



微生物促进膀胱尿路上皮细胞癌发生和发展分子机制的研究进展

刘振^{1#}, 张宁南^{2,3#}, 杨敏^{2,3}, 柳陈坚¹, 李晓然^{1*}

1 昆明理工大学生命科学与技术学院, 云南 昆明 650500

2 云南省第一人民医院泌尿外科, 云南 昆明 650032

3 昆明理工大学附属医院泌尿外科, 云南 昆明 650032

刘振, 张宁南, 杨敏, 柳陈坚, 李晓然. 微生物促进膀胱尿路上皮细胞癌发生和发展分子机制的研究进展[J]. 微生物学报, 2024, 64(7): 2209–2223.

LIU Zhen, ZHANG Ningnan, YANG Min, LIU Chenjian, LI Xiaoran. Progress in the mechanism of microbiota promoting the development and progression of urothelial carcinoma of bladder[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(7): 2209–2223.

摘要: 膀胱尿路上皮细胞癌(urothelial carcinoma of bladder, UCB)是泌尿系统常见的恶性肿瘤, 是膀胱癌(bladder cancer, BC)最常见的病理类型。UCB具有高发病率、高死亡率和易复发等特点, 对人类健康构成巨大威胁。引发UCB的原因可能与吸烟和接触有毒化学物质有关, 但是随着研究的不断深入, 人们发现膀胱内存在独特的微生物群, 它与UCB的发生和发展密切相关。本文着重综述微生物通过尿路感染(urinary tract infection, UTI)、影响上皮-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)以及上调细胞程序性死亡-配体1(programmed cell death 1 ligand 1, PD-L1)的表达来参与UCB的发生和发展, 同时也对健康人群与UCB患者微生物群特征以及UCB的预防和治疗等方面作了相应阐述。通过综述微生物与UCB之间的关系, 为进一步明确微生物对UCB的促进作用以及研发治疗UCB的药物提供新思路。

关键词: 微生物; 膀胱尿路上皮细胞癌; 分子机制; 膀胱癌

资助项目: 云南省科技厅项目(202101AY070001-259)

This work was supported by the Project of Yunnan Provincial Science and Technology Department (202101AY070001-259).

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding author. E-mail: starkeyran@163.com

Received: 2023-11-30; Accepted: 2024-02-29; Published online: 2024-03-05

Progress in the mechanism of microbiota promoting the development and progression of urothelial carcinoma of bladder

LIU Zhen^{1#}, ZHANG Ningnan^{2,3#}, YANG Min^{2,3}, LIU Chenjian¹, LI Xiaoran^{1*}

1 Faculty of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, Yunnan, China

2 Department of Urology, the First People's Hospital of Yunnan Province, Kunming 650032, Yunnan, China

3 Department of Urology, the Affiliated Hospital of Kunming University of Science and Technology, Kunming 650032, Yunnan, China

Abstract: Urothelial carcinoma of bladder (UCB) is a common malignant tumor of the urinary system and a common pathological type of bladder cancer (BC). With high morbidity, high mortality, and easy recurrence, UCB poses a serious threat to human health. The occurrence of UCB may be associated with smoking and exposure to toxic chemicals. With the deepening of research, researchers have discovered unique microbiota related to the occurrence and development of UCB in the bladder. This review focuses on the involvement of microbiota in the occurrence and development of UCB through urinary tract infection (UTI), affecting epithelial-mesenchymal transition (EMT), and up-regulating the expression of programmed cell death 1 ligand 1 (PD-L1). At the same time, this paper introduces the microbiota characteristics of healthy people and UCB patients as well as the prevention and treatment of UCB. By reviewing the relationship between microbiota and UCB, this paper provides new ideas for further clarifying the promoting effect of microbiota on UCB and developing drugs for treating UCB.

Keywords: microbiota; urothelial carcinoma of bladder; molecular mechanism; bladder cancer

膀胱癌(bladder cancer, BC)是全球第十大常见恶性肿瘤^[1], 2020 年全球新发病例约 57.3 万例, 死亡病例约 21.3 万例^[2], 约 90% 的患者确诊时是膀胱尿路上皮细胞癌(urothelial carcinoma of bladder, UCB)^[3]。UCB 是我国发病率最高的泌尿生殖系肿瘤^[4]。据统计, 2014 年我国 UCB 新发病例约 7.81 万例, 发病率约 5.71/10 万, 死亡病例约 3.21 万例, 死亡率约 2.35/10 万^[5-6]。同时, 男性 UCB 的发病率高于女性, 是导致男性癌症死亡的第九大原因^[2]。大多数 UCB 患者以无痛性肉眼血尿首发症状^[7], 晚期肿瘤侵犯邻近器官并产生严重血尿^[8]。一直以来, 人们认为引发

UCB 的主要原因是吸烟和接触有毒化学物质等^[8], 但随着下一代测序技术的发展^[9]和增强量尿液培养技术的广泛应用^[10], 人们发现膀胱并不是无菌环境, 其中也存在微生物, 并且微生物群会影响膀胱疾病的发生^[11]。本综述根据已有的研究论文, 阐明微生物促进 UCB 发生和发展的分子机制, 为进一步明确微生物对 UCB 的促进作用和研发治疗 UCB 的微生物药物提供新思路。

1 健康人群与 UCB 患者微生物群特征

人体微生态的微生物群失调对人类健康造

成很大影响, 微生物群被认为是人体“被遗忘且不可见的器官”^[3]。微生物群保持宿主体内微生态平衡, 防止病原微生物入侵并协助代谢过程^[12]。研究显示, 微生物群的宏基因组比整个宿主基因组大 100 倍^[3]。每个微生物群与其宿主之间都有一个特定的环境^[3]。

研究表明, 健康人群与 BC 患者的膀胱、尿液微生物群具有个体差异^[13], 其主要受抗生素使用、饮食、遗传、年龄^[14]、性别^[15-16]和取样方式^[17]等因素影响。值得注意的是, 与取中段尿分析微生物群相比, 使用导尿管收集的尿液微生物群更能代表膀胱微生物群^[18-20]。

1.1 健康人群泌尿系统微生物群特征

健康人膀胱、尿液微生物群属的组成在个体间差异显著^[21]。健康男性中段尿中韦荣氏球菌属(*Veillonella*)、链球菌属(*Streptococcus*)和棒杆菌属(*Corynebacterium*)更丰富^[13], 并且男性尿液中存在的菌属数量随着年龄的增长而增加^[22]。与男性相比, 健康女性中段尿中特有的是放线菌门(*Actinobacteria*)和拟杆菌门(*Bacteroidetes*)^[22], 而且女性的年龄与细菌属的数量无显著相关性^[23]。20-29 岁女性中段尿含有的细菌属最多, 绝经后妇女中段尿中细菌属的数量减少^[23]。绝经前女性中段尿中乳杆菌属(*Lactobacillus*)明显多于绝经后女性, 动弯杆菌属(*Mobiluncus*)在绝经后女性中更常见^[23]。男性和女性 70 岁以上年龄组特有的属是容凯氏菌属(*Jonquetella*)、小单胞菌属(*Parvimonas*)、嗜蛋白质菌属(*Proteiniphilum*)和糖发酵菌属(*Saccharofermentans*)^[22]。

由于女性尿液样本中特有放线菌门^[22], 其中包括分枝杆菌属(*Mycobacterium*)。UCB 治疗药物卡介苗(*Bacillus Calmette-Guérin* vaccine, BCG)属于分枝杆菌属的一种, 所以可能在预防女性 UCB 方面发挥重要作用^[9,24]。

1.2 UCB 患者泌尿系统、肿瘤组织微生物群特征

健康人群与 UCB 患者的尿液微生物群^[14,20,25-26]和膀胱微生物群^[20]存在显著差异。尿液微生物群的变化与许多泌尿系统疾病密切相关^[9]。

与健康对照组相比, UCB 患者中段尿中放线菌属(*Actinomyces*)、无色杆菌属(*Achromobacter*)、短杆菌属(*Brevibacterium*)、布鲁氏菌属(*Brucella*)^[26]、多环芳烃(polycyclic aromatic hydrocarbon, PAH)降解细菌鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)、微球菌属(*Micrococcus*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)和罗尔斯通氏菌属(*Ralstonia*)^[27]显著富集。非肌层浸润性膀胱癌(non-muscle-invasive bladder cancer, NMIBC)是最常见的 UCB^[28-29], 在 NMIBC 患者尿液中贪铜菌属(*Cupriavidus*)的丰度高, 肌层浸润性膀胱癌(muscle-invasive bladder cancer, MIBC)患者尿液中嗜血杆菌属(*Haemophilus*)和韦荣氏球菌属的丰度高^[26]。

在 UCB 患者肿瘤组织内部, 阿克曼氏菌属(*Akkermansia*)、拟杆菌属(*Bacteroides*)、狭义梭菌属(*Clostridium sensu stricto*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)、克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)^[20]、疮疱表皮杆菌状菌(*Cutibacterium acnes*)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)和恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)^[30]等细菌最为丰富。NMIBC 和 MIBC 患者肿瘤组织内部的微生物群存在显著差异, NMIBC 肿瘤组织内部的微生物多样性显著高于 MIBC 肿瘤组织内部^[31]。

男性 UCB 患者尿液中棒杆菌属、芬沟德氏菌属(*Fingoldia*)^[26]、韦荣氏球菌属和小弯杆菌属(*Varibaculum*)^[32]等细菌更丰富, 男性 UCB 复发患者中段尿中假单胞菌属、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、棒杆菌属和不动杆菌属显著富

集^[33]，而且尿液微生物多样性较低的患者无复发生存期长^[33]。女性 UCB 患者尿液中乳杆菌属、放线棒状菌属(*Actinotignum*)、普雷沃氏菌属(*Prevotella*)、弯曲杆菌属(*Campylobacter*)和肠球菌属(*Enterococcus*)等细菌丰度较高^[26]。

2 微生物在 UCB 发生发展中的作用及其分子机制

2.1 尿路感染(urinary tract infection, UTI)与癌症发生

UTI能够增加患UCB的风险^[34]。大多数UTI是由尿路致病性大肠埃希氏菌(uropathogenic *Escherichia coli*, UPEC)引起的^[35]，UPEC UT189菌株会使周期素依赖性激酶抑制因子 2A [cyclin-dependent kinase inhibitor 2A, *CDKN2A* (p16^{INK4A})]

甲基化，导致其表达减少，加快尿路上皮细胞增殖，增加病原体感染的持久性，增加 UTI 的复发风险，促进 UCB 发展^[36]。同时，该菌株也会下调尿路上皮细胞中 O⁶-甲基鸟嘌呤-DNA-甲基转移酶(O⁶-methylguanine-DNA-methyltransferase, MGMT)基因的表达，增加 DNA 复制出错的概率，导致抑癌基因突变，促进 UCB 发展^[36]。UPEC UT189 菌株会产生基因毒素 Colibactin 损伤尿路上皮细胞的 DNA，促进基因突变的积累，在长期 UTI 中增加患 UCB 的风险^[37]。尿路致病性无乳链球菌(uropathogenic *Streptococcus agalactiae*, UPSA) 807 菌株会产生 β-溶血素/溶细胞素(β-hemolysin/cytolysin, β-H/C)溶解尿路上皮细胞，并产生大量细胞因子诱导促炎反应，影响 UCB 的发展^[38](图 1)。

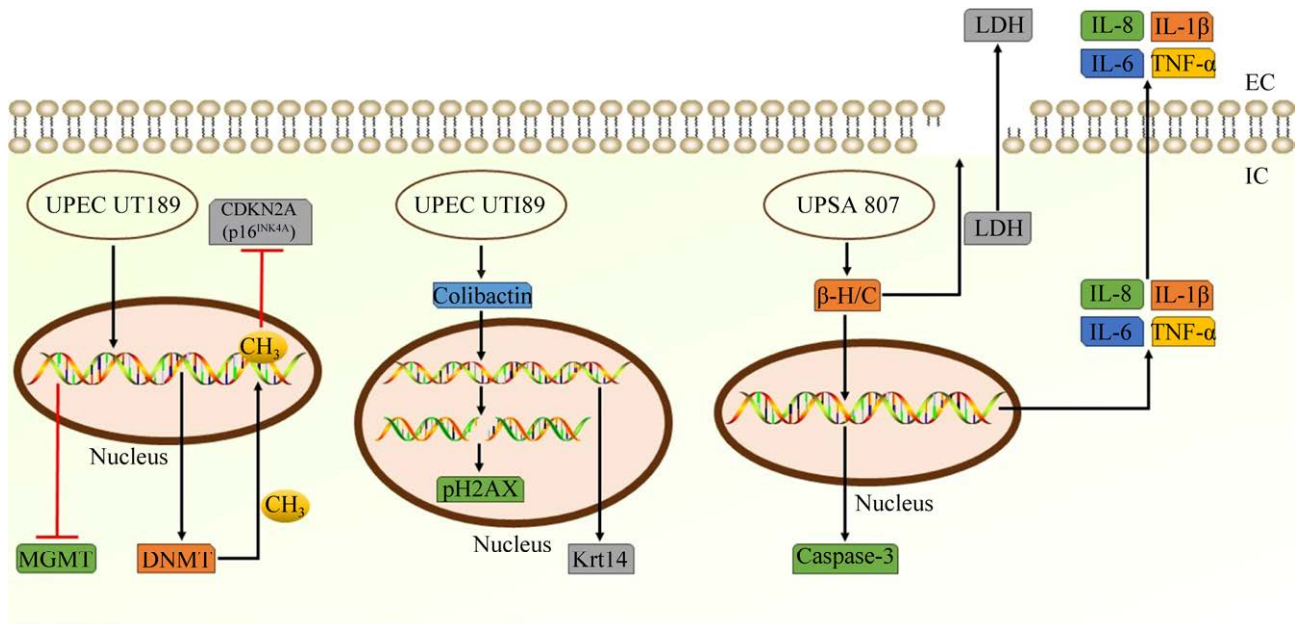


图 1 UTI 致癌的分子机制

Figure 1 Molecular mechanism of carcinogenesis of UTI. A bladder urothelial cell model is displayed. Graphical description of microbial damage to bladder urothelial cells. UPEC: Uropathogenic *Escherichia coli*; MGMT: O⁶-methylguanine-DNA-methyltransferase; DNMT: *De novo* methyltransferase; CDKN2A (p16^{INK4A}): Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A; Krt14: Keratin-14; UPSA: Uropathogenic *Streptococcus agalactiae*; β-H/C: β-hemolysin/cytolysin; LDH: Lactic dehydrogenase; IL-8: Interleukin-8; IL-1β: Interleukin-1β; IL-6: Interleukin-6; TNF-α: Tumor necrosis factor-α; EC: Extracellular; IC: Intracellular.

UPEC 通过增加 UTI 的复发风险以及导致抑癌基因突变来促进 UCB 的发展^[36]。Tolg 等^[36]将 UPEC UT189 菌株在体外与人 UCB 5637 细胞系共培养, 将未接种细菌的细胞系作为对照组。在共培养 6 d 后检测细胞系中基因的相对表达量和 DNA 甲基化程度^[36]。结果表明, UPEC UT189 菌株在尿路上皮细胞内增殖, 并且细胞系内 *de novo* DNA 甲基转移酶(*de novo* methyltransferase, DNMT)的活性是对照组的 12.5 倍, *DNMT1* mRNA 的水平是对照组的 6 倍, *CDKN2A* (p16^{INK4A}) mRNA 水平比对照组低 3.3 倍, *MGMT* mRNA 水平比对照组显著下调^[36]。焦磷酸测序显示 *CDKN2A* (p16^{INK4A}) 基因外显子 1 的甲基化增加, 是对照组的 3.8 倍^[36]。DNMT 与 DNA 的甲基化相关, DNMT1 表达上调会增强 DNMT 的活性, 使 *CDKN2A* (p16^{INK4A}) 基因甲基化增加, 导致该基因表达减少, 进而促进细胞周期素依赖性激酶 4 (cyclin-dependent kinase 4, CDK4) 和 CDK6 对 Rb 蛋白的磷酸化, 从而促进尿路上皮增殖, 增强病原体感染的持久性, 增加 UTI 的复发风险, 促进 UCB 发展^[36]。MGMT 是一种 DNA 修复关键酶, 其可以修复鸟嘌呤 O⁶ 位的烷基化损伤, 防止抑癌基因突变^[36]。MGMT 表达减少则增加了 DNA 复制出错的概率, 导致抑癌基因突变, 增加 UTI 的复发风险, 促进 UCB 的发展^[36]。

此外, UPEC 通过产生基因毒素 Colibactin 损伤 DNA, 导致基因突变的积累, 增加患 UCB 的风险^[37]。pks⁺大肠埃希氏菌含有 54 kb 的 *pks* 基因岛, 能够产生 Colibactin^[39]。Chagneau 等^[37]收集了 223 名肾盂肾炎、膀胱炎和无症状菌尿患者的尿样, 通过 LC-MS/MS 在 55 名患者的尿样中检测到 C14-Asn (Colibactin 的前体物质通过 C1bP 酶切割后产生 C14-Asn 和有活性的

Colibactin), 这表明产 Colibactin 的 UPEC 可能在 UTI 中发挥重要作用。研究者使用 UPEC UT189 菌株尿路感染 6-8 周龄的雌性 C3H/HEN 小鼠, 分别于 6 h 和 24 h 处死小鼠, 取膀胱进行组织学和免疫荧光分析以及荧光原位杂交^[37]。结果表明, 与 UPEC UT189 Δ *c1bP* 菌株相比, UPEC UT189 菌株在感染 6 h 后侵入到膀胱尿路上皮浅层伞状细胞中, 并在其细胞核中检测到 pH2AX 蛋白, 感染 24 h 后在小鼠的尿液中检测到 C14-Asn, 这表明 UTI 的早期阶段 Colibactin 就在膀胱尿路上皮浅层伞状细胞中表达^[37]。Colibactin 会导致 DNA 的 2 条链烷基化, 产生 DNA 链间交联, 使宿主细胞将 H2AX 组蛋白磷酸化为 pH2AX 蛋白, 诱导 DNA 损伤, 导致基因突变的积累, 在长期 UTI 中增加患 UCB 的风险^[37]。同时, 研究者还发现在 UPEC UT189 菌株感染 24 h 后, 膀胱尿路上皮基底角蛋白-14 (keratin-14, Krt14) 阳性(Krt14⁺)的祖细胞增加, 并检测到 pH2AX 蛋白^[37]。因此, Colibactin 能够诱导膀胱尿路上皮浅层伞状细胞和膀胱尿路上皮基底再生细胞的 DNA 损伤, 导致基因突变的积累^[37]。长期 UTI 与患 UCB 的风险相关^[37]。

UPSA 通过溶解尿路上皮细胞以及诱导促炎反应来影响 UCB 的发展^[38,40]。Leclercq 等^[38]从女性急性无并发症膀胱炎患者的尿液中培养出 UPSA 807 菌株, 并在体外感染人 UCB 5637 细胞系和从 U937 单核细胞成熟的单核细胞源性巨噬细胞(monocyte-derived macrophages, MDMs)。结果表明, 使用 UPSA 807 菌株感染 6 h 后, β -H/C 会诱导人 UCB 5637 细胞系产生白细胞介素-8 (interleukin-8, IL-8)、IL-1 β 和 IL-6, 诱导 MDMs 产生 IL-8、IL-1 β 和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α), 这表明 UPSA 807 菌株诱导了促炎反应^[38]。使用 UPSA 807 菌株感染 24 h 后,

在 β -H/C 的影响下, 其能够黏附和侵入人 UCB 5637 细胞系和 MDMs, 造成 Caspase-3 激活^[38]。同时 β -H/C 会溶解细胞, 导致乳酸脱氢酶(lactic dehydrogenase, LDH)的快速释放, 促进 UCB 的发展^[38]。随后, 研究者使用 UPSA 807 菌株尿路感染 8–10 周龄的雌性 C57BL/6 小鼠, 分别于 6 h 和 24 h 采集尿液和膀胱组织进行分析^[38]。结果表明, 使用 UPSA 807 菌株感染 6 h 后, 在 β -H/C 的影响下, 其能够在小鼠膀胱中诱导大量的角质形成细胞衍生趋化因子(KC)、调节激活正常 T-细胞表达分泌因子(rantes)、粒细胞集落刺激因子(granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF)、巨噬细胞炎症蛋白-1 α (macrophage inflammatory protein-1 α , MIP-1 α)和 IL-6 产生^[38]。使用 UPSA 807 菌株感染 24 h 后, 在 β -H/C 的影响下, 其能够在小鼠膀胱中产生大量中性粒细胞浸润, 诱导促炎反应, 影响 UCB 的发展^[38]。

总之, UTI 主要是由 UPEC UT189 菌株、UPEC UT189 菌株和 UPSA 807 菌株引起, 这些微生物通过损伤尿路上皮细胞的 DNA、促进基因突变、溶解尿路上皮细胞以及诱导促炎反应增加患者患 UCB 的风险。

2.2 上皮-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)

EMT 会增加细胞的移动性并降低细胞之间的黏附, 可能导致肿瘤细胞的转移^[41-42]。在 EMT 过程中, 上皮细胞转化为间充质细胞, 使它们从基底膜分离并侵袭附近的组织^[43]。在云南省第一人民医院(昆明理工大学附属医院)泌尿外科前期的研究中, 发现 BC 组织中 YAP 基因表达量升高^[44], 参与 EMT 进程^[45-46], 促进肿瘤细胞的转移^[44]。目前越来越多的研究发现肿瘤细胞与其微环境之间的相互作用可能会影响 UCB 的发展^[47]。膀胱肿瘤组织中的微生物群可能和 EMT

过程相关。大肠埃希氏菌会上调尿路上皮细胞中波形蛋白以及肿瘤干细胞(cancer stem cell, CSC)相关基因(*CD44*、*SOX2*、*NANOG* 和 *OCT4*)的表达, 下调细胞角蛋白 19 (cytokeratin 19, CK19)的表达^[48]。这些变化会降低尿路上皮细胞之间的黏附性, 诱导肿瘤干细胞样表型, 破坏尿路上皮细胞结构的完整性, 促进 UCB 的发展^[48]。大肠埃希氏菌还会通过产生活性氧(reactive oxygen species, ROS)改变尿路上皮细胞代谢, 使线粒体功能畸变, 并促进乳酸运送到细胞外基质(extracellular matrix, ECM)中, 加快细胞增殖, 改变细胞形态, 促进 UCB 的发生和发展^[48]。真杆菌属(*Eubacterium* sp.) CAG:581 菌株会上调 NMIBC 类器官中细胞外基质蛋白 1 (extracellular matrix protein 1, ECM1)表达, 促进细胞外调节蛋白激酶 1/2 (extracellular regulated protein kinases 1/2, ERK1/2)磷酸化, 进而诱导基质金属蛋白酶 9 (matrix metalloproteinase 9, MMP9)的表达, 最终水解 ECM 蛋白, 促进肿瘤的生长和转移^[28](图 2)。

大肠埃希氏菌通过促进 EMT 过程以及加快肿瘤细胞的增殖来促进 UCB 的发生和发展^[48]。Abd-El-Raouf 等^[48]从 UCB 患者尿液中分离出大肠埃希氏菌, 使用该细菌在体外感染人 UCB T24 细胞系, 检测细胞系中 EMT 相关蛋白的含量和表达量、CSC 相关基因的表达量、ROS 的含量以及代谢重编程相关基因的表达量。结果表明, 在大肠埃希氏菌感染 4 d 后, 人 UCB T24 细胞系中波形蛋白阳性染色平均百分比从 36%增加至 65%, CK19 的表达量从 79%减少至 51%, CSC 相关基因(*CD44*、*SOX2*、*NANOG* 和 *OCT4*)的表达显著上调^[48]。波形蛋白的表达增加使人 UCB T24 细胞系变得细长, 细胞与细胞之间的黏附性

降低，运动性增加，促进肿瘤细胞的转移^[48]。CK19 表达下调表明上皮细胞结构的完整性丧失，会促进 EMT 过程^[48]。CSC 相关基因的表达显著上调，表明大肠埃希氏菌的感染会诱导肿瘤干细胞样表型^[48]。同时，人 UCB T24 细胞系中 ROS 含量升高，导致解偶联蛋白 2 (uncoupling protein 2, UCP2)表达上调，进而导致丙酮酸脱氢酶激酶 1 (pyruvate dehydrogenase kinase 1, PDK1)表达上调，从而导致丙酮酸脱氢酶磷酸酶 (pyruvate dehydrogenase phosphatase, PDH)表达下调，最终使人 UCB T24 细胞系的代谢发生变化^[48]。该代谢变化能够阻止丙酮酸进入三羧酸

循环，减少丙酮酸转化为乙酰辅酶 A，进而抑制氧化磷酸化，促进糖酵解，加快肿瘤细胞的增殖^[48]。该代谢变化也会导致线粒体功能畸变和 AMP 活化蛋白激酶 (protein kinase AMP-activated, AMPK)表达下调，进而减弱肿瘤细胞对能量状态的感知，帮助肿瘤细胞通过糖酵解生成能量，加快肿瘤细胞的增殖^[48]。该代谢变化还会导致肿瘤细胞中丙二酰辅酶 A-酰基载体蛋白转酰基酶 (malonyl-CoA-acyl carrier protein transacylase, MCT1)表达上调，该蛋白质能够将乳酸运送到 ECM 中，进而改变细胞形态，促进 EMT 过程^[48]。

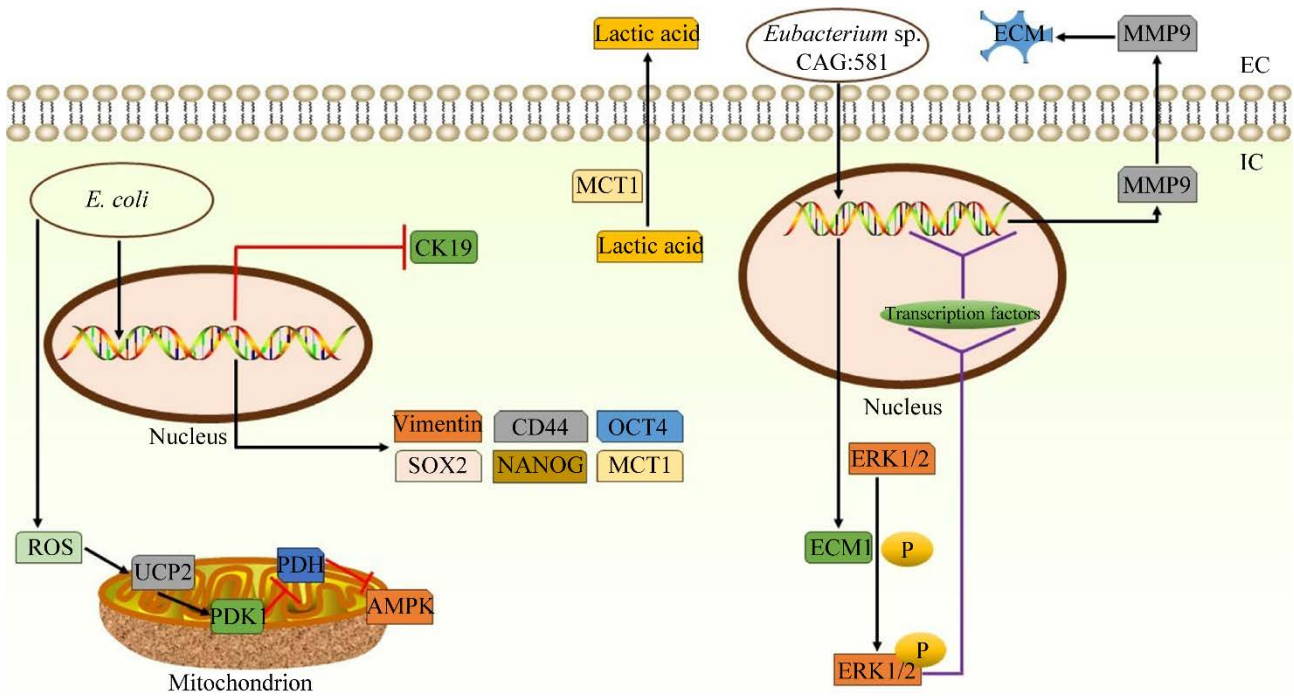


图 2 微生物影响 EMT 促进 UCB 发展的分子机制

Figure 2 Molecular mechanism of microbial influence on EMT promoting the development of UCB. A bladder urothelial cell model is displayed. Graphical description of microorganisms promoting tumor cell growth and metastasis. *E. coli*: *Escherichia coli*; ROS: Reactive oxygen species; UCP2: Uncoupling protein 2; PDK1: Pyruvate dehydrogenase kinase 1; PDH: Pyruvate dehydrogenase phosphatase; AMPK: Protein kinase AMP-activated; MCT1: Malonyl-CoA-acyl carrier protein transacylase; CK19: Cytokeratin 19; ECM1: Extracellular matrix protein 1; ERK1/2: Extracellular regulated protein kinases 1/2; MMP9: Matrix metalloproteinase 9; ECM: Extracellular matrix; EC: Extracellular; IC: Intracellular.

研究表明,真杆菌属 CAG:581 菌株通过上调 ECM1 和 MMP9 的表达促进 NMIBC 类器官的发展^[28]。Zhang 等^[28]分析比较了 51 名 NMIBC 患者和 47 名健康人中段尿微生物群差异,发现 NMIBC 患者中段尿中真杆菌属 CAG:581 菌株丰度高。研究者进一步模拟 NMIBC 类器官与真杆菌属 CAG:581 菌株共培养,并分析组织的差异基因表达,结果表明真杆菌属 CAG:581 菌株上调 ECM1 的表达,促进 ERK1/2 磷酸化,并显著上调 MMP9 的表达^[28]。ECM1 可以促进肿瘤生长^[28]。ERK1/2 信号的磷酸化可以调节许多转录因子,这些转录因子可以激活大量 MMPs 的转录^[28]。MMP9 对 ECM 蛋白具有水解活性,能够增强肿瘤的生长和转移^[28]。此外,该研究还表明真杆菌属 CAG:581 菌株可用于 NMIBC 的早期诊断和预后^[28]。

总之,大肠埃希氏菌和真杆菌属 CAG:581 菌株会通过降低尿路上皮细胞之间的黏附、破坏尿路上皮细胞的结构以及加快尿路上皮细胞的增殖来促进 UCB 的发生和发展。此外,在 EMT 过程中,微生物自身的代谢通路还值得进一步深入研究。

2.3 细胞程序性死亡-配体 1 (programmed cell death 1 ligand 1, PD-L1)表达

PD-L1 主要通过 T 细胞和 B 细胞表面的程序性死亡受体(programmed cell death protein 1, PD-1)结合来促进细胞凋亡,进而抑制宿主免疫功能,实现肿瘤免疫逃逸^[49]。微生物群可能上调 PD-L1 在肿瘤组织中的表达来影响 UCB 的发展^[49](图 3)。

Chen 等^[49]收集了 28 名男性 NMIBC 患者的中段尿和肿瘤组织。将肿瘤组织固定和包埋后,使用小鼠单克隆抗 PD-L1 抗体进行免疫组织化学染色^[49]。同时分析 PD-L1 阳性和阴性患者中段尿微生物群的差异^[49]。结果表明,在 9 例肿瘤组织 PD-L1 阳性患者的中段尿中,纤毛菌属(*Leptotrichia*)、棒杆菌属、丙酸杆菌属(*Propionibacterium*)、皮杆菌科(*Dermabacteraceae*)、小短杆菌属(*Brachybacterium*)、玫瑰单胞菌属(*Roseomonas*)、红螺菌科(*Rhodospirillaceae*)和噬染料菌属(*Pigmentiphaga*)的丰度较高,提示可能与肿瘤组织中 PD-L1 表达上调有关^[49]。

总之,微生物可能通过上调肿瘤组织中 PD-L1 的表达导致免疫细胞凋亡,从而促进 NMIBC 的

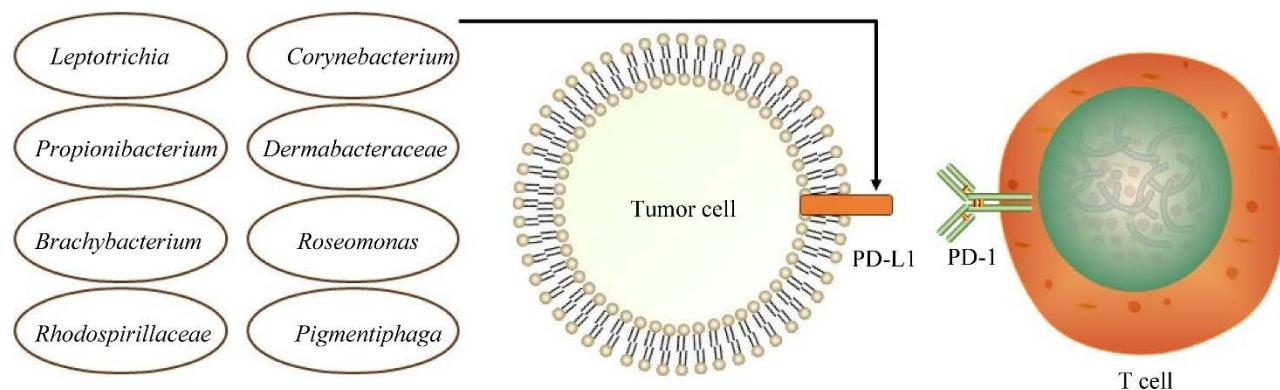


图 3 微生物上调 PD-L1 表达造成肿瘤细胞免疫逃逸的分子机制

Figure 3 Molecular mechanism of tumor cell immune escape caused by microbial up-regulation of PD-L1 expression. Graphical description of PD-L1 and PD-1 binding promoting apoptosis of immune cells. PD-L1: Programmed cell death 1 ligand 1; PD-1: Programmed cell death protein 1.

复发和发展。此外,微生物上调肿瘤组织 PD-L1 表达的分子机制以及在上调肿瘤组织 PD-L1 的表达中,微生物自身的代谢通路还值得进一步深入研究。

3 微生物在 UCB 预防和治疗中的作用

3.1 BCG

NMIBC 复发风险为 50%–70%,约 15%发展为 MIBC^[50]。高危 NMIBC 患者 5 年复发风险高达 80%^[51]。对于低危 NMIBC 患者,经尿道膀胱肿瘤切除术(transurethral resection of bladder tumor, TUR-BT)和术后化疗就可以治愈^[52],对于中高危 NMIBC 患者,在术后还需要膀胱内免疫治疗(BCG)或膀胱内化疗^[14,29]。TUR-BT 术后进行 BCG 灌注治疗可降低约 50%复发的概率^[53],使用 BCG 的膀胱内免疫疗法是中高风险 NMIBC 辅助治疗的金标准^[21,54]。同时,在云南省第一人民医院(昆明理工大学附属医院)泌尿外科的临床实践中发现,与电切术相比,1 470 nm 半导体激光手术治疗 NMIBC 安全性高,复发率低^[55]。

BCG 是由结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)通过减毒后制成的活菌疫苗,1976 年 Morales 等首次报道 BCG 作为免疫制剂用于治疗 UCB^[56]。研究表明^[57],30%–50%的 NMIBC 患者对 BCG 无应答。膀胱内的共生微生物会影响 BCG 发挥作用^[58]。奶酪乳酪杆菌(*Lactocaseibacillus casei*) BL23 菌株^[59]、罗伊特氏黏液乳杆菌(*Limosilactobacillus reuteri*) 1063 菌株^[60]和懒惰乳杆菌(*Lactobacillus iners*) AB-1 菌株^[61]等乳杆菌能够和尿路上皮细胞中的纤连蛋白黏附,可能会饱和 BCG 使用的位点,导致 BCG 无法通过纤连蛋白进入尿路上皮细胞中,

从而降低 BCG 的疗效^[14]。

此外,在 NMIBC 患者膀胱中使用 BCG 和其他化疗药物会降低导尿管尿液中的细菌丰度,该变化可能会影响 NMIBC 患者的预后^[62]。使用 BCG 和其他化疗药物后,复发患者导尿管尿液中气球菌属(*Aerococcus*)相对丰度较高,未复发患者脲支原体属(*Ureaplasma*)、埃希氏菌/志贺氏菌属(*Escherichia/Shigella*)相对丰度较高^[62]。

3.2 鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella enterica* subsp. *Typhimurium*) χ 11218 菌株介导的 P53 基因功能恢复

P53 基因功能的恢复是一种潜在的 UCB 抗癌策略^[63]。Pérez 等^[63]将野生型 P53 基因与真核表达载体 pYA4545 相连接,构建 pYA4545P53 载体,电击转化至鼠伤寒沙门氏菌 χ 11218 菌株,获得重组鼠伤寒沙门氏菌 χ 11218 pYA4545P53 菌株。将该重组菌株在体外转移至人 UCB 5637 细胞系(表达突变且无功能的 P53 蛋白)中,用来恢复野生型 P53 蛋白的功能^[63]。结果表明,将该重组菌株导入至人 UCB 5637 细胞系后其存活率下降 14%–64%,存活率显著降低,具有抗癌的功能^[63]。此外,鼠伤寒沙门氏菌 χ 11218 菌株表现为阿拉伯糖调节的延迟衰减表型,在接种时其表现出免疫原性,但由于在细胞内缺乏阿拉伯糖,所以细菌会自动裂解,这就解决治疗后细菌清除的问题,表明该细菌治疗是安全的,并为 UCB 的治疗提供新思路^[63]。

3.3 益生菌

鸡盲肠丁酸球菌(*Butyricicoccus pullicaecorum*)及其代谢产物具有抗 UCB 作用^[64]。Wang 等^[64]将鸡盲肠丁酸球菌通过肛门注射到 4–6 周龄的雄性 C3H/He 小鼠肠道中,结果表明,小鼠膀胱尿路上皮细胞中短链脂肪酸(short-chain fatty acid, SCFA)相关基因(*Gpr43*、*Gpr109b* 和 *Fabp4* 等)表达上调。*Gpr43* 能够被 SCFA 激活,从而

提高各种组织的抗炎活性^[64]。GPR109B 蛋白是抑制脂解的受体,能够保护膀胱尿路上皮细胞^[64]。脂肪酸结合蛋白 4 (fatty acid binding protein 4, FABP4)过度表达能够抑制肿瘤细胞的生长和侵袭^[64]。因此,补充鸡盲肠丁酸球菌具有抗癌作用^[64]。研究认为,鸡盲肠丁酸球菌可能通过产生丁酸盐而发挥抗癌作用^[64]。研究者将丁酸钠(sodium butyrate, NaB)在体外处理人 UCB HT1376 细胞系,结果表明, *Gpr43*、*Gpr109b* 和 *Fabp4* 的 mRNA 水平显著上调,分别是未经 NaB 处理的 11.4、2.8 和 107.7 倍,表明 NaB 具有抗癌作用^[64]。同时,BC 相关蛋白(bladder cancer-associated protein, BLCAP)和 Fas 配体(Fas Ligand, FasL)的表达量显著上调,分别是未经 NaB 处理的 29.2 倍和 2.9 倍,从而促进细胞凋亡^[64]。此外,周期蛋白依赖性激酶 1 (cyclin-dependent kinase 1, CDK1)的表达量显著下调,是未经 NaB 处理的 0.5 倍,表明经 NaB 处理阻碍了细胞的增殖^[64]。因此,鸡盲肠丁酸球菌通过产生丁酸盐介导对 UCB 的抗癌作用^[64]。

习惯性摄入乳杆菌属能降低罹患 UCB 的风险^[65-66],而且奶酪乳酪杆菌制剂能够预防 NMIBC 复发^[67-68]。Naito 等^[69]研究发现,对 TUR-BT 术后患者膀胱内灌注表阿霉素同时配合口服奶酪乳酪杆菌制剂,3 年无复发率高达 74.6%,表明这是一种新型、有前景的治疗方法。Miyake 等^[70]在患 UCB 的 5 周龄的雄性 C3H 小鼠腹腔中注射化疗药物并口服补充奶酪乳酪杆菌 Shirota YIT 9029 菌株和短双歧杆菌 (*Bifidobacterium breve*) Yakult 菌株能明显减缓肿瘤生长。Kandasamy 等^[71]使用基因工程改造鼠李糖乳酪杆菌 (*Lactocaseibacillus rhamnosus*) GG 菌株,使其能够分泌前列腺特异性抗原(prostate specific antigen, PSA)和 IL-15。结果表明,在体外能够激活抗原特异性免疫反应,能够用于治疗

BC^[71]。Kitagawa 等^[72]研究发现口服双歧杆菌属 (*Bifidobacterium*) 为载体的癌症疫苗能够抑制患 UCB 的雌性 C3H/He 小鼠膀胱肿瘤的生长。

4 总结与展望

本文总结了膀胱和尿液等泌尿系统微生物与 UCB 之间的关系。传统上,人们认为膀胱是无菌环境,但是随着下一代测序技术的发展,膀胱内的微生物逐渐被发现,人们也越来越关注微生物对 UCB 的致病作用。健康人群与 UCB 患者的尿液微生物群和膀胱微生物群存在显著差异,而且 NMIBC 肿瘤组织内部的生物多样性显著高于 MIBC 肿瘤组织内部。本课题组正在研究 UCB 患者 TUR-BT 术前和术后尿液微生物群差异,分析复发患者尿液微生物群特征,以期找到云南地域特性生物标志物。在未来需要深入研究微生物群在健康人群和 UCB 患者中的差异,找到 UCB 的生物标志物,更快更准确地预测和诊断 UCB。

部分微生物感染会引起泌尿系统炎症,并且可能最终引起癌症。UPEC UT189 菌株感染人 UCB 5637 细胞系后会增加 DNA 复制出错的概率,并导致 DNA 甲基化,影响抑癌基因的表达,增加 UTI 的复发风险,促进 UCB 的发展。UPEC UT189 菌株会产生基因毒素 Colibactin,能够诱导 C3H/HEN 小鼠膀胱尿路上皮浅层伞状细胞和膀胱尿路上皮基底再生细胞的 DNA 损伤,导致基因突变的积累,在长期 UTI 中增加患 UCB 的风险。UPSA 807 菌株感染人 UCB 5637 细胞系和 C57BL/6 小鼠后均会诱导促炎反应,影响 UCB 的发展。同时,大肠埃希氏菌和真杆菌属 CAG:581 菌株通过影响 EMT 过程增加尿路上皮细胞的移动性,降低尿路上皮细胞之间的黏附,改变尿路上皮细胞的形态,促进肿瘤细胞的转移和迁移。此外,纤毛菌属、棒杆菌属、丙酸杆菌

属、皮杆菌科、小短杆菌属、玫瑰单胞菌属、红螺菌科和噬染料菌属还可能通过上调肿瘤组织中 PD-L1 的表达使其发生免疫逃逸。在未来需要深入研究微生物群与 UCB 之间的关系, 阐明分子致病机制, 并有针对性地治疗。

中高危 NMIBC 患者大多是通过 TUR-BT 术后膀胱内灌注 BCG 治疗, 但是 BCG 的副作用较大, 而且有患者对 BCG 无应答。重组鼠伤寒沙门氏菌 $\chi 11218$ pYA4545P53 菌株介导的 P53 蛋白功能恢复能降低人 UCB 5637 细胞系的存活率, 为 UCB 的治疗提供了新思路。使用基因工程改造后的鼠李糖乳酪杆菌 GG 菌株也表明具有治疗 BC 的潜力。同时, 口服鸡盲肠丁酸球菌、乳杆菌属、奶酪乳酪杆菌制剂、奶酪乳酪杆菌 Shirota YIT 9029 菌株、短双歧杆菌 Yakult 菌株和以双歧杆菌属为载体的癌症疫苗具有预防及治疗 UCB 的作用。使用微生物治疗 UCB 具有副作用小、效果明显等特点, 但是目前应用得较少。在未来可以根据 UCB 的发生和发展机制, 使用基因工程的方法改造特定微生物, 从而替代 BCG, 更有效地治疗 UCB。

参考文献

- [1] LI Y, YOUSSEF SF, BUANZ AB. Intravesical combination therapies for non-muscle invasive bladder cancer: recent advances and future directions[J]. *European Journal of Pharmacology*, 2022, 926: 175024.
- [2] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL RL, LAVERSANNE M, SOERJOMATARAM I, JEMAL A, BRAY F. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA: a Cancer Journal for Clinicians*, 2021, 71(3): 209-249.
- [3] HUANG XX, PAN T, YAN LL, JIN T, ZHANG RN, CHEN B, FENG J, DUAN T, XIANG Y, ZHANG MM, CHEN XY, YANG ZY, ZHANG WZ, DING X, XIE T, SUI XB. The inflammatory microenvironment and the urinary microbiome in the initiation and progression of bladder cancer[J]. *Genes & Diseases*, 2020, 8(6): 781-797.
- [4] 唐芮鹏, 易正金, 肖川, 王树斌, 罗云, 魏绪磐, 朱光强, 万里. 经尿道膀胱肿瘤黏膜下剥离术联合术中膀胱黏膜下注射吉西他滨治疗膀胱非肌层浸润性尿路上皮癌的疗效观察(附 7 例报告)[J]. *重庆医科大学学报*, 2023, 48(8): 894-897.
TANG RP, YI ZJ, XIAO C, WANG SB, LUO Y, WEI XP, ZHU GQ, WAN L. Efficacy of transurethral submucosal dissection of bladder tumor combined with intraoperative bladder submucosal injection of gemcitabine in treatment of non-muscle invasive urothelial bladder cancer: a report of seven cases[J]. *Journal of Chongqing Medical University*, 2023, 48(8): 894-897 (in Chinese).
- [5] 贺宇彤, 李道娟, 梁迪, 郑荣寿, 张思维, 曾红梅, 陈万青, 赫捷. 2014 年中国膀胱癌发病和死亡分析[J]. *中华肿瘤杂志*, 2018, 40(9): 647-652.
HE YT, LI DJ, LIANG D, ZHENG RS, ZHANG SW, ZENG HM, CHEN WQ, HE J. Incidence and mortality of bladder cancer in China, 2014[J]. *Chinese Journal of Oncology*, 2018, 40(9): 647-652 (in Chinese).
- [6] 赵有利. SPARCL1 对膀胱癌发生发展的作用和机制研究[D]. 兰州: 兰州大学博士学位论文, 2021.
ZHAO YL. Study on the role and mechanism of SPARCL1 in the occurrence and development of bladder cancer[D]. Lanzhou: Doctoral Dissertation of Lanzhou University, 2021 (in Chinese).
- [7] 梁美丹, 张文武, 李峰, 宁鑫. 膀胱去分化脂肪肉瘤 1 例报告[J]. *现代泌尿外科杂志*, 2022, 27(3): 275-276.
LIANG MD, ZHANG WW, LI F, NING X. Dedifferentiated liposarcoma of bladder: a case report[J]. *Journal of Modern Urology*, 2022, 27(3): 275-276 (in Chinese).
- [8] 张治国, 王玉. 表柔比星、吉西他滨膀胱灌注化疗在浅表性膀胱尿路上皮癌患者中的应用效果比较[J]. *临床医学研究与实践*, 2022, 7(16): 66-70.
ZHANG ZG, WANG Y. Comparison of application effects of intravesical instillation chemotherapy with epirubicin and gemcitabine in patients with superficial bladder urothelial carcinoma[J]. *Clinical Research and Practice*, 2022, 7(16): 66-70 (in Chinese).
- [9] ZHANG WT, YANG FH, MAO SY, WANG RL, CHEN HT, RAN YF, LIU SH, WU PF, YAN Y, LI W, ZHANG JF, YAO XD. Bladder cancer-associated microbiota: recent advances and future perspectives[J]. *Heliyon*, 2023, 9(1): e13012.

- [10] 李登雄, 白云金, 唐寅, 韩平. 尿路微生物与膀胱癌的相关性研究进展[J]. 华西医学, 2021, 36(7): 986-989.
LI DX, BAI YJ, TANG Y, HAN P. Research progress on the relationship between urinary tract microbiome and bladder cancer[J]. West China Medical Journal, 2021, 36(7): 986-989 (in Chinese).
- [11] ZENG JR, ZHANG GH, CHEN CX, LI K, WEN YH, ZHAO J, WU P. Alterations in urobiome in patients with bladder cancer and implications for clinical outcome: a single-institution study[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2020, 10: 555508.
- [12] D'ANTONIO DL, MARCHETTI S, PIGNATELLI P, PIATTELLI A, CURIA MC. The oncobiome in gastroenteric and genitourinary cancers[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(17): 9664.
- [13] BUČEVIĆ POPOVIĆ V, ŠITUM M, CHOW CE T, CHAN LS, ROJE B, TERZIĆ J. The urinary microbiome associated with bladder cancer[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8: 12157.
- [14] ANDOLFI C, BLOODWORTH JC, PAPACHRISTOS A, SWEIS RF. The urinary microbiome and bladder cancer: susceptibility and immune responsiveness[J]. *Bladder Cancer*, 2020, 6(3): 225-235.
- [15] MARKOWSKI MC, BOORJIAN SA, BURTON JP, HAHN NM, INGERSOLL MA, MALEKI VAREKI S, PAL SK, SFANOS KS. The microbiome and genitourinary cancer: a collaborative review[J]. *European Urology*, 2019, 75(4): 637-646.
- [16] PEDERZOLI F, FERRARESE R, AMATO V, LOCATELLI I, ALCHERA E, LUCIANÒ R, NEBULONI M, BRIGANTI A, GALLINA A, COLOMBO R, NECCHI A, CLEMENTI M, MONTORSI F, MANCINI N, SALONIA A, ALFANO M. Sex-specific alterations in the urinary and tissue microbiome in therapy-naïve urothelial bladder cancer patients[J]. *European Urology Oncology*, 2020, 3(6): 784-788.
- [17] 范梁, 崔振宇, 王娅琼, 杨文增. 膀胱癌与泌尿系菌群相关性研究进展[J]. 中国癌症防治杂志, 2023, 15(1): 92-97.
FAN L, CUI ZY, WANG YQ, YANG WZ. Research progress on correlation between bladder cancer and urinary flora[J]. *Chinese Journal of Oncology Prevention and Treatment*, 2023, 15(1): 92-97 (in Chinese).
- [18] 李旭东. Eur Urol: 男性膀胱微生物状态与下尿路症状相关[J]. 现代泌尿外科杂志, 2018, 23(11): 871-872.
LI XD. Eur Urol: the microbial status of male bladder is related to lower urinary tract symptoms[J]. *Journal of Modern Urology*, 2018, 23(11): 871-872 (in Chinese).
- [19] BAJIC P, van KUIKEN ME, BURGE BK, KIRSHENBAUM EJ, JOYCE CJ, WOLFE AJ, BRANCH JD, BRESLER L, FAROOQ AV. Male bladder microbiome relates to lower urinary tract symptoms[J]. *European Urology Focus*, 2020, 6(2): 376-382.
- [20] MANSOUR B, MONYÓK Á, MAKRA N, GAJDÁCS M, VADNAY I, LIGETI B, JUHÁSZ J, SZABÓ D, OSTORHÁZI E. Bladder cancer-related microbiota: examining differences in urine and tissue samples[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10: 11042.
- [21] FRIEDRICH V, CHOI HW. The urinary microbiome: role in bladder cancer and treatment[J]. *Diagnostics*, 2022, 12(9): 2068.
- [22] LEWIS DA, BROWN R, WILLIAMS J, WHITE P, JACOBSON SK, MARCHESI JR, DRAKE MJ. The human urinary microbiome; bacterial DNA in voided urine of asymptomatic adults[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2013, 3: 41.
- [23] CURTISS N, BALACHANDRAN A, KRŠKA L, PEPPIATT-WILDMAN C, WILDMAN S, DUCKETT J. Age, menopausal status and the bladder microbiome[J]. *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology*, 2018, 228: 126-129.
- [24] MANSOUR B, MONYÓK Á, GAJDÁCS M, STERCZ B, MAKRA N, PÉNZES K, VADNAY I, SZABÓ D, OSTORHÁZI E. Bladder tissue microbiome composition in patients of bladder cancer or benign prostatic hyperplasia and related human beta defensin levels[J]. *Biomedicines*, 2022, 10(7): 1758.
- [25] LIU F, LIU AW, LU X, ZHANG ZS, XUE YP, XU JS, ZENG SX, XIONG Q, TAN HY, HE X, XU WD, SUN YH, XU CL. Dysbiosis signatures of the microbial profile in tissue from bladder cancer[J]. *Cancer Medicine*, 2019, 8(16): 6904-6914.
- [26] HUSSEIN AA, ELSAYED AS, DURRANI M, JING Z, IQBAL U, GOMEZ EC, SINGH PK, LIU S, SMITH G, TANG L, GURU KA. Investigating the association between the urinary microbiome and bladder cancer: an exploratory study[J]. *Urologic Oncology*, 2021, 39(6): 370.e9-370370.e19.

- [27] BUKAVINA L, ISALI I, GINWALA R, SINDHANI M, CALAWAY A, MAGEE D, MIRON B, CORREA A, KUTIKOV A, ZIBELMAN M, GHANNOUM M, RETUERTO M, PONSKY L, MARKT S, UZZO R, ABBOSH P. Global meta-analysis of urine microbiome: colonization of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria among bladder cancer patients[J]. *European Urology Oncology*, 2023, 6(2): 190-203.
- [28] ZHANG YH, WANG WY, ZHOU H, CUI YM. Urinary *Eubacterium* sp. CAG:581 promotes non-muscle invasive bladder cancer (NMIBC) development through the ECM1/MMP9 pathway[J]. *Cancers*, 2023, 15(3): 809.
- [29] MIN K, KIM HT, LEE EH, PARK H, HA YS. Bacteria for treatment: microbiome in bladder cancer[J]. *Biomedicines*, 2022, 10(8): 1783.
- [30] RODRIGUEZ RM, HERNANDEZ BY, MENOR M, DENG YP, KHADKA VS. The landscape of bacterial presence in tumor and adjacent normal tissue across 9 major cancer types using TCGA exome sequencing[J]. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 2020, 18: 631-641.
- [31] SUN JX, XIA QD, ZHONG XY, LIU Z, WANG SG. The bladder microbiome of NMIBC and MIBC patients revealed by 2bRAD-M[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2023, 13: 1182322.
- [32] HRBÁČEK J, TLÁSKAL V, ČERMÁK P, HANÁČEK V, ZACHOVAL R. Bladder cancer is associated with decreased urinary microbiota diversity and alterations in microbial community composition[J]. *Urologic Oncology*, 2023, 41(2): 107.e15-107.107.e22.
- [33] QIU YF, GAO YB, CHEN CX, XIE M, HUANG PC, SUN Q, ZHOU ZP, LI B, ZHAO J, WU P. Deciphering the influence of urinary microbiota on FoxP3+ regulatory T cell infiltration and prognosis in Chinese patients with non-muscle-invasive bladder cancer[J]. *Human Cell*, 2022, 35(2): 511-521.
- [34] SHEWEITA SA, ALSAMGHAN AS. Molecular mechanisms contributing bacterial infections to the incidence of various types of cancer[J]. *Mediators of Inflammation*, 2020, 2020: 4070419.
- [35] SCHULZ WA. Uropathogenic bacteria leave a mark[J]. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 2011, 91(6): 816-818.
- [36] TOLG C, SABHA N, CORTESE R, PANCHAL T, AHSAN A, SOLIMAN A, AITKEN KJ, PETRONIS A, BÄGLI DJ. Uropathogenic *E. coli* infection provokes epigenetic downregulation of CDKN2A (p16^{INK4A}) in uroepithelial cells[J]. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 2011, 91(6): 825-836.
- [37] CHAGNEAU CV, MASSIP C, BOSSUET-GREIF N, FREMEZ C, MOTTA JP, SHIMA A, BESSON C, Le FAOUDER P, CÉNAC N, ROTH MP, COPPIN H, FONTANIÉ M, MARTIN P, NOUGAYRÈDE JP, OSWALD E. Uropathogenic *E. coli* induces DNA damage in the bladder[J]. *PLoS Pathogens*, 2021, 17(2): e1009310.
- [38] LECLERCQ SY, SULLIVAN MJ, IPE DS, SMITH JP, CRIPPS AW, ULETT GC. Pathogenesis of *Streptococcus* urinary tract infection depends on bacterial strain and β -hemolysin/cytolysin that mediates cytotoxicity, cytokine synthesis, inflammation and virulence[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 29000.
- [39] BALSKEUS EP. Colibactin: understanding an elusive gut bacterial genotoxin[J]. *Natural Product Reports*, 2015, 32(11): 1534-1540.
- [40] SHING SR, RAMOS AR, PATRAS KA, RIESTRA AM, McCABE S, NIZET V, COADY A. The fungal pathogen *Candida albicans* promotes bladder colonization of group B *Streptococcus*[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2020, 9: 437.
- [41] OGAWA K, SHIMIZU Y, UKETA S, UTSUNOMIYA N, KANAMARU S. Prognosis of patients with muscle invasive bladder cancer who are intolerable to receive any anti-cancer treatment[J]. *Cancer Treatment and Research Communications*, 2020, 24: 100195.
- [42] FRANZEN CA, BLACKWELL RH, TODOROVIC V, GRECO KA, FOREMAN KE, FLANIGAN RC, KUO PC, GUPTA GN. Urothelial cells undergo epithelial-to-mesenchymal transition after exposure to muscle invasive bladder cancer exosomes[J]. *Oncogenesis*, 2015, 4(8): e163.
- [43] LI WT, IYANGAR AS, REDDY R, CHAKLADAR J, BHARGAVA V, SAKAMOTO K, ONGKEKO WM, RAJASEKARAN M. The bladder microbiome is associated with epithelial-mesenchymal transition in muscle invasive urothelial bladder carcinoma[J]. *Cancers*, 2021, 13(15): 3649.
- [44] 张宁南, 余闫宏, 肖民辉, 章卓睿, 杨峻峰. 膀胱癌中 YAP 基因的表达以及靶向干扰 YAP 对膀胱癌细胞株的调节作用[J]. *中国现代医学杂志*, 2015, 25(13): 40-42.
- ZHANG NN, YU YH, XIAO MH, ZHANG ZR, YANG

- JF. Expression of *YAP* gene in bladder cancer and regulatory role of *YAP* targeted interference on bladder cancer cell[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2015, 25(13): 40-42 (in Chinese).
- [45] 苏冠月, 余泓池, 黄雯雯, 王仁义, 胡亦清, 沈阳, 王云兵, 刘肖珩. *YAP* 参与调控细胞上皮-间充质转化的研究进展[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2018, 45(7): 705-713.
- SU GY, YU HC, HUANG WW, WANG RY, HU YQ, SHEN Y, WANG YB, LIU XH. The advance of *YAP* regulating epithelial-mesenchymal transition in cells[J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2018, 45(7): 705-713 (in Chinese).
- [46] 郭维炜. *YAP/TAZ/Cyr61* 轴在膀胱癌中调控膀胱癌细胞 EMT 的机制研究[D]. 南昌: 南昌大学硕士学位论文, 2023.
- GUO WW. Study on the Mechanism of *YAP/TAZ/Cyr61* Axis Regulating EMT of Bladder Cancer Cells in Bladder Cancer[D]. Nanchang: Master's Thesis of Nanchang University, 2023 (in Chinese).
- [47] ALFANO M, CANDUCCI F, NEBULONI M, CLEMENTI M, MONTORSI F, SALONIA A. The interplay of extracellular matrix and microbiome in urothelial bladder cancer[J]. *Nature Reviews Urology*, 2016, 13: 77-90.
- [48] ABD-EL-RAOUF R, OUF SA, GABR MM, ZAKARIA MM, EL-YASERGY KF, ALI-EL-DEIN B. *Escherichia coli* foster bladder cancer cell line progression via epithelial mesenchymal transition, stemness and metabolic reprogramming[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10: 18024.
- [49] CHEN CX, HUANG ZH, HUANG PC, LI K, ZENG JR, WEN YH, LI B, ZHAO J, WU P. Urogenital microbiota: potentially important determinant of PD-L1 expression in male patients with non-muscle invasive bladder cancer[J]. *BMC Microbiology*, 2022, 22(1): 7.
- [50] QIN C, CHEN ZH, CAO R, SHI MJ, TIAN Y. Integrated analysis of the fecal metagenome and metabolome in bladder cancer in a Chinese population[J]. *Genes*, 2022, 13(11): 1967.
- [51] JOBCZYK M, STAWISKI K, FENDLER W, RÓŻAŃSKI W. Validation of EORTC, CUETO, and EAU risk stratification in prediction of recurrence, progression, and death of patients with initially non-muscle-invasive bladder cancer (NMIBC): a cohort analysis[J]. *Cancer Medicine*, 2020, 9(11): 4014-4025.
- [52] FLAIG TW, SPIESS PE, AGARWAL N, BANGS R, BOORJIAN SA, BUYYOUNOUSKI MK, CHANG S, DOWNS TM, EFSTATHIOU JA, FRIEDLANDER T, GREENBERG RE, GURU KA, GUZZO T, HERR HW, HOFFMAN-CENSITS J, HOIMES C, INMAN BA, JIMBO M, KADER AK, LELE SM, et al. Bladder cancer, version 3.2020, NCCN clinical practice guidelines in oncology[J]. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 2020, 18(3): 329-354.
- [53] 余波, 张能, 黄翔, 付逆, 罗旭. 高危非肌层浸润性膀胱癌的膀胱灌注治疗[J]. *现代医药卫生*, 2016, 32(3): 383-386.
- YU B, ZHANG N, HUANG X, FU N, LUO X. Bladder perfusion therapy for high-risk non-muscular invasive bladder cancer[J]. *Journal of Modern Medicine & Health*, 2016, 32(3): 383-386 (in Chinese).
- [54] LENIS AT, LEC PM, CHAMIE K, MSHS MD. Bladder cancer: a review[J]. *JAMA*, 2020, 324(19): 1980-1991.
- [55] 杨茂林, 余闫宏, 章卓睿, 肖民辉, 张宁南. 半导体激光与等离子电切术治疗浅表性膀胱肿瘤的疗效比较[J]. *重庆医学*, 2017, 46(13): 1762-1764, 1767.
- YANG ML, YU YH, ZHANG ZR, XIAO MH, ZHANG NN. Comparative study of diode laser and plasma kinetic resection for treating superficial bladder tumor[J]. *Chongqing Medicine*, 2017, 46(13): 1762-1764, 1767 (in Chinese).
- [56] 傅晓仪, 骆阳, 孟民杰. 卡介苗灌注治疗膀胱肿瘤的方案研究进展[J]. *广东化工*, 2019, 46(5): 120-121.
- FU XY, LUO Y, MENG MJ. Progress in the research of irrigation BCG on treatment bladder tumor[J]. *Guangdong Chemical Industry*, 2019, 46(5): 120-121 (in Chinese).
- [57] 张栋, 金讯波. 卡介苗灌注治疗膀胱肿瘤的疗效预测标志物及其研究进展[J]. *泌尿外科杂志(电子版)*, 2014, 6(2): 33-37.
- ZHANG D, JIN XB. Predictive markers and research progress of BCG perfusion in the treatment of bladder tumor[J]. *Journal of Urology for Clinicians (Electronic Version)*, 2014, 6(2): 33-37 (in Chinese).
- [58] LONE Z, KNORR J, WERNEBURG G, ADLER A, AGUDELO J, CAMPBELL R, BAJIC P, ALMASSI N, the bladder tumor microbiome WEIGHT C, PASCAL-HABER G, MILLER A, LEE B. pd25-08 may augment response to bcg in non-muscle invasive bladder cancer[J]. *Journal of Urology*, 2023, 209(Supplement 4): E732-E732.

- [59] MUÑOZ-PROVENCIO D, PÉREZ-MARTÍNEZ G, MONEDERO V. Characterization of a fibronectin-binding protein from *Lactobacillus casei* BL23[J]. Journal of Applied Microbiology, 2010, 108(3): 1050-1059.
- [60] LINDGREN SE, SWAISGOOD HE, JANOLINO VG, AXELSSON LT, RICHTER CS, MACKENZIE JM, DOBROGOSZ WJ. Binding of *Lactobacillus reuteri* to fibronectin immobilized on glass beads[J]. Zentralblatt Fur Bakteriologie: International Journal of Medical Microbiology, 1992, 277(4): 519-528.
- [61] McMILLAN A, MACKLAIM JM, BURTON JP, REID G. Adhesion of *Lactobacillus iners* AB-1 to human fibronectin: a key mediator for persistence in the vagina?[J]. Reproductive Sciences, 2013, 20(7): 791-796.
- [62] JAMES C, GOMEZ K, DESAI SL, PATEL HD, RAC G, DOSHI CP, DORNBIER R, BAJIC P, HALVERSON T, GUPTA GN, QUEK ML, GORBONOS A, FLANIGAN R, WOLFE AJ. Impact of intravesical *Bacillus Calmette-Guérin* and chemotherapy on the bladder microbiome in patients with non-muscle invasive bladder cancer[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2023, 13: 1125809.
- [63] PÉREZ JORGE G, MÓDOLO DG, Jaimes-FLOREZ YP, FÁVARO WJ, de JESUS MB, BROCCHI M. p53 gene delivery via a recombinant *Salmonella enterica* Typhimurium leads to human bladder carcinoma cell death *in vitro*[J]. Letters in Applied Microbiology, 2022, 75(4): 1010-1020.
- [64] WANG YC, KU WC, LIU CY, CHENG YC, CHIEN CC, CHANG KW, HUANG CJ. Supplementation of probiotic *Butyricococcus pullicaecorum* mediates anticancer effect on bladder urothelial cells by regulating butyrate-responsive molecular signatures[J]. Diagnostics, 2021, 11(12): 2270.
- [65] OHASHI Y, NAKAI S, TSUKAMOTO T, MASUMORI N, AKAZA H, MIYANAGA N, KITAMURA T, KAWABE K, KOTAKE T, KURODA M, NAITO S, KOGA H, SAITO Y, NOMATA K, KITAGAWA M, ASO Y. Habitual intake of lactic acid bacteria and risk reduction of bladder cancer[J]. Urologia Internationalis, 2002, 68(4): 273-280.
- [66] LARSSON SC, ANDERSSON SO, JOHANSSON JE, WOLK A. Cultured milk, yogurt, and dairy intake in relation to bladder cancer risk in a prospective study of Swedish women and men[J]. The American Journal of Clinical Nutrition, 2008, 88(4): 1083-1087.
- [67] ASO Y, AKAZAN H. Prophylactic effect of a *Lactobacillus casei* preparation on the recurrence of superficial bladder cancer[J]. Urologia Internationalis, 1992, 49(3): 125-129.
- [68] ASO Y, AKAZA H, KOTAKE T, TSUKAMOTO T, IMAI K, NAITO S. Preventive effect of a *Lactobacillus casei* preparation on the recurrence of superficial bladder cancer in a double-blind trial[J]. European Urology, 1995, 27(2): 104-109.
- [69] NAITO S, KOGA H, YAMAGUCHI A, FUJIMOTO N, HASUI Y, KURAMOTO H, IGUCHI A, KINUKAWA N, GROUP KUUO. Prevention of recurrence with epirubicin and lactobacillus casei after transurethral resection of bladder cancer[J]. The Journal of Urology, 2008, 179(2): 485-490.
- [70] MIYAKE M, ODA Y, OWARI T, IIDA K, OHNISHI S, FUJII T, NISHIMURA N, MIYAMOTO T, SHIMIZU T, OHNISHI K, HORI S, MORIZAWA Y, GOTOH D, NAKAI Y, TORIMOTO K, TANAKA N, FUJIMOTO K. Probiotics enhances anti-tumor immune response induced by gemcitabine plus cisplatin chemotherapy for urothelial cancer[J]. Cancer Science, 2023, 114(3): 1118-1130.
- [71] KANDASAMY M, BAY BH, LEE YK, MAHENDRAN R. Lactobacilli secreting a tumor antigen and IL15 activates neutrophils and dendritic cells and generates cytotoxic T lymphocytes against cancer cells[J]. Cellular Immunology, 2011, 271(1): 89-96.
- [72] KITAGAWA K, TATSUMI M, KATO M, KOMAI S, DOI H, HASHII Y, KATAYAMA T, FUJISAWA M, SHIRAKAWA T. An oral cancer vaccine using a *Bifidobacterium* vector suppresses tumor growth in a syngeneic mouse bladder cancer model[J]. Molecular Therapy Oncolytics, 2021, 22: 592-603.