

丹皮酚对 5-FU 诱导的小鼠肠道黏膜损伤的保护作用及对其抗肿瘤活性的影响^{*}

韩成龙¹ 李苏阳² 韩雅萌³

(1. 四川大学华西药学院, 四川 成都 610041; 2. 安徽中医药大学药学院, 安徽 合肥 230000; 3. 蚌埠医学院临床医学系, 安徽 蚌埠 233030)

【摘要】 目的 研究丹皮酚对 5-氟尿嘧啶(5-FU)诱导小鼠肠黏膜损伤中的保护作用。**方法** SD 成年雄性 C57BL/6J 小鼠随机分为对照组(Con 组, 12 只)、5-FU 注射组(5-FU 组, 12 只)、丹皮酚 25 mg/kg 组(5-FU + Pae 25 mg/kg 组, 13 只)、丹皮酚 100 mg/kg 组(5-FU + Pae 100 mg/kg 组, 13 只)。通过腹腔注射 5-FU 建立小鼠肠黏膜损伤模型, 探讨丹皮酚对小鼠 5-FU 注射后体重的影响。HE 染色观察丹皮酚对小鼠小肠绒毛损伤的形态学影响; 免疫组化实验研究小鼠小肠腺细胞凋亡情况; 成瘤实验观察丹皮酚对 5-FU 抗肿瘤活性的影响。**结果** 注射 5-FU 9 天后, 小鼠体重显著降低, 而丹皮酚处理后可显著恢复小鼠体重。丹皮酚可明显降低小肠水肿程度或出血, 并使小肠绒毛升高, 增加小肠腺细胞数量。免疫组化结果显示, 丹皮酚可显著降低小肠腺细胞凋亡程度。**结论** 丹皮酚可通过抑制小肠腺细胞凋亡降低 5-FU 对小鼠黏膜损伤的影响, 具有一定的抗肿瘤作用, 并可增强其抗肿瘤活性。

【关键词】 丹皮酚; 5-氟尿嘧啶; 肠黏膜损伤; 抗肿瘤活性

【中图分类号】 R574; R96 **【文献标志码】** A **DOI:** 10. 3969/j. issn. 1672-3511. 2022. 08. 007

Protective effect of paeonol on intestinal mucosal injury induced by 5-fluorouracil in mice and its antitumor activity

HAN Chenglong¹, LI Suyang², HAN Yameng³

(1. West China School of Pharmacy Sichuan University, Chengdu 610041, China;

2. School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230000, China;

3. Department of Clinical Medicine, Bengbu Medical College, Bengbu 233030, Anhui, China)

【Abstract】 Objective To study the protective effect of Paeonol on intestinal mucosal injury induced by 5-FU in mice. **Methods** Mice were randomly divided into control group (CON, 12 mice), 5-FU injection group (5-FU, 12 mice), paeonol 25mg/kg group (5-FU+25mg/kg Pae, 13 mice), paeonol 100mg/kg group (5-FU+100mg/kg Pae, 13 mice). The mice intestinal mucosal injury model was established by intraperitoneal injection of 5-FU, and the effects of paeonol on the weight of mice after 5-FU injection were studied. The morphological effects of paeonol on the small intestinal villus injury were observed by H&E staining, and the apoptosis of small intestinal adenocytes was studied by immunohistochemical experiment. Finally, the effect of paeonol on 5-FU antitumor activity was observed by tumorigenicity assay. **Results** After 9 days of 5-FU injection, the weight of mice decreased significantly, while paeonol could significantly restore the weight of mice. Paeonol can significantly reduce the degree of small intestinal edema or bleeding, and increase the number of small intestinal glands. Immunohistochemical results showed that paeonol could significantly reduce the apoptosis of small intestinal gland cells. Finally, we found that paeonol had certain anti-tumor effects and might enhance the anti-tumor activity of 5-FU. **Conclusion** Paeonol can reduce the effect of 5-FU on mucosal injury and enhance the pit tumor activity of mice by inhibiting the apoptosis of small adenocarcinoma cells.

【Key words】 Paeonol; 5-FU; Intestinal mucosal damage; Antitumor activity

基金项目: 安徽省高校省级科学研究重点项目(KJ2017B182)

引用本文: 韩成龙, 李苏阳, 韩雅萌. 丹皮酚对 5-FU 诱导的小鼠肠道黏膜损伤的保护作用及对其抗肿瘤活性的影响[J]. 西部医学, 2022, 34(8):

1128-1132. DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-3511. 2022. 08. 007

5-氟尿嘧啶(5-Fluorouracil, 5-FU)是治疗胃肠道癌、乳腺癌、肺癌等多种癌症最常用的抗肿瘤药物^[1]。临床上 5-FU 的剂量通常为 10~20 mg/kg,药效可持续 5~10 d^[2]。然而, 5-FU 可引起一系列副作用,这其中就包括肠道功能损伤。据报道,大约 80%接受化疗的癌症患者会发生肠黏膜炎^[3]。丹皮酚是从毛茛科植物牡丹的根皮中提取出来的活性成分。丹皮酚具有镇痛、抗炎、解热、抗氧化及保护心脑血管等广泛的药理活性^[4]。研究发现,丹皮酚可增强化疗药物对肝癌和结肠癌的抑制作用^[5-6],然而丹皮酚对化疗过程中肠黏膜的保护作用并不清楚。本实验通过腹腔注射 5-FU 建立小鼠肠黏膜炎模型,研究丹皮酚对小鼠肠黏膜损伤的保护作用及对其抗肿瘤活性的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物 SD 成年雄性 C57BL/6J 小鼠购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司,饲养在 SPF 级动物房内,室温(23.00±1.00)℃,昼夜循环 12 h。丹皮酚购自安徽宣城百草植物工贸有限公司,纯度>98%(批号:N0980)。5-FU 购自天津金耀氨基酸有限公司(批号:1803091)。本研究通过动物伦理委员会审核批准。

1.2 分组 小鼠随机分为对照组(Con 组,12 只)、5-FU 注射组(5-FU 组,12 只)、丹皮酚 25 mg/kg 组(5-FU+Pae 25 mg/kg 组,13 只)、丹皮酚 100 mg/kg 组(5-FU+Pae 100 mg/kg 组,13 只)。小鼠均在在饲养环境下适应一周。5-FU 以及 5-FU+Pae 组小鼠每天腹腔注射 5-FU(50 mg/kg)一次,连续 6 d,Con 组注射等体积生理盐水。Pae 组小鼠每天灌胃给予对应浓度丹皮酚,每天两次,连续 6 d,Con 组和 5-FU 组小鼠每天灌胃等体积生理盐水。7 d 后小鼠经过量麻醉处死进行相应组织或生化检测。

1.3 成瘤实验 所有小鼠在接受药物注射前接受皮下注射结肠癌细胞(人结肠癌细胞株 LS174T 购于中国科学院生物研究所)。取对数生长期结肠癌细胞,制成细胞悬液,随后接种在小鼠腹股沟处。小鼠在第二天接受 5-FU 注射或丹皮酚治疗。实验接受后过量麻醉处死小鼠,取肿瘤组织称重。

1.4 HE 染色观察小鼠肠道形态 小鼠过量乙醚麻醉后快速打开腹腔,暴露出肠道。去小鼠肠道组织后,生理盐水冲洗并快速固定于 4% 福尔马林缓冲液中,24 h 后进行石蜡包埋处理。用切片机制作 4 μm 厚度小肠组织切片,HE 染色观察小肠绒毛形态学变化情况。

1.5 免疫组化染色观察小鼠小肠腺细胞 小肠组织切片通过二甲苯中脱石蜡后浸泡乙醇水化,随后

100℃煮沸 1 h。切片在 H₂O₂ 处理 45 min 以分解内源性过氧化物酶。PBS 洗涤后,切片以 10% 山羊血清 37℃ 下封闭 1 h。随后加入一抗(鼠抗 anti-TUNEL 1:500,鼠抗 anti-Cleaved caspase-3 1:500)(Sigma, 美国, A0835)37℃ 孵育 2 h 后 4℃ 过夜。第二天切片用二抗(1:200)(Sigma, 美国, A2268)37℃ 孵育 1 h, DAB 显色。随机选取 3 个视野,采用 Image J 软件统计。

1.6 统计学分析 采用 SPSS 21.0 软件进行统计分析。计量资料用($\bar{x} \pm s$)表示,多组之间比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 丹皮酚对 5-FU 注射后小鼠体重的影响 实验结果显示,相比于 Con 组,在 5-FU 注射后第 3 天、第 6 天和第 9 天小鼠体重显著降低($P < 0.001$)。而相比于仅接受 5-FU 注射的小鼠,丹皮酚可显著增加小鼠 5-FU 注射后体重,在 100 mg/kg($P < 0.001$)浓度下效果最为明显。见图 1。

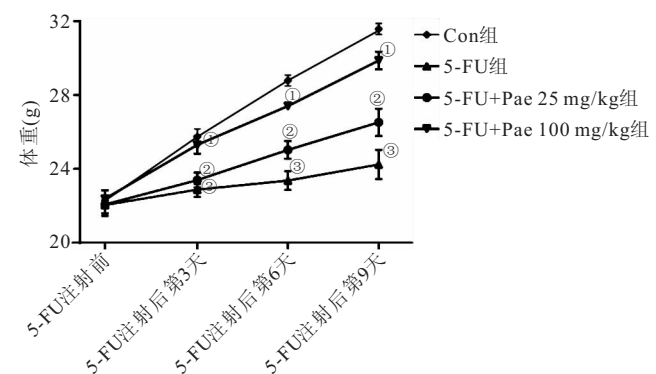


图 1 丹皮酚对 5-FU 注射后小鼠体重的影响

Figure 1 Effects of paeonol a on body weight change of mice treated with 5-FU

注:与 Con 组比较,① $P < 0.001$;与 5-FU 组比较,② $P < 0.05$,③ $P < 0.01$

2.2 丹皮酚对 5-FU 注射后小鼠肠道形态学变化及小肠绒毛高度的影响 HE 染色结果显示,Con 组小鼠肠道无水肿或充血,5-FU 注射后小鼠肠道被严重破坏,并伴有明显的水肿和充血。而丹皮酚分别处理 25、100 mg/kg 可明显改善肠道情况,在 100 mg/kg 时未观察到明显的水肿或出血(图 2A);5-FU 注射后小鼠小肠绒毛高度明显降低(图 2B),小肠腺数量明显下降(图 2C),而丹皮酚可显著逆转 5-FU 注射小鼠小肠绒毛的形态变化,使小肠绒毛升高并增加小肠腺数量。

2.3 丹皮酚对 5-FU 注射后小鼠小肠腺细胞凋亡的影响 实验结果显示,5-FU 注射后小鼠小肠腺中 TUNEL 和 Cleaved caspase-3 染色程度明显加重,说

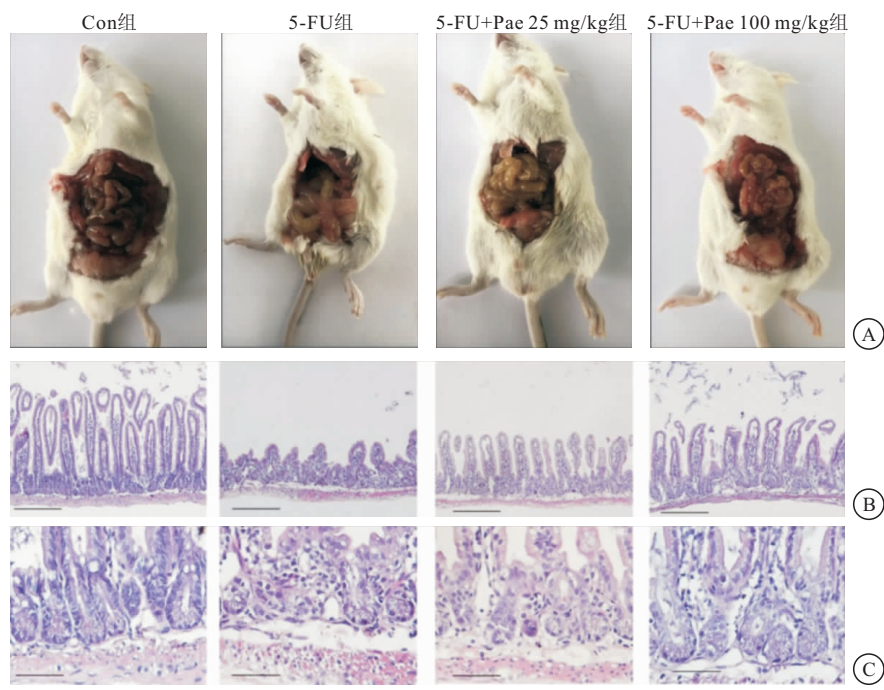


图 2 丹皮酚对 5-FU 注射后小鼠肠道形态学变化影响

Figure 2 Effects of paeonol a on intestinal morphology in mice after 5-FU injection

注: A. 小鼠肠道大体图; B. HE 染色小鼠肠道图(100×); C. HE 染色小鼠肠道图(400×)

明细胞凋亡程度上升。而丹皮酚在 25 mg/kg ($P < 0.05$) 和 100 mg/kg ($P < 0.01$) 处理后可显著降低 TUNEL 和 Cleaved caspase-3 在小肠腺的表达, 见图

3。因此, 丹皮酚可显著降低 5-FU 引起的小肠腺细胞凋亡。

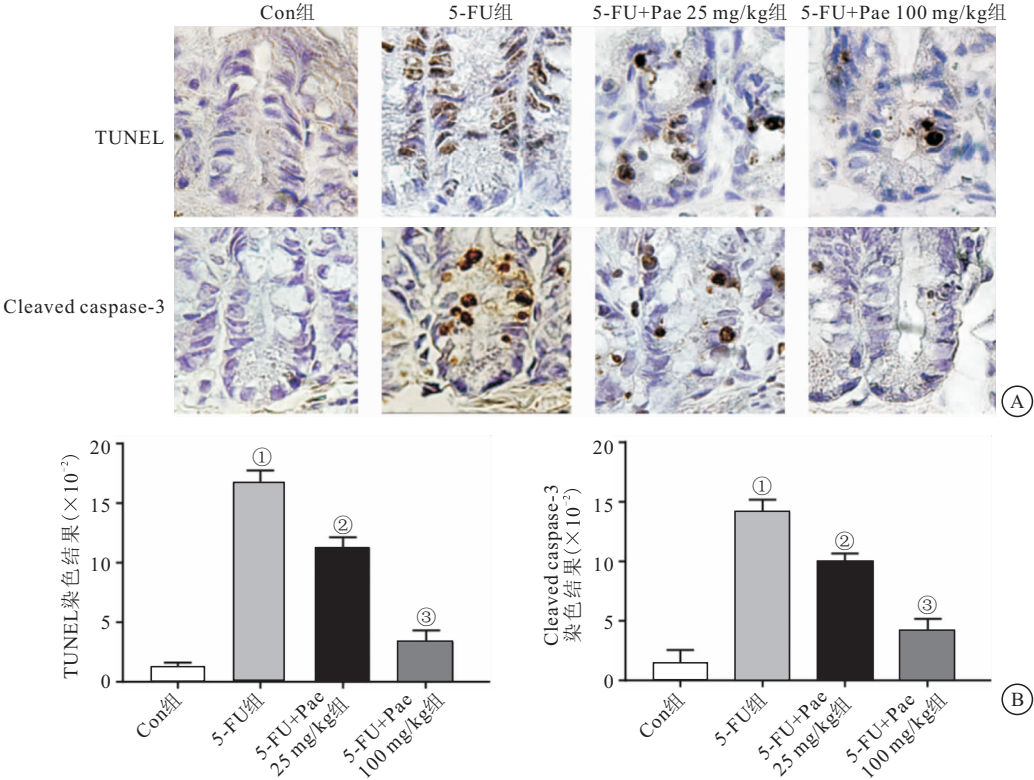


图 3 丹皮酚对 5-FU 注射后小鼠小肠腺细胞凋亡的影响

Figure 3 Effect of Paeonol on apoptosis of small intestinal gland cells in mice after 5-FU injection

注: 与 Con 组比较, ① $P < 0.001$; 与 5-FU 组比较, ② $P < 0.05$, ③ $P < 0.01$

2.4 丹皮酚对 5-FU 抗肿瘤的影响 与 Con、5-FU 组相比,5-FU+100 mg/kg 丹皮酚组肿瘤显著缩小,

见图 4。这提示 5-FU 可显著抑制瘤体生长。

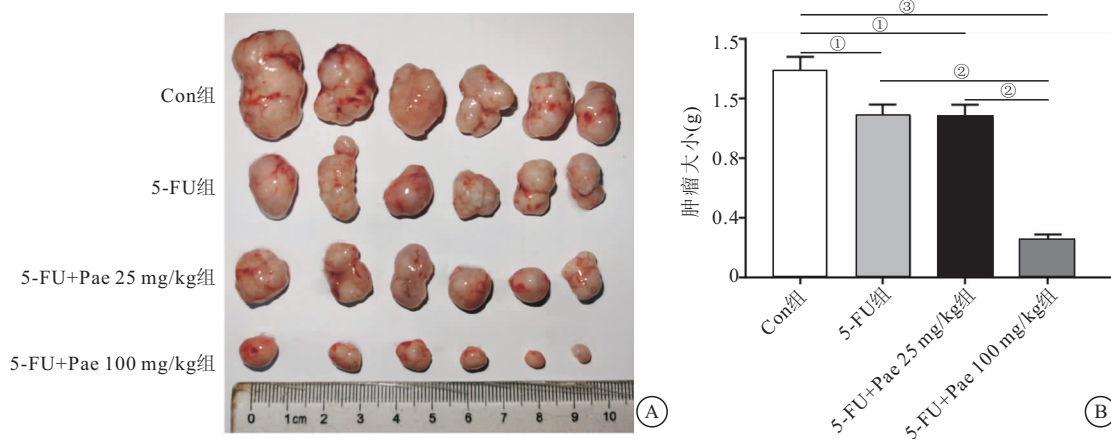


图 4 丹皮酚对 5-FU 抗肿瘤的影响

Figure 4 Effect of paeonol a on 5-FU antitumor activity

注:A. 肿瘤大体形态;B. 肿瘤大小。与 Con 组比较,① $P<0.001$,② $P<0.01$,③ $P<0.05$

3 讨论

5-FU 是临床常用的化疗药物,其口服吸收率较低,临床主要采取静脉注射。然而 5-FU 可导致肠道损伤,主要表现为肠屏障功能破坏,小肠腺细胞凋亡,肠细胞增殖减少^[7]。因此寻找对抗 5-FU 对肠道功能破坏的药物至关重要。丹皮酚是一种具有多种临床疗效的中药成分,其在加强化疗药物抗肿瘤活性方面的作用受到越来越多的关注^[5,8]。但关于丹皮酚对 5-FU 诱导的肠道黏膜损伤的保护作用尚未有报道,鉴于此,本实验主要集中在丹皮酚对 5-FU 诱导肠黏膜损伤的保护作用。

小肠是哺乳动物消化吸收的主要器官,其功能受损后直接影响能量来源,导致体重下降^[9]。因此我们首先研究了丹皮酚对 5-FU 注射后小鼠体重变化的影响。结果显示,在注射 5-FU 9 天后,小鼠体重显著降低,而丹皮酚处理后可恢复小鼠体重,说明丹皮酚对 5-FU 引起的小肠损伤可能具有一定的保护作用。既往研究报道显示小肠管壁结构特点是管壁有环形皱襞,黏膜有许多绒毛^[10],这些环状皱襞和绒毛扩大了黏膜的表面积,黏膜下层中有由表层上皮下陷形成的肠腺,开口于黏膜表面,分泌肠液,绒毛和小肠腺与小肠的消化和吸收功能关系密切^[11-12]。由于 5-FU 对 DNA 损伤及细胞毒性作用,在诱导肿瘤细胞凋亡的同时,也诱导正常细胞凋亡,改变其生物学特性,并诱导正常细胞或肿瘤细胞产生大量炎症因子或氧化因子,进而损伤包括肠上皮细胞在内的细胞损伤^[13-14]。因此我们观察了丹皮酚对小鼠肠道形态以及组织学变化的影响。结果显示,丹皮酚可明显降低小肠水肿

程度或出血,并使小肠绒毛升高,增加小肠腺数量。小肠腺主要由柱状细胞、杯状细胞和潘氏细胞构成,起着合成和释放消化酶的作用^[15]。研究表明 5-FU 引起的肠损伤通常伴有小肠腺细胞的凋亡^[16]。因此随后我们通过免疫组化实验研究了丹皮酚对小肠腺细胞凋亡的影响,结果显示,丹皮酚可显著降低小肠腺细胞凋亡程度。说明丹皮酚对 5-FU 引起的小肠损伤具有保护作用。

丹皮酚具有广泛的药理特性^[17],其中包括抗肿瘤特性^[18],如抗卵巢癌^[19]、乳腺癌^[20]、肝癌^[21]、膀胱癌^[22]等,抗肿瘤机制主要包括抑制肿瘤细胞增殖、诱导肿瘤细胞凋亡、促进抑癌基因表达、增强机体免疫力、阻滞细胞周期等^[23]。本研究通过成瘤实验研究了丹皮酚对 5-FU 抗肿瘤活性的影响,发现丹皮酚对结肠癌细胞具有抑制作用,并且可增强 5-FU 抗肿瘤特性。

4 结论与启示

本研究发现丹皮酚可通过抑制小肠腺细胞凋亡降低 5-FU 对小鼠黏膜损伤的影响,并可增强其抗肿瘤活性,为对抗 5-FU 损伤肠道的副作用提供了新的干预手段,但具体作用机制仍需进一步研究加以验证。

【参考文献】

- VERKUIJL S J, JONKER J E, TRZPIS M, *et al.* Functional outcomes of surgery for colon cancer: A systematic review and meta-analysis[J]. *Eur J Surg Oncol*, 2021, 47(5): 960-969.
- PAOLO M CRUZ J, GEORGE C PALES C, MIN KIM K, *et al.* Adjuvant chemotherapy for high-risk stage II and stage III

- colon cancer: timing of initiation and optimal duration[J]. J BUON, 2018, 23(3):568-573.
- [3] DANIELE B, SECONDULFO M, VIVO R D, *et al.* Effect of chemotherapy with 5-fluorouracil on intestinal permeability and absorption in patients with advanced colorectal cancer[J]. Journal of Clinical Gastroenterology, 2001, 32(3):228-230.
- [4] 宋杰丽, 陈建国, 陈次滨, 等. 丹皮酚的心血管系统药理作用研究及临床应用[J]. 中国现代药物应用, 2013, 7(10):181.
- [5] 计春燕, 谭诗云, 刘长青. 丹皮酚抑制人大肠癌细胞增殖及其与化疗药物的协同作用[J]. 中国肿瘤临床, 2005, 32(9):513-515.
- [6] 张春虎, 胡随瑜, 李云辉, 等. 丹皮酚对人肝癌 Bel-7404 的抑瘤效应及其机制[J]. 中南大学学报(医学版), 2006, 31(5):682-686.
- [7] 张婷, 陆山红, 杨兴鑫, 等. 砂仁水提物对 5-FU 致大鼠肠黏膜屏障损伤的保护作用[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(3):30-35.
- [8] 郭齐, 李贻奎, 王志国, 等. 丹皮酚药理研究进展[J]. 中医药信息, 2009, 26(1):20-22.
- [9] 宋彩霞, 马强. 小肠疾病的临床特点及研究现状[J]. 中国临床研究, 2018, 31(3):424-426.
- [10] 席兴宇, 孙寅玮. 小肠的天然免疫系统[J]. 生物学通报, 2018, 53(4):12-14.
- [11] 邹立军, 熊霞, 王小城, 等. 肠道隐窝-绒毛轴上皮细胞更新及调控机制研究进展[J]. 中国科学:生命科学, 2017, (2):34-44.
- [12] 缪明永, 高云. 乳糖不耐症与结肠代谢[J]. 肿瘤代谢与营养电子杂志, 2016, 3(4):216-219.
- [13] ESIN E, TELLI T A, YUCE D, *et al.* A correlation study of fluorouracil pharmacodynamics with clinical efficacy and toxicity[J]. Tumori, 2018, 104(3):157-164.
- [14] MORE L A, LANE S, ASNANI A. 5-FU Cardiotoxicity: Vasoospasm, Myocarditis, and Sudden Death[J]. Curr Cardiol Rep, 2021, 23(3):17.
- [15] 满银玉, 周国华. 潘氏细胞与炎症性肠病研究进展[J]. 蛇志, 2017, 29(1):87-88.
- [16] ZHANG S, LIU Y, XIANG D, *et al.* Assessment of dose-response relationship of 5-fluorouracil to murine intestinal injury[J]. Biomed Pharmacother, 2018, 106:910-916.
- [17] CHEN N, LIU D, SOROMOU L W, *et al.* Paeonol suppresses lipopolysaccharide-induced inflammatory cytokines in macrophage cells and protects mice from lethal endotoxin shock[J]. Fundam Clin Pharmacol, 2014, 28(3):268-276.
- [18] WANG X J, LIU J L, WANG J K. Synthesis and anti-tumor activity of paeonol and its derivatives[J]. Yao Xue Xue Bao, 2012, 47(1):72-76.
- [19] YIN J, WU N, ZENG F, *et al.* Paeonol induces apoptosis in human ovarian cancer cells[J]. Acta Histochem, 2013, 115(8):835-839.
- [20] SAAHENE R O, WANG J, WANG M L, *et al.* The Antitumor Mechanism of Paeonol on CXCL4/CXCR3-B Signals in Breast Cancer Through Induction of Tumor Cell Apoptosis[J]. Cancer Biother Radiopharm, 2018, 33(6):233-240.
- [21] CAI M, SHAO W, YU H, *et al.* Paeonol Inhibits Cell Proliferation, Migration and Invasion and Induces Apoptosis in Hepatocellular Carcinoma by Regulating miR-21-5p/KLF6 Axis[J]. Cancer Manag Res, 2020, 12:5931-5943.
- [22] ZHANG J J, CAI L J, PANG K, *et al.* Paeonol inhibits proliferation and induces cell apoptosis of human T24 and 5637 bladder cancer cells in vitro and in vivo[J]. Clin Transl Oncol, 2021, 23(3):601-611.
- [23] 高立民, 满其倩. 丹皮酚抗肿瘤作用及作用机制研究进展[J]. 药物评价研究, 2016, 39(2):300-303.

(收稿日期:2021-06-07;修回日期:2022-07-20;编辑:黎仕娟)

(上接第 1127 页)

- [21] LI X, YANG H, WANG J, *et al.* High level of lncRNA H19 expression is associated with shorter survival in esophageal squamous cell cancer patients[J]. Pathol Res Pract, 2019, 215(11):152638-152648.
- [22] ZHOU Y, ZHANG Y. Inhibition of lncRNA H19 has the effect of anti-tumour and enhancing sensitivity to Gefitinib and Chemotherapy in Non-small-cell lung cancer in vivo[J]. J Cell Mol Med. 2020, 24(10):5811-5816.
- [23] 孟祥鹏, 马佳, 王宝胜. lncRNA/miRNA 在胰腺癌发生发展中的研究进展[J]. 现代肿瘤医学, 2020, 28(22):3999-4002.
- [24] YAN J, ZHANG Y, SHE Q, *et al.* Long Noncoding RNA H19/miR-675 Axis Promotes Gastric Cancer via FADD/Caspase 8/Caspase 3 Signaling Pathway[J]. Cell Physiol Biochem, 2017, 42(6):2364-2376.
- [25] 马敬, 唐丹, 张燕, 等. H19 介导 miR-let-7 的分子机制及其在妊娠期糖尿病中的作用研究[J]. 中国全科医学, 2019, 10(8):942-946.
- [26] REN J, FU J, MA T, *et al.* lncRNA H19-elevated LIN28B promotes lung cancer progression through sequestering miR-196b[J]. Cell Cycle, 2018, 17(11):1372-1380.
- [27] LV M, ZHONG Z, HUANG M, *et al.* lncRNA H19 regulates epithelial-mesenchymal transition and metastasis of bladder cancer by miR-29b-3p as competing endogenous RNA[J]. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res, 2017, 1864(10):1887-1899.
- [28] PAN Y, ZHANG Y, LIU W, *et al.* lncRNA H19 overexpression induces bortezomib resistance in multiple myeloma by targeting MCL-1 via miR-29b-3p[J]. Cell Death Dis, 2019, 10(2):106-118.

(收稿日期:2021-08-05;修回日期:2022-06-09;编辑:黎仕娟)