

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2026.04.009

· 基础研究 ·

肠道菌群失衡通过免疫代谢重编程促进胆管癌发展的分子机制研究

方晨, 柯希[△], 石丽娟(湖北工程职业学院 健康与教育学院, 湖北 黄石 435000)

[摘要] **目的:**通过多组学整合分析,解析肠道菌群在胆管癌(CCA)发生发展中的潜在作用机制并识别相关关键基因。**方法:**基于SRA数据库的16S rRNA测序数据,比较CCA患者与健康对照者的肠道菌群组成;采用孟德尔随机化(MR)分析评估菌群与CCA风险的遗传关联。通过gutMGene和GeneCards数据库获取相关代谢物与基因,进行代谢和功能富集分析。整合GEO单细胞转录组数据(GSE213452),解析肿瘤微环境的细胞组成,重点关注T细胞亚群及其功能状态,并结合TCGA-CHOL数据集验证关键候选基因的表达差异。**结果:**与健康对照组相比,CCA患者肠道菌群组成发生显著改变,变形菌门下菌群异常富集(LDA > 4)。MR分析进一步证实,肠杆菌目与肠杆菌科的遗传易感性均与CCA风险呈正向关联。代谢通路富集分析提示,菌群相关代谢物主要参与嘌呤代谢及糖酵解/糖异生等通路;功能富集分析显示,相关基因显著富集于NOD样受体、IL-17、Toll样受体及NF-κB信号通路等炎症免疫通路。单细胞转录组分析结果显示,CCA组织中肿瘤细胞比例显著升高($P < 0.05$),T细胞比例由20.7%增至39.2%;拟时序分析结果表明,MKI67⁺T细胞处于分化末期并呈高增殖特征,其差异基因与菌群相关基因存在交集,其中SERPINA1和IFNG表达在肿瘤免疫微环境中显著变化($P < 0.001$),可能发挥核心调控作用。TCGA-CHOL数据集验证显示,SERPINA1在CCA肿瘤组织中显著下调($P < 0.001$),而IFNG在肿瘤与正常组织间无显著差异($P > 0.05$)。**结论:**肠道菌群失衡(尤其是肠杆菌科异常增殖)可能通过代谢-免疫调控网络促进CCA进展,T细胞功能变化与关键基因(SERPINA1和IFNG)在MKI67⁺T细胞中的差异化表达模式密切相关。

[关键词] 胆管癌;肠道菌群;变形菌门;孟德尔随机化;单细胞转录组;T细胞

[中图分类号] R735.8;R37;R392 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2026)04-0429-10

Study on the molecular mechanisms by which gut microbiota dysbiosis promotes the development of cholangiocarcinoma through immunometabolic reprogramming

FANG Chen, KE Xi[△], SHI Lijuan (School of Health and Education, Hubei Engineering Institute, Huangshi 435000, Hubei, China)

[Abstract] **Objective:** To comprehensively elucidate the potential mechanisms of gut microbiota in the occurrence and development of cholangiocarcinoma (CCA) and identify related key genes through integrative multi-omics analysis. **Methods:** Based on 16S rRNA sequencing data from the SRA database, the gut microbiota composition of CCA patients was compared with that of healthy controls. Mendelian randomization (MR) analysis was employed to assess the genetic association between specific microbiota and CCA risk. Relevant metabolites and genes were obtained from the gutMGene and GeneCards databases for metabolic and functional enrichment analyses. GEO single-cell transcriptomic data (GSE213452) was integrated to characterize the cellular composition of the tumor microenvironment, with a particular focus on T cell subsets and their functional states. The expression differences of key candidate genes were validated using the TCGA-CHOL dataset. **Results:** Compared with the healthy control group, the gut microbiota composition of CCA patients was significantly altered, characterized by an abnormal enrichment of the phylum *Proteobacteria* (LDA > 4). MR analysis further demonstrated that genetic predispositions to both the order *Enterobacteriales* and the family *Enterobacteriaceae* were positively associated with the risk of CCA. Metabolic pathway enrichment analysis suggested that microbiota-related metabolites were mainly involved in pathways such as the purine metabolism and glycolysis/gluconeogenesis; functional enrichment analysis showed that related genes were significantly enriched in inflammatory-immune pathways including NOD-like receptor, IL-17, Toll-like receptor, and NF-κB signaling pathways. Single-cell transcriptomic analysis revealed a significantly increased proportion of cancer cells ($P < 0.05$) and an elevated T cell proportion (from 20.7% to 39.2%) in CCA tissues. Pseudotime analysis indicated that MKI67⁺T cell was at a late differentiation stage and exhibited high proliferative features. Differential genes of these T cell intersected with microbiota-related genes, among which SERPINA1 and IFNG showed significant changes in expression in the tumor immune microenvironment ($P < 0.001$) and may play a core regulatory role. Validation using the TCGA-CHOL dataset revealed that SERPINA1 was significantly downregulated in CCA tumor tissues ($P < 0.001$), whereas IFNG showed no significant difference

[作者简介] 方晨,硕士,助教;柯希,硕士,助教。△为共同第一作者

[通信作者] 石丽娟(扫码获取作者通信方式)



between tumor and normal tissues ($P > 0.05$). **Conclusion:** Gut microbiota dysbiosis, particularly the abnormal proliferation of *Enterobacteriaceae*, may promote CCA progression via a metabolic-immune regulatory network. Specifically, alterations in T cell function are closely linked to the differentiated expression patterns of the key genes (SERPINA1 and IFNG) within MKI67⁺ T cell.

[Key words] cholangiocarcinoma (CCA); gut microbiota; *Proteobacteria*; Mendelian randomization (MR); single-cell transcriptomics; T cell

[Chin J Cancer Biother, 2026, 33(4): 429-438. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2026.04.009]

胆管癌(cholangiocarcinoma, CCA)是第二常见的原发性肝恶性肿瘤,其发病率在全球范围内呈逐年上升趋势^[1-2]。由于CCA侵袭性强、异质性高,多数患者确诊时已是中晚期,现有治疗手段效果有限,预后较差。因此,深入探索CCA发生发展的分子机制与潜在干预靶点至关重要。肠道菌群作为人体重要的“第二基因组”^[3],在肝癌^[4]、结直肠癌^[5]、胰腺癌^[6]等多种消化系统肿瘤中发挥关键作用。肠道菌群通过调节营养代谢、胆汁酸循环及宿主免疫,进而影响局部与全身炎症微环境^[7-8]。例如,菌群失衡将导致肠黏膜屏障功能受损、免疫耐受性破坏及慢性炎症持续,进而促进肿瘤的发生发展^[9-10]。值得注意的是,CCA的发生与胆道系统独特的解剖位置密切相关——肠道菌群可能通过“肠-肝轴”与胆管上皮微环境相互作用,参与肿瘤发生^[11-12]。现有研究^[13]表明,特定菌群可通过调节免疫应答与胆汁酸代谢影响胆管上皮细胞癌变。某些菌群的异常增殖可引发慢性炎症反应,促进促炎因子和细胞因子的持续释放,从而导致胆管局部的免疫微环境重塑^[14]。菌群代谢产物(如短链脂肪酸、胆汁酸衍生物等)亦可影响细胞代谢重编程与基因表达,可能加速癌变进程^[15-16]。此外,菌群相关信号还能调控T细胞功能,包括效应性T细胞的激活、耗竭及调节性T细胞的扩增,从而改变抗肿瘤免疫应答的平衡^[17-19]。然而,目前关于肠道菌群在CCA中的具体作用机制仍不明确,尤其是关键菌群如何通过代谢-免疫网络驱动肿瘤发生及其与肿瘤微环境中免疫细胞(如T细胞)的互作机制,尚缺乏系统阐释。为此,本研究整合16S rRNA测序、代谢组学、孟德尔随机化(Mendelian randomization, MR)及单细胞转录组学等多组学数据,从菌群组成、代谢功能与免疫调控三个维度,系统解析肠道菌群在CCA发生发展中的潜在作用机制。

1 材料与方法

1.1 16S rRNA 测序数据收集

通过EMBL-EBI数据库(<https://www.ebi.ac.uk/ena/browser/search>)以关键词“Cholangiocarcinoma”检索相关研究项目,筛选并下载包含完整表型信息的数据集(项目编号:PRJNA983932)。随后,通过NCBI SRA数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/>)

获取该项目中所有样本的16S rRNA测序原始数据。该项目共包含20份粪便样本测序数据,其中包括9例健康对照和11例CCA患者样本。

1.2 微生物相对丰度分析

采用FastQC(v0.11.9)对原始测序数据进行质量评估,并利用MultiQC整合报告。接着,使用KneadData(v0.12, <https://github.com/biobakery/biobakery/wiki/kneaddata>)去除宿主和污染序列,并通过GraPhlAn(v1.1.3, <https://github.com/biobakery/graphlan.git>)基于相对丰度数据绘制微生物系统发育树以可视化群落结构。Alpha多样性通过invsimpson指数进行评估,Beta多样性则使用主坐标分析(principal coordinates analysis, PCoA)进行评估。组间差异通过Wilcoxon秩和检验和Welch *t*检验进行比较。使用R包edgeR分析(v3.32.1)微生物丰度差异,并绘制火山图和曼哈顿图。通过LEfSe分析(v1.1.2, 阈值为2.0)识别差异菌群并绘制柱状图,LDA分数反映各物种在组间的差异程度。

1.3 FAPROTAX 和 PICRUSt 预测微生物功能组成

利用FAPROTAX(v1.2.10, <http://www.loucalab.com/archive/FAPROTAX/>)对微生物群落的主要生态功能进行注释。同时,QIIME(v1.9.1)导出的OTU丰度表及其对应的分类学注释信息通过R包进行格式转换后,利用PICRUSt(https://www.bic.ac.cn/BIC/#/analysis_tool_type=tool&page=b%27Mzk%3D%27)基于16S rRNA测序数据进行群落系统发育功能预测。

1.4 肠道菌群基因组数据收集

肠道菌群的汇总统计数据源自MiBioGen联盟(<https://mibiogen.gcc.rug.nl>)开展的一项大规模全基因组关联研究(genome-wide association study, GWAS),该研究涵盖来自11个国家的18 340名欧洲参与者,共检测到122 110个位点。本研究从中提取了与5个分类层级(门、纲、目、科、属)相关的肠道细菌分类单元对应的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)数据,作为工具变量用于后续分析。此外,从IEU Open GWAS数据库(<https://gwas.mrcieu.ac.uk/>)中提取了欧洲人群的暴露因素和结局变量的GWAS摘要数据,用于实施MR分析。从GWAS Catalog数据库下载了CCA相关的GWAS研究(研究编号:GCST90013662)作为结局变量,分别

以变形菌门、 γ -变形菌纲、肠杆菌目和肠杆菌科这4个不同分类层级的菌群的相对丰度作为暴露因素进行分析。

1.5 MR分析肠道菌群与CCA的因果关系

基于MiBioGen和IEU Open GWAS数据库获取的GWAS摘要数据,采用双样本MR方法评估肠道菌群与CCA之间的潜在因果关系。首先,筛选与暴露因素(即目标菌群)显著相关($P < 5 \times 10^{-5}$)且相互独立的SNP(LD阈值为 $r^2 < 0.001$ 、距离 $> 10\ 000$ kb)作为工具变量,并确保其 F 统计量 > 10 以避免弱工具偏倚。初始关联分析通过R包gwasglue进行,随后利用TwoSampleMR包去除连锁不平衡SNP,暴露与结局数据通过harmonise步骤进行协调,以确保效应量的方向在两个数据集中保持一致,从而避免等位基因方向不一致导致的偏倚。随后,使用MR-PRESSO方法检测并校正水平多效性导致的离群值。在此基础上,采用5种常用方法[逆方差加权法(inverse variance weighted, IVW)、加权模式、MR-Egger、加权中位数、简单模式法]进行因果推断。其中,MR-Egger回归作为主要分析方法用于评估潜在因果关系,而其他方法用于验证结果的稳健性和一致性。

1.6 代谢物与基因功能富集分析

利用gutMGene数据库(<http://bio-computing.hrbmu.edu.cn/gutmgene/#/home>)获取目标菌群(肠杆菌目和肠杆菌科)相关的代谢物,分别获得332个和386个相关代谢物,合并去重后共获得405个独特代谢物。将这些代谢物导入MetaboAnalyst平台(<https://www.metaboanalyst.ca/>),基于SMPDB与KEGG数据库进行代谢通路富集分析,以识别显著富集的代谢通路。同时,从GeneCards数据库(<https://www.genecards.org/>)获取肠杆菌目相关基因3个,肠杆菌科相关基因205个,合并后共有206个非冗余基因,利用R包clusterProfiler对其进行KEGG与GO功能富集(包括生物学过程、细胞组分和分子功能)分析,以探究其在免疫和炎症相关通路中的潜在作用。

1.7 Seurat包分析CCA组织单细胞转录组数据

从GEO数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)下载单细胞转录组测序数据集GSE213452(7例CCA与4例癌旁组织)。采用Seurat包进行数据整合、归一化与线性批次校正,并通过UMAP降维聚类。随后,利用已知的细胞谱系特异性标记基因,并结合在线网站CellMarker(<http://xteam.xbio.top/CellMarker/>)及SingleR包对细胞类型进行注释。使用inferCNV工具分析上皮细胞的染色体拷贝数变异(copy number variation, CNV),以非上皮细胞群(T细胞、B细胞、浆细胞、单核/巨噬细胞、树突状细

胞、成纤维细胞、内皮细胞、平滑肌细胞、肥大细胞及分泌细胞)作为参考细胞建立正常基线表达谱并统计不同组织中细胞比例差异。

1.8 CellChat和SCORPIUS分析细胞通信与T细胞的分化轨迹

利用CellChat软件构建配体-受体相互作用网络,比较肿瘤组织与癌旁组织间通信模式的差异,重点评估T细胞与肿瘤细胞的信号互作情况。随后,对T细胞亚群进行重新聚类和细分。采用SCORPIUS算法,基于基因表达谱推断T细胞的分化轨迹,以探究其在肿瘤微环境中的功能动态和发育路径。

1.9 TCGA数据验证SERPINA1和IFNG在CCA中的表达差异

从TCGA数据库(<https://portal.gdc.cancer.gov>)选取CCA项目(TCGA-CHOL)中基于STAR流程的RNAseq数据(FPKM格式),共纳入9例正常胆管组织样本与35例CCA组织样本。利用R包ggplot2对筛选出的SERPINA1和IFNG基因在两组间的表达水平进行可视化,并使用Wilcoxon秩和检验比较其表达差异的统计学显著性。

1.10 统计学处理

本研究所有统计分析和绘图均使用R语言(v4.3.1, <https://www.r-project.org/>),并通过集成开发环境RStudio(v2023.12.1)完成代码编写与调试。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 CCA患者肠道菌群组成呈显著改变

PCoA分析结果(图1A)显示,CCA患者与健康对照组的肠道菌群结构存在显著分离。Venn图(图1B)进一步显示,两组菌群共有的操作分类单元(operational taxonomic unit, OTU)仅20个,从分类单元共享层面证实了群落组成的显著差异。分类学分析结果(图1C~F)显示,从门至属各层级均观察到两组间的构成差异。属水平分析结果(图1G)显示,CCA组中链球菌属的相对丰度显著高于健康对照组,而健康对照组中布劳特氏菌属和乳糖黑杆菌相对富集。LEfSe分析(图1H、I, LDA > 4)显示,健康对照组的特征菌群主要集中于普雷沃氏菌属、普雷沃氏菌科和拟杆菌目等,而CCA组的特征菌群则显著富集于变形菌门相关分类单元(γ -变形菌纲、肠杆菌目和肠杆菌科)。

2.2 肠杆菌目和肠杆菌科的增加显著促进CCA进展

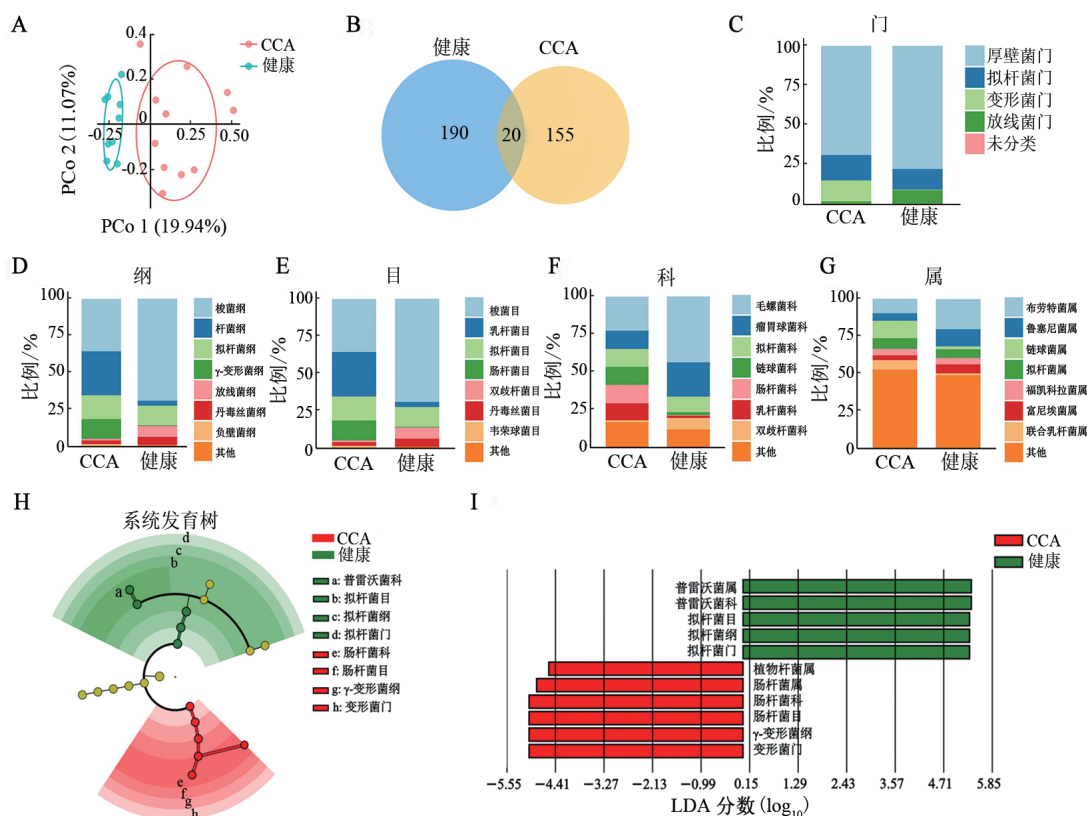
MR分析结果(图2A、B)显示,在MR-Egger模型中,肠杆菌目与肠杆菌科的遗传易感性均与CCA风险增加存在正向关联;散点图进一步展示了SNP对

暴露菌群与结局(CCA)效应的分布,其拟合线斜率为正,提示两种菌群与CCA存在正向关联。

2.3 肠道菌群可能通过代谢重编程、免疫与炎症调控促进CCA进展

基于 SMPDB 的代谢通路富集分析(图 3A)显示,相关代谢物主要富集于能量代谢与氨基酸代谢通路,如嘌呤代谢、糖酵解/糖异生、柠檬酸循环等。基于KEGG的代谢通路分析(图3B)进一步揭示了嘌呤代谢、氮代谢、脂肪酸生物合成及核苷酸代谢异常,强调这些代谢异常在细胞增殖与肿瘤微环境重

塑中的潜在作用。在此基础上,从GeneCards数据库获取206个相关基因,进行功能富集分析。KEGG分析(图3C)显示,这些基因显著富集于多条免疫和炎症相关信号通路,包括NOD样受体、IL-17、Toll样受体及NF-κB通路,并涉及Th17、Th1和Th2细胞分化及免疫检查点通路。GO功能注释分析(图3D)显示,这些基因主要参与免疫反应、细胞因子活性调控及T细胞活化等生物学过程,并与细胞外区域和分泌颗粒等相关。



A:PCoA分析显示两组菌群结构明显分离;B:Venn图显示CCA组与健康组之间OTU的重叠情况;C~G:各分类层级的相对丰度分布堆叠柱状图;H:LefSe系统发育树显示两组优势菌群分布;I:LDA分析结果柱状图。

图1 从不同水平对CCA组和健康组样本中肠道菌群的物种组成进行差异分析

2.4 CCA组织中肿瘤细胞增殖伴随T细胞免疫应答增强

对CCA单细胞转录组数据集的分析显示,肿瘤微环境中细胞组成发生改变。经Seurat流程整合、归一化及批次校正后,UMAP聚类得到32个细胞簇(图4A),结合已知标记基因进行细胞注释,识别出11种主要细胞类型(图4B),包括T细胞、成纤维细胞、上皮细胞、单核/巨噬细胞、浆细胞、内皮细胞、树突状细胞、B细胞、肥大细胞、平滑肌细胞和分泌细胞。标记基因表达情况(图4C)支持注释可靠性。为进一步区分上皮细胞中的恶性细胞,将上皮细胞分为6个亚群(图4D)。随后,通过inferCNV分析评估

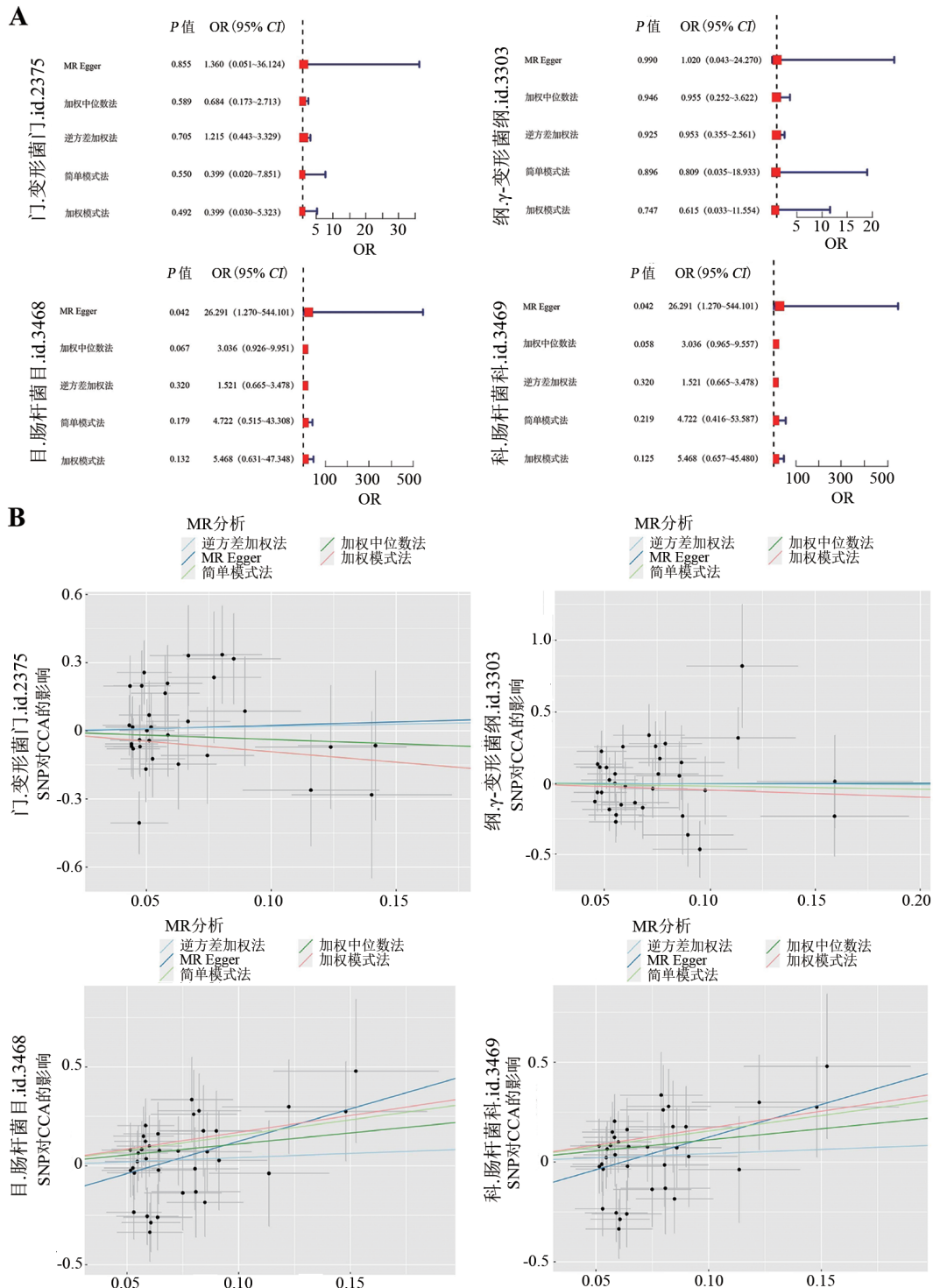
各亚群的CNV特征,结果(图4E)显示:亚群1、2、3、5、6存在广泛的CNV,且其评分也均明显高于亚群4(图4F)。基于此,将亚群1、2、3、5、6定义为肿瘤细胞群体(图4G)。上述细胞身份重新注释后,比较不同组织来源的细胞组成比例,结果(图4H)显示,CCA组织中肿瘤细胞比例显著高于癌旁组织($P < 0.05$),且T细胞比例也明显上升(从20.7%增至39.2%)。

2.5 T细胞与肿瘤细胞通信增强并呈现增殖相关基因表达特征

CellChat软件分析结果(图5A)显示,CCA组中T细胞与肿瘤细胞的交互强度显著高于癌旁组($P < 0.05$)。进一步对T细胞群体进行单独提取和

重新聚类, 可分为5个亚型(图5B), 且标记基因的点图验证了细胞注释的准确性(图5C)。比例分析结果(图5D)显示, CCA组织中初始T细胞显著减少, 而MKI67⁺ T细胞显著增多(均 $P < 0.05$)。拟时序分析结果(图5E、F)表明, MKI67⁺ T细胞处于分化末期, 提示其可能代表肿瘤环境中高度增殖或耗竭的T细胞状态。进一步对比两组中MKI67⁺ T细胞的差异基

因, 共鉴定出231个显著上调基因和131个显著下调基因(图5G)。将差异基因与上述菌群相关基因取交集, 发现13个关键交集基因(图5H)。PPI网络分析结果(图5I)显示, SERPINA1与IFNG在其中连接度最高, 提示其可能在菌群相关基因与肿瘤免疫调控的交互中发挥核心作用。



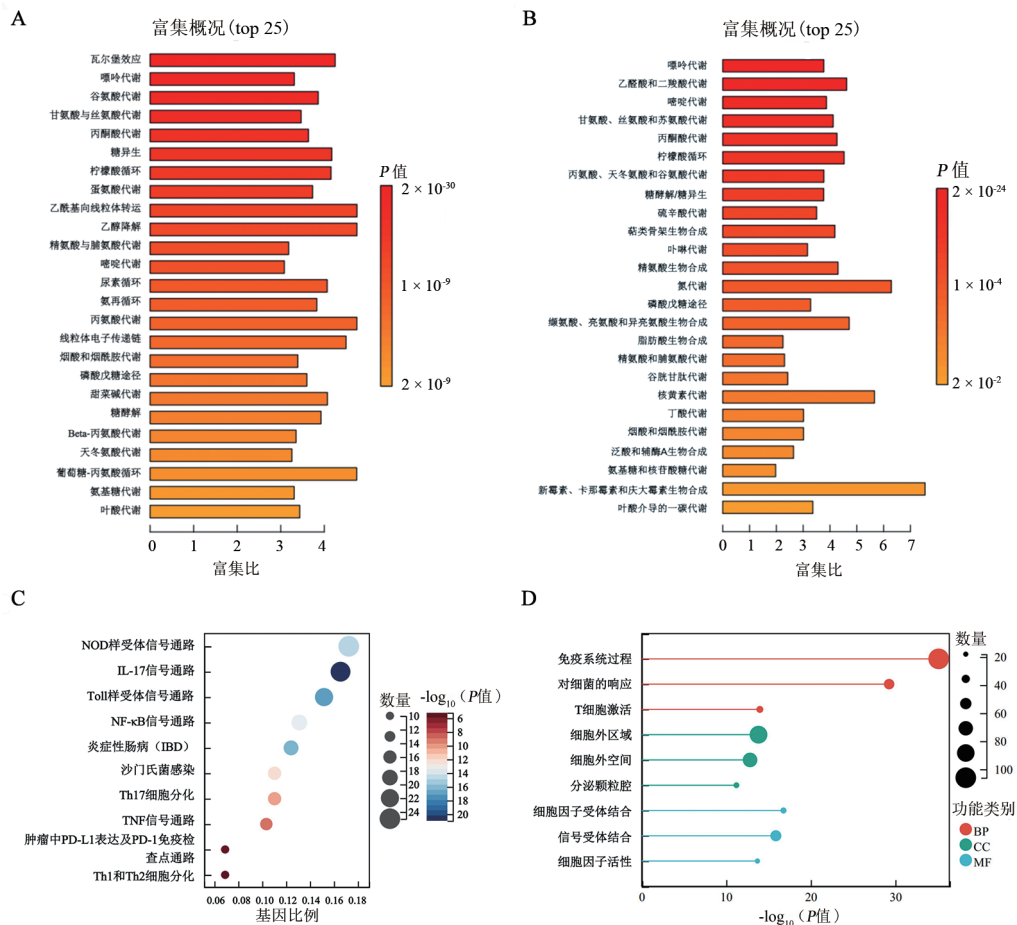
A: 四种菌群与CCA的MR分析结果森林图; B: 上述菌群与CCA风险的MR散点图, 每个点代表一个工具变量(SNP), 趋势线斜率指示因果效应方向。

图2 MR分析揭示肠杆菌目/肠杆菌科与CCA的遗传相关性

2.6 SERPINA1 与 IFNG 在 CCA 中呈现差异化表达模式

在 MKI67⁺ T 细胞中, SERPINA1 显著下调, 而 IFNG 显著上调(图 6A、B, $P < 0.001$)。UMAP 可视化图(图 6C、D)进一步揭示, 两者的表达均集中分布于 MKI67⁺ T 细胞群体, 提示其可能与 T 细胞的增殖和功能

状态密切相关。为验证这些发现, 基于 TCGA-CHOL 数据集对 SERPINA1 和 IFNG 的整体表达水平进行比较, 结果(图 6E)显示, SERPINA1 在肿瘤组织中显著下调($P < 0.001$), 而 IFNG 在正常与肿瘤组织间未见显著差异($P > 0.05$)。



A、B: 基于 SMPDB(A)和 KEGG(B)数据库的代谢通路富集分析柱状图; C、D: 相关基因的 KEGG(C)与 GO(D)富集分析气泡图, 颜色代表富集显著性[-log₁₀(P值)], 点大小代表基因计数。

图3 功能富集分析结果

3 讨论

本研究通过整合多组学数据, 系统性地揭示了肠道菌群失衡与 CCA 发生发展的潜在因果联系与分子机制。主要发现可归纳为菌群、功能、肿瘤微环境这三个相互关联的层面, 共同勾勒出“菌群失调-代谢免疫重编程-肿瘤微环境重塑”的致病网络。

首先, 在菌群层面, 本研究证实了 CCA 患者存在以变形菌门(尤其是肠杆菌科)异常富集为特征的肠道菌群失调, 进一步通过 MR 分析为其在 CCA 发生中的潜在“驱动者”角色提供了遗传学证据。既往研究^[20-21]提示变形菌门富集与慢性炎症及肿瘤发生相关, 但多停留在相关性层面。本研究利用 MR 方法, 一定程度上克

服了混杂因素的干扰, 发现肠杆菌目、肠杆菌科的丰度增加与 CCA 风险存在正向遗传关联, 强化了特定菌群失衡作为 CCA 风险因素的因果推断, 而非仅仅是疾病的伴随现象。肠杆菌科可通过脂多糖等细胞壁成分持续激活 Toll 样受体 4(TLR4)、NF-κB 等经典炎症通路, 驱动局部及全身性慢性炎症, 为上皮细胞恶性转化创造了关键土壤^[22-23]。这一发现提示, 针对此类促炎菌群的干预, 或可成为 CCA 预防的新思路。

其次, 在功能层面, 代谢物显著富集于糖酵解、嘌呤代谢及氮代谢等通路, 这与典型的“Warburg 效应”高度一致, 提示菌群代谢产物可能通过重塑宿主能量代谢环境, 加速肿瘤细胞的快速增殖。与此同时, IL-17、NOD 样受体和 NF-κB 等免疫相关信号通路

的显著富集,进一步揭示了菌群失衡在炎症放大与免疫微环境重塑中的作用。值得注意的是,这些通路于T细胞活化和功能状态密切相关^[24-26],提示菌群可能通过调控T细胞的分化、细胞因子分泌及免疫检查点信号,驱动肿瘤微环境中免疫应答的失衡。

最后,在肿瘤微环境层面,单细胞转录组分析直观地展现了上述菌群与功能改变所导致的细胞学后果。本研究不仅观察到CCA组织中肿瘤细胞

的扩增,更发现T细胞整体比例显著升高,尤其是增殖相关的MKI67⁺T细胞明显富集。MKI67⁺T细胞通常代表处于高度增殖状态的效应性或耗竭性T细胞群体^[27-28],反映了肿瘤微环境中持续的抗原刺激与免疫应答。已有研究^[29-31]指出,MKI67⁺T细胞在多种实体瘤中均与免疫微环境的高应激状态相关,这一群体往往同时表现出免疫应答持续激活与功能衰竭共存的特征,反映出肿瘤微环境中复杂的免疫动力学。

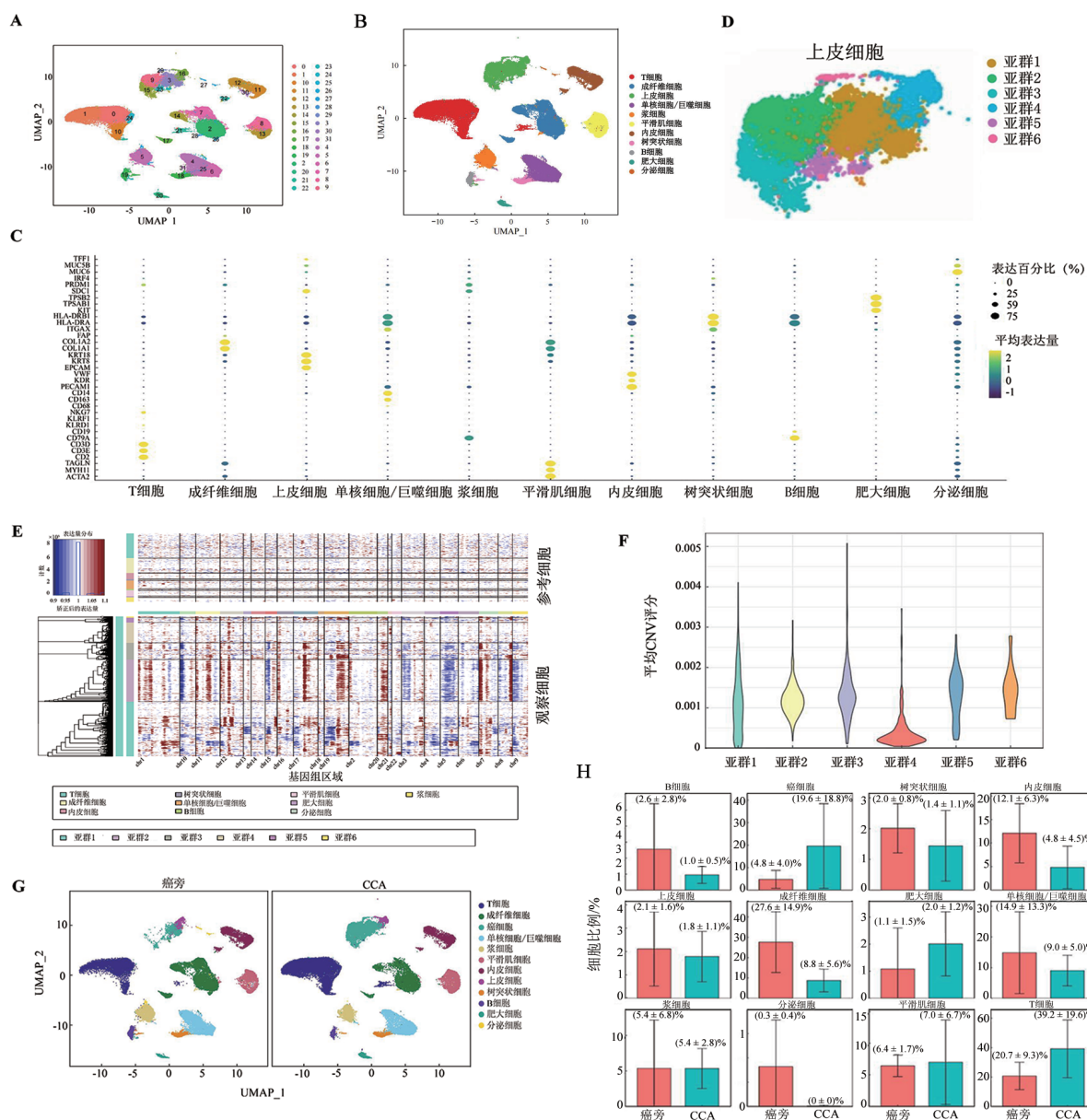


图4 单细胞转录组分析揭示CCA组织中细胞类型异质性与差异分布

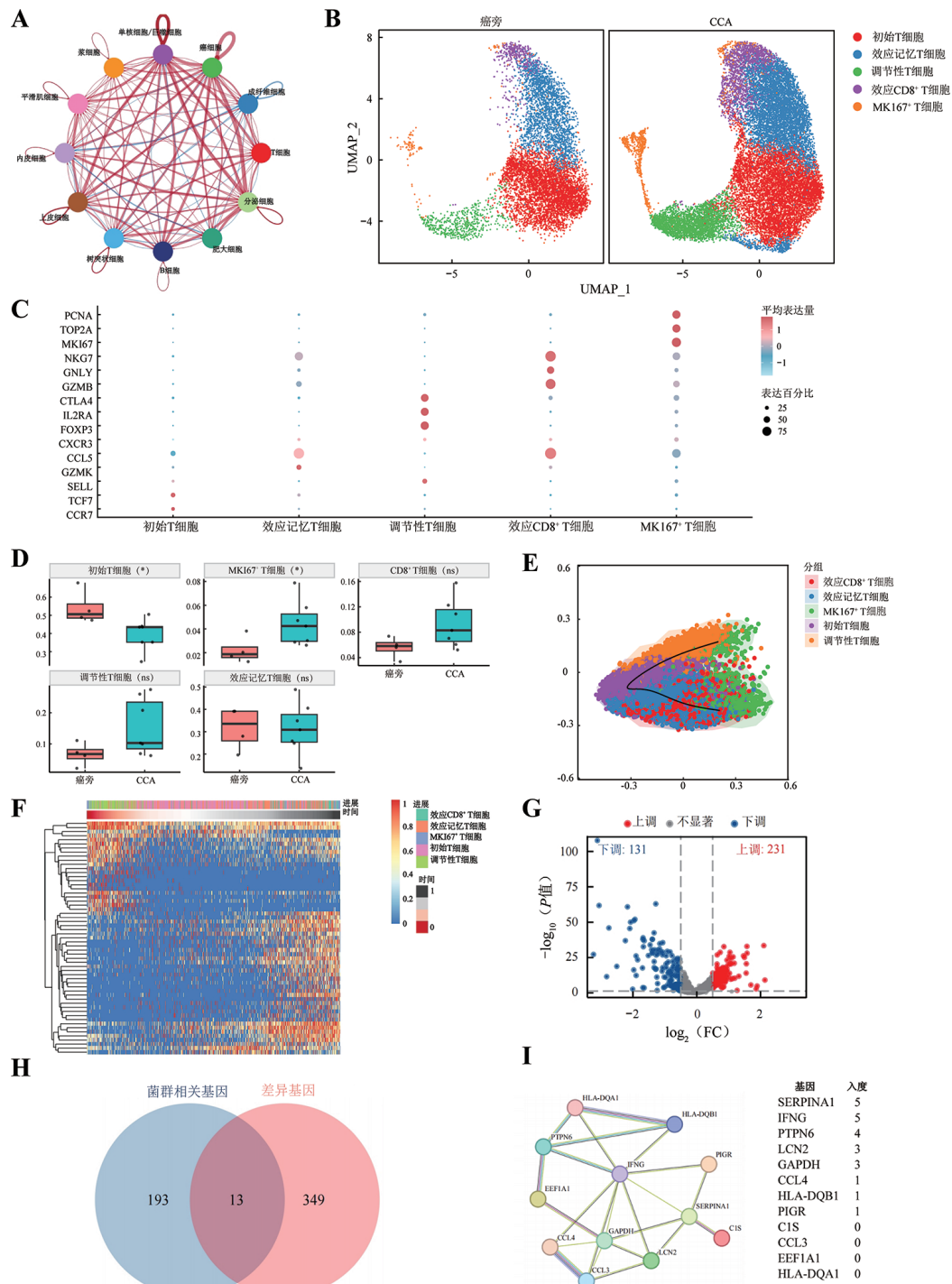


图5 单细胞转录组分析揭示 CCA 组织中 T 细胞的转录特征与微生物相关基因的潜在作用

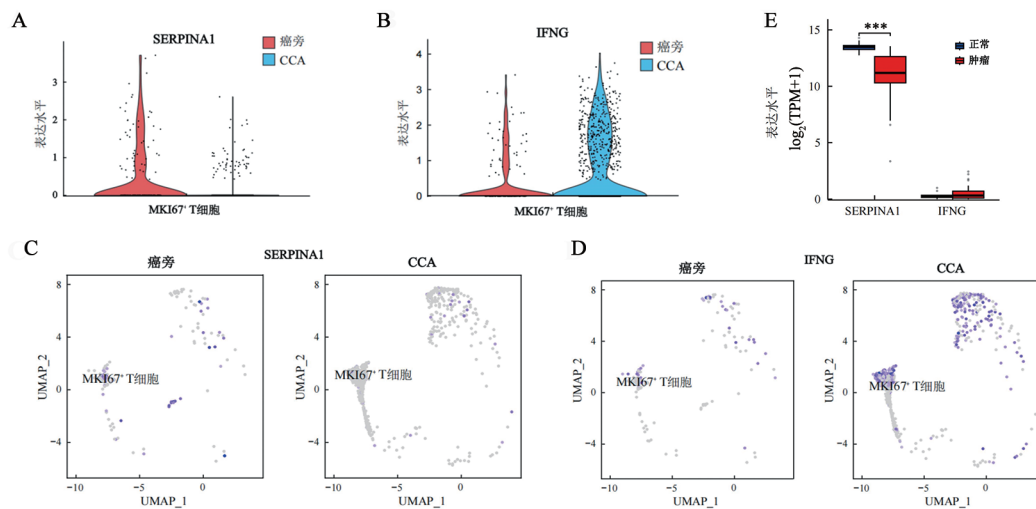
尤为重要，通过整合分析，本研究发现在 MK167⁺ T 细胞中差异表达基因与前述菌群相关基因存在交集，并从中筛选出核心节点基因 SERPINA1 和 IFNG。SERPINA1 在 CCA 肿瘤组织及 MK167⁺ T 细胞中均显著下调，提示其可能作为一个具有免疫调

节功能的潜在抑癌因子，其缺失可能削弱免疫监视。已有研究^[32-33]表明，SERPINA1 与 T 细胞的活化及炎症因子分泌密切相关，其下调可能削弱 T 细胞的免疫监视功能。IFNG 则在 MK167⁺ T 细胞中特异性上调，但在组织整体水平无显著差异，凸显了其作用的高

度细胞亚群特异性。IFNG是一把“双刃剑”：一方面，IFNG是T细胞分泌的重要效应因子，在肿瘤中通过激活巨噬细胞、增强抗原提呈和促进细胞毒性反应发挥抗肿瘤作用^[34-36]；另一方面，在持续的肿瘤刺激下，IFNG也可能诱导免疫检查点分子上调，形成负反馈抑制，从而导致免疫逃逸^[37]。

然而本研究也存在一定局限性。多组学分析主要揭示的是关联性证据，所提出的“菌群-代谢/免疫-肿瘤”调控轴仍需通过功能实验进行因果关系的验证。未来结合动物模型与临床样本的纵向研

究，将有助于进一步明确菌群与免疫互作在CCA中的机制性作用。综上所述，本研究从“微生物组-代谢/免疫组-细胞组”多维视角，系统阐释了肠道菌群失衡，尤其是肠杆菌科的异常增殖，可能通过驱动宿主代谢重编程、激活特定免疫炎症通路，最终在肿瘤微环境中促成肿瘤细胞增殖与T细胞功能状态改变的协同作用网络。本研究不仅深化了对CCA发病机制的理解，更为未来针对菌群及其下游代谢-免疫关键节点（如SERPINA1、IFNG）进行早期干预或联合治疗提供了新的潜在靶点和科学依据。



A、B: 基于单细胞转录组数据, 展示SERPINA1和IFNG在MKI67⁺T细胞中差异小提琴图; C、D: 基于单细胞转录组数据, 展示SERPINA1和IFNG的UMAP分布图; E: 基于TCGA-CHOL数据集中SERPINA1和IFNG的表达箱线图, *** $P < 0.001$ 。

图6 SERPINA1与IFNG在CCA组织及T细胞中的差异表达分析

[参考文献]

- [1] KHAN A S, DAGEFORDE L A. Cholangiocarcinoma[J]. Surg Clin North Am, 2019, 99(2): 315-335. DOI:10.1016/j.suc.2018.12.004.
- [2] FU S F, ZHANG Q Y, ZHANG C H. Research update for ferroptosis and cholangiocarcinoma[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2024, 198: 104356. DOI:10.1016/j.critrevonc.2024.104356.
- [3] SI H F, YANG Q, HU H, et al. Colorectal cancer occurrence and treatment based on changes in intestinal flora[J]. Semin Cancer Biol, 2021, 70: 3-10. DOI:10.1016/j.semcancer.2020.05.004.
- [4] LIU S Y, YANG X L. Intestinal flora plays a role in the progression of hepatitis-cirrhosis-liver cancer[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2023, 13: 1140126. DOI:10.3389/fcimb.2023.1140126.
- [5] KARAM F, EL DEGHEL Y, IRATNI R, et al. The gut microbiome and colorectal cancer: an integrative review of the underlying mechanisms[J]. Cell Biochem Biophys, 2025, 83(3): 2637-2650. DOI:10.1007/s12013-025-01683-9.
- [6] CHEN Y W, ZHOU J H, WANG L. Role and mechanism of gut microbiota in human disease[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2021, 11: 625913. DOI:10.3389/fcimb.2021.625913.
- [7] ZHANG Y, GAO X Y, GAO S C, et al. Effect of gut flora mediated-bile acid metabolism on intestinal immune microenvironment[J]. Immunology, 2023, 170(3): 301-318. DOI:10.1111/imm.13672.
- [8] CAI J W, RIMAL B, JIANG C T, et al. Bile acid metabolism and signaling, the microbiota, and metabolic disease[J]. Pharmacol Ther, 2022, 237: 108238. DOI:10.1016/j.pharmthera.2022.108238.
- [9] CAI J, SUN L L, GONZALEZ F J. Gut microbiota-derived bile acids in intestinal immunity, inflammation, and tumorigenesis[J]. Cell Host Microbe, 2022, 30(3): 289-300. DOI:10.1016/j.chom.2022.02.004.
- [10] TAKIISHI T, FENERO C I M, CÂMARA N O S. Intestinal barrier and gut microbiota: Shaping our immune responses throughout life [J]. Tissue Barriers, 2017, 5(4): e1373208. DOI:10.1080/21688370.2017.1373208.
- [11] SHI L S, JIN L H, HUANG W D. Bile acids, intestinal barrier dysfunction, and related diseases[J]. Cells, 2023, 12(14): 1888. DOI:10.3390/cells12141888.
- [12] ZHANG Q F, MA C, DUAN Y, et al. Gut microbiome directs hepatocytes to recruit MDSCs and promote cholangiocarcinoma[J]. Cancer Discov, 2021, 11(5): 1248-1267. DOI:10.1158/2159-8290.CD-20-0304.
- [13] PALLOZZI M, DE GAETANO V, DI TOMMASO N, et al. Role of gut microbial metabolites in the pathogenesis of primary liver cancers[J]. Nutrients, 2024, 16(14): 2372. DOI:10.3390/nu16142372.

- [14] WU N, BAYATPOUR S, HYLEMON P B, et al. Gut microbiome and bile acid interactions: mechanistic implications for cholangiocarcinoma development, immune resistance, and therapy[J]. *Am J Pathol*, 2025, 195(3): 397-408. DOI:10.1016/j.ajpath.2024.11.004.
- [15] VAN DER HEE B, WELLS J M. Microbial regulation of host physiology by short-chain fatty acids[J]. *Trends Microbiol*, 2021, 29(8): 700-712. DOI:10.1016/j.tim.2021.02.001.
- [16] LIN H, SHI Z H, WANG B Y, et al. Effects of dietary soybean phosphatidylethanolamine on intestinal metabolism and microbiota in mice fed low-fat and high-fat diets[J]. *Food Res Int*, 2025, 218: 116909. DOI:10.1016/j.foodres.2025.116909.
- [17] CONG J J, LIU P P, HAN Z L, et al. Bile acids modified by the intestinal microbiota promote colorectal cancer growth by suppressing CD8⁺ T cell effector functions[J]. *Immunity*, 2024, 57(4): 876-889.e11. DOI:10.1016/j.immuni.2024.02.014.
- [18] SUI H, ZHANG L, GU K J, et al. YYFZBJS ameliorates colorectal cancer progression in Apc^{Min/+} mice by remodeling gut microbiota and inhibiting regulatory T-cell generation[J]. *Cell Commun Signal*, 2020, 18(1): 113. DOI:10.1186/s12964-020-00596-9.
- [19] ZHU X H, LI K, LIU G C, et al. Microbial metabolite butyrate promotes anti-PD-1 antitumor efficacy by modulating T cell receptor signaling of cytotoxic CD8 T cell[J]. *Gut Microbes*, 2023, 15(2): 2249143. DOI:10.1080/19490976.2023.2249143.
- [20] HUANG J H, WANG J, CHAI X Q, et al. The intratumoral bacterial metatranscriptomic signature of hepatocellular carcinoma[J]. *Microbiol Spectr*, 2022, 10(5): e00983-e00922. DOI:10.1128/spectrum.00983-22.
- [21] DU X, JIE Z L, ZOU Q. Microbiota alert: Proteobacteria consume arginine to dampen omental antitumor immunity[J]. *Cell Host Microbe*, 2024, 32(7): 1045-1047. DOI:10.1016/j.chom.2024.05.020.
- [22] WEI J J, CHEN A D, HUANG D Q, et al. Gut microbiome-derived lipopolysaccharides aggravate cognitive impairment via TLR4-mediated inflammatory signaling in neonatal rats following hypoxic-ischemic brain damage[J]. *Brain Behav Immun*, 2025, 127: 4-24. DOI:10.1016/j.bbi.2025.02.029.
- [23] SUCRE J M, BOCK F, NEGRETTI N M, et al. Alveolar repair following LPS-induced injury requires cell-ECM interactions[J]. *JCI Insight*, 2023, 8(14): e167211. DOI:10.1172/jci.insight.167211.
- [24] WICHERSKA-PAWŁOWSKA K, WRÓBEL T, RYBKA J. Toll-like receptors (TLRs), NOD-like receptors (NLRs), and RIG-I-like receptors (RLRs) in innate immunity. TLRs, NLRs, and RLRs ligands as immunotherapeutic agents for hematopoietic diseases[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(24): 13397. DOI:10.3390/ijms222413397.
- [25] CHENG C, HU J Y, LI Y N, et al. Qing-Chang-Hua-Shi granule ameliorates DSS-induced colitis by activating NLRP6 signaling and regulating Th17/Treg balance[J]. *Phytomedicine*, 2022, 107: 154452. DOI:10.1016/j.phymed.2022.154452.
- [26] HÖVELMEYER N, SCHMIDT-SUPPRIAN M, OHNMACHT C. NF-κB in control of regulatory T cell development, identity, and function[J]. *J Mol Med*, 2022, 100(7): 985-995. DOI: 10.1007/s00109-022-02215-1.
- [27] LI X Q, LI S P, WU B, et al. Landscape of immune cells heterogeneity in liver transplantation by single-cell RNA sequencing analysis[J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 890019. DOI: 10.3389/fimmu.2022.890019.
- [28] CHENG D N, QIU K, RAO Y F, et al. Proliferative exhausted CD8⁺ T cells exacerbate long-lasting anti-tumor effects in human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma[J]. *eLife*, 2023, 12: e82705. DOI:10.7554/eLife.82705.
- [29] BORCHERDING N, VISHWAKARMA A, VOIGT A P, et al. Mapping the immune environment in clear cell renal carcinoma by single-cell genomics[J]. *Commun Biol*, 2021, 4(1): 122. DOI: 10.1038/s42003-020-01625-6.
- [30] DU Y X, CAI Y, LV Y, et al. Single-cell RNA sequencing unveils the communications between malignant T and myeloid cells contributing to tumor growth and immunosuppression in cutaneous T-cell lymphoma[J]. *Cancer Lett*, 2022, 551: 215972. DOI:10.1016/j.canlet.2022.215972.
- [31] KIM H D, JUNG S, LIM H Y, et al. Regorafenib plus nivolumab in unresectable hepatocellular carcinoma: the phase 2 RENOBATE trial[J]. *Nat Med*, 2024, 30(3): 699-707. DOI:10.1038/s41591-024-02824-y.
- [32] KUAI X W, LV J Y, ZHANG J Y, et al. Serpin family a member 1 is prognostic and involved in immunological regulation in human cancers[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(14): 11566. DOI: 10.3390/ijms241411566.
- [33] LI F Z, ZHOU J, LI Z D, et al. Screening of immunosuppressive cells from colorectal adenocarcinoma and identification of prognostic markers[J]. *Biosci Rep*, 2021, 41(4): BSR20203496. DOI:10.1042/BSR20203496.
- [34] SASSON S C, SLEVIN S M, CHEUNG V T F, et al. Interferon-gamma-producing CD8⁺ tissue resident memory T cells are a targetable hallmark of immune checkpoint inhibitor-colitis[J]. *Gastroenterology*, 2021, 161(4): 1229-1244.e9. DOI:10.1053/j.gastro.2021.06.025.
- [35] REMSIK J, TONG X R, KUNES R Z, et al. Interferon-γ orchestrates leptomeningeal anti-tumour response[J]. *Nature*, 2025, 643(8073): 1087-1096. DOI:10.1038/s41586-025-09012-z.
- [36] ICHIYAMA K, LONG J, KOBAYASHI Y, et al. Transcription factor Irf1 associates with Foxp3 to repress gene expression in Treg cells and limit autoimmunity and anti-tumor immunity[J]. *Immunity*, 2024, 57(9): 2043-2060.e10. DOI:10.1016/j.immuni.2024.07.010.
- [37] BENCI J L, JOHNSON L R, CHOA R, et al. Opposing functions of interferon coordinate adaptive and innate immune responses to cancer immune checkpoint blockade[J]. *Cell*, 2019, 178(4): 933-948.e14. DOI:10.1016/j.cell.2019.07.019.

[收稿日期] 2025-09-06

[修回日期] 2026-01-15

[本文编辑] 陈怡宁