

短双歧杆菌对小鼠子宫内膜异位症的作用研究

曹玉珍, 陈玉影, 黄碧洪, 冯慧仪, 马菘, 马颖*

南方医科大学珠江医院妇产医学中心, 广东广州 510282

[中图分类号] R711.71 [文献标志码] A [DOI] 10.11855/j.issn.0577-7402.0360.2025.1110

[声明] 本文所有作者声明无利益冲突

[引用本文] 曹玉珍, 陈玉影, 黄碧洪, 等. 短双歧杆菌对小鼠子宫内膜异位症的作用研究[J]. 解放军医学杂志, 2026, 51(1): 86-93.

[收稿日期] 2025-03-02 [录用日期] 2025-04-10 [上线日期] 2025-11-10

[摘要] **目的** 探究短双歧杆菌(*B. breve*)缓解小鼠子宫内膜异位症(EM)的效果。**方法** 回顾性选取2021年6月—2022年8月南方医科大学珠江医院收治的EM患者47例, 其中早期EM 21例、晚期EM 26例; 采用qPCR检测早、晚期EM患者粪便中3种常见双歧杆菌含量; 采用CCK-8法、划痕实验、Transwell实验检测不同浓度*B. breve*上清液对小鼠子宫内膜间质细胞(ESCs)增殖与迁移能力的影响。将16只雌性小鼠随机分为对照组与a、b、c组, 每组4只; 对照组不做特殊处理, a、b、c组采用同种异体腹腔内注射子宫内膜碎片法建立小鼠EM模型; 另外, a组于造模后7d、b组于造模同时、c组于造模前1周分别接受*B. breve*灌胃。造模后21d, 比较各组小鼠EM病灶最大重量与数目, HE染色观察小鼠EM组织病理变化, qPCR检测小鼠EM组织炎症因子白细胞介素(IL)-6、IL-8、肿瘤坏死因子(TNF)- α 、IL-1 β 、IL-17表达情况。**结果** qPCR检测结果显示, 与早期EM患者比较, 晚期EM患者粪便中*B. breve*含量明显降低(0.705 \pm 0.828 vs. 1.715 \pm 1.685, $P<0.05$); CCK-8法检测结果显示, *B. breve*上清液浓度 $>20\%$ 时, ESCs细胞几乎完全失去增殖活性; Transwell实验和细胞划痕实验结果显示, 与对照组比较, 1%、10% *B. breve*上清液处理的ESCs细胞迁移成功数明显减少($P<0.001$)。 *B. breve*灌胃后, a、b、c组小鼠EM病灶最大重量和数目较对照组减小, c组小鼠EM病灶最大重量和数目小于b组, 而b组小鼠EM病灶最大重量和数目小于a组, 差异均有统计学意义($P<0.05$); HE染色结果显示, 小鼠EM病灶中均可见明显的腺体结构; qPCR检测结果显示, 与对照组比较, a组小鼠EM病灶中IL-6表达水平明显下降($P<0.05$), b组小鼠EM病灶中IL-8表达水平明显下降($P<0.05$), c组小鼠EM病灶中TNF- α 、IL-8、IL-6表达水平明显下降($P<0.05$ 或 $P<0.05$), 各组IL-1 β 、IL-17表达水平差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** *B. breve*可抑制ESCs细胞增殖和迁移, 降低EM组织中促炎因子水平, 抑制EM的发展; *B. breve*干预对EM可能有预防作用。

[关键词] 子宫内膜异位症; 肠道微生物; 短双歧杆菌; 炎症因子; 子宫内膜间质细胞

Effect of *Bifidobacterium breve* on the endometriosis in mice

Cao Yu-Zhen, Chen Yu-Ying, Huang Bi-Qi, Feng Hui-Yi, Ma Song, Ma Ying

Department of Obstetrics and Gynecology, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510282, China

*Corresponding author, E-mail: mayingwuzhuoyi@126.com

This work was supported by the Natural Science Foundation of Guangdong Province (2022A1515011880, 2023A1515011688), and the President Foundation of Zhujiang Hospital, Southern Medical University (yzjj2022ms18)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of *Bifidobacterium breve* (*B. breve*) on the alleviation of endometriosis (EM) in mice. **Methods** A retrospective analysis was performed on 47 EM patients admitted to Zhujiang Hospital of Southern Medical University from June 2021 to August 2022, including 21 patients with early-stage EM and 26 patients with late-stage EM. The fecal content of three common *Bifidobacterium* species in these patients was measured using qPCR. The effects of different concentrations of *B. breve* supernatant on the proliferation and migration of human endometrial stromal cells (ESCs) were assessed using the CCK-8 assay, scratch assay, and Transwell assay. Sixteen female mice were randomly divided into a control group and groups A, B, and C, with four mice in each group. The control group received no special treatment, while groups A, B, and C were used to establish a mouse EM

[基金项目] 广东省自然科学基金(2022A1515011880, 2023A1515011688); 南方医科大学珠江医院院长基金(yzjj2022ms18)

[作者简介] 曹玉珍, 硕士研究生, 主要从事妇科疾病与肠道菌群方面的研究

[通信作者] 马颖, E-mail: mayingwuzhuoyi@126.com

model *via* allogeneic intraperitoneal injection of endometrial fragments. Additionally, *B. breve* was administered by gavage to group A at 7 days after modeling, to group B simultaneously with modeling, and to group C 1 week before modeling. Twenty-one days after modeling, the maximum weight and number of EM lesions in each group were compared. Pathological changes in mouse EM tissues were observed using HE staining, and the expression levels of inflammatory factors [interleukin-6 (IL-6), IL-8, IL-1 β , and IL-17, tumor necrosis factor- α (TNF- α)] in mouse EM tissues were detected using qPCR. **Results** qPCR results showed that the fecal content of *B. breve* in late-stage EM patients was significantly lower than that in early-stage EM patients (0.705 ± 0.828 vs. 1.715 ± 1.685 , $P<0.05$). The CCK-8 assay results indicated that ESCs almost completely lost their proliferative activity when treated with *B. breve* supernatant at concentrations $>20\%$. Transwell and scratch assay results showed that, compared with control group, the number of successfully migrated ESCs treated with 1% and 10% *B. breve* supernatant was significantly reduced ($P<0.001$). After *B. breve* gavage, the maximum weight and number of EM lesions in groups A, B, and C were reduced compared to those in control group. The maximum weight and number of EM lesions in group C were smaller than those in group B, and the maximum weight and number of EM lesions in group B were smaller than those in group A, with statistically significant differences ($P<0.05$). HE staining results showed that obvious glandular structures were observed in the EM lesions of mice. q-PCR results revealed that, compared with control group, the expression level of IL-6 in the EM lesions of group A was significantly decreased ($P<0.05$), the expression level of IL-8 in the EM lesions of group B was significantly decreased ($P<0.05$), and the expression levels of TNF- α , IL-8, and IL-6 in the EM lesions of group C were significantly decreased ($P<0.05$ or $P<0.01$). However, no statistically significant differences were observed in the expression levels of IL-1 β and IL-17 among the groups ($P>0.05$). **Conclusions** *B. breve* can inhibit the proliferation and migration of ESCs, reduce the levels of pro-inflammatory factors in EM tissues, and suppress EM progression. *B. breve* intervention may have a preventive effect against EM.

[Key words] endometriosis; gut microbiota; *Bifidobacterium breve*; inflammatory factors; endometrial stromal cells

子宫内膜异位症(endometriosis, EM)是常见的妇科疾病,全球约10%的育龄女性受其困扰;其主要症状包括慢性盆腔疼痛、痛经、性交痛和不孕,严重影响患者的生活质量和生育能力^[1-2]。EM的确切病因尚不明确,研究显示其与激素、环境、炎症、免疫等有关^[3]。EM的治疗主要包括药物和手术;因其高复发性,通常需长期使用激素药物,往往产生诸多不良反应;因此,迫切需要探索新的治疗策略和预防措施。近年来,肠道菌群与妇科疾病的关系成为研究热点^[4]。研究显示,肠道菌群与EM存在潜在的相关性,可能通过干扰机体正常的免疫功能等方式对“肠-子宫轴”产生影响^[5]。其中,肠道的主要益生菌双歧杆菌属的丰度在EM患者中较健康人明显降低,本课题组前期研究结果也提示其可能在EM的发生发展中发挥重要作用^[6]。然而,探究不同种的双歧杆菌与EM相关性的研究少见。本研究探讨短双歧杆菌(*Bifidobacterium breve*, *B. breve*)对小鼠EM病灶的影响及其对子宫内膜间质细胞(endometrial stromal cells, ESCs)增殖和迁移的作用,旨在为后续的机制探索研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器 粪便细菌DNA提取试剂盒(DP302-02,北京天根生物科技有限公司); AceQ qPCR SYBR Green PCR master mix(Q111-02,南京诺唯赞生物科技有限公司); EvoM-MLV反转录试剂预混液(AG11706,广州瑞真生物技术有限公司); 双歧杆

菌培养基干粉(BNCC352254,北京北纳创联生物技术研究院); I型胶原酶[40507ES60,翌圣生物科技(上海)股份有限公司]; DMEM/F-12培养液(C11330500BT,美国赛默飞世尔科技有限公司); 胎牛血清[FSP500,依科赛生物科技(苏州)有限公司]; 胰蛋白酶(C0201-500ML,上海碧云天生物技术有限公司); CCK-8试剂盒(K1018-5,美国艾普拜生物科技有限公司); Transwell小室(353097,美国康宁公司); 实时荧光定量PCR(qPCR)仪(Quantstudio 6)、紫外分光光度计(NanoDrop One)(美国赛默飞世尔科技公司); 离心机(5424R,德国Eppendorf公司); 酶标仪(SYNERGY h1,美国BioTek公司)。

1.2 人EM组织与标本的获取 根据纳入与排除标准(表1),回顾性选取2021年6月—2022年8月因子宫肌瘤、不孕症等良性妇科疾病在南方医科大学珠江医院妇产科行宫腹腔镜手术的患者47例;其中美国生殖医学学会(American Society for Reproductive Medicine, ASRM)分期I—II期为早期EM患者(EMA, $n=21$), ASRM分期III—IV期为晚期EM患者(EMB, $n=26$)。术前收集患者粪便,分装无菌离心管中置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。手术时在无菌操作下迅速刮取内膜,置于预冷的PBS液中并迅速转运至实验室,行原代细胞分离及培养。本研究获南方医科大学珠江医院伦理委员会审批(2021-KY-035-02)。

1.3 实验动物 24只C57BL/6雌性小鼠,包括16只受体鼠,8只供体鼠,购自珠海百试通生物科技有限公司[实验动物生产许可证号:SCXK(粤)2025-0051],

表1 研究对象纳入与排除标准

Tab.1 Inclusion and exclusion criteria for the study participants

纳入标准	排除标准
(1)女性, 年龄18~45岁	(1)疝
(2)月经周期21~35 d	(2)恶性肿瘤
(3)不孕	(3)腹膜炎或盆腔炎
(4)继发性痛经、进行性加重	(4)全身或局部急性炎症
(5)慢性下腹痛, 月经期加重	(5)BMI≤18.5 kg/m ² 或BMI≥28 kg/m ²
(6)卵巢巧克力囊肿	(6)存在腹腔镜手术的绝对或相对禁忌证
(7)无急性或慢性盆腔炎病史	(7)基因治疗、干细胞治疗或骨髓移植病史
(8)术前6个月未全身或局部使用激素	(8)精神、人格障碍或精神活性物质滥用
(9)术前1个月未全身或局部使用抗生素	(9)免疫治疗、过敏性或自身免疫性疾病
(10)腹腔镜术中及病理证实或排除盆腔子宫内异位症	(10)肺结核、慢阻肺、慢性肝肾疾病、糖尿病、甲亢、心脏或大血管疾病等
(11)受试者充分理解研究意义	

于南方医科大学珠江医院实验动物中心饲养。小鼠的饲养及实验操作均参照实验动物护理指南, 本研究动物实验方案获南方医科大学珠江医院动物伦理委员会审批(LAEC-2024-043)。

1.4 方法

1.4.1 qPCR检测EM患者粪便中*B. breve*、长双歧杆菌(*Bifidobacterium longum*, *B. longum*)、婴儿双歧杆菌(*Bifidobacterium infantis*, *B. infantis*)含量 使用粪便DNA提取试剂盒提取EM粪便样本中细菌DNA; 通过qPCR定量分析双歧杆菌属3种常见菌种^[7]——*B. breve*、*B. longum*^[8]、*B. infantis*^[9]含量。qPCR反应体系见附表1; 反应流程: 初始变性, 95℃, 5 min; 变性, 95℃, 30 s; 退火引物特异性温度下, 15 s; 延伸, 72℃, 30 s; 共循环36次^[10]。相对定量采用2^{-ΔΔCt}法表示, 16S rRNA为内参。引物序列: *B. breve*, 上游GAGAAGGCTGAGGCCGT, 下游GGCAGAGAACGAACCTT; *B. longum*, 上游GCCGACGGAAGCATT, 下游CGGAACCTCACCGCATT; *B. infantis*, 上游CCTCTGATGGCAACCACTT, 下游TGCGGGCTATGACCAATTCA; 16S rRNA, 上游GIGSTGCA YGGYTGTCTGCA, 下游ACGTCRTCCMCACCTTCC TC。

1.4.2 *B. breve*的培养与菌上清液制备 *B. breve*冻干粉(菌种编号BNCC186529, 购自信阳市纳创联生物科技有限公司), 于37℃、厌氧条件下培养, 在培养过程中, 单菌落大小、形状、颜色、质地、光泽等均无差异。

取5.1 g双歧杆菌培养基干粉及1.5 g琼脂粉, 溶于100 ml蒸馏水中, 115℃高温灭菌20 min, 倒入细菌培养皿中, 紫外线杀菌30 min, 冷却备用, 即为双歧杆菌固体培养基。灭菌枪头吸取1 ml无菌生理盐水滴入装有*B. breve*冻干粉的安瓿瓶内, 使其充分

溶解后, 吸取0.4 ml菌体悬浮液, 分装两份于双歧杆菌固体培养基表面并涂布均匀, 置于37℃、厌氧条件下培养48~72 h。通过微生物质谱鉴定系统进行菌种鉴定。接种环取已培养48 h的*B. breve*菌落, 1 ml无菌生理盐水稀释, 调整*B. breve*菌数至10⁸ CFU/200 μl, 即为菌悬液(酶标仪测得OD₆₀₀=1时, 进行稀释涂布计数菌数为10⁸ CFU/ml)。吸取100 μl上述活菌悬液于3 ml双歧杆菌液体培养基中培养48 h, 10 000 r/min离心15 min, 用0.22 μm微孔滤膜过滤上清液, 即为*B. breve*上清液^[4]; 使用无血清培养基稀释至不同浓度(1%、3%、5%、7%、10%、20%、50%)。

1.4.3 ESCs的获取与培养 取得子宫内膜组织后, PBS漂洗3次, 使用无菌眼科剪将其剪成絮状碎块。将组织碎块与2倍体积的0.25% I型胶原酶溶液混合, 于37℃恒温箱中震荡消化40~60 min。加入3倍体积DMEM/F-12培养液终止消化。细胞溶液依次使用150 μm与38 μm细胞过滤网过滤, 并用培养液冲洗细胞网, 收集细胞溶液进行离心(1000 r/min, 5 min), 弃上清液, 即得ESCs。

将细胞置于5~6 ml完全培养基(90% DMEM/F-12培养液、10%胎牛血清、1% 0.25%青霉素-链霉素双抗)中重悬混匀, 按密度1×10⁵个/ml接种于25 cm²细胞培养瓶内, 于37℃、5% CO₂培养箱中孵育并进行传代培养^[11]。

1.4.4 CCK-8法检测ESCs增殖能力 ESCs接种于96孔板中(1×10⁴个/孔)培养24 h, 实验组分别加入不同浓度的*B. breve*上清液(1%、3%、5%、7%、10%、20%、50%)与细胞共培养, 对照组则使用无血清培养基与细胞共培养^[12]。每个处理设置3个复孔, 于常规培养箱中培养24 h, 每孔避光加入含10% CCK-8溶液的DMEM/F-12培养液, 并设置无细胞的空白对照孔, 孵育1 h, 用酶标仪检测450 nm波长处的吸

光度。

1.4.5 Transwell 实验检测 ESCs 迁移能力 下室加入 600 μl 含有 *B. breve* 上清液(0、1%、10%)的无血清培养基, ESCs 以 2×10^5 个/ml 的密度接种于小室上室中(约 20 000 个/孔, 100 μl /孔)培养 48 h, 弃原培养基, 对小室依次进行 PBS 溶液冲洗, 4% 多聚甲醛溶液室温固定细胞 15 min, 0.2% 结晶紫染色 5 min, PBS 溶液冲洗染料, 显微镜下选 5 个视野进行计数拍照, 计数细胞迁移数^[13]。

1.4.6 细胞划痕实验检测 ESCs 迁移能力 接种 ESCs 于 6 孔板中(5×10^5 个/孔)培养 24~48 h。当细胞贴壁覆盖孔板底部 80% 时, 使用 100 μl 移液器吸头在板底部中间垂直划痕, 弃去培养基, PBS 清洗 1 或 2 次。分别加入浓度为 0、1%、10% 的 *B. breve* 上清液与细胞

共培养 0、6、12、24 h, 置于倒置显微镜下拍照。ImageJ 软件测量 24 h 划痕宽度并评估细胞迁移率^[14]。

1.4.7 小鼠分组与 EM 模型制备 16 只受体鼠随机分为对照组和 a、b、c 组, 每组 4 只。采用腹腔注射子宫内膜碎片法构建小鼠 EM 模型。所有受体鼠均使用广谱抗生素(broad-spectrum antibiotics, ABX)处理 7 d, 以消除肠道菌群并构建假无菌小鼠模型^[15]。a、b、c 组小鼠于造模前 7 d 进行雌激素颈后注射, 采用阴道涂片观察小鼠是否处于相同的动情周期(图 1A); 对照组小鼠自造模当天开始 200 $\mu\text{l}/\text{d}$ 生理盐水灌胃; a、b、c 组分别从造模后 7 d、造模第 1 天、造模前 7 d 进行 *B. breve* 悬液(10^8 CFU/200 μl , 每只 200 $\mu\text{l}/\text{d}$)灌胃处理^[16](图 1B)。造模后 21 d 处死并解剖小鼠, 观察并记录 EM 病灶数目及最大重量^[17]。

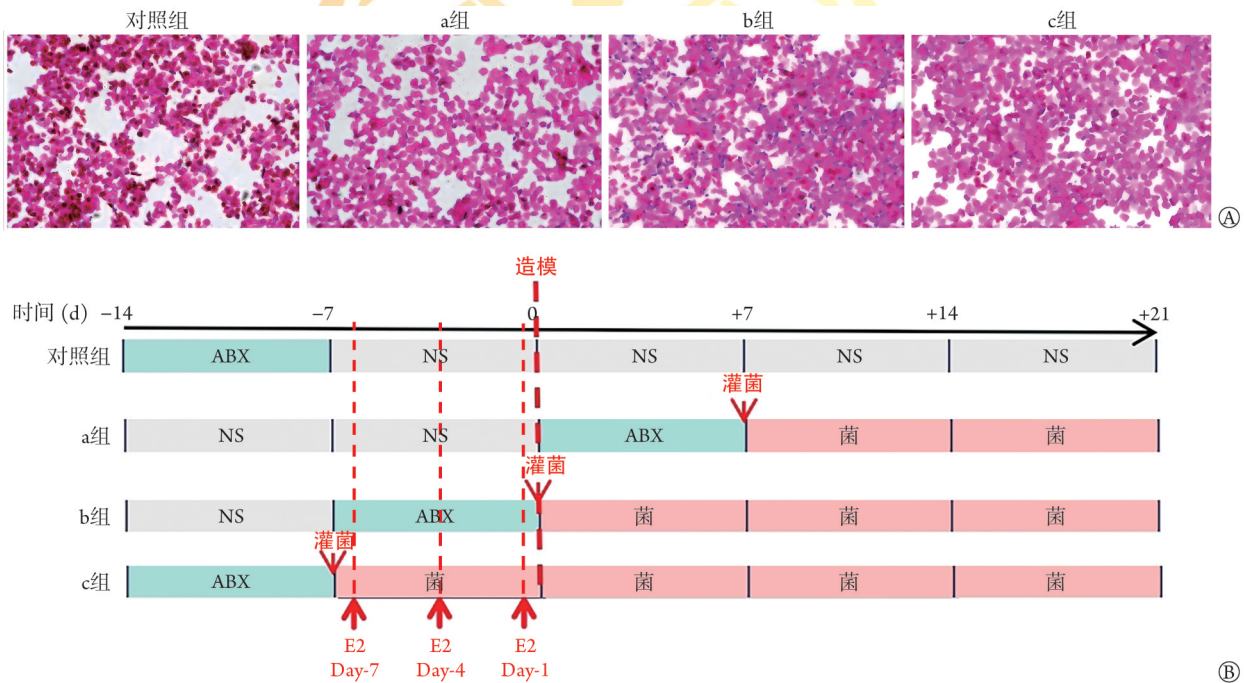


图 1 造模前小鼠阴道涂片(A)与实验操作流程(B)

Fig.1 The estrus phase of vaginal smears in each group of mice before modeling and the experimental procedures
阴道涂片显示各组小鼠均处于动情期。ABX. 广谱抗生素; NS. 无特殊处理; E2. 雌激素; 灌菌. 短双歧杆菌灌胃

1.4.8 HE 染色检测小鼠 EM 病灶 小鼠 EM 组织于 4% 多聚甲醛溶液中固定 24 h, 常规包埋, 0.4 μm 连续切片, HE 染色后于显微镜下观察病灶情况^[18]。

1.4.9 qPCR 检测小鼠 EM 组织中炎症因子表达水平 将小鼠 EM 病灶组织匀浆, 按 Trizol 法提取总 RNA 并测定其浓度; 按照反转录试剂盒说明书反转录合成 cDNA; 使用 SYBR Green PCR 预混液在 qPCR 系统中进行检测, 反应总体积为 20 μl ; 反应条件: 预变性 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 变性 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 退火 55 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 延伸 72 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 共 40 个循环。以 β -actin 为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算白细胞介素(IL)-6、IL-8、肿瘤坏死因子(TNF)- α 、IL-1 β 、IL-17 相对表达水平^[19]。引物序

列: *IL-6*, 上游 CTCCAACAGACCTGTCTATAC, 下游 CCATTGCACAACCTTTTCTCA; *IL-8*, 上游 AGACCTGGAATCAGACAACCTTT, 下游 TCAGTCATATCCTCGAACACAG; *TNF- α* , 上游 ATGTCTCAGCCTCTTCTCATTCC, 下游 GCTTGTCACTCGAATTGAGA; *IL-1 β* , 上游 CACTACAGGCTCCGAGAGAACAAAC, 下游 TGTCGTTGCTTGGTTCTCCTTGTAC; *IL-17*, 上游 TACCTCAACCGTTCACGTC, 下游 TTCATGTGGTGGTCCAGCTT; β -actin, 上游 CTACCTCATGAAGATCCTGACC, 下游 CACAGCTTCTCTTTGATGTCAC。

1.5 统计学处理 采用 GraphPad Prism 10.1.2 软件进

行统计分析。计量资料均符合正态分布,以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析(ANOVA),进一步两两比较采用LSD法^[10]。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 双歧杆菌在EM患者粪便中的差异 qPCR检测结果显示,与早期EM患者比较,晚期EM患者粪便中*B. breve*含量明显降低(0.705 ± 0.828 vs. 1.715 ± 1.685 , $P<0.05$),而婴儿双歧杆菌和长双歧杆菌含量差异无统计学意义(1.289 ± 0.848 vs. 1.613 ± 0.990 , 1.168 ± 0.717 vs. 1.946 ± 1.068 , $P>0.05$)(附图1)。

2.2 *B. breve*上清液干预对ESCs增殖、迁移能力的影响

CCK-8法检测结果显示,不同浓度*B. breve*上清液处理后ESCs增殖活性均受到明显抑制,抑制程度与*B. breve*浓度呈正相关(图2A)。当*B. breve*浓度 $>20\%$ 时,细胞几乎完全失去增殖活性,故选取1%、10%*B. breve*上清液进行后续细胞实验。

Transwell细胞迁移实验结果显示,与对照组比较,1%、10%*B. breve*上清液处理的ESCs迁移数明显减少($P<0.0001$);与1%*B. breve*上清液比较,10%*B. breve*上清液处理的ESCs迁移数明显减少($P<0.0001$,图2B)。

细胞划痕实验结果显示,与对照组比较,1%、10%*B. breve*上清液处理6、12、24 h的细胞迁移率降低($P<0.01$ 或 $P<0.0001$,图2C)。

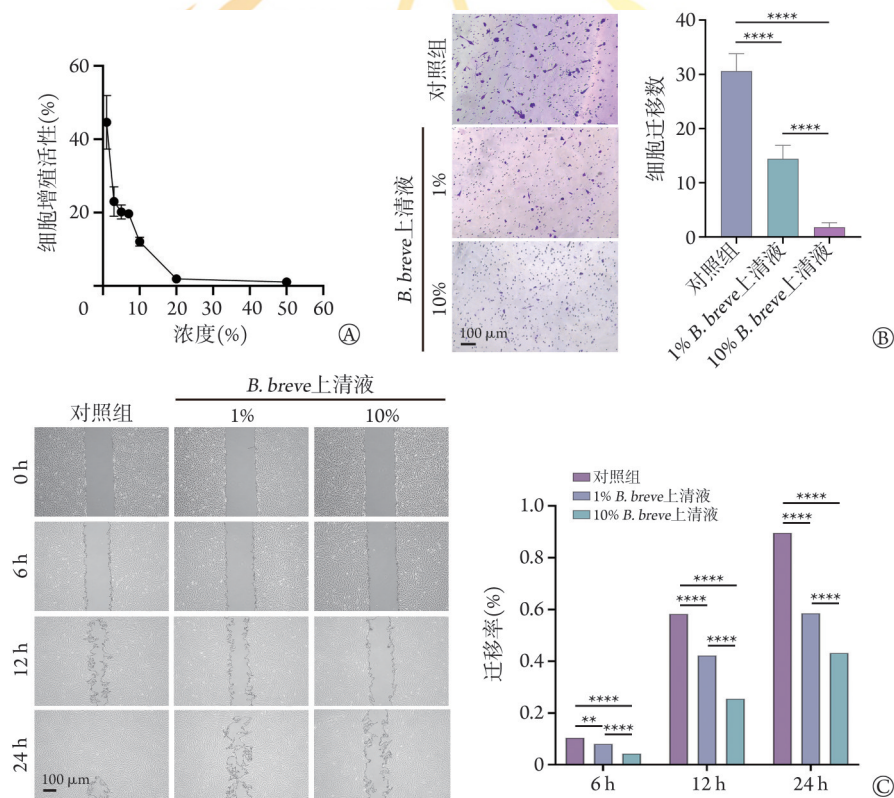


图2 短双歧杆菌(*B. breve*)对子宫内质细胞(ESCs)增殖、迁移的影响

Fig.2 Effects of *Bifidobacterium breve* (*B. breve*) on proliferation and migration of endometrial stromal cells (ESCs)

A. CCK-8法检测细胞增殖活性; B. Transwell实验检测细胞迁移能力; C. 细胞划痕实验检测细胞迁移能力.** $P<0.01$, **** $P<0.0001$

2.3 *B. breve*干预对小鼠EM病灶增长的影响 造模21 d后,小鼠腹腔内EM病灶与腹膜、肠系膜等紧密黏着,并有囊腔形成,局部可见新生血管(图3A)。与对照组比较,a、b、c组的EM病灶最大重量和数目均明显降低($P<0.05$);a、b、c组间EM病灶最大重量和数目比较,a组与b组、b组与c组,以及a组与c组之间均存在统计学差异($P<0.05$,图3B)。HE染色结果显示,各组小鼠EM病灶中均可见明显的腺体结构。对照组病灶呈典型的囊腔结构,而且异形血管更为丰富;而a、b、c组EM病灶内腺体均呈扁

平、萎缩状态(图3C)。

2.4 *B. breve*干预对小鼠EM病灶中炎症因子*TNF- α* 、*IL-8*、*IL-6*、*IL-1 β* 、*IL-17*表达的影响 qPCR检测结果显示,与对照组比较,a组小鼠EM病灶中*TNF- α* 、*IL-8*、*IL-6*、*IL-1 β* 、*IL-17* mRNA表达水平差异无统计学意义($P>0.05$);b组小鼠EM病灶中*IL-8*、*IL-6* mRNA表达水平均明显下降($P<0.05$);c组小鼠EM病灶中*TNF- α* 、*IL-8*、*IL-6* mRNA表达水平均明显下降($P<0.05$ 或 $P<0.05$)。各组间*IL-1 β* 、*IL-17*表达水平比较,差异无统计学意义($P>0.05$,图4)。

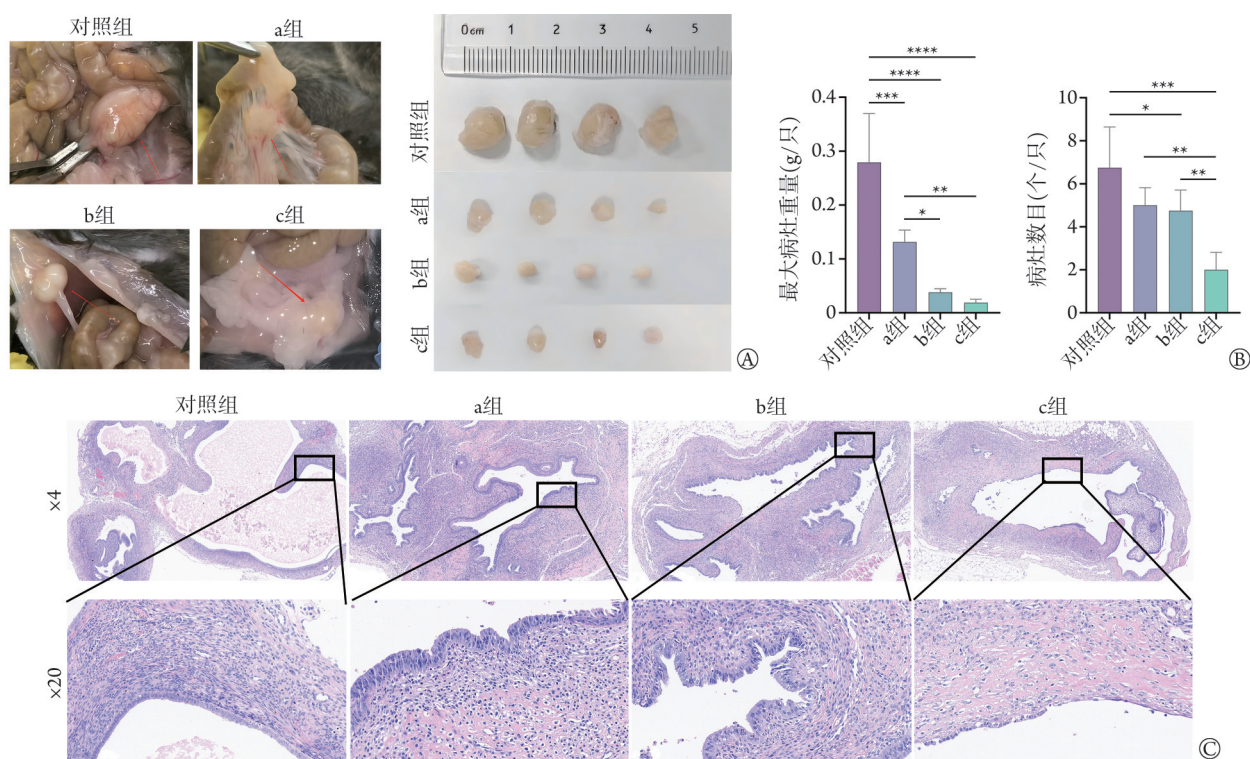


图3 短双歧杆菌灌胃处理对小鼠子宫内膜异位症(EM)病灶的影响

Fig.3 Effects of *Bifidobacterium breve* gavage on endometriotic (EM) lesions of mice

A. 病灶外观; B. 病灶最大重量及数目; C. 病灶HE染色镜下观。*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, ****P<0.0001

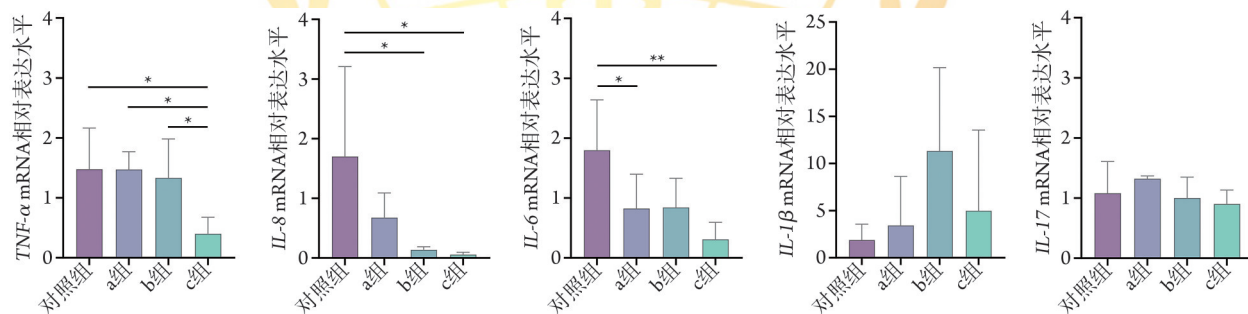


图4 短双歧杆菌灌胃处理对小鼠子宫内膜异位症(EM)病灶中炎症因子表达的影响

Fig.4 Effects of *Bifidobacterium breve* gavage on the expression of inflammatory factors in endometriotic (EM) lesions of mice

*P<0.05, **P<0.01。TNF-α. 肿瘤坏死因子-α; IL. 白细胞介素

3 讨 论

EM被认为是一种慢性炎性疾病。子宫内膜细胞常侵入并定植盆腹腔,导致局部促炎细胞因子的产生增加,从而引发局部和全身炎症,累及部位可能出现局部纤维化、粘连,形成异位病灶,引起慢性疼痛^[20]。除妇科症状以外,高达90%EM患者出现胃肠道症状,表现为月经时出现腹泻、腹胀、恶心、便秘等^[21];提示EM患者肠道健康情况可能与EM疾病存在关联。

随着基因组学研究的推进和高通量测序技术的应用,众多证据提示,肠道微生物与女性生殖健康关系密切。有研究发现,EM患者的肠道菌群组成与

健康女性存在明显差异,如*B. breve*等有益菌的丰度明显降低^[22]。本课题组前期粪便样本16S rRNA测序分析结果显示,EMB患者肠道中双歧杆菌属的丰度明显低于EMA^[23]。而多项临床研究显示,在口服*B. breve*后,女性痛经症状、炎症状态缓解,内分泌功能改善^[7,24-25]。这提示*B. breve*可能在EM的发生发展中发挥重要作用。本研究进一步通过qPCR验证*B. breve*在早晚期EM患者肠道中差异明显。

EM虽是一种良性疾病,但其病灶生物学行为却与恶性肿瘤相似^[26];病灶的侵袭性、浸润性及转移性均较强。在本研究CCK-8法、划痕实验、Transwell实验中,含有*B. breve*活性物质的培养上清液可明显抑制ESCs的增殖和迁移。这可能与核因子-

κ B (NF- κ B)通路持续激活,促进免疫抑制细胞[如调节性T细胞(Treg)、骨髓来源的抑制性细胞(MDSC)]的生成,促成免疫逃逸有关^[27]。有研究显示, *B. breve*可通过其产生的短链脂肪酸抑制NF- κ B通路^[28-29]。此外, *B. breve*也可能通过调节细胞外基质的降解和重塑,抑制ESCs的侵袭能力^[30]。本研究为*B. breve*的治疗潜力提供了细胞水平的证据,并提示其可能通过多靶点作用机制干预EM的病理进程。

本研究观察了*B. breve*对EM小鼠的治疗效果,结果显示,*B. breve*灌胃后,各实验组小鼠的EM病灶数目和重量均小于对照组,且实验组之间也存在差异,其中造模前灌胃组(c组)的效果最为明显。这提示*B. breve*不仅在EM发生后具有治疗作用,还可能通过早期干预发挥预防效果。

*B. breve*可抑制NF- κ B通路减少促炎因子的产生,并在结肠、肝、肺部分相关疾病治疗中发挥抗炎和免疫调节作用^[28,31]。NF- κ B通路的激活常诱导IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、IL-17在内的炎症因子^[29]。在EM患者,IL-8、TNF- α 表达水平与盆腔粘连程度及疼痛程度呈较强正相关^[22];TNF- α 和IL-8可促进血管生成和病灶增殖^[32]。此外,*B. breve*作为益生菌的代表,其丰度降低可导致肠道菌群失调。研究发现,*B. breve*干预后,具有显著促炎的关键菌群——大肠杆菌属和拟杆菌属丰度降低^[33]。本研究发现,病灶组织中促炎因子IL-6、IL-8和TNF- α 的表达呈下降趋势,尤其在c组中表现更为明显。这些炎症因子在EM的病理过程中起重要作用,其表达下调进一步提示*B. breve*通过抗炎机制改善EM的可能性。

综上所述,本研究通过分析EM患者肠道菌群、细胞实验及小鼠EM模型,探讨了*B. breve*在EM中的作用及其潜在机制,揭示了*B. breve*在EM中的多重作用,包括抑制ESCs的增殖和迁移及降低组织中炎症因子表达,从而改善EM的进程。特别是造模前灌胃组的效果提示,早期干预可能是预防EM的有效策略。本研究存在一定的局限性,缺乏对*B. breve*具体作用机制的深入研究,未对其活性成分进行鉴定,未探究其对免疫微环境的调控作用。总之,本研究探讨了*B. breve*对小鼠EM病灶的影响及其对ESCs增殖和迁移的作用,为后续相关机制研究建立了初步的基础。

【附加材料】

附表1及附图1见 [https://dx.doi.org/10.11855/j.](https://dx.doi.org/10.11855/j.issn.0577-7402.0360.2025.1110FJ)

issn.0577-7402.0360.2025.1110FJ。

请扫描右方二维码获取。



【参考文献】

- [1] 彭超,黄艳,周应芳,等. 子宫内位症的早期诊断和治疗[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2024, 40(5): 485-489.
- [2] 袁素珍,靳焰,汪雯雯. 卵巢透明细胞癌和卵巢型子宫内膜异位症患者的临床特征分析[J]. 吉林大学学报(医学版), 2024, 50(6): 1677-1682.
- [3] 孙梦祝,黄文庆. 子宫内膜异位症的发病机制与临床诊疗研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2023, 44(16): 2017-2022.
- [4] Spaggiari L, Sala A, Ardizzoni A, et al. *Lactobacillus acidophilus*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, and *L. reuteri* cell-free supernatants inhibit candida parapsilosis pathogenic potential upon infection of vaginal epithelial cells monolayer and in a transwell coculture system *in vitro* [J]. *Microbiol Spectr*, 2022, 10(3): e269621.
- [5] Moustakli E, Zagorianakou N, Makrydimas S, et al. The gut-endometriosis axis: genetic mechanisms and public health implications[J]. *Genes (Basel)*, 2025, 16(8): e918.
- [6] Rocchetti MT, Russo P, de Simone N, et al. Immunomodulatory activity on human macrophages by cell-free supernatants to explore the probiotic and postbiotic potential of lactiplantibacillus plantarum strains of plant origin[J]. *Probiotics Antimicrob Proteins*, 2024, 16(3): e911-e926.
- [7] Motei DE, Beteri B, Hepsomali P, et al. Supplementation with postbiotic from *Bifidobacterium breve* BB091109 improves inflammatory status and endocrine function in healthy females: a randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-groups study [J]. *Front Microbiol*, 2023, 14: 1273861.
- [8] Ding M, Li B, Chen H, et al. *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* regulates Th1/Th2 balance through the JAK-STAT pathway in growing mice[J]. *Microbiome Res Rep*, 2024, 3(2): 16.
- [9] Zhang H, Wang J, Shen J, et al. Prophylactic supplementation with *Bifidobacterium infantis* or its metabolite inosine attenuates cardiac ischemia/reperfusion injury[J]. *Imeta*, 2024, 3(4): e220.
- [10] 史艺雅. 肠道具核梭杆菌迁移胎盘促进子痫前期研究[D]. 广州: 南方医科大学, 2022.
- [11] 温小慧,刘学红,黄诗雅,等. 加味芍药甘草汤含药血清对子宫腺肌病异位子宫内膜间质细胞迁移、侵袭和血管生成的影响[J]. *中药药理与临床*, 2024, 40(11): 16-21.
- [12] 王焱,聂晓博,金霞,等. 基于JAK2/STAT3信号通路探讨三棱莪术含药血清对人异位子宫内膜间质细胞增殖、凋亡和迁移的影响[J]. *中国中药杂志*, 2023, 48(12): 3199-3206.
- [13] 王芳,王丽春,韩彩玲,等. 血管内皮生长因子调节蛋白激酶C表达对子宫内膜异位症间质细胞侵袭性的影响[J]. *宁夏医科大学学报*, 2024, 46(8): 757-764.
- [14] 杨忠云,吴婷,李雪森. 黄卡瓦胡椒素B下调雄激素受体对三阴性乳腺癌增殖和迁移的影响[J]. *解放军医学杂志*, 2024, 49(8): 930-938.
- [15] Xu J, Xia Q, Wu T, et al. Prophylactic treatment with *Bacteroides uniformis* and *Bifidobacterium bifidum* counteracts hepatic NK cell immune tolerance in nonalcoholic steatohepatitis induced by high fat diet[J]. *Gut Microbes*, 2024, 16(1): 2302065.
- [16] Uchida M, Kobayashi O. Effects of *Lactobacillus gasseri* OLL2809 on the induced endometriosis in rats[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2013, 77(9): 1879-1881.
- [17] Wei Y, Tan H, Yang R, et al. Gut dysbiosis-derived beta-glucuronidase promotes the development of endometriosis[J]. *Fertil Steril*, 2023, 120(3 Pt 2): 682-694.
- [18] 周雪,万贵平,张真真. 人源异种皮下注射移植法建立子宫内

- 膜异位症纤维化裸鼠模型的评价[J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(8): 19-26.
- [19] Gogacz M, Winkler I, Bojarska-Junak A, *et al.* Increased percentage of Th17 cells in peritoneal fluid is associated with severity of endometriosis[J]. J Reprod Immunol, 2016, 117: 39-44.
- [20] 王飞娥, 赵巧红, 晏星. 免疫炎症指标在子宫内异位症中的诊断价值[J]. 医学新知, 2025, 35(7): 774-782.
- [21] Yu V, McHenry N, Proctor S, *et al.* Gastroenterologist primer: endometriosis for gastroenterologists[J]. Dig Dis Sci, 2023, 68(6): 2482-2492.
- [22] Shan J, Ni Z, Cheng W, *et al.* Gut microbiota imbalance and its correlations with hormone and inflammatory factors in patients with stage 3/4 endometriosis[J]. Arch Gynecol Obstet, 2021, 304(5): 1363-1373.
- [23] 黄思霞. 不同分期子宫内异位症患者肠道微生物菌群的特征性研究[D]. 广州: 南方医科大学, 2023.
- [24] Pungel D, Treveil A, Dalby MJ, *et al.* *Bifidobacterium breve* UCC2003 exopolysaccharide modulates the early life microbiota by acting as a potential dietary substrate[J]. Nutrients, 2020, 12(4): 948.
- [25] Zakaria IA, Mohammed Zain NA, Teik CK, *et al.* The role of probiotics in improving menstrual health in women with primary dysmenorrhoea: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial (the PERIOD study) [J]. Womens Health (Lond), 2024, 20: 912645212.
- [26] Zhang M, Xu T, Tong D, *et al.* Research advances in endometriosis-related signaling pathways: a review[J]. Biomed Pharmacother, 2023, 164: 114909.
- [27] Talwar C, Singh V, Kommagani R. The gut microbiota: a double-edged sword in endometriosis[J]. Biol Reprod, 2022, 107(4): 881-901.
- [28] Niu M, Li Y, Su Q, *et al.* A mannose-rich exopolysaccharide-1 isolated from *Bifidobacterium breve* mitigates ovalbumin-induced intestinal damage in mice by modulation CD4⁺ T cell differentiation and inhibiting NF-kappaB signaling pathway[J]. Int J Biol Macromol, 2024, 280(Pt 3): 135850.
- [29] Wang Z, Liu J, Li F, *et al.* Mechanisms of Qingyi decoction in severe acute pancreatitis-associated acute lung injury *via* gut microbiota: targeting the short-chain fatty acids-mediated AMPK/NF-kappaB/NLRP3 pathway[J]. Microbiol Spectr, 2023, 11(4): e366422.
- [30] Silva AKS, Silva TRN, Nicoli JR, *et al.* *In vitro* evaluation of antagonism, modulation of cytokines and extracellular matrix proteins by *Bifidobacterium* strains[J]. Lett Appl Microbiol, 2018, 67(5): 497-505.
- [31] Mortaz E, Adcock IM, Ricciardolo FLM, *et al.* Anti-inflammatory effects of *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium breve* on cigarette smoke activated human macrophages[J]. PLoS One, 2015, 10(8): e136455.
- [32] Taylor HS, Kotlyar AM, Flores VA. Endometriosis is a chronic systemic disease: clinical challenges and novel innovations[J]. Lancet, 2021, 397(10276): 839-852.
- [33] Xholli A, Cremonini F, Perugi I, *et al.* Gut microbiota and endometriosis: exploring the relationship and therapeutic implications[J]. Pharmaceuticals (Basel), 2023, 16(12): 1696.

(责任编辑: 蒋铭敏)

解放军医学杂志®