

人工蝉花对5-氟尿嘧啶诱发大鼠肠黏膜损伤的修复作用研究[△]

喻 振*, 于瑞莲#, 邵佳蔚, 杨 哲, 王 惠(南京中医药大学药学院, 南京 210046)

中图分类号 R932;R965;R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)21-2973-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.21.19

摘要 目的:研究人工蝉花对5-氟尿嘧啶(5-FU)诱发大鼠肠黏膜损伤的修复作用。方法:将40只SD大鼠随机分为正常组(生理盐水)、模型组(生理盐水)和人工蝉花高、中、低剂量(3.5、1.75、0.875 g/kg)组,每组8只。除正常组外,其余各组大鼠每日腹腔注射30 mg/kg的5-FU(0.25 g/10 mL)1次,连续5 d;同时,各组大鼠每天灌胃相应药物/生理盐水1次,连续给药8 d。给药结束后,测定各组大鼠体质量变化,苏木精-伊红染色后观察各组大鼠小肠组织病理学变化,并检测各组大鼠生物屏障相关因子[血清中内毒素(ET)、D-乳酸(D-LA)]水平和免疫屏障相关因子[血清中肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、 γ -干扰素(IFN- γ)、分泌性免疫球蛋白(sIgA)、白细胞介素15(IL-15)、集落刺激因子(G-CSF)和小肠组织中髓过氧化物酶(MPO)、丙二醛(MDA)]水平以及机械屏障相关因子(肠表面闭锁小带蛋白ZO-1和紧密连接蛋白Claudin-1)水平。结果:与正常组比较,模型组大鼠体质量显著减少($P<0.01$);肠绒毛剥落明显,隐窝结构散乱,大量炎性细胞聚集,肠黏膜损伤严重;血清中D-LA、ET和TNF- α 、IFN- γ 、MPO、G-CSF水平以及小肠组织中MDA水平均显著升高($P<0.01$);血清中sIgA、IL-15水平以及小肠组织中ZO-1、Claudin-1蛋白表达水平显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与模型组比较,人工蝉花高剂量组大鼠体质量均显著增加($P<0.01$);各给药组大鼠小肠的病理变化均得到不同程度改善,其中人工蝉花高、中剂量组小肠形态接近正常组;各给药组大鼠血清中D-LA、ET和TNF- α 、IFN- γ 、MPO、G-CSF水平以及小肠组织中MDA水平均显著降低($P<0.01$);各给药组大鼠血清中sIgA、IL-15水平以及人工蝉花高、中剂量组大鼠小肠组织中Claudin-1、ZO-1蛋白表达水平均显著升高($P<0.01$)。结论:人工蝉花可从机械屏障、免疫屏障、生物屏障等多个方面修复5-FU所致大鼠肠黏膜损伤。

关键词 人工蝉花;肠黏膜损伤;5-氟尿嘧啶;大鼠;机械屏障;生物屏障;免疫屏障

Study on Repair Effect of Artificial *Isaria cicadae* on Intestinal Mucosal Injury Induced by 5-Fluorouracil in Rats

YU Zhen, YU Ruilian, SHAO Jiawei, YANG Zhe, WANG Hui (School of Pharmacy, Nanjing University of TCM, Nanjing 210046, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the repair effect of artificial *Isaria cicadae* on intestinal mucosal injury induced by 5-fluorouracil (5-FU) in rats. METHODS: Forty SD rats were randomly divided into normal group (normal saline), model group (normal saline), artificial *I. cicadae* high-dose, medium-dose and low-dose groups (3.5, 1.75, 0.875 g/kg), with 8 rats in each group. Except for normal group, other groups were given intraperitoneal injection of 5-FU (0.25 g/10 mL) 30 mg/kg, once a day, for consecutive 5 days. At the same time, each group was given relevant medicine/normal saline intragastrically, once a day, for consecutive 8 d. After medication, body weight of rat was determined in each group. HE staining was used to observe the pathological change of small intestine. The levels of biobarrier-related factor [endotoxin (ET), D-lactic acid (D-LA)], immune barrier related factors (TNF- α , IFN- γ , sIgA, IL-15, G-CSF in serum and MPO, MDA in small intestine) and the levels of mechanical barrier related factors (connexin ZO-1 and Claudin-1) were detected. RESULTS: Compared with normal group, body weight of rats in model group was decreased significantly ($P<0.01$). Intestinal villus exfoliated obviously, the crypt structure was scattered, a large number of inflammatory cells gathered, and intestinal mucosa was seriously damaged. Serum levels of ET and D-LA, the levels of TNF- α , IFN- γ , MPO and G-CSF in serum, MDA level in small intestine were increased significantly ($P<0.01$). Serum levels of sIgA and IL-15 as well as the expressions of ZO-1 and Claudin-1 in small intestine were decreased significantly ($P<0.05$ or $P<0.01$). Compared with model group, body weight of rats in artificial *I. cicadae* high-dose group was increased significantly ($P<0.01$). The pathological changes of the small intestine of rats in each administration group were improved to varying degrees. The intestine morphology of artificial *I. cicadae* high-dose and medium-dose groups was close to that of the normal group. The levels of and ET, D-LA, TNF- α , IFN- γ , MPO, G-CSF in serum and the level of MDA in intestinal were decreased significantly ($P<0.01$). Serum levels of sIgA and IL-15 in administration groups as well as the expressions of ZO-1 and Claudin-1 in intestinal tissue were increased significantly ($P<0.01$). CONCLUSIONS: Artificial *I. cicadae* can repair intestinal mucosal damage caused by

[△] 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81673918);江苏省科技厅政策引导类计划(产学研合作)-前瞻性联合研究项目(No. BY2015008-03)

* 硕士研究生。研究方向:中药新药开发。E-mail:15651973605@163.com

通信作者:副教授,硕士生导师,博士。研究方向:中药新药开发。E-mail:yu3ruilian@163.com

5-FU in respects of mechanical barrier, immune barrier, biological barrier.

KEYWORDS Artificial *Isaria cicadae*; Intestinal mucosal injury; 5-Fluorouracil; Rat; Mechanical barrier; Biological barrier; Immune barrier

肿瘤是危害全人类健康的常见疾病和多发疾病,目前临床上常用的肿瘤治疗策略主要有手术、化疗、分子靶向抑制剂以及生物药疗法,常规化疗仍然是临床治疗肿瘤的主要方式^[1-2]。其中,以5-氟尿嘧啶(5-Fluorouracil, 5-FU)为代表的抗代谢类化疗药在化疗中占据约40%的比重^[3]。5-FU作为最早应用的抗代谢类化疗药,已在临床上广泛用于胃肠道癌、肝癌和胰腺癌等^[1-3]实体肿瘤的治疗,尤其在消化道肿瘤的治疗上占据主导地位^[4-5]。然而,5-FU在对多种癌症有良好疗效的同时,也会对消化道黏膜造成严重损伤,不仅会引起呕吐、腹泻等消化道症状^[1],甚至导致病情恶化危及生命^[3,6]。任何引起肠黏膜屏障功能障碍的因素都可以加重原有疾病,引发严重的全身炎症甚至死亡^[7],使得肿瘤患者的治疗无法进行。目前,临床上缺乏有效治疗化疗引起的肠黏膜损伤的药物及手段^[8]。因此,治疗化疗引起的肠黏膜损伤、保护肠黏膜屏障结构完整和免疫系统功能正常具有重要意义。

蝉花(*Isaria cicadae* Miquel)为麦角菌科真菌蝉拟青霉寄生竹蝉若虫后的复合体。据《本草纲目》记载,蝉花味甘,性寒,无毒,主治小儿天吊、惊痫、夜啼心悸^[9]。现代研究也报道,蝉花具有抗惊厥^[9]、抗炎^[9]、免疫调节^[10]等生物活性。但目前,野生蝉花存在着有害物质富集、不易采摘、产量低等问题^[11]。而本实验室前期通过研究栽培出的人工蝉花污染少、产量高、孢子粉含量高、品质优^[11],具有一定的应用价值。且前期实验已证实,本实验室栽培的人工蝉花具有保护庆大霉素所致大鼠急性肾损伤的作用^[12]。本研究以本实验室栽培的人工蝉花为研究对象,旨在详细研究其对5-氟尿嘧啶(5-FU)诱发的肠黏膜损伤及免疫功能下降的修复作用,为其临床应用提供参考。

1 材料

1.1 仪器

Max190全波长酶标仪(美国Spectra公司);L420离心机(湘仪离心机仪器有限公司);TANKPE060纯水仪(美国Millipore公司);BSA224S-CW电子天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司];Vortex-5涡旋混匀仪(海门市其林贝尔仪器制造有限公司);EG1150C石蜡包埋仪(德国徕卡公司);2000-C倒置显微镜、V.A1倒置荧光显微镜(德国Zeiss公司)。

1.2 药品与试剂

人工蝉花由本实验室栽培,由南京中医药大学药

院于瑞莲副教授鉴定为蝉花(*Isaria cicadae* Miquel)菌种的人工栽培品;5-FU注射液(天津金耀药业有限公司,批号:1605081,规格:0.25 g/10 mL);大鼠内毒素(ET)酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒(批号:H03A8E48592)、D-乳酸(D-LA)ELISA试剂盒(批号:H02F4E48101)、分泌型免疫球蛋白(sIgA)ELISA试剂盒(批号:H13C3E76192)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)ELISA试剂盒(批号:H06A2E50672)、 γ -干扰素(IFN- γ)ELISA试剂盒(批号:H06F6E23206)、白细胞介素15(IL-15)ELISA试剂盒(批号:H03A3F06703)、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)ELISA试剂盒(批号:H05A7E46872)、髓过氧化物酶(MPO)ELISA试剂盒(批号:H03F8E34274)、丙二醛(MDA)ELISA试剂盒(批号:H04A6E40382)、闭锁小带蛋白ZO-1 ELISA试剂盒(批号:H03A2E78452)均购自上海源叶生物科技有限公司;DAPI染色液(南京建成生物有限公司,批号:SUB-30162);兔源紧密连接蛋白Claudin 1-1抗(批号:ab240400);山羊抗兔免疫球蛋白(IgG)二抗(批号:ab150077)均购自美国Abcam公司。

1.3 动物

SPF级健康SD大鼠40只,♂,体质量(215±35)g,由南京市青龙山动物繁殖场提供,动物生产许可证号:SCXK(苏)2017-0008。所有大鼠饲养于南京中医药大学实验动物房内,环境温度为(23±2)℃、12 h/12 h昼夜循环。饲养期间大鼠自由进食、饮水,适应性饲养1周后进行实验。本实验遵守《实验动物护理和使用指南》,符合动物常规伦理。

2 方法

2.1 动物分组与造模

将40只SD大鼠随机分为正常组、模型组和人工蝉花高、中、低剂量组,每组8只。除正常组外,模型组和人工蝉花各剂量组大鼠均每天腹腔注射1次30 mg/kg的5-FU^[7],正常组大鼠腹腔注射等量生理盐水,持续注射5 d。在此同时,人工蝉花高、中、低剂量组大鼠在注射5-FU后1 h分别灌胃3.5、1.75、0.875 g/kg的人工蝉花溶液(将干燥人工蝉花粉末用生理盐水制备的悬液,剂量根据预实验结果和本实验室前期研究报道设置^[9]),正常组和模型组大鼠灌胃等体积生理盐水;各组大鼠均每天给药1次,连续给药8 d,记录大鼠体质量等一般情况变化。

2.2 血清中ET、D-LA含量测定

末次给药后2 h,大鼠腹主动脉取血,室温静置1 h,

凝固收缩后,3 000 r/min 离心 10 min,分离血清,然后于-20 ℃保存,备用。按相应试剂盒说明书操作,检测血清中ET、D-LA的含量,考察其对小肠黏膜生物屏障功能的影响。

2.3 血清中sIgA、TNF- α 、IFN- γ 、IL-15含量测定

取“2.2”项下血清,按相关试剂盒说明书操作,对血清中sIgA、TNF- α 、IFN- γ 、IL-15的含量进行测定,考察其对小肠黏膜免疫功能的影响。

2.4 血清中MPO活性测定

取“2.2”项下血清,按试剂盒说明书操作,对血清中G-CSF的含量进行测定。大鼠取血后,腹腔解剖取小肠组织约40 mg匀浆[组织与生理盐水比为1:10(mg/mL)],用于试剂盒检测,剩余部分病理组织检查待用。按检测试剂盒说明书操作,对小肠组织中MPO活性进行测定,考察其对小肠炎症因子的影响。

2.5 小肠组织中MDA含量测定

取“2.4”项下小肠组织,按检测试剂盒说明书操作,对小肠组织中MDA的含量进行测定,考察其对小肠组织过氧化水平的影响。

2.6 小肠黏膜病理学观察

将小肠于10%多聚甲醛溶液固定24 h,然后进行常规组织包埋、石蜡切片等操作,经苏木精-伊红(HE)染色后显微镜下观察小肠黏膜病理变化。

2.7 小肠组织中ZO-1、Claudin 1蛋白表达测定

2.7.1 ZO-1蛋白 取“2.4”项下小肠组织,按检测试剂盒说明书操作,对小肠组织中ZO-1的含量进行测定。

2.7.2 Claudin 1蛋白 取大鼠小肠组织石蜡切片,经脱蜡、梯度脱水后,进行抗原修复,用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤3次;用2%牛血清白蛋白(BSA)室温封闭30 min, PBS洗涤2次;滴加适量用2% BSA稀释的Claudin 1一抗(1:200),4 ℃过夜;次日用PBS洗涤2次,滴加适量二抗,室温下封闭2 h,用PBS洗涤2次;滴加DAPI染液,室温下染色10 min, PBS洗涤2次;用滤纸吸取多余的PBS溶液,滴加少量抗荧光猝灭剂,盖片,荧光显微镜下观察Claudin 1蛋白表达情况(蓝色荧光为DAPI,绿色荧光为Claudin 1蛋白),并应用Image J 1.8.0软件测定灰度值对蛋白表达进行定量分析。

2.8 统计学方法

采用SPSS 22.0软件对数据进行统计分析。所有结果均以 $\bar{x} \pm s$ 的形式表示,多组间均数比较采用单因素方差分析,两组间均数比较采用*t*检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 一般情况观察结果

给药前,各组大鼠间体质量差异均无统计学意义

($P > 0.05$)。给药8 d后,与正常组比较,模型组大鼠体质量显著降低($P < 0.01$),此外还出现了明显的食欲不振、精神萎靡、活力下降等症状。与模型组比较,人工蝉花高剂量组大鼠体质量均显著升高($P < 0.01$),食欲不振、精神萎靡等情况也得到明显改善。各组大鼠体质量测定结果见表1。

表1 各组大鼠体质量测定结果($\bar{x} \pm s, n=8, g$)

Tab 1 Results of body weight of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=8, g$)

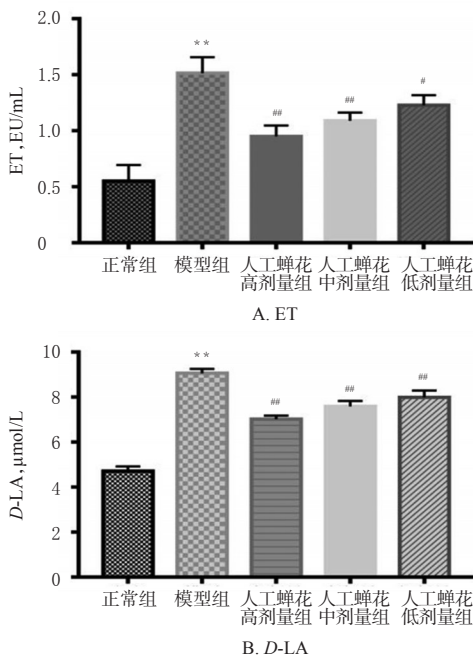
组别	给药前	给药第8天
正常组	206.50 \pm 10.73	243.00 \pm 6.93
模型组	236.75 \pm 15.08	193.75 \pm 13.96**
人工蝉花高剂量组	219.50 \pm 21.24	202.38 \pm 23.62##
人工蝉花中剂量组	211.75 \pm 20.13	191.00 \pm 16.42
人工蝉花低剂量组	219.50 \pm 10.99	193.13 \pm 12.57

注:与正常组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,## $P < 0.01$

Note: vs. normal group, ** $P < 0.01$; vs. model group, ## $P < 0.01$

3.2 对小肠黏膜屏障功能的影响结果

与正常组比较,模型组大鼠血清中ET、D-LA含量显著升高($P < 0.01$)。与模型组比较,人工蝉花高、中、低剂量组大鼠血清中ET、D-LA含量均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),且呈剂量依赖性趋势。各组大鼠血清中ET、D-LA含量测定结果见图1。



注:与正常组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,* $P < 0.05$,## $P < 0.01$

Note: vs. normal group, ** $P < 0.01$; vs. model group, * $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

$P < 0.01$

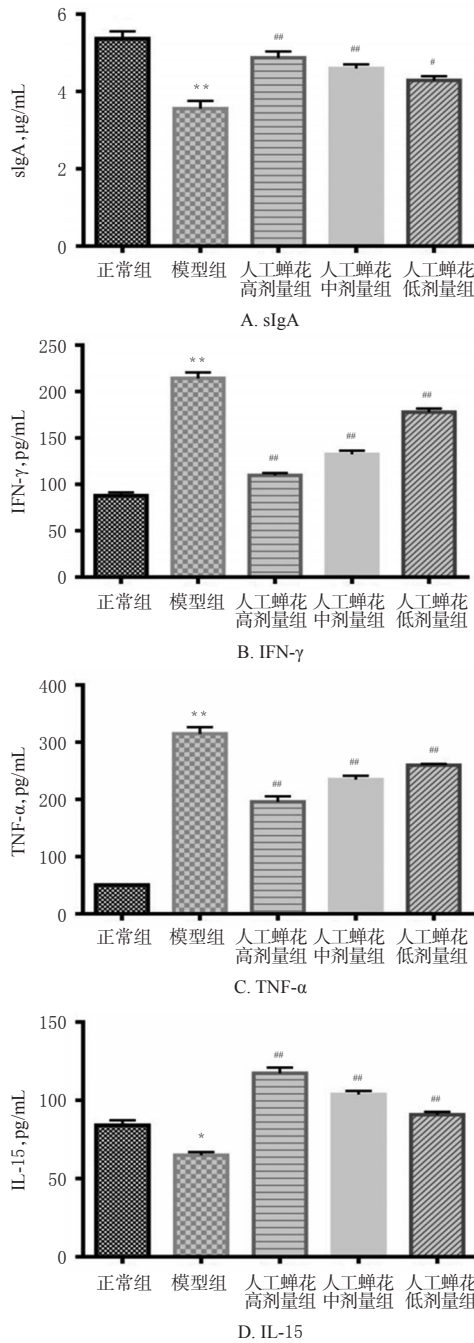
图1 各组大鼠血清中ET、D-LA含量测定结果

Fig 1 Results of serum contents of ET and D-LA of rats in each group

3.3 对小肠黏膜免疫功能的影响结果

与正常组比较,模型组大鼠血清中sIgA、IL-15含量

显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$), IFN- γ 、TNF- α 含量显著升高($P<0.01$)。与模型组比较,人工蝉花高、中、低剂量组大鼠血清中sIgA、IL-15含量均显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$), IFN- γ 、TNF- α 含量显著降低($P<0.01$), 并呈剂量依赖性趋势。各组大鼠血清中sIgA、IFN- γ 、TNF- α 和IL-15含量测定结果见图2。



注:与正常组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$

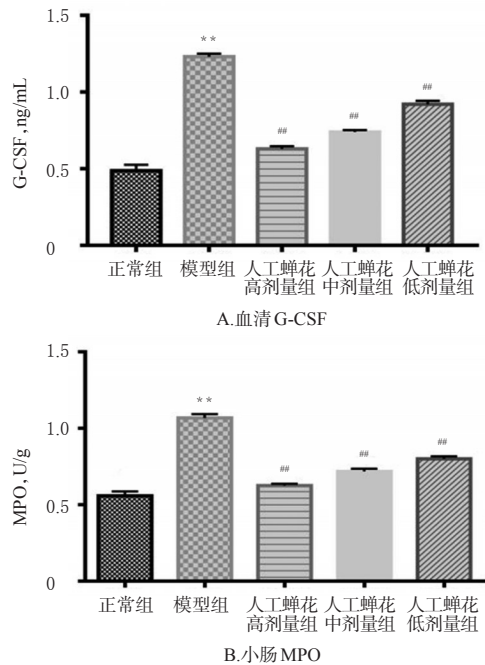
Note: vs. normal group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; vs. model group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$

图2 各组大鼠血清中sIgA、IFN- γ 、TNF- α 和IL-15含量测定结果

Fig 2 Results of serum contents of sIgA, IFN- γ , TNF- α and IL-15 of rats in each group

3.4 对小肠炎症因子的影响结果

与正常组比较,模型组大鼠血清中G-CSF含量和小肠组织中MPO活性均显著升高($P<0.01$)。与模型组比较,人工蝉花高、中、低剂量组大鼠血清中G-CSF含量和小肠组织中MPO活性均显著降低($P<0.01$), 并呈剂量依赖性。各组大鼠血清中G-CSF含量和小肠组织中MPO活性测定结果见图3。



注:与正常组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,## $P<0.01$

Note: vs. normal group, ** $P<0.01$; vs. model group, ## $P<0.01$

图3 各组大鼠血清中G-CSF含量和小肠组织中MPO活性测定结果

Fig 3 Results of the content of G-CSF in serum and the activity of MPO in the small intestine of rats in each group

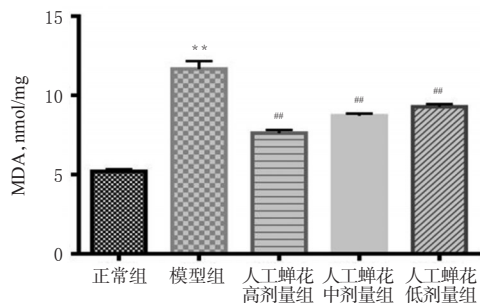
3.5 对小肠组织过氧化水平的影响结果

与正常组比较,模型组大鼠小肠组织中MDA含量显著升高($P<0.01$)。与模型组比较,人工蝉花高、中、低剂量组大鼠小肠组织中MDA含量显著降低($P<0.01$), 并呈剂量依赖性趋势。各组大鼠小肠组织中MDA含量测定结果见图4。

3.6 对小肠黏膜病理学的检查结果

正常组大鼠肠腔绒毛形态完整,隐窝结构清晰。模型组大鼠肠绒毛剥落明显,隐窝结构散乱,可观察到大量炎性细胞聚集,肠黏膜损伤严重。与模型组比较,人工蝉花高、中、低剂量组大鼠的肠腔绒毛和隐窝结构形态较完整,损伤程度较小;其中,人工蝉花高剂量、中剂量组大鼠肠绒毛已接近正常,人工蝉花高剂量组大鼠隐窝结构较为紧密、完整,人工蝉花低剂量组大鼠小肠组织隐窝结构虽较正常组有一定程度的破坏、中性粒细胞

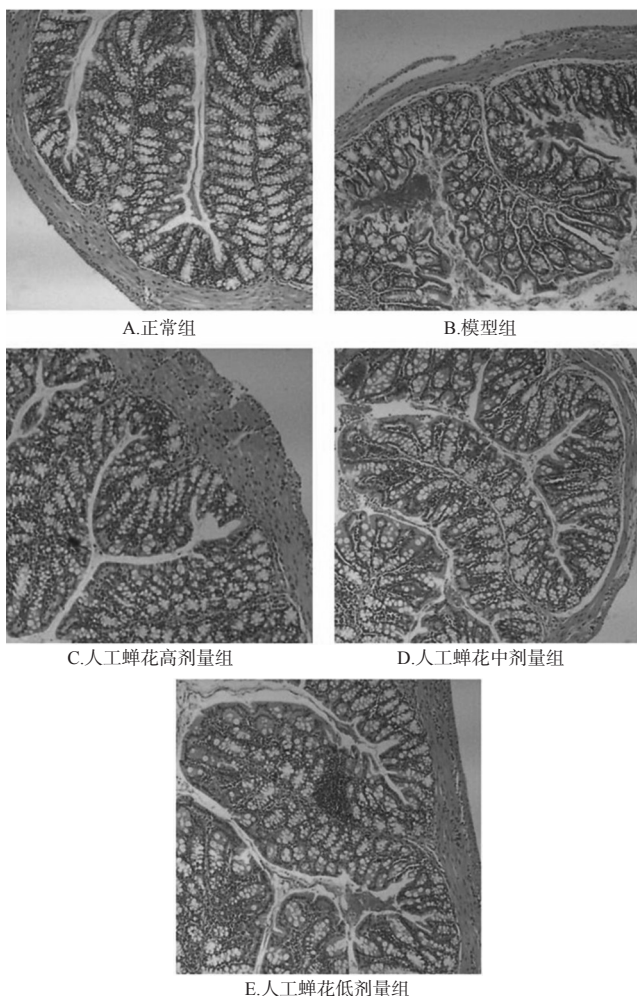
聚集,但相比于模型组结构仍较好。各组大鼠小肠组织病理切片图见图5。



注:与正常组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,### $P < 0.01$
 Note: vs. normal group, ** $P < 0.01$; vs. model group, ### $P < 0.01$

图4 各组大鼠小肠组织中MDA含量测定结果

Fig 4 Results of the content of MDA in the small intestine of rats in each group



A.正常组

B.模型组

C.人工蝉花高剂量组

D.人工蝉花中剂量组

E.人工蝉花低剂量组

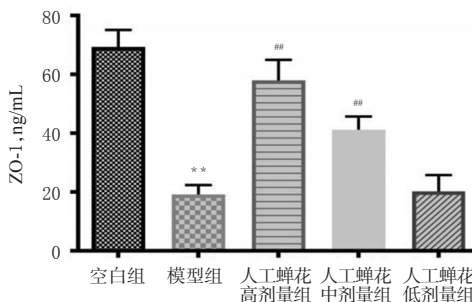
图5 各组大鼠小肠病理切片图(HE染色,10×10)

Fig 5 Pathological sections of small intestine of rats in each group (HE staining, 10×10)

3.7 对肠黏膜屏障完整性的影响结果

3.7.1 对小肠组织中ZO-1蛋白表达的影响结果 与正常组比较,模型组大鼠小肠组织中ZO-1蛋白表达水平

显著降低($P < 0.01$)。与模型组比较,人工蝉花高、中剂量组大鼠小肠组织中ZO-1蛋白表达水平显著升高($P < 0.01$),但人工蝉花低剂量组大鼠小肠组织中ZO-1蛋白表达水平差异无统计学意义($P > 0.05$)。各组大鼠小肠组织中ZO-1蛋白表达水平测定结果见图6。



注:与正常组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,### $P < 0.01$
 Note: vs. normal group, ** $P < 0.01$; vs. model group, ### $P < 0.01$

图6 各组大鼠小肠组织中ZO-1蛋白表达水平测定结果

Fig 6 Results of the protein expression of ZO-1 in the small intestine of mice in each group

3.7.2 对小肠组织中Claudin-1蛋白表达的影响结果 正常组、模型组和人工蝉花高、中、低剂量组的灰度值分别为(11.67 ± 1.50)、(2.54 ± 0.56)、(8.35 ± 0.97)、(5.60 ± 0.73)、(3.29 ± 0.72)($n = 8$)。与正常组比较,模型组大鼠小肠组织中Claudin-1蛋白表达水平显著降低($P < 0.01$)。与模型组比较,人工蝉花高、中剂量组大鼠小肠组织中Claudin-1蛋白表达水平显著升高($P < 0.01$),但人工蝉花低剂量组大鼠小肠组织中Claudin-1蛋白表达水平差异无统计学意义($P > 0.05$)。各组大鼠小肠组织中Claudin-1蛋白表达的免疫荧光图见图7。

4 讨论

正常的肠道黏膜屏障由机械屏障、化学屏障、免疫屏障和生物屏障共同组成。通过对肠黏膜病理切片的观察,发现5-FU化疗之后,大鼠小肠绒毛和隐窝结构均受到了严重的损伤,导致肠黏膜屏障功能受到严重的影响,机体无法正常地进行营养吸收,表现为体质量下降和血清中ET含量显著升高。*D-LA*是肠道细菌代谢、裂解的产物,当肠道缺血时,肠黏膜生物屏障破坏,此时肠道中细菌产生的大量*D-LA*,通过受损的肠黏膜经循环进入血液,检测血中*D-LA*水平可以反映肠黏膜受损程度和通透性变化^[13]。本研究结果显示,模型组大鼠血清中*D-LA*含量显著升高,灌胃人工蝉花后,肠黏膜得到明显保护,血清中ET和*D-LA*含量均显著降低,并且大鼠因化疗造成的体质量下降的情况也有显著的改善,表明人工蝉花对5-FU化疗后破坏的肠黏膜营养吸收以及肠黏膜生物屏障有明显的保护作用。

FU化疗后,肠道产生分泌性免疫球蛋白的功能明

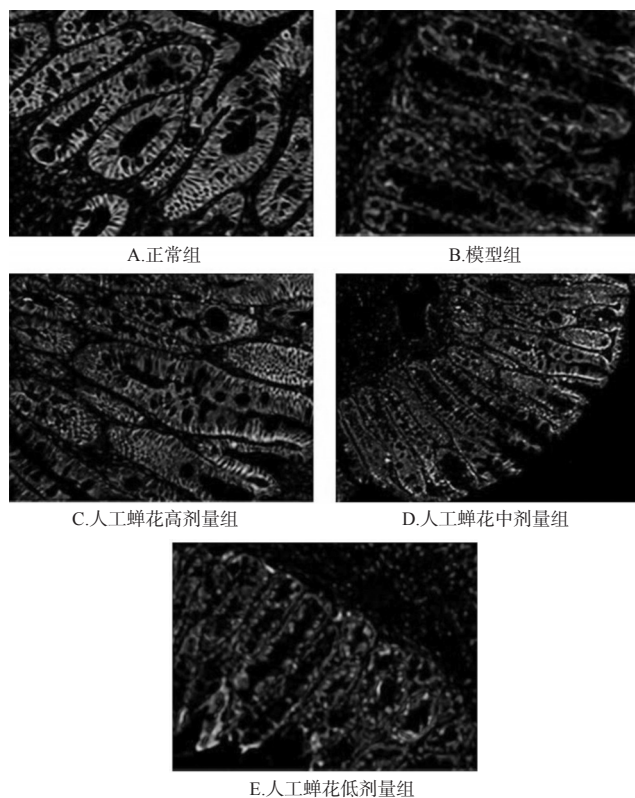


图7 各组大鼠小肠组织中 Claudin-1 蛋白表达的免疫荧光染色图(10×10)

Fig 7 Immunofluorescence staining of Claudin-1 protein in small intestine of rats in each group (10×10)

显受到抑制,表现为 sIgA 含量减少,由肠道固有层浆细胞和肠上皮细胞分泌组装的 sIgA 是构成肠道黏膜免疫的重要组成部分,是防御病菌在肠道黏膜粘附和定植的第一道防线^[14]。本研究结果显示,5-FU 化疗破坏了大鼠肠黏膜的免疫屏障,表现为大鼠血清中 sIgA 含量显著降低;而给予人工蝉花后,大鼠血清中 sIgA 含量不同程度升高,提示肠黏膜免疫屏障得到了有效保护。Th1 细胞因子(如 IFN- γ)、上皮细胞分泌促炎性因子(如 TNF- α)以及免疫抗炎性因子(如 IL-15)等细胞因子,可以调节免疫细胞功能,维护黏膜免疫的屏障功能^[14-15]。本研究结果显示,5-FU 化疗后大鼠血清中 IFN- γ 、TNF- α 含量均异常升高,给予人工蝉花后,大鼠血清中 TNF- α 、IFN- γ 含量显著降低,提示人工蝉花有明显的抗炎疗效,可能是通过抑制 TNF- α 、IFN- γ 的异常表达,维护黏膜免疫,从而发挥保护肠黏膜的作用。IL-15 是在小肠陷窝细胞中发现的一个细胞因子,其能促进小肠上皮细胞中度增生,维护正常肠黏膜 CD8⁺T 细胞增殖、促进 sIgA 的分泌^[16-17],对化疗后肠黏膜损伤有修复功能^[17-18]。本研究结果显示,5-FU 化疗后大鼠血清中 IL-15 含量显著降低,表明 5-FU 化疗可能使免疫抗炎性因子降低;而给予人工蝉花后,大鼠血清中 IL-15 含量明显升高,且高于正常组大鼠

水平,这表明人工蝉花能促进血清中 IL-15 的生成,以增强肠免疫屏障,对肠黏膜损伤具有一定的保护作用。

集落刺激因子是一组功能很强的骨髓造血细胞增殖因子,G-CSF 为其中一种,可以促进中性粒细胞集落的形成,延长成熟中性粒细胞的存活时间,活化中性粒细胞,在抗感染的非特异性细胞免疫过程中起重要作用。当化脓菌或其毒素侵入时,G-CSF 在血清或体液中含量迅速升高,并在感染得到控制后又降至正常水平^[19]。本研究结果显示,模型组大鼠小肠组织中 G-CSF 含量较正常组明显升高,而给予人工蝉花后其含量显著降低,说明人工蝉花对 G-CSF 有一定的调控作用,从而影响中性粒细胞的增殖、分化和活化,减少成熟中性粒细胞的存活时间,减轻中性粒细胞呼吸爆发对肠组织的损伤。MPO 是由中性粒细胞、单核细胞和某些组织的巨噬细胞分泌的含血红素辅基的血红素蛋白酶,MPO 的合成是粒细胞进入循环之前在骨髓内合成并贮存于嗜天青颗粒内,外界刺激可导致中性粒细胞聚集,释放 MPO^[20]。因此,MPO 的活性高低反映了中性粒细胞浸润程度,肠道组织中 MPO 表达与肠道炎症的严重程度呈正相关。本研究结果显示,5-FU 化疗后大鼠小肠组织中 MPO 活性较正常大鼠显著升高,而给予人工蝉花后,大鼠小肠组织中异常升高的 MPO 活性显著降低,这说明人工蝉花能有效减轻肠道炎症,保护肠黏膜。体内氧自由基通过参与脂质过氧化反应,并产生脂质过氧化物(如 MDA),脂质过氧化反应和脂质过氧化物的分解产物都能引起细胞膜结构受损、炎症介质大量释放^[21]。通过检测 MDA 含量,可以反映脂质过氧化物程度,间接评价细胞、组织受损程度^[22-23]。本研究结果显示,5-FU 化疗后大鼠小肠组织中 MDA 含量显著升高,而给予人工蝉花,可显著降低其小肠组织中 MDA 含量,这说明人工蝉花能抑制肠组织过氧化反应,对抗肠组织损伤,促进维持肠免疫屏障稳态。

肠上皮细胞通过表达闭锁小带蛋白 ZO-1、紧密连接蛋白 Claudin-1 等蛋白来维持肠上皮的完整和紧密连接性,以抵抗菌群和外界病原体的入侵^[24]。肠道菌、化疗药物及其他氧化应激等刺激,均可能破坏表面连接蛋白^[22,24],使肠屏障不再完整,导致肠道的通透性增加,进而引发各种疾病^[14,24]。本研究结果显示,5-FU 化疗后大鼠小肠组织中 ZO-1 和 Claudin-1 蛋白水平较正常大鼠显著降低,而给予人工蝉花后能有效提高小肠组织中 ZO-1 和 Claudin-1 蛋白表达水平,表明人工蝉花能够通过提高肠上皮表面连接蛋白水平,发挥对肠上皮机械屏障的保护作用。

癌症已成为我国第一大死因,常规的化疗仍然是临床治疗肿瘤的主要方式,而化疗药物在杀伤癌细胞的同时,对消化道黏膜造成严重损伤,引起肠黏膜屏障功能

障碍以及其他严重副作用,使得肿瘤患者治疗无法进行,甚至加重原有疾病直至死亡。现在,肿瘤临床治疗理念开始转向对癌症患者生活质量的关注,人们更加重视对化疗不良反应的防治,维护患者的生活质量。通过对上述实验数据的分析发现,本实验室栽培的蝉花能从机械屏障、免疫屏障、生物屏障等多方面修复5-FU化疗后出现的肠黏膜损伤,维持肠道正常的组织结构,对于改善患者化疗时的生活质量具有一定临床应用价值。

参考文献

- [1] LONGLEY DB, HARKIN DP, JOHNSTON PG. 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2003, 3(5): 330-338.
- [2] MAEHARA Y, OKI E, SAEKI H, et al. Evolving 5-Fluorouracil therapy to achieve enhanced efficacy-past and current efforts of researchers[J]. *Gan to Kagaku Ryoho*, 2016, 43(7): 845-854.
- [3] SORRENTINO MF, KIM J, FODERARO AE, et al. 5-Fluorouracil induced cardiotoxicity: review of the literature [J]. *Cardiology Journal*, 2012, 19(5): 453-457.
- [4] LIU L, JIN P, CHENG M, et al. 5-Fluorouracil-loaded self-assembled pH-sensitive nanoparticles as novel drug carrier for treatment of malignant tumors[J]. *Chinese J Chem Eng*, 2006, 14(3): 377-382.
- [5] KAISER N, KIMPFLER A, MASSING U, et al. 5-Fluorouracil in vesicular phospholipid gels for anticancer treatment: entrapment and release properties[J]. *Int J Pharm*, 2003, 256(1): 123-131.
- [6] 孙维彤,陈倩倩,张娜,等. 5-氟尿嘧啶前体药物研究进展[J]. *生命的化学*, 2014, 34(2): 269-274.
- [7] 郑梦颖,陈晓品. 化疗药物对重要脏器不良反应的研究进展[J]. *重庆医学*, 2012, 41(14): 1431-1433.
- [8] 蒙焯,黄永坤. 化疗药物对肠黏膜屏障的损伤及其防治[J]. *医学综述*, 2012, 18(9): 1325-1327.
- [9] 张忠亮,王玉芹,樊美珍. 培育蝉花改善小鼠睡眠功能的试验研究[J]. *哈尔滨商业大学学报*, 2016, 32(6): 663-667.
- [10] 宋捷民,陈玲,陈玮,等. 蝉花对免疫功能影响的实验研究[J]. *中国中医药科技*, 2007, 14(1): 37-38.
- [11] 卞智慧,于瑞莲,魏思敏,等. 蝉花、蛹虫草和冬虫夏草药材中脂肪酸含量的比较研究[J]. *中国药房*, 2017, 28(30): 4252-4256.
- [12] 邵佳蔚,于瑞莲,喻振,等. 人工蝉花子实体对庆大霉素所致小鼠急性肾衰竭的影响及机制研究[J]. *中国药房*, 2018, 29(19): 61-65.
- [13] 王志华,蔡金芳,汪伟,等. 丙氨酰-谷氨酰胺在重度颅脑损伤治疗中的应用价值研究[J]. *中国全科医学*, 2011, 14(3): 277-279.
- [14] MACPHERSON AJ, HUNZIKER L, MCCOY K. IgA responses in the intestinal mucosa against pathogenic and non-pathogenic microorganisms[J]. *Microbes & Infection*, 2001, 3(12): 1021-1035.
- [15] THAISS CA, ELINAV E. NF- κ B regulation by NLRs: T cells join the club[J]. *Immunity*, 2015, 42(4): 595-597.
- [16] 段静思,张建华,徐岩. 急性冠状动脉综合征标志物预测价值的新进展[J]. *心血管病学进展*, 2011, 32(6): 806-808.
- [17] 付靖楠,周黎,马熙. 小肠内排列术对急性广泛粘连性肠梗阻的临床疗效及其对血清DAO、MDA的影响[J]. *解放军医药杂志*, 2017, 29(5): 68-71.
- [18] 宋厚盼,李如意,魏艳霞,等. 四君子汤含药血清上调c-Myc表达促进小肠上皮细胞迁移和增殖[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2016, 22(22): 154-159.
- [19] 张国华,吕琳. 血府逐瘀汤、温胆汤和天麻钩藤饮对自发性高血压大鼠心肌组织内IGF-1和TGF- β_1 表达的影响[J]. *中药材*, 2013, 36(1): 109-111.
- [20] KRUIDENIER L, VERSPAGET HW. Oxidative stress as a pathogenic factor in inflammatory bowel disease-radicals or ridiculous[J]. *Aliment Pharm Therap*, 2002, 16(12): 1997-2015.
- [21] 杨萍,刘琳娜,石磊,等. 唐古特大黄多糖组分1对辐射损伤所致肠上皮细胞凋亡的保护作用及其可能的机制[J]. *现代生物医学进展*, 2012, 12(35): 6830-6833.
- [22] 陈茜,屠伟峰. 氧化应激性肠上皮细胞损伤与MAPK信号通路的关系研究[J]. *热带医学杂志*, 2011, 11(9): 1004-1006.
- [23] 刘琳娜,张峰,梅其炳,等. 唐古特大黄多糖对过氧化氢诱导的肠上皮细胞凋亡的保护作用及其可能机制[J]. *中国药理学通报*, 2010, 26(7): 877-881.
- [24] UNGARO R, MEHANDRU S, ALLEN PB, et al. Ulcerative colitis[J]. *Lancet*, 2016, 389(1016): 1756-1770.

(收稿日期:2019-05-21 修回日期:2019-09-03)

(编辑:林 静)

《中国药房》杂志——中国科技论文统计源期刊, 欢迎投稿、订阅