

砂仁复方对 5-FU 所致大鼠肠道损伤的影响

郑霏艳¹, 孙瑞芬², 龚建瑜², 陈 鑫², 赵荣华², 李 菊^{2*}
(1. 云南省疾病预防控制中心, 云南 昆明 650022; 2. 云南中医药大学, 云南 昆明 650500)

摘要: **目的** 探讨砂仁复方对 5-FU 所致大鼠肠道损伤的影响。**方法** 将 SD 大鼠随机分为空白组、阳性组、模型组及砂仁复方高、中、低剂量组。观察大鼠状态、体质量情况, HE 染色观察小肠形态结构、绒毛高度和隐窝深度, Western blot 检测小肠组织中 occludin、Claudin-1 蛋白表达。**结果** 与空白组比较, 模型组体质量增量降低 ($P<0.05$), 绒毛高度及隐窝深度降低 ($P<0.05$, $P<0.01$), Claudin-1、occludin 蛋白表达降低 ($P<0.01$); 与模型组比较, 砂仁复方高、中、低剂量组绒毛高度、隐窝深度升高 ($P<0.05$, $P<0.01$), occludin 蛋白表达升高 ($P<0.01$), 砂仁复方高、中剂量组 Claudin-1 蛋白表达升高 ($P<0.05$, $P<0.01$)。**结论** 砂仁复方能保护 5-FU 所致大鼠肠道功能损伤。

关键词: 砂仁复方; 5-FU; 肠道功能; occludin; Claudin-1
中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2020)10-2611-05
doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2020.10.013

Effects of *Amomum villosum* Lour. Compound on rat intestinal injury induced by 5-FU

ZHENG Fei-yan¹, SUN Rui-fen², GONG Jian-yu², CHEN Xin², ZHAO Rong-hua², LI Ju^{2*}
(1. Yunnan Provincial Center for Disease Prevention and Control, Kunming 650022, China; 2. Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China)

ABSTRACT: **AIM** To investigate the effects of *Amomum villosum* Lour. Compound (AVLC) on rat intestinal injury induced by 5-FU. **METHODS** The SD rats were randomly divided into blank control group, model group, positive drug group, and high dose, medium dose and low dose AVLC groups. The rats had their body weight observed and activity recorded every day, their intestinal morphology, villus height and crypt depth observed using HE staining, their intestinal occludin and claudin-1 expression checked using Western blot. **RESULTS** In contrast to the blank control group, the model group showed decreased body mass increment ($P<0.05$), villi height and crypt depth ($P<0.05$, $P<0.01$), and claudin-1 and occludin protein expression as well ($P<0.01$). Compared with the model group, AVLC groups displayed increased villi height and crypt depth, and occludin expression ($P<0.05$, $P<0.01$), while the high and medium doses AVLC groups had increased claudin-1 protein expression ($P<0.05$, $P<0.01$). **CONCLUSION** AVLC can protect rat intestinal function impairment induced by 5-FU.

KEY WORDS: *Amomum villosum* Lour. Compound (AVLC); 5-FU; intestinal function; occludin; Claudin-1

恶性肿瘤威胁着全人类的健康, 在我国肿瘤导致的死亡占全部死因的 1/4, 治疗手段以手术和放化疗为主。五氟尿嘧啶 (5-fluorouracil, 5-FU) 是临床上常用的化疗药物, 但其应用常伴随有骨髓抑

制、胃肠道反应、肝损害、泌尿生殖系统毒性、脱发等不良反应^[1], 以胃肠道反应为主, 如何改善这一现象, 成为了肿瘤化疗中的重要课题。

祖国医学博大精深, 尤其在治疗胃肠道方面疾

收稿日期: 2020-04-15
基金项目: 国家自然科学基金项目 (81560429); 南药研究协同创新中心专项基金项目 (2011YXZD07)
作者简介: 郑霏艳 (1990—), 女, 硕士, 初级中药师, 从事疫苗临床试验工作。E-mail: 15188119347@163.com
* 通信作者: 李 菊 (1979—), 女, 硕士, 实验师, 从事药理学及机能学教学科研工作。E-mail: kmliju@hotmail.com

病时有不可替代的优势。砂仁复方是以砂仁为主要药材，辅以人参、滇黄精制成，方中砂仁具有行气调中、和胃醒脾的功效，在临床上具有保护胃黏膜、改善胃肠机能、止痛、止泻、促进消化液的分泌等作用^[2-3]；人参具有大补元气、复脉固脱、补脾益肺、生津止渴、安神益智的功效^[4]，现代药理学研究证明它有提高机体免疫力、抗肿瘤、抗炎、杀菌等作用^[5]；滇黄精具有滋肾润肺、补脾益气的功效^[6]，全方对 5-FU 导致的胃肠道功能损伤可能具有保护作用，但尚无确切的研究证明。本实验利用 5-FU 建立大鼠肠道功能损伤模型，研究砂仁复方对大鼠肠道功能损伤的保护作用，为临床肿瘤治疗中 5-FU 应用提供支撑，为该方开发利用提供一定科学依据，同时也为云南砂仁产业化发挥推动作用。

1 材料

1.1 动物 SD 大鼠，清洁级，雄性，体质量 180~200 g，购自昆明医科大学实验动物学部，生产许可证号 SCXK（滇）k2015-002。

1.2 试剂与药物 砂仁复方相关生药均购自昆明螺狮湾中药材市场，经云南中医药大学赵荣华教授鉴定为正品。双歧杆菌四联活菌片（杭州远大生物制药有限公司，批号 201703101）；5-FU（北京华迈科生物技术有限责任公司，批号 BJ160513212A）；二辛可宁酸（bicinchoninic acid, BCA）蛋白定量试剂盒（北京普利莱基因技术有限公司，货号 P1511）；高效细胞组织裂解液（radio-immunoprecipitation assay, RIPA，北京索莱宝科技有限公司，货号 R0010）；Anti-occludin 抗体（英国 Abcam 公司，货号 ab167161）；Anti-Claudin-1 抗体（英国 Abcam 公司，货号 ab15098）；Anti-Alpha tubulin 抗体（英国 Abcam 公司，货号 5335）；辣根过氧化物酶（horseradish peroxidase, HRP）标记羊抗兔免疫球蛋白 G（immunoglobulin G, IgG）二抗（美国 Cell Signaling Technology 公司，货号 7074）；抗-甘油醛-3-磷酸脱氢酶（Anti-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, Anti-GAPDH）抗体（美国 Proteintech 公司，货号 10494-1-AP）；电化学发光（electrochemiluminescence, ECL）检测试剂（德国 Merck Millipore 公司，货号 WBKLS0050）。

2 方法

2.1 砂仁复方溶液的制备 砂仁复方为砂仁、滇黄精、人参按 1：1：1 比例配伍而成，滇黄精用其提取液制成每 1 mL 含 1 g 生药的流浸膏备用，砂

仁、人参分别粉碎过 100 目筛备用。根据砂仁复方人服用每日剂量，折算大鼠的等效剂量约为 1.6 g 生药/kg，为本实验的中剂量，同时分别以 0.8、3.2 g 生药/kg 作为低剂量、高剂量。再配制 0.32 g/mL 砂仁复方高剂量药液、0.16 g/mL 砂仁复方中剂量药液、0.08 g/mL 砂仁复方低剂量药液。

2.2 分组、造模及给药 雄性 SD 大鼠随机分为空白组、模型组、阳性（思连康）组及砂仁复方低、中、高剂量组，每组 8 只。动物模型参照课题组前期实验研究及郭炳勋^[7]、杜静等^[8]报道的方法，空白组每天灌胃生理盐水（1 mL/100 g）1 次至第 19 天；模型组除每天灌胃生理盐水至第 19 天外，于第 8、14 天灌胃生理盐水 4 h 后腹腔注射 5-FU（35 mg/kg）1 次。阳性组每天灌胃生理盐水至第 7 天，第 8 天灌胃思连康溶液（0.45 g/kg），每天 1 次，至第 19 天，于第 8、14 天给药 4 h 后腹腔注射 5-FU（35 mg/kg）1 次；砂仁复方低、中、高剂量组每天灌胃相应剂量的药液 1 次，于第 8、14 天给药 4 h 后腹腔注射 5-FU（35 mg/kg）1 次。每天测量大鼠饮食量、体质量，观察其状态和活动情况，体质量增量=体质量_{第19天}-体质量_{第1天}。

2.3 HE 染色 每组随机抽取 3 只大鼠，处死后取回肠，于 10% 中性福尔马林中固定，梯度乙醇脱水，石蜡包埋，切片，苏木精-伊红染色，中性树胶进行封片，观察各组织切片形态，测量小肠绒毛高度及隐窝深度。

2.4 Western blot 检测

2.4.1 总蛋白的提取、测定和变性 取小肠组织，磷酸缓冲盐溶液快速清洗，称定质量，每 1 mg 加入 1 mL 细胞组织裂解液（RIPA），置玻璃匀浆器中快速匀浆，冰上裂解 0.5 h，离心（13 000 r/min、4 ℃）20 min，收集上清，即得小肠组织总蛋白。蛋白定量采用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒，按照说明书操作步骤进行，利用酶标仪在 562 nm 波长处测定小肠组织总蛋白含量，提取液按 1：1 比例加入电泳样品缓冲液，于 95 ℃ 水浴锅中煮 5 min 进行变性。

2.4.2 Western blot 制备含 10% 分离胶、5% 浓缩胶的 15 孔 1.2 mm 聚丙烯酰胺凝胶（dodecyl sulfate, sodium salt-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE）。蛋白液按空白组、模型组、阳性组及砂仁复方低、中、高剂量组顺序依次上样，两边分别加入 4 μL 标记（marker），80 V 电泳 2 h，120 V 转膜

2 h 到聚偏二氟乙烯膜（polyvinylidene fluoride, PVDF）膜上，PVDF 膜于室温摇床上用 5% 脱脂奶粉-三甲胺-生理盐水和吐温 20 缓冲液（tris-buffered saline and Tween 20, TBST）于摇床上振摇均匀封闭 2 h，封闭后用 TBST 缓冲液洗涤 3 次（5 min/次），加入一抗 4 ℃ 孵育过夜，第 2 天用 TBST 洗膜 3 次（5 min/次），再加入偶联的二抗，于室温摇床上孵育 1.5 h，用 TBST 洗膜 3 次（5 min/次）后用 ECL 显影液显影，凝胶成像仪拍照。采用 Quantity One 软件对条带进行光密度分析，以目的蛋白光密度与内参蛋白光密度比值代表目的蛋白的相对含量。

2.5 统计学分析 采用 SPSS 19.0 软件进行处理，数据以（ $\bar{x}\pm s$ ）表示，多组间比较采用单因素方差分析，方差齐者采用最小显著性差异法（least significant difference, LSD）检验，方差不齐者采用 Tamhane's 法检验。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 砂仁复方对大鼠体质量的影响 如表 1 所示，模型组体质量增量低于空白组（ $P<0.05$ ）；与模型组比较，砂仁复方各剂量组体质量增量无明显变化（ $P>0.05$ ）。

表 1 各组大鼠体质量增量（ $\bar{x}\pm s$ ， $n=8$ ）
Tab. 1 Weight gain of rats in each group（ $\bar{x}\pm s$ ， $n=8$ ）

组别	体质量增量/g
空白组	82.2±9.6
模型组	67.7±6.9 [△]
阳性组	70.2±10.3
砂仁复方低剂量组	64.9±12.9
砂仁复方中剂量组	75.6±15.1
砂仁复方高剂量组	62.89±11.9

注：与空白组比较，[△] $P<0.05$ 。

3.2 砂仁复方对大鼠回肠病理形态学及绒毛高度的影响 如图 1 所示，空白组肠绒毛结构清晰、完整，黏膜下层、肌层完整，无炎细胞浸润；模型组肠绒毛断裂严重、结构改变，炎性细胞浸润至黏膜下层，形成溃疡，部分炎性细胞浸润至肌层，杯状细胞消失；阳性组肠绒毛结构破坏，炎细胞浸润至黏膜下层、部分肠上皮细胞；砂仁复方低剂量组肠绒毛结构部分改变、绒毛部分断裂，黏膜下层有炎细胞浸润，部分肌层增生；砂仁复方中剂量组中肠绒毛结构部分改变、断裂，黏膜下层炎性细胞浸润；砂仁复方高剂量组炎性细胞不同程度浸润至肠绒毛、黏膜下层，上皮细胞脱落。

如表 2 所示，空白组小肠绒毛高度大于模型组

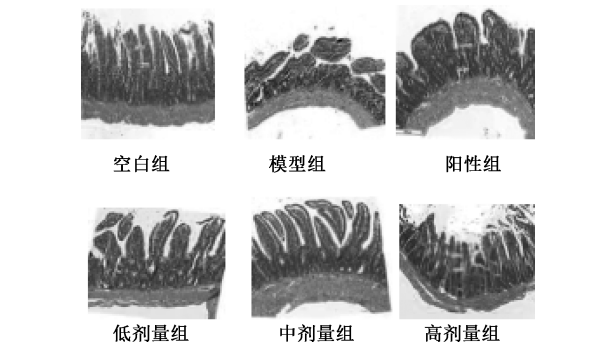


图 1 HE 染色检测各组大鼠回肠组织病理学（×10）
Fig. 1 Histopathological detection of rat ilea in each group by HE staining（×10）

（ $P<0.01$ ），砂仁复方各剂量组小肠绒毛高度均大于模型组（ $P<0.05$ ， $P<0.01$ ），初步表明砂仁复方对 5-FU 所致大鼠回肠绒毛降低具有调节作用。

表 2 各组大鼠小肠绒毛高度（ $\bar{x}\pm s$ ， $n=3$ ）
Tab. 2 Intestinal villus heights of rats in each group（ $\bar{x}\pm s$ ， $n=3$ ）

组别	绒毛高度/μm
空白组	217.99±16.53
模型组	175.23±33.21 ^{△△}
阳性组	199.58±27.82
砂仁复方低剂量组	236.79±18.60 ^{**}
砂仁复方中剂量组	253.02±48.53 ^{**}
砂仁复方高剂量组	208.30±24.48 [*]

注：与空白组比较，^{△△} $P<0.01$ ；与模型组比较，^{*} $P<0.05$ ，^{**} $P<0.01$ 。

3.3 砂仁复方对大鼠小肠隐窝深度的影响 如表 3 所示，空白组小肠隐窝深度大于模型组（ $P<0.05$ ）；阳性组、模型组小肠隐窝深度比较，差异无统计学意义（ $P>0.05$ ）；砂仁复方低、中、高剂量组小肠隐窝深度大于模型组（ $P<0.05$ ），初步表明砂仁复方对 5-FU 所致大鼠回肠隐窝深度降低具有调节作用。

表 3 各组大鼠小肠隐窝深度（ $\bar{x}\pm s$ ， $n=3$ ）
Tab. 3 Depths of small intestinal crypts of rats in each group（ $\bar{x}\pm s$ ， $n=3$ ）

组别	隐窝深度/μm
空白组	96.53±26.08
模型组	59.81±19.76 [△]
阳性组	69.08±27.53
砂仁复方低剂量组	92.78±34.13 [*]
砂仁复方中剂量组	97.85±23.08 [*]
砂仁复方高剂量组	95.24±29.87 [*]

注：与空白组比较，[△] $P<0.05$ ；与模型组比较，^{*} $P<0.05$ 。

3.4 砂仁复方对大鼠肠道紧密连接 occludin 蛋白表达的影响 如图 2 所示，与空白组比较，模型组

occludin 表达降低 ($P<0.01$); 与模型组比较, 砂仁复方各剂量组 occludin 蛋白表达升高 ($P<0.01$), 初步表明 5-FU 腹腔注射致大鼠 occludin 表达降低, 而砂仁复方对其具有调高作用。

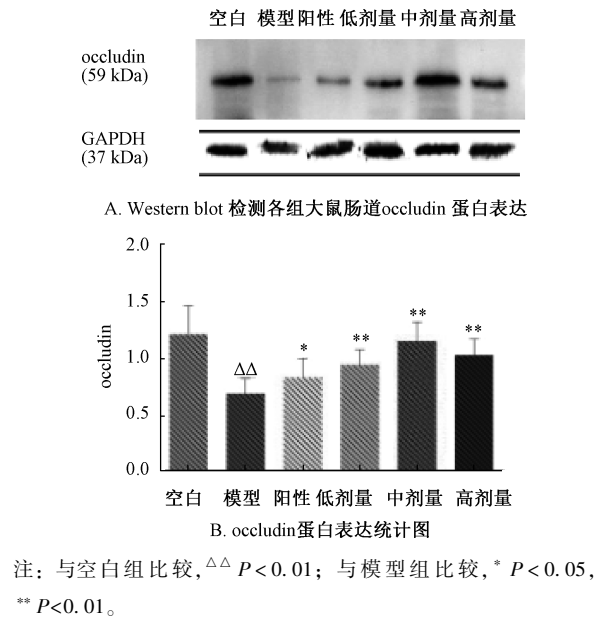


图 2 砂仁复方对大鼠肠道组织 occludin 蛋白表达的影响

Fig. 2 Effect of AVLC on the expression of occludin protein in intestinal tissue of rats

3.5 砂仁复方对大鼠肠道紧密连接 Claudin-1 蛋白表达的影响 如图 3 所示, 与空白组比较, 模型组 Claudin-1 蛋白表达降低 ($P<0.01$); 与模型组比较, 砂仁复方中剂量组 ($P<0.05$)、高剂量组 ($P<0.01$) Claudin-1 蛋白表达升高。

4 讨论

化疗是肿瘤治疗的主要手段之一, 但相关药物的毒副作用影响着化疗能否顺利进行, 而胃肠道反应是常见的不良反应之一。目前研究发现, 化疗药物可直接损伤肠黏膜上皮细胞, 引起肠上皮细胞损伤、凋亡; 影响细胞增殖, 阻碍肠黏膜修复; 引起免疫细胞数量变化, 导致免疫调控异常^[9-10], 在能使用的药物中, 很少有能够达到有效拮抗化疗后胃肠损伤的效果。化疗药物对胃肠损伤的机制比较复杂, 本研究中阳性药思连康是一种复方制剂, 其主要成分为双歧杆菌、粪肠球菌、蜡样芽孢杆菌、嗜酸乳杆菌, 部分是人体肠道空白的肠菌群, 可直接补充机体空白生理细菌, 在肠道形成一个生物屏障, 继而促进肠道蠕动, 缓解临床症状以调节胃肠功能^[11], 但可能因其对胃肠道保护作用单一, 导

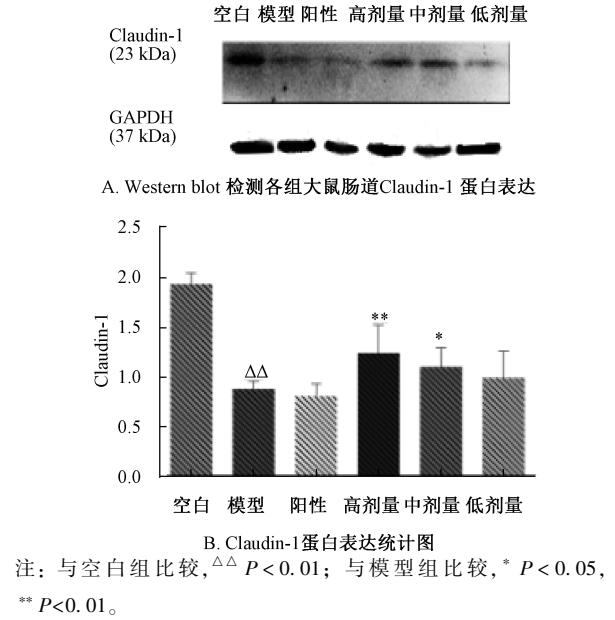


图 3 砂仁复方对大鼠肠道组织 Claudin-1 蛋白表达的影响

Fig. 3 Effect of AVLC on the expression of Claudin-1 protein in intestinal tissue of rats

致在整个化疗药对胃肠损伤实验中保护性作用微弱。结果, 思连康在调节隐窝深度、绒毛高度等方面都有一定积极作用, 但未达到统计学差异。

体质量直接显示胃肠道功能的高低, 也是治疗恶性肿瘤的临床疗效指标之一, 可间接反映肿瘤患者的生存质量^[12]。模型组体质量增量低于空白组; 砂仁复方各剂量组体质量增量与模型组比较, 差异无统计学意义; 砂仁复方中剂量组对 5-FU 所致大鼠体质量增量降低, 具有一定调节作用。所以, 进一步进行砂仁复方有效化合物的提取、纯化, 增加有效成分的血药浓度, 有望能达到有效调节体质量的目的, 但高、低剂量调节作用较弱, 可能是因为低剂量达不到有效血药浓度, 而高剂量表现出一定的不良反应。

小肠绒毛是吸收营养物质的主要部位, 肠绒毛的高低决定着绒毛上皮细胞数量的多少, 进而影响营养物质的吸收^[13]; 隐窝深度反映了上皮细胞的生成率, 上皮细胞不断从隐窝基部向绒毛端部迁移、分化, 形成具有吸收能力的绒毛细胞, 以补充空白的脱落^[14], 因此, 肠绒毛高度及隐窝深度一定程度间接反映了肠道的结构和功能。空白组小肠绒毛高度、隐窝深度显著高于模型组, 砂仁复方各剂量组也均显著高于模型组, 初步表明砂仁复方对化疗药 5-FU 所致大鼠回肠绒毛降低具有明显调节作用, 其途径可能是通过对肠道生理功能及屏障功

能的恢复，增加肠道对体内储留的代谢物的排出，以低、中剂量调节作用最显著，这可能与砂仁挥发油成分可通过对抗胃肠黏膜的攻击因子来产生胃肠保护作用有关^[15]。

本研究发现，模型组小肠紧密连接 occludin 蛋白表达显著低于空白组，砂仁复方各剂量组其表达均明显高于模型组，表明 5-FU 腹腔注射致大鼠 occludin 蛋白表达降低，而砂仁复方对其具有明显调高作用；模型组中 Claudin-1 蛋白表达低于空白组，砂仁复方中剂量组、高剂量组中其表达明显高于模型组。肠道黏膜屏障主要由上皮细胞和细胞间紧密连接构成，是阻碍有害物质进入机体的重要屏障^[16]，肠道紧密连接主要位于肠上皮细胞顶端表面，是上皮细胞间连接最为重要的结构复合物，在维持肠黏膜的屏障功能方面发挥着重要的作用，多种蛋白参与了紧密连接的形成，包括 Claudin、occludin 等，因此，肠道紧密连接蛋白被用来作为评价肠道黏膜屏障和肠道通透性的指标^[17-18]。结果显示，砂仁复方可以增加多种蛋白的表达，参与肠道紧密连接结构的形成，为胃肠道损伤提供保护。

综上所述，砂仁复方可以从多方面、多层次调节 5-FU 所致大鼠肠道功能的损伤作用，为该方开发应用提供了科学依据。但本实验只进行了调节胃肠道作用的初步研究，今后还需深入系统地探索。

参考文献：

[1] 丁明翠, 张 可, 牟 玲. 恶性肿瘤化疗后呕吐的中医药治疗临床研究[J]. 中医临床研究, 2017, 9(12): 127-128.

[2] 李丽丽, 田文仓, 刘 茵, 等. 砂仁中化学成分及其药理作用的研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2018, 18(22): 4390-4396.

[3] 靳祎祎. 复方白花蛇舌草减轻大肠癌 5-FU 化疗肠道损伤的作用机制研究[D]. 福州: 福建中医药大学, 2018.

[4] 李 倩, 柴艺汇, 高 洁, 等. 人参现代药理作用研究进展[J]. 贵阳中医学院学报, 2019, 41(5): 89-92.

[5] 刘 睿, 李 迪, 李 勇. 人参皂试药理作用研究进展[J]. 中国食物与营养, 2017, 23(10): 68-72.

[6] 齐聪聪, 黄晓芹. 黄精对造血系统药理作用的研究进展[J]. 中国民族民间医药, 2015, 24(24): 21-23.

[7] 郭炳勋. 5-FU 与阿霉素化疗期间对肠屏障功能影响比较的实验研究[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2008.

[8] 杜 静, 李 平, 张 梅, 等. 亮菌防治顺铂化疗诱发胃肠道反应的机制研究[J]. 安徽医药, 2011, 15(2): 144-147.

[9] 杨 凡, 刘 莲, 曹邦伟. 化疗相关恶心呕吐的发生机制及治疗药物的研究进展[J]. 中国医院用药评价与分析, 2017, 17(8): 1013-1016.

[10] 贾云鹤. 癌性营养不良胃肠黏膜损伤及保护研究[D]. 上海: 第二军医大学, 2005.

[11] Infante Pina D, Redecillas Ferreiro S, Torrent Vernetta A, *et al.* Improvement of intestinal fuction in cystic fibrosis patients using probiotics [J]. *An Pediatr (Barc)*, 2008, 69(6): 501-505.

[12] 王 斐, 刘丽媛, 王永久, 等. 体重指数与乳腺癌预后的相关性分析[J]. 中国现代普通外科进展, 2016, 19(9): 673-678.

[13] Yamamoto K E S, Hatakeyama Y, Sakamoto Y, *et al.* High-fat diet intake from senescence inhibits the attenuation of cell functions and the degeneration of villi with aging in the small intestine, and inhibits the attenuation of lipid absorption ability in SAMP8 mice[J]. *J Clin Biochem Nutr*, 2015, 57(3): 204-211.

[14] 陈泽伟. 五子衍宗丸改善 5-氟尿嘧啶诱导小肠黏膜炎的机制研究[C] //2017 年第五次世界中西医结合大会论文摘要集 (上册). 广州: 中国中西医结合学会, 2017: 512.

[15] 张明发, 沈雅琴. 砂仁临床药理作用的研究进展[J]. 抗感染药学, 2013, 10(1): 8-13.

[16] 王 娜, 唐雪婵. 黏蛋白-2 与肠黏膜屏障损伤的研究进展[J]. 基础医学与临床, 2015, 35(7): 985-988.

[17] Miyoshi Y, Tanabe S, Suzuki T. Cellular zinc is required for intestinal epithelial barrier maintenance via the regulation of claudin-3 and occludin expression[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2016, 311(1): G105-G116.

[18] 宦海琳, 白建勇, 周维仁, 等. 抗菌肽对仔猪血清生化指标、肠黏膜形态结构及空肠上皮紧密连接蛋白基因相对表达量的影响[J]. 动物营养学报, 2015, 27(12): 3797-3804.