

清解扶正颗粒调控 Cathepsin B/NLRP3 通路减轻 大肠癌小鼠 5-FU 化疗性肠黏膜炎的机制研究

袁颖绯¹, 林久茂^{1,2,3}, 林明和¹, 赵锦燕^{1,2,3}, 陈旭征^{1,2}, 刘锦洪¹, 朱晓勤^{1,2,3*}

1 福建中医药大学中西医结合学院 中西医结合研究院, 福建 福州 350122;

2 福建省中西医结合老年性疾病重点实验室, 福建 福州 350122;

3 中西医结合基础福建省高校重点实验室, 福建 福州 350122

* 通信作者: 朱晓勤, E-mail: 2008027@fjtem.edu.cn

收稿日期: 2023-10-16; 接受日期: 2023-12-25

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81774121); 福建省自然科学基金项目(2021J01941, 2021J01939);

福建省教育厅 A 类科技项目(JAT200230); 福建中医药大学校管项目(X2020015)

DOI: 10.3724/SP.J.1329.2025.01015

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



摘要 目的 基于 Cathepsin B/NLRP3 通路探讨清解扶正颗粒对大肠癌小鼠经 5-氟尿嘧啶(5-FU)化疗后所致的肠黏膜炎的治疗作用及作用机制。**方法** 24 只雄性 BALB/c 小鼠采取右前肢腋部皮下接种 CT26 细胞的方法构建大肠癌皮下移植瘤小鼠模型, 待瘤体生长至 100~300 mm³ 时, 按照瘤体体积大小将小鼠随机分为对照组、5-FU 组、5-FU+清解扶正颗粒组(5-FU+QFG 组), 每组 8 只。对照组给予生理盐水灌胃和腹腔注射, 其他 2 组小鼠腹腔注射 5-FU[50 mg/(kg·d⁻¹)], 每日 1 次, 连续 5 d; 5-FU+QFG 组在化疗的同时灌胃给予清解扶正颗粒(1.0 g/kg·d⁻¹), 每日 1 次, 连续 7 d。每天观察小鼠的腹泻情况, 记录体质量及瘤体体积等情况。第 7 天末次给药后禁食 12 h, 动物取材, 进行实验检测。采用苏木精-伊红染色(HE)法观察小鼠空肠组织病理变化; 采用酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测 3 组小鼠血清中二胺氧化酶(DAO)、D-乳酸(D-LA)、内毒素(ET)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6(IL-6)表达水平; 采用免疫组织化学法检测空肠组织中组织蛋白酶 B(Cathepsin B)的阳性表达; 采用实时定量聚合酶链式反应(qPCR)检测空肠组织中紧密连接蛋白 ZO-1、Occludin mRNA 的相对表达水平, 采用 Western blot 法检测空肠组织中 ZO-1、Occludin、Cathepsin B、NLRP3、ASC、cleaved Caspase-1 蛋白的相对表达量。**结果** ① 小鼠一般情况: 在实验周期内, 清解扶正颗粒能够显著减轻 5-FU 化疗引起的腹泻症状($P < 0.05$), 对 5-FU 化疗引起的体质量下降无显著改善($P > 0.05$), 对 5-FU 抑制瘤体生长没有显著的协同效应($P > 0.05$)。② 空肠组织病理变化: 清解扶正颗粒可显著改善 5-FU 化疗引起的肠黏膜绒毛变短、隐窝变深、炎性细胞浸润等肠黏膜损伤症状。③ 血清 DAO、D-LA、ET 以及 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 含量: 与 5-FU 组比较, 清解扶正颗粒可以显著降低大肠癌小鼠血清中 DAO、D-LA、ET 以及促炎细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的含量($P < 0.05$)。④ 空肠组织 Cathepsin B、NLRP3、ASC、cleaved Caspase-1 蛋白相对表达量: 与 5-FU 组比较, 清解扶正颗粒显著降低空肠组织中 Cathepsin B、NLRP3、ASC、cleaved Caspase-1 蛋白相对表达量($P < 0.05$)。⑤ 空肠组织 ZO-1、Occludin mRNA 转录水平和蛋白表达水平: 与 5-FU 组比较, 清解扶正颗粒显著增加空肠组织中紧密连接蛋白 ZO-1、Occludin mRNA 和蛋白相对表达量($P < 0.05$)。**结论** 清解扶正颗粒通过调控 Cathepsin B/NLRP3 信号通路, 减少促炎细胞因子释放, 抑制肠黏膜炎症反应, 修复肠黏膜屏障损伤, 从而减轻 5-FU 引起的化疗性肠黏膜炎。

关键词 大肠癌; Cathepsin B/NLRP3 通路; 肠黏膜炎; 5-氟尿嘧啶; 清解扶正颗粒

引用格式: 袁颖绯, 林久茂, 林明和, 等. 清解扶正颗粒调控 Cathepsin B/NLRP3 通路减轻大肠癌小鼠 5-FU 化疗性肠黏膜炎的机制研究[J]. 康复学报, 2024, 34(5): 473-482, 489.

YUAN Y F, LIN J M, LIN M H, et al. Mechanism of Qingjie Fuzheng Granules on alleviating 5-FU chemotherapy-induced intestinal mucositis in mouse model of colorectal cancer by regulating Cathepsin B/NLRP3 pathway [J]. Rehabil Med, 2024, 34(5): 473-482, 489.

DOI: 10.3724/SP.J.1329.2025.01015

©《康复学报》编辑部, 开放获取 CC BY-NC-ND 4.0 协议

© Rehabilitation Medicine, OA under the CC BY-NC-ND 4.0

肿瘤是危害人类健康的常见病和多发病,目前化疗仍然是临床上治疗肿瘤的有效方式之一。5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)作为治疗消化道肿瘤、乳腺癌常用的化疗药物,能提高患者的生存率,但同时也会引起骨髓抑制、黏膜损伤、心脏毒性等不良反应^[1-3]。化疗性肠黏膜炎(chemotherapy-induced intestinal mucositis, CIM)是肿瘤患者化疗过程中最常见的不良反应,大约80%以上接受5-FU化疗的患者可见肠黏膜炎,其临床症状主要表现为排便异常,多数患者出现腹泻、腹痛、血便及黏液便等症状^[4-5]。CIM不仅影响化疗进程,而且严重影响患者的生存质量和预后。因此,迫切需要寻找一种能减少化疗毒副作用,同时不影响5-FU疗效的治疗药物,并阐明其作用机制。

越来越多的研究发现,中医药在减毒增效方面具有独特优势^[6]。清解扶正颗粒(Qingjie Fuzheng Granules, QFG)由白花蛇舌草、半枝莲、炙黄芪和炒麦芽等组成,具有清热解毒、益气健脾等功效,临床上辅助化疗药物治疗多种恶性消化道肿瘤,能减少化疗引起的胃肠道不良反应^[7]。课题组前期研究发现, QFG不仅能抑制大肠癌细胞增殖和诱导凋亡,还能减轻5-FU化疗引起的肠黏膜炎^[8-10]。QFG通过减少白细胞介素-1 β (interleukin 1 β , IL-1 β)等促炎因子的释放,减轻炎性细胞浸润,抑制炎症反应,从而改善5-FU引起的化疗性肠黏膜炎,但其发挥抗炎效应的作用机制有待进一步研究^[10]。NOD样受体蛋白3(NOD-like receptor protein 3, NLRP3)炎症小体在肠黏膜损伤的免疫与炎症反应中起到重要作用^[11]。NLRP3炎症小体激活后,促进炎症细胞因子IL-1 β 和白细胞介素-18(interleukin-18, IL-18)的释放,参与炎症和免疫性疾病的发生与发展^[12]。研究发现,5-FU可促进溶酶体组织蛋白酶B(Cathepsin B)释放,从而调控下游NLRP3炎症小体的活化^[13]。因此,本研究基于Cathepsin B/NLRP3通路探讨QFG改善大肠癌小鼠5-FU化疗性肠黏膜炎的作用机制,为QFG的临床应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物与细胞

24只雄性BALB/c小鼠,SPF等级,4~6周龄,体质量20~22 g,由上海斯莱克实验动物有限公司提供,实验动物生产许可证号:SCXK(沪)2022-

0004,饲养于福建中医药大学实验动物中心SPF级实验室,许可证号:SYXK(闽)2023-0004。动物实验得到福建中医药大学动物伦理管理委员会批准(审批号:FJTCMIACUC2023160)。小鼠CT-26结肠癌细胞系购自普诺赛公司。

1.2 实验药物

QFG由福建中医药大学药学院制剂室提供,其君、臣、佐、使分别为白花蛇舌草、半枝莲、炙黄芪和炒麦芽,按1:1:1:1配伍。按处方量药物10倍质量比加入超纯水,加热回流提取2次,每次1 h,过滤,合并2次滤液,减压浓缩至稠膏,冷冻干燥成干浸膏。动物实验时称取QFG干浸膏1 000 mg于离心管内,加10 mL无菌生理盐水,超声0.5 h助溶,配制成浓度为100 mg/mL QFG溶液。根据临床给药剂量换算小鼠给药剂量为1.0 g/kg,按照0.1 mL/10 g的给药体积用于小鼠灌胃。

1.3 实验试剂

注射用氟尿嘧啶(山西普德药业有限公司,货号:H20051113); NovoScript[®] Plus All-in-one 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix (Novoprotein公司,货号:E096-01A); NovoStart[®] SYBR qPCR SuperMix plus (Novoprotein公司,货号:E047-02A); ZO-1抗体(Abcam公司,货号:ab96587); Occludin抗体(Abcam公司,货号:ab216327); Cathepsin B抗体(Immunoway公司,货号:YT0679-1); TMS1/ASC抗体(Thermo Fisher公司,货号:DF6304); cleaved Caspase-1(D210)抗体(Immunoway公司,货号:YC0002-1); NLRP3抗体(SAB公司,货号:38679); 免疫组织化学染色试剂盒(福州迈新生物开发有限公司,货号:Kit-0017); 小鼠内毒素(endotoxin, ET)ELISA试剂盒(江苏酶免实业有限公司,货号:MM-0369M2); 小鼠二胺氧化酶(diamine oxidase, DAO)ELISA试剂盒(江苏酶免实业有限公司,货号:MM-0228M2); 小鼠D-乳酸(D-lactic acid, D-LA)ELISA试剂盒(江苏酶免实业有限公司,货号:MM-43853M2); 小鼠白细胞介素-6(IL-6)ELISA试剂盒(江苏酶免实业有限公司,货号:MM-0163M2); 小鼠IL-1 β ELISA试剂盒(江苏酶免实业有限公司,货号:MM-0040M2); 小鼠肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)ELISA试剂盒(江苏酶免实业有限公司,货号:MM-0132M2); 小鼠源性引物(GAPDH、Occludin、ZO-1)均购自尚亚生物技术有限公司。

1.4 实验仪器

石蜡切片机(德国徕卡仪器公司,型号:RM2235); Real time PCR 仪(Bio-Rad, 型号:CFX96);微量迷你离心机(上海奥豪斯仪器有限公司,型号:FC5306);迷你混合仪(杭州米欧仪器有限公司,型号:MIX-25P);Keraeus Multifuge X1R 高速冷冻离心机[(赛默飞世尔科技(中国)有限公司];倒置显微镜(德国徕卡仪器公司,型号:DM4000B)。

2 实验方法

2.1 细胞培养

CT26 细胞株在含有 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素的 RPMI 1640 培养基中,置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养。当细胞密度达 80%~90% 时,用胰蛋白酶(0.25% EDTA)消化,按所需比例传代培养。

2.2 造模、分组及干预方法

小鼠适应性喂养 3 d 后,采取右前肢腋部皮下接种 CT26 细胞的方法构建大肠癌皮下移植瘤小鼠模型。取处于对数生长期的 CT26 细胞消化计数,制备单细胞悬液,以密度 1×10^7 /mL,每只 0.1 mL 皮下接种于小鼠右前肢腋部。待瘤体体积长至约 100~300 mm³ 时,随机分成 3 组,即对照组、5-FU 组、5-FU+清解扶正颗粒组(5-FU+QFG 组),每组 8 只。对照组连续腹腔注射与 5-FU 组等体积的生理盐水 5 d,并灌胃与 5-FU+QFG 组等体积生理盐水 7 d,每日 1 次;5-FU 组小鼠连续腹腔注射 5-FU [50 mg/(kg·d)] 5 d,每日 1 次;5-FU+QFG 组在连续腹腔注射 5-FU [50 mg/(kg·d)] 5 d 的同时灌胃给予 QFG [1.0 g/(kg·d)],每日 1 次,连续 7 d。

2.3 3 组体质量、瘤体积与腹泻情况

从分组第 1 天开始称取 3 组小鼠的体质量,计算体质量下降率。体质量下降率(%)=(最初体质量-扣瘤重体质量)/最初体质量×100%。从分组第 1 天开始测量小鼠瘤体体积,其计算公式为 $V = \pi/6 \times L(\text{长径}) \times W^2(\text{短径})$ 。参照 KURITA 等^[14] 腹泻评分方法,从分组第 1 天开始观察小鼠腹泻情况进行评分并记录,每天观察 6 h,连续观察 7 d。0 分:没有腹泻(粪便正常或无粪便);1 分:轻度腹泻(粪便稍湿和软);2 分:中度腹泻(粪便湿和粪便不成形伴中度肛周被毛染色);3 分:重度腹泻(粪便水样伴重度肛周被毛染色)。

2.4 实验样本的采集与处理

第 7 天末次给药后所有小鼠禁食 12 h,2% 戊巴比妥麻醉后,摘除眼球取血,再在冰上迅速剖腹取空肠。空肠组织分别放置 4% 多聚甲醛溶液中固定及置于 -80 °C 超低温冰箱保存备用。

2.5 3 组空肠组织病理学改变

空肠组织石蜡包埋后制作 4 μm 切片,进行常规 HE 染色。光学显微镜下观察空肠组织结构损伤及炎性细胞浸润等病理学改变,并进行图像采集。

2.6 3 组血清中 DAO、D-LA、ET 及促炎细胞因子 TNF-α、IL-1β、IL-6 的表达水平

小鼠血样静置 0.5 h 后经 4 °C、3 000 r/min, 15 min 离心后取上清,最后按照 1:5 的比例稀释样本,完成 ELISA 试剂盒中上样样品的制备,参照试剂盒中的说明书步骤进行实验。

2.7 3 组空肠组织中 Cathepsin B 的相对表达量

载玻片经脱蜡至水后,微波炉加热抗原修复,参照免疫组织化学试剂盒说明书步骤,内源性过氧化物酶阻断后封闭,孵育一抗工作液过夜,Cathepsin B 按 1:200 稀释,设置阴性对照,二抗孵育完后,DAB 显色,苏木素复染,棕色或棕黄色为阳性表达,每张切片光镜下随机观察,采用 ImageJ 分析蛋白表达平均光密度值。

2.8 3 组空肠组织中 ZO-1、Occludin mRNA 相对表达水平

TRIzol 法提取小鼠空肠组织的总 RNA 并检测其纯度,逆转录根据试剂盒实验步骤进行样本和 Mix 体系混合后,在反应程序 50 °C 15 min,75 °C 5 min 下合成 cDNA。采取 qPCR 法进行定量分析,PCR 扩增程序为 95 °C 1 min;95 °C 20 s,60 °C 20 s,72 °C 30 s,总共进行 45 个循环。荧光定量使用 SYBR Green 荧光染料。应用 Ct 值法计算目的基因的量 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。各基因引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence of target gene	
基因名称	引物序列(5'→3')
ZO-1	F:5'GAGCAAGCCTTCTGCACATC3'
	R:5'TCGGGTTTTCCCTTTGAAGAGT3'
Occludin	F:5'ATGGCTGCTGCTGATGAATA3'
	R:5'CTTGATGTGCGATAATTTGCTCTT3'
GAPDH	F:5'TGGAAAGCTGTGGCGTGATG3'
	R:5'TACTTGGCAGGTTTCTCCAGG3'

2.9 3组空肠组织中ZO-1、Occludin、Cathepsin B、NLRP3、ASC、cleaved Caspase-1蛋白相对表达量

组织裂解液提取小鼠空肠组织总蛋白,BCA测蛋白含量,定量。经制胶、上样、电泳(30 V 10 min, 80 V 30 min, 120 V 60 min)、转膜(转膜时间根据目的蛋白分子量决定)、封闭2 h, TBST洗膜5 min, 洗3次,加入检测目的蛋白的一抗(稀释比例为1:1 000),4 ℃冷库脱色摇床上孵育过夜,回收一抗, TBST洗膜5 min, 洗3次,加入二抗(稀释比例1:10 000),37 ℃孵育1 h, TBST洗膜5 min, 洗3次,ECL进行曝光显影, β -actin为内参,使用ImageJ软件分析蛋白条带灰度值。

2.10 统计学方法

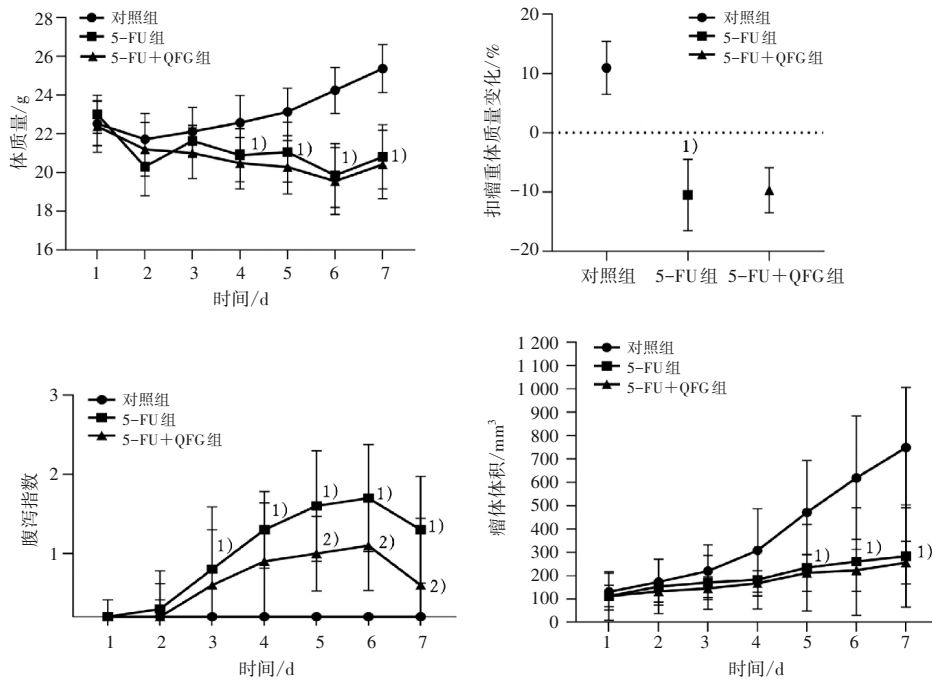
使用SPSS 25.0软件对实验数据进行统计学分析处理。计量资料服从正态分布采用($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较采用方差分析,方差齐时两两比较采用LSD-*t*检验,方差不齐时采用Tamhane's T2法。 $P <$

0.05为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 3组体质量、瘤体体积和腹泻指数的比较

与对照组相比,5-FU组第2天开始体质量呈下降趋势,第4天体质量下降显著($P < 0.05$),且实验周期内体质量明显下降($P < 0.05$);与5-FU组相比,QFG对5-FU化疗引起的体质量下降没有显著改善($P > 0.05$)。与对照组相比,5-FU组从第3天开始出现轻微腹泻,随着时间的延长,腹泻指数显著性增加,第6天达到腹泻高峰($P < 0.05$)。与5-FU组相比,5-FU+QFG组从第5天开始腹泻指数差异具有统计学意义($P < 0.05$),QFG显著改善5-FU引起的腹泻症状。与对照组相比,5-FU组在第5天开始瘤体体积发生变化,差异具有统计学意义($P < 0.05$),实验周期内QFG对5-FU抑制瘤体生长没有显著的协同效应($P > 0.05$)。见图1。



注:与对照组比较,1) $P < 0.05$;与5-FU组比较,2) $P < 0.05$ 。

Note: Compared with the control group, 1) $P < 0.05$; compared with the 5-FU group, 2) $P < 0.05$.

图1 3组体质量、瘤体体积和腹泻指数比较

Figure 1 Comparison of body mass,tumor volume, and diarrhea index of in each group

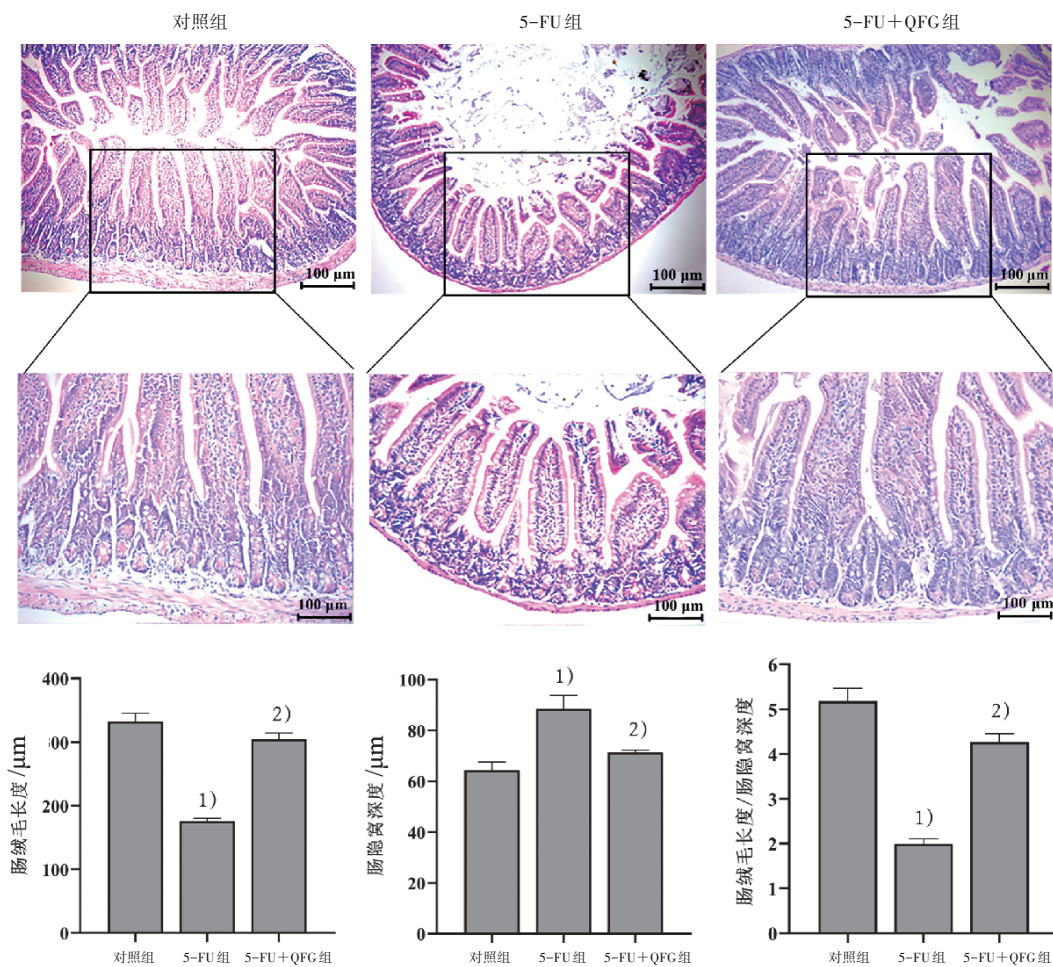
3.2 3组空肠组织病理形态学变化

HE染色结果显示,对照组小鼠空肠组织基本结构完整清楚,肠绒毛细长且排列整齐规则,隐窝浅,界限明显,未见炎性细胞的浸润;5-FU组小鼠肠

绒毛萎缩变短且排列紊乱,并伴有顶端缺失及空泡化情况,隐窝明显加深,部分肠上皮层与固有层分离,可见炎性细胞浸润;5-FU+QFG组空肠组织结构得到明显的修复,肠绒毛变长且排列稍整齐规

则, 隐窝深度变浅且界限分明清晰, 炎性细胞浸润的现象得到较好的抑制。形态计量学分析显示, 与对照组比较, 5-FU 组的肠绒毛长度显著降低, 隐窝深度显著增加, 绒毛/隐窝比显著降低 ($P < 0.05$); 与

5-FU 组比较, 5-FU + QFG 组的肠绒毛长度显著增加, 隐窝深度显著降低, 绒毛/隐窝比显著增加 ($P < 0.05$)。结果表明, QFG 可显著减轻 5-FU 所致的大肠癌小鼠空肠组织的损伤。见图 2。



注: 与对照组比较, 1) $P < 0.05$; 与 5-FU 组比较, 2) $P < 0.05$ 。

Note: Compared with the control group, 1) $P < 0.05$; compared with the 5-FU group, 2) $P < 0.05$.

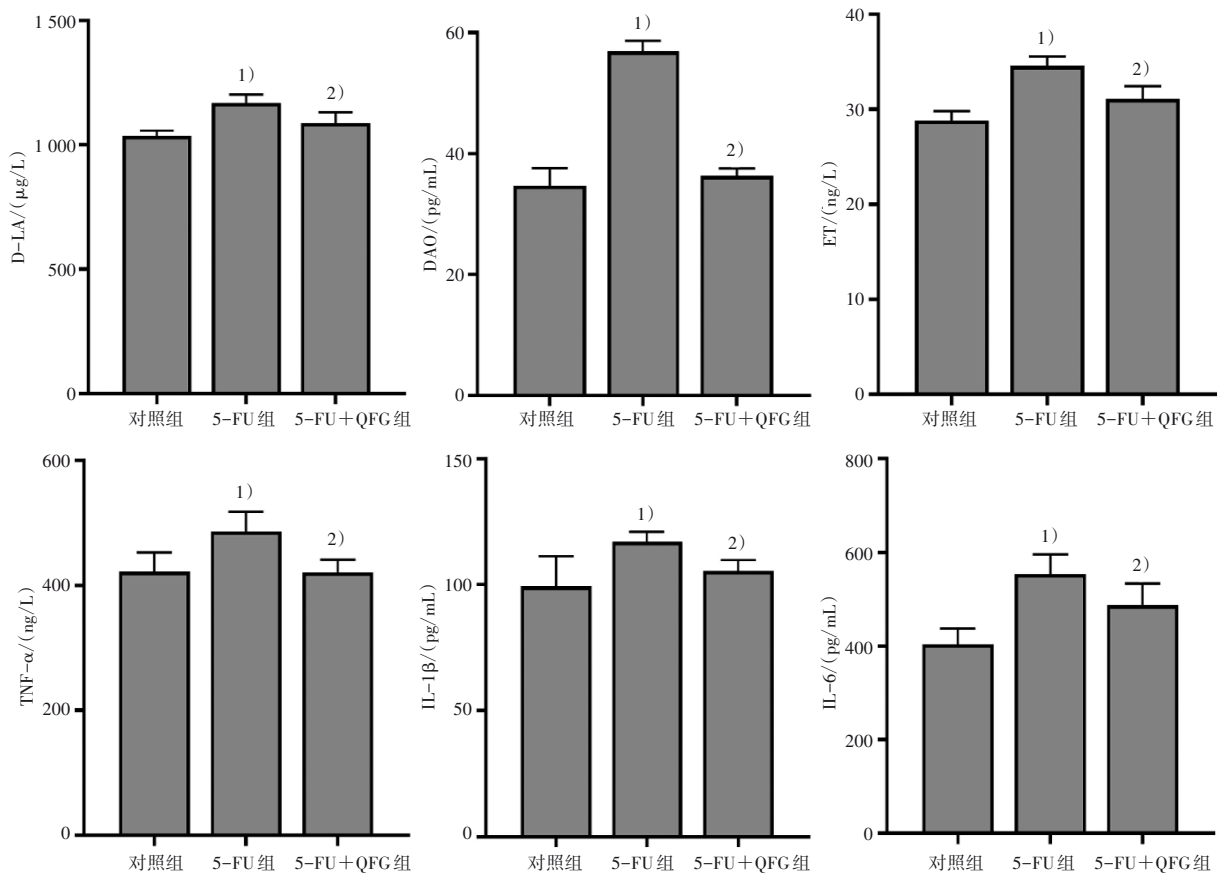
图 2 3 组空肠组织病理形态学观察 ($\times 100, \times 200$)

Figure 2 Pathological morphological observation of jejunal tissues of in three groups ($\times 100, \times 200$)

3.3 3 组血清中 DAO、D-LA、ET 及促炎细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 相对表达水平比较

与对照组比较, 5-FU 组小鼠血清中 DAO、D-LA、ET 及促炎细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 相对表

达水平明显升高 ($P < 0.05$); 给予 QFG 干预后, 5-FU + QFG 组小鼠血清中 DAO、D-LA、ET 及促炎因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 表达水平均显著降低 ($P < 0.05$)。见图 3。



注:与对照组比较,1) $P < 0.05$;与5-FU组比较,2) $P < 0.05$ 。

Note: Compared with the control group, 1) $P < 0.05$; compared with the 5-FU group, 2) $P < 0.05$.

图3 3组血清中DAO、D-LA、ET、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6含量水平比较

Figure 3 Comparison of level of DAO, D-LA, ET, TNF- α , IL-1 β and IL-6 in serum in three groups

3.4 3组空肠组织中Cathepsin B蛋白相对表达量

免疫组织化学法结果显示,Cathepsin B主要在胞浆,镜下呈棕黄色。与对照组比较,5-FU组小鼠空肠组织中Cathepsin B的阳性表达率升高($P < 0.05$);与5-FU组比较,给予QFG干预后,小鼠空肠组织中的Cathepsin B阳性表达率下降($P < 0.05$)。Western blot结果显示,与对照组比较,5-FU组小鼠空肠组织中Cathepsin B蛋白相对表达量升高($P < 0.05$);与5-FU组比较,QFG干预后降低空肠组织Cathepsin B蛋白相对表达量($P < 0.05$)。见图4。

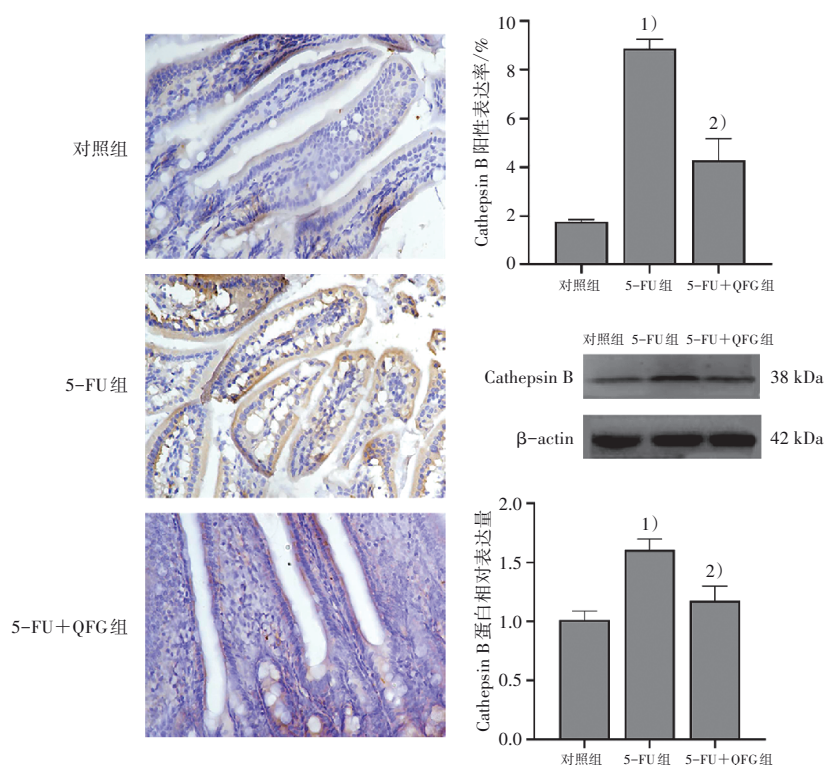
3.5 3组空肠组织中NLRP3、ASC、cleaved Caspase-1蛋白的表达水平

与对照组比较,5-FU组小鼠空肠组织中NLRP3、ASC、cleaved Caspase-1蛋白相对表达量均升

高($P < 0.05$);与5-FU组比较,5-FU+QFG组空肠组织中NLRP3、ASC、cleaved Caspase-1蛋白的相对表达量均降低($P < 0.05$)。见图5。

3.6 3组空肠组织中ZO-1、Occludin mRNA和蛋白相对表达量

qPCR结果显示,与对照组比较,5-FU组小鼠空肠组织中紧密连接蛋白ZO-1、Occludin mRNA表达水平降低($P < 0.05$);与5-FU组比较,给予QFG干预后,QFG增加5-FU所致的肠黏膜损伤小鼠空肠组织中ZO-1、Occludin mRNA的表达($P < 0.05$)。Western blot结果显示,与对照组比较,5-FU组小鼠空肠组织ZO-1、Occludin蛋白相对表达量降低($P < 0.05$);与5-FU组比较,空肠组织中ZO-1、Occludin蛋白相对表达量均升高($P < 0.05$)。见图6。

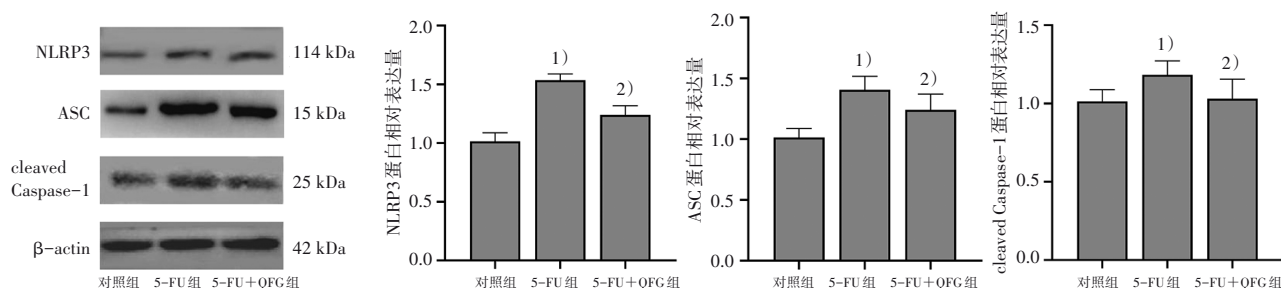


注:与对照组比较,1) $P < 0.05$;与5-FU组比较,2) $P < 0.05$ 。

Note: Compared with the control group, 1) $P < 0.05$; compared with the 5-FU group, 2) $P < 0.05$.

图4 3组小鼠空肠组织 Cathepsin B 蛋白的表达水平 ($\times 400$)

Figure 4 Expression level of Cathepsin B protein in jejunum tissue of mice in three groups ($\times 400$)



注:与对照组比较,1) $P < 0.05$;与5-FU组比较,2) $P < 0.05$ 。

Note: Compared with the control group, 1) $P < 0.05$; compared with the 5-FU group, 2) $P < 0.05$.

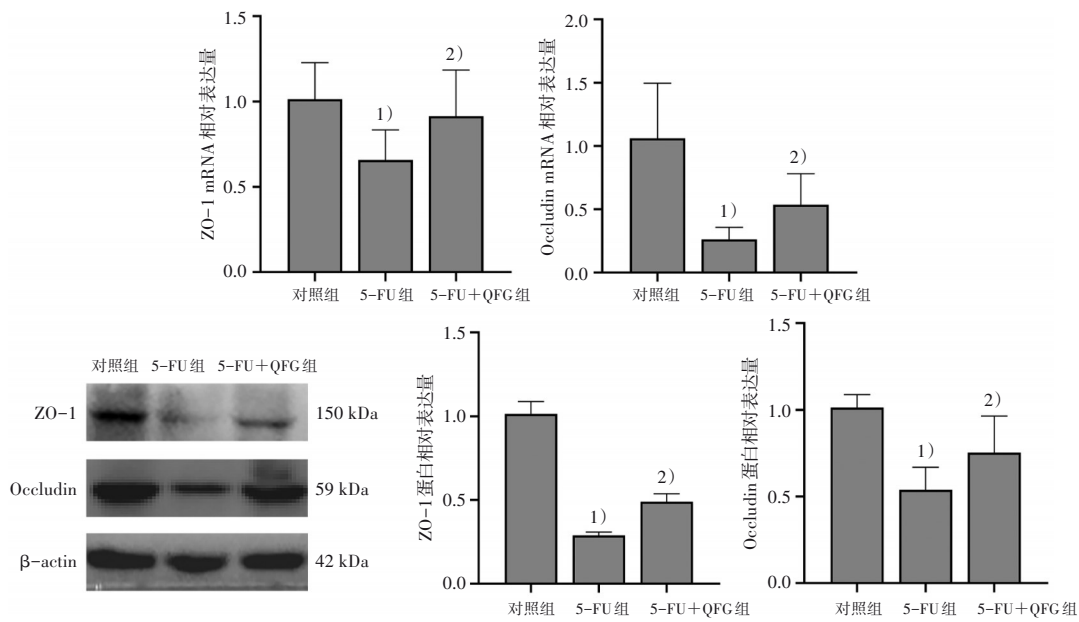
图5 3组空肠组织中 NLRP3、ASC、cleaved Caspase-1 蛋白的表达水平

Figure 5 Expression level of NLRP3, ASC, and cleaved Caspase-1 protein in jejunal tissue in three groups

4 讨论

中医学认为化疗药物属于“毒”“邪”等范畴,易耗损阳气,损伤脾胃之阳,脾气不升,胃气不降,脾运失健,水湿内生,湿邪郁久化热,流注大肠,发为湿热泄^[15]。因此,化疗所致的肠黏膜炎的基本病机为脾虚湿热,临床上多采用“清热解毒祛邪、健脾益气扶正”等治疗方式^[16]。QFG以白花蛇舌草为君

药,半枝莲为臣药,辅以佐使炙黄芪和炒麦芽组成。方中白花蛇舌草清热解毒、消痈散结、利尿除湿;半枝莲清热解毒、活血止痛,二者合用增加清热解毒之功效;炙黄芪健脾补中,升阳举陷,益卫固表,调和君臣寒凉之性;炒麦芽行气消积,调节脾胃气机升降失调,促进脾胃运化,缓解君臣凉遏脾胃之气。诸药相须为用,共奏“清热解毒、健脾益气扶正”之功效。



注:与对照组比较,1) $P < 0.05$;与5-FU组比较,2) $P < 0.05$ 。

Note: Compared with the control group, 1) $P < 0.05$; compared with the 5-FU group, 2) $P < 0.05$.

图6 3组空肠组织中ZO-1、Occludin mRNA和蛋白的表达水平

Figure 6 Expression level of ZO-1, Occludin mRNA and protein in jejunum tissue in three groups

临床研究发现,清解扶正方联合化疗药物治疗晚期肠癌,能提高总有效率,改善免疫功能,缓解腹泻、恶心呕吐等消化道不良反应^[7,17]。课题组前期研究证实QFG可以抑制大肠癌细胞增殖和促进大肠癌细胞凋亡^[18]、抑制大肠癌血管和淋巴管新生^[19-20]。进一步研究发现,在5-FU诱导的CT-26荷瘤小鼠肠黏膜炎模型中,QFG通过抑制空肠组织凋亡,减少空肠组织炎性细胞的浸润,减轻5-FU所致的腹泻和肠黏膜炎,但作用机制还未明确^[10]。本研究在前期研究的基础上,进一步证实了QFG可以减少5-FU所致的肠黏膜炎小鼠血清中促炎因子的释放,减轻5-FU所致的腹泻和空肠组织病理损伤,并且改善肠黏膜屏障损伤,但是在本实验周期内,由于QFG干预时间比较短,对5-FU所致的肠黏膜炎小鼠体质量减轻还未有所改善,对5-FU抑制瘤体生长也未出现协同效应但不影响5-FU的治疗效果。

5-FU所致的肠黏膜炎的机制错综复杂,其中炎症介质引发的炎症级联反应是5-FU致肠黏膜炎的重要机制^[21]。化疗药物多具有细胞毒性,可引起肠黏膜的免疫系统调节异常,使肠上皮细胞,黏膜固有层中的免疫细胞分泌大量促炎性细胞因子,如TNF- α 、IL-1 β 、IL-6等,引发炎症级联反应,诱导肠黏膜上皮细胞凋亡或坏死,绒毛变短、隐窝加深,进一步引起炎性细胞浸润,造成肠黏膜溃疡形成,导

致吸收和消化面积减少,吸收功能减弱,出现腹泻。同时炎症介质的释放破坏了肠黏膜上皮细胞之间的紧密连接,肠黏膜通透性升高,肠黏膜机械屏障功能受损,一些有害细菌或内毒素易位^[22]。肠上皮细胞间的紧密连接是肠黏膜机械屏障的重要组成部分,是抵抗细菌、病毒侵袭及抗原入侵的第一道防线。occludin、封闭蛋白(claudin)、连接黏附分子(junctional adhesion molecule, JAM)、带状闭合蛋白(zonula occludens, ZO)家族等被认为是评价肠黏膜屏障通透性的重要指标^[23]。当肠黏膜屏障受损,通透性增加时,小肠黏膜上皮细胞中的二胺氧化酶(diamine oxidase, DAO)、细菌发酵的代谢产物D-乳酸(D-Lactate, D-LA)以及内毒素(endotoxin, ET)就从肠腔进入血液,因此临床实践以及基础研究中常检测血清中DAO、D-LA以及ET水平来评估肠黏膜屏障功能^[24-25]。本研究结果表明,与5-FU组相比,QFG可以减轻5-FU所致的腹泻、减缓5-FU化疗引起的肠绒毛变短、隐窝深度增加及肠黏膜组织炎性细胞浸润等空肠组织病理损伤,从而恢复肠道的吸收、传递功能;减少血液中TNF- α 、IL-1 β 、IL-6等促炎细胞因子的分泌与释放,抑制炎症反应;降低血液中DAO、D-LA、ET的含量,有效地减少了体内有效细菌和内毒素的蓄积;增加空肠组织紧密连接蛋白ZO-1、Occludin mRNA和蛋白表达水平,从而降

低肠黏膜的通透性,修复肠黏膜的屏障功能,缓解肠黏膜损伤。

越来越多的研究证实,NLRP3 炎症小体在维持肠道内环境稳态及调节肠道免疫与炎症反应方面发挥重要作用^[26]。NLRP3 炎症小体是 NOD 样受体(NOD-like receptor, NLR)家族中的重要成员,由核心蛋白 NLRP3、凋亡相关斑点样蛋白 ASC(apoptosis-associated speck-like protein, ASC)作为接头蛋白以及效应蛋白 Caspase-1 组成,广泛分布于肠黏膜上皮细胞以及浸润的巨噬细胞、树突状细胞及中性粒细胞中,是系列炎症和免疫反应的核心要素^[27]。当 NLRP3 炎症小体受到刺激活化后,pro-Caspase-1 从复合物中裂解,自剪切成活化形式,活化的 Caspase-1 将无活性的 pro-IL-1 β 和 pro-IL-18 裂解为成熟体释放到胞外,加剧炎症反应^[12]。目前研究发现 NLRP3 炎症小体参与了化疗性肠黏膜炎的发生与发展,在调节肠道炎症反应方面发挥重要作用。NAKATA 等^[28]发现,在 5-FU 诱导的肠黏膜炎小鼠模型中,NLRP3 和 IL-1 β mRNA 的表达增加,cleaved Caspase-1 和成熟 IL-1 β 蛋白表达升高。本研究结果显示,与对照组相比,5-FU 组 NLRP3、ASC、cleaved Caspase-1 蛋白表达显著增加,促炎细胞因子 IL-1 β 的表达亦相应显著增加,说明在 5-FU 化疗所致的肠黏膜损伤中,NLRP3 炎症小体参与了 Caspase-1 的活化及 IL-1 β 的分泌。QFG 干预后,可显著下调 5-FU 所致的肠黏膜损伤小鼠空肠组织中 NLRP3、ASC、cleaved Caspase-1 蛋白的表达,减少促炎细胞因子 IL-1 β 的分泌,提示 QFG 可能通过 NLRP3 炎症小体通路减少促炎细胞因子的释放,减轻大肠癌小鼠 5-FU 所致的肠黏膜炎。

NLRP3 小体的激活被认为与细胞溶酶体破裂导致 Cathepsin B 释放有关^[29]。Cathepsin B 是广泛分布于多种组织细胞溶酶体中的一种重要的半胱氨酸蛋白水解酶,通过调控细胞凋亡与炎症反应干预肿瘤等多种疾病的发生与发展^[30]。已有报道细胞吞噬某些颗粒物或晶体类,如 MSU、二氧化硅、石棉等,可导致溶酶体损伤或破裂,Cathepsin B 被释放到胞质,与 NLRP3 小体相互作用,激活 NLRP3 炎症小体^[31]。WANG 等^[32]研究发现 Cathepsin B 通过激活 NLRP3 炎症小体,促进 Caspase-1 诱导的细胞焦亡而加重急性胰腺炎。BRUCHARD 等^[13]学者研究发现,5-FU 可以促进大肠癌患者髓样抑制性细胞(myeloid derived suppress cells, MDSCs)溶酶体释放组织蛋白酶 B,通过与 NLRP3 的 LRR 结构域相互作

用,直接激活 NLRP3 炎症小体,导致 IL-1 β 分泌,提示 5-FU 导致溶酶体损伤后 Cathepsin B 的释放是 NLRP3 炎症小体激活的重要作用机制。本研究结果显示大肠癌小鼠给予 5-FU 后,空肠组织 Cathepsin B 蛋白表达显著增加,QFG 干预后,空肠组织中 Cathepsin B 蛋白表达显著减少,提示 QFG 有可能通过抑制 Cathepsin B 的表达,进而抑制 NLRP3 炎症小体的活化,从而发挥减轻化疗性肠黏膜炎的作用。

综上所述,QFG 对大肠癌小鼠 5-FU 化疗所致的肠黏膜炎有显著的改善作用,其作用机制可能与抑制 Cathepsin B/NLRP3 信号通路,减少促炎细胞因子的释放,减轻肠黏膜炎症反应,修复肠黏膜屏障损伤有关。后续将在本实验的基础上通过人肠上皮细胞 HIEC-6,应用 NLRP3 激活剂进一步研究 QFG 对 Cathepsin B/NLRP3 通路的具体作用机制,挖掘关键的作用靶点,为临床运用 QFG 治疗大肠癌患者 5-FU 化疗所致的肠黏膜炎提供实验依据。

参考文献

- [1] LONGLEY D B, HARKIN D P, JOHNSTON P G. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies [J]. *Nat Rev Cancer*, 2003, 3(5): 330-338.
- [2] SHIGA T, HIRAIDE M. Cardiotoxicities of 5-fluorouracil and other fluoropyrimidines [J]. *Curr Treat Options Oncol*, 2020, 21(4): 27.
- [3] SOARES P M, MOTA J M, SOUZA E P, et al. Inflammatory intestinal damage induced by 5-fluorouracil requires IL-4 [J]. *Cytokine*, 2013, 61(1): 46-49.
- [4] POON M A, O'CONNELL M J, MOERTEL C G, et al. Biochemical modulation of fluorouracil: evidence of significant improvement of survival and quality of life in patients with advanced colorectal carcinoma [J]. *J Clin Oncol*, 1989, 7(10): 1407-1418.
- [5] SONIS S T. The pathobiology of mucositis [J]. *Nat Rev Cancer*, 2004, 4(4): 277-284.
- [6] JIN W W, LIN J M. Research progress of traditional Chinese medicine on enhancing effect and decreasing toxicity of tumor chemotherapeutic drugs [J]. *Fujian J Tradit Chin Med*, 2019, 50(1): 85-88.
- [7] HUA K J, LIN J M, REN L P, et al. Curative effect of Qing jie fu zheng recipe combined with MFOLFOX4 regimen in the treatment of advanced colorectal cancer [J]. *Fujian J Tradit Chin Med*, 2019, 50(1): 20-21.
- [8] ZHU X Q, YANG H, HUANG B, et al. Effect of Qingjie Fuzheng Granules on proliferation, apoptosis and migration of colorectal cancer SW620 Cells [J]. *Rehabil Med*, 2020, 30(1): 46-51.
- [9] ZHU X Q, YANG H, LIN M H, et al. Qingjie Fuzheng Granules regulates cancer cell proliferation, apoptosis and tumor angiogenesis in colorectal cancer xenograft mice via Sonic Hedgehog pathway [J]. *J Gastrointest Oncol*, 2020, 11(6): 1123-1134.
- [10] ZHANG L, JIN Y Y, PENG J, et al. Qingjie Fuzheng Granule

- attenuates 5-fluorouracil-induced intestinal mucosal damage [J]. *Biomedicine Pharmacother*, 2019, 118: 109223.
- [11] ZHANG H Y, ZHUANG Y Y, ZENG Q F. Progress in the role of NLRP3 inflammasome in inflammatory enteritis [J]. *Modern Intervent Diagno Treat*, 2019, 24(9): 1059-1062.
- [12] LIU W, GUO W J, XU Q, et al. Advances in mechanisms for NLRP3 inflammasomes regulation [J]. *Yao Xue Xue Bao*, 2016, 51(10): 1505-1512.
- [13] BRUCHARD M, MIGNOT G, DERANGÈRE V, et al. Chemotherapy-triggered cathepsin B release in myeloid-derived suppressor cells activates the Nlrp3 inflammasome and promotes tumor growth [J]. *Nat Med*, 2013, 19(1): 57-64.
- [14] KURITA A, KADO S, KANEDA N, et al. Modified irinotecan hydrochloride (CPT-11) administration schedule improves induction of delayed-onset diarrhea in rats [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2000, 46(3): 211-220.
- [15] ZHANG Y, LI F, MA C M, et al. To explore the TCM treatment of gastrointestinal dysfunction after radiotherapy and chemotherapy for colorectal cancer [J]. *Yunnan J Tradit Chin Med Mater Med*, 2017, 38(10): 18-19.
- [16] LIU H, FENG D Q, SHAO S Y, et al. Jianpi Jiedu Formula alleviated 5-FU-induced intestinal mucositis in rats through inhibiting TLRs/NF- κ B signaling pathway [J]. *Shanghai J Tradit Chin*, 2020, 54(12): 84-90.
- [17] HUA K J, LIN J M, LU L S, et al. Effect of replenishing qi and detoxification combined with chemotherapy on short-term efficacy and quality of life in patients with advanced colorectal cancer [J]. *Asia-Pact Tradit Med*, 2021, 17(11): 106-109.
- [18] YANG H, LIU J X, SHANG H X, et al. Qingjie Fuzheng granules inhibit colorectal cancer cell growth by the PI3K/AKT and ERK pathways [J]. *World J Gastrointest Oncol*, 2019, 11(5): 377-392.
- [19] 曹治云, 余旋, 魏丽慧, 等. 清解扶正颗粒体外抑制血管新生的作用机制研究 [J]. *实用中西医结合临床*, 2019, 19(1): 4-6, 160.
- CAO Z Y, YU X, WEI L H, et al. The antiangiogenic effect of the qingjiefuzheng granules on HUVEC *in vitro* [J]. *Pract Clin J Integr Tradit Chin West Med*, 2019, 19(1): 4-6, 160.
- [20] HUANG B, LU Y, GUI M X, et al. Qingjie Fuzheng Granule suppresses lymphangiogenesis in colorectal cancer via the VEGF-C/VEGFR-3 dependent PI3K/AKT pathway [J]. *Biomed Pharmac*, 2021, 137: 111331.
- [21] HAMOUDA N, SANO T, OIKAWA Y, et al. Apoptosis, dysbiosis and expression of inflammatory cytokines are sequential events in the development of 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in mice [J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2017, 121(3): 159-168.
- [22] BIAN O. Mechanism and prevention of intestinal mucosal barrier dysfunction induced by chemotherapy [J]. *Chin Clin Pract Med*, 2017(2): 1-2.
- [23] SUN B Y, WANG S Y, HU H Y. Research progress on the relationship between intestinal permeability and inflammatory bowel disease [J]. *Chin J Integr Tradit Weste Medic Diges*, 2016, 24(11): 891-894.
- [24] JIANG B. Changes of DAO, endotoxin, D-lactic acid and their role in evaluating intestinal mucosal barrier function in patients with liver cirrhosis [J]. *Chin Pract Med*, 2017, 12(33): 33-34.
- [25] 邓怒骄, 陈凌波, 谭瑛子, 等. 栀子苷对酵母多糖致大鼠肠黏膜屏障损害作用的研究 [J]. *湖南中医药大学学报*, 2019, 39(4): 465-469.
- DENG N J, CHEN L B, TAN Y Z, et al. Effects of geniposide on intestinal mucosal barrier damage induced by zymosan in rats [J]. *J Hunan Univ Chin Med*, 2019, 39(4): 465-469.
- [26] GU S Z, DOU D B. NLRP3 inflammasomes and inflammatory bowel diseases and intervention of traditional Chinese medicine [J]. *Hanghai J Tradit Chin Med*, 2017, 51(S1): 249-252.
- [27] 郑沁薇, 郝微微, 王凯强, 等. NLRP3炎症小体对炎症性肠病免疫机制影响的研究进展 [J]. *世界华人消化杂志*, 2019, 27(6): 389-394.
- ZHENG Q W, HAO W W, WANG K Q, et al. Impact of NLRP3 inflammasome on immune modulation mechanism in inflammatory bowel disease [J]. *World Chin J Digestol*, 2019, 27(6): 389-394.
- [28] NAKATA A, NADATANI Y, WATANABE T, et al. NOD-like receptor family pyrin domain-containing 3 inflammasome activation exacerbates 5-fluorouracil-induced small intestinal mucositis *via* interleukin-1 β activation [J]. *Digestion*, 2021, 102(2): 298-312.
- [29] LIU Y G, CHEN Y C, ZONG Y, et al. Activation and regulation of NLRP3 inflammasome [J]. *Acade J Naval Med Uni*, 2016, 37(7): 868-872.
- [30] 郑媛媛, 刘伟敬, 刘华锋. 溶酶体组织蛋白酶B和D调控细胞凋亡及炎症反应的研究进展 [J]. *临床医学工程*, 2014, 21(1): 126-128.
- ZHENG Y Y, LIU W J, LIU H F. Research advance of cathepsin B and D regulating apoptosis and inflammation [J]. *Clin Med & Eng*, 2014, 21(1): 126-128.
- [31] QIAO T X, TANG C L, QIU L, et al. Cathepsin-B involved in effect of electroacupuncture by inhibiting the activation of NLRP3 inflammasome in rats with acute gouty arthritis [J]. *Zhen Ci Yan Jiu*, 2021, 46(4): 295-300.
- [32] WANG J H, WANG L C, ZHANG X F, et al. Cathepsin B aggravates acute pancreatitis by activating the NLRP3 inflammasome and promoting the caspase-1-induced pyroptosis [J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 94: 107496.

(下转第 489 页)