

益生菌对头颈部肿瘤患者放化疗引起的口腔黏膜炎的作用分析

冯柳¹, 蒋春灵², 李道靖², 舒予先², 何志坚², 王侠²
(1. 南昌大学医学院, 江西 南昌 330006; 2. 江西省肿瘤医院, 江西 南昌 330029)

摘要: [目的] 探讨联合应用益生菌对头颈部肿瘤放化疗患者放射性口腔黏膜炎的治疗作用。 [方法] 51例头颈部肿瘤患者纳入研究, 随机分为放疗+化疗+安慰剂即对照组(RCP)和放疗+化疗+益生菌联合即实验组(RCPC)两组。对患者口腔黏膜炎的发生、肿瘤反应、免疫功能、肠道微生物群多样性等进行监测分析。 [结果] RCPC组患者口腔黏膜炎发生率显著降低(88.5% vs 100%, $P=0.037$), 而肿瘤反应与RCP组相当(100% vs 100%, $P=0.583$)。RCPC组淋巴细胞比例、CD4⁺T细胞、CD3⁺T细胞数量均增加(P 均 <0.05)。高通量测序结果表明, 益生菌的摄入显著增加了拟杆菌、志贺氏菌、对映体的种群数量, 同时降低了肠道菌群中普雷沃氏菌和链状杆菌的丰度。 [结论] 益生菌联合治疗可通过改变肠道菌群, 提高头颈部肿瘤患者的免疫反应, 降低口腔黏膜炎的发生率。

关键词: 益生菌; 头颈部肿瘤; 口腔黏膜炎; 放化疗
中图分类号: R739.91 文献标识码: A 文章编号: 1671-170X(2021)02-0136-06
doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2021.02.B009

Efficacy of Probiotics for Radiotherapy/Chemotherapy-induced Oral Mucositis in Patients with Head and Neck Cancer

FENG Liu¹, JIANG Chun-ling², LI Dao-jing², SHU Yu-xian², HE Zhi-jian², WANG Xia²
(1. Medical College of Nanchang University, Nanchang 330006, China;
2. Jiangxi Cancer Hospital, Nanchang 330029, China)

Abstract: [Objective] To investigate the efficacy of probiotic combination for chemotherapy/radiotherapy-induced oral mucositis in patients with head and neck cancer. [Methods] Fifty one patients with head and neck cancer were enrolled and randomly divided into two groups: radiotherapy+chemotherapy+placebo (RCP) and radiotherapy+chemotherapy+ probiotic combination(RCPC). The occurrence of oral mucositis, tumor response, immune function and intestinal microbial diversity were monitored and analyzed. [Results] The incidence of oral mucositis in the RCPC group was significantly lower than that in the RCP group (88.5% vs 100%, $P=0.037$), while the tumor response was similar to that in the RCP group (100% vs 100%, $P=0.583$). The proportion of lymphocytes, the number of CD4⁺ T cells and CD3⁺ T cells in RCPC group were increased (all $P < 0.05$). High throughput sequencing results showed that probiotics intake significantly increased the number of Bacteroides, Escherichia-Shigella and Parabacteroides, and decreased the abundance of Prevotella and Catenibacterium in intestinal flora. [Conclusion] Probiotics combination therapy can improve the immune response and reduce the incidence of oral mucositis by changing intestinal flora in patients with head and neck cancer receiving concurrent radio-chemotherapy.

Subject words: probiotics; head and neck cancer; oral mucositis; radio-chemotherapy

头颈部肿瘤在恶性肿瘤中相对预后较好。同步放化疗是头颈部肿瘤的重要治疗手段, 而同步放化

疗中放射治疗诱发的口腔黏膜炎(oral mucositis, OM)是一种因为电离辐射导致的发生在口腔、咽部和喉部黏膜上皮的损伤, 一般发生在常规放疗的第2周至第3周^[1], 同期放化疗引起的口腔黏膜炎发生率高达80%^[2]。口腔黏膜炎会导致一系列的临床表现: 黏膜水肿充血、溃疡形成, 甚至伴发感染、进食困难,

基金项目: 北京卫生健康公益基金会项目(YWJKJHJKYJJ-B17335)
通信作者: 蒋春灵, 副主任, 副主任医师, 博士; 江西省肿瘤医院乳腺肿瘤放疗科, 江西省南昌市北京东路519号(330029); E-mail: jclil2002@163.com
收稿日期: 2019-12-21; **修回日期:** 2020-10-30

严重的时候导致治疗中断影响疗效、增加住院费用^[3]。目前暂无有效的防治口腔黏膜炎的方法。寻找安全有效的方法减轻口腔黏膜炎对于提高患者生活质量及疗效尤为重要。口腔黏膜炎的发病机制很多,放射治疗引起的唾液腺损伤是其一,腺体损伤减少和免疫相关的免疫蛋白大涎腺糖蛋白(如免疫球蛋白A)和口腔表面黏膜的粘附从而未能起到保护作用^[4]。肠道菌群能通过调节机体的免疫功能,在协同抗肿瘤治疗和防治抗肿瘤治疗引起的毒副反应中起积极的作用。为探讨肠道菌群能否通过调节机体免疫力减少口腔黏膜炎的发生,本研究自2013年10月至2014年6月观察口服益生菌对头颈部放疗所致严重口腔黏膜炎的防治作用,现将结果报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

2013年10月至2014年6月,共入组60例头颈部肿瘤患者,其中鼻咽癌52例,口咽癌5例,口腔癌3例。试验组RCPC(放疗+化疗+益生菌)30例,对照组RCP(放疗+化疗+安慰剂)30例。剔除5例均为鼻咽癌(8.3%),脱落4例也均为鼻咽癌(6.7%),最终可评价病例51例。试验组26例,鼻咽癌21例,口咽癌3例,口腔癌2例;临床分期:Ⅱ期3例,Ⅲ期16例,Ⅳ期7例。对照组25例,鼻咽癌22例,口咽癌2例,口腔癌1例;肿瘤分期:Ⅱ期5例,Ⅲ期14例,Ⅳ期6例。两组患者性别、年龄、肿瘤分期、口腔平均剂量比较,差异均无统计学意义(Table 1)。

1.2 病例选择

1.2.1 纳入标准

经组织病理学确诊、无远处转移的初诊头颈部肿瘤患者;行根治性放疗+同期化疗;年龄18~70周岁,性别不限;KPS评分 ≥ 70 分;预计生存期至少6个月;自愿参加本试验并签署知情同意书。

1.2.2 排除标准

妊娠期、哺乳期妇女及试验期间不能有效避孕的育龄妇女;其他疾病所致的口腔黏膜炎患者;复发或者残留的头颈部肿瘤患者;

同步使用分子靶向治疗患者;患有免疫系统疾病;既往反复发作的口腔黏膜炎;合并严重心、肝、肾、造血系统和神经系统疾病;精神病患者;血糖控制不佳的糖尿病患者;不能服用药物或消化道不能吸收药物的患者;对益生菌过敏患者。

1.3 药物

益生菌(Bifico, Shanghai Pharmaceuticals Sine, SFDA批准文号:S10950032),含有长双歧杆菌,乳杆菌和粪肠球菌的三联活菌散,上海信谊药厂有限公司生产。

1.4 试验设计

采用单中心、随机、平行对照的临床试验设计方法纳入江西省肿瘤医院行同期放疗的初次治疗的头颈部肿瘤患者。通过医院伦理委员会同意。受试者按照1:1的比例被随机分配到试验组和对照组。随机编码的产生采用分层区组随机化,按中心进行分层,利用SAS软件模拟产生。研究者根据由计算机产生的随机号编制的药物编号,根据受试者入组

Table 1 The clinical features of 51 patients

Features	RCP group (%)	RCPC group (%)	P
Age (years)	51(29~67)	51(29~73)	0.715
Gender			0.549
Male	16(64.0)	16(61.5)	
Female	9(36.0)	10(38.5)	
Tumor stage			0.540
T ₁	1(4.0)	0(0)	
T ₂	1(4.0)	2(7.7)	
T ₃	6(24.0)	10(38.4)	
T ₄	17(68.0)	14(53.9)	
Node stage			0.476
N ₀	5(20.0)	3(11.5)	
N ₁	11(44.0)	13(50.0)	
N ₂	4(16.0)	9(34.6)	
N ₃	5(20.0)	1(3.9)	
TNM stage			0.341
I	1(4.0)	1(3.8)	
II	0(0)	1(3.8)	
III	4(16.0)	9(34.7)	
IV	20(80.0)	15(57.7)	
Antibiotic			0.073
Yes	15(60.0)	6(23.1)	
No	10(40.0)	20(76.9)	
Oral cavity mean average dose (Gy)	38.1	40.4	0.664
Concomitant chemotherapy	25(100)	26(100)	0.831
Tumor complete remission	25(100)	26(100)	0.583
Unplanned delays	20(80.0)	0(0)	0.001

时间的先后顺序,在各中心从最小药物编号开始依次发放试验用药。从最小编号开始入组。试验组口服益生菌,一日2次(早、晚餐后),3片/次;对照组不服用。益生菌从放疗的第一天开始,直至患者放疗结束。如患者出现口腔真菌感染,可食用碳酸氢钠漱口水及抗真菌药物。当患者仅出现0~1度口腔黏膜炎,可给予常规口泰含漱液漱口;当患者出现2级以上疼痛时可给予利多卡因漱口。以上事项需详细记录。

1.5 评价标准

本研究治疗观察周期从放疗第一天起直至患者出现3级口腔黏膜炎或放疗结束。指定一名副高以上医师作为观察员,每天上午查房期间观察放疗过程中受试者的口腔黏膜炎情况,采用RTOG(Table 2)标准记录口腔黏膜炎情况。记录放疗开始和结束时间及中断时间,累积放疗剂量;记录药物相关不良反应及停药时间。首要的观察终点:3级以上急性口腔黏膜炎的发生情况,其他的观察终点:近期疗效、免疫指标、粪便菌群变化。主要评价指标:放射性口腔黏膜炎客观分级(RTOG标准)、菌群高通量测序、免疫相关指标(CD3,CD4,CD8等淋巴细胞免疫分析、淋巴细胞、白蛋白等);次要评价指标:因严重放射性口腔黏膜炎导致放疗中断的发生率,放疗前后体重变化,近期疗效。安全性评价指标:不良反应发生率。

1.6 标本采集

治疗前(不接受任何治疗前):收集患者大便标本(送-80℃冰箱冷冻),查血常规、小生化、CD3、CD4、CD8。治疗完成(入院后接受治疗或服用结束后):收集大便标本(送-80℃冰箱冷冻),进行血常规、小生化、CD3、CD4、CD8。从样本中提取细菌DNA基因组DNA试剂盒(天根)。

1.7 放化疗方法

放疗方案:全部患者均接受根治性放射治疗。放疗技术采用适形调强放疗,肿瘤GTVnx 66~70Gy/32次(2.06~2.19Gy/次),颈部阳性淋巴结GTVnd 66~70Gy/32次(2.06~2.19Gy/次),高危CTV-1 60Gy(1.9Gy/

次),低危区CTV-2 55Gy(1.7Gy/次),5次/周。

化疗方案:同期化疗方案为顺铂,剂量为80mg/m²,d₁,21天为1个周期,同期化疗共2个周期。

1.8 总细菌基因组DNA提取和高通量测序

以样品中总菌群DNA为模板,用通用引物338F(5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCA-3')和806R(5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')与接头序列和条形码序列组合扩增细菌16SrRNA基因的V3~V4区域。在总体积50μl的体系中进行PCR扩增,包含10μl缓冲液,10μl High GC Enhancer,1μl 1.8 dNTP,10 μmol/L引物和60ng基因组DNA。扩增条件如下:95℃预变性5min,95℃变性1min,50℃退火1min,72℃延伸1min,一共进行15个循环,最后在72℃延伸7min。第一步的PCR产物通过VAHTSTM DNACleanBeads纯化。然后在40μl体系中进行第二轮PCR,反应所包含20μl 2×PhusionHF MM,8μl DDH₂O,上下游引物各10 μmol/L和10μl第一轮PCR产物。扩增条件如下:98℃预变性30s,98℃变性10s,65℃退火30s和72℃延伸30s,一共进行10个循环,最后在72℃延伸5min。最后,所有PCR产物混合在一起并通过Quant-iT™TMsDNA HS试剂定量分析。使用Illumina HiSeq2500平台(2×250双端测序)在北京百迈客生物科技股份有限公司对纯化的样品进行细菌16SrRNA的高通量。

1.9 统计学处理

使用SPSS 23.0软件对结果进行分析,采用F-Test检验,P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 口服益生菌可明显减少严重口腔黏膜炎(3级以上)发生率

本研究显示,试验组放化疗导致的3级、4级口腔黏膜炎的发生率减少(0 vs 60%,P<0.001)(Figure 1, Table 3),且整体黏膜炎发生率(88.5% vs 100%,P=0.037)降低而放化疗治疗完成率相似(100% vs 100%,P=0.831)。表明联合应用益生菌可减少放疗引起的口腔黏膜炎,且不影响肿瘤对放疗的反应(100% vs 100%,P=0.583)(Table 1)。

Table 2 Grade criteria for oral mucositis

Grade	Clinical manifestations
0	Asymptomatic
1	Mucosal erythema
2	Patchy ulcer or pseudomembrane
3	Continuous ulceration or pseudomembrane or minor abrasions causing bleeding
4	Tissue necrosis, obvious spontaneous hemorrhage, life-threatening

Table 3 Results of oral mucositis at the end of treatment [n(%)]

Grade	RCP(N=25)	RCPC(N=26)
0	0(0)	3(11.5)
1	1(4.0)	20(77.0)
2	9(36.0)	3(11.5)
3	15(60.0)	0(0)
4	0(0)	0(0)

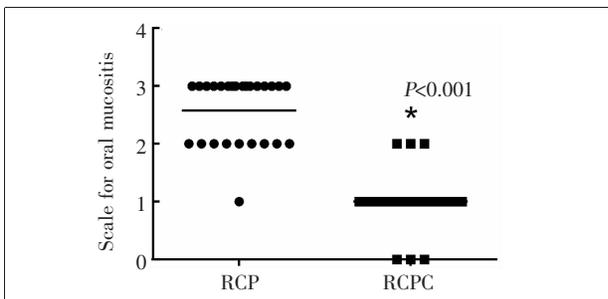


Figure 1 Effect of probiotic combination on scale for oral mucositis

Table 4 Number and ratio of T cells[n(%)]

Cell	Number	RCP(N=25)	RCPC(N=26)	P
CD3 ⁺ T cells	400~2860/ μ l	0(0)	3(12.0)	0.0091
CD4 ⁺ T cells	300~1440/ μ l	0(0)	3(12.0)	0.0091
CD4/ CD8 ⁺ T cells	1.4~2.0	9(36.0)	5(19.0)	0.0420
Lymphocyte ratio	20%~50%	3(8.3)	7(28.0)	0.0060

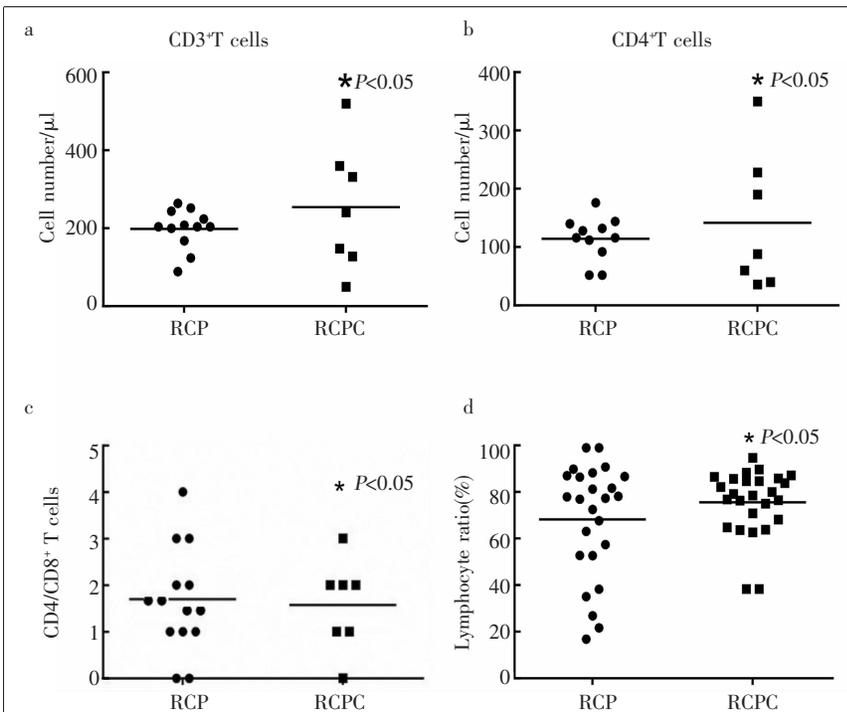


Figure 2 Effect of probiotic combination on CD3⁺T cells number, CD4⁺T cells number, CD4⁺T cells/CD8⁺T cells and lymphocyte number

2.2 口服益生菌调节放疗患者的 T 细胞群

与对照组相比,联合应用益生菌组 CD3⁺T 细胞 ($P=0.0091$)、CD4⁺T 细胞 ($P=0.0091$)增加,CD4⁺T 细胞/CD8⁺T 细胞比例降低 ($P=0.0420$),淋巴细胞比例显著提高 ($P=0.0060$)(Figure 2, Table 4)。

2.3 微生物群落 β 多样性的差异

利用高通测量法评价益生菌对肠道微生物群的因影响,分析了前 8 个微生物种群的数目(Figure 3a),其中,Firmicutes、Bacteroidetes 和 Proteobacteria 是 RCP 和 RCPC 组中三种最常见的主要菌群(分别为 51.92% 和 38.35%;34.94% 和 36.47%;10.68% 和 21.94%), 占总排序数的 97.54% 和 96.76%。益生菌组合的使用使 RCPC 组增加了拟杆菌、埃希氏菌-志贺氏菌和副杆菌的数量,同时减少了普氏菌和链球菌的数量(Figure 3b)。

进一步对 HP 组、RCP 组和 RCPC 组肠道菌群

进行主坐标分析(Figure 4),距离 HP 越近的样本,表明细菌组成与正常菌群越相似。HP 组分布远离 RCP 组和 RCPC 组,表明 RCP 组和 RCPC 组的微生物群落偏离 HP 组。通过距离系数 UPGMA 聚类分析证实了 RCP 组和 RCPC 组与正常菌群存在差异。尽管益生菌组合增强了宿主免疫力并减少了溃疡性黏膜炎,但在放疗结束时肠道菌群多样性未能恢复到正常水平。

2.4 安全性评价

本研究中,两组患者均未出现和药物相关的严重不良事件。

3 讨论

口腔黏膜炎是头颈部肿瘤放疗中最常见且对患者影响明显的急性反应之一,影响患者的睡眠及营养摄入,易并发感染,加重经济负担,严重的还会降低患者的放射治疗耐受性。放疗过程中,如何有效的预防性治疗急性放射性口腔黏膜炎,对于提高头颈部肿瘤患者

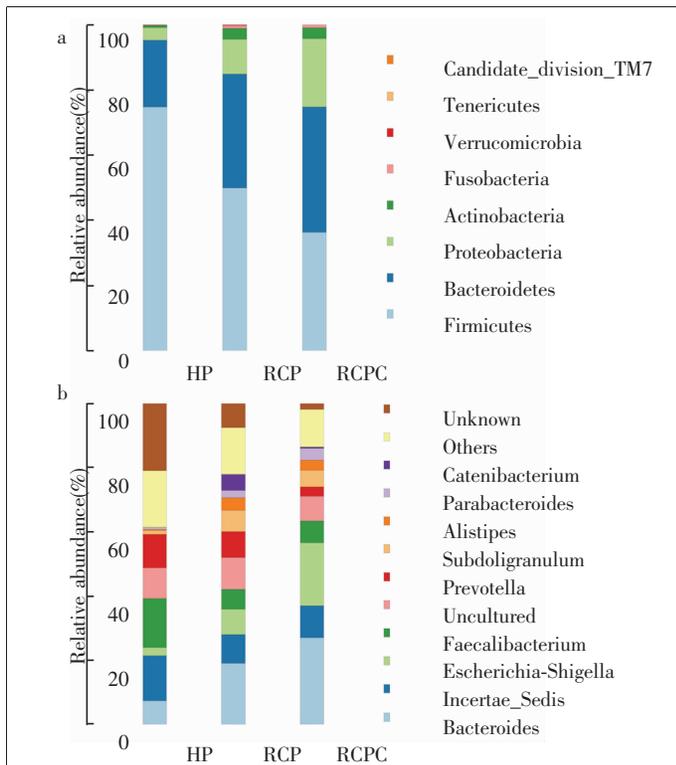


Figure 3 Effect of probiotic combination on composition and relative abundance of bacterial communities in feces of nasopharyngeal carcinoma patients in phylum level (a) and genus level (b)

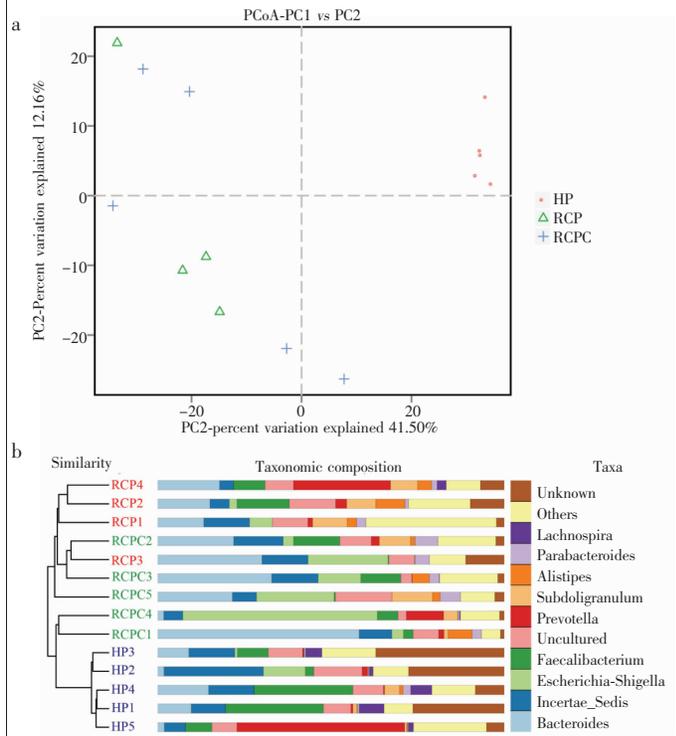


Figure 4 The principal coordinates analysis (PCoA) (a) and the UPGMA cluster tree (b) of HP group, RCP group and RCPC group

的放射治疗效果至关重要。有多项研究分析如何治疗放射性口腔黏膜炎,如双花百合片、新净界漱口水、重组人表皮生长因子联合氨磷汀、口腔溃疡含漱液、重组人白介素 11 联合传统含漱液、牛奶冰棒加中药茶、口炎清颗粒等等研究^[5-7],都表明可以降低头颈部肿瘤放疗过程中口腔黏膜炎的发生,提高患者的放疗耐受。但是并没有说明如何降低患者的口腔黏膜炎发生,而大都是在发生口腔黏膜炎后的治疗以减轻患者痛苦。本研究中,我们发现口服益生菌可提前预防口腔黏膜炎的发生,不仅可以降低患者 3、4 级口腔黏膜炎的发生率,肿瘤消退反应与对照组相似,而且还能够增加患者的淋巴细胞数、CD3⁺T 细胞、CD4⁺T 细胞和 CD8⁺T 细胞的数目,增强抗肿瘤免疫反应,改善患者的肠道菌群分布。结果显示,服用益生菌组患者的肠道菌群更接近正常健康人的肠道菌群。

口腔黏膜炎的发生经过 4 个过程,首先是射线对 DNA 的直接损伤作用^[8],随后是辐射产生的活性氧引起机体的氧化应激而对细胞的损伤作用^[9],再是辐射激活的转录因子和促炎细胞因子对细胞损伤的介导作用,其中 NF-κB 被认为是肿瘤的毒性和耐受性相关最显著的因子之一,NF-κB 的激活能够引起某些促炎细胞因子的生成进而导致组织的早期损伤^[10-11],最后是放疗过程中病原微生物对口腔黏膜的损伤作用,口腔原微生物对黏膜炎的发展具有推动作用。各类细菌能很快在黏膜溃疡的表面繁殖,加重口腔黏膜的损伤^[12]。肠道菌群的失调对结直肠癌的发生发展也起着相当重要的作用,在结直肠癌中,肠道菌群的细菌组成发生了许多变化,菌群失调对基因毒性、炎症、宿主防御调制、代谢、氧化应激和氧化防御调制都有影响^[13]。本研究中,口服益生菌正是在这些环节中起到作用,口服益生菌能够调节肠道的有益菌群在一个平衡范围内。

拟杆菌属是哺乳动物胃肠道中最重要的部分,它们在将复杂分子加工成宿主肠道中较简单的分子中发挥重要作用,并通过排除潜在的病原体使肠道定植而使其受益^[14]。本研究中,主要研究的是口腔黏膜炎,而实验中检测的菌群是肠道菌群,那么肠道菌群是否能够影响到口腔的菌

群?是如何影响的?这些机制目前尚不明确。并且研究表明口服益生菌能够增加肠道的有益菌群,具体是哪种菌群对减轻口腔黏膜炎的发生有作用,从而为患者提供一个精确的个体化的治疗方案,还需进一步深入研究。

参考文献:

- [1] De Sanctis V, Bossi P, Sanguineti G, et al. Mucositis in head and neck cancer patients treated with radiotherapy and systemic therapies: literature review and consensus statements [J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2016, 100: 147-166.
- [2] Rose-Ped AM, Bellm LA, Epstein JB, et al. Complications of radiation therapy for head and neck cancers. The patient's perspective [J]. *Cancer Nurs*, 2002, 25(6): 461-467.
- [3] Sroussi HY, Epstein JB, Bensadoun RJ, et al. Common oral complications of head and neck cancer radiation therapy: mucositis, infections, saliva change, fibrosis, sensory dysfunctions, dental caries, periodontal disease, and osteoradionecrosis [J]. *Cancer Med*, 2017, 6(12): 2918-2931.
- [4] Shih A, Miaskowski C, Dodd MJ, et al. Mechanisms for radiation-induced oral mucositis and the consequences [J]. *Cancer Nurs*, 2003, 26(3): 222-229.
- [5] 罗鹏辉, 毛艳, 李黎, 等. 重组人白介素 11 联合传统含漱液防治鼻咽癌放射性口腔黏膜炎的疗效观察 [J]. *海南医学*, 2016, 27(24): 3997-4000.
Luo PH, Mao Y, Li L, et al. Efficacy of recombinant human interleukin 11 and traditional mouthwash in prevention and treatment of radiation-induced oral mucositis in patients with nasopharyngeal carcinoma [J]. *Hainan Medical Journal*, 2016, 27(24): 3997-4000.
- [6] 严齐会, 林海升, 卓文杰, 等. 口炎清颗粒对头颈部恶性肿瘤患者放疗后放射性口腔黏膜炎的防治作用 [J]. *中国药房*, 2017, 28(27): 3778-3781.
Yan QH, Lin HS, Zhuo WJ, et al. Effects of kouyanqing granules on prevention and treatment of radiation-induced oral mucositis patients with head and neck cancer after radiotherapy [J]. *China Pharmacy*, 2017, 28(27): 3778-3781.
- [7] 万诗燕, 夏桂兰, 王传英. 牛奶冰棒加中药茶防治鼻咽癌病人放射性口腔黏膜反应的临床研究 [J]. *护理研究*, 2011, 25(24): 2218-2220.
Wan SY, Xia GL, Wang CY. Clinical study on milk popsicle plus traditional Chinese herbal tea to prevent and to treat nasopharyngeal carcinoma patients from radioactive oral mucosa reaction [J]. *Chinese Nursing Research*, 2011, 25(24): 2218-2220.
- [8] Ps SK, Balan A, Sankar A, et al. Radiation induced oral mucositis [J]. *Indian J Palliat Care*, 2009, 15(2): 95-102.
- [9] Ozben T. Oxidative stress and apoptosis: impact on cancer therapy [J]. *J Pharm Sci*, 2007, 96(9): 2181-2196.
- [10] Ong ZY, Gibson RJ, Bowen JM, et al. Pro-inflammatory cytokines play a key role in the development of radiotherapy-induced gastrointestinal mucositis [J]. *Radiat Oncol*, 2010, 5: 22.
- [11] Logan RM, Stringer AM, Bowen JM, et al. Serum levels of NF kappaB and pro-inflammatory cytokines following administration of mucotoxic drugs [J]. *Cancer Biol Ther*, 2008, 7(7): 1139-1145.
- [12] Sonis ST. Mucositis: the impact, biology and therapeutic opportunities of oral mucositis [J]. *Oral Oncol*, 2009, 45(12): 1015-1020.
- [13] Gagniere J, Raisch J, Veziant J, et al. Gut microbiota imbalance and colorectal cancer [J]. *World J Gastroenterol*, 2016, 22(2): 501-518.
- [14] Xu J, Mahowald MA, Ley RE, et al. Evolution of symbiotic bacteria in the distal human intestine [J]. *Plos Biol*, 2007, 5(7): e156.