

## 双歧杆菌在5-氟尿嘧啶作用下的适应性变化

刘俊康, 邓渝, 吴小兰, 魏海龙, 徐启旺

刘俊康, 邓渝, 吴小兰, 魏海龙, 徐启旺, 第三军医大学医学检验系生物波研究室 重庆市 400038  
重庆市科委自然科学基金计划资助项目, No. CSTC2006BB5068  
通讯作者: 徐启旺, 400038, 重庆市沙坪坝区高滩岩正街30号, 第三军医大学医学检验系生物波研究室. tmmubc@163.com  
电话: 023-68752191  
收稿日期: 2006-07-28 接受日期: 2006-08-22

### Adaptive changes of bifidobacteria in the presence of 5-fluorouracil

Jun-Kang Liu, Yu Deng, Xiao-Lan Wu, Hai-Long Wei, Qi-Wang Xu

Jun-Kang Liu, Yu Deng, Xiao-Lan Wu, Hai-Long Wei, Qi-Wang Xu, Research Center of Bio-wave, Department of Laboratory Medicine, the Third Military Medical University, Chongqing 400038, China

Supported by the Natural Science Planning Foundation of Chongqing Science and Technology Committee, No. CSTC2006BB5068

Correspondence to: Qi-Wang Xu, Research Center of Bio-wave, the Third Military Medical University, Chongqing 400038, China. tmmubc@163.com

Received: 2006-07-28 Accepted: 2006-08-22

### Abstract

**AIM:** To observe the characteristics for the adaptive changes of bifidobacteria under the influence of 5-fluorouracil (5-FU).

**METHODS:** The growth and morphological characteristics of bifidobacteria in the presence of 5-FU were acquired by drug-sensitivity test, gram stain and atomic force microscopic scanning as well as the identification of the 5-FU-resistant isolates.

**RESULTS:** In the presence of 5-FU, bifidobacteria were lengthened with fewer ruptures, becoming filament-like, with a length of more than 10  $\mu\text{m}$ . The bifidobacteria were ramose at both ends and the relative height was about 1  $\mu\text{m}$ . The 5-FU-resistant bifidobacteria were also found within the inhibition zone. Given the normal growth conditions, the filament-like bifidobacteria restored to the normal growth again.

**CONCLUSION:** 5-FU can directly influence the

growth of bifidobacteria, whereas bifidobacteria exhibit significant adaptive changes to the action of 5-FU.

**Key Words:** Bifidobacteria; Chemotherapeutic drugs; 5-fluorouracil; Biological wave; Atomic force microscope

Liu JK, Deng Y, Wu XL, Wei HL, Xu QW. Adaptive changes of bifidobacteria in the presence of 5-fluorouracil. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(32):3139-3142

### 摘要

**目的:** 研究双歧杆菌在5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)作用下的适应性变化特点。

**方法:** 采用药敏实验、染色形态观察、原子力显微镜扫描观察以及耐药菌株生长实验鉴定等方法观察双歧杆菌的生长情况及形态特征。

**结果:** 在5-FU作用下, 双歧杆菌菌体加长, 断裂减少, 转变成丝状体, 长度在10  $\mu\text{m}$ 以上, 两端呈分枝状, 相对高度约1  $\mu\text{m}$ , 并且在抑菌环内还产生了耐药菌株。这些丝状体在正常的生长条件下又可以恢复正常生长。

**结论:** 化疗药物可以直接影响双歧杆菌的生长, 而双歧杆菌对化疗药的作用可产生显著的适应性变化。

**关键词:** 双歧杆菌; 化疗药物; 5-氟尿嘧啶; 生物波; 原子力显微镜

刘俊康, 邓渝, 吴小兰, 魏海龙, 徐启旺. 双歧杆菌在5-氟尿嘧啶作用下的适应性变化. *世界华人消化杂志* 2006;14(32):3139-3142

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/3139.asp>

### 0 引言

人体胃肠道对数量巨大而又动态变化的细菌群体而言是一个天然的生态环境<sup>[1]</sup>, 双歧杆菌作为肠道菌群的重要成员<sup>[2]</sup>, 占新生儿肠道细菌总量的91%, 成年人占到3%-7%, 发挥稳定肠道菌

### ■背景资料

双歧杆菌是人体内存的一种生理性细菌, 是人体有益菌中最值得重视和研究的一种, 只有在患病时或衰老时才有所减少; 5-氟尿嘧啶是通过抑制脱氧胸苷酸酶, 从而影响DNA的合成, 其对消化系统癌的疗效较好, 在临床中的应用广泛, 5-氟尿嘧啶对双歧杆菌的损伤作用较强, 在此背景下, 人们做了大量的研究来解决此问题, 最多的研究都集中在对体内双歧杆菌的补充上, 但这种方式仍然不能避免5-氟尿嘧啶的损伤作用, 因此本文希望通过一些独特的研究来选育出可以抗5-氟尿嘧啶的损伤的双歧杆菌来。

### ■创新盘点

潜生体是细菌在不利条件下的一种特殊生长状态, 本文利用原子力显微镜结合常规细菌培养的方法, 对此进行了深入的探索, 结果发现在抑菌圈的周围出现了能耐药的菌株, 虽然数量不多, 但如果其拥有稳定的转种传代能力, 这将为临床药物的应用及某些类似的消化类疾病作出不小的贡献, 进一步的研究还在继续中。

群、产生特殊有机酸类物质来对抗致病菌<sup>[3]</sup>、以寡聚糖抑制多种致病微生物、维持人体胃肠道正常功能等多方面作用<sup>[4]</sup>。医院患者特别是肿瘤患者常常应用抗癌药物, 在此过程中肠道功能会受到明显影响。文献报道可引起肠道菌群紊乱, 导致艰难梭菌等条件致病菌的过生长, 引发肠道感染<sup>[5]</sup>, 也有文献报道化疗药应用使双歧杆菌数量减少<sup>[6]</sup>, 但尚未见到化疗药物直接对双歧杆菌作用而引起其生物学形状改变的研究报道。因此, 本文选用5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)对此作了针对性研究, 目的在于探索双歧杆菌对化疗药物作用的适应性变化特点, 为临床上找到一条在应用化疗药物情况下, 稳定双歧杆菌从而维持肠道功能正常的途径提供实验依据。现报道如下。

## 1 材料和方法

1.1 材料 青春型双歧杆菌, 本室分离保存; 改良BS培养基, 依文献[7]的方法配置; 5-FU, 天津金耀氨基酸有限公司; Olympus多功能显微镜: 日本Olympus公司, 带有型号为UplanFL的10×, 20×, 40×, 100×平场消色差镜头; 原子力显微镜: 日本精工公司, 型号SPI3800N-SPA400, 应用原子力显微镜AFM的气相模式。在该种模式下使用了100 μm Scanner, 其参数为: X: 115 μm, Y: 115 μm, Z: 29.97 μm, 表示应用的Scanner在X轴、Y轴方向上的扫描移动范围最大值为115 μm, 在Z轴方向上移动范围最大值为29.97 μm, 应用AFM测定使用Triangle 200 nm的cantilever, 使用相应的探针支架。柯达数码相机: Kodak EasyShare V603, 3倍光学变焦。

### 1.2 方法

1.2.1 5-FU作用下细菌的生长及形态观察 将5-FU制备成1, 5, 10 mg/L的水溶液, 以5 μL/片的体积加在直径5 mm的药敏实验专用纸片上, 制成药敏纸片, 同时以环磷酰胺配制0.5 g/L水溶液, 同法制成药敏纸片。用棉签蘸取双歧杆菌悬液涂抹BS平板, 并在平皿中心放置5-FU药敏纸片, 于37℃厌氧环境中(800 mL/L N<sub>2</sub>, 100 mL/L H<sub>2</sub>, 100 mL/L CO<sub>2</sub>)培养48 h, 观察抑菌情况, 并以革兰染色法观察抑菌环内外细菌形态。

1.2.2 原子力显微镜扫描观测法 在上述药敏实验形成的抑菌圈边缘取一接种环细菌, 加入0.5 mL生理盐水制备成生理盐水菌悬液, 均匀涂布于扫描专用玻片上干燥, 以甲醇固定15 min, 蒸馏水漂洗3次, 每次1 min, 待干, 按照

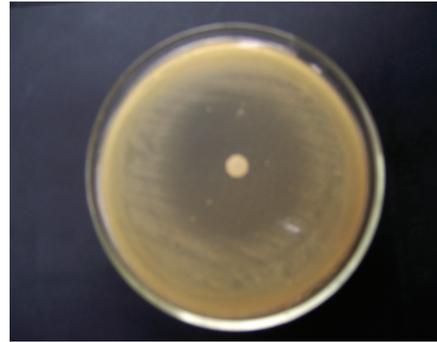


图1 5-FU对双歧杆菌药敏实验结果(×1)。从中心含有10 mg/L × 5 μL的5-FU药敏纸片向边缘延伸, 显示出直径约2.5 cm的抑菌圈, 在抑菌圈内可见散在生长的菌落。



图2 5-FU纸片周围抑菌圈边缘细菌革兰染色表现出的菌体加长, 断裂减少的丝状体特征(×1000)。

原子力显微镜操作程序扫描观测细菌形态特征。  
1.2.3 细菌生长能力观察 抑菌环边缘处取细菌标本, 接种改良BS培养基, 37℃厌氧培养48-72 h, 观察其复原生长情况; 并对抑菌环内菌落再次进行5-FU耐药实验。

## 2 结果

2.1 双歧杆菌在5-FU作用下生长及形态观察结果 5-FU对双歧杆菌的生长显示出抑制作用, 并且药量大者, 其抑菌作用也增强, 在抑菌圈内还可见散在生长的菌落(图1)。抑菌圈边缘处细菌常规涂片, 革兰染色, 表现出菌体加长, 断裂减少的丝状体变化(图2), 并且革兰染色为蓝紫色阳性反应特征减轻, 总体上呈复染后的红色(图3), 环磷酰胺纸片周围没有抑菌圈(图4), 细菌形态呈分枝状, Y字形、V字形等形态特征, 革兰染色呈阳性。

2.2 5-FU作用下形成的丝状体 由扫描结果可见, 双歧杆菌的丝状体长度在10 μm以上, 两端呈分枝状, 相对高度约1 μm(图5)。

2.3 5-FU作用后细菌生长能力 以纸片法进行的

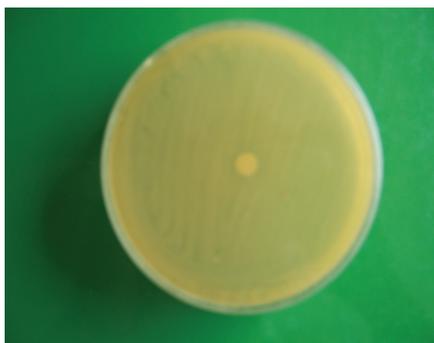


图 3 环磷酰胺对双歧杆菌药敏实验结果( $\times 1$ ). 含0.5 mg/L  $\times 5 \mu\text{L}$ 的环磷酰胺对双歧杆菌的生长无抑菌圈, 表明对双歧杆菌的生长无抑制作用.

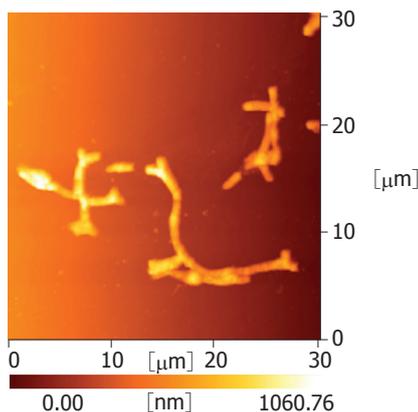


图 5 5-FU作用下形成的丝状体AFM扫描, 扫描面积 $30 \mu\text{m} \times 30 \mu\text{m}$ .

**■创新盘点**  
 本文将为临床药物的应用及某些类似的消化类疾病作出不小的贡献.

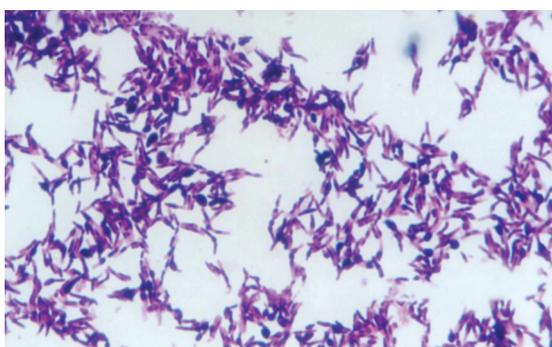


图 4 环磷酰胺作用下双歧杆菌革兰染色结果( $\times 1000$ ).

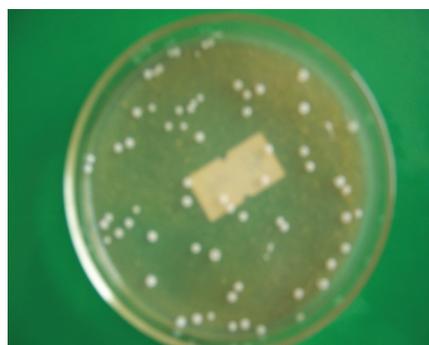


图 6 双歧杆菌丝状体转种后形成的菌落形态( $\times 1$ ).

5-FU药敏实验结果显示, 在含5-FU的纸片周围形成了抑菌圈, 在抑菌圈内有散在的菌落. 从抑菌圈外缘处挑取细菌涂片染色观察见多数为丝状体双歧杆菌. 转种培养48-72 h, 形成的菌落由正常形态细菌组成(图6); 转种于 $37^\circ\text{C}$ 厌氧环境中抑菌环内生长菌落再次进行5-FU药敏实验, 结果无抑菌环出现(图7).

### 3 讨论

本文在有关双歧杆菌传统研究的基础上<sup>[7]</sup>, 针对肿瘤患者应用化疗药物后, 肠道功能受损, 特别是双歧杆菌数量明显减少的问题<sup>[8]</sup>, 实验研究5-FU作用下双歧杆菌的适应性变化, 结果表明5-FU对双歧杆菌有抑制作用; 这种抑制作用使双歧杆菌适应性变化和耐药性显现出来. 其中, 适应性变化显示在形态和生长特点上. 形态方面由正常的革兰染色阳性的分叉状的短杆菌变为纤细的革兰染色阳性反应减弱的菌体形态. 实验也证明, 在给以合适条件时, 这种纤细状细菌能恢复生长, 形成正常的细菌形态. 另一方面, 耐药性的变化表现在5-FU纸片周围抑菌圈内出现散在菌落, 这些菌落再次进行5-FU药敏实验

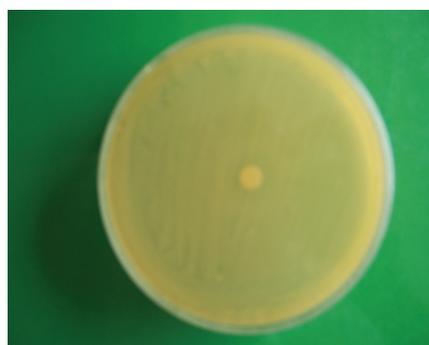


图 7 5-FU纸片周围抑菌圈内生长菌落再次进行5-FU药敏实验结果( $\times 1$ ).

时, 仍然耐药.

由本实验可知, 虽然5-FU等化疗药物能够直接抑制或损伤双歧杆菌, 作为一种肠道重要的正常菌群<sup>[9]</sup>, 在生长进化中同样具备了适应变化能力, 其在抑菌圈周围出现的纤细状形态, 再结合其产生条件来看符合生物波研究中提出的有关潜生体的概念<sup>[10]</sup>, 是对抗不利环境的一种适应性变化形式. 另一方面, 也可以看出并非所有的双歧杆菌都对化疗药物敏感, 有的菌株表现

### ■同行评价

本文准确反映了研究工作的科学问题和特定内容, 简明而有特色, 文章的科学性、创新性和可读性反映了我国胃肠病学基础研究的水准。

出天然的耐药性, 这些菌株的存在或者通过人工补充对应用化疗药物的患者应该有较为重要的作用。化疗药作用下双歧杆菌为何会发生形态的变化等有关的机制问题尚有待进一步研究。

### 4 参考文献

- 1 Ballongue J. Bifidobacteria and probiotic action. In: Salminen S, von Wright A, eds. Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects. New York: Marcel Dekker, 1998: 519-587
- 2 Biavati, Mattarelli P. The family Bifidobacteriaceae. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E, eds. The prokaryotes. New York: Springer, 2001: 1-70
- 3 Gagnon M, Kheadr EE, Le Blay G, Fliss I. *In vitro* inhibition of *Escherichia coli* O157:H7 by bifidobacterial strains of human origin. *Int J Food Microbiol* 2004; 92: 69-78
- 4 De Vuyst L, Avonts L, Neysens P, Hoste B, Vancanneyt M, Swings J, Callewaert R. The lactobin A and amylovorin L471 encoding genes are identical, and their distribution seems to be restricted to the species *Lactobacillus amylovorus* that is of interest for cereal fermentations. *Int J Food Microbiol* 2004; 90: 93-106
- 5 Kamthan AG, Bruckner HW, Hirschman SZ, Agus SG. *Clostridium difficile* diarrhea induced by cancer chemotherapy. *Arch Intern Med* 1992; 152: 1715-1717
- 6 张晓敏, 杨景云, 李丹红, 刘开蕾. 化疗安口服液对白血病患者化疗后免疫功能及肠道菌群影响的研究. *中国微生态学杂志* 2005; 17: 284-285
- 7 Wang Z, Xiao G, Yao Y, Guo S, Lu K, Sheng Z. The role of bifidobacteria in gut barrier function after thermal injury in rats. *J Trauma* 2006; 61: 650-657
- 8 Caglar E, Sandalli N, Twetman S, Kavaloglu S, Ergeneli S, Selvi S. Effect of yogurt with *Bifidobacterium* DN-173 010 on salivary mutans streptococci and lactobacilli in young adults. *Acta Odontol Scand* 2005; 63: 317-320
- 9 Topouzian N, Joseph BJ, Bezkorovainy A. Effect of various metals and calcium metabolism inhibitors on the growth of *Bifidobacterium bifidum* var. *pennsylvanicus*. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1984; 3: 137-142
- 10 徐启旺, 刘俊康. 生物波与人体抗癌能力诠释. 香港: 新青年出版社, 2005, 30-46

电编 张敏 编辑 王晓瑜

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

## 《世界华人消化杂志》简介

《世界华人消化杂志》创刊于1993-01-15, 原刊名《新消化病学杂志》, 1999-03-25经国家科学技术部和国家新闻出版总署批准更名为《世界华人消化杂志》, 国科发财字[1999] 071号, 国内统一刊号CN 14-1260/R, 国际标准刊号ISSN 1009-3079, 国内外公开发行的综合性消化病学类学术期刊。2002-11-14经国家工商行政管理总局商标局核定使用商品(第16类), 获得商标注册证第2001071号。《世界华人消化杂志》为保证期刊的学术质量, 对所有来稿均进行同行评议, 是一份被中国科技论文统计源核心期刊和中文核心期刊要目总览收录的学术类期刊。《世界华人消化杂志》发表的英文摘要被美国《化学文摘(Chemical Abstracts)》, 荷兰《医学文摘库/医学文摘(EMBASE/Excerpta Medica)》, 俄罗斯《文摘杂志(Abstracts Journals)》收录。《世界华人消化杂志》综合介绍消化病学前沿基础与临床研究的发现, 覆盖消化病学领域中经临床实验证明的技术进展。从1993-2005《世界华人消化杂志》发表的文章可以在线<http://www.wjgnet.com>免费阅读全文。《世界华人消化杂志》综合介绍以下领域的内容: 消化基础研究、消化临床研究、消化内科、消化内镜、消化外科、消化肿瘤、消化介入治疗、消化护理、消化医学影像、消化病理、消化预防医学、消化误诊误治、消化中西医结合、消化检验、消化新技术应用、消化病诊断、消化病治疗、消化新药应用、消化专家门诊。《世界华人消化杂志》开通了<http://www.wjgnet.com/wcjd/ch/index.aspx>在线办公系统, 实现了在线投稿和审稿等功能。