



# 具核梭杆菌对结直肠癌细胞增殖、迁移及上皮间质转化作用的影响

张旭强<sup>1,2</sup>, 郭斌梅<sup>1,2</sup>, 陈苛蒙<sup>1,2</sup>, 李竺婷<sup>1,2</sup>, 范若辰<sup>3</sup>, 金黎明<sup>1,2</sup>, 王豫鑫<sup>1,2</sup>, 权春善<sup>1,2\*</sup>

1 大连民族大学生物技术与资源利用教育部重点实验室, 辽宁 大连 116600

2 大连民族大学生命科学学院, 辽宁 大连 116600

3 大连理工大学生物工程学院, 辽宁 大连 116024

张旭强, 郭斌梅, 陈苛蒙, 李竺婷, 范若辰, 金黎明, 王豫鑫, 权春善. 具核梭杆菌对结直肠癌细胞增殖、迁移及上皮间质转化作用的影响. 微生物学报, 2022, 62(12): 4841–4853.

Zhang Xuqiang, Guo Binmei, Chen Kemeng, Li Zhuting, Fan Ruochen, Jin Liming, Wang Yuxin, Quan Chunshan. Effect of *Fusobacterium nucleatum* on proliferation, migration and epithelial-to-mesenchymal transition of colorectal cancer cells. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(12): 4841–4853.

**摘要:** 【目的】评估具核梭杆菌对人结直肠癌细胞 HCT116 和人正常结肠上皮细胞 HCoEpiC 的增殖、黏附、凋亡、迁移、侵袭和上皮间质转化的影响。【方法】本研究用不同感染复数(MOI) *Fusobacterium nucleatum* ATCC 23726 感染人结直肠癌细胞 HCT116 和人正常结肠上皮细胞 HCoEpiC, 建立感染模型; 用 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT]、平板克隆、细胞划痕及侵袭(transwell)实验检测两组细胞的增殖、迁移和侵袭的变化; 用流式细胞仪检测两组细胞凋亡情况; 通过 Western blotting 检测两组细胞上皮标记物上皮细胞钙黏蛋白(E-cadherin)、Catenin  $\delta$ -1 蛋白、间充质标记物 N-钙粘蛋白(N-cadherin)和波形蛋白(vimentin)表达水平的变化。【结果】*F. nucleatum* 可促进 HCT116 细胞增殖, 诱导 HCT116 细胞的迁移和侵袭, 但不能引起细胞凋亡; 可抑制 HCoEpiC 细胞的增殖、迁移和侵袭, 并加速其凋亡; 对 HCT116 和 HCoEpiC 细胞表现出很强的粘附能力, 致细胞分散和拉长, 细胞间粘附减少; 使 HCT116 和 HCoEpiC 细胞上皮标记物 E-cadherin 与 Catenin  $\delta$ -1 的表达量减少, 间充质标记物 N-cadherin 与 vimentin 的表达量上升, E-cadherin 由细胞膜向细胞质转移。【结论】*F. nucleatum*

基金项目: 辽宁省自然科学基金民族创新联合基金(2020-MZLH-07)

Supported by the Innovation Joint Fund of Natural Science Foundation of Liaoning Province (2020-MZLH-07)

\*Corresponding author. Tel: +86-411-87656219; E-mail: mikyeken@dlnu.edu.cn

Received: 27 March 2022; Revised: 21 June 2022; Published online: 15 July 2022

可诱导结直肠癌细胞和人正常结肠上皮细胞发生上皮间质转化, 但抑制人正常结肠细胞的增殖、迁移和侵袭, 表现出与结直肠癌细胞相反的作用。

**关键词:** 具核梭杆菌; 结直肠癌; 增殖; 迁移; 上皮间质化

## Effect of *Fusobacterium nucleatum* on proliferation, migration and epithelial-to-mesenchymal transition of colorectal cancer cells

ZHANG Xuqiang<sup>1,2</sup>, GUO Binmei<sup>1,2</sup>, CHEN Kemeng<sup>1,2</sup>, LI Zhuting<sup>1,2</sup>, FAN Ruochen<sup>3</sup>, JIN Liming<sup>1,2</sup>, WANG Yuxin<sup>1,2</sup>, QUAN Chunshan<sup>1,2\*</sup>

1 Key Laboratory of Biotechnology and Bioresources Utilization, Ministry of Education, Dalian Minzu University, Dalian 116600, Liaoning, China

2 School of Life Sciences, Dalian Minzu University, Dalian 116600, Liaoning, China

3 School of Bioengineering, Dalian University of Technology, Dalian 116024, Liaoning, China

**Abstract: [Objective]** This study aims to investigate the effects of *Fusobacterium nucleatum* on the proliferation, adhesion, apoptosis, migration, invasion, and epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) of colorectal cancer cell line HCT116 and human normal colon epithelial cell line HCoEpiC. **[Methods]** HCT116 and HCoEpiC cells were stimulated with *F. nucleatum* ATCC 23726 at different multiplicity of infection (MOI) to establish infection models, and then MTT, plate cloning assay, wound healing assay, and transwell assay were employed to measure cell proliferation, migration, and invasion. Flow cytometry was employed to detect cell apoptosis. The expression levels of E-cadherin, catenin  $\delta$ -1, N-cadherin, and vimentin were determined by Western blotting. **[Results]** *F. nucleatum* promoted the proliferation, induced the migration and invasion, and did not induce the apoptosis of HCT116 cells. However, it inhibited the proliferation, migration, and invasion and accelerated the apoptosis of HCoEpiC cells. *F. nucleatum* exhibited strong adhesion to HCT116 and HCoEpiC cells, resulting in dispersed and elongated cells and reduced intercellular adhesion. This bacterium down-regulated the expression levels of the epithelial markers E-cadherin and catenin  $\delta$ -1 and up-regulated those of the mesenchymal markers N-cadherin and vimentin in HCT116 and HCoEpiC cells. In addition, it promoted the transition of E-cadherin from the cell membrane to the cytoplasm. **[Conclusion]** *F. nucleatum* can adhere to both normal colon epithelial cells and colon cancer cells and induce EMT. However, it inhibited the proliferation, migration, and invasion of human normal colon epithelial cells, showing the effect opposite to that on colon cancer cells.

**Keywords:** *Fusobacterium nucleatum*; colon cancer; cell proliferation; migration; epithelial-to-mesenchymal transition

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)又称大肠癌, 是全世界高发性恶性肿瘤之一, 其发病率为全球恶性肿瘤发病率的第三位, 死亡率占癌症总

死亡病例的 9.4%, 是第二大癌症死亡原因<sup>[1-2]</sup>。

结直肠癌的发病过程涉及遗传、环境、饮食和肠道菌群等多种因素<sup>[3-4]</sup>, 其中, 肠道菌

群在消化系统恶性肿瘤的发生发展中扮演着重要角色, 尤其是具核梭杆菌<sup>[5]</sup> (*Fusobacterium nucleatum*)。 *F. nucleatum* 是一种革兰氏阴性厌氧菌, 正常寄生于口腔, 是一种条件性致病菌<sup>[6]</sup>。研究表明, 具核梭杆菌的丰度与结直肠癌的发生、发展和转移直接相关<sup>[7-8]</sup>。研究发现结直肠癌组织中具核梭杆菌含量显著高于正常肠黏膜, 且其数量与淋巴结转移的数量呈正相关<sup>[9-10]</sup>。Komiya 等研究发现, 超过 40% 的结直肠癌患者结直肠癌组织中的具核梭杆菌 DNA 含量高于癌旁组织, 并且从结直肠癌患者的 0 期到 IV 期均能检测到具核梭杆菌, 表明具核梭杆菌可在肿瘤发生的早期就粘附到结直肠癌组织并大量富集从而促进肿瘤细胞增殖, 其含量越高, 肿瘤的转移性越强, 患者死亡率也越高<sup>[10-12]</sup>。Yang 等通过小鼠实验证明具核梭杆菌通过激活宿主细胞的 TLR4/MDY88/NF- $\kappa$ B 途径上调 microRNA-21 的表达, 从而激活结直肠癌细胞内的 MAPK 信号通路, 促进小鼠结直肠癌细胞的增殖和肿瘤的发展<sup>[13]</sup>。Peng 等研究发现具核梭杆菌通过激活宿主细胞 NF- $\kappa$ B 信号途径促进结直肠癌细胞的侵袭能力<sup>[14]</sup>。具核梭杆菌可黏附和侵袭上皮细胞, 并诱导分泌大量的 IL-6h、IL-8 等促炎性细胞因子<sup>[15]</sup>。具核梭杆菌利用粘附素 FadA 识别并结合 E-cadherin, 促使 E-cadherin 从细胞-细胞连接处重新定位, 导致细胞通透性增加, 诱导结直肠癌  $\beta$ -连环蛋白的信号传导。另外, E-cadherin 还可以上调膜蛋白 A1 的表达, 促进 Wnt/ $\beta$ -连接蛋白途径, 因此具核梭杆菌不仅本身具有侵袭性, 同时还可以促进其他物种入侵细胞内和细胞间<sup>[16]</sup>。

虽然具核梭杆菌被发现与结直肠肿瘤关系密切, 临床上发现其在结直肠癌患者肠道菌群中的阳性率或比例升高, 认为具核梭杆菌感染可作为预测结肠癌患者病理分期的重要指标<sup>[17]</sup>。

但是, 目前对于具核梭杆菌在结肠癌发生发展及转移等方面的具体作用和机制尚未完全阐明。本文以 *F. nucleatum* ATCC 23726 为模式菌株, 将其与结直肠癌细胞(HCT116)和人正常结肠上皮细胞(HCoEpiC)进行共培养, 初步评估其对结直肠癌细胞和人正常结肠上皮细胞的增殖、迁移、侵袭及上皮间质转化(epithelial-to-mesenchymal transition, EMT)等方面的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料和试剂

*F. nucleatum* ATCC 23726 购自菌种保藏中心(American type culture collection, ATCC); 人结直肠癌细胞株 HCT116 购于武汉普诺赛公司, 人正常结肠上皮细胞株 HCoEpiC 由中国科学院大连化学物理研究所赠予; 本实验所用抗体均购于 Abcam 公司; 培养细胞用血清购于 Gibco 公司; 培养细菌用固体培养基购于青岛海博生物技术有限公司; 流式凋亡检测试剂盒购于 BD 公司; 流式周期检测试剂盒购于北京四正柏生物科技有限公司。

### 1.2 细胞培养

将 HCT116 细胞或 HCoEpiC 细胞培养于含 10% 胎牛血清的 PRMI 1640 培养基, 于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 及饱和湿度的细胞培养箱中培养。待细胞生长至覆盖瓶底的 80%–90% 后进行传代, 备用。

### 1.3 具核梭杆菌培养

固体平板培养采用哥伦比亚血琼脂培养基, 置于有厌氧袋的厌氧箱中, 37 °C 静置培养。液体培养采用 TSPC (0.03% TSB, 0.01% Bacto™ peptone, 0.25 mg/mL L-cysteine) 培养基, 通入无菌 N<sub>2</sub>, 密封后 37 °C 恒温培养箱中静置培养。

### 1.4 具核梭杆菌感染细胞模型

将 *F. nucleatum* ATCC 23726 按照上述培养

条件培养 16 h,使其进入对数生长期,4 000 r/min 离心 5 min,吸弃上清,使用磷酸缓冲盐溶液(phosphate-buffered saline, PBS)清洗 2 遍,重悬,梯度稀释菌悬液,调整  $OD_{600}$  值为 0.2–0.8,使用细菌计数板在显微镜下直接计数,计算出每个吸光值下对应的细菌数,实验重复 3 次,并绘制出  $OD_{600}$  与菌个数的关系标准曲线备用。将 HCT116 细胞按实验所需细胞数接种于 96 孔板中进行贴壁培养过夜,次日按照一定的感染复数(multiplicity of infection, MOI)依次加入用无抗体培养基重悬的 *F. nucleatum* ATCC 23726,将孔板移至细胞恒温培养箱中进行培养。

### 1.5 具核梭杆菌对 HCT116 细胞的毒性检测

取对数生长期的 HCT116 细胞和 HCoEpiC 细胞,分别以每孔 8 000 个和 5 000 个细胞接种于 96 孔培养板,每孔 100  $\mu$ L。于 37  $^{\circ}$ C、5%  $CO_2$  及饱和湿度的细胞培养箱中培养。12 h 后,吸弃旧培养基,使用 PBS 缓冲液将 *F. nucleatum* ATCC 23726 菌体洗涤 3 次以除去培养基,使用无抗体细胞培养基将其浓度分别调整为  $5.0 \times 10^5$ 、 $2.5 \times 10^6$ 、 $5.0 \times 10^6$  和  $5.0 \times 10^7$  个细胞/mL (即 MOI=10, 50, 100, 1 000),每孔 100  $\mu$ L 接种于 96 孔培养板,使 *F. nucleatum* ATCC 23726 与两组细胞共培养。24 h 后,吸弃旧培养基,每孔加 100  $\mu$ L MTT (5 mg/mL)溶液和细胞培养基混合(1:9),孵育 4 h。弃上清液,避光条件下每孔加 100  $\mu$ L 的 DMSO 溶液,于摇床上室温振荡 10 min 使紫色结晶完全溶解,用多功能酶标仪检测  $OD_{490}$  值。

### 1.6 细胞克隆形成实验

取对数生长期的 HCT116 细胞和 HCoEpiC 细胞,以  $2.0 \times 10^5$  个细胞/mL 接种于 6 孔细胞培养板,于 37  $^{\circ}$ C、5%  $CO_2$  及饱和湿度的细胞培养箱中培养 12 h。取对数生长期的 *F. nucleatum* ATCC 23726,用无血清培养基调整其浓度为

MOI=500,接种于 6 孔细胞培养板中,感染细胞 24 h。去掉培养基, PBS 清洗 3 遍,常规消化,以每孔 1 000 个细胞接种于 12 孔细胞培养板中,每组 3 个复孔,再将细胞置于培养箱中培养 10 d。当观察到肉眼可见的细胞克隆后,去掉旧培养基,用 4%甲醛固定液室温固定 20 min,去掉甲醛固定液用适量的 0.1%结晶紫染液染色 15 min。流水冲洗,空气中干燥,用数码相机进行拍照,并用 33%冰乙酸脱色,用多功能酶标仪检测  $OD_{570}$  值。

### 1.7 流式细胞术检测细胞凋亡率

取对数生长期的 HCT116 细胞和 HCoEpiC 细胞,以  $2.5 \times 10^5$  个细胞/mL 接种于 6 孔板中,12 h 后,将对数生长期的 *F. nucleatum* ATCC 23726 以 MOI=500 比例接种于 6 孔细胞培养板中,共孵育 0、24 和 48 h。用不含 EDTA 胰酶消化收集各组细胞,加入 500 mL Binding Buffer 重悬细胞,随后加入 5  $\mu$ L Annexin AV-FITC 避光孵育 10 min,随后加入 10  $\mu$ L PI 染色液避光孵育 5 min,用流式细胞仪检测,结果采用 FlowJo 软件进行分析。

### 1.8 细胞划痕迁移实验

培养 HCT116 细胞和 HCoEpiC 细胞,经胰酶消化后接种于 6 孔板,培养 12 h。取 10  $\mu$ L 枪头均匀快速划过 6 孔板底部,加入具核梭杆菌,分别共孵育 12 和 24 h,取出 6 孔板,在倒置荧光显微镜下观察具核梭杆菌与 HCT116 细胞和 HCoEpiC 细胞共孵育 12 和 24 h 的划痕面积变化情况并拍照保存。

### 1.9 Transwell 迁移和侵袭实验

取对数生长期的 HCT116 细胞和 HCoEpiC 细胞,调整细胞浓度为  $3.0 \times 10^5$  个细胞/mL,接种于 6 孔培养板中培养。12 h 后,取对数生长期的 *F. nucleatum* ATCC 23726 (MOI=500)接种于 6 孔培养板,共孵育 12 h,收集细胞,用基

基础培养基调整细胞浓度为  $1.0 \times 10^5$  个细胞/mL, 取 100  $\mu\text{L}$  加入 transwell 上室, 下室加 600  $\mu\text{L}$  含 10% 胎牛血清培养基, 于  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  及饱和湿度的细胞培养箱中培养。4% 甲醛固定, 1% 结晶紫染色, 33% 醋酸脱色, 用多功能酶标仪检测  $OD_{570}$  值; 同时, 在 transwell 上室中加入一定浓度 matrigel 基质胶, 待其凝固后, 加入 100  $\mu\text{L}$  用基础培养基稀释至一定浓度的细胞, 下室加 600  $\mu\text{L}$  完全培养基, 于  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  及饱和湿度的细胞培养箱中培养。4% 甲醛固定, 1% 结晶紫染色, 33% 醋酸脱色, 用多功能酶标仪检测  $OD_{570}$  值。

### 1.10 Western blotting 检测细胞发生 EMT 相关蛋白

取对数生长期的 HCT116 细胞和 HCoEpiC

细胞, 调整细胞浓度  $3.0 \times 10^5$  个细胞/mL, 每孔 2.5 mL 接种于 6 孔板中, 于  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 、饱和湿度的细胞培养箱中培养。12 h 后, 取对数生长期的 *F. nucleatum* 接种于 6 孔板中, 收集与 *F. nucleatum* 共孵育不同时间的细胞, 检测 E-cadherin 蛋白表达水平。

## 2 结果与分析

### 2.1 具核梭杆菌对结直肠癌细胞 HCT116 增殖的影响

如图 1A 所示, 显微镜下观察各组 HCT116 和 HCoEpiC 细胞增殖情况, 可见和对照组相比, 随着 MOI 比例的增加, HCT116 细胞数量明显增多, 细胞间空隙逐渐变小; 而 HCoEpiC 细胞数没有明显变化。MTT 法检测结果表明(图 1B),

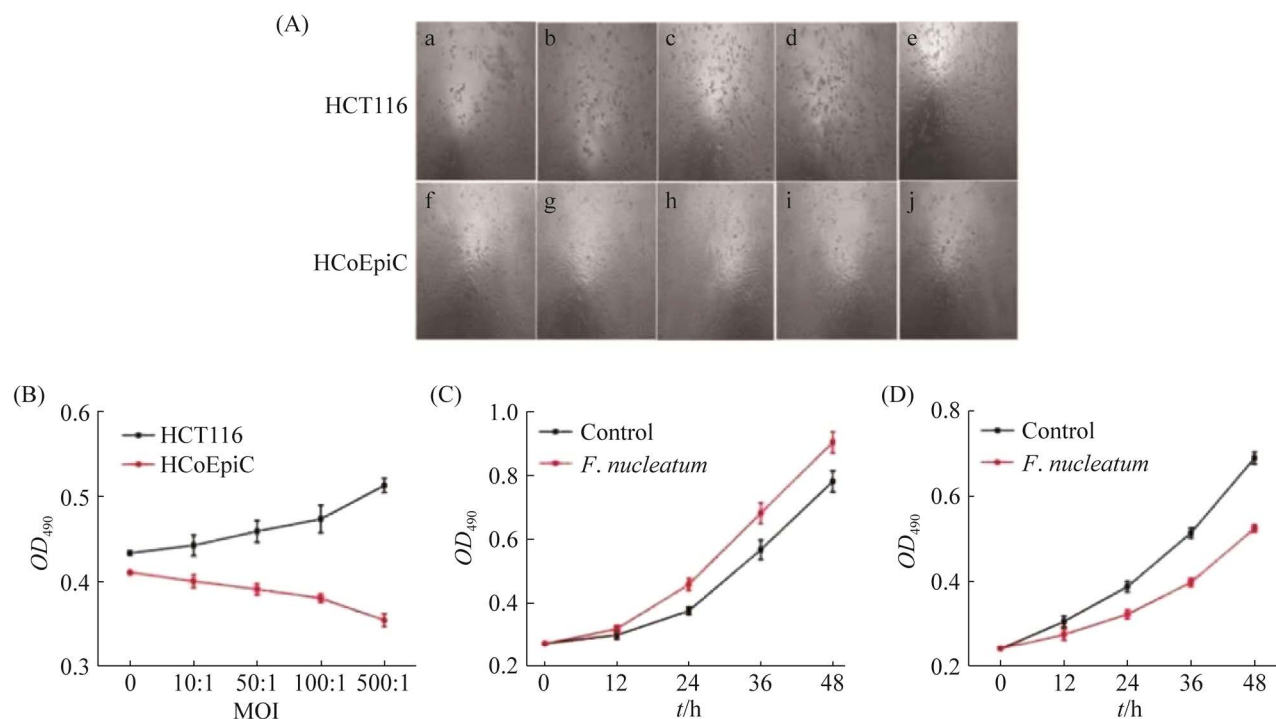


图 1 具核梭杆菌对细胞增殖的影响

Figure 1 Effects of *Fusobacterium nucleatum* infection on cell proliferation. A: optical microscopy image at different MOI, 40 $\times$ ; B: MTT detection; C: effects of infection time on the HCT116 cells proliferation; D: effects of infection time on the HCoEpiC cells proliferation. a, f: control; b, g: MOI=10:1; c, h: MOI=50:1; d, i: MOI=100:1; e, j: MOI=500:1. Error bars in figure represent standard deviation.

HCT116 细胞随 MOI 比例增加呈递增的趋势，而 HCoEpiC 细胞却随着 MOI 比例增加呈递减趋势，与显微镜观察结果相一致。

为考察不同感染时间对细胞增殖的影响，取 MOI 为 500，分别测定 *F. nucleatum* 感染 0、12、24、36 和 48 h 后的细胞增殖情况，结果如图 1C 和 1D 所示。与对照组相比，随着 *F. nucleatum* 感染时间的增加，HCT116 细胞生存率逐渐递增，而 HCoEpiC 细胞生存率逐渐下降(图 1D)。同时，我们也采用平板克隆形成实验考察 *F. nucleatum* 对结肠癌细胞和人正常结肠上皮细胞克隆形成能力的影响。由图 2A 可以观察到，HCT116 细胞被具核梭杆菌感染以后形成的克隆数量明显多于对照组，而 HCoEpiC 细胞表现出相反的现象。结合统计学分析(图 2B)，被 *F. nucleatum* 感染与未感染的 HCT116 细胞克隆形成能力差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )，被 *F. nucleatum* 感染的 HCT116 细胞的克隆形成能力高于对照组。被 *F. nucleatum* 感染与未感染的 HCoEpiC 细胞的克隆形成能力差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )，被 *F. nucleatum* 感染后 HCoEpiC

细胞克隆形成能力明显减弱。

上述结果说明，*F. nucleatum* 可促进结直肠癌细胞的生长和增殖，而对人正常结肠上皮细胞的生长和增殖起抑制作用。

## 2.2 具核梭杆菌对结直肠癌细胞 HCT116 形态的影响

利用 *F. nucleatum* 分别感染 HCT116 和 HCoEpiC 细胞 24 h 后，通过倒置显微镜观察，可见细胞形态发生明显变化。如图 3A 所示，实验组 HCT116 细胞颗粒完整，相较于对照组，细胞数量明显增多，但是实验组 HCoEpiC 细胞数量呈现减少的趋势，同时出现较多细胞碎片，细胞空泡，有的细胞延伸出很长的触角。由图 3B 可见，对照组中 HCT116 细胞形态呈梭形或多边形，随着 *F. nucleatum* 处理时间的增加，其形态趋于椭球型或球型，形态改变，推测粘附度降低是细胞形态改变的结果。从图 3C 可知，对照组中 HCoEpiC 细胞形态趋近于球型，当 *F. nucleatum* 与其共培养 24 h，HCoEpiC 细胞形态也发生改变，大多数变为梭形或不规则形状。

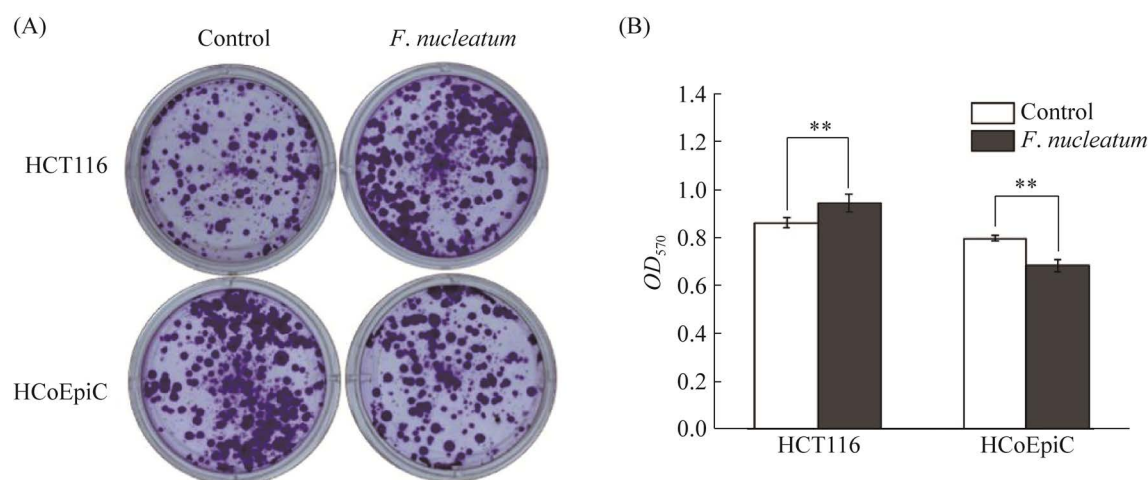


图 2 平板克隆形成实验检测 *Fusobacterium nucleatum* 对细胞增殖作用

Figure 2 Determination of cell proliferation by colony-forming assay. A: image of colony-forming assay; B: crystal violet concentration was measured at OD<sub>570</sub>, \*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$  vs. control group.



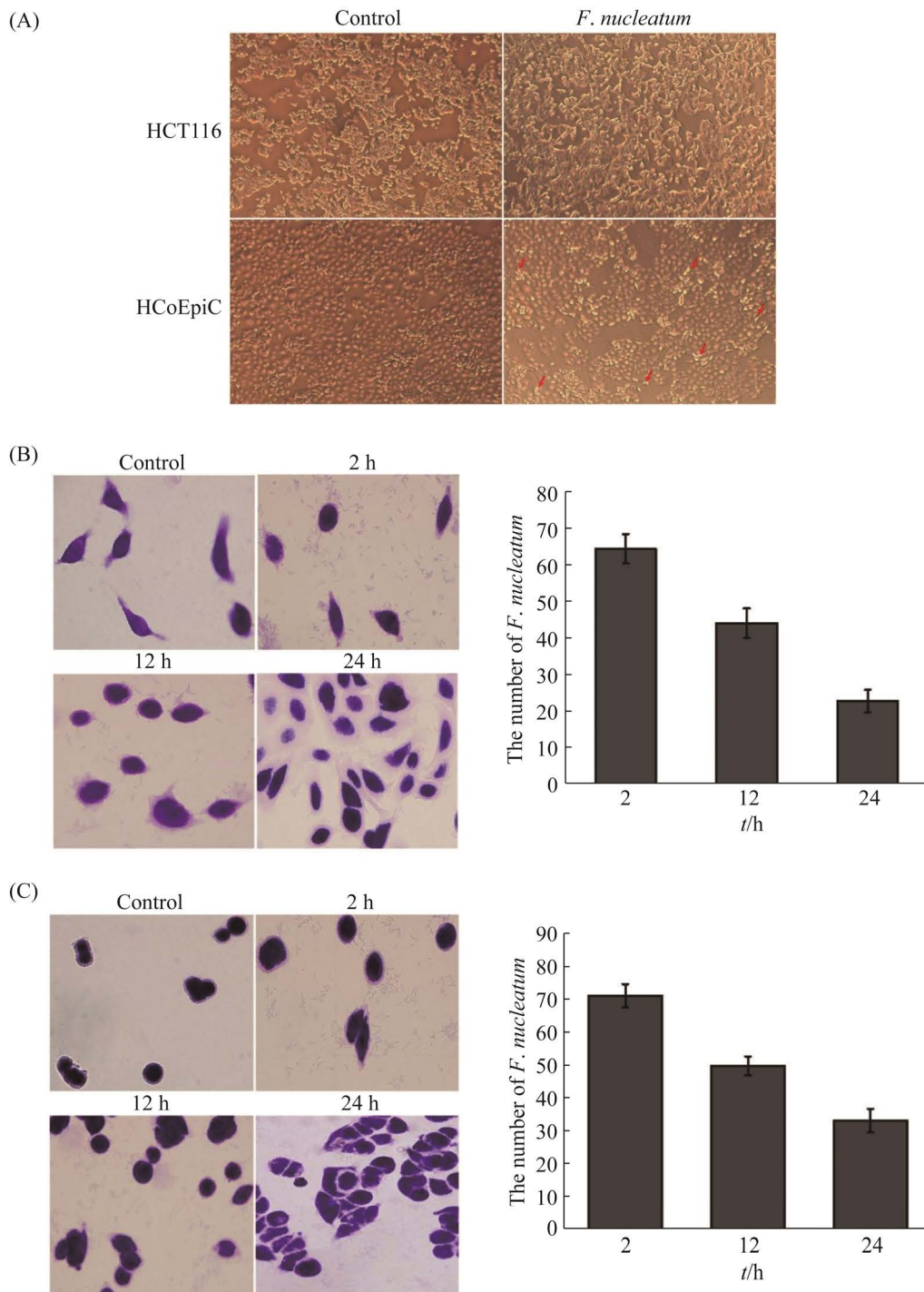


图3 具核梭杆菌对结直肠癌细胞 HCT116 形态的影响

Figure 3 Effects of *Fusobacterium nucleatum* on the morphology of colorectal cancer cell line HCT116. A: cell morphology after being infected by *F. nucleatum* for 24 h, 40 $\times$ ; B: count of *F. nucleatum* adhered to HCT116 cells, 100 $\times$ ; C: count of *F. nucleatum* adhered to HCoEpiC cells, 100 $\times$ . Error bars in figure represent standard deviation.

由上述实验结果可推断, *F. nucleatum* 能够影响 HCT116 细胞的粘附性。

### 2.3 具核梭杆菌对结直肠癌细胞 HCT116 凋亡的影响

用 *F. nucleatum* 处理细胞 24 和 48 h 后收集细胞, Annexin V-FITC/PI 染色, 通过流式细

胞仪检测细胞凋亡情况, 结果如图 4A 和 4B 所示。HCT116 细胞被 *F. nucleatum* 感染后, 并未观察到明显的细胞凋亡现象, 相反, HCoEpiC 细胞随着 *F. nucleatum* 感染时间的增加, 细胞凋亡率增加, 出现较明显的细胞凋亡现象。

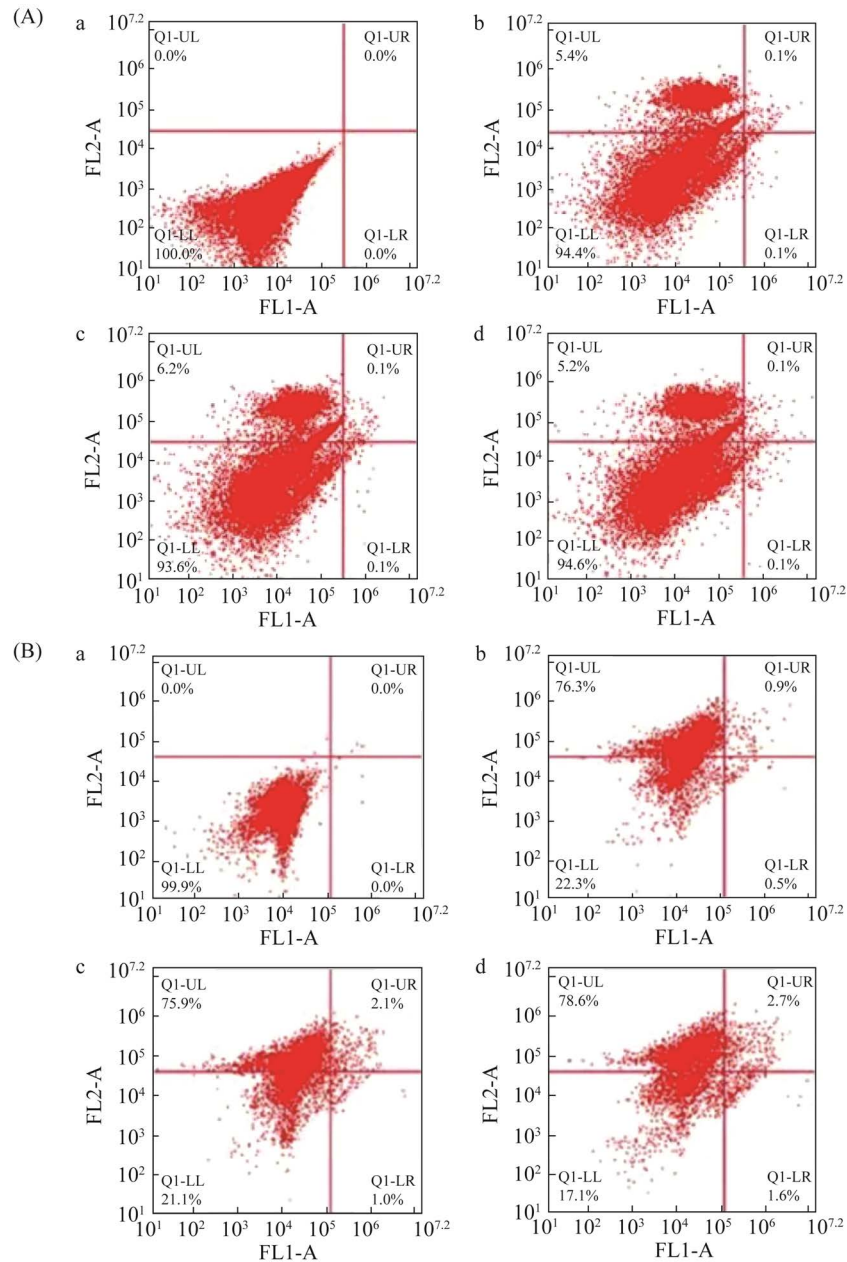


图 4 具核梭杆菌对 HCT116 和 HCoEpiC 细胞凋亡的影响

Figure 4 Effects of *F. nucleatum* on cell apoptosis. A: cell apoptosis of HCT116; B: cell apoptosis of HCoEpiC. a: control; b: 0 h; c: 24 h; d: 48 h.



## 2.4 具核梭杆菌对结直肠癌细胞 HCT116 迁移的影响

细胞划痕实验结果表明, 被 *F. nucleatum* 感染的 HCT116 细胞随着感染时间的增加, 其迁移的速度明显快于对照组, 对照组迁移率在

24 h 时为 27.38%, 而实验组达到了 35.03% (图 5A)。被 *F. nucleatum* 感染的 HCoEpiC 细胞随着时间的增加, 其迁移速度降低, 对照组迁移率在 24 h 时为 38.51%, 而实验组为 17.51% (图 5B)。为进一步验证细胞划痕实验结果, 随

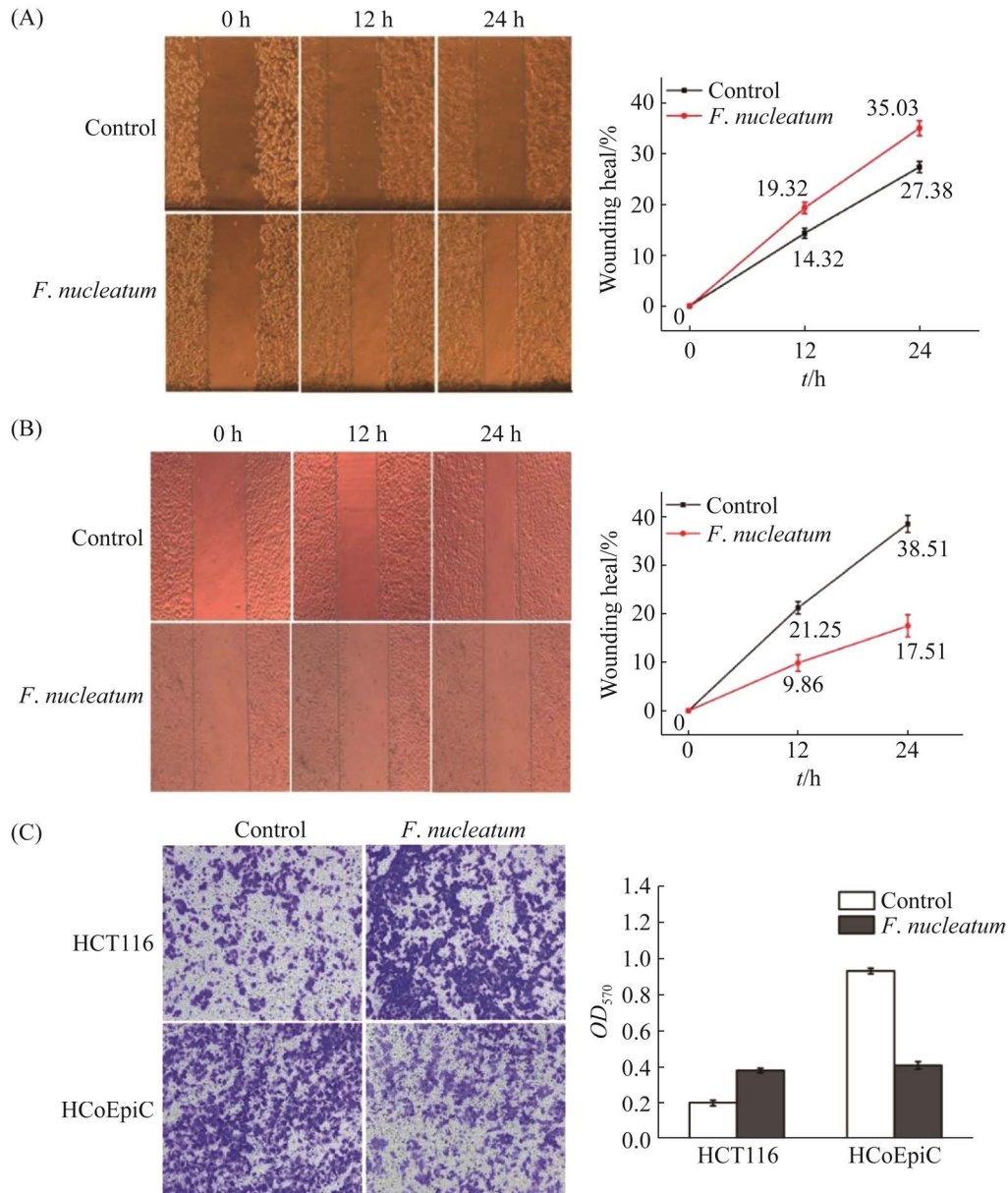


图 5 具核梭杆菌对 HCT116 和 HCoEpiC 细胞迁移的影响

Figure 5 Effects of *Fusobacterium nucleatum* on the migration of HCT116 and HCoEpiC cells. A: wound-healing assay of HCT116 cells, 40 $\times$ ; B: wound-healing assay of HCoEpiC cells, 40 $\times$ ; C: transwell assay, 50 $\times$ . Error bars in figure represent standard deviation.

后进行了 transwell 迁移(未包被 matrigel 胶)实验。Transwell 迁移实验结果显示,与对照组相比,被 *F. nucleatum* 感染的 HCT116 细胞迁移数明显增加;而被 *F. nucleatum* 感染 HCoEpiC 细胞穿过 transwell 小室基底膜的细胞数明显少于对照组(图 5C)。由上述结果可知, *F. nucleatum* 促进了 HCT116 细胞的迁移,但抑制了 HCoEpiC 细胞的迁移。

上述实验结果证明, *F. nucleatum* 能促进 HCT116 细胞的迁移,而抑制 HCoEpiC 细胞的迁移。因此,推测 *F. nucleatum* 对细胞的侵袭也具有相同的作用,通过细胞 transwell 侵袭(已包被 matrigel 胶)实验进行验证,结果如图 6 显示。与对照组相比, *F. nucleatum* 感染的 HCT116 细胞能穿过 transwell 小室基底膜的细胞数量显著增加;而 *F. nucleatum* 感染的 HCoEpiC 细胞能穿过 transwell 小室基底膜的细胞数明显少于对照组,说明 *F. nucleatum* 促进 HCT116 细胞的侵袭,而抑制 HCoEpiC 细胞的侵袭。

## 2.5 具核梭杆菌对结直肠癌细胞 HCT116 EMT 发生的影响

将收集好的细胞蛋白样品调整至同一浓度

并进行 Western blotting 实验,检测 E-cadherin (135 kDa)、Catenin  $\delta$ -1 (95、105 kDa)、N-cadherin (140 kDa)和 Vimentin (57 kDa)蛋白表达量的变化,结果如图 7A 和 7B 所示。与对照组相比,被 *F. nucleatum* 感染的 HCT116 细胞,上皮标记物 E-cadherin 和 Catenin  $\delta$ -1 表达量随着 *F. nucleatum* 作用时间的变长逐渐减少,蛋白表达量在 0–12 h 变化不明显,在 24 h 表达量明显降低。间充质标记物 N-cadherin 和 Vimentin 表达量在 24 h 时有明显的上升趋势,并随着 *F. nucleatum* 作用时间变长而有所增加。被 *F. nucleatum* 感染的 HCoEpiC 细胞,与对照组相比,上皮标记物 E-cadherin 和 Catenin  $\delta$ -1 表达量随着 *F. nucleatum* 作用时间的增加有递减的趋势,在 24 h 较为明显;而间充质标记物 N-cadherin 和 Vimentin 的表达量在 24 h 时明显升高。综上, *F. nucleatum* 均可诱导 HCT116 和 HCoEpiC 细胞发生上皮间质转化。

E-cadherin 是否发生移位,即在细胞膜和细胞浆中表达量的差异是细胞发生上皮间质转化的另一个重要特征。因此,分别抽提细胞膜和细胞浆蛋白进行 Western blotting 实验,实

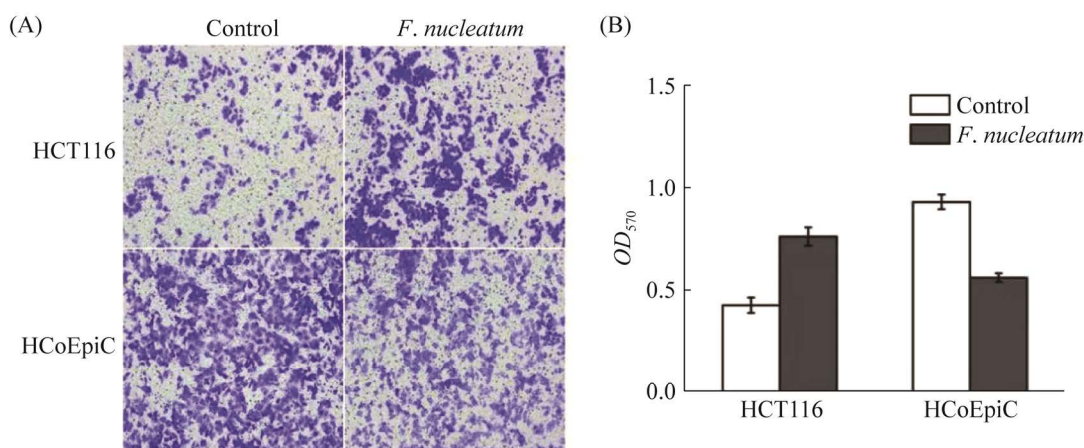


图 6 具核梭杆菌对 HCT116 和 HCoEpiC 细胞侵袭的影响

Figure 6 Effects of *Fusobacterium nucleatum* on the invasion of HCT116 and HCoEpiC cells. A: picture of cell invasion, 50 $\times$ ; B: crystal violet concentration was measured at OD<sub>570</sub>. Error bars in figure represent standard deviation.

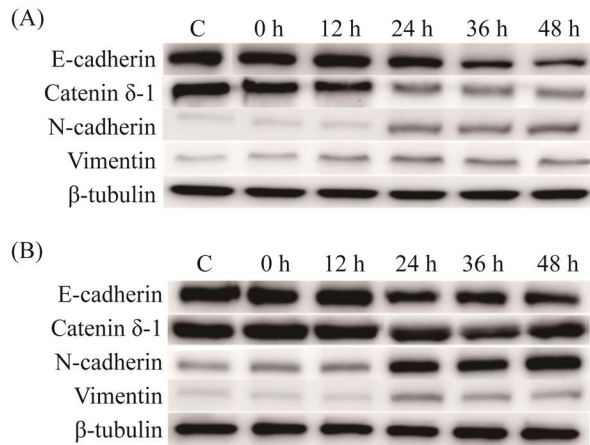


图 7 具核梭杆菌对 EMT 相关蛋白的影响  
Figure 7 The effect of *Fusobacterium nucleatum* on the EMT-related protein expression. A: HCT116 cells; B: HCoEpiC cells.

验结果如图 8A 和 8B 所示。与对照组相比, 被 *F. nucleatum* 感染的 HCT116 和 HCoEpiC 细胞的细胞膜中 E-cadherin 表达量均随着感染时间递增而减少, 但在细胞浆中则呈现逐渐增加的趋势, 说明 E-cadherin 发生移位, 由细胞膜向细胞浆转移, 进一步证明了 *F. nucleatum* 诱导 HCT116 和 HCoEpiC 细胞发生上皮间质转化。

### 3 讨论

结直肠癌通常在一系列肠道慢性炎症疾病基础上发展而成。肠道中个别菌群在肠上皮细

胞中的过度生长和能量代谢, 会导致肠上皮细胞损伤, 诱导肠道炎症的发生, 诱导细胞增殖, 刺激血管再生, 从而促进肿瘤的生成。越来越多的研究表明, 具核梭杆菌在结直肠癌发生发展中起重要作用。*F. nucleatum* 可表达 Fap2 和 FadA 等蛋白, 借助 Fap2 和 FadA 蛋白在肿瘤细胞表面富集, 促进肿瘤的发生发展<sup>[18]</sup>。也有研究表明, *F. nucleatum* 外膜囊泡具有促炎性和组织侵入性, 可以在早期肿瘤发生中起到重要作用<sup>[19]</sup>。*F. nucleatum* 不仅在结直肠癌发生发展的各个阶段起到重要作用, 还可影响结直肠癌的复发和转移<sup>[9-20]</sup>。目前, 国内外有关具核梭杆菌对人结直肠癌细胞增殖、迁移、侵袭及上皮间质转化等方面的机制方面的研究较多, 但其对人正常结肠上皮细胞的增殖、迁移、侵袭及上皮间质转化等方面研究还未见报道。本文以 *F. nucleatum* ATCC 23726 为模式菌株, 将其分别与结直肠癌细胞(HCT116)和人正常结肠上皮细胞(HCoEpiC)进行共培养, 研究其对结直肠癌细胞和人正常结肠上皮细胞的增殖、迁移、侵袭及上皮间质转化等方面的影响。

研究结果显示, *F. nucleatum* 对人结直肠癌细胞和人正常结肠上皮细胞的增殖产生不同影响。*F. nucleatum* 可促进 HCT116 细胞的生长和增殖, 随着 MOI 比例和感染时间的递增, HCT116

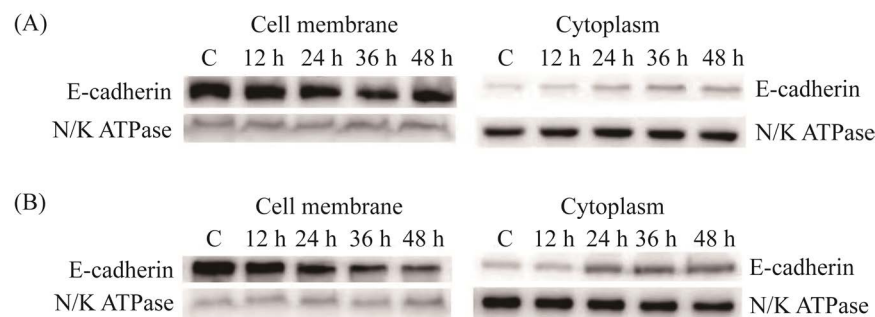


图 8 具核梭杆菌处理对细胞膜和细胞浆中 E-cadherin 蛋白表达量的影响  
Figure 8 The effects of *Fusobacterium nucleatum* on E-cadherin expression in cell membrane and cytoplasm. A: HCT116 cells; B: HCoEpiC cells.

细胞增殖活性明显增加, 细胞中 S 期比例大幅度提高, G2/M 期比例也有所上升。相反, 被 *F. nucleatum* 感染后 HCoEpiC 细胞的生长和增殖明显受到抑制, 细胞中 S 期比例下降幅度较大, G2/M 期比例也有所下降。*F. nucleatum* 可诱导 HCoEpiC 细胞发生凋亡, 但不诱导 HCT116 细胞的凋亡。细胞迁移和侵袭实验结果表明, *F. nucleatum* 可诱导 HCT116 细胞发生迁移, 促进细胞的侵袭, 但降低 HCoEpiC 细胞的迁移和侵袭。同时, 细胞粘附实验结果也证实, *F. nucleatum* 可粘附于细胞表面, 被 *F. nucleatum* 感染的 HCT116 细胞和 HCoEpiC 细胞变得分散、细长, 并且细胞与细胞之间的粘附性降低, 并且出现较多的细胞碎片

最新研究表明, 上皮间质转化与肿瘤的发生、恶性转变及化疗产生的抵抗有密切联系。上皮间质转化通过调节相关信号通路来改变细胞的极性、细胞间的黏附、细胞骨架及细胞外基质的降解, 从而赋予细胞浸润和迁移的能力<sup>[21]</sup>。本研究结果表明, *F. nucleatum* 均可诱导人结肠癌细胞和人正常结肠细胞发生上皮间质转化, 被感染 *F. nucleatum* 的 HCT116 和 HCoEpiC 细胞, 其上皮标记物 E-cadherin 与 Catenin  $\delta$ -1 的表达量减少, 而间充质标记物 N-cadherin 与 Vimentin 的表达量增加, E-cadherin 由细胞膜向细胞质转移。

综上所述, 本研究发现 *F. nucleatum* 对人正常结肠上皮细胞和结肠癌细胞都具有粘附能力, 并且可诱导细胞发生上皮间质转化。但是, *F. nucleatum* 抑制人正常结肠细胞的增殖、迁移和侵袭, 表现出与结肠癌细胞相反的作用, 推测 *F. nucleatum* 通过刺激肠上皮细胞抑制其生长和增殖, 使其产生炎症等反应, 为结直肠癌的发生提供了病理生理基础。目前对 *F. nucleatum* 诱导结肠上皮细胞炎症机制尚不明确, 且“具核梭杆

菌感染-炎症-肿瘤”整个过程中涉及的关键通路及靶基因还不清楚, 有待后续进一步深入研究。

## 参考文献

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global cancer statistics 2020. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 2021, 71(3): 209–249.
- [2] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 2018, 68(6): 394–424.
- [3] Hampel H, Kalady MF, Pearlman R, Stanich PP. Hereditary colorectal cancer. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 2022, 36(3): 429–447.
- [4] Vernia F, Longo S, Stefanelli G, Viscido A, Latella G. Dietary factors modulating colorectal carcinogenesis. *Nutrients*, 2021, 13(1): 143.
- [5] Osman MA, Neoh HM, Ab Mutalib NS, Chin SF, Mazlan L, Raja Ali RA, Zakaria AD, Ngiu CS, Ang MY, Jamal R. *Parvimonas micra*, *Peptostreptococcus stomatis*, *Fusobacterium nucleatum* and *Akkermansia muciniphila* as a four-bacteria biomarker panel of colorectal cancer. *Scientific Reports*, 2021, 11: 2925.
- [6] McIlvanna E, Linden GJ, Craig SG, Lundy FT, James JA. *Fusobacterium nucleatum* and oral cancer: a critical review. *BMC Cancer*, 2021, 21(1): 1212.
- [7] Wong SH, Yu J. Gut microbiota in colorectal cancer: mechanisms of action and clinical applications. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 2019, 16(11): 690–704.
- [8] Chen SJ, Su TT, Zhang Y, Lee A, He JM, Ge QW, Wang L, Si JM, Zhuo W, Wang LJ. *Fusobacterium nucleatum* promotes colorectal cancer metastasis by modulating KRT7-AS/KRT7. *Gut Microbes*, 2020, 11(3): 511–525.
- [9] Yu T, Guo FF, Yu YN, Sun TT, Ma D, Han JX, Qian Y, Kryczek I, Sun DF, Nagarsheth N, Chen YX, Chen HY, Hong J, Zou WP, Fang JY. *Fusobacterium nucleatum* promotes chemoresistance to colorectal cancer by modulating autophagy. *Cell*, 2017, 170(3): 548–563.e16.
- [10] 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. *Genome Research*, 2012, 22(2): 299–306.



- [11] Komiya Y, Shimomura Y, Higurashi T, Sugi Y, Arimoto J, Umezawa S, Uchiyama S, Matsumoto M, Nakajima A. Patients with colorectal cancer have identical strains of *Fusobacterium nucleatum* in their colorectal cancer and oral cavity. *Gut*, 2019, 68(7): 1335–1337.
- [12] Mima K, Cao Y, Chan AT, Qian ZR, Nowak JA, Masugi Y, Shi Y, Song MY, da Silva A, Gu MC, Li WW, Hamada T, Kosumi K, Hanyuda A, Liu L, Kostic AD, Giannakis M, Bullman S, Brennan CA, Milner DA, Baba H, Garraway LA, Meyerhardt JA, Garrett WS, Huttenhower C, Meyerson M, Giovannucci EL, Fuchs CS, Nishihara R, Ogino S. *Fusobacterium nucleatum* in colorectal carcinoma tissue according to tumor location. *Clinical and Translational Gastroenterology*, 2016, 7(11): e200.
- [13] Yang YZ, Weng WH, Peng JJ, Hong LM, Yang L, Toiyama Y, Gao RY, Liu MF, Yin MM, Pan C, Li H, Guo BM, Zhu QC, Wei Q, Moyer MP, Wang P, Cai SJ, Goel A, Ma YL. *Fusobacterium nucleatum* increases proliferation of colorectal cancer cells and tumor development in mice by activating toll-like receptor 4 signaling to nuclear factor- $\kappa$ B, and up-regulating expression of microRNA-21. *Gastroenterology*, 2017, 152(4): 851–866.e24.
- [14] Peng C, Ouyang YB, Lu NH, Li NS. The NF- $\kappa$ B signaling pathway, the microbiota, and gastrointestinal tumorigenesis: recent advances. *Frontiers in Immunology*, 2020, 11: 1387.
- [15] Sahan AZ, Hazra TK, Das S. The pivotal role of DNA repair in infection mediated-inflammation and cancer. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 663.
- [16] Kolenbrander PE, Palmer RJ, Periasamy S, Jakubovics NS. Oral multi species biofilm development and the key role of cell-cell distance. *Nature Reviews Microbiology*, 2010, 8(7): 471–480.
- [17] Gao ZG, Guo BM, Gao RY, Zhu QC, Wu W, Qin HL. Probiotics modify human intestinal mucosa-associated microbiota in patients with colorectal cancer. *Molecular Medicine Reports*, 2015, 12(4): 6119–6127.
- [18] Brennan CA, Garrett WS. *Fusobacterium nucleatum*—symbiont, opportunist and oncobacterium. *Nature Reviews Microbiology*, 2019, 17(3): 156–166.
- [19] Engevik MA, Danhof HA, Ruan W, Engevik AC, Chang-Graham AL, Engevik KA, Shi ZC, Zhao YL, Brand CK, Krystofiak ES, Venable S, Liu XL, Hirschi KD, Hyser JM, Spinler JK, Britton RA, Versalovic J. *Fusobacterium nucleatum* secretes outer membrane vesicles and promotes intestinal inflammation. *mBio*, 2021, 12(2): e02706–e02720.
- [20] Bullman S, Pédamallu CS, Sicinska E, Clancy TE, Zhang XY, Cai DA, Neuberger 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, Aguirre AJ, Ng K, Élez E, Ogino S, Taberero J, Fuchs CS, Hahn WC, Nuciforo P, Meyerson M. Analysis of *Fusobacterium persistence* and antibiotic response in colorectal cancer. *Science*, 2017, 358(6369): 1443–1448.
- [21] Yu MR, Kim HJ, Park HR. *Fusobacterium nucleatum* accelerates the progression of colitis-associated colorectal cancer by promoting EMT. *Cancers*, 2020, 12(10): 2728.