·论著·

胃癌新辅助化疗不同应答肿瘤微生物组学的改变及其临床意义

张鹏 徐剑飞 周岩冰
青岛大学附属医院胃肠外科，青岛 266003
通信作者：周岩冰，Email：zhouyanbing@qduhospital.cn

【摘要】 **目的** 探究胃癌新辅助化疗不同应答肿瘤微生物组学的改变。**方法** 采用回顾性观察性研究的方法，收集2017年1月至2023年1月期间，青岛大学附属医院胃肠外科肿瘤样本库中病理确诊为胃腺癌、无转移及术前仅接受新辅助化疗并成功接受胃癌根治术的31例胃癌患者术后新鲜冷冻标本；排除出现转移或其他原发肿瘤病灶和术前1个月内接受过其他转化治疗包括免疫治疗、靶向治疗和益生菌的患者。采用第8版美国癌症联合委员会（AJCC）分期系统和美国病理学家协会肿瘤消退分级系统（TRG）对患者进行分级和分组，TRG 0~1级、ypT0~1和ypN0被归类为新辅助化疗有反应组（12例），而TRG 2~3级和ypT2~4或ypN+则被归类为新辅助化疗无反应组（19例）。采用16S rRNA测序技术对新鲜冷冻样本进行处理和分析。使用QIIME2的Q2-diversity插件进行Alpha多样性和Beta多样性分析，使用STAMP找出默认参数和两组之间的差异富集细菌类群。通过效应大小线性判别分析进行高维类比较，使用PICRUST2（v2.3.0-b）软件预测微生物组的潜在功能分布。**结果** 新辅助化疗有反应组与无反应组胃癌患者在性别、年龄、体质指数、吸烟史、肿瘤位置、新辅助化疗前的肿瘤cTNM分期和新辅助化疗方案方面比较，差异没有统计学意义（均P>0.05），但两组的肿瘤长径和新辅助化疗后的肿瘤ypTNM分期差异均具有统计学意义（均P=0.001）。胃部微生态的Alpha和Beta多样性结果显示，两组Alpha多样性差异没有统计学意义（P>0.05），而两组Beta多样性差异却有统计学意义（P=0.004）。红螺菌科（*Coriobacteriaceae*）、瘤胃球菌科（*Ruminococcaceae*）、韦荣球菌科（*Veillonellaceae*）和毛螺菌科（*Lachnospiraceae*）等4种科水平细菌分类群在新辅助化疗有反应组患者中富集，而以*Proteobacteria*（变形菌门）为主的4种细菌分类群在新辅助化疗无反应组患者中富集。柠檬酸循环和丙氨酸等在内的各种氨基酸的代谢通路被发现具有潜在预测意义。**结论** 不同新辅助化疗反应结果的胃癌患者在胃部微生态的丰度和组成方面存在差异。

【关键词】 胃肿瘤； 胃部微生态； 新辅助化疗； 16s rRNA测序
基金项目：山东省自然基金面上项目（ZR2021MH001）

Changes in tumor microbiome and underlying value according to response to neoadjuvan chemotherapy for in patients with gastric cancer

Zhang Peng, Xu Jianfei, Zhou Yanbing
Department of Gastrointestinal Surgery, the Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266003, China
Corresponding author: Zhou Yanbing, Email: zhouyanbing@qduhospital.cn

【**Abstract**】 **Objective** To investigate the relationship between efficacy of neoadjuvant chemotherapy (NACT) for gastric cancer and gastric microecology. **Methods** This was a retrospective observational study using fresh frozen operative specimens. The specimens had been stored in the tumor sample bank of the Department of Gastrointestinal Surgery of the Affiliated Hospital of Qingdao University from January 2017 to January 2023 after having been collected from

DOI：10.3760/cma.j.cn441530-20240109-00012
收稿日期 2024-01-09 **本文编辑** 卜建红
引用本文：张鹏, 徐剑飞, 周岩冰. 胃癌新辅助化疗不同应答肿瘤微生物组学的改变及其临床意义[J]. 中华胃肠外科杂志, 2024, 27(7): 702-710. DOI: 10.3760/cma.j.cn441530-20240109-00012.

31 patients with pathologically diagnosed gastric cancer who had no metastases and had received only neoadjuvant chemotherapy preoperatively. The study patients had all successfully undergone radical gastric cancer surgery. Patients with metastases or other primary tumor foci and/or had received other therapies within 1 month prior to surgery, including immunotherapy, targeted therapies and probiotics, were excluded. The tumors were graded and grouped in accordance with the 8th edition of the American Joint Committee on Cancer staging system and the Tumor Regression Grading System (TRG) of the College of American Pathologists. Those with TRG Grades 0-1, ypT0-1 and ypN0 were classified as responsive (Group R, 12 cases), whereas those with TRG Grades 2-3 and ypT2-4 or ypN+ were classified as non-responsive (Group NR, 19 cases). The fresh frozen samples were processed and analyzed using 16S rRNA sequencing. Alpha and beta diversity analyses were performed using the Q2-diversity plug-in for QIIME2 and STAMP was used to determine the default parameters and differentially enriched bacterial taxa in the two groups. High-dimensional class comparisons were performed by effect size linear discriminant analysis, and potential functional distributions of microbiomes were predicted using PICRUST2 (v2.3.0-b) software. **Results** Groups R and NR did not differ significantly in sex, age, body mass index, smoking history, tumor location, cTNM stage before NACT, and neoadjuvant chemotherapy (all P>0.05), whereas tumor size and ypTNM stage after NACT differed significantly between the two groups (both P=0.001). Alpha and beta diversity analysis of the gastric microbiota did not reveal a statistically significant difference in alpha diversity between the two groups (P>0.05), whereas there was a statistically significant difference in beta diversity between the two groups (P=0.004). Four family-level bacterial taxa, namely *Coriobacteriaceae*, *Ruminococcaceae*, *Veillonellaceae*, and *Lachnospiraceae*, were enriched in the R group, whereas four bacterial taxa dominated by phylum Proteobacteria were enriched in the NR group. Metabolic pathways of various amino acids, including citric acid cycle and alanine, were found to be potentially predictive. **Conclusions** There are significant differences in the abundance and composition of gastric microecology in gastric cancer patients with different responses to NACT.

【Key words】 Stomach neoplasms; Gastric microecology; Neoadjuvant chemotherapy; 16s rRNA sequencing

Fund program: Shandong Provincial Nature Foundation Upper-level Project (ZR2021MH001)

新辅助化疗的优势目前已获得人们的广泛认可，诸如降低肿瘤的分期、消除隐匿性微转移以及增加根治性切除的机会等[1-2]。然而人们发现，新辅助化疗的疗效因人而异，其影响因素中的细胞内在机制包括药物转运、自噬、细胞凋亡抑制、DNA 损伤修复和基因组不稳定性等；细胞外在因素为肿瘤微环境（tumor microenvironment，TME）等[3-4]。近年来的研究报道，共生细菌在化疗药物的代谢、疗效和毒性中具有影响[5-10]。然而，胃部因其特殊的强酸性环境，其胃部微生态与胃癌新辅助化疗之间的关系鲜有报道[11]。本研究回顾性收集了胃癌患者的肿瘤黏膜组织样本，采用 16s rRNA 测序技术分析胃部微生态与新辅助化疗之间的潜在联系，探究胃癌患者新辅助化疗不同应答与胃微生态之间的关系。

资料与方法

一、研究对象

本研究采用回顾性观察性研究的方法。

研究对象纳入标准：（1）病理确诊为胃腺癌；（2）无转移；（3）术前接受新辅助化疗，按照指南，根据患者个体耐受差异情况给予包括氟尿嘧啶、奥沙利铂和卡培他滨等在内的新辅助化疗方案；（4）完成胃癌根治术。排除标准：（1）出现转移或其他原发肿瘤病灶；（2）术前 1 个月内接受过其他转化治疗，包括免疫治疗、靶向治疗和益生菌治疗等。

回顾性收集 2017 年 1 月至 2023 年 1 月期间，青岛大学附属医院胃肠外科肿瘤样本库中符合纳入和排除标准的 31 例胃癌患者新辅助化疗后的新鲜冷冻肿瘤黏膜样本，样本均在离体后 20 min 内立即保存于−80℃的样本库。样本的收集完全遵循《人类遗传资源管理条例实施细则》。本研究经青岛大学附属医院伦理委员会批准（审批号：QYFYWALL28226）。

二、新辅助化疗的疗效评估和分组

为了评估新辅助化疗的疗效，采用美国癌症联合委员会（American Joint Committee on Cancer，

AJCC)第 8 版分期系统和美国病理学家协会(College of American Pathologist,CAP)肿瘤消退分级系统(tumor regression grade,TRG)对胃癌患者进行分级和分组,如果患者术后病理报告为TRG 0~1级、ypT0~1和ypN0,则被归类为新辅助化疗有反应;而TRG 2~3级、ypT2~4或ypN+,则被归类为新辅助化疗无反应[8,12]。

根据新辅助化疗后有无反应,将31例胃癌患者分为有反应组(12例)和无反应组(19例),两组患者在性别、年龄、体质指数、吸烟史、肿瘤位置、新辅助化疗前的cTNM分期和新辅助化疗方案方面差异没有统计学意义(均P>0.05),而肿瘤长径和新辅助化疗后的ypTNM分期差异均具有统计学意义(均P<0.05)。见表1。

三、肿瘤黏膜样本的处理和分析

采用16S rRNA测序技术对样本进行处理和分析。用AllPrep DNA/RNA/miRNA通用试剂盒(Qiagen,德国)从新鲜冷冻样本中提取基因组DNA。同样,使用QIAamp DNA FFPE组织试剂盒(Qiagen,德国)提取FFPE组织的基因组DNA。经PCR扩增后,用Agencourt AMPure XP磁珠对聚合酶链式反应(polymerase chain reaction,PCR)扩增产物进行纯化并溶于Elution Buffer。完成建库后,使用Agilent 2100 Bioanalyzer对文库的片段范围及浓度进行检测。检测合格的文库根据插入片段大小,选择Illumina HiSeq平台进行测序。

四、生物信息学处理和分析

使用软件iTools Fqtools fqcheck(v. 0.25)、cutadapt(v.2.6)和readfq(v1.0)对原始测序数据进行质量控制处理,获得Clean Data并用于后续的生物信息学分析[13]。利用软件QIIME2中的DADA2(divisive amplicon denoising algorithm)方法去噪,获得Amplicon Sequence Variants(ASVs,100%相似的序列),进而得到特征表(Feature),之后通过RDP classifer(v2.2)软件将Feature与数据库Greengene V201305比对进行物种注释,置信度阈值设置为0.6[14]。

基于以上结果,使用QIIME2的Q2-diversity插件进行Alpha多样性(chao1指数、Simpson指数和Shannon指数)和Beta多样性分析。使用STAMP来找出默认参数和P<0.05的两组之间的差异富集细菌类群[15]。为了进一步探讨差异,采用通过效应大小线性判别分析(LDA Effect Size analysis,LEfSe)进行高维类比较[16]。随后,使用PICRUST2(v2.3.0-b)软件预测微生物组的潜在功能分布[17]。

五、统计学方法

使用SPSS26版软件完成患者临床数据的分析。服从正态分布的计量资料用$\bar{x}\pm s$表示,组间比较采用独立样本t检验;不服从正态分布的计量资料用M(范围)表示,组间比较采用Mann Whitney U检验。计数资料用例(%)表示,组间比较采用χ^2检验或Fisher精确概率法。采用Wilcoxon秩和检验、ANOVA单因素方差检验比较Alpha和Beta多样性指数、丰度差异;采用Wilcoxon秩和检验计算功能预测分析P值,并使用错误发现率(fasle discovery rate,FDR)评估不同P值显著性。P<0.05表示差异有统计学意义。

表1 新辅助化疗有反应组与无反应组胃癌患者临床病理基线资料的比较

组别	例数	性别(例)		年龄[岁,M(范围)]	体质指数(kg/m^2,$x\pm s$)	吸烟史(例)		肿瘤位置(例)		
		男	女			有	无	胃下部	胃中部	胃上部
有反应组	12	7	5	64.0(61.5~66.0)	24.2±3.1	5	7	8	3	1
无反应组	19	16	3	59.0(51.0~65.0)	23.6±4.0	9	10	12	4	3
统计值		χ^2=1.323		Z=−0.955	t=−2.444	−		−		
P值		0.206		0.340	0.451	0.756[a]		1.000[a]		

组别	例数	肿瘤长径[cm,M(范围)]	新辅助化疗前cTNM分期(例)			新辅助化疗后ypTNM分期(例)			新辅助化疗方案(例)		
			Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ	Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ	顺铂+5-FU	奥沙利铂	紫杉醇
有反应组	12	0.75(0~2.88)	0	4	8	7	3	2	5	6	1
无反应组	19	3.50(2.20~5.00)	0	2	17	0	9	10	9	7	3
统计值		Z=−3.286	χ^2=2.706			−			χ^2=4.351		
P值		0.001	0.174			0.001[a]			0.781		

注:[a]为fisher精确检验;5-FU为5-氟尿嘧啶;"−"示无数据

结　果

一、新辅助化疗有反应组与无反应组胃癌患者的胃部微生态比较

1.Alpha 和 Beta 多样性比较：新辅助化疗有反应组组与无反应组之间 Alpha 多样性差异没有统计学意义（P=0.984），见图 1A~1C；而两组 Beta 多样性差异却有统计学意义（P=0.004），见图 1D。进一步的 PCoA 和 NMDS 降维分析验证结果见图 1E 和 1F。

2.STAMP 的注释结果：拟杆菌门（*Bacteroidetes*）、梭状芽孢杆菌纲/梭状芽孢杆菌目（*Clostridia* / *Clostridiales*）、毛螺菌科（*Lachnospiraceae*）、瘤胃球菌科（*Ruminococcaceae*）、*Prevotella_copri* 等细菌分类群在新辅助化疗有反应组患者中富集，而芽孢杆菌纲（*Bacilli*）、*Bacillus_cereus*、埃普西隆变形杆菌纲（*Epsilonproteobacteria*）等在新辅助化疗无反应组患者中富集。见表 2。

3. LEfSe 分析验证结果：红螺菌科（*Coriobacteriaceae*）、瘤胃球菌科（*Ruminococcaceae*）、韦荣球菌科（*Veillonellaceae*）和毛螺菌科（*Lachnospiraceae*）等 31 种细菌分类群在新辅助化疗有反应组患者中富集，而弯曲杆菌目（*Campylobacterales*）和埃普西隆变形菌纲（*Epsilonproteobacteria*）等 4 种细菌分类群在新辅助化疗无反应组患者中富集，见图 1G 和图 1H。

二、KEGG 代谢功能预测分析

使用 PICRUST2 软件进行 KEGG 富集分析预测潜在的功能差异。原核生物中的碳固定途径、D-丙氨酸代谢（D-Alanine metabolism）、丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢、安莎霉素生物合成、柠檬酸循环（又称为 TCA 循环）等可能是影响两组患者对新辅助化疗反应的潜在代谢通路。经 Wilcoxon 检测，P<0.05。见图 2。

讨　论

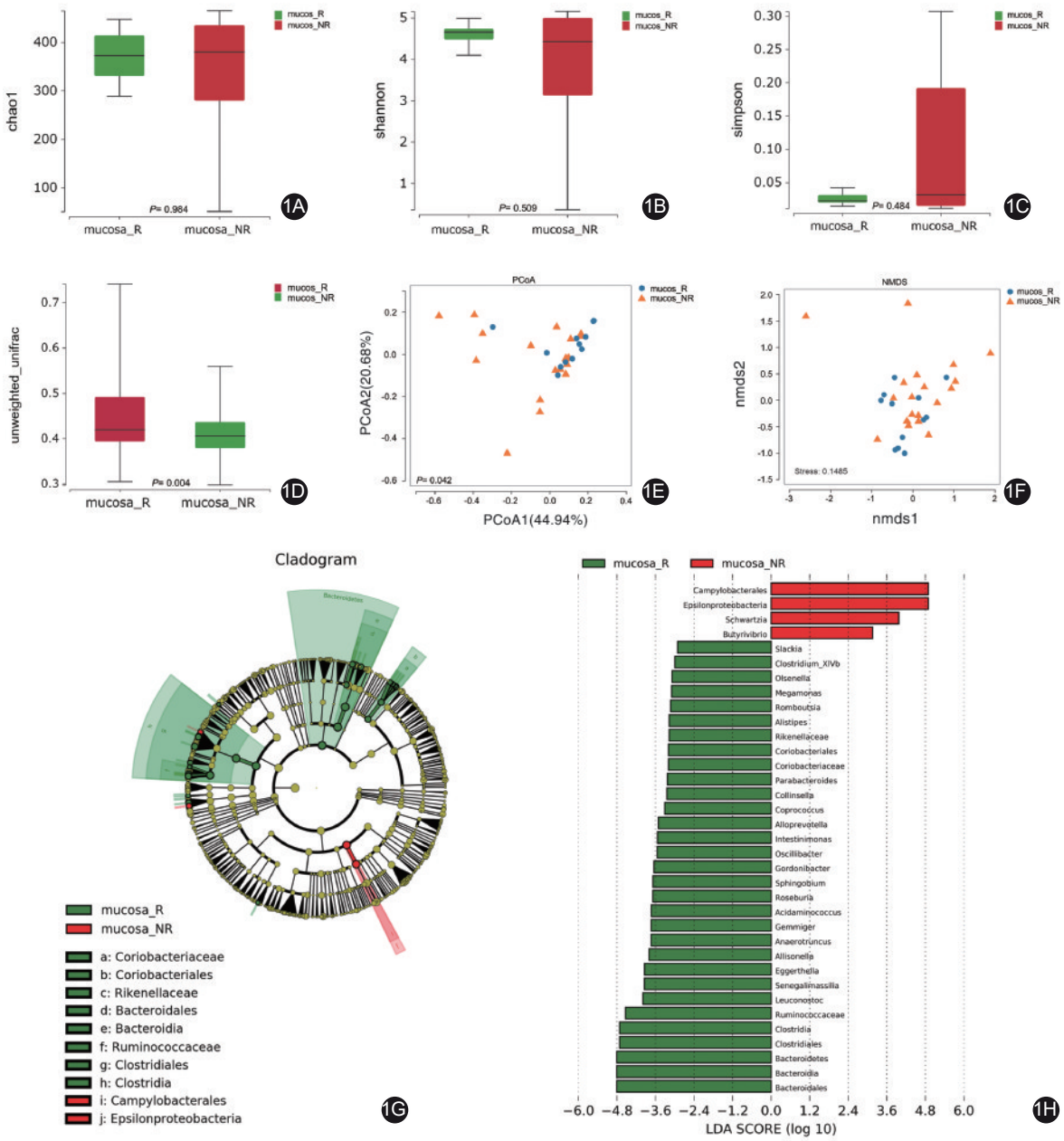
近几十年来，越来越多的证据证明，胃肠道微生态在人类健康和疾病中扮演着重要角色[11,18]。多项研究表明，胃肠道微生态与结直肠癌的放化疗有关[6-8]。然而，胃部微生态与新辅助化疗的关系鲜有研究。而且，与结直肠相比，强酸性环境[11,19]、蠕动状态[19]、幽门螺杆菌感染[11]以及质子泵抑制剂治疗[20]等诸多因素造成了胃部微生态的相对不稳定性，再加上诸多研究设计上的差异，从而导致了胃部微生态研究结果的多样性。

本研究结果显示，新辅助化疗有反应的患者以科水平红螺菌科（*Coriobacteriaceae*）、瘤胃球菌科（*Ruminococcaceae*）、韦荣球菌科（*Veillonellaceae*）、毛螺菌科（*Lachnospiraceae*）等为主的几种细菌分类群富集。DELIVER 试验（JACCRO GC-08）的结果表明，韦荣菌属（*Veillonella*）可能是进展期胃癌免疫治疗有效的新型生物标志物[21]。矛盾的研究是，韦荣菌属（*Veillonella*）似乎是肺癌检测和分类的特异性生物标志物[22]。本研究发现，TCA 循环代谢通路是潜在的影响通路，而韦荣菌属（*Veillonella*）可以通过 TCA 循环将乳酸分解成丙酸和丁酸而发挥抗炎特性[23-24]。同样地，韦荣球菌科（*Veillonellaceae*）和韦荣菌属（*Veillonella*）被证明与碳固定有关[23]。这与本研究的功能预测一致。我们发现，原核生物中的碳固定途径可能是潜在的影响通路。

表 2　STAMP 比较新辅助化疗有反应组与无反应组胃癌患者的胃微生物分类群相对含量（%）

组别	例数	*Bacteroidetes*	*Clostridia*	*Bacteroidia*	*Bacilli*	*Epsilonproteobacteria*
有反应组	12	28.193820	29.276092	28.104442	9.513941	5.551373
无反应组	19	17.544959	18.397846	17.436246	18.570907	16.709311
P值		0.020	0.037	0.020	0.037	0.037
分类水平		门	纲	纲	纲	纲
组别	例数	*Clostridiales*	*Lachnospiraceae*	*Ruminococcaceae*	*Prevotella_copri*	*Bacillus_cereus*
有反应组	12	29.276092	15.640448	10.918395	16.205266	0.002455
无反应组	19	18.397846	10.033421	5.179571	8.238723	2.679231
P值		0.037	0.041	0.030	0.033	0.020
分类水平		目	科	科	种	种

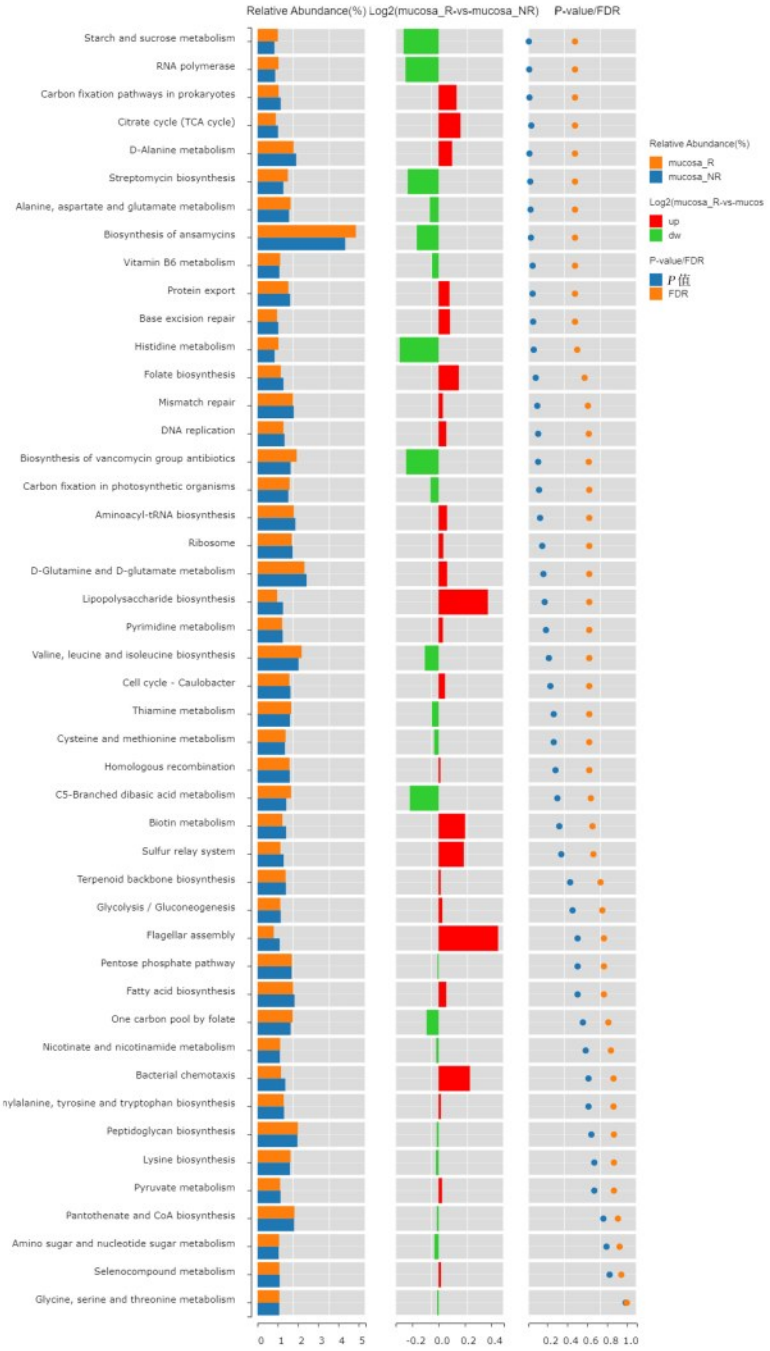
注：表中数据均为华大公司采用 STAMP 分析软件完成统计分析，均无统计值



注：mucosa：黏膜；R：response，有反应；NR：no response，无反应；unweighted_unifrac：非加权 unifrac 距离

图 1 新辅助化疗有反应与无反应两组患者胃微生物组中不同细菌类群的多样性和组成 1A. chao1 指数，P=0.984；1B.shannon 指数，P=0.509；1C.simpson 指数，P=0.484；1D.Beta 多样性，P=0.004；1E~1F.PCoA（Principal Co-ordinates Analysis，主坐标分析）显示，P=0.042；NMDS 分析（Nonmetric Multidimensional Scaling，非度量多维标度）显示，差异存在一定解释意义（胁强系数 Stress=0.148 5；stress 值表示了 2 维空间中点的距离与多维空间中点的距离的差异）；1G.LEfSe 聚类 Clangrom 图；1H. 新辅助治疗后有反应与无反应组患者细菌差异类群的 $\log_{10}$ 效应大小线性判别分析（LDA）柱状图，所列分类群差异具有统计学意义（P<0.05；LDA 分数>2）

另外，已有研究证明，毛螺菌科（*Lachnospiraceae*）和瘤胃球菌科（*Ruminococcaceae*）物种水解淀粉和其他糖类，产生丁酸盐和其他（short-chain fatty acid，SCFA）[25-26]。而丁酸盐等 SCFA 被认为是肠道的保护者[27-28]。毛螺菌科（*Lachnospiraceae*）通过促进肿瘤免疫监视防止结直肠癌的发生[29]。红螺菌科（*Coriobacteriaceae*）也被证明与炎性肠病（inflammatory bowel diseases，IBD）[30]、2 型糖尿病[31-32]呈负相关。一致地，本研究属水平上被鉴定为 R 患者的富集细菌分类群，包括肠单胞球菌属（*Intestinimonas*）[33]、厌氧菌属（*Anaerotruncus*）[34]、罗氏菌属（*Roseburia*）[25,35]、粪球菌



注：Relative Abundance 为相对含量；mucosa_为黏膜；up 为上升；dw 为下降；FDR 为错误发现率

图 2　用 PICRUST2 对新辅助化疗有反应与无反应两组患者进行京都基因和基因组途径百科全书（KEGG）代谢通路富集分析

属（*Coprococcus*）[25-35]、巨单胞菌属（*Megamonas*）[27]、拟普雷沃氏菌属（*Alloprevotella*）[27]、氨基酸球菌属（*Acidaminococcus*）[27,36]等都被证明是乙酸和丙酸等 SCFA 的产生菌。其中，氨基酸球菌属（*Acidaminococcus*）等[27,36]参与谷氨酸等氨基酸的代谢，这与本研究的功能预测一致。我们发现，包括谷氨酸和丙氨酸等氨基酸在内的代谢通路似乎是潜在的影响通路。另外，与本研究一致，在一项与新辅助化疗无反应患者为对照的研究中，罗氏菌属（*Roseburia*）被发现在新辅助化疗有反应患者中富集，其最适丰度变异被证明可能是区分胃肠道肿瘤患者中化疗疗效的预测因子[9]。一项小鼠实验证明，齿乳杆菌属（*Olsenella*）与某些共生菌的共同作用可以通过提高 CTLA-4 抗体的疗效进一步

提高结直肠癌的免疫治疗效果[37]；戈登菌属（*Gordonibacter*）也被证明能够产生尿石素[38]；而尿石素被证明具有抗炎、抗癌等特性[39-40]；芽殖菌属（*Gemmiger*）与多种精神疾病负相关[41]。除此之外，明串珠菌属（*Leuconostoc*）也被认为是一种“公认安全菌属”（generally recognized as safe，GRAS）[42]；鞘氨醇单胞菌属（*Sphingobium*）在胃癌患者的胃部微生物态中减少[43]；并且，该属能够降解异生素化合物，特别是已知具有致癌特性的芳香烃[44]。然而相反地，促炎性细菌颤杆菌属（*Oscillibacter*）[45]、IBD 患者中富集并在小鼠中以 Rorc 依赖性方式恶化结肠炎的埃格斯菌属（*Eggerthella*）[46]等也被鉴定为在新辅助化疗有反应患者中富集。

而在新辅助化疗无反应患者中，以变形菌门（*Proteobacteria*）的富集为主，该菌被证明是促肿瘤菌[47]。然而，我们也同样观察到了产丁酸菌属（*Butyrivibrio*）的富集[27]。这些现象让人深思，尽管丁酸盐等 SCFA 被证明对胃肠道具有保护作用，但也发挥着促癌作用[27-28,48]。细菌多样性一直是阻碍研究人员发现肿瘤发展或治疗的潜在生物标志物的原因，但这并不意味着可以排除利用微生物参与疾病进展及治疗的可能性，这需要更深入地进行基础研究，以及更大范围的临床前或临床试验才能得出结论。

本研究存在局限性。一方面样本量较小，这可能是我们无法解释一些现象的原因；另一方面，单纯采用 16s rRNA 测序技术并不能很好地注释，需要宏基因组学、代谢组学等技术的联合运用，需要从简单的观察转向对相关性的确定，从而确定是单纯的相关性，还是因果关系。

综上，本研究的观察结果首次证实，胃癌患者的新辅助化疗疗效与胃部微生态相关。这为进一步的基础研究和胃癌的个体化治疗提供了理论基础；但胃部微生态和新辅助化疗疗效之间的联系是因果关系还是结果关系，仍需进一步探究。

利益冲突 华大基因公司提供微生物检测技术支持，并采用 STAMP 分析软件进行了统计分析

作者贡献声明 张鹏负责本研究的数据收集与分析、患者样本收集、项目管理与监督、方法学、研究设计及手稿撰写；徐剑飞负责本研究方法学、研究设计及项目管理与监督；周岩冰负责本研究方法学、研究设计、项目管理与监督、资金筹集、手稿审阅与修改

参 考 文 献

[1] Smyth EC, Nilsson M, Grabsch HI, et al. Gastric cancer[J]. Lancet, 2020,396(10251):635-648. DOI:10.1016/S0140-6736(20)31288-5.

[2] Cunningham D, Allum WH, Stenning SP, et al. Perioperative chemotherapy versus surgery alone for resectable gastroesophageal cancer[J]. N Engl J Med, 2006, 355(1):11-20. DOI:10.1056/NEJMoa055531.

[3] Hekmatshoar Y, Nakhle J, Galloni M, et al. The role of metabolism and tunneling nanotube-mediated intercellular mitochondria exchange in cancer drug resistance[J]. Biochem J, 2018, 475(14): 2305-2328. DOI: 10.1042/BCJ 20170712.

[4] Zheng HC. The molecular mechanisms of chemoresistance in cancers[J].Oncotarget, 2017,8(35):59950-59964. DOI:10.18632/oncotarget.19048.

[5] Li H, He J, Jia W. The influence of gut microbiota on drug metabolism and toxicity[J]. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2016,12(1):31-40. DOI:10.1517/17425255.2016.1121234.

[6] Yi Y, Shen L, Shi W, et al. Gut microbiome components predict response to neoadjuvant chemoradiotherapy in patients with locally advanced rectal cancer: a prospective, longitudinal study[J]. Clin Cancer Res, 2021, 27(5):1329-1340. DOI:10.1158/1078-0432.CCR-20-3445.

[7] Teng H, Wang Y, Sui X, et al. Gut microbiota-mediated nucleotide synthesis attenuates the response to neoadjuvant chemoradiotherapy in rectal cancer[J]. Cancer Cell, 2023, 41(1):124-138.e6. DOI:10.1016/j.ccell.2022.11.013.

[8] Jang BS, Chang JH, Chie EK, et al. Gut microbiome composition is associated with a pathologic response after preoperative chemoradiation in patients with rectal cancer[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2020,107(4):736-746. DOI:10.1016/j.ijrobp.2020.04.015.

[9] Li N, Bai C, Zhao L, et al. The relationship between gut microbiome features and chemotherapy response in gastrointestinal cancer[J]. Front Oncol, 2021, 11: 781697. DOI:10.3389/fonc.2021. 781697.

[10] Yamamura K, Izumi D, Kandimalla R, et al. Intratumoral Fusobacterium Nucleatum levels predict therapeutic response to neoadjuvant chemotherapy in esophageal squamous cell carcinoma[J]. Clin Cancer Res, 2019, 25(20): 6170-6179. DOI:10.1158/1078-0432.CCR-19-0318.

[11] Stewart OA, Wu F, Chen Y. The role of gastric microbiota in gastric cancer[J]. Gut Microbes, 2020, 11(5): 1220-1230. DOI:10.1080/19490976.2020.1762520.

[12] Ryan R, Gibbons D, Hyland JM, et al. Pathological response following long-course neoadjuvant chemoradiotherapy for locally advanced rectal cancer[J]. Histopathology, 2005, 47(2): 141-146. DOI: 10.1111/j. 1365-2559.2005.02176.x.

[13] He W, Zhao S, Liu X, et al. ReSeqTools: an integrated toolkit for large-scale next-generation sequencing based resequencing analysis[J]. Genet Mol Res, 2013, 12(4): 6275-6283. DOI:10.4238/ 2013.December.4.15.

[14] Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, et al. Naive bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy[J]. Appl Environ Microbiol, 2007, 73(16): 5261-5267. DOI:10.1128/AEM.00062-07.

[15] Parks DH, Tyson GW, Hugenholtz P, et al. STAMP: statistical analysis of taxonomic and functional profiles[J]. Bioinformatics, 2014, 30(21): 3123-3124. DOI: 10.1093/

bioinformatics/ btu494.

[16] Segata N, Izard J, Waldron L, et al. Metagenomic biomarker discovery and explanation[J]. Genome Biol, 2011,12(6):R60. DOI:10.1186/gb-2011-12-6-r60.

[17] Langille MG, Zaneveld J, Caporaso JG, et al. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences[J]. Nat Biotechnol, 2013, 31(9):814-821. DOI:10.1038/nbt.2676.

[18] Guo Y, Cao XS, Zhou MG, et al. Gastric microbiota in gastric cancer: different roles of Helicobacter pylori and other microbes[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2023,12:1105811. DOI:10.3389/fcimb.2022.1105811.

[19] Guarner F, Malagelada JR. Gut flora in health and disease [J]. Lancet, 2003, 361(9356): 512 - 519. DOI: 10.1016/ S0140-6736(03)12489-0.

[20] Amir I, Konikoff FM, Oppenheim M, et al. Gastric microbiota is altered in oesophagitis and Barrett's oesophagus and further modified by proton pump inhibitors[J]. Environ Microbiol, 2014, 16(9): 2905 - 2914. DOI:10.1111/1462-2920.12285.

[21] Sunakawa, Y, Matoba, R, Inoue, E, et al. Genomic pathway of gut microbiome to predict efficacy of nivolumab in advanced gastric cancer: DELIVER trial (JACCRO GC - 08) [J]. J Clin Oncol, 2023, 39. DOI: 10.1200/jco. 2021.39.3_ suppl.161.

[22] Zhou Y, Zeng H, Liu K, et al. Microbiota profiles in the saliva, cancerous tissues and its companion paracancerous tissues among Chinese patients with lung cancer[J]. BMC Microbiol, 2023, 23(1): 237. DOI: 10.1186/s12866 - 023 - 02882-1.

[23] Hamilton IR. Carbon dioxide fixation by Veillonella parvula M 4 and its relation to propionic acid formation [J]. Can J Microbiol, 1973, 19(6): 715 - 723. DOI: 10.1139/ m73-116.

[24] Scheiman J, Luber JM, Chavkin TA, et al. Meta - omics analysis of elite athletes identifies a performance - enhancing microbe that functions via lactate metabolism [J]. Nat Med, 2019, 25(7):1104-1109. DOI:10.1038/s41591-019-0485-4.

[25] Vacca M, Celano G, Calabrese FM, et al. The controversial role of human gut lachnospiraceae[J]. Microorganisms, 2020,8(4):573.DOI:10.3390/microorganisms8040573.

[26] Biddle A , Stewart L , Blanchard J ,et al.Untangling the genetic basis of fibrolytic specialization by Lachnospiraceae and Ruminococcaceae in diverse gut communities[J]. Diversity, 2013, 5(3):627-640. DOI:10.3390/d5030627.

[27] Martin - Gallausiaux C, Marinelli L, Blottière HM, et al. SCFA: mechanisms and functional importance in the gut [J]. Proc Nutr Soc, 2021,80(1):37-49. DOI:10.1017/S0029 665120006916.

[28] Bishehsari F, Engen PA, Preite NZ, et al. Dietary fiber treatment corrects the composition of gut microbiota, promotes SCFA production, and suppresses colon carcinogenesis[J]. Genes (Basel), 2018, 9(2): 102. DOI: 10. 3390/genes9020102.

[29] Zhang X, Yu D, Wu D, et al. Tissue - resident lachnospiraceae family bacteria protect against colorectal carcinogenesis by promoting tumor immune surveillance [J]. Cell Host Microbe, 2023,31(3):418-432. DOI:10.1016/ j.chom.2023.01.013.

[30] Pittayanon R, Lau JT, Leontiadis GI, et al. Differences in gut microbiota in patients with vs without inflammatory bowel diseases: a systematic review[J]. Gastroenterology, 2020,158(4):930-946. DOI:10.1053/j.gastro.2019.11.294.

[31] Zhuang P, Li H, Jia W, et al. Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids attenuate hyperglycemia through the microbiome - gut - organs axis in db/db mice[J]. Microbiome, 2021, 9(1): 185. DOI: 10.1186/s40168 - 021 - 01126-6.

[32] Liu H, Zhang H, Wang X, et al. The family coriobacteriaceae is a potential contributor to the beneficial effects of Roux-en-Y gastric bypass on type 2 diabetes[J]. Surg Obes Relat Dis, 2018, 14(5): 584 - 593. DOI: 10.1016/j. soard. 2018.01.012.

[33] Afouda P, Durand GA, Lagier JC, et al. Noncontiguous finished genome sequence and description of Intestinimonas massiliensis sp. nov strain GD2^{T}, the second intestinimonas species cultured from the human gut[J]. Microbiologyopen, 2019, 8(1): e00621. DOI: 10. 1002/mbo3.621.

[34] Lawson PA, Song Y, Liu C, et al. Anaerotruncus colihominis gen. nov., sp. nov., from human faeces[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2004,54(Pt 2):413-417. DOI:10.1099/ ijs.0.02653-0.

[35] Duncan SH, Barcenilla A, Stewart CS, et al. Acetate utilization and butyryl coenzyme A (CoA): acetate - CoA transferase in butyrate - producing bacteria from the human large intestine[J]. Appl Environ Microbiol, 2002, 68(10): 5186 - 5190. DOI: 10.1128/AEM.68.10.5186 - 5190. 2002.

[36] Rogosa M. Acidaminococcus gen. n., Acidaminococcus fermentans sp. n., anaerobic gram - negative diplococci using amino acids as the sole energy source for growth[J]. J Bacterio, 1969,98 (2):756-766. DOI: 10.1128/jb.98.2.756-766.1969.

[37] Mager LF, Burkhard R, Pett N, et al. Microbiome - derived inosine modulates response to checkpoint inhibitor immunotherapy[J]. Science, 2020, 369(6510): 1481 - 1489. DOI:10.1126/science.abc3421.

[38] Watanabe, H, Kishino, S, Kudoh, M, et al. Evaluation of electron - transferring cofactor mediating enzyme systems involved in urolithin dehydroxylation in Gordonibacter urolithinfaciens DSM 27213[J]. J Biosci Bioeng, 2020, 129(5):552-557. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2019.11.014.

[39] Kasimsetty SG, Bialonska D, Reddy MK, et al. Effects of pomegranate chemical constituents/intestinal microbial metabolites on CYP1B1 in 22Rv1 prostate cancer cells[J]. J Agric Food Chem, 2009, 57(22): 10636 - 10644. DOI: 10.1021/jf902716r.

[40] Bialonska D, Kasimsetty SG, Khan SI, et al. Urolithins, intestinal microbial metabolites of Pomegranate ellagitannins, exhibit potent antioxidant activity in a cell - based assay[J]. J Agric Food Chem, 2009, 57(21): 10181 - 10186. DOI:10.1021/jf9025794.

[41] Li J, Ma Y, Bao Z, et al. Clostridiales are predominant microbes that mediate psychiatric disorders[J]. J Psychiatr Res, 2020, 130: 48 - 56. DOI: 10.1016/j.jpsychires. 2020.07.018.

[42] Ogier JC, Casalta E, Farrokh C, e al. Safety assessment of dairy microorganisms: the Leuconostoc genus[J]. Int J

Food Microbiol, 2008, 126(3): 286 - 290. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.08.012.

[43] Hu YL, Pang W, Huang Y, et al. The gastric microbiome is perturbed in advanced gastric adenocarcinoma identified through shotgun metagenomics[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2018,8:433. DOI:10.3389/fcimb.2018.00433.

[44] Bessède E, Mégraud F. Microbiota and gastric cancer[J]. Semin Cancer Biol, 2022, 86(Pt 3):11-17. DOI:10.1016/j.semcancer.2022.05.001.

[45] Xie R, Sun Y, Wu J, et al. Maternal high fat diet alters gut microbiota of offspring and exacerbates DSS - induced colitis in adulthood[J]. Front Immunol, 2018,9:2608. DOI: 10.3389/fimmu.2018.02608.

[46] Alexander M, Ang QY, Nayak RR, et al. Human gut bacterial metabolism drives Th17 activation and colitis[J]. Cell Host Microbe, 2022,30(1):17-30.e9. DOI:10.1016/j.chom.2021.11.001.

[47] Pongen YL, Thirumurugan D, Ramasubburayan R, et al. Harnessing actinobacteria potential for cancer prevention and treatment[J]. Microb Pathog, 2023,183:106324. DOI: 10.1016/j.micpath. 2023.106324.

[48] Marchesi JR, Adams DH, Fava F, et al. The gut microbiota and host health: a new clinical frontier[J]. Gut,2016,65(2): 330-339. DOI:10.1136/gutjnl-2015-309990.

·读者·作者·编者·

本刊对参考文献撰写的要求

执行 GB/T 7714—2015《信息与文献 参考文献著录规则》,依照其在正文中出现的先后顺序用阿拉伯数字加方括号标出。未发表的观察资料和个人通讯一般不用作参考文献,确需引用时,可将其在正文相应处注明。有条件时,2 次文献亦不宜引为参考文献,尽量避免引用摘要作为参考文献。

文献作者在 3 位以内者,姓名均列出;3 位以上者,只列前 3 位,后加“等”或“et al”(西文)或“他”(日文)或“ИДР”(俄文)。作者姓名一律姓氏在前、名字在后,外国人的名字采用首字母缩写形式,缩写名后不加缩写点;日文汉字请按日文规定书写,勿与我国汉字及简化字混淆。不同作者姓名之间用“,”隔开,不用“和”或“and”等连词。

文献类型和电子文献载体标志代码参照 GB/T 7714—2015 附录 B《文献类型与文献载体标识代码》。中文期刊用全称;外文期刊名称用缩写,以美国国立医学图书馆编辑出版的医学索引(Index Medicus)中的格式为准;Index Medicus 未收录者,依次选用文献自身对刊名的缩写、期刊全称。**每条参考文献均须著录具体的卷期号以及起止页。文献 DOI 号著录在该条文献最后。**书写格式举例如下:

例 1:王胤奎,李子禹,陕飞,等.我国早期胃癌的诊治现状——来自中国胃肠肿瘤外科联盟数据的启示[J].中华胃肠外科杂志,2018,21(2):168-174. DOI:10.3760/cma.j.issn.1671-0274.2018.02.010.

例 2:Kulu Y, Tarantino I, Billeter AT, et al. Comparative outcomes of neoadjuvant treatment prior to total mesorectal excision and total mesorectal excision alone in selected stage II/III low and mid rectal cancer[J]. Ann Surg Oncol, 2016, 23(1):106-113. DOI:10.1245/s10434- 015-4832-5.

例 3:Jablonski S. Online multiple congenital anomaly/mental retardation(MCA/MR)syndromes[DB/OL]. Bethesda(MD):National Library of Medicine(US).1999(2001-11-20)[2002-12-12].http://www. nlm. nih. gov/mesh/jablonski/syndrome_ title. html.

例 4:刘小银,刘广健,文艳玲,等.经直肠超声检查在直肠癌新辅助放化疗后术前评估中的应用价值[J/CD].中华医学超声杂志(电子版),2017,14(6):411-416. DOI:10.3877/cma.j.issn.1672-6448.2017.06.004.

例 5:张晓鹏.胃肠道 CT 诊断学图集[M].沈阳:辽宁科学技术出版社,2001:339.

例 6:Amin MB, Edge S, Greene FL, et al. AJCC Cancer Staging Manual[M]. 8th ed. New York:Springer, 2017:185-202.