

靶向CD47的免疫治疗对口腔-肠道菌群影响的实验初探*

陈婧¹, 任敏², 彭显¹, 任彪¹, 程磊^{1△}

1. 口腔疾病研究国家重点实验室 国家口腔疾病临床医学研究中心 四川大学华西口腔医院(成都 610041);

2. 四川大学华西医院 肿瘤中心 腹部肿瘤科(成都 610041)

【摘要】目的 比较靶向CD47的免疫治疗对于免疫健全小鼠口腔-肠道菌群的影响。**方法** 构建免疫健全小鼠的结肠癌腹腔转移模型,经腹腔实验组给予抗CD47单克隆抗体或对照组给予PBS溶液进行治疗,用小动物活体成像技术记录肿瘤生长,采用16S rRNA基因测序技术进行口腔-肠道微生物群落组成及多样性分析。**结果** 抗CD47单克隆抗体治疗组小鼠口腔微生物Alpha多样性降低,差异有统计学意义($P<0.05$);肠道微生物Alpha多样性则无显著改变;差异物种分析显示,接受治疗小鼠口腔葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、*Jeotgalicoccus*、球菌属(*Sporosarcina*)较对照组丰度显著降低,肠道菌群拟杆菌属(*Bacteroides*)在接受靶向CD47免疫治疗组丰度显著增高。**结论** 靶向CD47的免疫治疗对小鼠口腔菌群多样性有着较大的影响,而对肠道菌群物种多样性无显著影响。

【关键词】 CD47 免疫治疗 口腔菌群 肠道菌群

A Preliminary Study on the Effect of CD47-Targeted Immunotherapy on Oral-Gut Microbiota CHEN Jing¹, REN Min², PENG Xian¹, REN Biao¹, CHENG Lei^{1△}. 1. State Key Laboratory of Oral Disease, National Clinical Research Center for Oral Diseases, West China Hospital of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Department of Abdominal Oncology, Cancer Center, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China
△ Corresponding author, E-mail: chengleidentist@163.com

【Abstract】 Objective To study the effects of CD47-targeted immunotherapy on the oral-gut microbiota of immune-competent mice. **Methods** A peritoneal metastatic colon cancer model was constructed in immune-competent mice. Anti-CD47 monoclonal antibody was intraperitoneally administered to the mice in the treatment group, while PBS was administered to mice in the control group. Tumor growth was documented with small animal live imaging technology. 16S rRNA sequencing technology was used to analyze the composition and diversity of oral-gut microbiota. **Results** The alpha diversity of oral microbes in the anti-CD47 monoclonal antibody treatment group decreased, and the difference was statistically significant. There was no significant change in the alpha diversity of gut microbes. Differential species analysis showed significantly decreased abundance of *Staphylococcus*, *Jeotgalicoccus*, and *Sporosarcina* in the oral microbiota of mice in the treatment group compared to that of mice in the control group. The abundance of *Bacteroides* in the gut microbiota was significantly higher in the treatment group. **Conclusion** CD47-targeted immunotherapy has a rather significant impact on the diversity of oral microbiota in mice, but does not have significant impact on the species diversity of gut microbiota.

【Key words】 CD47 Immunotherapy Oral microbiota Gut microbiota

细菌作为人体的重要组成,影响着宿主免疫系统的发育、成熟、功能应答及营养代谢;与此同时,免疫系统的改变也影响着定植于人体的微生物群落^[1]。细菌与宿主免疫特别是固有免疫系统有着相互影响、共同进化的存在形式^[2]。

肿瘤免疫治疗是指通过调节机体对于肿瘤的免疫反应,激活免疫系统对于肿瘤细胞的有效识别及杀伤,从而起到抗肿瘤功效的新型疗法。目前,包括抗程序性细胞死亡蛋白-1(programmed cell death protein-1, PD-1)抗体及抗细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4(cytotoxic T lymphocyte-

associated antigen 4, CTLA-4)抗体以及抗CD47抗体等免疫检查点抑制剂已在多种肿瘤中取得了突破性的临床治疗效果^[3-4]。其中,CD47-信号调节蛋白 α (signal-regulatory protein alpha, SIRP α)轴是当下研究最为广泛的巨噬细胞相关免疫检查点。通过阻断肿瘤细胞表面高表达的CD47与其在巨噬细胞表面的受体SIRP α 所传递的“别吃我”信号,可增强巨噬细胞对于肿瘤细胞的吞噬能力,促进巨噬细胞介导的程序性细胞清除,从而起到抗肿瘤的效果^[5-6]。

近年来,研究人员逐渐意识到口腔-肠道菌群与免疫治疗有着紧密的联系。这种联系主要体现在两个方面:
①免疫治疗对口腔-肠道菌群的影响:免疫治疗可以大量

* 国家自然科学基金(No. 81870759)资助

△ 通信作者, E-mail: chengleidentist@163.com

激活患者体内的免疫细胞,使机体免疫处于高反应状态,引起肿瘤脱靶效应,出现免疫相关不良反应(immune-related adverse effects, irAE)^[7],结肠炎是最为常见的消化道irAE之一^[8]。前期研究结果显示,单次抗CTLA-4治疗就可显著改变小鼠肠道菌群结构^[9]。肠道菌群的结构改变及Beta多样性降低与小肠结肠炎的发生相关^[10]。②口腔-肠道菌群对免疫治疗的影响: VETIZOU等^[9]研究发现,无菌小鼠或抗生素处理小鼠对于CTLA-4免疫检查点抑制剂不应答。但通过口饲脆弱拟杆菌或脆弱拟杆菌多糖,亦或是进行拟杆菌记忆T细胞移植,小鼠就可重新恢复对抗CTLA-4治疗的反应。这一研究结果充分表明了口腔-肠道细菌在肿瘤免疫治疗中的重要作用。然而,目前尚无靶向CD47的免疫治疗对于口腔-肠道菌群影响的研究报道。CD47作为目前固有免疫检查点的研究热点,其抑制剂的运用对于菌群影响或与适应性免疫检查点抑制剂存在差异,是非常具有潜力的研究方向。

因此,本研究以腹腔转移结肠癌小鼠模型为实验对象,评价了抗CD47单克隆抗体在小鼠结肠癌转移模型的治疗效果,并进一步分析比较对照组与抗CD47单克隆抗体治疗组小鼠口腔-肠道菌群的微生物群落组成及多样性,为后续研究提供一定参考。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及细胞株 4~8周龄雄性BALB/c小鼠购自Jackson实验室,于SPF级屏障环境下饲养,自由饮水及进食,并遵循四川大学动物管理委员会要求进行实验操作。稳定表达荧光素酶及绿色荧光蛋白融合蛋白的鼠结肠癌细胞系CT26由本实验室保管,使用含有10% FBS和1%双抗生素的RPMI 1640培养基在37℃、体积分数5%CO₂细胞培养环境培养。

1.1.2 试剂与仪器 RPMI 1640培养基、1%青霉素/链霉素(Life Technologies, 美国), FBS(Omega Scientific, 美国), 二甲基亚砜(Sigma Aldrich, 美国), 0.05%胰蛋白酶(Life Technologies, 美国), 抗小鼠CD47抗体(BioXCell, 美国), 异氟烷(USP, 美国), D-荧光素(SYD lab, 美国), ZymoBIOMICS小量DNA抽提试剂盒(Zymo Research, 美国), Select-a-Size DNA清洁浓缩试剂盒(Zymo Research, 美国), Quick-16S下一代测序文库准备试剂盒(Zymo Research, 美国), Illumina MiSeq测序试剂盒(Zymo Research, 美国)。

15 mL离心管、100 mm细胞培养皿(BD, 美国), 离心机(Beckman Coulter, 美国), 二氧化碳细胞培养箱

(SANYO, 日本), 胰岛素注射器(BD Syringe, 美国), 小动物活体成像仪(Lago X, 美国), 旋涡混合器(MP, 美国), Nano Photometer超微量分光光度计(Implen, 德国), PCR仪(Bio-Rad, 美国), MiSeq测序仪(Illumina, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 小鼠结肠癌腹腔转移模型的构建 取细胞密度约70%的贴壁结肠癌细胞CT26, 去除培养基。3 mL PBS洗去多余培养基后, 弃废液。加入3 mL 0.05%胰蛋白酶, 置于37℃、体积分数5%CO₂细胞培养箱孵育5 min。镜下观察所消化细胞, 如细胞脱落、变圆即可终止消化。取3 mL含血清培养基, 轻轻吹打细胞使其脱落, 终止消化。采用血球细胞计数板进行细胞计数。取2×10⁵细胞重悬于1.5 mL PBS中, 分别将150 μL细胞悬液分装至1.5 mL EP管, 冰上转运至动物实验中心。将150 μL细胞悬液采用胰岛素注射器注射进入小鼠腹腔, 构建结肠癌腹腔转移模型。

1.2.2 抗CD47抗体对荷瘤小鼠的疗效评价 在造模第3天, 确认造模成功, 基线资料差异无统计学意义, 随机分组后, 对造模小鼠进行治疗。治疗组: 腹腔注射2.5 mg/kg抗CD47单克隆抗体溶液, 每周2次, 共4次; 对照组: 腹腔注射与治疗组等量的PBS溶液, 每周2次, 共4次。治疗结束后, 采用小动物活体荧光成像技术监测肿瘤细胞荧光信号。腹腔注射139 mg/kg D-荧光素PBS溶液, 异氟烷吸入麻醉小鼠, 待小鼠麻醉后, 于小动物活体成像仪记录小鼠肿瘤荧光信号。治疗期间每日称量小鼠体质量, 监测小鼠健康。

1.2.3 小鼠唾液及粪便样本的收集 完成4次治疗后, 采用无菌棉签收集对照及治疗组小鼠唾液及新鲜粪便样本, 迅速转运至-80℃冰箱保存。寄送干冰保存的样本至美吉生物集团及Zymo Research进行后续处理及分析。

1.2.4 细菌总DNA的提取 添加25~50 μL样品至ZR BashingBead裂解管, 加入750 μL ZymoBIOMICS裂解溶液; 在装有2 mL管固定器的MP研磨仪中最大转速震荡5 min后; 10 000×g转速离心1 min; 转移400 μL上清至Zymo-Spin III-F滤芯, 滤芯置于收集管, 10 000×g转速离心1 min, 弃滤芯; 加入1 200 μL ZymoBIOMICS DNA结合液至装有过滤物的收集管, 混匀; 转移800 μL混合物至Zymo-Spin IICR结合管, 结合管置于收集管, 10 000×g转速离心1 min; 小心倒弃废液, 重复先前步骤; 加入400 μL ZymoBIOMICS DNA洗液1至Zymo-Spin IICR结合管, 结合管置于新的收集管, 10 000×g转速离心1 min, 弃废液; 加入700 μL ZymoBIOMICS DNA洗液2至Zymo-Spin IICR结合管, 结合管置于收集管, 10 000×g转速离心1 min,

弃废液;加入200 μ L ZymoBIOMICS DNA洗液2至Zymo-Spin IICR结合管,结合管置于收集管,10 000 \times g转速离心1 min,弃废液;转移Zymo-Spin IICR至干净EP管,将50 μ L无酶水直接滴至管内,孵育1 min,10 000 \times g转速离心1 min,洗脱得到总DNA;放置Zymo-Spin III-HRC滤芯到一个新的收集管,加入200 μ L ZymoBIOMICS HRC准备溶液,8 000 \times g转速离心3 min;将洗脱的DNA转入准备好的Zymo-Spin III-HRC滤芯,滤芯至于干净EP管,16 000 \times g转速离心3 min。

1.2.5 测序文库准备

1.2.5.1 目标序列扩增 采用qPCR对目标序列进行扩增,总反应体系为20 μ L,Quick-16S qPCR Premix 10 μ L,DNA样本2 μ L。引物对应区域:16S V3-V4区(上游引物341F:5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3';下游引物805R:5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3')。

qPCR反应参数为95 $^{\circ}$ C预变性10 min,95 $^{\circ}$ C变性30 s,55 $^{\circ}$ C退火30 s,72 $^{\circ}$ C延伸3 min,共20个循环。

1.2.5.2 PCR产物清洁 每个反应体系加入1 μ L清洁溶液,混合,置于PCR仪进行反应。37 $^{\circ}$ C反应15 min,95 $^{\circ}$ C反应10 min,4 $^{\circ}$ C长时间。将清洁后的PCR产物冷却至4 $^{\circ}$ C,离心收集浓缩产物。

1.2.5.3 添加条码 将10 μ L Quick-16S qPCR Premix,4 μ L无酶水,2 μ L Index引物对,2 μ L DNA模板混合,根据表1反应条件进行Index添加qPCR反应。

表1 Index添加qPCR反应条件
Table 1 Index added qPCR reaction conditions

Process	Reaction temperature	Reaction time	Cycle number
Predegeneration	95 $^{\circ}$ C	10 min	1
Denaturation	95 $^{\circ}$ C	30 s	5
Annealing	55 $^{\circ}$ C	30 s	5
Extension	72 $^{\circ}$ C	3 min	5
Plate reading			5

1.2.5.4 文库再清洁 将30 μ L Select-a-Size MagBead浓缩剂加入1 mL Select-a-Size MagBead溶剂,充分混合;将Select-a-Size MagBead混合液与DNA文库按照0.8 : 1充分混合,室温孵育5 min;将b中混合物样本放置于磁铁架,孵育3~10 min,直至磁珠从溶液中充分分离;样本加入200 μ L DNA洗液,弃上清;将样本从磁铁架分离,室温孵育3 min;加入10 μ L无酶水至磁珠,充分混合,室温孵育2 min;将样本放回磁铁架,室温孵育1 min;收集上清至清洁EP管,获得清洁DNA文库。

1.2.6 Illumina Miseq 测序 采用Illumina公司的Miseq PE300平台进行测序,具体流程详见Illumina公司说

明书。

1.2.7 统计学方法 活体成像荧光信号及动物体质量监测以 $\bar{x} \pm s$ 呈现,使用GraphPad Prism 9.0进行统计分析和作图,当两组样本进行比较时,采用t检验。

数据分析由生物云平台(上海美吉)完成。使用fastp软件^[11]对原始测序序列进行质控。通过质控的读段,使用FLASH软件^[12]进行拼接,具体如下:①去除低质量读段及含N碱基的读段;②根据Miseq双端测序间的重合关系,将对读段拼接成一条序列,同一序列读段间的最小重合长度为10 bp;③保留序列拼接的重叠区错配比率小于等于0.2的序列;④根据序列的条码(允许的错配数为0)和引物(引物最大错配数为2),调整序列方向,并归类至不同样本。

使用UPARSE软件^[13],对序列进行操作分类单元(operational taxonomic units, OTU)聚类(97%相似度^[13-14]),具体如下:①提取非重复序列,去除单序列;②对非重复序列进行OTU聚类(去除嵌合体)得到OTU代表序列;③将所有质控后高质量序列比对至OTU代表序列,相似性在97%以上的序列可用于生成OTU表格。利用RDP classifier^[15]进行每条序列物种分类注释。以70%为对比阈值,比对至Silva 16S rRNA数据库(v138)。

使用Mothur^[16-17]软件计算Simpson指数对不同分组样本进行Alpha多样性分析,Simpson指数兼顾物种丰富度及均匀度,是衡量物种Alpha多样性的常用指标之一;使用Qiime软件^[18]-Bray Curtis公式计算距离矩阵,R语言vegan软件包^[19]进行非度量多维尺度分析(non-metric multidimensional scaling analysis, NMDS),NMDS分析是根据样本中的物种信息,在多维空间中以点的形式呈现,通过点间距离体现不同样本的差异程度,最终获得样本的空间定位图;采用R的stats包和python的scipy包对不同分组差异物种进行Wilcox秩和检验;采用LEfSe软件^[20]对于组间丰度存在显著差异的物种进一步进行线性判别分析(linear discriminant analysis, LDA),LDA值越大则表明丰度对差异效果影响越大。

2 结果

2.1 抗CD47单克隆抗体可抑制腹腔转移结肠癌细胞生长

抗CD47单克隆抗体治疗4次后,采用小动物活体成像技术记录荧光素信号强度,评价CT26结肠癌细胞负荷。结果显示,腹腔转移结肠癌肿瘤细胞生长较对照组显著减缓,差异有统计学意义($P < 0.05$),治疗取得一定效果(图1)。

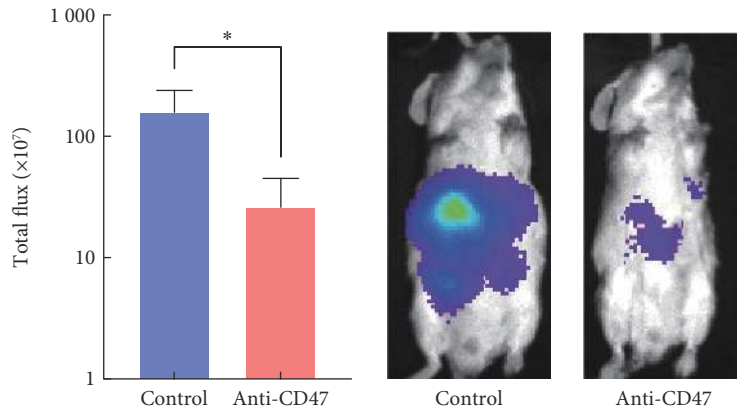


图 1 抗CD47单克隆抗体抑制腹腔转移结肠癌生长第18天的活体成像

Fig 1 Anti-CD47 monoclonal antibody inhibits the growth of peritoneal metastatic colon cancer--*in vivo* imaging on day 18

n=3, *P<0.05.

2.2 靶向CD47的免疫治疗对口腔-肠道菌群物种多样性的影响

结果显示, 对照组口腔菌群Simpson指数为0.548, 治疗组为0.722, 治疗组Alpha多样性降低, 差异有统计学意义(图2A), 而对照组肠道菌群Simpson指数为0.144, 治疗组为0.177, 两组差异无统计学意义(图2B)。

Beta多样性通过NMDS分析进行。结果显示, 图形stress小于0.1, 图中散点具有良好的排列, 可反映Beta多样性(图2C)。其中, 口腔-肠道菌群散点呈现出在不同分组聚集, 肠道菌群总体较为集中, 而口腔菌群较为分散。据此, 我们认为治疗对于肠道菌群Beta多样性影响较小。

2.3 靶向CD47的免疫治疗对口腔-肠道菌群组成的影响

属水平的菌群构成分析显示, 口腔微生物较为集中。葡萄球菌属(*Staphylococcus*)(55.7%)、链球菌属(*Streptococcus*)(30.2%)和*Jeotgalicoccus*(9.3%)是对照组丰度最高的微生物种类, 而链球菌属(*Streptococcus*)(83.7%)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)(4.9%)和*Lachnoclostridium*(4.4%)是治疗组最为丰富的物种(图3)。物种差异分析则显示葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、

Jeotgalicoccus、球菌属(*Sporosarcina*)在治疗组丰度较低, 差异有统计学意义。肠道菌群中*Lachnoclostridium*(22.3%)、拟杆菌属(*Bacteroides*)(16.2%)及*Akkermansia*(14.6%)是对照组丰度最高的微生物种类, 而拟杆菌属(*Bacteroides*)(29.5%)、*Lachnoclostridium*(17.8%)及*Akkermansia*(10.8%)是治疗组最为丰富的物种(图4)。物种差异分析则显示拟杆菌属(*Bacteroides*)在治疗组丰度增高, 差异有统计学意义。

属水平LEfSe分析显示, 对照口腔菌群代表物种以及对应log10 LDA值为: 葡萄球菌属(*Staphylococcaceae*)(5.4)、*Jeotgalicoccus*(4.7)、球菌属(*Sporosarcina*)(3.8)以及*Atopostipes*(3.6); 治疗组口腔菌群为: 链球菌属(*Streptococcus*)(5.4)、*Lachnoclostridium*(4.2)、*Clostridium_innocuum_group*(4.1)、大肠志贺菌属(*Escherichia_Shigella*)(3.9)及肠球菌(*Enterococcus*)(3.5)(图5A); 对照肠道菌群代表物种以及log10 LDA值为: *Parabacteroides*(4.1)、ASF356(4.0)、*Enterorhabdus*(3.6)、葡萄球菌属(*Staphylococcaceae*)(3.5)、粪杆菌属(*Faecalibacterium*)(3.3)、*Jeotgalicoccus*(3.0)以及

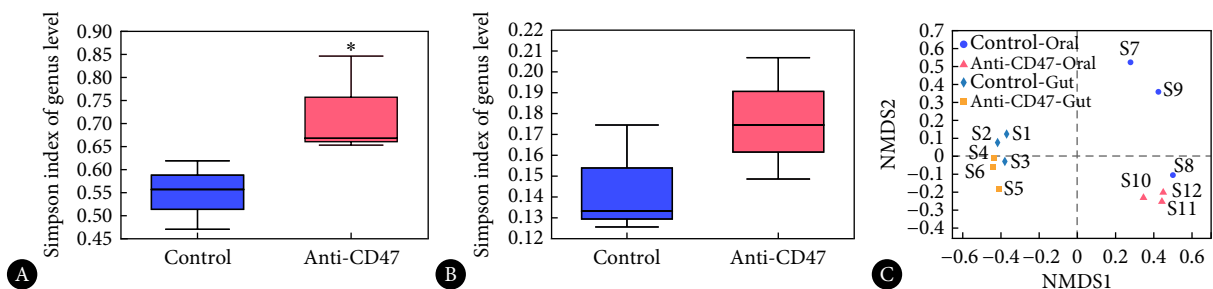


图 2 靶向CD47的免疫治疗对于口腔-肠道菌群多样性的影响

Fig 2 The impact of CD47-targeted immunotherapy on the diversity of oral-gut microbiota

A: Alpha diversity of oral microbiota, Simpson index, Ctrl_Oral compared with Anti_CD47_Oral, *P<0.05; B: Alpha diversity of gut microbiota, Simpson index; C: Beta diversity, NMDS analysis.

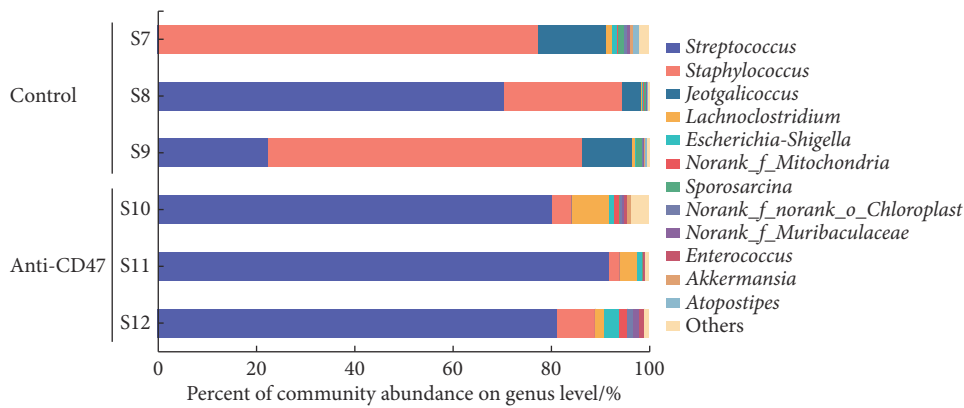


图 3 靶向CD47免疫治疗组小鼠及对照组小鼠口腔菌群物种组成对比

Fig 3 Composition diagram of oral microbiota at the genus level in the anti-CD47 antibody treated group and the control group

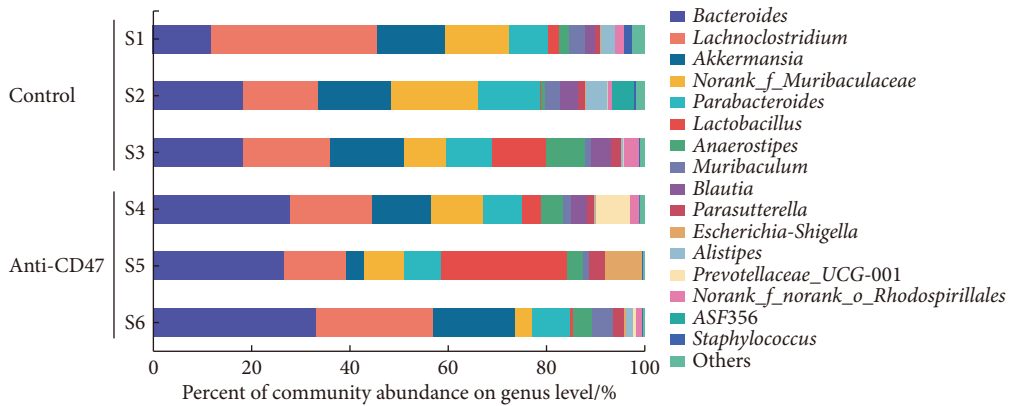


图 4 靶向CD47免疫治疗组小鼠及对照组小鼠肠道菌群物种组成对比

Fig 4 Composition diagram of gut microbiota at the genus level in the anti-CD47 antibody treated group and the control group

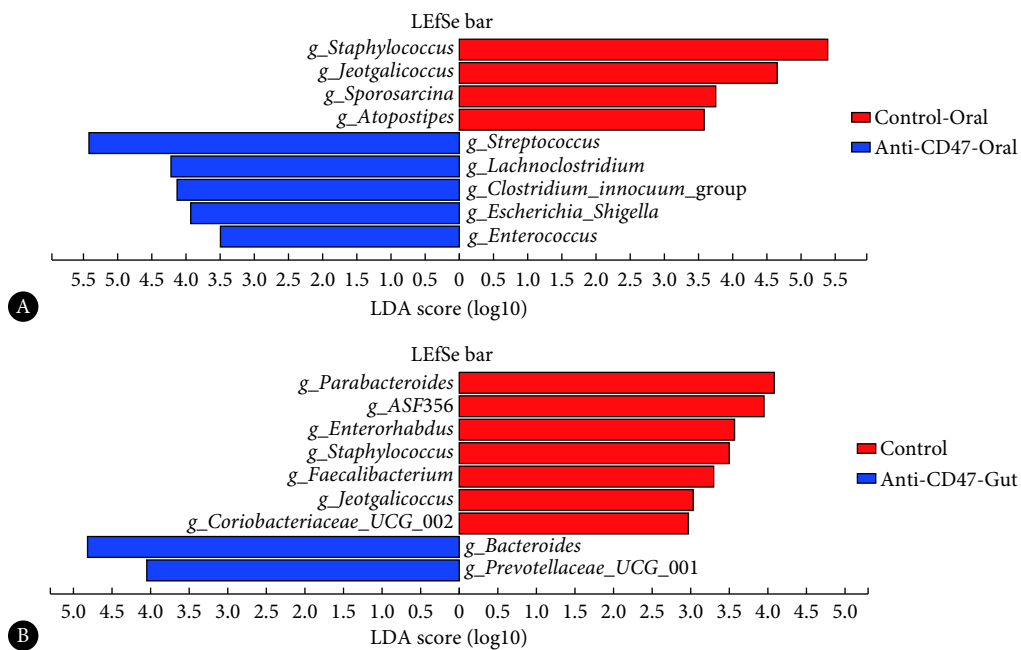


图 5 不同组差异性物种LDA值比较

Fig 5 Comparison of the LDA scores from the biomarkers

A: Oral microbiota; B: Gut microbiota.

(*Coriobacteriaceae_UCG_002*)(3.0); 而治疗组肠道为: 拟杆菌属(*Bacteroides*)(4.8)、*Prevotellaceae_UCG_001*(4.1), 以上差异均有统计学意义(图5B)。

3 讨论

细菌与人体健康息息相关, 在研究者探索靶向CD47的免疫治疗方案有效性的同时, 本实验初步探索了CD47免疫治疗对于结肠癌模型小鼠口腔-肠道菌群的影响, 从而填补该方面研究空白。

目前口腔微生物群落与免疫治疗的相关研究尚处于起步阶段。口腔唾液取样具有无创、快速及便捷等优势^[21], 是进行微生物诊断的良好选择。口腔作为消化系统的起始, 是机体营养摄入的入口, 也是消化道免疫与外界环境作用的窗口。同时, 口腔微生物结构也在一定程度上反映了远端消化系统的健康状态^[22-26]。FLEMER等^[27]的一项利用微生物对结肠癌进行诊断及预测的研究显示, 口腔菌群相较于粪便菌群对结肠癌诊断的敏感性更高; 口腔菌群联合粪便肠道菌群共同诊断, 敏感性更高。口腔微生物在其他消化系统肿瘤, 如食管癌、胰腺癌、肝癌等也均为良好的诊断指标^[28]。本实验中, 接受靶向CD47免疫治疗组小鼠口腔菌群Alpha多样性较对照低, 不同组间Beta多样性也存在差异, 口腔菌群对于治疗的反应相对敏感。此结果提示口腔微生物群落可能是监测靶向CD47免疫治疗应答以及免疫相关并发症的良好选择, 同时也可能是利用微生物干预手段调节免疫治疗效果的一个作用位点。

本实验中肠道菌群分析显示, 接受治疗的结肠癌小鼠肠道内的拟杆菌属出现了明显的升高。虽然, 目前尚无研究探索靶向CD47免疫治疗对于肠道菌群的影响, 但既往的研究表明拟杆菌属在肠道菌群内的丰度与免疫治疗的副作用有着密切联系。前人通过对比接受CTLA-4治疗患者的肠道菌群发现, 发生免疫相关性结肠炎的患者肠道中拟杆菌的丰度要明显低于无该并发症的患者^[29]。DUBIN等^[30]在接受抗PD-1治疗的小细胞肺癌患者队列中也发现了类似的现象。本实验中接受靶向CD47免疫治疗的小鼠肠道内的拟杆菌属丰度升高可能是靶向CD47免疫治疗相较于T细胞相关免疫治疗结肠炎及肠道副反应发生率较低^[31]的重要原因, 值得进一步深入研究。

此外, 前人采用抗CD47单克隆抗体治疗荷胶质瘤小鼠后, 小鼠肿瘤相关巨噬细胞表现为M1样极化, 巨噬细胞呈现出抗炎激活状态^[32]。M1极化巨噬细胞在发挥抗肿瘤功效时, 其作为天然免疫细胞的病原体清除及识别防御功能也同步增强。口腔细菌的Alpha多样性低是否由

于巨噬细胞的高反应状态导致, 这一问题有待进一步研究。同时, 小鼠口腔菌群与人类口腔菌群存在较大差异^[33-35], 利用课题组前期构建的口腔菌群人源化小鼠模型^[36], 探究接受治疗后人源化的口腔-肠道细菌群落与免疫治疗间的相互影响也是我们将进一步研究的方向。

* * *

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] LEVY M, THAISS CA, ELINAV E. Metagenomic cross-talk: The regulatory interplay between immunogenomics and the microbiome. *Genome Med*, 2015, 7: 120[2021-07-15]. <https://doi.org/10.1186/s13073-015-0249-9>.
- [2] BELKAID Y, HARRISON O J. Homeostatic immunity and the microbiota. *Immunity*, 2017, 46(4): 562-576.
- [3] WU X, GU Z, CHEN Y, et al. Application of PD-1 blockade in cancer immunotherapy. *Comput Struct Biotechnol J*, 2019, 17: 661-674.
- [4] SONDAK V K, SMALLEY K S M, KUDCHADKAR R, et al. Ipilimumab. *Nat Rev Drug Discov*, 2011, 10(6): 411-412.
- [5] ZHANG W, HUANG Q, XIAO W, et al. Advances in Anti-Tumor Treatments Targeting the CD47/SIRPα Axis. *Front Immunol*, 2020, 11: 18[2021-07-15]. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00018>.
- [6] FENG M, JIANG W, KIM B Y S, et al. Phagocytosis checkpoints as new targets for cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*, 2019, 19(10): 568-586.
- [7] FIALA O, SOREJS O, SUSTR J, et al. Immune-related adverse effects and outcome of patients with cancer treated with immune checkpoint inhibitors. *Anticancer Res*, 2020, 40(3): 1219-1227.
- [8] SPAIN L, DIEM S, LARKIN J. Management of toxicities of immune checkpoint inhibitors. *Cancer Treat Rev*, 2016, 44: 51-60.
- [9] VETIZOU M, PITT J M, DAILLIERE R, et al. Anticancer immunotherapy by CTLA-4 blockade relies on the gut microbiota. *Science*, 2015, 350(6264): 1079-1084.
- [10] SOULARUE E, LEPAGE P, COLOMBEL J F, et al. Enterocolitis due to immune checkpoint inhibitors: A systematic review. *Gut*, 2018, 67(11): 2056-2067.
- [11] CHEN S, ZHOU Y, CHEN Y, et al. Fastp: An ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics*, 2018, 34(17): i884-i890.
- [12] MAGOC T, SALZBERG S L. FLASH: Fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics*, 2011, 27(21): 2957-2963.
- [13] EDGAR R C. UPARSE: Highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nat Methods*, 2013, 10(10): 996-998.
- [14] STACKEBRANDT E, GOEBEL B M. Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Microbiol Society*, 1994, 44(4): 846-849.
- [15] WANG Q, GARRITY G M, TIEDJE J M, et al. Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy.

- Appl Environ Microbiol*, 2007, 73(16): 5261–5267.
- [16] SCHLOSS P D, WESTCOTT S L, RYABIN T, *et al.* Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol*, 2009, 75(23): 7537–7541.
- [17] SCHLOSS PD. Reintroducing mothur: 10 years later. *Appl Environ Microbiol*, 2020, 86(2): e02343-19[2021-07-15]. <https://doi.org/10.1128/AEM.02343-19>.
- [18] CAPORASO J G, KUCZYNSKI J, STOMBAUGH J, *et al.* QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods*, 2010, 7(5): 335–336.
- [19] DIXON P. VEGAN, a package of R functions for community ecology. *Journal of Vegetation Science*, 2003, 14(6): 927–930.
- [20] SEGATA N, IZARD J, WALDRON L, *et al.* Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol*, 2011, 12(6): R60[2021-07-15]. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-6-r60>.
- [21] 程兴群, 周学东, 徐欣. 唾液的诊断应用研究. *华西口腔医学杂志*, 2016, 34(6): 647–653.
- [22] RAUTAVA J, PINNELL L J, VONG L, *et al.* Oral microbiome composition changes in mouse models of colitis. *J Gastroenterol Hepatol*, 2015, 30(3): 521–527.
- [23] SAID H S, SUDA W, NAKAGOME S, *et al.* Dysbiosis of salivary microbiota in inflammatory bowel disease and its association with oral immunological biomarkers. *DNA Res*, 2014, 21(1): 15–25.
- [24] ZHAO F, DONG T, YUAN KY, *et al.* Shifts in the Bacterial Community of Supragingival Plaque Associated With Metabolic-Associated Fatty Liver Disease. *Front Cell Infect Microbiol*, 2020, 10: 581888[2021-07-15]. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.581888>.
- [25] ACHARYA C, SAHINGUR SE, BAJAJ JS. Microbiota, cirrhosis, and the emerging oral-gut-liver axis. *JCI Insight*, 2017, 2(19): e94416[2021-07-15]. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.94416>.
- [26] LE BARS P, MATAMOROS S, MONTASSIER E, *et al.* The oral cavity microbiota: Between health, oral disease, and cancers of the aerodigestive tract. *Can J Microbiol*, 2017, 63(6): 475–492.
- [27] FLEMER B, WARREN R D, BARRETT M P, *et al.* The oral microbiota in colorectal cancer is distinctive and predictive. *Gut*, 2018, 67(8): 1454–1463.
- [28] CHEN Y, CHEN X, YU H, *et al.* Oral microbiota as promising diagnostic biomarkers for gastrointestinal cancer: A systematic review. *Onco Targets Ther*, 2019, 12: 11131–11144.
- [29] CHAPUT N, LEPAGE P, COUTZAC C, *et al.* Baseline gut microbiota predicts clinical response and colitis in metastatic melanoma patients treated with ipilimumab. *Ann Oncol*, 2017, 28(6): 1368–1379.
- [30] DUBIN K, CALLAHAN MK, REN B, *et al.* Intestinal microbiome analyses identify melanoma patients at risk for checkpoint-blockade-induced colitis. *Nature Commun*, 2016, 7: 10391[2021-07-15]. <https://doi.org/10.1038/ncomms10391>.
- [31] MARTINS F, SOFIYA L, SYKIOTIS G P, *et al.* Adverse effects of immune-checkpoint inhibitors: Epidemiology, management and surveillance. *Nat Rev Clin Oncol*, 2019, 16(9): 563–580.
- [32] ZHANG M, HUTTER G, KAHN SA, *et al.* Anti-CD47 treatment stimulates phagocytosis of glioblastoma by M1 and M2 polarized macrophages and promotes M1 polarized macrophages in vivo. *PLoS ONE*, 2016, 11(4): e0153550[2021-07-15]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153550>.
- [33] JOSEPH S, ADUSE-OPOKU J, HASHIM A, *et al.* A 16S rRNA Gene and Draft Genome Database for the Murine Oral Bacterial Community. *mSystems*, 2021, 6(1): e01222-20[2021-07-15]. <https://doi.org/10.1128/mSystems.01222-20>.
- [34] LI Y, HE J, HE Z, *et al.* Phylogenetic and functional gene structure shifts of the oral microbiomes in periodontitis patients. *ISME J*, 2014, 8(9): 1879–1891.
- [35] DUTZAN N, KAJIKAWA T, ABUSLEME L, *et al.* A dysbiotic microbiome triggers TH17 cells to mediate oral mucosal immunopathology in mice and humans. *Sci Transl Med*, 2018, 10(463): eaat0797[2021-07-15]. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aat0797>.
- [36] LI B, GE Y, CHENG L, *et al.* Oral bacteria colonize and compete with gut microbiota in gnotobiotic mice. *Int J Oral Sci*, 2019, 11(1): 10[2021-07-15]. <https://doi.org/10.1038/s41368-018-0043-9>.

(2021-08-30 收稿, 2021-12-21 修回)

编辑 汤洁