

# 双歧杆菌制剂对大鼠肿瘤模型化疗引起 肠道炎症的影响

潘捷<sup>1</sup>,段达荣<sup>2</sup>

(台州市第一人民医院医学门诊部<sup>1</sup>,检验科<sup>2</sup>,浙江 台州 318020)

**摘要:**目的 探讨双歧杆菌对减少氟尿嘧啶化疗过程中血流感染的价值。方法 选择健康SD大鼠24只,建立肿瘤模型后随机分为A、B、C、D4组,每组6只,A组作为对照,B组给予氟尿嘧啶,C组给予氟尿嘧啶+低剂量双歧杆菌,D组给予氟尿嘧啶+高剂量双歧杆菌,观察各组大鼠的体重、活动、饮食情况及粪便隐血情况,7d后解剖观察肠道充血、水肿、溃疡情况,检测MPO、NF- $\kappa$ B活性。结果 B、C、D组大鼠体重均小于A组,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),但D组大鼠体重高于B组,差异有统计学意义( $P<0.05$ );B组粪便细菌染色的球杆比高于A组,D组粪便细菌染色的球杆比高于C组,差异有统计学意义( $P<0.05$ );A组粪便隐血、肠组织MPO和NF- $\kappa$ B低于B、C、D组,B组隐血、MPO和NF- $\kappa$ B低于C、D组,差异有统计学意义( $P<0.05$ );HE染色显示,A组无明显炎症细胞浸润,基本正常结肠组织结构;B组肠组织的黏膜、黏膜下炎症细胞重度浸润;C组黏膜下层炎症明显细胞浸润,腺体减少;D组黏膜下轻度炎症细胞浸润。结论 在肿瘤化疗过程中加入大剂量的双歧杆菌制剂可以减少肠道炎症和血流感染的风险,最终可提高治疗成功率。

**关键词:**双歧杆菌;氟尿嘧啶;肿瘤模型;炎症指标

中图分类号:R574.62

文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.1006-1959.2022.06.021

文章编号:1006-1959(2022)06-0086-04

## Effect of Bifidobacterium Preparation on Intestinal Inflammation Induced by Chemotherapy in Rat Tumor Model

PAN Jie<sup>1</sup>,DUAN Da-rong<sup>2</sup>

(The Outpatient Department<sup>1</sup>,Department of Clinical Laboratory<sup>2</sup>,the First People's Hospital of Taizhou City,  
Taizhou 318020,Zhejiang,China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the value of Bifidobacterium in reducing blood flow infection during fluorouracil chemotherapy. **Methods** Twenty-four healthy SD rats were randomly divided into groups A, B, C and D after the establishment of the tumor model, with six rats in each group. Group A was used as the control, group B was given fluorouracil, group C was given fluorouracil+low-dose Bifidobacterium, group D was given fluorouracil+high-dose Bifidobacterium. The weight, activity, diet and fecal occult blood of rats in each group were observed. After 7 days, intestinal congestion, edema and ulcer were observed, and MPO and NF- $\kappa$ B activities were detected. **Results** The body weight of rats in group B, C and D was lower than that in group A, the difference was statistically significant ( $P<0.05$ ), but the body weight of rats in group D was higher than that in group B, the difference was statistically significant ( $P<0.05$ ). The ratio of fecal bacteria staining in group B was higher than that in group A, and the ratio of fecal bacteria staining in group D was higher than that in group C ( $P<0.05$ ). The fecal occult blood, intestinal MPO and NF- $\kappa$ B in group A were lower than those in groups B, C and D, while the fecal occult blood, intestinal MPO and NF- $\kappa$ B in group B were lower than those in groups C and D, and the differences were statistically significant ( $P<0.05$ ). HE staining showed that there was no obvious inflammatory cell infiltration and normal colon tissue structure in group A; severe infiltration of mucosal and submucosal inflammatory cells in intestinal tissue of group B; submucosa inflammation in group C was significantly cell infiltration, glands decreased; submucosal mild inflammatory cell infiltration in group D. **Conclusion** The addition of large doses of Bifidobacteria preparation during tumor chemotherapy can reduce the risk of intestinal inflammation and blood flow infection, and ultimately improve the success rate of treatment.

**Key words:** Bifidobacterium; Fluorouracil; Tumor model; Inflammatory indicators

化学药物治疗法(chemotherapy)是肿瘤常用的治疗方法之一,随着该方法的广泛使用和疗效的提高,使得肿瘤患者的寿命大大延长;而化疗药物可诱发肠道黏膜的微炎症,造成肠道屏障功能破坏、肠道通透性增加等改变,临床上表现为恶心、呕吐、腹痛、腹泻等不良反应,进而肠道细菌穿过肠道屏障进入血流,引起严重的血流感染,从而影响到治疗的进程,甚至危及患者生命<sup>[1-3]</sup>。有研究显示<sup>[4,5]</sup>,化疗期间补充双歧杆菌可能减轻肠道黏膜微炎症,双歧杆菌所产生的短链脂肪酸(short chain fatty acids, SCFAs)

类物质可明显减轻患者体内的结肠炎及化疗诱导的肠道黏膜微炎症反应,降低化疗患者血流感染的发生率。本研究在对SD大鼠肿瘤应用氟尿嘧啶治疗过程中加入不同剂量的双歧杆菌,观察大鼠肠道炎症指标的变化,以明确双歧杆菌对减少氟尿嘧啶化疗过程中发生血流感染的价值。

### 1 材料与方法

1.1 实验动物 选择健康SD大鼠24只,重量160~180g,由温州医科大学动物实验中心提供,许可证号:SYLK(浙)2015-0008。实验方案经实验动物伦理委员会批准,实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。实验动物在麻醉下进行所有的手术,并尽一

基金项目:台州市科技计划项目(编号:1901ky62)

作者简介:潘捷(1966.1-),女,浙江台州人,本科,主任护师,主要从事临床护理及肿瘤化疗后感染的相关机制研究

切努力最大限度地减少其痛苦和死亡。

1.2 试剂与仪器 双歧杆菌制剂采用酪酸梭菌双歧杆菌二联活菌(商品名:常乐康,山东科兴生物制品有限公司,批号:S20190015,规格:500 mg/袋);氟尿嘧啶主要作用成份为 5-氟尿嘧啶(海南中化联合制药工业股份有限公司,批号:1904221,规格:0.5 g/支);粪便隐血(OB)试剂盒(匹拉米酮半定量检测法,中国珠海贝索生物技术有限公司,批号:B190402);革兰染色液(中国珠海贝索生物技术有限公司,批号:A190301)、肠组织髓过氧化物酶(MPO)(美国 R&D 公司,批号:19082101),促炎因子 NF- $\kappa$ B(美国 Santa Cruz 公司,批号:191106),H22 肿瘤细胞(购自中科院细胞研究所);酶标仪(瑞士帝肯公司,型号:TECAN HB-150E);显微镜(日本 OLYMPUS 型号: CX31)。

1.3 动物肿瘤模型的建立及相关指标的检测 取 H22 肿瘤细胞,3000 r/min 离心 5 min,再用生理盐水洗 3 次,并做适当稀释。取 40  $\mu$ l 细胞悬液加入 10  $\mu$ l 0.4% 溴酚蓝染色并镜检计数,并制成  $3 \times 10^6$  个/ml 肿瘤细胞悬液,分别给予 SD 大鼠右腋皮下接种肿瘤细胞悬液 0.2 ml。接种完成后,逐日进行观察,如果出现肿瘤迅速增长,符合大鼠肿瘤模型。将符合大鼠肿瘤模型的大鼠分为 A、B、C、D 4 组,每组 6 只。A 组作为对照,B 组给予氟尿嘧啶,C 组给予氟尿嘧啶+低剂量双歧杆菌,D 组给予氟尿嘧啶+高剂量双歧杆菌。氟尿嘧啶按 10 mg/(kg·d)喂量,低剂量双歧杆菌按 10 mg/(kg·d)喂量,高剂量双歧杆菌按 50 mg/(kg·d)喂量,对照组不使用氟尿嘧啶或双歧杆菌喂养。每日观察大鼠的体重、活动、饮食情况

及粪便隐血情况,并对粪便进行革兰染色评估,判断革兰阳性菌及革兰阴性菌。连续 7 d 后对大鼠进行注射麻醉解剖,观察肠道充血、水肿、溃疡情况,检测 MPO、NF- $\kappa$ B 活性。

1.4 检测指标及赋值 MPO、NF- $\kappa$ B 的检测方法参照试剂使用说明书进行,对肠组织进行冷冻切片,进行 HE 染色,HE 染色过程参照相关操作规程进行,粪便革兰染色过程参照相关操作规程进行,球菌与杆菌比值按比值计算。粪便隐血采用匹拉米酮半定量检测法,判读阴性、1+、2+、3+、4+,并分别赋值 0、1、2、3、4。

1.5 统计学方法 采用 SPSS 17.0 统计学软件进行数据分析。计量资料用( $\bar{x} \pm s$ )表示,两组间独立样本采用  $t$  检验,计数资料采用[n(%)]表示,行  $\chi^2$  检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 各组大鼠相关检测指标情况 B、C、D 组大鼠体重均小于 A 组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),但 D 组大鼠体重高于 B 组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );B 组粪便细菌染色的球杆比高于 A 组,D 组粪便细菌染色的球杆比高于 C 组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );A 组粪便隐血、肠组织 MPO 和 NF- $\kappa$ B 低于 B、C、D 组,B 组隐血、MPO 和 NF- $\kappa$ B 低于 C、D 组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表 1。

2.2 各组大鼠肠组织 HE 染色情况 对大鼠肠组织进行 HE 染色发现,A 组无明显炎性细胞浸润,基本正常结肠组织结构;B 组肠组织的黏膜、黏膜下炎症细胞重度浸润;C 组黏膜下层炎症明显细胞浸润,腺体减少;D 组黏膜下轻度炎症细胞浸润,见图 1。

表 1 各组大鼠相关检测指标情况( $\bar{x} \pm s$ )

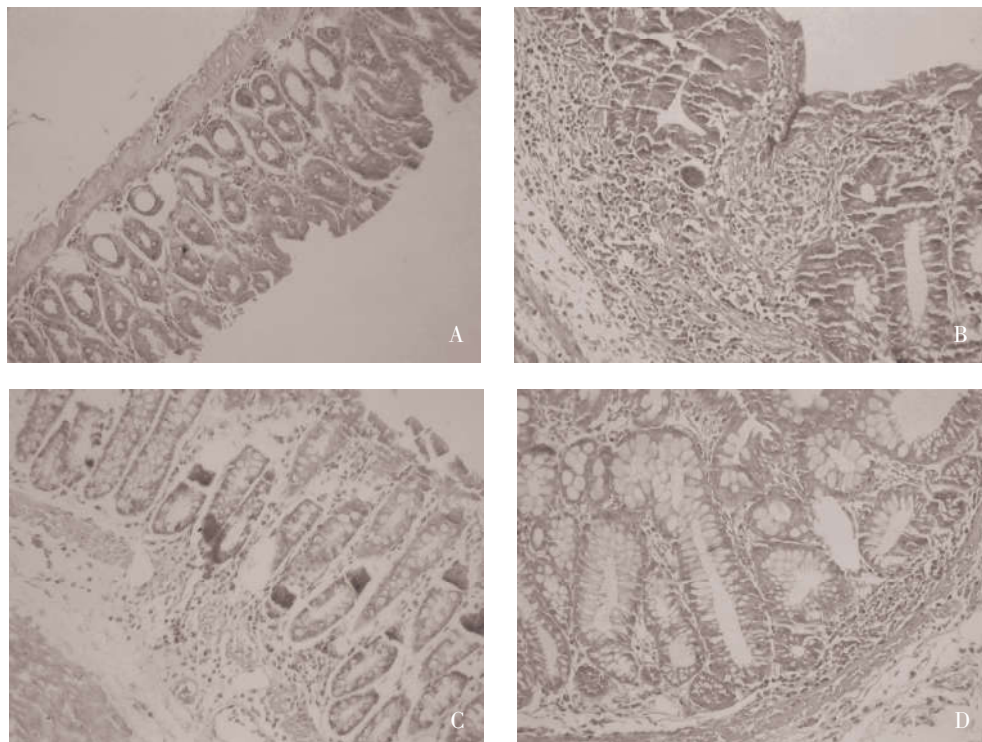
组别	体重(g)	球杆比	隐血	MPO	NF- $\kappa$ B
A 组	178.61 $\pm$ 5.03	0.41 $\pm$ 0.14	0.24 $\pm$ 0.13	19.62 $\pm$ 2.08	1.49 $\pm$ 0.90
B 组	160.14 $\pm$ 6.78 <sup>a</sup>	2.27 $\pm$ 0.33 <sup>a</sup>	3.47 $\pm$ 0.52 <sup>a</sup>	76.34 $\pm$ 8.21 <sup>a</sup>	8.94 $\pm$ 1.52 <sup>a</sup>
C 组	166.47 $\pm$ 3.86 <sup>a</sup>	2.21 $\pm$ 0.49 <sup>a</sup>	1.26 $\pm$ 1.48 <sup>ab</sup>	76.18 $\pm$ 8.13 <sup>a</sup>	8.31 $\pm$ 0.54 <sup>a</sup>
D 组	169.52 $\pm$ 3.83 <sup>ab</sup>	0.91 $\pm$ 0.13 <sup>abc</sup>	1.12 $\pm$ 1.04 <sup>ab</sup>	53.51 $\pm$ 5.25 <sup>abc</sup>	5.24 $\pm$ 0.69 <sup>abc</sup>

注:与 A 组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与 B 组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与 C 组比较,<sup>c</sup> $P < 0.05$

## 3 讨论

人体肠道上皮细胞内含有特殊的耐受性树突状细胞、巨噬细胞和调节性 T 细胞,这些免疫细胞可以产生许多抗炎细胞因子,从而下调炎症反应,维持肠道内环境的稳定<sup>[6,7]</sup>。肠道内正常菌群或其代谢产物可通过与肠上皮细胞表面的 Toll 样受体(toll-like receptors,TLR)结合,启动下游炎症反应因子(如 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 等),维持肠道内环境的稳定<sup>[8,9]</sup>。

一些药物(特别是化疗药物)的使用可改变这种稳定状态,化疗期间肠道黏膜微炎症的发生与肠道菌群及其代谢产物的变化密切相关,肠道菌群可发生改变<sup>[10]</sup>,而这些改变的菌群会合成多种代谢产物,这些产物在肿瘤的发生和发展过程中发挥了作用,不利于肿瘤的治疗。Konishi H 等<sup>[11]</sup>研究指出,肠道共生菌,特别是双歧杆菌、梭状杆菌等革兰阴性益生菌能够改变肿瘤微环境,明显减轻患者体内的结肠炎及



注:A组:无明显炎症细胞浸润,基本正常结肠组织结构;B组:黏膜、黏膜下炎症细胞重度浸润;C组:黏膜下层炎症明显细胞浸润,腺体减少;D组:黏膜下轻度炎症细胞浸润

图1 各组大鼠肠组织 HE 染色( $\times 200$ )

化疗诱导的肠道黏膜微炎症反应<sup>[12]</sup>。如果在化疗过程中加入大量双歧杆菌等益生菌,可以提高机体对于寡核苷酸介导的肿瘤治疗和铂类化疗的疗效,有效降低化疗血流感染风险,提高治疗成功率<sup>[13]</sup>。

氟尿嘧啶是目前临床上应用最广的抗嘧啶类药物,对消化道癌及其他实体瘤有良好疗效,在肿瘤治疗中占有重要地位,是一种常见的肿瘤化疗药物。氟尿嘧啶主要通过酶将其转化为5-氟脱氧尿嘧啶核苷酸,5-氟脱氧尿嘧啶核苷酸通过抑制胸腺嘧啶核苷酸合成酶而抑制DNA的合成<sup>[14]</sup>。此外,氟尿嘧啶的代谢物也可以以代谢物的形式掺入到RNA和DNA中,影响细胞功能,产生细胞毒性,但其对肿瘤细胞作用的同时也会对正常细胞产生影响<sup>[15]</sup>。

MPO是中性粒细胞的重要组成部分,是炎症和组织损伤的重要指标。研究发现<sup>[16,17]</sup>,实验性动物和炎症性肠炎的MPO活性增加,提示肠道炎症发生。本研究结果显示,采用氟尿嘧啶治疗大鼠肠道肿瘤过程中MPO活性明显增强,说明双歧杆菌能有效缓解肿瘤化疗过程中对肠道上皮细胞的炎性损伤;同时,增加双歧杆菌制剂的剂量后MPO活性降低,说明双歧杆菌有助于减少肠道炎症的发生。部分研究发现<sup>[18,19]</sup>,对有肠道肿瘤的实验大鼠进行氟尿嘧啶单药化疗的过程当中,其肠道菌群的总数在化疗期

间明显减低,特别是双歧杆菌、梭状杆菌集落IV及梭状杆菌集落XIVa等有益菌株的数量下降明显。这种肠道微生态的改变更有利于致病菌的生长,增加化疗诱导腹泻等毒副作用的发生率,增加血流感染的风险。本研究显示,化疗会导致大鼠肠道菌群中球菌与杆菌比例倒置,影响菌群平衡,不利于肿瘤的治疗,而加入双歧杆菌会改善这一状况,与报道结果基本一致<sup>[20,21]</sup>。促炎因子NF- $\kappa$ B可以激活细胞因子、趋化因子等炎症介质的表达<sup>[22]</sup>,参与结肠炎及其它肠道炎症的表达。NF- $\kappa$ B的活性可反映炎症的严重程度。研究发现<sup>[23,24]</sup>,使用化疗药对动物模型进行干预会导致NF- $\kappa$ B的活性加强,引起肠道炎性感染,最终导致治疗失败。本研究显示,化疗药物治疗后大鼠肠道NF- $\kappa$ B的活性大幅增加,但在加入大剂量的双歧杆菌后NF- $\kappa$ B的活性降低;而从HE染色的炎症细胞浸润程度也可以得出同样的结果,进一步证实了双歧杆菌的作用。

综上所述,化疗可以导致肠道内环境改变,诱导肠道炎性发生,导致治疗的失败。而在肿瘤化疗过程中加入大剂量的双歧杆菌制剂可以减少肠道炎症和血流感染的风险,提高治疗成功率。

#### 参考文献:

[1]Peng Y,Li Q,Zhang J,et al.Update review of skin adverse

events during treatment of lung cancer and colorectal carcinoma with epidermal growth receptor factor inhibitors [J]. *Biosci Trends*, 2019, 12(6):537–552.

[2] Kudo K, Hotta K, Bessho A, et al. Development of a skin rash within the first week and the therapeutic effect in afatinib monotherapy for EGFR-mutant non-small cell lung cancer (NSCLC): Okayama Lung Cancer Study Group experience [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2016, 77(5):1005–1009.

[3] Daver N, Schlenk RF, Russell NH, et al. Targeting FLT3 mutations in AML: review of current knowledge and evidence [J]. *Leukemia*, 2019, 33(2):299–312.

[4] Sun J, Kato I. Gut microbiota, inflammation and colorectal cancer [J]. *Genes Dis*, 2016, 3(2):130–143.

[5] 顾慧媛, 高欣, 钱丽娟, 等. 益生菌联合早期肠内营养治疗对重症急性胰腺炎患者血清炎症因子、肠黏膜屏障功能的影响 [J]. *海南医学*, 2017, 36(23):3793–3795.

[6] Veganzones J, Montero A, Maseda E. New evidence on the use of fosfomycin for bacteremia and infectious endocarditis [J]. *Rev Esp Quimioter*, 2019, 32(S1):25–29.

[7] Grabein B, Graninger W, Rodriguez Bano J, et al. Intravenous fosfomycin—back to the future. Systematic review and meta-analysis of the clinical literature [J]. *Clin Microbiol Infect*, 2017, 23(6):363–372.

[8] 张威, 姜可伟. 肠道菌群在结直肠癌发生发展及治疗中的作用 [J]. *中华胃肠外科杂志*, 2020, 23(5):516–520.

[9] Wong SH, Zhao L, Zhang X, et al. Gavage of fecal samples from patients with colorectal cancer promotes intestinal carcinogenesis in germ-free and conventional mice [J]. *Gastroenterology*, 2017, 153(6):1621–1633.

[10] Brennan CA, Garrett WS. Gut Microbiota, inflammation, and colorectal cancer [J]. *Annu Rev Microbiol*, 2016(70):395–411.

[11] Konishi H, Fujiya M, Tanaka H, et al. Probiotic-derived ferriochrome inhibits colon cancer progression via JNK-mediated apoptosis [J]. *Nat Commun*, 2016(7):12365.

[12] 张静, 闻钰. 微生态制剂对小儿血液肿瘤化疗后肠道菌群失调的影响 [J]. *浙江临床医学*, 2018, 20(11):1818–1819.

[13] Zhang J, Gu Y, Chen B. Mechanisms of drug resistance in acute myeloid leukemia [J]. *Onco Targets Ther*, 2019 (12):1937–

1945.

[14] Dickson RP, Schultz MJ, van der Poll T, et al. Lung microbiota predict clinical outcomes in critically ill patients [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2020, 201(5):555–563.

[15] Wu D, Lu B, Xue HD, et al. Validation of Modified Determinant-Based Classification of severity for acute pancreatitis in a tertiary teaching hospital [J]. *Pancreatol*, 2019, 19(2):217–223.

[16] Vancamelbeke M, Vermeire S. The intestinal barrier: a fundamental role in health and disease [J]. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 2017, 11(9):821–834.

[17] Takam Kamga P, Bassi G, Cassaro A, et al. Notch signalling drives bone marrow stromal cell-mediated chemoresistance in acute myeloid leukemia [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(16):21713–21727.

[18] Dos RS, Da CL, Siqueira NP, et al. Review of the mechanisms of probiotic actions in the prevention of colorectal cancer [J]. *Nutr Res*, 2017(37):1–19.

[19] Tan SF, Dunton W, Liu X, et al. Acid ceramidase promotes drug resistance in acute myeloid leukemia through NF- $\kappa$ B dependent P-glycoprotein upregulation [J]. *Lipid Res*, 2019, 60(6):1078–1086.

[20] 梁运特, 黄仲海, 廖志远, 等. 安肠汤对 TNBS 致溃疡性结肠炎模型大鼠 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路及粪钙卫蛋白表达的影响 [J]. *中国药房*, 2021, 32(2):189–194.

[21] 姚望, 张鑫杰, 姚庆华. 胃肠道恶性肿瘤化疗患者早期肠内营养干预的临床研究 [J]. *中国肿瘤临床*, 2019, 46(15):780–784.

[22] Yang Y, Xia Y, Chen H, et al. The effect of perioperative probiotics treatment for colorectal cancer: short-term outcomes of a randomized controlled trial [J]. *Oncoarget*, 2016, 7(7):8432–8440.

[23] Gagniere J, Raisch J, Veziant J, et al. Gut microbiota imbalance and colorectal cancer [J]. *World J Gastroenterol*, 2016, 22(2):501–518.

[24] Lian Q, Xu L, Yan S, et al. Chemotherapy-induced intestinal inflammatory responses are mediated by exosome secretion of double-strand DNA via AIM2 inflammasome activation [J]. *Cell Res*, 2017, 27(6):784–800.

收稿日期: 2021-10-02; 修回日期: 2021-11-09

编辑/成森