

具核梭杆菌促进肺癌发展及其对肺部微生态的影响

李东^{1,2#}, 童江辉^{2#}, 李奕彤^{1,2}, 孙一凡², 李俭杰³, 王子平³, 谭亚芳²,
杨瑞馥², 毕玉晶^{1,2*}

- 1 安徽医科大学 基础医学院, 安徽 合肥
- 2 军事医学研究院, 病原微生物与生物安全全国重点实验室, 北京
- 3 北京大学肿瘤医院 胸部肿瘤内一科, 北京

李东, 童江辉, 李奕彤, 孙一凡, 李俭杰, 王子平, 谭亚芳, 杨瑞馥, 毕玉晶. 具核梭杆菌促进肺癌发展及其对肺部微生态的影响[J]. 微生物学报, 2025, 65(9): 4001-4013.

LI Dong, TONG Jianghui, LI Yitong, SUN Yifan, LI Jianjie, WANG Ziping, TAN Yafang, YANG Ruifu, BI Yujing. *Fusobacterium nucleatum* promotes lung cancer development and influences the lung microbiota[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2025, 65(9): 4001-4013.

摘要:【目的】探究具核梭杆菌是否会促进肺癌的发展及其潜在机制。【方法】通过细胞实验证实具核梭杆菌能促进肺癌细胞的增殖和转移; 通过动物实验验证具核梭杆菌能促进肺癌的发展。对肺癌小鼠的肺泡灌洗液进行 16S rRNA 基因测序, 以及对肺组织进行转录组测序, 分析具核梭杆菌对肺癌小鼠肺部菌群的影响及肺组织相关通路的激活情况。【结果】具核梭杆菌促进了肺癌上皮细胞 A549 的增殖和转移。在体内动物实验中, 具核梭杆菌感染肺部后肺部结节数量增加, 肺组织荧光强度增强。16S rRNA 基因测序结果显示, 感染小鼠肺部鼠杆菌属(*Muribaculum*)、简单螺旋形菌属(*Simplicispira*)等富集。肺组织转录组结果显示, 肺癌小鼠感染具核梭杆菌后激活了 IL-17 信号通路、细胞因子-细胞因子受体相互作用、金黄色葡萄球菌感染通路、TNF 信号通路等与炎症或免疫相关的信号通路。【结论】具核梭杆菌感染导致肺部微生物群紊乱, 肺组织中多个与炎症和免疫相关的信号通路被激活, 从而促进了小鼠肺癌的转移。

关键词: 具核梭杆菌; 肺癌; 肺部微生物群; 16S rRNA 基因测序; 转录组

资助项目: 国家重点研发计划(2022YFC2601200)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2022YFC2601200).

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding author. E-mail: byj7801@sina.com

Received: 2025-02-21; Accepted: 2025-04-19; Published online: 2025-05-18

Fusobacterium nucleatum promotes lung cancer development and influences the lung microbiota

LI Dong^{1,2#}, TONG Jianghui^{2#}, LI Yitong^{1,2}, SUN Yifan², LI Jianjie³, WANG Ziping³, TAN Yafang², YANG Ruifu², BI Yujing^{1,2*}

1 School of Basic Medical Sciences, Anhui Medical University, Hefei, Anhui, China

2 State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Academy of Military Medical Sciences, Beijing, China

3 Department of Thoracic Oncology, Peking University Cancer Hospital, Beijing, China

Abstract: [Objective] To investigate whether *Fusobacterium nucleatum* promotes the development of lung cancer and find out the underlying mechanisms. [Methods] The cell experiment proved that *F. nucleatum* can promote the proliferation and metastasis of lung cancer cells; Animal experiments showed that *F. nucleatum* can promote the development of lung cancer; 16S rRNA gene sequencing of alveolar lavage fluid and transcriptome sequencing of lung tissue were performed to analyze the effects of *F. nucleatum* on the lung flora of mice with lung cancer and the activation of relevant pathways in lung tissue. [Results] The cell experiment showed that *F. nucleatum* significantly promoted the proliferation and metastasis of A549 cells. The animal experiments confirmed that *F. nucleatum* infection in the lungs increased the number of nodules and enhanced the fluorescence intensity in the lung tissue. The 16S rRNA gene sequencing revealed the enrichment of *Muribaculum* and *Simplicispira* in the lung of infected mice. The transcriptome sequencing results showed that the mouse model of lung cancer activated the interleukin-17 signaling pathway, cytokine-cytokine receptor interactions, *Staphylococcus aureus* infection pathway, tumor necrosis factor signaling pathway, and other signaling pathways related to inflammation or immunity after being infected with *F. nucleatum*. [Conclusion] *F. nucleatum* infection in mice with lung cancer disrupts the microbiota and activates the immunity- and inflammation-related signaling pathways in the lung, thereby promoting the metastasis of lung cancer in mice.

Keywords: *Fusobacterium nucleatum*; lung cancer; lung microbiota; 16S rRNA gene sequencing; transcriptome

肺癌严重威胁着人类的身体健康。每年有100万至800万人被诊断出患有肺癌，其中约100万至600万人死于肺癌^[1]。虽然导致肺癌的原因很多，但吸烟仍是主要的风险因素。其他非吸烟因素包括环境和职业暴露、慢性肺部疾病、肺部感染以及不良生活方式等^[2]。相关研究发现，在非吸烟人群中肺癌与以慢性气道炎症

为特征性疾病密切相关，如慢性阻塞性肺疾病、肺炎衣原体感染、结核分枝杆菌引起的肺结核和呼吸道病毒感染等^[3]。这些结果表明，肺部微生物可能在肺癌的发生和发展中发挥重要作用。具核梭杆菌是口腔中常见的革兰氏阴性厌氧菌。它与牙龈卟啉单胞菌及其他微生物共同破坏宿主与微生物之间的平衡，诱发牙周炎^[4-5]。随着

测序技术的发展, 研究人员发现具核梭杆菌也能在结直肠癌组织中富集。进一步研究表明, 具核梭杆菌能够促进结直肠癌的发展^[6-7]。在 *Apc*^{Min/+} 小鼠模型中, 通过灌胃方式将具核梭杆菌引入小鼠体内, 结果显示其会促进结直肠癌的发生^[8]。此外, 研究人员利用培养组学技术从肺癌患者的肺泡灌洗液中分离出具核梭杆菌, 并通过分析口腔微生物、牙周病与肺癌之间的关联, 发现具核梭杆菌可能是肺癌标志物的潜在微生物之一^[9-11]。

本研究探讨了具核梭杆菌促进肺癌发展的潜在机制。

1 材料与方法

1.1 实验菌株与细胞

具核梭杆菌(*Fusobacterium nucleatum*) ATCC 25586 购自广东省微生物菌种保藏中心。具核梭杆菌(*Fusobacterium nucleatum*) strain-9 从北京大学肿瘤医院肺癌患者的肺泡灌洗液中分离并在本实验室保存^[9]。以上菌株分别命名为 Fn-ATCC 和 Fn-9。

肺癌上皮细胞 A549、人单核细胞白血病 THP-1 细胞、带有绿色荧光蛋白的小鼠 Lewis 肺癌细胞(LLC-GFP)均为本实验室保存。

1.2 实验动物

选择 8 周龄、雌性野生型无特定病原体(specific-pathogen-free, SPF)级 C57BL/6N 小鼠(北京维通利华实验动物技术有限公司), 饲养于军事医学研究院实验动物中心。

1.3 主要试剂和仪器

MTT 试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司; Transwell 孔板购自康宁公司; ELISA 试剂盒购自达科为生物技术股份有限公司; RNA 提取试剂盒 FastPure Cell/Tissue Total RNA Isolation Kit V2、逆转录试剂盒 *Taq* Pro Universal SYBR qPCR Master Mix、HiScript III RT SuperMix for qPCR 试剂盒和 SYBR Green qPCR Master Mix 均购自

南京诺唯赞生物科技股份有限公司。

IVIS Spectrum 小动物活体光学成像系统、PerkinElmer Operetta CLSTM 高内涵成像分析系统均购自 PerkinElmer 公司。

1.4 细菌生长曲线的测定

将 Fn-9 和 Fn-ATCC 菌液的 OD_{600} 值调至 1.0 时, 菌液浓度分别为 5×10^7 CFU/mL 和 1×10^8 CFU/mL。在 24 孔板中加入 2 mL BHI (脑心浸液肉汤)培养基, 并加入 50 μ L 上述调好的菌液。培养 12 h 后取出菌液检测 OD_{600} 值, 之后每隔 2 h 取出孔板中的菌液测量 OD_{600} 值, 直至 36 h 结束。将数据导入 GraphPad Prism 软件中绘制曲线图。

1.5 MTT 细胞增殖实验

每孔培养 2×10^4 个 A549 细胞, 在 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 条件下培养 4 h。在平板中分别加入感染复数(multiplicity of infection, MOI)为 20 或 40 的 Fn-ATCC 或 Fn-9 菌株。细胞与细菌共培养 48 h 后, 使用 MTT 细胞增殖和细胞毒性检测试剂盒检测细胞, 并在酶联免疫测定仪上以 490 nm 波长测量各孔的吸光度值。PBS 用作空白对照。

1.6 Transwell 实验

使用带有 8 μ m 孔径膜的 24 孔 Transwell 小室评估细胞迁移能力。在 Transwell 小室的上室加入 200 μ L A549 细胞悬液, 下室分别加入 800 μ L 含 Fn-9 或 Fn-ATCC 的细菌溶液(细菌重悬于含 10% 胎牛血清的 1640 培养基中, MOI 为 100)、800 μ L 含 10% 胎牛血清的 1640 培养基或 200 μ L 10 μ g/mL 脂多糖溶液以吸引细胞迁移。将 Transwell 小室置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养箱中培养 48 h。随后用 4% 甲醇固定穿透膜的细胞 30 min。随用 0.1% 结晶紫染色 25 min, 最后在显微镜下拍照。通过观察并拍摄每个孔的 5 个随机区域, 统计每个孔中迁移细胞的数量。每个实验设置 4 个技术重复孔。4 孔计数的平均值作为一次生物实验的结果。生物重复实验重复 3 次。

1.7 ELISA 检测炎症因子的表达

用 PMA 试剂刺激 THP-1 细胞 48 h 后, 分别加入 Fn-9 和 Fn-ATCC 2 种菌株的上清液, 继续培养 4 h。按照试剂盒说明书使用 ELISA 试剂盒检测 IL-1 β 和 TNF- α 细胞因子的表达水平。

1.8 动物实验

将 8 周龄雌性 C57BL/6N 小鼠混养 1 周后随机分为 3 组: Fn-ATCC 组、Fn-9 组和 PBS 组。将 LLC-GFP 细胞分别与 Fn-ATCC 和 Fn-9 2 种具核梭杆菌的上清液或 PBS 共同培养 12 h。收集细胞后, 通过经尾静脉将 2.5×10^6 个细胞/只注射到小鼠体内。造模后第 7 天和第 14 天使用小动物微雾化器将 Fn-9、Fn-ATCC 或 PBS 雾化至小鼠支气管分叉处。第 21 天处死小鼠, 提取血清用于细胞因子检测, 利用 IVIS Spectrum 系统检测肺部荧光强度, 并对小鼠肺结节进行计数, 同时收集肺泡灌洗液。

本研究所有动物实验通过军事医学研究院伦理委员会批准, 编号为 IACUC-DWZX-2024-015。

1.9 病理检测

将新鲜肺组织在 4% 多聚甲醛中固定 24 h, 随后将肺组织包埋于石蜡块中, 切成薄片, 经苏木精-伊红染色(HE 染色)后进行肺组织病理学诊断。

1.10 实时定量聚合酶链式反应(qPCR)

提取肺组织总 RNA, 使用逆转录试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA。在 LightCycler 480 II 实时荧光定量 PCR 系统中, 使用 SYBR Green qPCR Master Mix 进行 qPCR 检测。数据以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法表示相对表达量的变化倍数。所用引物序列如表 1 所示。

1.11 小鼠肺泡灌洗液 16S rRNA 基因测序

动物实验结束后, 立即收集小鼠新鲜肺泡灌洗液, 迅速放入 -80°C 冰箱保存。将样本送至北京诺禾致源科技股份有限公司进行 16S rRNA

表1 小鼠炎症因子的引物序列

Table 1 Primer sequences of mouse inflammatory factor

Primers name	Primer sequences (5'→3')
GAPDH-F	CATCACTGCCACCCAGAAGACTG
GAPDH-R	ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTCTAG
IL-1 β -F	GCAACTGTTCTCTGAACCCAACT
IL-1 β -R	AAGTGCATCATCGTTGTTCATACA
IL-6-F	TGTTCTCTGGGAAATCGTGGA
IL-6-R	AAGTGCATCATCGTTGTTCATACA
TNF- α -F	CCCTCACACTCAGATCATCTTCT
TNF- α -R	GCTACGACGTGGGCTACAG

基因测序。

1.12 肺组织转录组测序

将肺组织样本保存于 -80°C 冰箱, 随后送至北京诺禾致源科技股份有限公司进行转录组测序。

1.13 数据分析

对于多组数据的比较, 首先确认每组数据是否符合正态分布及方差齐性。若数据呈正态分布且方差齐性, 则采用单因素方差分析 (analysis of variance, ANOVA) 或双尾非配对 t 检验 (two-tailed unpaired t -test); 若数据不符合正态分布或方差不齐, 则采用 Kruskal-Wallis 检验进行分析。显著性水平设定为 $P < 0.05$ 。所有统计分析均使用 GraphPad Prism 软件 (v9.0.0) 完成。

2 结果与分析

2.1 具核梭杆菌体外促细胞增殖和细胞因子分泌

生长曲线显示, 2 株具核梭杆菌在生长 30 h 后达到平稳期(图 1A), 处于对数期的细菌被用于后续实验。用 2 种菌株感染 A549 细胞 48 h, 与空白对照组相比, 在 MOI=40 和 MOI=20 的条件下, Fn-ATCC 能显著促进 A549 细胞的增殖, 而当 MOI=20 时 Fn-9 和 Fn-ATCC 均能显著促进 A549 细胞的增殖(图 1B)。在 Transwell 实

验中, 当 MOI=100 时与空白对照组相比, 经具核梭杆菌刺激后的 A549 细胞过膜数量显著增加(图 1C、1D)。

THP-1 细胞经 2 株菌株的培养上清刺激后, 细胞分泌的 TNF- α 与对照组(大肠杆菌 DH5 α 刺激组)相比显著增加(图 1E), 而 IL-1 β 的分泌量差异无统计学意义(图 1F)。这些结果表明, 在体外实验中具核梭杆菌可促进肺上皮细胞的增

殖和转移, 并刺激免疫细胞分泌细胞因子。

2.2 具核梭杆菌促进小鼠肺癌转移

采用 C57 小鼠进行尾静脉注射造模实验, 通过肺部递送 2 种具核梭杆菌或 PBS (图 2A)。造模成功后收集 3 组小鼠的肺组织, 并使用 IVIS Spectrum 系统进行拍照(图 2B)。结果显示, Fn-9 组和 Fn-ATCC 组肺组织的荧光强度显著高于 PBS 组(图 2C)。统计肺结节数量发现, Fn-9

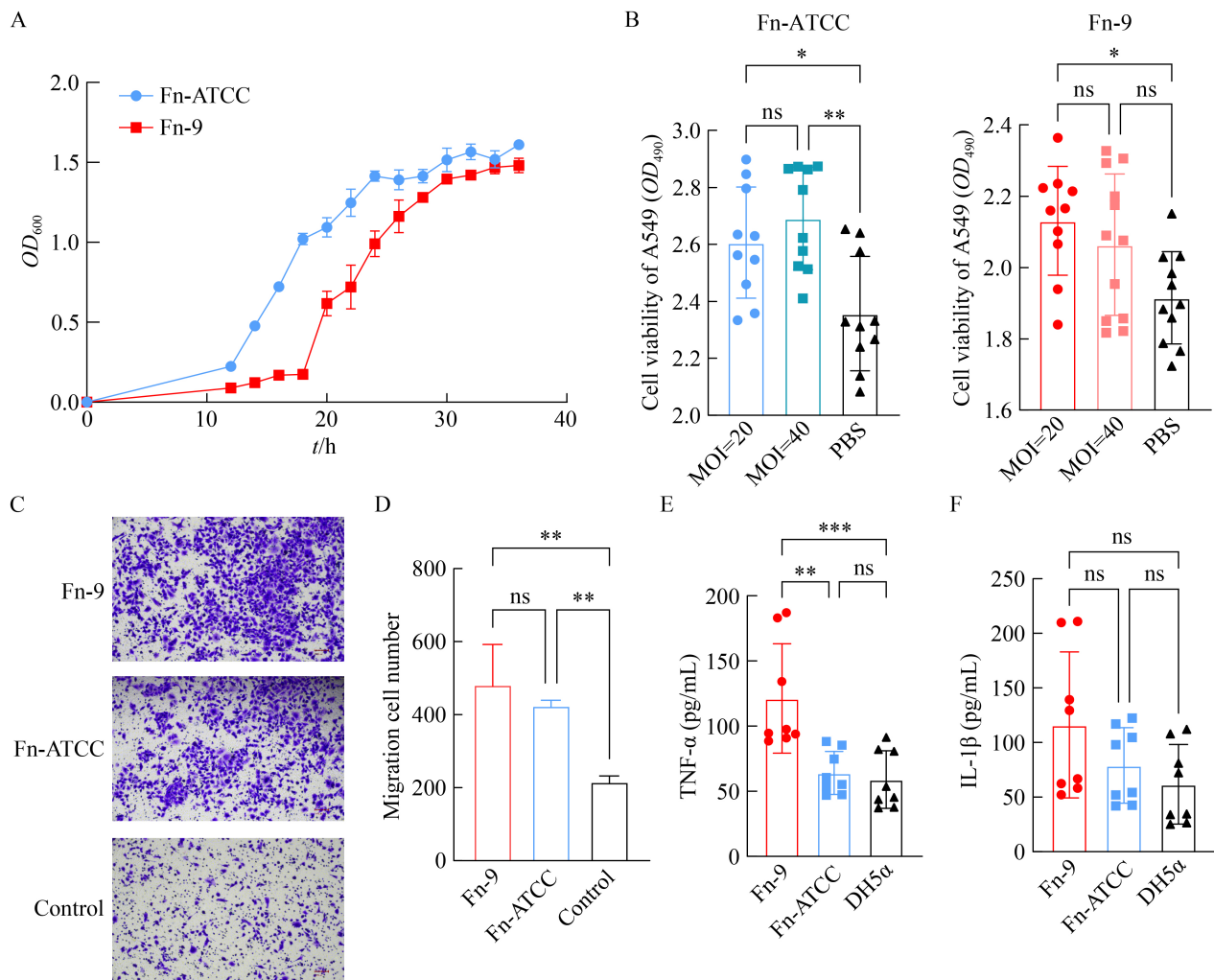


图1 具核梭杆菌促进A549细胞的增殖和转移。A: 2株菌株的生长曲线; B: MTT实验检测细胞增殖; C、D: Transwell实验检测细胞转移; E、F: 2种菌株与大肠杆菌DH5 α 的促炎能力比较。

Figure 1 *Fusobacterium nucleatum* promotes proliferation and metastasis of A549 cells. A: Growth curves of two strains of *F. nucleatum*; B: MTT assay of cell proliferation; C, D: Transwell assay of cell transfer; E, F: Comparison of the pro-inflammatory capacity of two strains of *F. nucleatum* and *Escherichia coli* DH5 α . ns: Not statistically significant; *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$. Data are expressed as mean $\pm$ SD.

组和 Fn-ATCC 组的数量显著高于对照组(图 2D)。同时, 2 组的肺器官系数也均高于 PBS 组(图 2E)。这些结果表明, 具核梭杆菌可能促进了肿瘤细胞的增殖与转移。

为了进一步了解 3 组小鼠的肺损伤情况, 对肺切片进行了 HE 染色分析。病理结果显示, 3 组小鼠的肺部均有炎症细胞浸润, 但 Fn-9 组和 Fn-ATCC 组的肺泡间隔破坏更为严重, 部分气道黏膜上皮也出现萎缩(图 3A)。值得注意的是, 2 组的肺肿瘤面积明显增大, 肺结节数量明显增多(图 3A)。同样地, qPCR 检测 3 组小鼠肺组织中炎症因子的表达发现, Fn-9 组

和 Fn-ATCC 组的 IL-1 β 和 TNF- α 表达量更高(图 3B、3C), 而 IL-6 的表达在 3 组之间无显著差异(图 3D)。综上所述, 在动物水平上证明了具核梭杆菌促进了肺癌的转移和进展。

2.3 具核梭杆菌对小鼠肺部微生物群的影响

收集上述各组及正常小鼠的肺泡灌洗液, 探讨具核梭杆菌对肺微生物群的影响。在属水平, Fn-9 组和 Fn-ATCC 组细菌组成明显不同于 PBS 组(图 4A)。Chao1 指数表明, Fn-9 组的 α 多样性显著高于空白组(图 4B)。然而, 4 组间的 β 多样性无显著差异(图 4C)。MetagenomeSeq 分

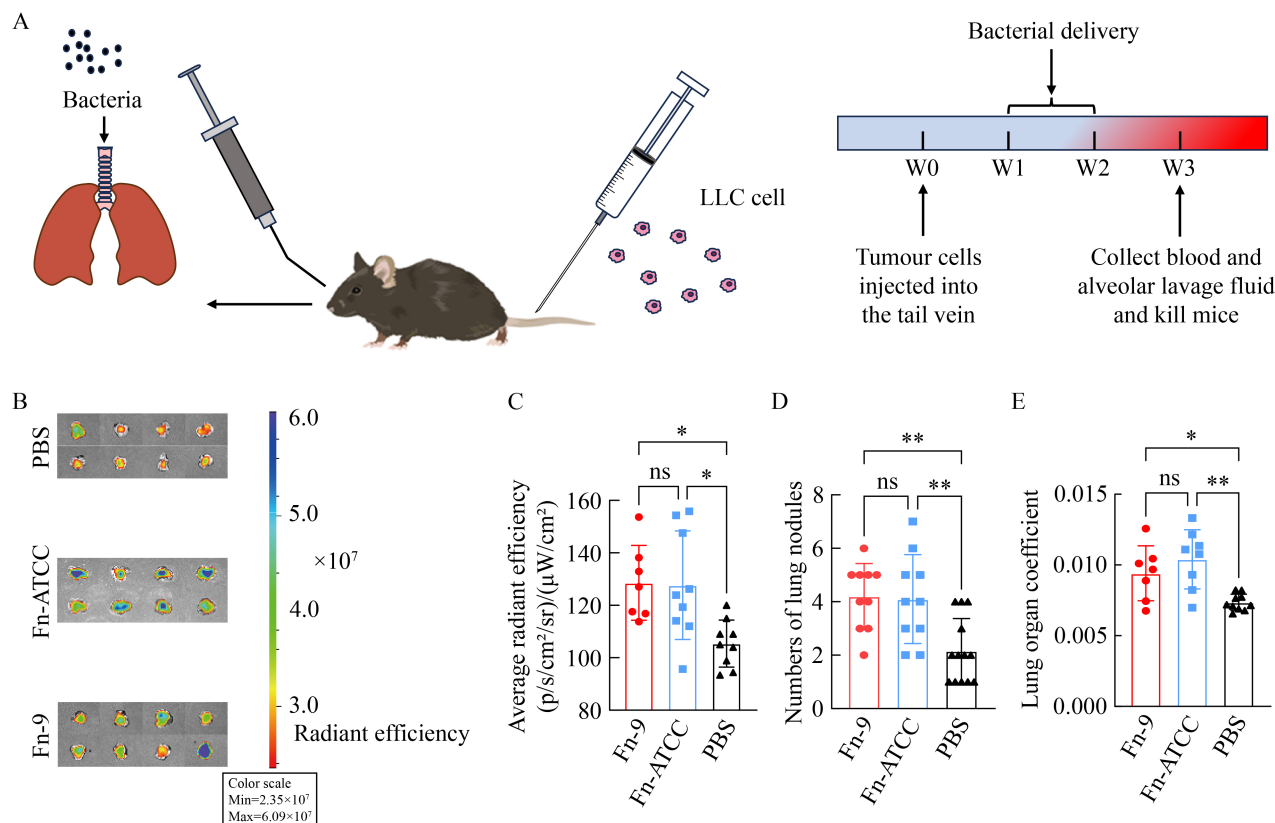


图2 具核梭杆菌促进小鼠肺癌转移。A: 实验流程图; B、C: Fn-9、Fn-ATCC和PBS 3组荧光强度比较; D、E: 3组肺结节数量和肺器官系数。

Figure 2 *Fusobacterium nucleatum* promotes lung cancer metastasis in mice. A: The experimental flow graph; B, C: Comparison of fluorescence intensity among three groups of Fn-9, Fn-ATCC and PBS; D, E: Number of lung nodules and lung organ coefficients in three groups. ns: Not statistically significant; *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$. Data are expressed as mean $\pm$ SD.

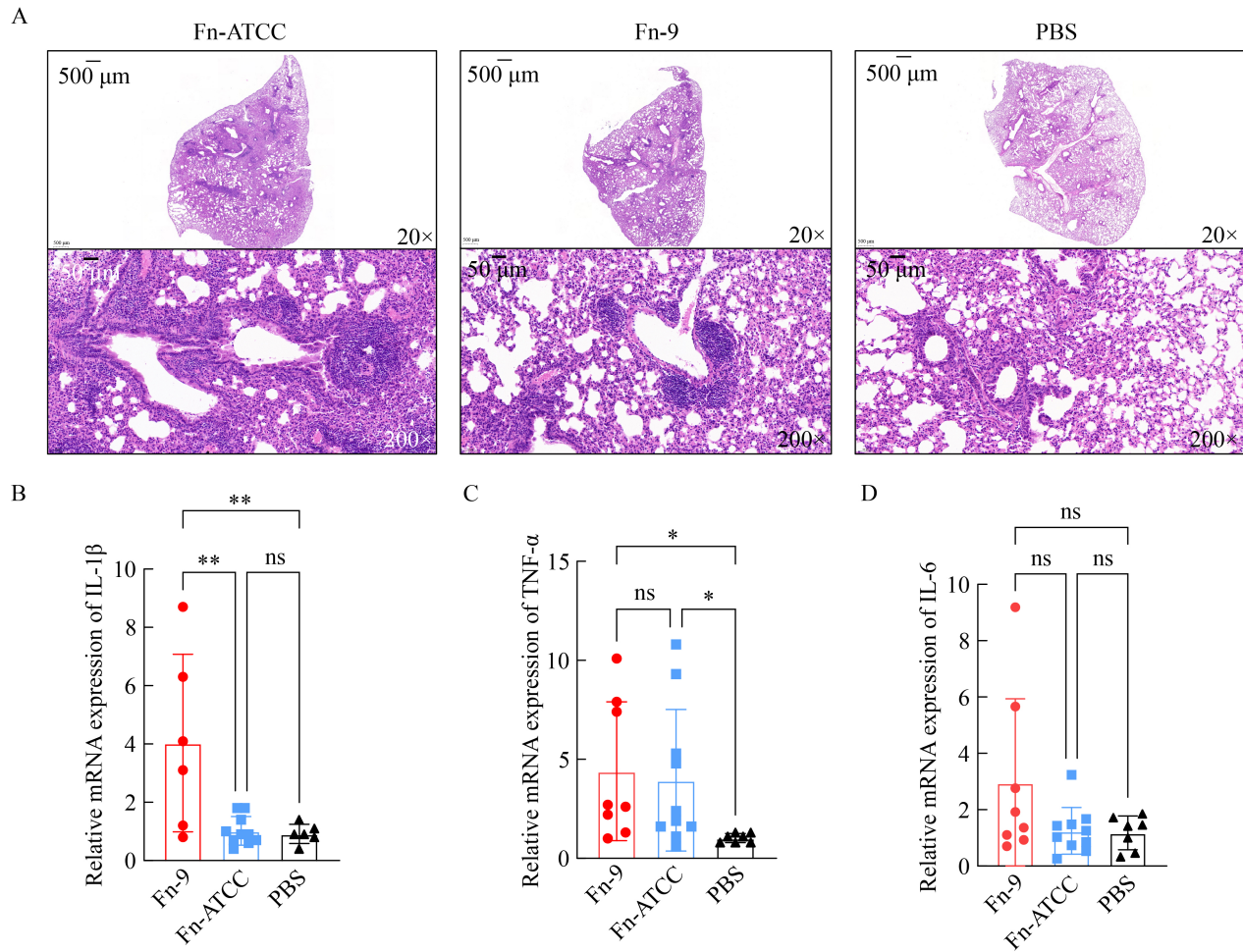


图3 病理切片图和定量聚合酶链反应(qPCR)。A: Fn-9、Fn-ATCC和PBS 3组肺组织切片; B-D: IL-1 β 、TNF- α 和IL-6在小鼠肺组织中的表达(ns: 无统计学意义; *: $P<0.05$; **: $P<0.01$ 。数据以平均值 $\pm$ SD表示)。

Figure 3 Pathologic section diagrams and quantitative polymerase chain reaction (qPCR). A: Lung tissue sections of three groups of Fn-9, Fn-ATCC, and PBS; B-D: Expression of IL-1 β , TNF- α , and IL-6 in mouse lung tissue. ns: Not statistically significant; *: $P<0.05$; **: $P<0.01$. Data are expressed as mean $\pm$ SD.

析显示, Fn-9 组和 Fn-ATCC 组中 *Muribaculum* 的丰度显著低于 PBS 组, 而 Fn-9 组中 *Simplicispira* 的丰度显著高于 PBS 组(图 4D)。

2.4 肺组织转录组分析

转录组测序用于描述肺组织变化的特征。主成分分析(principal components analysis, PCA)结果显示, Fn-9 组、Fn-ATCC 组和 PBS 组的转录组基因存在显著差异(图 5A)。进一步通过火

山图比较其差异基因的变化, 发现与 PBS 组相比, Fn-ATCC 组共有 1 855 个差异基因表达上调, 1 185 个差异基因表达下调(图 5B); 而在 Fn-9 组与 PBS 组的比较中, Fn-9 组共有 864 个差异基因表达上调, 640 个差异基因表达下调(图 5C)。随后, 分析了 3 组小鼠肺组织中 KEGG 通路差异基因的富集情况。在 Fn-9 组、Fn-ATCC 组和 PBS 组的比较中, 差异基因主要富集在 IL-17 信号通路、细胞因子-细胞因子受

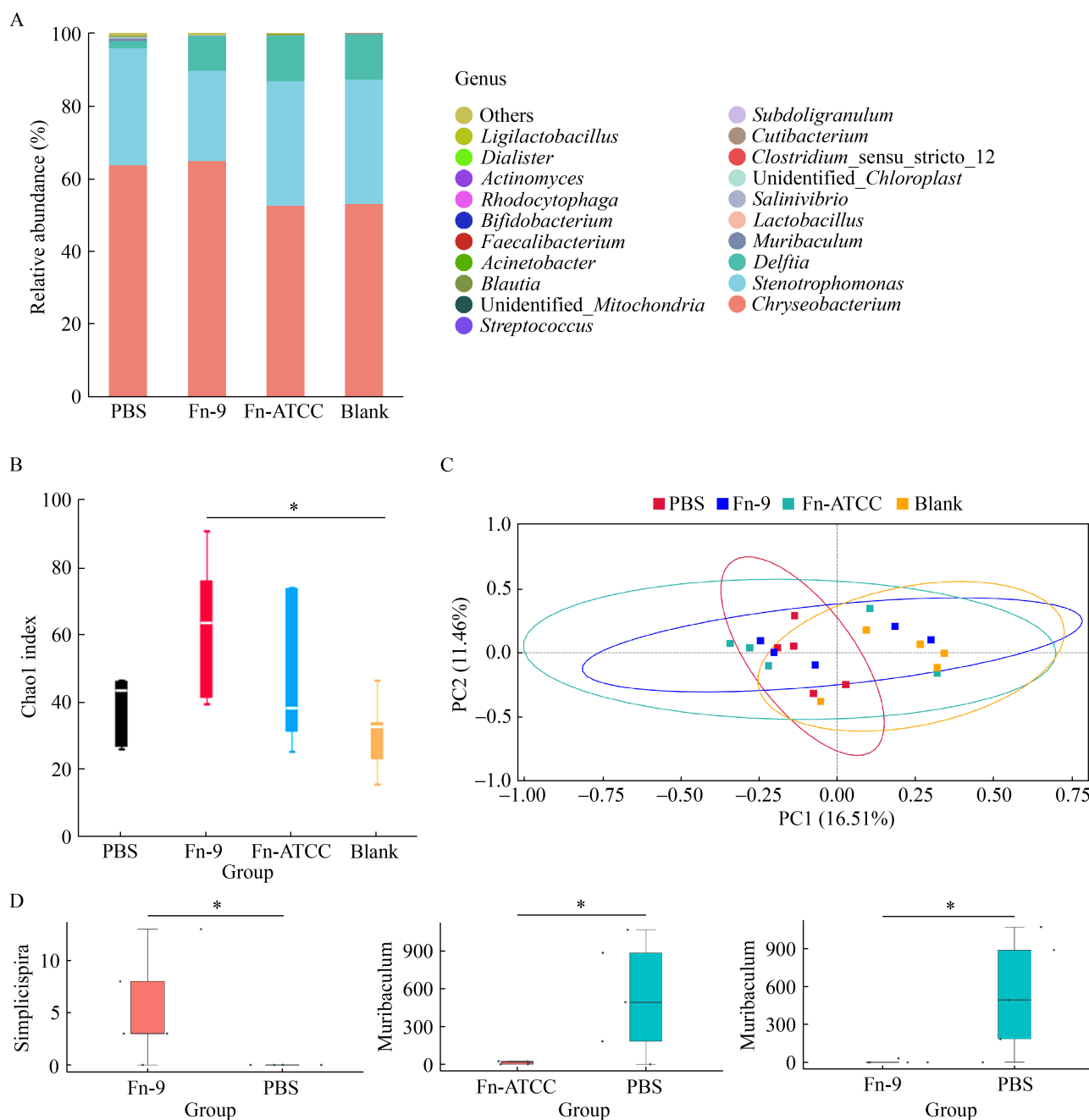


图4 具核梭杆菌对肺部微生物群的影响。A: 4组菌属水平前20个丰度的群落条形图; B: 4组肺泡灌洗液的Chao1指数(P 值通过Kruskal-Wallis检验计算, *: $P < 0.05$); C: 4组肺泡灌洗液的PCoA图(ANOSIM用于统计评估显著差异); D: MetagenomeSeq检测4组之间的差异物种(*: $P < 0.05$)。

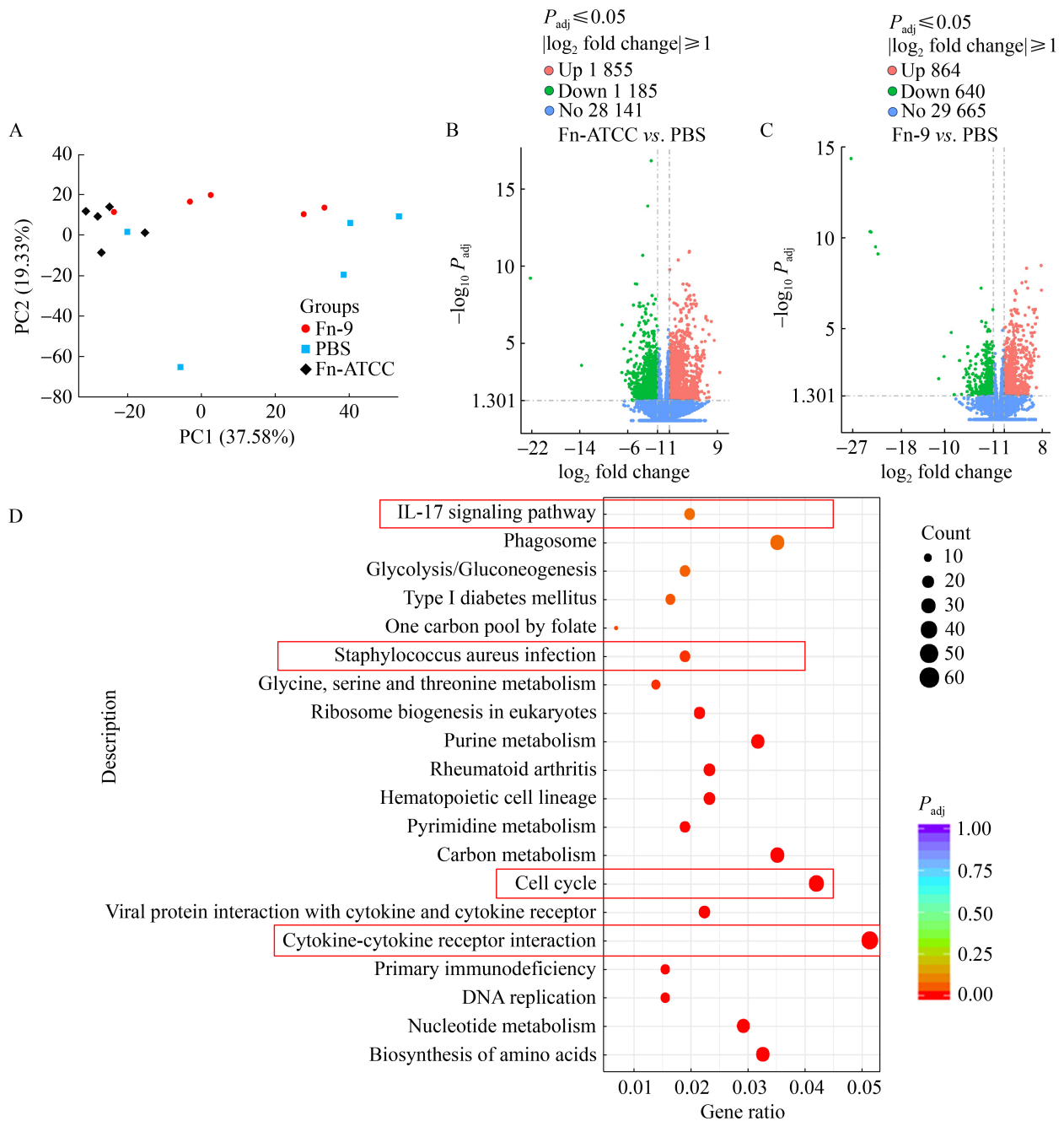
Figure 4 Effect of *Fusobacterium nucleatum* on the lung microbiota. A: Community bar plots for the top 20 abundant genera in level for the four groups; B: Chao1 index of the four groups of alveolar lavage fluid (P -value calculated by Kruskal-Wallis test, *: $P < 0.05$); C: PCoA plots of the four groups of alveolar lavage fluid (ANOSIM was used to statistically evaluate significant differences); D: MetagenomeSeq detects differential species between the four groups (*: $P < 0.05$).

体相互作用、细胞周期和运动蛋白等信号通路上, 这提示 Fn-9 组和 Fn-ATCC 组 2 种菌株可能通过调节免疫反应来促进肺癌的进展(图 5D、5E)。

3 讨论与结论

传统上, 肺一直被认为是一个无菌器官, 随着分子测序技术的发展证实肺中实际上存在

少量微生物, 这可能是由于口腔、上呼吸道、下呼吸道和肺直接接触导致呼吸道或口腔中的微生物进入呼吸道并在肺中定殖^[12-14]。根据目前的理论, 大多数微生物通过上呼吸道以及微量吸入的方式进入肺部^[14-16]。相比之下, 某些微生物已被证实会增加患肺癌的风险^[17]。作为口腔中常见的条件致病菌, 具核梭杆菌已被证



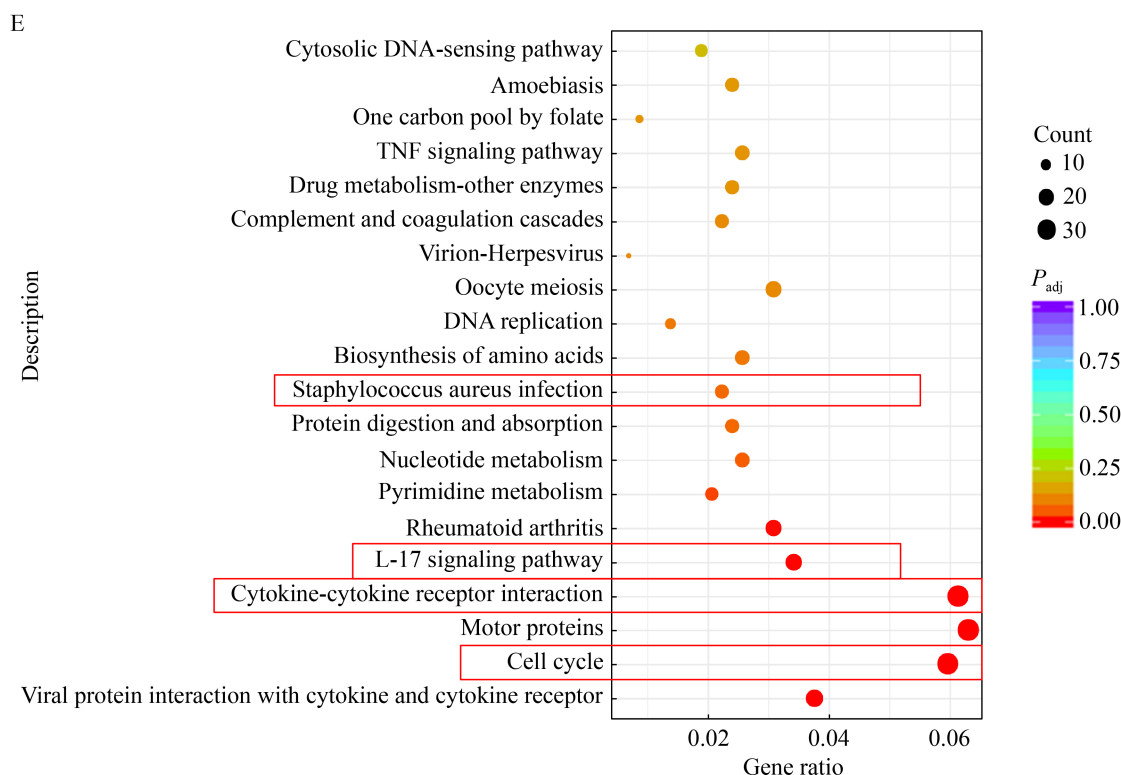


图5 感染后肺癌组织的转录组。A: 3组样本间的主成分分析; B、C: 差异基因表达分析的火山图; D: Fn-ATCC与PBS之间RNA-seq数据中差异基因的KEGG通路富集分析; E: Fn-9与PBS之间RNA-seq数据中差异基因的KEGG通路富集分析。

Figure 5 Transcriptome of infected lung cancer tissues. A: Principal component analysis between three groups of samples; B, C: Volcano plots of differential gene expression analysis; D: KEGG pathway enrichment analysis of differential genes in RNA-seq data between Fn-ATCC and PBS; E: KEGG pathway enrichment analysis of differential genes in RNA-seq data between Fn-9 and PBS.

明与多种疾病相关^[18-20]。具核梭杆菌与牙龈卟啉单胞菌协同作用可诱发牙周炎,并促进口腔癌的发展^[4,21-22]。除口腔疾病外,研究人员还在结直肠癌患者的组织中检测到高丰度的具核梭杆菌^[23-24],并进一步证实具核梭杆菌对结直肠癌有促进作用^[6,25]。从作用机制上看,具核梭杆菌能激活 *Apc*^{min/+} 小鼠的 NF- κ B 信号通路,并诱导 TNF、IL-6、IL-8 和 IL-1 β 等促癌通路^[8,26]。然而,目前尚无直接证据表明具核梭杆菌与肺癌有关。

本研究首先选择了 2 种不同来源的具核梭杆菌菌株:一种是 ATCC 25586 标准菌株,另一

种是从肺癌患者肺泡灌洗液中提取的具核梭杆菌动物亚种。与其他亚种相比,动物亚种具核梭杆菌在结直肠癌生态区域中占主导地位^[27]。在动物实验中,发现向小鼠肺部递送具核梭杆菌可促进肺结节数量的增加,并且实验组的肺组织在荧光成像下比对照组的荧光强度更强。通过 qPCR 检测发现,小鼠肺组织中 TNF- α 和 IL-1 β 基因的表达显著增加。研究也表明, TNF- α 在肺癌的上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)、侵袭、转移和进展过程中起着重要作用,这在 TNFR2-KO 小鼠植入 Lewis 肺癌(LLC)模型中也得到了证实^[28-29]。IL-1 β 也被

证实在肿瘤微环境中的表达升高,并在肺癌的转移发展中发挥重要作用^[30-31]。

根据肺泡灌洗液的 16S rRNA 基因测序结果,在实验组和 PBS 组之间发现了 2 个不同的属:简单螺旋形菌属(*Simplicispira*)和鼠杆状菌属(*Muribaculum*)。简单螺旋形菌属是一种常见于土壤、水库和污泥中的细菌,尚未见与癌症相关的报道^[32-33]。鼠杆状菌属与肠道微生物群中的脂质代谢以及结直肠癌中的肠道微生物菌群失调有关^[34-35]。肺组织转录组 KEGG 结果表明,具核梭杆菌可能通过免疫相关信号通路促进肺癌转移。细胞因子-细胞因子受体相互作用通路与肿瘤密切相关,研究证实齐墩果酸可通过调节细胞因子-细胞因子受体相互作用通路来调控乳酸菌抑制肿瘤的发展,TRIM6 也通过该通路促进胶质瘤的发展^[36-37]。同样地,TNF 信号通路也参与了细胞凋亡及其对癌症疾病的影响^[38-39]。具核梭杆菌进入小鼠肺部后,激活了金黄色葡萄球菌感染途径,而金黄色葡萄球菌具有很强的促炎能力,能引起肺炎等疾病^[40-41]。肺部炎症会诱发肺部微环境的改变,从而导致肺癌病变^[42]。此外,尽管在结直肠癌研究中已显示具核梭杆菌能够进入肠上皮细胞发挥作用,但对于具核梭杆菌是否能进入肺上皮细胞尚无相关报道,这也是后续机制研究的方向之一。

综上所述,通过细胞实验验证了具核梭杆菌能促进 A549 细胞的增殖和转移,并通过体内实验进一步验证了它能促进肺癌的转移和恶化。根据 16S rRNA 基因测序结果和肺组织转录组结果,具核梭杆菌进入小鼠肺部后扰乱了肺部菌群的组成,激活了肺组织中多个与炎症和免疫相关的信号通路,这可能是具核梭杆菌促进肺癌的潜在机制。

作者贡献声明

李东:进行实验和撰写文章;童江辉:进行实验和数据分析;李奕彤:进行实验;孙一凡:数据分析;李俭杰:样本收集和数据分析;

王子平:文章编辑与修改;谭亚芳:实验设计与统筹;杨瑞馥:实验设计与文章审阅;毕玉晶:实验设计与文章撰写。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] HIRSCH FR, SCAGLIOTTI GV, MULSHINE JL, KWON R, CURRAN WJ, WU YL, PAZ-ARES L. Lung cancer: current therapies and new targeted treatments[J]. *The Lancet*, 2017, 389(10066): 299-311.
- [2] BADE BC, DELA CRUZ CS. Lung cancer 2020: epidemiology, etiology, and prevention[J]. *Clinics in Chest Medicine*, 2020, 41(1): 1-24.
- [3] MOURONTE-ROIBÁS C, LEIRO-FERNÁNDEZ V, FERNÁNDEZ-VILLAR A, BOTANA-RIAL M, RAMOS-HERNÁNDEZ C, RUANO-RAVINA A. COPD, emphysema and the onset of lung cancer: a systematic review[J]. *Cancer Letters*, 2016, 382(2): 240-244.
- [4] SOCRANSKY SS, HAJFAJEE AD, CUGINI MA, SMITH C, KENT RL JR. Microbial complexes in subgingival plaque[J]. *Journal of Clinical Periodontology*, 1998, 25(2): 134-144.
- [5] LAMONT RJ, KOO H, HAJISHENGALLIS G. The oral microbiota: dynamic communities and host interactions[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2018, 16(12): 745-759.
- [6] CASTELLARIN M, WARREN RL, FREEMAN JD, DREOLINI L, KRZYWINSKI M, STRAUSS J, BARNES R, WATSON P, ALLEN-VERCOE E, MOORE RA, HOLT RA. *Fusobacterium nucleatum* infection is prevalent in human colorectal carcinoma[J]. *Genome Research*, 2012, 22(2): 299-306.
- [7] OU SW, WANG HF, TAO YB, LUO KJ, YE JH, RAN SL, GUAN ZL, WANG Y, HU HQ, HUANG R. *Fusobacterium nucleatum* and colorectal cancer: from phenomenon to mechanism[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2022, 12: 1020583.
- [8] KOSTIC AD, CHUN E, ROBERTSON L, GLICKMAN JN, GALLINI CA, MICHAUD M, CLANCY TE, CHUNG DC, LOCHHEAD P, HOLD GL, EL-OMAR EM, BRENNER D, FUCHS CS, MEYERSON M, GARRETT WS. *Fusobacterium nucleatum* potentiates intestinal tumorigenesis and modulates the tumor-immune microenvironment[J]. *Cell Host & Microbe*, 2013, 14(2): 207-215.
- [9] SUN YE, LIU YJ, LI JJ, TAN YE, AN TT, ZHUO ML, PAN ZY, MA ML, JIA B, ZHANG HW, WANG ZP, YANG RF, BI YJ. Characterization of lung and oral microbiomes in lung cancer patients using culturomics and 16S rRNA gene sequencing[J]. *Microbiology Spectrum*, 2023, 11(3): e0031423.

- [10] ZHANG K, HE C, QIU Y, LI XY, HU J, FU BP. Association of oral microbiota and periodontal disease with lung cancer: a systematic review and meta-analysis[J]. *Journal of Evidence-Based Dental Practice*, 2023, 23(3): 101897.
- [11] TELES FF, ALAWI F, CASTILHO RM, WANG Y. Association or causation exploring the oral microbiome and cancer links[J]. *Journal of Dental Research*, 2020, 99(13): 1411-1424.
- [12] CHARLSON ES, BITTINGER K, HAAS AR, FITZGERALD AS, FRANK I, YADAV A, BUSHMAN FD, COLLMAN RG. Topographical continuity of bacterial populations in the healthy human respiratory tract[J]. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2011, 184(8): 957-963.
- [13] MAMMEN MJ, SCANNAPIECO FA, SETHI S. Oral-lung microbiome interactions in lung diseases[J]. *Periodontology* 2000, 2020, 83(1): 234-241.
- [14] DICKSON RP, ERB-DOWNWARD JR, FREEMAN CM, McCLOSKEY L, BECK JM, HUFFNAGLE GB, CURTIS JL. Spatial variation in the healthy human lung microbiome and the adapted island model of lung biogeography[J]. *Annals of the American Thoracic Society*, 2015, 12(6): 821-830.
- [15] MORRIS A, BECK JM, SCHLOSS PD, CAMPBELL TB, CROTHERS K, CURTIS JL, FLORES SC, FONTENOT AP, GHEDIN E, HUANG L, JABLONSKI K, KLEERUP E, LYNCH SV, SODERGREN E, TWIGG H, YOUNG VB, BASSIS CM, VENKATARAMAN A, SCHMIDT TM, WEINSTOCK GM, et al. Comparison of the respiratory microbiome in healthy nonsmokers and smokers[J]. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2013, 187(10): 1067-1075.
- [16] GLEESON K, MAXWELL SL, EGGLI DF. Quantitative aspiration during sleep in normal subjects[J]. *Chest*, 1997, 111(5): 1266-1272.
- [17] KOVALEVA OV, ROMASHIN D, ZBOROVSKAYA IB, DAVYDOV MM, SHOGENOV MS, GRATCHEV A. Human lung microbiome on the way to cancer[J]. *Journal of Immunology Research*, 2019, 2019: 1394191.
- [18] KOSTIC AD, GEVERS D, PEDAMALLU CS, MICHAUD M, DUKE F, EARL AM, OJESINA AI, JUNG J, BASS AJ, TABERNERO J, BASELGA J, LIU C, SHIVDASANI RA, OGINO S, BIRREN BW, HUTTENHOWER C, GARRETT WS, MEYERSON M. Genomic analysis identifies association of *Fusobacterium* with colorectal carcinoma[J]. *Genome Research*, 2012, 22(2): 292-298.
- [19] BULLMAN S, PEDAMALLU CS, SICINSKA E, CLANCY TE, ZHANG XY, CAI DA, NEUBERG D, HUANG K, GUEVARA F, NELSON T, CHIPASHVILI O, HAGAN T, WALKER M, RAMACHANDRAN A, DIOSDADO B, SERNA G, MULET N, LANDOLFI S, CAJAL SRY, FASANI R, et al. Analysis of *Fusobacterium* persistence and antibiotic response in colorectal cancer[J]. *Science*, 2017, 358(6369): 1443-1448.
- [20] McILVANNA E, LINDEN GJ, CRAIG SG, LUNDY FT, JAMES JA. *Fusobacterium nucleatum* and oral cancer: a critical review[J]. *BMC Cancer*, 2021, 21(1): 1212.
- [21] CHEN G, GAO CN, JIANG S, CAI QL, LI RR, SUN Q, XIAO C, XU YB, WU BL, ZHOU HW. *Fusobacterium nucleatum* outer membrane vesicles activate autophagy to promote oral cancer metastasis[J]. *Journal of Advanced Research*, 2024, 56: 167-179.
- [22] STASIEWICZ M, KARPIŃSKI TM. The oral microbiota and its role in carcinogenesis[J]. *Seminars in Cancer Biology*, 2022, 86: 633-642.
- [23] ALON-MAIMON T, MANDELBOIM O, BACHRACH G. *Fusobacterium nucleatum* and cancer[J]. *Periodontology* 2000, 2022, 89(1): 166-180.
- [24] LIU H, LIU YX, FAN W, FAN B. *Fusobacterium nucleatum* triggers proinflammatory cell death via Z-DNA binding protein 1 in apical periodontitis[J]. *Cell Communication and Signaling*, 2022, 20(1): 196.
- [25] WANG N, FANG JY. *Fusobacterium nucleatum*, a key pathogenic factor and microbial biomarker for colorectal cancer[J]. *Trends in Microbiology*, 2023, 31(2): 159-172.
- [26] SU LK, KINZLER KW, VOGELSTEIN B, PREISINGER AC, MOSER AR, LUONGO C, GOULD KA, DOVE WF. Multiple intestinal neoplasia caused by a mutation in the murine homolog of the APC gene[J]. *Science*, 1992, 256(5057): 668-670.
- [27] ZEPEDA-RIVERA M, MINOT SS, BOUZEK H, WU HR, BLANCO-MÍGUEZ A, MANGHI P, JONES DS, LaCOURSE KD, WU Y, McMAHON EF, PARK SN, LIM YK, KEMPCHINSKY AG, WILLIS AD, COTTON SL, YOST SC, SICINSKA E, KOOK JK, DEWHIRST FE, SEGATA N, et al. A distinct *Fusobacterium nucleatum* clade dominates the colorectal cancer niche[J]. *Nature*, 2024, 628(8007): 424-432.
- [28] SHANG GS, LIU LX, QIN YW. IL-6 and TNF- α promote metastasis of lung cancer by inducing epithelial-mesenchymal transition[J]. *Oncology Letters*, 2017, 13(6): 4657-4660.
- [29] SASI SP, BAE S, SONG J, PEREPLETCHIKOV A, SCHNEIDER D, CARROZZA J, YAN XH, KISHORE R, ENDERLING H, GOUKASSIAN DA. Therapeutic non-toxic doses of TNF induce significant regression in TNFR2-p75 knockdown Lewis lung carcinoma tumor implants[J]. *PLoS One*, 2014, 9(3): e92373.
- [30] RIDKER PM, MacFADYEN JG, THUREN T, EVERETT BM, LIBBY P, GLYNN RJ, RIDKER P, LORENZATTI A, KRUM H, VARIGOS J, SIOSTRZONEK P, SINNAEVE P, FONSECA F, NICOLAU J, GOTCHEVA N, GENEST J, YONG H, URINA-TRIANA M, MILICIC D, CIFKOVA R, et al. Effect of interleukin-1 β inhibition with canakinumab on incident lung cancer in patients with atherosclerosis: exploratory results from a randomised, double-blind, placebo-controlled trial[J]. *The Lancet*, 2017, 390(10105): 1833-1842.
- [31] NAWAS AF, SOLMONSON A, GAO BN, DeBERARDINIS RJ, MINNA JD, CONACCI-SORRELL M, MENDELSON CR. IL-1 β mediates the induction of immune checkpoint regulators IDO1 and PD-L1 in lung adenocarcinoma cells[J]. *Cell Communication and Signaling*, 2023, 21(1): 331.
- [32] SHI YL, SUN Y, JIANG ZM, RUAN ZY, SU J, YU LY,

- ZHANG YQ. *Simplicispira lacusdiani* sp. nov., a novel betaproteobacterium isolated from a freshwater reservoir[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2019, 69(1): 129-133.
- [33] LU SP, RYU SH, CHUNG BS, CHUNG YR, PARK W, JEON CO. *Simplicispira limi* sp. nov., isolated from activated sludge[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2007, 57(Pt 1): 31-34.
- [34] XU HT, FANG F, WU KZ, SONG JP, LI YQ, LU XY, LIU JC, ZHOU LY, YU WQ, YU F, GAO J. Gut microbiota-bile acid crosstalk regulates murine lipid metabolism *via* the intestinal FXR-FGF19 axis in diet-induced humanized dyslipidemia[J]. Microbiome, 2023, 11(1): 262.
- [35] YU H, LI XX, HAN X, CHEN BX, ZHANG XH, GAO S, XU DQ, WANG Y, GAO ZK, YU L, ZHU SL, YAO LC, LIU GR, LIU SL, MU XQ. Fecal microbiota transplantation inhibits colorectal cancer progression: reversing intestinal microbial dysbiosis to enhance anti-cancer immune responses[J]. Frontiers in Microbiology, 2023, 14: 1126808.
- [36] HE K, MENG X, SU JX, JIANG SQ, CHU M, HUANG B. Oleanolic acid inhibits the tumor progression by regulating *Lactobacillus* through the cytokine-cytokine receptor interaction pathway in 4T1-induced mice breast cancer model[J]. Heliyon, 2024, 10(5): e27028.
- [37] GUO JR, FENG SC, LIU H, CHEN ZP, DING C, JIN YK, CHEN XJ, LING YD, ZENG Y, LONG H, QIU HB. TRIM6: an upregulated biomarker with prognostic significance and immune correlations in gliomas[J]. Biomolecules, 2023, 13(9): 1298.
- [38] DING F, LUO X, TU YT, DUAN XL, LIU J, JIA LJ, ZHENG PL. Alpk1 sensitizes pancreatic beta cells to cytokine-induced apoptosis *via* upregulating TNF- α signaling pathway[J]. Frontiers in Immunology, 2021, 12: 705751.
- [39] WANG QR, HUANG QY, YING XW, ZHOU Y, DUAN SW. Exploring the regulatory role of tsRNAs in the TNF signaling pathway: implications for cancer and non-cancer diseases[J]. Progress in Biophysics and Molecular Biology, 2024, 191: 1-10.
- [40] LUDWIG N, THÖRNER-VAN ALMSICK J, MERSMANN S, BARDEL B, NIEMANN S, CHASAN AI, SCHÄFERS M, MARGRAF A, ROSSAINT J, KAHL BC, ZARBOCK A, BLOCK H. Nuclease activity and protein A release of *Staphylococcus aureus* clinical isolates determine the virulence in a murine model of acute lung infection[J]. Frontiers in Immunology, 2023, 14: 1259004.
- [41] MIRZAEI R, MOHAMMADZADEH R, MIRZAEI H, SHOLEH M, KARAMPOOR S, ABDI M, ALIKHANI MY, KAZEMI S, AHMADYOUSEFI Y, JALALIFAR S, YOUSEFIMASHOUF R. Role of microRNAs in *Staphylococcus aureus* infection: potential biomarkers and mechanism[J]. IUBMB Life, 2020, 72(9): 1856-1869.
- [42] ALTORKI NK, MARKOWITZ GJ, GAO DC, PORT JL, SAXENA A, STILES B, MCGRAW T, MITTAL V. The lung microenvironment: an important regulator of tumour growth and metastasis[J]. Nature Reviews Cancer, 2018, 19(1): 9-31.