

肠道菌群对蛋氨酸脑啡肽治疗肿瘤疗效的影响

呼芳竹, 陈 灏, 邓煜瑶, 王晓楠, 李胜军, 单风平*

(中国医科大学基础医学院 免疫学教研室 辽宁 沈阳 110122)

摘 要 蛋氨酸脑啡肽(Methionine enkephalin, MENK)是一种内源性阿片肽,有良好的抗肿瘤作用,而肠道菌群对 MENK 抗肿瘤作用的影响尚不清楚。建立小鼠肠道菌群紊乱模型及荷瘤小鼠模型,以 16S rRNA 测序法检测肠道菌群丰度、监测小鼠体重、绘制肿瘤生长曲线,以流式细胞术检测小鼠肿瘤浸润 CD4⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞、Treg 细胞百分比。结果表明,小鼠肠道菌群紊乱模型建立成功;肠道菌群正常与紊乱荷瘤小鼠同时接受 MENK 治疗,后者肿瘤体积更大,菌群正常荷瘤小鼠肿瘤浸润的 CD4⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞百分比上调,Treg 细胞百分比下调,而菌群紊乱荷瘤小鼠与菌群正常荷瘤小鼠相比,肿瘤浸润 CD4⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞百分比下调,Treg 细胞百分比上调。该研究表明肠道菌群紊乱可以降低 MENK 治疗肿瘤的疗效。

关键词 肠道菌群; 蛋氨酸脑啡肽; 肿瘤治疗; 小鼠肉瘤 S180; 肿瘤浸润淋巴细胞

中图分类号 Q939.93 文献标识码 A 文章编号 1005-7021(2021)02-0053-07

doi: 10.3969/j.issn.1005-7021.2021.02.007

Influence of Intestinal Microbial Population on Therapeutic Effect of Methionine Enkephalin on Tumor

HU Fang-zhu, CHEN Hao, DENG Yu-yao, WANG Xiao-nan, LI Sheng-jun, SHAN Feng-ping*

(Teach. & Res. Div. of Immunol., Schl. of Basic Med. Sci., China Med. Uni., Shengyang 110122)

Abstract Methionine enkephalin (MENK) is an endogenous opioid peptide that has good antitumor effects, while the influence of intestinal microbial population (IMP) on the anti-tumor effect of MENK is still unclear. In this study, a mouse IMP disorder model and a tumour-bearing mouse model were established to detect the IMP abundance by 16S rRNA sequencing method, to monitor the weight of mice, and draw tumor growth curve, and detect the percentage of CD4⁺T cells, CD8⁺T cells and Treg cells infiltrated by mice tumor by flow cytometry. The results showed that the model of IMP disturbance in mice was established successfully. Both tumor-bearing mice with normal IMP and tumor-bearing mice with disturbed IMP were treated with MENK, the latter had a larger tumor volume, the percentage of CD4⁺T cells and CD8⁺T cells infiltrated by tumor in tumor-bearing mice with normal IMP was up-regulated, Treg cells percentage was down-regulated, when tumor-bearing mice with disordered IMP were compared with tumor-bearing mice with normal IMP, the percentage of CD4⁺T cells and CD8⁺T cells infiltrated by tumor in tumor-bearing mice was down-regulated, Treg cells percentage was up-regulated. This study showed that IMP disturbance could reduce the efficacy of MENK in treatment of tumors.

Keywords intestinal microbial population (IMP); methionine enkephalin (MENK); oncotherapy; mouse sarcoma S180; tumor infiltrating lymphocyte

肠道菌群平衡在维持机体生理功能与健康中起着至关重要的作用,可影响多种生理和病理过

基金项目: 国家自然科学基金项目(31670921)

作者简介: 呼芳竹 女 硕士研究生。主要从事肿瘤免疫调节研究。E-mail: 810137074@qq.com

* 通讯作者。男 教授 博士生导师。主要从事肿瘤免疫调节研究。E-mail: fshan@mail.cmu.edu.cn

收稿日期: 2020-09-29

程^[1]。肠道菌群失调可能会触发炎症信号通路,其影响范围不仅仅是在肠道水平,而是涵盖整个免疫功能^[2],因此可能导致癌症的发生和发展^[3];微生物通过代谢药物和外源性物质、调节宿主炎症和免疫反应也会影响抗癌药物的治疗效果。近年来,肠道菌群与抗癌药物之间的相互作用引起了越来越多的关注,研究发现多种抗癌药物对无菌小鼠、广谱抗生素处理小鼠的治疗效果都有所降低^[4-6],说明肠道菌群平衡对抗癌药物发挥良好活性有重要作用。蛋氨酸脑啡肽(Methionine enkephalin, MENK)是由肾上腺产生的前脑啡肽衍生出来的五肽,其不仅可调节神经内分泌活性,也可与多种细胞表面阿片受体结合产生不同的免疫效应^[7],在细胞更新、伤口愈合、血管生成、肿瘤发生和发展中发挥作用^[8]。MENK可直接参与肿瘤细胞生长过程并进行调控从而发挥抗肿瘤作用,如胃癌、黑色素瘤、卵巢癌、非小细胞肺癌等^[9-10];此外,NK细胞、T细胞、树突细胞、巨噬细胞等多种免疫细胞广泛存在阿片受体的结合位点,MENK可与之结合产生免疫调节,从而间接发挥抗肿瘤作用^[7];还有研究发现,MENK可通过抑制炎症和重组糖脂代谢相关的肝脏功能在结直肠癌治疗方面发挥作用^[11]。然而肠道菌群是否会对MENK抗肿瘤疗效产生影响,目前尚不清楚。本研究利用小鼠肠道菌群紊乱模型及荷瘤小鼠模型,通过16S rRNA测序、观察模型、流式细胞术等方法探讨肠道菌群紊乱对蛋氨酸脑啡肽治疗肿瘤疗效的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 小鼠 SPF级C57BL/6(6~8周龄,雌性,体重18~20 g),购自北京维通利华有限公司,饲养于中国医科大学SPF级动物实验室。

1.1.2 细胞 小鼠肉瘤细胞株Sarcoma180(S180)细胞由实验室传代保存,用含有10%胎牛血清和1%的青霉素、链霉素双抗的RPMI-1640培养基,置于37℃、5% CO₂ 孵箱中传代培养。

1.1.3 试剂 蛋氨酸脑啡肽(MENK,纯度>98%)购自杭州中肽生化有限公司;庆大霉素、万古霉素、甲硝唑、新霉素、氨苄西林均购自上海阿拉丁有限公司;E. Z. N. ATM Mag-Bind Soil DNA

Kit 购自 OMEGA 公司;流式抗体购自 Biolegend 公司。

1.1.4 仪器与设备 CO₂ 恒温培养箱(316108-5121, Thermo);台式高速冷冻离心机(H2050R, 湘仪离心机有限公司);Illumina MiSeq 高通量测序仪(美国 Illumina 公司);PCR 仪(Bio-Rad 580BR10905);流式细胞仪(FACSCelesta, BD)。

1.2 方法

1.2.1 小鼠肠道菌群紊乱模型 荷瘤前10 d,预先使用混合抗生素(Antibiotic Mix, ABX)处理。方式为实验组每只小鼠每天灌胃ABX 0.2 mL(包括1.5 mg/mL 庆大霉素、1.5 mg/mL 甲硝唑、1.5 mg/mL 新霉素、1.5 mg/mL 氨苄西林、0.75 mg/mL 万古霉素),对照组给予等量生理盐水(Normal saline, NS)。处理10 d后分别取NS对照组和ABX实验组小鼠盲肠观察,并取盲肠内容物,液氮速冻后于-80℃保存,进行16S rRNA测序。

1.2.2 小鼠皮下荷瘤模型 将体外培养至对数生长期的S180细胞以 2×10^6 个/只接种于小鼠腹腔内,7~8 d产生腹水后无菌抽取小鼠腹腔积液,用无血清RPMI-1640离心洗涤并配制瘤细胞悬液,每只小鼠腋窝皮下注入 2×10^6 个瘤细胞。

1.2.3 实验小鼠分组及处理 将小鼠随机分为4组(n=6),分别为C组(对照组)、M组(MENK治疗组)、AN组(菌群紊乱对照组)、AM组(菌群紊乱MENK治疗组)。第1天起,AN组与AM组灌胃ABX,剂量见1.2.1,C组与M组给予等量NS,直至实验结束。第10天,所有小鼠进行皮下荷瘤,方法见1.2.2。荷瘤后24 h,M组与AM组每天腹腔注射20 mg/kg MENK 0.1 mL,C组与AN组给予等量NS,持续14 d。

1.2.4 小鼠体重及肿瘤体积测量 实验开始后,隔天记录小鼠体重,绘制体重变化曲线,直至实验结束。待肿瘤体积可测量后,隔天用游标卡尺测量肿瘤长径a、短径b,并根据公式(肿瘤体积 $=1/2 \times a \times b^2$)计算肿瘤体积,绘制肿瘤生长曲线。实验结束后对小鼠实施安乐死,取实体瘤称重、留取肿瘤组织做后续实验。

1.2.5 16S rRNA 鉴定粪便菌群 参照 E. Z. N. ATM Mag-Bind Soil DNA Kit 试剂盒使用说明书提取粪便中的DNA,使用V3~V4通用引物进行PCR扩增,扩增产物经纯化回收后等量混样上机

测序。Illumina Miseq™ 得到的原始图像经预处理得到有效数据, 根据样本序列之间的相似性将其分成不同的操作分类单元 (Operational Taxonomic Units, OTU), 在 97% 的 OTU 相似水平下进行生物信息统计分析。根据不同样本中 OTU 的丰度分布, 对每个样本的多样性进行评估。

1.2.6 肿瘤单细胞悬液制备 将皮下瘤组织切割为 <2 mm 的碎块, 加入 1.6 mg/mL IV 型胶原酶 (RIPA-1640 培养基配制), 37 °C 恒温水浴震荡 1 h, 加入 EDTA 使其工作浓度为 10 mmol/L, 4 °C 孵育 10 min, 使用 70 μm 尼龙网过滤获得单细胞悬液。磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤, 加入红细胞裂解液 4 °C 孵育 5 min, PBS 洗涤后重悬细胞待用。

1.2.7 流式细胞术检测肿瘤浸润 CD4⁺ T 细胞、CD8⁺ T 细胞、Treg 细胞 获得肿瘤单细胞悬液后, 每个流式管取细胞数量为 1×10^6 个。设置对照管, 相应的同型对照管和单标管, 同型对照管加等量相对应同型对照抗体, 单标管加单一的荧光抗体。为检测 CD4⁺ T 细胞、CD8⁺ T 细胞分别加入抗体 (APC anti-mouse CD3、FITC anti-mouse CD4、PerCP-cy5.5 anti-mouse CD8) 进行细胞表面染色, 4 °C 避光孵育 30 min, 洗涤后用缓冲液重悬待上机检测。为检测 Treg 细胞, 分别加入抗体 (PerCP-cy5.5 anti-mouse CD4、PE anti-mouse

CD25) 进行细胞表面染色, 4 °C 避光孵育 30 min; 洗涤后加入 Foxp3 透膜固定剂, 4 °C 避光孵育 40 min; 透膜洗液洗涤后加入抗体 APC anti-mouse Foxp3 进行核内染色, 4 °C 避光孵育 40 min; 洗涤后用缓冲液重悬待上机检测。流式细胞仪 (FACS Celesta, BD) 检测 CD4⁺ T 细胞、CD8⁺ T 细胞、Treg 细胞百分比, 用 FlowJo10 软件进行分析。

1.2.8 统计学方法 采用 GraphPad Prism 8 软件进行统计学分析, 各组实验结果以平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm S$) 表示, 两组之间的比较采用 *t* 检验, 多组之间的比较采用 one-way ANOVA 分析, 以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 肠道菌群紊乱小鼠模型的建立

为验证肠道菌群紊乱小鼠模型是否建立成功, 按 1.2.3 方法处理 10 d 后, 分别取 NS 组和 ABX 组小鼠盲肠, 如图 1A 所示, 肉眼观察到 ABX 组小鼠盲肠相比 NS 组肿大, 存留更多的粪便; 16S rRNA 测序分析结果如图 1B 和图 1C 所示, ABX 组小鼠肠道菌群 Chao 指数以及 Shannon 指数明显下降 ($***P < 0.001$, $****P < 0.0001$), 表明 ABX 组小鼠肠道菌群物种总数以及物种多样性相比 NS 组显著下降, 证实模型建立成功。

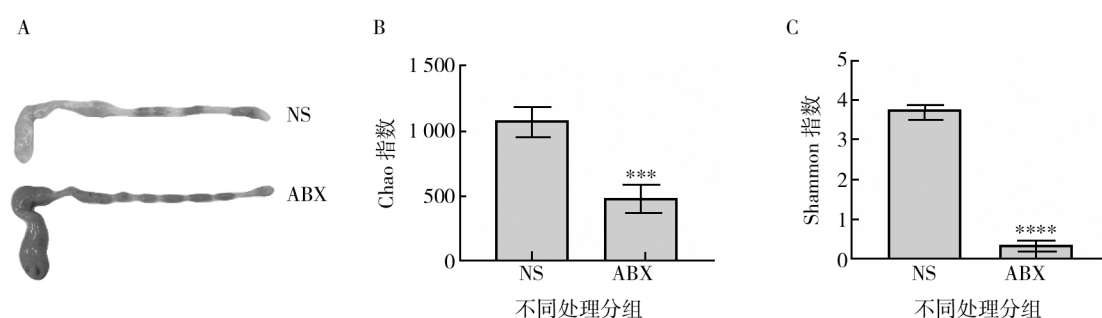


图 1 ABX 处理后小鼠盲肠外观及肠道菌群物种总数和多样性的比较

Fig. 1 Comparison of cecal appearance, total number and diversity of intestinal flora in mice treated with ABX

A: NS 组与 ABX 组小鼠盲肠外观; B: NS 组与 ABX 组小鼠肠道菌群 Chao 指数图; C: NS 组与 ABX 组小鼠肠道菌群 Shannon 指数图; ABX 组与 NS 组相比, $***P < 0.001$, $****P < 0.0001$

A: Appearance of cecum of mice in NS group and ABX group; B: Chao index graph of intestinal flora of NS group and ABX group; C: Shannon index graph of intestinal flora in NS group and ABX group; The ABX group was compared to the NS group, $***$ Significant difference ($P < 0.001$), $****$ Significant difference ($P < 0.0001$)

2.2 小鼠体重及肿瘤生长曲线

对荷瘤小鼠皮下瘤进行测量并计算体积, 绘

制出肿瘤生长曲线。如图 2A 所示, M 组荷瘤小鼠经 MENK 治疗皮下瘤生长缓慢, 治疗期间瘤体

积明显小于 C 组 ($***P < 0.001$) ; 单纯 ABX 处理对于肿瘤生长并没有产生太大影响, 其肿瘤体积与 C 组相比没有显著性差异; AM 组皮下瘤生长较 M 组快, 且瘤体积明显大于 M 组 ($###P < 0.001$)。另外, 可监测到各组小鼠体重平稳上升, 如图 2B 所示, AN 组与 AM 组小鼠体重始终略低于 C 组与 M 组, 但无显著差异, 表明实验的处理对小鼠的精神及身体方面没有产生影响。剖

出小鼠皮下瘤进行称重拍照, 如图 2C 所示, 可肉眼清楚看出 M 组小鼠皮下瘤明显减小, 而 AM 组瘤体积无显著改变; 如图 2D 所示, 经统计学分析, M 组小鼠瘤重明显小于 C 组 ($***P < 0.0001$), AN 组与 C 组相比无统计学差异, AM 组瘤重显著大于 M 组 ($####P < 0.0001$), 该结果与肿瘤生长曲线检测一致, 提示肠道菌群紊乱可能会使 MENK 治疗肿瘤效果下降。

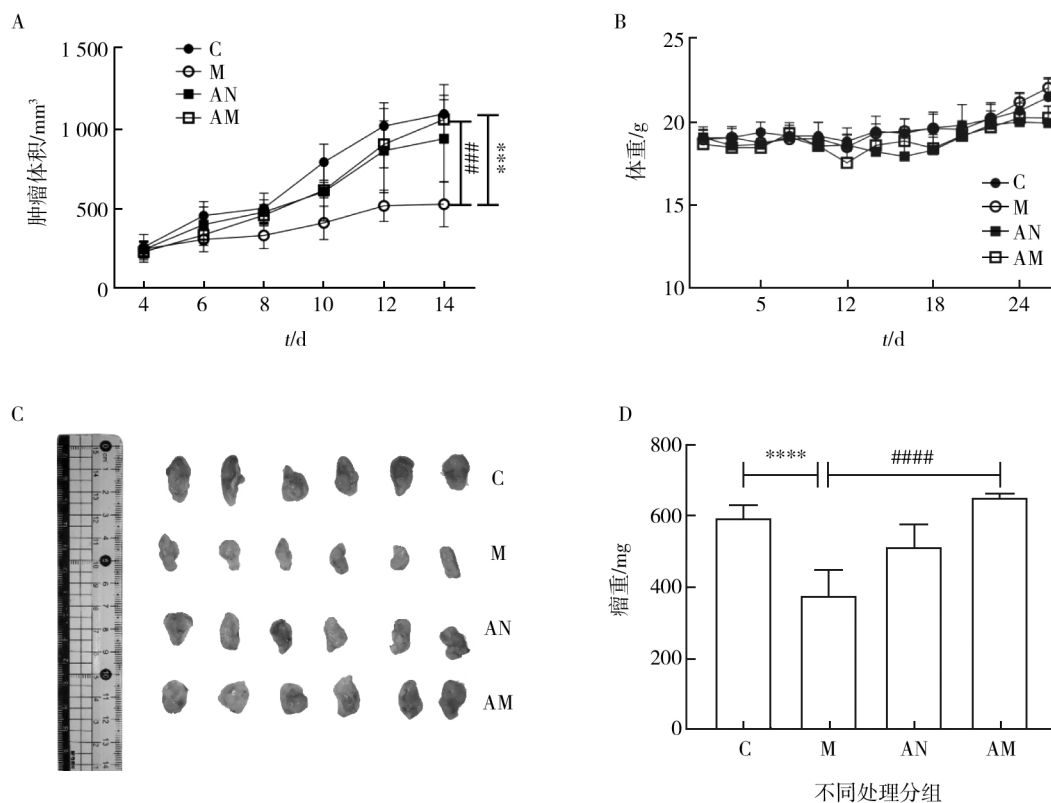


图 2 C 组、M 组、AN 组、AM 组小鼠体重及肿瘤生长情况

Fig. 2 Body weight and tumor growth of mice in group C, M, AN and AM

A: 小鼠肿瘤生长曲线; B: 小鼠体重比较; C: 小鼠肿瘤标本; D: 小鼠瘤重比较; M 组与 C 组相比, $***P < 0.001$, $****P < 0.0001$; AM 组与 M 组相比 $###P < 0.001$ $####P < 0.0001$

A: Tumor growth curve of mice; B: Weight comparison of mice; C: Mouse tumor specimen; D: Comparison of tumor weight in mice; When group M is compared to group C, $***$ Significant difference ($P < 0.001$), $****$ Significant difference ($P < 0.0001$); When group AM is compared to group M, $###$ Significant difference ($P < 0.001$) $####$ Significant difference ($P < 0.0001$)

2.3 流式细胞术检测小鼠肿瘤浸润 $CD4^+$ T 细胞、 $CD8^+$ T 细胞、Treg 细胞百分比

取出的皮下瘤经处理获得单细胞悬液, 细胞表面及核内染色后, 通过流式细胞术检测肿瘤浸润 $CD4^+$ T 细胞、 $CD8^+$ T 细胞、Treg 细胞百分比, 分析结果如图 3 所示, M 组小鼠经 MENK

治疗后, 肿瘤浸润 $CD4^+$ T 细胞、 $CD8^+$ T 细胞百分比对照组显著增加 ($**P < 0.01$, $**P < 0.01$), 而 Treg 细胞百分比明显减少 ($****P < 0.0001$); 单纯 ABX 处理组肿瘤浸润淋巴细胞百分比与 C 组相比无显著差异; AM 组与 M 组相比, 肿瘤浸润 $CD4^+$ T 细胞及

CD8⁺ T 细胞百分比显著下降 (#### $P < 0.0001$, ### $P < 0.001$) , 而 Treg 细胞百分比上升 (### $P < 0.001$) , 提示肠道菌群紊乱使

得 MENK 治疗导致的 CD4⁺ T 细胞及 CD8⁺ T 细胞浸润显著减少, Treg 细胞浸润增多, 表明菌群紊乱可能会减弱 MENK 治疗肿瘤的效果。

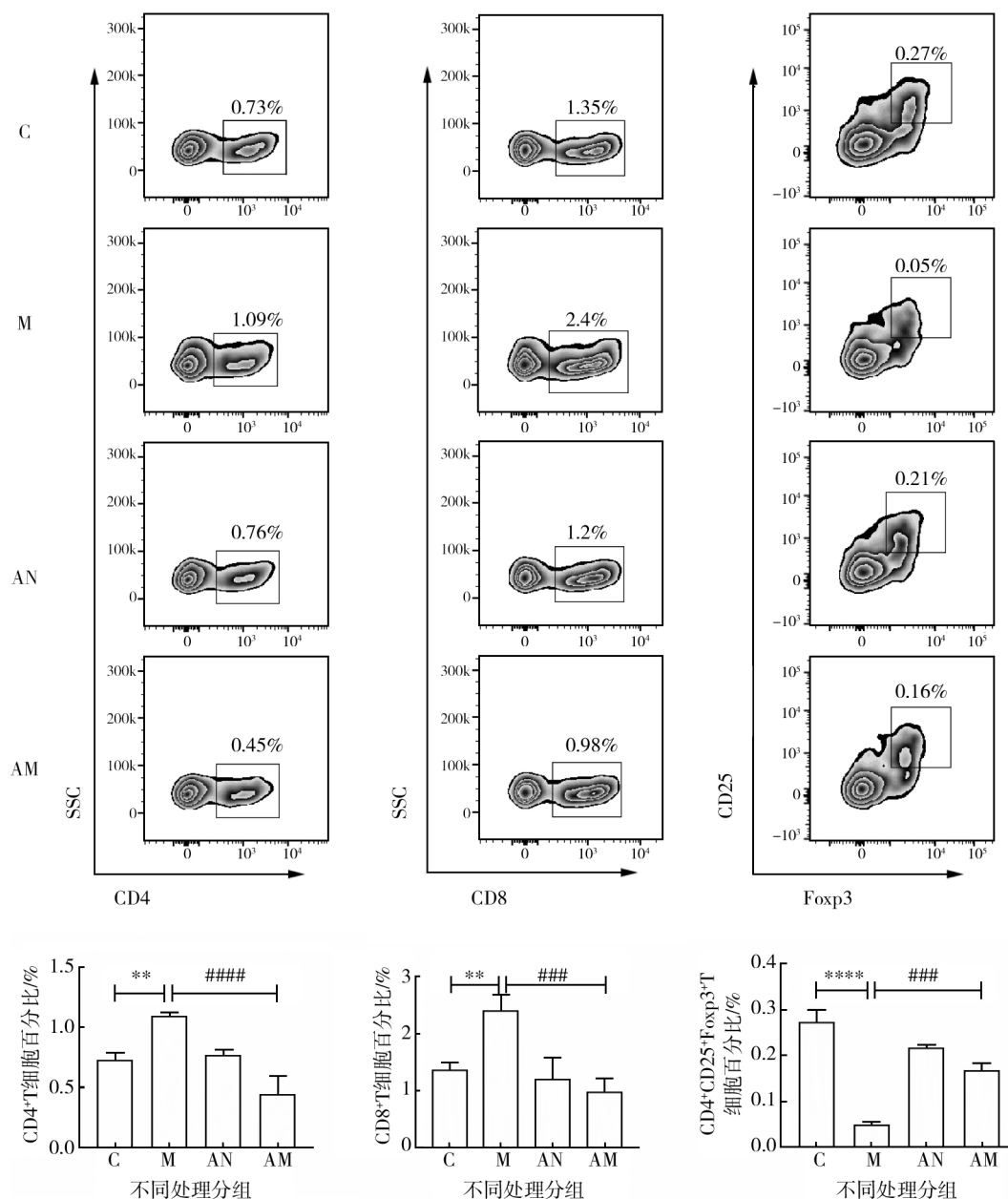


图3 C、M、AN、AM 组小鼠肿瘤浸润 CD4⁺ T 细胞、CD8⁺ T 细胞、Treg 细胞百分比

Fig. 3 Percentage of CD4⁺ T cells, CD8⁺ T cells and Treg cells infiltrated by tumor in mice in C, M, AN and AM groups
M 组与 C 组相比, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$; AM 组与 M 组相比, ### $P < 0.001$, #### $P < 0.0001$

When group M is compared to group C, ** Significant difference ($P < 0.01$), *** Significant difference ($P < 0.001$), **** Significant difference ($P < 0.0001$); When group AM is compared to group M, ### Significant difference ($P < 0.001$), #### Significant difference ($P < 0.0001$)

3 讨论

ABX 可在短期内清除小鼠肠道中的大部分菌群且不会被肠道吸收, 所以研究肠道菌群在肿瘤发生发展以及治疗中的作用时常被用来建立小鼠肠道菌群紊乱模型^[12]。本研究 16S rRNA 测序结果显示 ABX 处理小鼠肠道菌群总数及多样性均下降, 表明已成功建立了小鼠肠道菌群紊乱模型。有研究表明, ABX 处理可显著抑制多种荷瘤模型小鼠肿瘤生长^[13]; 而 Routy 等^[14]报道 ABX 处理对不同荷瘤模型小鼠肿瘤生长有一定的影响, 但均无显著差异。由此可知, 肠道菌群紊乱对不同荷瘤模型小鼠的影响也不同。本研究发现, ABX 导致的菌群紊乱使 S180 荷瘤小鼠肿瘤体积略有减小但无显著影响。

MENK 作为内源性阿片肽能够有效沟通神经内分泌与免疫系统, 表现出对多种免疫细胞的调节作用^[15]。本课题组前期研究证明, MENK 可作用于人外周血淋巴细胞, 在刺激 CD4⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞增殖方面比 IL-2 或 IFN- γ 更有活性^[16]; MENK 在体内或体外均可上调 CD8⁺T 细胞百分比, 显著提高荷瘤小鼠的存活率^[17]; MENK 可以通过下调荷瘤小鼠 Treg 细胞体内比例延缓肿瘤的发展^[18]。本研究通过流式细胞术证明 MENK 治疗可以提高肿瘤浸润 CD4⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞百分比, 降低 Treg 细胞百分比, 表明 MENK 治疗后, 肿瘤组织内局部的免疫微环境得到了显著改善。

肠道菌群可以通过参与肿瘤的发生, 调节抗肿瘤治疗的活性、疗效和毒性^[19], 也可以通过调节化疗药物的代谢影响肿瘤对化疗的反应^[20]。有研究表明, 对 ABX 处理的荷瘤小鼠使用 5-氟尿嘧啶^[5]、顺铂^[21]或 PD-1^[14]等治疗, 其抗肿瘤疗效均有所降低。本研究发现, MENK 治疗的肠道菌群紊乱荷瘤小鼠与肠道菌群正常荷瘤小鼠相比, 前者肿瘤更大, 肿瘤浸润 CD4⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞百分比下降, Treg 细胞百分比上升, 表明 MENK 抑制肿瘤生长的作用减弱。与 Dong 等^[22]结果不同之处在于, 其使用的抗肿瘤药物对肠道菌群有调节作用, 使得 ABX 处理对其药物抑瘤疗效损害较小。肠道菌群紊乱严重减弱 MENK 抗肿瘤疗效的机制还有待进一步研究。

越来越多的研究结果证明, 某些肠道细菌的定殖可增强宿主的抗肿瘤免疫反应, 从而在远离肠道部位的抗肿瘤治疗中也可以发挥积极作用^[23]。Sivan 等^[24]给无菌荷瘤小鼠灌胃双歧杆菌, 可有效抑制黑色素瘤的生长, 与 PD-1 抑制剂联合治疗几乎完全抑制了肿瘤的生长; Tanoue 等^[25]从健康的人类供体粪便中分离出 11 个细菌菌株, 在将其移植到无菌荷瘤小鼠后, 可以抑制肿瘤生长, 联合免疫抑制剂效果更佳。益生菌或粪菌移植是否会增强 MENK 对肿瘤的治疗效果还需要进一步深入的研究。

综上所述, 肠道菌群紊乱可以减弱蛋氨酸脑啡肽对于小鼠肿瘤的治疗效果, 这是首次从肠道微生态角度研究肠道菌群紊乱对蛋氨酸脑啡肽抗肿瘤免疫疗效的影响, 以上结果可以为蛋氨酸脑啡肽抗肿瘤治疗的进一步研究提供参考。

参考文献:

- [1] Liu Y, Baba Y, Ishimoto T, et al. Progress in characterizing the linkage between *Fusobacterium nucleatum* and gastrointestinal cancer [J]. J Gastroenterol, 2019, 54 (1): 33-41.
- [2] Wong SH, Kwong TNY, Wu CY, et al. Clinical applications of gut microbiota in cancer biology [J]. Semin Cancer Biol, 2019 (55): 28-36.
- [3] Panebianco C, Adamberg K, Jaagura M, et al. Influence of gemcitabine chemotherapy on the microbiota of pancreatic cancer xenografted mice [J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2018, 81 (4): 773-782.
- [4] Ding C, Tang W, Fan X, et al. Intestinal microbiota: a novel perspective in colorectal cancer biotherapeutics [J]. Onco Targets Ther, 2018 (11): 4797-4810.
- [5] Yuan L, Zhang S, Li H, et al. The influence of gut microbiota dysbiosis to the efficacy of 5-Fluorouracil treatment on colorectal cancer [J]. Biomed Pharmacother, 2018 (108): 184-193.
- [6] Perales-Puchalt A, Perez-Sanz J, Payne KK, et al. Frontline Science: Microbiota reconstitution restores intestinal integrity after cisplatin therapy [J]. J Leukoc Biol, 2018, 103 (5): 799-805.
- [7] Jiao X, Wang X, Wang R, et al. Rules to activate CD8⁺T cells through regulating subunits of opioid receptors by methionine enkephalin (MENK) [J]. Int Immunopharmacol, 2018 (65): 76-83.
- [8] Wang R, Zhang Y, Shan F, et al. Interaction of opioid growth factor (OGF) and opioid antagonist and their significance in cancer therapy [J]. Int Immunopharmacol, 2019 (75): 105785.

- [9] Wang X , Jiao X , Meng Y , et al. Methionine enkephalin (MENK) inhibits human gastric cancer through regulating tumor associated macrophages (TAMs) and PI3K/AKT/mTOR signaling pathway inside cancer cells [J]. *Int Immunopharmacol* , 2018 (65) : 312-322.
- [10] Wang DM , Jiao X , Plotnikoff NP , et al. Killing effect of methionine enkephalin on melanoma *in vivo* and *in vitro* [J]. *Oncol Rep* , 2017 , 38 (4) : 2132-2140.
- [11] Tuo Y , Zhang Z , Tian C , et al. Anti-inflammatory and metabolic reprogramming effects of MENK produce antitumor response in CT26 tumor-bearing mice [J]. *J Leukoc Biol* , 2020 , 108 (1) : 215-228.
- [12] Kennedy EA , King KY , Baldrige MT , et al. Mouse microbiota models: comparing germ-free mice and antibiotics treatment as tools for modifying gut bacteria [J]. *Front Physiol* , 2018 (9) : 1534.
- [13] Sethi V , Kurtom S , Tarique M , et al. Gut microbiota promotes tumor growth in mice by modulating immune response [J]. *Gastroenterology* , 2018 , 155 (1) : 33-37. e36.
- [14] Routy B , Le Chatelier E , Derosa L , et al. Gut microbiome influences efficacy of PD-1-based immunotherapy against epithelial tumors [J]. *Science* , 2018 , 359 (6371) : 91-97.
- [15] Zhao D , Plotnikoff N , Griffin N , et al. Methionine enkephalin , its role in immunoregulation and cancer therapy [J]. *Int Immunopharmacol* , 2016 (37) : 59-64.
- [16] Hua H , Lu C , Li W , et al. Comparison of stimulating effect on subpopulations of lymphocytes in human peripheral blood by methionine enkephalin with IL-2 and IFN- γ [J]. *Hum Vaccin Immunother* , 2012 , 8 (8) : 1082-1089.
- [17] Li W , Chen W , Herberman RB , et al. Immunotherapy of cancer via mediation of cytotoxic T lymphocytes by methionine enkephalin (MENK) [J]. *Cancer Lett* , 2014 , 344 (2) : 212-222.
- [18] Li X , Meng Y , Plotnikoff NP , et al. Methionine enkephalin (MENK) inhibits tumor growth through regulating CD4 + Foxp3 + regulatory T cells (Tregs) in mice [J]. *Cancer Biol Ther* , 2015 , 16 (3) : 450-459.
- [19] Picardo SL , Coburn B , Hansen AR , et al. The microbiome and cancer for clinicians [J]. *Crit Rev Oncol Hematol* , 2019 (141) : 1-12.
- [20] Gori S , Inno A , Belluomini L , et al. Gut microbiota and cancer: How gut microbiota modulates activity , efficacy and toxicity of antitumoral therapy [J]. *Crit Rev Oncol Hematol* , 2019 (143) : 139-147.
- [21] Gui QF , Lu HF , Zhang CX , et al. Well-balanced commensal microbiota contributes to anti-cancer response in a lung cancer mouse model [J]. *Genet Mol Res* , 2015 , 14 (2) : 5642-5651.
- [22] Dong M , Meng Z , Kuerban K , et al. Diosgenin promotes antitumor immunity and PD-1 antibody efficacy against melanoma by regulating intestinal microbiota [J]. *Cell Death Dis* , 2018 , 9 (10) : 1039.
- [23] Zitvogel L , Daillère R , Roberti MP , et al. Anticancer effects of the microbiome and its products [J]. *Nat Rev Microbiol* , 2017 , 15 (8) : 465-478.
- [24] Sivan A , Corrales L , Hubert N , et al. Commensal *Bifidobacterium* promotes antitumor immunity and facilitates anti-PD-L1 efficacy [J]. *Science* , 2015 , 350 (6264) : 1084-1089.
- [25] Tanoue T , Morita S , Plichta DR , et al. A defined commensal consortium elicits CD8 T cells and anti-cancer immunity [J]. *Nature* , 2019 , 565 (7741) : 600-605.