

MDCK-MDR1 细胞药物体外吸收模型的建立及验证

韩帅¹ 张洁² 金婷婷¹ 闫茹冰¹ 褚海辰^{1,2} 梁永新^{1,3}

(1 青岛大学医学部,山东 青岛 266071; 2 青岛大学附属医院麻醉科; 3 青岛大学附属妇女儿童医院麻醉科)

[摘要] 目的 构建 MDCK-MDR1 细胞体外吸收模型并进行验证,以用于口服药物吸收和转运机制的研究。方法 将不同浓度组(1.0×10^8 /L 的 L 组、 2.5×10^8 /L 的 M 组、 5.0×10^8 /L 的 H 组)MDCK-MDR1 细胞接种于 24 孔 Transwell 培养板上,培养 1~7 d,通过吸光度值绘制 MDCK-MDR1 细胞生长曲线,观察不同培养时间点细胞的形态,测定不同时间点的跨膜电阻(TEER)值,确定形成单层膜结构的最佳细胞接种浓度和培养时间。通过荧光黄转运实验对不同浓度和时间点形成的单层膜结构进行验证。结果 L 组、M 组和 H 组分别在接种后第 5、3、1 天形成单层膜结构,分别在第 5、4、3 天时吸光度值达到峰值。L 组在接种第 5 天时 TEER 值达到 $300 \Omega \cdot \text{cm}^2$,第 5~7 天趋于稳定,故确定形成单层膜结构的最佳细胞接种浓度为 1.0×10^8 /L,最佳培养时间为 5 d。荧光黄转运实验验证显示,该单层膜结构的荧光黄表观渗透系数为 $4.27 \times 10^{-7} \text{ cm/s}$,低于通透性试验规定的 $5.0 \times 10^{-7} \text{ cm/s}$ 。结论 本研究构建的 MDCK-MDR1 细胞模型单层膜结构完整性和通透性均通过验证,可作为模拟口服药物吸收和转运机制研究的体外模型。

[关键词] MDCK-MDR1 细胞;电阻抗;细胞膜通透性;模型,生物学;生物转运;肠吸收;体外培养技术

[中图分类号] R349.92;R329.27

[文献标志码] A

ESTABLISHMENT AND VALIDATION OF A DRUG *IN VITRO* ABSORPTION MODEL OF MDCK-MDR1 CELLS HAN Shuai, ZHANG Jie, JIN Tingting, YAN Rubing, CHU Haichen, LIANG Yongxin (Faculty of Medicine, Qingdao University, Qingdao 266071, China)

[ABSTRACT] **Objective** To establish and validate a drug *in vitro* absorption model of MDCK-MDR1 cells for research on the mechanism of oral drug absorption and transport. **Methods** MDCK-MDR1 cells with different concentrations (group L with 1.0×10^8 /L, group M with 2.5×10^8 /L, and group H with 5.0×10^8 /L) were inoculated onto a 24-well Transwell plate and cultured for 1–7 d. Optical density (OD) was measured to plot the growth curve of MDCK-MDR1 cells, and cell morphology was observed at different time points of culture. Transepithelial electrical resistance (TEER) was measured at different time points to determine the optimal cell inoculation concentration and culture time for the formation of a monolayer structure. Lucifer yellow transfer assay was used to validate the monolayer structure formed at different concentrations and time points. **Results** The groups L, M, and H showed the formation of the monolayer structure on days 5, 3, and 1, respectively, after inoculation, and OD reached the peak value on days 5, 4, and 3, respectively. For group L, TEER reached $300 \Omega \cdot \text{cm}^2$ on day 5 of inoculation and tended to be stable on days 5–7. Therefore, 1.0×10^8 /L was selected as the optimal cell inoculation concentration, with an optimal culture time of 5 d. Lucifer yellow transfer assay showed that the monolayer structure had a Lucifer yellow apparent permeability coefficient of $4.27 \times 10^{-7} \text{ cm/s}$, which was lower than $5.0 \times 10^{-7} \text{ cm/s}$ determined by the permeability test. **Conclusion** The MDCK-MDR1 cell model established in this study has validated monolayer structural integrity and permeability and can be used as an *in vitro* model to simulate the absorption and transport mechanisms of oral drugs.

[KEY WORDS] MDCK-MDR1 cells; Electric impedance; Cell membrane permeability; Models, biological; Biological transport; Intestinal absorption; *In vitro* techniques

口服给药是临床上最广泛的给药方式之一,药物在消化道吸收的速度和程度是影响药物生物利用度的主要因素^[1-2]。MDR1 转染犬肾细胞(MDR1-MDCK)是将人的多耐药基因转染 MDCK 细胞形成的稳定细胞系,能够分化成连接紧密和表达高转运蛋白的单层极性细胞^[3-4]。MDCK-MDR1 细胞体外吸收模型被广泛用于口服药物肠道上皮吸收转运机制的研究中^[5-7]。但由于 MDCK-MDR1 细胞来源

以及各实验室培养条件不同,各实验室对 MDCK-MDR1 细胞模型的建立方法和检验标准也存在一定的差异。本研究通过对 MDCK-MDR1 细胞形态特征、生长活力、跨膜电阻(TEER)值和荧光黄表观渗透系数(P_{app})等参数进行检测,拟构建可重复性强、稳定性好的 MDCK-MDR1 细胞体外吸收模型,为药物体外穿膜机制的研究提供可靠的细胞模型。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

MDCK-MDR1 细胞由上海青旗生物技术发展

[收稿日期] 2022-11-19; **[修订日期]** 2023-02-18

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81873729)

[通讯作者] 梁永新, Email: liangzi66@hotmail.com

有限公司提供,CCK-8 试剂盒由上海翊圣生物科技有限公司生产,荧光黄由北京谨明生物科技有限公司生产,EVOM2 跨膜细胞电阻仪购自美国 World Precision Instruments 公司,NIB620-FL 倒置显微镜购自安徽耐可视科技股份有限公司。

1.2 MDCK-MDR1 细胞培养及形态观察

将 MDCK-MDR1 细胞置于 DMEM 高糖培养基(含有 1×10^5 U/L 青霉素/链霉素/两性霉素 B、2 mmol/L 谷氨酰胺和体积分数 0.10 的 FBS)中,于 37°C 、含有体积分数 0.05 CO_2 的培养箱中培养。待 MDCK-MDR1 细胞(20~35 代)处于对数生长期时,分别按浓度 1.0×10^8 /L(L 组)、 2.5×10^8 /L(M 组)、 5.0×10^8 /L(H 组)接种于 24 孔 Transwell 培养板(后文简称“培养板”)上,从培养板的滤膜顶端(AP)以及基底侧(BL)分别加入 400、600 μL 的 DMEM 高糖培养基,各组细胞均培养 7 d,每天更换 DMEM 高糖培养基,分别于第 1、3、5 天于 NIB620-FL 倒置显微镜下观察各组 MDCK-MDR1 细胞的形态变化情况。

1.3 MDCK-MDR1 细胞增殖数量的测定

将培养达到对数生长期的 L、M、H 组 MDCK-MDR1 细胞接种于培养板上,按 1.2 中的方法进行培养,共培养 7 d。每天分别从 L、M、H 组中各取出 3 孔细胞,以 Hank 平衡盐溶液(HBSS)洗涤 2 次后,每孔再分别加入 100 μL 的 DMEM 高糖培养基和 10 μL 的 CCK-8 试剂,将培养板再次置于 37°C 、含体积分数 0.05 CO_2 培养箱中继续培养 2 h 后,将各孔中的细胞和培养液转移至 96 孔板中,采用酶标仪测定 450 nm 波长处的吸光度(A)值,绘制细胞生长曲线。

1.4 MDCK-MDR1 细胞 TEER 值的测定

将培养达到对数生长期的 L、M、H 组 MDCK-MDR1 细胞接种于培养板上,同时将不加 MDCK-MDR1 细胞的 DMEM 高糖培养基作为对照,按 1.2 中的方法进行培养,共培养 7 d。每天分别从对照和 L、M、H 组中各取出 3 孔细胞,弃去孔中的 DMEM 高糖培养基,再将 400、600 μL 的 HBSS 分别加入培养板的 AP 侧和 BL 侧。TEER 值测定开始前,将 EVOM2 跨膜细胞电阻仪电极置于预热至 37°C HBSS 中平衡 15~20 min。每孔重复测量 3 次,结果取均值。TEER 值计算公式: $\text{TEER} = (\text{TEER}_{\text{测定}} - \text{TEER}_{\text{对照}}) \times 0.33 \text{ cm}^2$,其中 $\text{TEER}_{\text{测定}}$ 为 L、M、H 组培养板孔中的电阻值, $\text{TEER}_{\text{对照}}$ 为对照培养板孔中的电阻值。

1.5 MDCK-MDR1 细胞单层膜结构通透性的验证

1.5.1 荧光黄标准曲线绘制

用 HBSS 将荧光黄稀释成 0.005、0.010、0.025、0.050 和 0.100 mg/L 的浓度,随后采用酶标仪测量不同浓度荧光黄的荧光强度(激发波长 427 nm,发射波长 536 nm),以荧光强度为纵坐标,荧光黄浓度为横坐标,绘制荧光黄标准曲线。

1.5.2 荧光黄转运实验

根据 1.2~1.4 中的实验结果,确定 MDCK-MDR1 细胞形成单层膜结构的最佳接种浓度和培养时间,按照 1.2 的方法将最佳接种浓度的 MDCK-MDR1 细胞接种于培养板上,培养至最佳培养时间时,取出 3 孔细胞吸弃 DMEM 高糖培养基后,从培养板 AP 侧加入 20 mg/L 荧光黄 400 μL ,BL 侧加入 600 μL 的 HBSS,置于 37°C 、含体积分数 0.05 CO_2 的培养箱中再培养 1 h。分别于培养 0.5、1.0 h 时从每孔的 BL 侧取样 100 μL ,再补充相同体积的 HBSS,以酶标仪测量各孔中 BL 侧荧光黄的荧光强度(激发波长 427 nm 以及发射波长 536 nm)。参考荧光黄标准曲线,计算各孔 BL 侧荧光黄 P_{app} 值,以 P_{app} 值 $< 5.0 \times 10^{-7} \text{ cm/s}$ 作为细胞单层膜结构的通透性达到通透性试验要求的标准^[8]。

2 结 果

2.1 MDCK-MDR1 细胞生长形态观察

倒置显微镜下观察显示,MDCK-MDR1 细胞在培养板上贴壁生长,呈扁平状,自发性上皮样分化。L、M、H 组的 MDCK-MDR1 细胞分别在第 5、3、1 天时形成单层膜结构。形成单层膜结构后,MDCK-MDR1 细胞间连接紧密,细胞数量达到峰值。H 组在第 5 天时出现细胞成团现象(图 1)。

2.2 各组 MDCK-MDR1 细胞增殖数量比较

各组 MDCK-MDR1 细胞的增殖数量均呈现先上升后下降的趋势,L、M 和 H 组的细胞数量分别在第 5、4、3 天时达到峰值。重复测量设计方差分析结果显示,时间、组别、时间和组别交互作用对 MDCK-MDR1 细胞的增殖数量均有显著影响($F_{\text{时间}} = 41.133$, $F_{\text{组别}} = 29.385$, $F_{\text{时间} \times \text{组别}} = 13.211$, $P < 0.05$)。在细胞生长早期(1~3 d),H 组的 MDCK-MDR1 细胞增殖数量明显高于 L 组以及 M 组($F = 26.241 \sim 34.645$, $P < 0.05$)。在细胞生长的中晚期(5~7 d),H 组 MDCK-MDR1 细胞增殖数量明显低于 L 组和 M 组($F = 32.256 \sim 41.778$, $P < 0.05$)。见表 1。

2.3 各组 MDCK-MDR1 细胞 TEER 值比较

各组 MDCK-MDR1 细胞的 TEER 值在第 1~5 天时均随培养时间的延长而增加,并于第 6 天时基本趋于稳定,达到 $300 \Omega \cdot \text{cm}^2$ 。重复测量设计的方差分析结果显示,时间、组别、时间和组别交互作用对 MDCK-MDR1 细胞的 TEER 值均具有显著影响 ($F_{\text{时间}} = 26.784, F_{\text{组别}} = 31.247, F_{\text{时间} \times \text{组别}} = 25.773, P < 0.05$)。与 M 组和 H 组相比, L 组的 TEER 值在第 5 天显著增高 ($F = 13.621, P < 0.05$),且最快达到 $300 \Omega \cdot \text{cm}^2$ 左右。在第 6~7 天时,各组的 TEER 值进行比较,其差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 2。

2.4 MDCK-MDR1 细胞单层通透性的验证

本研究绘制的不同浓度荧光黄标准曲线为 $Y = 674693X + 720.86, R^2$ 为 0.999 7。根据各组 MDCK-MDR1 细胞不同培养时间细胞的生长形态、生长曲线和 TEER 值结果可以发现, L 组细胞在接种第 5 天时吸光度值达到峰值,且成团死亡的细胞数较少, TEER 值在第 5~7 天趋于稳定,故认为 MD-

CK-MDR1 细胞形成单层膜结构的最佳接种浓度为 $1.0 \times 10^8 / \text{L}$,最佳的培养时间为第 5 天。在此条件下进行的荧光黄转运实验,测得的 0.5 h 和 1.0 h 时 BL 侧荧光强度分别为 126 ± 17 和 $382 \pm 35, P_{\text{app}} = 4.27 \times 10^{-7} \text{ cm/s}$, 低于 $5.0 \times 10^{-7} \text{ cm/s}$,模型验证成功,构建的 MDCK-MDR1 细胞单层膜结构的通透性符合通透性实验的要求,能够用于模拟口服药物吸收和转运机制的研究。

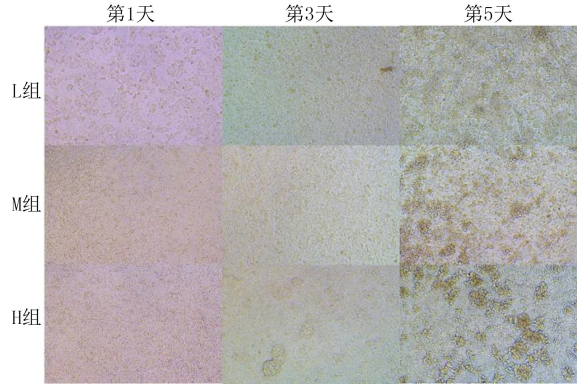


图 1 各组 MDCK-MDR1 细胞培养不同时间时的细胞形态观察(20 倍)

表 1 各组 MDCK-MDR1 细胞第 1~7 天 A 值比较 ($A, \bar{x} \pm s$)

组别	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天	第 6 天	第 7 天
L 组	0.415±0.031	0.457±0.024	0.614±0.027	0.727±0.025	1.003±0.027	0.791±0.033	0.714±0.032
M 组	0.498±0.037	0.732±0.031	0.913±0.074	1.053±0.033	0.846±0.035	0.723±0.029	0.572±0.028
H 组	0.571±0.013	0.882±0.033	1.001±0.065	0.811±0.031	0.568±0.060	0.449±0.071	0.425±0.058

表 2 各组 MDCK-MDR1 细胞第 1~7 天 TEER 值比较 ($\Omega \cdot \text{cm}^2, \bar{x} \pm s$)

组别	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天	第 6 天	第 7 天
L 组	80.084±8.456	123.314±11.267	171.824± 3.762	241.866± 4.414	309.104± 6.914	300.771±29.035	302.869±11.680
M 组	79.754±8.607	96.996± 5.985	138.989±12.849	179.414± 9.913	211.919± 7.301	301.101± 4.528	304.814± 5.857
H 组	75.711±6.786	102.606±10.650	154.664± 8.454	195.914±13.096	251.849±14.647	305.061± 6.513	305.456± 8.419

3 讨 论

口服是临床中首选的给药途径,与其他给药途径相比,具有给药方式简便以及患者依从性好等优点^[9-10]。药物在肠道内的吸收速度及吸收程度是影响药物生物利用度的重要因素。药物在胃肠道的吸收途径主要有以下几种:①跨细胞途径:药物借助其脂溶性或细胞膜上的载体穿过细胞被吸收,包括被动转运和主动转运两种机制;②细胞旁途径:是水溶性小分子吸收的重要途径,属于被动转运;③内吞:药物吸附在细胞膜上,通过膜的凹陷进入细胞形成小泡被吸收;④经派伊尔结(PPs)上的 M 细胞吸收到淋巴循环:微粒和一些抗原性物质被 M 细胞摄取以后转运至 PP,被 PP 内的巨噬细胞吞噬,经淋

巴循环进入血液完成吸收过程。此外,胃肠黏膜的通透性、药物的溶解度、代谢的稳定性、pH 值、胃肠道表面积、吸收以及外排转运体的活性等因素,也均会影响到药物的口服生物利用度。人克隆结肠腺癌(Caco-2)细胞和 MDCK 细胞模型是目前药物吸收渗透性研究应用最多的模型^[11-12],但 Caco-2 细胞缺少黏液层,培养周期较长(21 d),MDCK 细胞表达转运蛋白的水平低且来源于动物^[13]。与 Caco-2 细胞和 MDCK 细胞相比较,MDCK-MDR1 细胞能够高效表达 P-糖蛋白^[14-15],实验成本低,培养周期短(3~5 d),结果重现性好^[16-17]。MDCK-MDR1 细胞在体外培养时能进行形态和功能的分化,被认为是研究口服药物前期筛选、营养素与毒素吸收最好细胞模型之一。虽然 MDCK-MDR1 细胞模型具备许

多优势,但目前对于构建该模型时 MDCK-MDR1 细胞接种的浓度和培养时间并未达成一致。

本研究通过在倒置显微镜下面观察 MDCK-MDR1 细胞生长形态、绘制细胞的生长曲线、测定 TEER 值评价细胞单层膜结构的完整性来选择最佳的 MDCK-MDR1 细胞接种浓度和培养时间。后续通过荧光黄转运实验验证 MDCK-MDR1 细胞单层膜的通透性。本研究选取了 MDCK-MDR1 细胞的 3 种接种浓度,各组细胞接种早期生长迅速,吸光度值和 TEER 值显著升高,随后呈现趋于稳定的趋势,其中 H 组的吸光度值最早达到峰值,但是由于培养基中维持细胞生长的营养物质减少,代谢产物增加,细胞因为能量耗竭和代谢紊乱出现密度抑制,最终细胞停止分裂,凋亡增加,吸光度值降低。各组 MDCK-MDR1 细胞 TEER 值均随培养时间延长而增加,于第 6 天时基本趋于稳定,达到 $300 \Omega \cdot \text{cm}^2$ 左右,其中 L 组细胞的 TEER 值在 1~3 d 增加缓慢,4~5 d 增长迅速,第 5 天达到 $300 \Omega \cdot \text{cm}^2$ 后基本稳定,并保持稳定至第 7 天,M 组和 H 组细胞的 TEER 值在 1~4 d 增长稍平缓,5~6 d 快速增长,在第 6 天达到 $300 \Omega \cdot \text{cm}^2$ 。一般情况下,跨膜电阻值约为 $200 \sim 1\,000 \Omega \cdot \text{cm}^2$ 时,细胞单层膜结构完整性好^[18-19],致密度越高,TEER 值也就越大^[20-22]。结合上述情况,本研究确定的 MDCK-MDR1 细胞形成单层膜结构的最佳接种浓度为 $1.0 \times 10^8 / \text{L}$,最佳培养时间为 5 d。

通过荧光黄转运实验对 $1.0 \times 10^8 / \text{L}$ 的 MDCK-MDR1 细胞接种浓度、培养 5 d 的单层膜结构进行验证。结果显示,从培养板 AP 侧至 BL 侧的荧光黄 Papp 为 $4.27 \times 10^{-7} \text{ cm/s}$,低于通透性实验规定的 $5.0 \times 10^{-7} \text{ cm/s}$,证明该细胞单层膜结构完整,连接紧密性良好,且符合通透性实验的要求。

综上所述,MDCK-MDR1 细胞体外吸收模型与细胞接种密度、构建时间密切相关。在本实验室条件下,MDCK-MDR1 细胞接种浓度为 $1.0 \times 10^8 / \text{L}$,连续培养 5 d,显微镜下观察 MDCK-MDR1 细胞形态良好,生长迅速,TEER 值趋于稳定,具有较低的荧光黄渗透率,证明 MDCK-MDR1 细胞形成单层膜结构且完整性好,可以作为模拟药物的体外肠道吸收转运模型。

作者声明:韩帅、闫茹冰、梁永新参与了研究设计;韩帅、金婷婷、张洁、褚海辰参与了论文的写作和修改。所有作者均阅读并同意发表该论文。所有作者均声明不存在利益冲突。

[参考文献]

- [1] SHANG H H, SUN Y H, WANG Z, et al. Intestinal absorption mechanism of rotundic acid: Involvement of P-gp and OATP2B1[J]. J Ethnopharmacol, 2022,289:115006.
- [2] BRAUN A, HÄMMERLE S, SUDA K, et al. Cell cultures as tools in biopharmacy[J]. Eur J Pharm Sci, 2000,11(Suppl 2): S51-S60.
- [3] WILLIAMS J, SIRAMSHETTY V, NGUYÉN D T, et al. Using in vitro ADME data for lead compound selection: An emphasis on PAMPA pH 5 permeability and oral bioavailability[J]. Bioorg Med Chem, 2022,56:116588.
- [4] WANG M H, LI Z L, ZHAO C H, et al. Effect of subculture ratio on culture of MDCK cells[J]. Chinese Journal of Biologics, 2020,11:1230-1235.
- [5] LI X, HU J P, WANG B L, et al. Inhibitory effects of herbal constituents on P-glycoprotein in vitro and in vivo: Herb-drug interactions mediated via P-gp[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2014,275(2):163-175.
- [6] LIU Z H, WEN X Z, WANG G J, et al. Involvement of P-gp on reversing multidrug resistance effects of 23-hydroxybetulinic acid on chemotherapeutic agents[J]. Front Pharmacol, 2021,12:796745.
- [7] ZHANG Y C, BENET L Z. Characterization of P-glycoprotein mediated transport of K02, a novel vinylsulfone peptidomimetic cysteine protease inhibitor, across MDR1-MDCK and caco-2 cell monolayers[J]. Pharm Res, 1998,15(10):1520-1524.
- [8] 吕晓君,曹易丹,何开勇. Caco-2 细胞体外吸收模型的建立及验证[J]. 医药导报, 2018,37(11):1311-1315.
- [9] LENNERNÄS H. Regional intestinal drug permeation: Biopharmaceutics and drug development[J]. Eur J Pharm Sci, 2014,57:333-341.
- [10] DAHLGREN D, ROOS C, LUNDQVIST A, et al. Regional intestinal permeability of three model drugs in human[J]. Mol Pharm, 2016,13(9):3013-3021.
- [11] CHARMAN W N, PORTER C J H, MITHANI S, et al. Physicochemical and physiological mechanisms for the effects of food on drug absorption: The role of lipids and pH[J]. J Pharm Sci, 1997,86(3):269-282.
- [12] AVDEEF A. Absorption and drug development: Solubility, permeability, and charge state[M]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2012.
- [13] PUTNAM W S, PAN L, TSUTSUI K, et al. Comparison of bidirectional cephalixin transport across MDCK and caco-2 cell monolayers: Interactions with peptide transporters[J]. Pharm Res, 2002,19(1):27-33.
- [14] AVDEEF A. The rise of PAMPA[J]. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2005,1(2):325-342.
- [15] SUN H M, NGUYEN K, KERNS E, et al. Highly predictive and interpretable models for PAMPA permeability[J]. Bioorg Med Chem, 2017,25(3):1266-1276.

- [4] 中国临床肿瘤学会指南工作委员会组织. 中国临床肿瘤学会 (CSCO) 结直肠癌诊疗指南-2021[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2021;141.
- [5] FUKUGAITI M H, IGNACIO A, FERNANDES M R, et al. High occurrence of *Fusobacterium nucleatum* and *Clostridium difficile* in the intestinal microbiota of colorectal carcinoma patients[J]. *Braz J Microbiol*, 2015,46(4):1135-1140.
- [6] JENKE A C, POSTBERG J, MARIEL B, et al. S100A12 and hBD2 correlate with the composition of the fecal microflora in ELBW infants and expansion of *E. coli* is associated with NEC [J]. *Biomed Res Int*, 2013, 2013:150372.
- [7] RINTTILÄ T, KASSINEN A, MALINEN E, et al. Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR[J]. *J Appl Microbiol*, 2004,97(6): 1166-1177.
- [8] 石远凯, 孙燕主编. 临床肿瘤内科手册(第 6 版)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2014:938.
- [9] XIA C F, DONG X S, LI H, et al. Cancer statistics in China and United States, 2022: Profiles, trends, and determinants [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2022,135(5):584-590.
- [10] WANG Q, LI S B, QIAO S M, et al. Changes in T lymphocyte subsets in different tumors before and after radiotherapy: A meta-analysis[J]. *Front Immunol*, 2021,12:648652.
- [11] SERNA G, RUIZ-PACE F, HERNANDO J, et al. *Fusobacterium nucleatum* persistence and risk of recurrence after preoperative treatment in locally advanced rectal cancer[J]. *Ann Oncol*, 2020,31(10):1366-1375.
- [12] YUN J W, LEE S, KIM H M, et al. A novel type of blood biomarker: Distinct changes of cytokine-induced STAT phosphorylation in blood T cells between colorectal cancer patients and healthy individuals[J]. *Cancers (Basel)*, 2019,11(8):1157.
- [13] LOO S W, PUI T S. Cytokine and cancer biomarkers detection: The dawn of electrochemical paper-based biosensor[J]. *Sensors (Basel)*, 2020, 20(7):1854.
- [14] FU T, DAI L J, WU S Y, et al. Spatial architecture of the immune microenvironment orchestrates tumor immunity and therapeutic response[J]. *J Hematol Oncol*, 2021,14(1):98.
- [15] ZHOU J Y, ALVAREZ C A, COBB B A. Integration of IL-2 and IL-4 signals coordinates divergent regulatory T cell responses and drives therapeutic efficacy[J]. *eLife*, 2021, 10: e57417.
- [16] 张慧秋, 刘丽, 刘玲, 等. 严重多发伤患者外周血 Th1/Th2 细胞因子水平变化及其对医院感染的预测价值分析[J]. *中国感染与化疗杂志*, 2022,22(4):418-424.
- [17] MANTOVANI A, BARAJON I, GARLANDA C. IL-1 and IL-1 regulatory pathways in cancer progression and therapy [J]. *Immunol Rev*, 2018, 281(1):57-61.
- [18] RAY A L, BERGGREN K L, RESTREPO CRUZ S, et al. Inhibition of MK2 suppresses IL-1 β , IL-6, and TNF- α -dependent colorectal cancer growth[J]. *Int J Cancer*, 2018,142(8): 1702-1711.
- [19] 慕莹, 魏晓芳, 王晔, 等. 恶性肿瘤患者治疗前后外周血淋巴细胞亚群的变化分析[J]. *生物医学工程与临床*, 2018,22(2): 191-195.
- [20] SOMMER F, ANDERSON J M, BHARTI R, et al. The resilience of the intestinal microbiota influences health and disease [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2017,15(10):630-638.
- [21] BRENNAN C A, GARRETT W S. *Fusobacterium nucleatum*—Symbiont, opportunist and oncobacterium [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2019,17(3):156-166.
- [22] KOSTIC A D, CHUN E, ROBERTSON L, et al. *Fusobacterium nucleatum* potentiates intestinal tumorigenesis and modulates the tumor-immune microenvironment[J]. *Cell Host Microbe*, 2013,14(2):207-215.
- [23] RUBINSTEIN M R, WANG X W, LIU W, et al. *Fusobacterium nucleatum* promotes colorectal carcinogenesis by modulating E-cadherin/ β -catenin signaling via its FadA adhesin [J]. *Cell Host Microbe*, 2013,14(2):195-206.
- [24] LIN S, SHEN Y F. The efficacy and safety of probiotics for prevention of chemoradiotherapy-induced diarrhea in people with abdominal and pelvic cancer: A systematic review and meta-analysis based on 23 randomized studies[J]. *Int J Surg*, 2020,84:69-77. (本文编辑 耿波 厉建强)

(上接第 148 页)

- [16] OJA M, MARAN U. Quantitative structure-permeability relationships at various pH values for acidic and basic drugs and drug-like compounds[J]. *SAR QSAR Environ Res*, 2015,26 (7-9):701-719.
- [17] KERNS E H, DI L, PETUSKY S, et al. Combined application of parallel artificial membrane permeability assay and Caco-2 permeability assays in drug discovery[J]. *J Pharm Sci*, 2004,93(6):1440-1453.
- [18] MIYAKE M, KOGA T, KONDO S, et al. Prediction of drug intestinal absorption in human using the Ussing chamber system: A comparison of intestinal tissues from animals and humans[J]. *Eur J Pharm Sci*, 2017,96:373-380.
- [19] ZUO Z, ZHANG L, ZHOU L M, et al. Intestinal absorption of hawthorn flavonoids: In vitro, in situ and in vivo correlations[J]. *Life Sci*, 2006,79(26):2455-2462.
- [20] TAUB M E, PODILA L, ELY D, et al. Functional assessment of multiple P-glycoprotein (P-gp) probe substrates: Influence of cell line and modulator concentration on P-gp activity[J]. *Drug Metab Dispos*, 2005,33(11):1679-1687.
- [21] WANG Q, RAGER J D, WEINSTEIN K, et al. Evaluation of the MDR-MDCK cell line as a permeability screen for the blood-brain barrier[J]. *Int J Pharm*, 2005,288(2):349-359.
- [22] HUBATSCH I, RAGNARSSON E G E, ARTURSSON P. Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers[J]. *Nat Protoc*, 2007,2(9): 2111-2119. (本文编辑 耿波 厉建强)