机制是通过局部诱导可溶性免疫调节因子,然后将其全身扩散。循环中的细胞因子可能会改变肿瘤免疫微环境或肿瘤引流淋巴结内关键免疫亚群的激活阈值,从而在免疫治疗时增强适应性免疫应答。

此外,免疫细胞也可以作为信使,例如树突状细胞,它将固有免疫与获得性免疫联系起来,并在肿瘤微环境(TME)内塑造 T 细胞的过程中发挥了关键的作用。摄取了细菌抗原的树突状细胞可以诱导机体产生对共生细菌的免疫耐受,或者激活具有细菌抗原反应性的 T 细胞,在某些情况下,这些 T 细胞能够与肿瘤抗原发生交叉反应,也可以在抗肿瘤免疫的过程中提供帮助。

5 未来潜在的临床应用

5.1 抗生素联合免疫治疗

必须注意的是,应谨慎对接受癌症免疫治疗的患者使用抗生素。由抗生素引起的共生微生物的消失和肠道菌群组成的改变会对肠道免疫防御系统产生重大的影响,近期研究表明,抗生素可能会对接受免疫检查点阻断(ICB)疗法的患者的预后产生不利影响^[30]。但是,也可以假设一些患者体内可能有大量的促免疫抑制的细菌,此时适当使用抗生素可能会减少这种有免疫抑制作用的调节细菌的数量,因此,可能会使有免疫激活作用的细菌大量繁殖,并改善患者肿瘤控制的情况,目前的研究一直在重组无菌小鼠来验证以上的想法。

5.2 微生物群作为预后生物标志物的应用

作为一种非侵入性测试,评估肠道微生物组作为对免疫治疗反映的生物标志物可以提高治疗选择的准确性^[31]。肠道(非口腔微生物群)中的细菌多样性越高,治疗中对 ICB 的反应率就越高^[32]。在治疗前进行粪便 DNA 测序,通过量化群落丰度和公认的“有益”或“有害”细菌的相对比例,可预测治疗结果,并有助于指导治疗决策和方案的制订。未来,微生物组的组成可能是与其他已知结果相关因素(例如 T 细胞浸润和肿瘤突变负担)结合在一起的一个参数,用于预测特定的免疫治疗方案的疗效,并通过微生物群采用其他的干预措施,最终提高免疫治疗效果或替代性地降低相关毒性。

5.3 调节微生物群组成和功能的治疗干预

临床证据扩展了微生物群与患者反应之间的相关关系,以支持二者之间的因果关系。这种情况使通过操纵肠道菌群提高疗效的可能性大大提高。目前的干预策略也从不太精确的方法到更有针对性的方法。其中一种方法是粪便微生物群移植。例如,粪便标本可以从抗 PD-1 应答者提取,该应答者有良好的共生细菌成分,然后通过内镜移植或口服的方法将菌群移植到抗 PD-1 治疗抵抗且显示出肠道微生物组成不良的患者体内。一种更敏感的干预手段包括通过益生元或饮食的改变来调节现有的共生群落,以促进需要特定底物的有益细菌的繁殖,或者将有害细菌的所需营养耗尽。

另外一个方法是,可以将有益或具有免疫增强效应的细菌制备成益生菌,并作为免疫治疗的佐剂使用。一旦确定了有益作用的分子机制,就可以利用对所选细菌进行基因操作来最大限度地发挥其有益的作用。这项技术可以修改细菌的现有功能或引入全新的基因^[33]。例如,经过修饰的类杆菌菌株携带了使用吡啉的基因簇,可以稳定将菌株植入喂食吡啉补充饲料的小鼠体内的过程^[34]。此外,如果能够鉴定出细

菌的代谢途径及可以提高抗肿瘤免疫和免疫治疗效果的代谢产物,则可以将一些小分子作为候选的免疫增强药物来进行测试。但都需要经适当控制的临床试验,以验证任何可能的基于微生物的治疗方法,并评估其益处和风险。

6 展 望

由于微生物群的复杂性,在这样一个复杂的系统中梳理出与机制相关的基本元素是一项挑战。即使两个个体拥有相同种类的细菌,每个细菌在菌株水平上也可能存在变异,这可能导致其在与宿主的相互作用过程中产生不同的功能。此外,在两个完全不同的环境中,两个相同的菌株对其所在菌落的贡献程度也可能不同,由此对宿主发挥不同的作用。至今为止,大部分的研究都集中在癌症的免疫治疗和微生物组分两个方面,但目前尚未彻底鉴别出非细菌成分,包括病毒、真菌和原生动植物。因此,更深入地了解微生物群可以使人们更全面地了解其对癌症治疗的影响。

在未来的研究中,研究者需要意识到在控制癌症与宿主免疫反应之间存在许多不同的调控因子,微生物群只是其中之一。肿瘤细胞会在治疗过程中生长和进化,即使通过操纵微生物菌群获得了最大的免疫治疗效果,肿瘤的分子进化仍然可能发生,而微生物群也可能会发生演变。这种变化给科研带来了更大的挑战,但这种灵活性也带来了令人兴奋的前景,即可以通过干预和利用宿主与微生物相互依赖的关系,来制订更有效的治疗方案。在未来的研究中,将微生物群作为几个影响因素之一纳入个性化癌症治疗中也是十分重要且有必要的。

参考文献

- [1] 于莹莹,张小莉,宋超杰,等. 肠道菌群对 1 型糖尿病肠道通透性及免疫作用机制研究进展[J]. 微生物学杂志,2019,39(4):115-121.
- [2] ZHANG H,SUN L. When human cells meet bacteria: precision medicine for cancers using the microbiota[J]. *Am J Cancer Res*,2018,8(7):1157-1175.
- [3] BERTRAND R,LE C E,LISA D,et al. Gut microbiome influences efficacy of PD-1-based immunotherapy against epithelial tumors [J]. *2018*,359(6371):91-97.
- [4] 章必成,彭敏,宋启斌. 肠道微生物群与免疫治疗疗效的关系[J]. *肿瘤学杂志*,2018,24(11):1056-1059.
- [5] 郑凯,吴军华,邱海燕. 影响新生儿肠道细菌定植相关因素的研究进展[J]. *中国微生态学杂志*,2017,29(11):1350-1353.
- [6] HAO W,LI X,ZHANG P,et al. A review of antibiotics,depression,and the gut microbiome [J]. *Psychiatry Res*,2020,284:112691.
- [7] 付亚楠,唐彩琰,DUCATELLE R,等. 肠道健康的定义和标志物鉴定[J]. *国外畜牧学(猪与禽)*,2019(6):44-46.
- [8] CHEN X,FANG S,WEI L,et al. Systematic evaluation of the gut microbiome of swamp eel (*Monopterus albus*) by 16S rRNA gene sequencing[J]. *PeerJ*,2019,7(5):e8176.
- [9] ILARIA L,VALERIO F,FRANCESCA P,et al. Quantitative assessment of shotgun metagenomics and 16S rDNA amplicon sequencing in the study of human gut microbiome [J]. *Omics*,2018,22(4):248-254.
- [10] 薛淮娟,马龙,秦欢,等. 无菌小鼠免疫系统研究概况和进展[J]. *现代免疫学*,2018,38(3):252-256.
- [11] 张征,刘志华. 无菌小鼠在肠道菌与机体免疫互作机制研究中的应用[J]. *中国实验动物学报*,2017,25(6):663-666.
- [12] 俞昊男,刘志华. 肠道微生物与黏膜免疫研究的前沿进展[J]. *中国免疫学杂志*,2019,35(16):1921-1930.
- [13] GORJIFARD S,GOLDSZMID R S. Microbiota-myeloid cell crosstalk beyond the gut [J]. *J Leukoc Biol*,2016,100(5):865-879.
- [14] TROMPETTE A,GOLLWITZER E S,YADA VA K,et al. Gut microbiota metabolism of dietary fiber influences allergic airway disease and hematopoiesis[J]. *Nat Med*,2014,20(2):159-166.
- [15] HUGENHOLTZ F,DE VOS W M. Mouse models for human intestinal microbiota research:a critical evaluation[J]. *Cell Mol Life Sci*,2018,75(1):149-160.
- [16] SCHWARZER M,SRUTKOVA D,HERMANOVA P,et al. Diet matters:endotoxin in the diet impacts the level of allergic sensitization in germ-free mice[J]. *PLoS One*,2017,12(1):e167786.
- [17] TEMRAZ S,NASSAR F,NASR R,et al. Gut microbiome:a promising biomarker for immunotherapy in colorectal cancer [J]. *Int J Mol Sci*,2019,20(17):4155.
- [18] FRANKEL A E,COUGHLIN L A,KIM J,et al. Metagenomic shotgun sequencing and unbiased

- metabolomic profiling identify specific human gut microbiota and metabolites associated with immune checkpoint therapy efficacy in melanoma patients [J]. *Neoplasia*, 2017, 19(10):848-855.
- [19] ROUTY B, LE CHATELIER E, DEROSA L, et al. Gut microbiome influences efficacy of PD-1-based immunotherapy against epithelial tumors [J]. *Science*, 2018, 359(6371):91-97.
- [20] GOPALAKRISHNAN V, SPENCER C N, NEZI L, et al. Gut microbiome modulates response to anti-PD-1 immunotherapy in melanoma patients [J]. *Science*, 2018, 359(6371):97-103.
- [21] MATSON V, FESSLER J, BAO R, et al. The commensal microbiome is associated with anti-PD-1 efficacy in metastatic melanoma patients [J]. *Science*, 2018, 359(6371):104-108.
- [22] GELLER L T, BARZILY-ROKNI M, DANINO T, et al. Potential role of intratumor bacteria in mediating tumor resistance to the chemotherapeutic drug gemcitabine [J]. *Science*, 2017, 357(6356):1156-1160.
- [23] PELED J U, DEVLIN S M, STAFFAS A, et al. Intestinal microbiota and relapse after hematopoietic-cell transplantation [J]. *J Clin Oncol*, 2017, 35(15):1650-1659.
- [24] TEMRAZ S, NASSAR F, NASR R, et al. Gut microbiome: a promising biomarker for immunotherapy in colorectal cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(17):4155.
- [25] LI W, DENG Y, CHU Q, et al. Gut microbiome and cancer immunotherapy [J]. *Cancer Lett*, 2019, 447(1):41-47.
- [26] FAN Y, ZHANG C, JIN S, et al. Progress of immune checkpoint therapy in the clinic (Review) [J]. *Oncol Rep*, 2018, 41(1):3-14.
- [27] PAULOS C M, WRZESINSKI C, KAISER A, et al. Microbial translocation augments the function of adoptively transferred self/tumor-specific CD8⁺ T cells via TLR4 signaling [J]. *J Clin Invest*, 2007, 117(8):2197-2204.
- [28] MORRISON D J, PRESTON T. Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism [J]. *Gut Microbes*, 2016, 7(3):189-200.
- [29] IRAPORDA C, ERREA A, ROMANIN D E, et al. Lactate and short chain fatty acids produced by microbial fermentation downregulate proinflammatory responses in intestinal epithelial cells and myeloid cells [J]. *Immunobiology*, 2015, 220(10):1161-1169.
- [30] PERRON M. Antibiotics reduce immunotherapy effectiveness in kidney cancer [J]. *Oncol Times*, 2017, 39(7):36.
- [31] SHAIKH F Y, GILLS J J, SEARS C L. Impact of the microbiome on checkpoint inhibitor treatment in patients with non-small cell lung cancer and melanoma [J]. *E Bio Med*, 2019, 48(6):642-647.
- [32] GOPALAKRISHNAN V, SPENCER C N, NEZI L, et al. Gut microbiome modulates response to anti-PD-1 immunotherapy in melanoma patients [J]. *Science*, 2018, 359(6371):97-103.
- [33] LIM B, ZIMMERMANN M, BARRY N A, et al. Engineered regulatory systems modulate gene expression of human commensals in the gut [J]. *Cell*, 2017, 169(3):547-558.
- [34] SHEPHERD E S, DELOACHE W C, PRUSS K M, et al. An exclusive metabolic niche enables strain engraftment in the gut microbiota [J]. *Nature*, 2018, 557(7705):434-438.

(收稿日期:2020-02-20 修回日期:2020-06-02)