

五味子多糖对化疗性肠道黏膜炎小鼠的保护作用

周卫东¹, 项磊¹, 陈泽伟¹, 卢汉琪¹, 罗仁¹, 孙晓敏¹, 赵晓山^{1*}, 谭为^{2,3,4*}

(1. 南方医科大学中医药学院, 广州 510515; 2. 广东省人民医院, 广州 510080;
3. 广东省医学科学院, 广州 510080; 4. 广东省老年医学研究所, 广州 510080)

[摘要] **目的:**观察五味子多糖对5-氟尿嘧啶(5-FU)引起的肠道黏膜炎的治疗作用及探讨其作用机制。**方法:**使用5-FU造模,将小鼠随机分为正常组,模型组,多糖高、中、低剂量组(20,10,5 mg·kg⁻¹)。观测小鼠腹泻和体重情况;将小鼠处死后,通过测量小肠绒毛高度、隐窝深度、以及计算绒毛高度/隐窝深度比值进行形态学评价;通过酶联免疫(ELISA)法测定小肠组织白细胞介素-1 β (IL-1 β),IL-6,肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的含量。**结果:**给药第4天,与模型组相比,高、中剂量多糖组体重比明显提高($P < 0.01$);高、中剂量多糖组大便得分显著低于模型组($P < 0.05, P < 0.01$)。五味子多糖显著抑制5-FU引起的小肠肠绒毛高度缩短、隐窝深度值更大、绒毛高度/隐窝深度比减少($P < 0.01$);明显降低TNF- α ,IL-1 β ,IL6水平($P < 0.01$)。**结论:**五味子多糖能改善5-FU引起的肠道黏膜炎症状,其作用机制可能与通过抑制TNF- α ,IL-1 β ,IL6等炎症因子的水平有关。

[关键词] 五味子多糖; 5-氟尿嘧啶; 肠道黏膜炎

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)22-0124-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016220124

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160906.0908.020.html>

[网络出版时间] 2016-09-06 9:08

Schisandrae Chinensis Fructus Polysaccharide Protects Against Chemotherapy-Induced Enteritis in Mice Models

ZHOU Wei-dong¹, XIANG Lei¹, CHEN Ze-wei¹, LU Han-qi¹, LUO Ren¹,
SUN Xiao-min¹, ZHAO Xiao-shan^{1*}, TAN Wei^{2,3,4*}

(1. *Traditional Chinese Medicine College, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China;*
2. *Guangdong General Hospital, Guangzhou 510080, China;*
3. *Guangdong Provincial Academy of Medicine, Guangzhou 510080, China;*
4. *Guangdong Institute of Gerontology Research, Guangzhou 510080, China*)

[Abstract] **Objective:** To observe the therapeutic effect of Schisandrae Chinensis Fructus polysaccharide (SCFP) on 5-fluorouracil (5-FU) induced gastrointestinal mucositis and explore the underlying mechanism. **Method:** 5-FU was used to establish models and the mice were randomly divided into normal group, control group, low-dose polysaccharide (LDP) group, middle-dose polysaccharide (MDP) group and high-dose polysaccharide (HDP) group (5, 10, and 20 mg·kg⁻¹ respectively). Body weight and scoring for diarrhoea index were recorded. After the mice were sacrificed, small intestinal villous height and crypt depth were measured for orphological evaluation; the levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), interleukin-1 β (IL-1 β) in the intestinal tissues were determined by ELISA. **Result:** On day 4 of treatment, as compared with the

[收稿日期] 20160115(010)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81302958,81373707);广州市产学研重大专项(2014Y2-00504)

[第一作者] 周卫东,博士,住院医师,从事常见慢性病的中西医结合防治研究,Tel:0790-6651021,E-mail: 599301644@qq.com

[通讯作者] *赵晓山,研究员,副主任医师,从事常见慢性病的中西医结合防治研究,Tel:020-61648767,E-mail: zhaoxs0609@163.com;

*谭为,主治医师,从事常见肿瘤的中医药防治,Tel:020-83827812-70521,E-mail: tanweiyao@163.com

control group, the body weight loss in MDP group and HDP group was inhibited significantly ($P < 0.01$); diarrhoea scores of mice in MDP group and HDP group were significantly decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). SCFP significantly inhibited the shortening of villus heights, enlarging of crypts depths and redecresing of villus heights/crypts depths ratio in small intestine induced by 5-Fu ($P < 0.01$). The levels of TNF- α , IL-1 β , and IL-6 in mice treated with SCFP were significantly decreased in comparison with the normal group ($P < 0.01$). **Conclusion:** Our results suggest that SCFP could improve the symptoms of gastrointestinal mucositis induced by 5-FU, and the mechanism may be associated with inhibiting the levels of TNF- α , IL-6 and IL-1 β .

[**Key words**] Schisandrae Chinensis Fructus polysaccharide; 5-fluorouracil; gastrointestinal mucositis

肠道黏膜炎是化疗患者常见的不良反应,化疗引起的消化道黏膜炎达 40%,而大剂量化疗患者的黏膜炎发生率达 76%^[1]。严重的溃疡、炎症及出血可发生在胃肠道任何部位,好发于小肠^[2]。化疗性肠道黏膜炎发生的机制目前并不十分清楚,以前的观点认为黏膜炎的发生是主要由于化疗药物对黏膜上皮组织的直接损伤,然而随着研究的进一步深入,为更好地了解其发病机制,Sonis^[3]将其病理分为 5 个阶段:开始阶段、初级损害与信号传导阶段、信号放大阶段、溃疡阶段和愈合阶段。黏膜炎的发展与促炎因子[如肿瘤坏死因子- α (TNF- α),白细胞介素-6 (IL-6),白细胞介素-1 β (IL-1 β),干扰素- γ (IFN- γ)]水平的上升所导致黏膜、组织的损伤有密切相关。目前临床治疗化疗引起的胃肠道黏膜炎手段主要有雷尼替丁和奥美拉唑等治疗上腹部疼痛,格拉司琼或昂丹司琼等止吐,益生菌等饮食干预调节肠道菌群,及一些细胞因子或生长因子等治疗,但其预防或者治疗胃肠道黏膜炎效果有限^[4]。课题组前期研究发现,五子衍宗丸能够对化疗产生的毒副作用有一定的缓解作用^[5],实验中大量筛选复方中有效成分,结果发现五味子多糖对化疗引起的毒副作用有较好的效果。本实验拟采用 5-FU 诱导小鼠肠道黏膜炎模型,观察五味子多糖治疗 5-FU 引起的肠道黏膜炎的疗效,评价其对炎症因子的影响,并对其抗炎机制进行初步分析。

1 材料

7 周龄 SPF 级 BALB/c 雄性小鼠 50 只,体重 18 ~ 22 g,由广东医学实验动物中心提供,合格证号 SCXK(粤)2013-0002。实验前全部小鼠适应性喂养 7 d,室温 22 ~ 26 °C,相对湿度 40% ~ 60%,明暗交替 12 h,自由饮水、采食。

制五味子(产地山西,广东天诚中药饮片有限公司提供,批号 111002;经南方医科大学中医药学院田恩伟讲师鉴定为木兰科植物五味子 *Schisandra chinensis* 的干燥成熟果实);5-FU (Sigma 公司,货号

F6627);TNF- α ,IL-6,IL-1 β 酶联免疫(ELISA)试剂盒(均购于美国 R&D Systems 公司,批号分别为 DTA00C,DLB50,D6050)。

N-1001D-WA 型系列旋转蒸发器(东京理化器械株式会社),NT-5 型低温高速离心机(美国 Themrol Electron 公司),Eclipse Ni 型显微镜(日本尼康),FD8508 型冻干机(美国西盟公司),Enspire 型多功能酶标仪(美国 PerkinElmer 公司),RM2135 型切片机(德国 Leica 仪器公司)。

2 方法

2.1 五味子多糖的制备 称取粉碎的五味子粗粉 200 g 置于烧瓶中,加石油醚 1 600 mL 回流 2 次(90 °C 水浴),冷却,过滤,得药渣,将药渣风干。水提醇沉 2 次,过滤,得沉淀。依次用无水乙醇、丙酮、乙醚洗涤,风干,加水复溶,Sevage 法除蛋白(Sevage 试剂-三氯甲烷-正丁醇 25:5:1,充分振荡,分离,得清液)10 次,得水溶液。将水溶液置于旋转蒸发器接收瓶中,挥去有机溶剂,将溶液浓缩,加入 5 倍 95% 乙醇,过夜,过滤,得沉淀,将其置于烧瓶中,加入水复溶解,使用旋转蒸发器挥去乙醇,得黏稠状浸膏,将其真空冷冻干燥,得五味子多糖。使用硫酸-苯酚法测定含量,检测波长为 490 nm^[6],所得五味子多糖质量分数为 82.93%。

2.2 分组和给药 小鼠随机分为正常组、模型组、多糖组(高、中、低剂量组),每组 10 只;给药前,将五味子多糖溶于生理盐水,配成不同浓度的多糖溶液,0.22 μ m 滤膜滤过(无菌操作),即得五味子多糖注射液。模型组和多糖组给予腹腔注射 5-FU (50 mg·kg⁻¹),第 1 次给药记为给药第 0 天,每天上午 8:00 给药,每天 1 次,连续给药 3 次,正常组注射相应体积 pH 7.4 的 PBS;高、中、低多糖组分别给予腹腔注射五味子多糖 20,10,5 mg·kg⁻¹,从给药第 0 天起,每天上午 9:00 给药,每天 1 次,连续 5 次,正常组和模型组注射相应体积生理盐水。

2.3 观测指标

2.3.1 腹泻和体重情况 给药第 0 天开始观测大便的情况和测量体重情况。体重的改变通过体重比表示。腹泻症状评分:0 分,正常;1 分,微湿;2 分,中等湿度;3 分,松散便;4 分,水样便^[7]。

体重比 = 第 *n* 天的体重 / 第 0 天的体重 × 100%

2.3.2 组织学评价 末次给药,禁食 12 h 后,用 1% 戊巴比妥钠麻醉小鼠,打开腹腔,取距空肠始端 3 cm 处约 2 cm 新鲜的小鼠组织,4% 多聚甲醛溶液固定 24 h,行脱水、透明、浸蜡后包埋组织,病理切片行苏木精-伊红染色(HE),镜下观察。通过测量的空肠绒毛长度、隐窝深度、空肠绒毛长度/隐窝深度比值来评价其形态学的改变。

2.3.3 ELISA 检测 取空肠组织 50 mg,使用匀浆器匀浆后,在低温离心机 3 000 r·min⁻¹ 离心 15 min,取上清液。含量测定方法严格按 TNF-α, IL-6, IL-

1β 试剂盒说明书操作。

2.4 统计学方法 采用软件 SPSS 22.0 进行统计分析。计量资料用均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析,方差齐性检验使用 Levene 检验,方差齐时,组间两两比较采用 LSD 法;方差不齐时,组间两两比较采用 dunnett T3 法, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 小鼠体重、大便得分情况 小鼠体重变化见表 1 所示,模型组相对正常组体重第 1 天至第 5 天出现显著下降 ($P < 0.01$)。给药第 3 天,与模型组比较,高剂量组体重比明显更高 ($P < 0.05$);而到第 4 天,高、中剂量多糖组比模型组体重比更高 ($P < 0.01$)。大便得分变化见表 2,模型组第 3,4 天大便得分与正常组比较明显升高 ($P < 0.01$);给药第 4 天,高、中剂量多糖组大便得分与模型组比较具有显著差异 ($P < 0.05, P < 0.01$)。

表 1 五味子多糖对 5-FU 化疗小鼠体重比的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天
正常	-	99.03 ± 0.99	98.89 ± 2.24	100.41 ± 0.59	101.07 ± 1.23
模型	-	97.43 ± 1.23 ²⁾	94.68 ± 2.38 ²⁾	91.44 ± 1.83 ²⁾	86.98 ± 2.03 ²⁾
五味子多糖	20	97.84 ± 0.60 ¹⁾	95.66 ± 1.27 ²⁾	92.77 ± 1.39 ^{2,3)}	90.36 ± 1.89 ^{2,4)}
	10	98.04 ± 1.31 ¹⁾	95.01 ± 1.18 ²⁾	92.23 ± 1.24 ²⁾	89.00 ± 1.27 ^{2,4)}
	5	97.34 ± 0.89 ²⁾	94.92 ± 1.11 ²⁾	92.12 ± 1.36 ²⁾	88.18 ± 1.50 ²⁾

注:第 0 天均为“100% ± 0”;与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ (表 2,图 2,3 同)。

表 2 五味子多糖对 5-FU 化疗小鼠腹泻的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天
正常	-	0.00 ± 0.00	0.10 ± 0.32	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
模型	-	0.10 ± 0.32	0.20 ± 0.42	1.00 ± 0.47 ²⁾	2.40 ± 0.52 ²⁾
五味子多糖	20	0.10 ± 0.32	0.30 ± 0.48	0.50 ± 0.53	1.40 ± 0.52 ⁴⁾
	10	0.00 ± 0.00	0.20 ± 0.42	0.80 ± 0.63 ¹⁾	1.60 ± 0.52 ³⁾
	5	0.00 ± 0.00	0.20 ± 0.42	0.80 ± 0.63 ¹⁾	1.90 ± 0.32 ²⁾

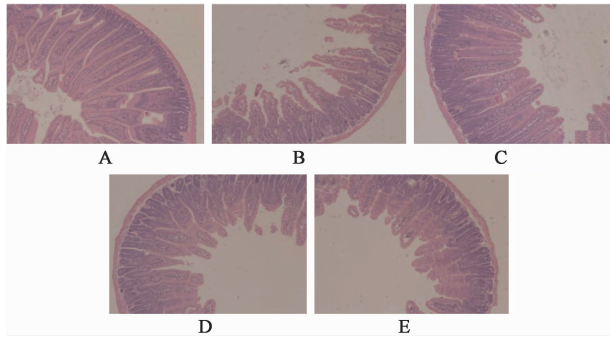
注:第 0 天均为 0 分。

3.2 肠道黏膜的病理变化 正常组小肠绒毛形态整齐规则,而模型组绒毛形态萎缩、缺失,损伤较严重,肠绒毛排列紊乱;与模型组比较,多糖组绒毛断裂、缺失情况减少。见图 1。与正常组比较,模型组的空肠绒毛高度值显著减少、隐窝深度显著增加,空肠绒毛高度值/隐窝深度值减少 ($P < 0.01$);与正常组比较,高、中、低剂量组空肠绒毛高度值显著增加,隐窝深度值显著减少、空肠绒毛高度值/隐窝深度增加 ($P < 0.01$)。见图 2。

3.3 小肠组织炎症因子水平变化 与正常组比较,模型组的 TNF-α, IL-1β, IL-6 水平都明显提高 ($P < 0.05, P < 0.01$);与模型组比较,高、中、低剂量多糖组小鼠空肠组织 TNF-α, IL-1β, IL-6 水平显著降低 ($P < 0.01$)。见图 3。

4 讨论

腹泻、消化吸收障碍是肠道黏膜炎常见的反应^[8]。从本研究来看,模型组因使用 5-FU 后,小鼠体重一直出现下降,第 3,4 天腹泻得分与正常组有



A. 正常组; B. 模型组; C. 五味子多糖高剂量组; D. 五味子多糖中剂量组; E. 五味子多糖低剂量组(图 2,3 同)

图 1 给药第 4 天各组小鼠典型的空肠组织的病理变化(HE, × 100)

Fig. 1 Representative histology of jejunum with villus height and crypt haematoxylin and eosin stain in mice on day 4 challenged with/without 5-FU treatment(HE, × 100)

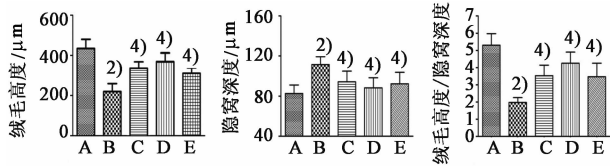


图 2 五味子多糖对 5-FU 化疗小鼠空肠黏膜形态学参数的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 2 Segments of jejunum of saline or 5-FU-injected mice with/without SCFP administration were taken for measurement of villus height, crypt depth and villus/crypt ratio($\bar{x} \pm s, n = 10$)

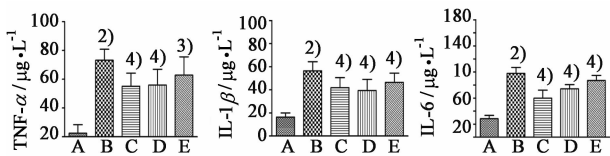


图 3 五味子多糖对 5-FU 化疗小鼠空肠组织炎症因子水平的影响($n = 10, \bar{x} \pm s$)

Fig. 3 Effect of SCFP on levels of pro-inflammatory cytokines in jejunums of 5-FU-treated mice($n = 10, \bar{x} \pm s$)

显著差异,而多糖(高、中剂量)能显著改善 5-FU 引起的小鼠腹泻和体重下降情况。有研究表明,化疗引起的小鼠体重下降可能化疗导致隐窝细胞损伤、以及绒毛吸收面积的减少有关^[9],而腹泻主要与水吸收、肠平滑肌蠕动、肠道微生物环境的改变有关^[10-11]。这说明五味子多糖可能改善了 5-FU 引起的营养吸收障碍、水吸收障碍、肠道蠕动能力下降、肠道微生物环境紊乱等状况。

肠道的吸收功能和小肠绒毛高度和小肠隐窝深度有直接的关系。绒毛缩短、隐窝细胞损害而深度增加、绒毛长度/隐窝深度比下降都反映小肠黏膜损

害程度加重^[12]。本研究通过组织病理学证据表明 5-FU 导致严重的肠道黏膜损害,形态直观上看,与正常组比较,模型组小鼠空肠绒毛明显萎缩、缺失,隐窝加深;通过测量发现,模型组小鼠空肠绒毛长度明显缩短、隐窝深度明显增加、绒毛长度/隐窝深度比明显下降;而五味子多糖能够显著抑制 5-FU 对空肠的绒毛萎缩、变短,隐窝的深度增加,这说明五味子多糖有减少 5-FU 对小肠上皮细胞的损害的作用,通过对绒毛和隐窝的保护作用改善肠道的吸收功能。

肠道黏膜炎的初期主要是化疗药物直接损伤细胞 DNA 和产生活性氧^[12],进而一系列的转化因子对损伤起反应^[13],启动一系列的促炎细胞因子发生反应^[14]。Williams 研究表明炎症因子(如 IL-1, TNF-α, IL-6)对肠道黏膜损伤的严重程度和修复过程起着重要的影响^[15]。TNF-α 可促使其他炎症因子如 IL-6, IL-1, IL-8 等的产生^[16]。IL-1β 很可能经过一系列的过程,活化核转录因子-κB(NF-κB)/p65,参与和调节肠道的化疗后细胞凋亡过程。抑制 IL-1β 表达,可保护 5-FU 化疗小鼠肠道细胞凋亡,减少黏膜损害,有助于小肠黏膜修复^[17]。炎症性肠病发病过程中,由于 T 细胞对凋亡的抵抗导致 T 细胞积累过多和黏膜慢性炎症加重的作用与 IL-6 信号转导有关;IL-6 通过 Trans-signalling 诱导 STAT3 磷酸化,而 STAT3 自身则诱导抗凋亡因子 Bcl-xl 和 Bel-2,由此导致 T 细胞抗凋亡。由于对凋亡的抵抗,T 细胞累积的循环作用最终导致慢性炎症^[18]。鉴于 TNF-α, IL-1β, IL-6 在肠道黏膜炎病变过程中起着十分重要的作用,因此,其含量水平可能能够反映炎症性的严重程度。从本研究来看,模型组的小肠组织中的 IL-6, TNF-α, IL-1β 含量显著升高,这可能说明五味子多糖通过显著抑制肠道组织中的 IL-6, TNF-α, IL-1β 水平以减轻炎症反应。通过减轻炎症反应,以保护对绒毛、隐窝的损伤,从而改善体重下降、腹泻的小肠黏膜炎症状。这可能是五味子多糖起治疗作用的机制之一,确切机制仍待进一步研究。

[参考文献]

[1] Naiclu M U, Ramana G V, Rani P U, et al. Chemotherapy-induced and/or radiation therapy-induced oral mucositis-complicating the treatment of cancer[J]. Neoplasia, 2004, 6(5): 423-431.
[2] Sonis S T, Elting L S, Keefe D, et al. Perspectives on cancer therapy-induced mucosal injury: pathogenesis, measurement, epidemiology, and consequences for

- patients [J]. *Cancer*, 2004, 100 (9 Suppl): 1995-2025.
- [3] Sonis S T. Pathobiology of mucositis [J]. *Nat Rev Cancer*, 2004, 4(4): 277-284.
- [4] 田丽,陈长英,刘倩倩,等. 化疗药物致消化道黏膜炎的治疗及护理进展[J]. *中国护理杂志*, 2013, 48(7): 658-660.
- [5] 欧阳明子,谭为,刘艳艳,等. 五子衍宗丸对小鼠乳腺癌化疗敏感性及化疗相关性疲劳的干预作用[J]. *实用医学*, 2012, 29(11): 1744-1747.
- [6] 舒予,李小芳,刘玲,等. 五味子多糖微囊的制备及其体外释药特性考察[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2014, 20(5): 27-31.
- [7] Liu Z, Xi J, Schröder S, et al. *Chimonanthus nitens* var. *salicifolius* aqueous extract protects against 5-fluorouracil induced gastrointestinal mucositis in a mouse model [J]. *Ev Bas Compl Alt Med*, 2013, 2013: 789263. doi: 10.1155/2013/789263.
- [8] Huang T Y, Chu H C, Lin Y L, et al. Minocycline attenuates 5-fluorouracil-induced small intestinal mucositis in mouse model [J]. *Biochem Biophys Res Com*, 2009, 389(4): 634-639.
- [9] Yeung C Y, Chan W T, Jiang C B, et al. Amelioration of chemotherapy-induced intestinal mucositis by orally administered probiotics in a mouse model [J]. *PloS One*, 2015, 10(9): e138746.
- [10] Soares P M, Mota J M, Gomes A S, et al. Gastrointestinal dysmotility in 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis outlasts inflammatory process resolution [J]. *Cancer Chem Pharm*, 2008, 63 (1): 91-98.
- [11] Gibson R J, Keefe D M. Cancer chemotherapy-induced diarrhoea and constipation: mechanisms of damage and prevention strategies [J]. *Support Care Cancer*, 2006, 14(9): 890-900.
- [12] Sonis S T. Regimen-related gastrointestinal toxicities in cancer patients [J]. *Curr Opin Support Palliat Care*, 2010, 4(1): 26-30.
- [13] Sonis S T. Mucositis: the impact, biology and therapeutic opportunities of oral mucositis [J]. *Oral Oncol*, 2009, 45(12): 1015-1020.
- [14] Bowen J M, Keefe D M. New pathways for alimentary mucositis [J]. *J Oncol*, 2008, 2008: 1-7.
- [15] Williams D A. Inflammatory cytokines and mucosal injury [J]. *J Natl Cancer Inst Monogr*, 2001, (29): 26-30.
- [16] de Koning B A, van Dieren J M, Lindenbergh-Kortleve D J, et al. Contributions of mucosal immune cells to methotrexate-induced mucositis [J]. *Int Immunol*, 2006, 18(6): 941-949.
- [17] Schreiber S, Nikolaus S, Hampe J. Activation of nuclear factor kappa B inflammatory bowel disease [J]. *Gut*, 1998, 42(4): 477-484.
- [18] Mudter J, Neurath M F. IL-6 signaling in inflammatory bowel disease: pathophysiological role and clinical relevance [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2007, 13(8): 1016-1023.

[责任编辑 邹晓翠]