

齐墩果酸对小鼠化疗后肠道免疫功能损伤的修复作用研究

白瀚哲¹, 杨玉², 王畅¹

(1.佳木斯大学临床医学院, 黑龙江 佳木斯 154000; 2.佳木斯大学基础医学院药理学教研室 154000)

Study on the repairing effect of oleanolic acid on intestinal immune function damage after chemotherapy in mice

Bai Hanzhe¹, Yang Yu², Wang Chang¹

(1. School of Clinical Medicine, Jiamusi University, Jiamusi, Heilongjiang 154000; 2. Department of Pharmacology, School of Basic Medicine, Jiamusi University, Jiamusi 154000)

【摘要】 目的: 探讨 OA 对化疗后的肠道免疫功能损伤是否具有修复作用。**方法:** 首先饲养动物、造模并给药, 在规定日期测定其免疫器官指数、肠系膜淋巴结 T 淋巴细胞亚群和肠黏膜分泌型免疫球蛋白 A, 最后, 用 GraphPad Prism 5 软件完成统计分析与绘图, 两组比较采用 t 检验法, 多组比较采用单因素方差分析法。**结果:** 与模型组相比, OA 高剂量组的小鼠免疫器官指数、CD3+CD4+T 淋巴细胞的百分比和肠黏膜 sIgA 的含量显著升高, OA 低、高剂量组动物 CD3+CD8+T 淋巴细胞的百分比均显著升高。**结论:** 本研究认为 OA 是具有潜在转化价值的肠道免疫调节剂, 有望用于化疗后肠道副作用的预防与治疗。

【关键词】 齐墩果酸; 化疗; 肠道免疫; 损伤修复

【ABSTRACT】 OBJECTIVE: To investigate whether OA has a reparative effect on intestinal immune function impairment after chemotherapy. **METHODS:** Animals

收稿日期: 修订日期:

基金项目:

作者信息: 白瀚哲, E-mail: 2365270111@qq.com

*通讯作者: 杨玉, E-mail: yangyu-198208@163.com

王畅, E-mail: 949414352@qq.com

were first housed, models were created and drugs were administered, and their immune organ indices, mesenteric lymph node T lymphocyte subpopulations and intestinal mucosal secretory immunoglobulin A were measured on the specified dates. Finally, statistical analysis and plots were completed using GraphPad Prism 5 software. T-test was used for comparison of two groups, and one-way ANOVA was used for comparison of multiple groups. **RESULTS:** Compared with the model group, the immune organ index, the percentage of CD3+CD4+ T lymphocytes and the content of intestinal mucosal sIgA were significantly higher in the OA high-dose group, and the percentage of CD3+CD8+ T lymphocytes was significantly higher in both the OA low and high-dose groups of animals. **CONCLUSION:** This study concluded that OA is an intestinal immunomodulator with potential translational value and is expected to be used for the prevention and treatment of intestinal side effects after chemotherapy.

【KEY WORDS】 Oleanolic acid; chemotherapy; intestinal immunity; damage repair.

收稿日期: 修订日期:

基金项目:

作者信息: 白瀚哲, E-mail: 2365270111@qq.com

*通讯作者: 杨玉, E-mail: yangyu-198208@163.com

王畅, E-mail: 949414352@qq.com

尽管在近近年来以免疫治疗为代表的新的恶性肿瘤治疗手段已经取得了突破性进展，但是化疗目前仍然是很多恶性肿瘤的常规治疗方法。但是，化疗药物的毒副作用严重影响了患者的身心健康，其常见的毒副作用包括：肾毒性、肝毒性、骨髓抑制、胃肠道毒性等 [1]。环磷酰胺

(Cyclophosphamide, CTX) 是最成功的化疗药物之一，现在其仍被用于治疗淋巴瘤、乳腺癌、卵巢癌等恶性肿瘤[2]。CTX 作为一种细胞毒药物具有严重的副作用，例如骨髓抑制，生殖系统毒性，继发膀胱恶性肿瘤与感染等[3]。而且，CTX 具有肠毒性。CTX 一方面损伤肠道免疫功能，一方面促进肠黏膜炎症的发生。另外，CTX 还会导致肠道菌群的失调与肠渗透性的增加[4]。肠道免疫系统是人体最大的免疫系统，具有重要的屏障功能；其功能的损伤会导致继发的病原体感染。因此，有必要给予服用 CTX 的患者合适的肠道免疫调节剂以减轻其副作用。

齐墩果酸 (Oleanolic acid, OA) 是一种天然的五环三萜类化合物。OA 存在于很多植物中，例如女贞子、青叶胆、人参、木瓜等[5]。OA 有丰富的生物活性，对很多疾病都具有预防和治疗作用，例如溃疡性结肠炎、多发性硬化症、糖尿病、肝炎及某些癌症[6]。除此之外，OA 还具有免疫调节作用。研究表明：OA 可以促进淋巴细胞的增殖，并且增强动物巨噬细胞的吞噬功能。而且，临床研究证实 OA 可以在一定程度上提高肿瘤患者 T 淋巴细胞与巨噬细胞的功能[7]。另一方面，OA 还被发现在鼠伤寒沙门氏菌肠炎中具

有保护肠黏膜屏障完整、抑制了促炎性细胞因子分泌，进而改善肠炎症状的作用，表明 OA 还具有肠道保护作用[8]。基于以上研究，我们提出

“OA 对 CTX 化疗后的肠道免疫功能损伤具有修复作用”的假设，并且通过体内实验对该假设予以了验证。

1 实验方法与实验材料

1.1 动物的饲养、造模与给药：SPF 级昆明小鼠 6~8 周龄，适应性饲养两周后，随机分配至正常组（共 16 只）、模型组（共 16 只）、OA 低剂量组 (5mg/kg, 共 8 只)、与 OA 高剂量组 (25mg/kg, 共 8 只)。模型组与 OA 不同剂量组在实验第 1、2、3、4、5 天腹腔注射 CTX80mg/kg/d（溶于生理盐水），正常组注射等体积生理盐水[9]。OA 低、高剂量组在实验第 6 天通过灌胃给予相应剂量 OA(用 2%的 Tween 80 配成混悬液)，每天给药 1 次，连续给药 14 天。OA 与 CTX 均购于北京索莱宝科技有限公司。

1.2 免疫器官指数测定：在实验的第 7 天，对部分正常组与模型组小鼠实施安乐死，并摘除胸腺和脾脏，剥离周围的筋膜及组织，并用滤纸吸干血液。计算胸腺指数与脾脏指数，判断模型是否成功建立。胸腺指数与脾脏指数的计算公式是：免疫器官指数=胸腺（或脾脏）的重量（单位 g）/体重（单位 kg）。第 21 天，对所有小鼠实施安乐死，摘除胸腺和脾脏，称重并计算胸腺

指数和脾脏指数。

1.3 肠系膜淋巴结 (mesenteric lymph nodes, MLN) T 淋巴细胞亚群测定: 第 21 天, 小鼠安乐死后, 充分暴露小鼠腹腔, 沿肠系膜上溯找到被脂肪组织包裹的 MLN。分离 MLN, 置其于 200 目滤网, 以圆底玻璃试管轻轻按压, 将其分离为单细胞, 并重悬于 RPMI1640 培养基中。PBS 清洗细胞, 调整细胞数量为 1×10^6 个并重悬于染色缓冲液。加入抗体 Anti-Mouse CD3 ϵ -PerCP-Cy5.5 (1/20)、Anti-Mouse CD4-APC (1/20) 与 Anti-Mouse CD8 α -FITC (1/20), 室温避光孵育 25 分钟。抗体均购置于杭州联科生物技术股份有限公司。流式缓冲液清洗细胞后, 将细胞用 4%多聚甲醛溶液固定。次日, 流式细胞仪上机检测细胞, FlowJo X 软件 (版本 10.0.7r2) 分析流式结果。

1.4 肠黏膜分泌型免疫球蛋白 A (secretary immunoglobulin A, sIgA) 含量测定: 分离 MLN 的同时, 沿盲肠上溯并取 3 厘米回肠。排除肠道内容物后, 用预冷的 1ml 生理盐水充分灌洗肠腔。肠腔内的生理盐水被收集于 EP 管, 离心, 取 100 μ l 上清液用于 ELISA 分析。IgA 检测试剂盒购置于武汉云克隆科技股份有限公司。ELISA 实验的简要步骤如下: 制备 ELISA 检测标准品, 并倍比稀释为 500pg/mL、250pg/mL、125pg/mL、

62.5pg/mL、31.2pg/mL、15.6pg/mL 与 7.8pg/mL。实验设标准孔、样品孔与空白孔, 分别加入标准品、各组样品与标准品稀释液。按照说明书要求, 依次完成温育、加工作液 A 并温育、洗涤、加工作液 B 并温育、洗涤、加 TMB 底物并避光显色、终止反应及酶标仪检测等步骤。

1.5 统计分析: 用 GraphPad Prism 5 软件 (版本 5.01) 完成统计分析与绘图, 两组比较采用 t 检验法, 多组比较采用单因素方差分析法, 以 $P < 0.05$ 为比较具有统计学意义。

2 实验结果

2.1 OA 能够改善 CTX 引起的小鼠胸腺指数与脾脏指数下降

胸腺与脾脏是重要的中枢与外周免疫器官，因此我们在第 7 天检测了 CTX 对小鼠胸腺与脾脏指数的影响。我们发现模型组小鼠的免疫器官指数显著低于正常组的小鼠，如图 1 所示。结果

乐死并检测了各组小鼠胸腺指数与脾脏指数的变化。我们发现，模型组小鼠的免疫器官指数显著低于正常组的小鼠，表明 CTX 对小鼠免疫功能的损伤作用没有得到自然恢复。与模型组相比较，OA 高剂量组的小鼠免疫器官指数均明显升高。

结果表明：高剂量的 OA 对 CTX 引起的动物免疫功能抑制具有恢复作用。结果详见图 2。

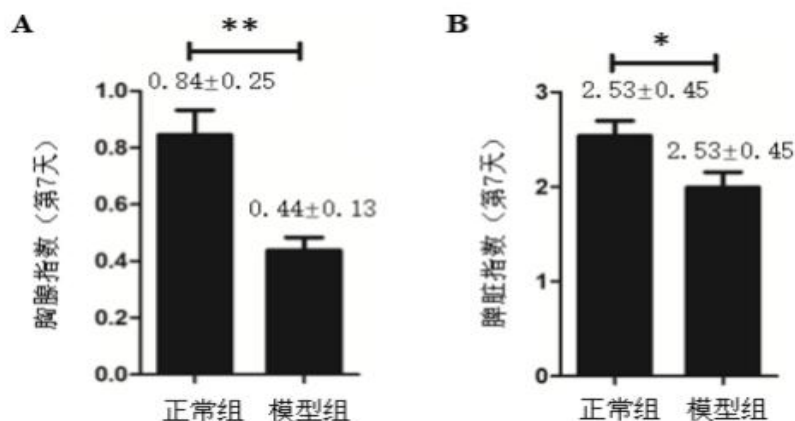


图 1，造模第 7 天动物免疫器官指数变化情况

注：A. 正常组与模型组动物胸腺指数的比较；B. 正常组与模型组动物脾脏指数的比较。

*表示 $P < 0.05$ ，**表示 $P < 0.01$ 。

表明，我们通过给予 CTX 成功制备了化疗后免疫抑制动物模型。在第 21 天，我们对小鼠实施安

2.2 OA 能够改善 CTX 引起的小鼠肠道辅助性与细胞毒性 T 细胞亚群缺陷

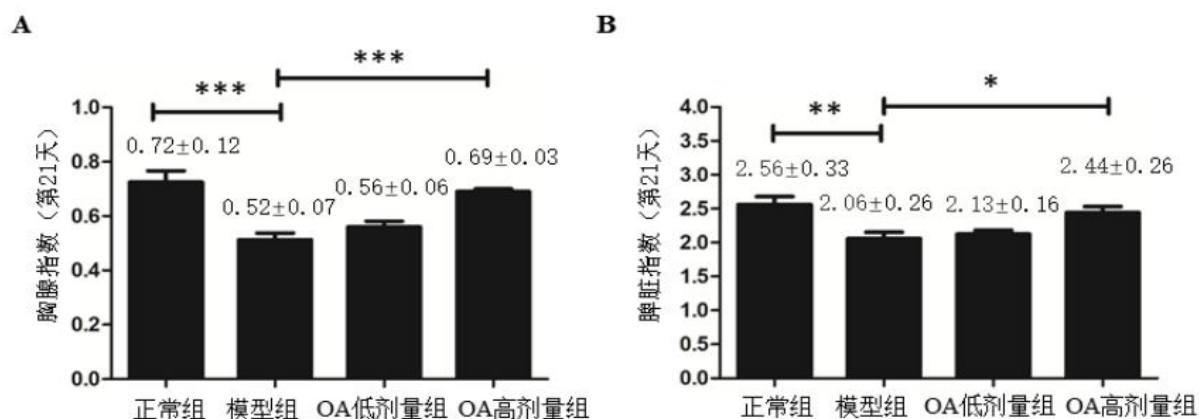


图 2，第 21 天各组动物免疫器官指数的比较

注：A. 各组动物胸腺指数的比较；B. 各组动物脾脏指数的比较。

*表示 $P < 0.05$ ，**表示 $P < 0.01$ ，***表示 $P < 0.001$ 。

MLN 是肠道免疫系统的重要成员。淋巴细胞在 MLN 经历抗原识别、增殖分化，形成效应性淋巴细胞，并迁移至黏膜固有层与黏膜上皮表面。鉴于其功能，我们对各组动物 MLN 的淋巴细胞亚群进行了检测。我们发现，模型组动物 MLN 中 CD3+CD4+T 淋巴细胞的百分比显著低于正常组，而 OA 高剂量组动物 CD3+CD4+T 淋巴细胞的百分比显著高于模型组动物，结果如图 3 所示。与 CD4+T 细胞的结果相似，我们发现：模

组动物，结果如图 4 所示。以上结果表明：OA，特别是高剂量的 OA，对 CTX 引起的肠道 T 细胞亚群缺陷具有明显的恢复作用。

2.3 OA 能够促进肠道 sIgA 的生成

sIgA 是肠道最主要的抗体，其合成后被分泌于肠黏膜表面发挥抗菌作用[10]。我们分离了部分回肠，并且检测了肠黏膜灌洗液中 sIgA 的含量。结果发现：模型组动物肠黏膜 sIgA 的含量与正常组动物相比明显下降，而 OA 高剂量组的

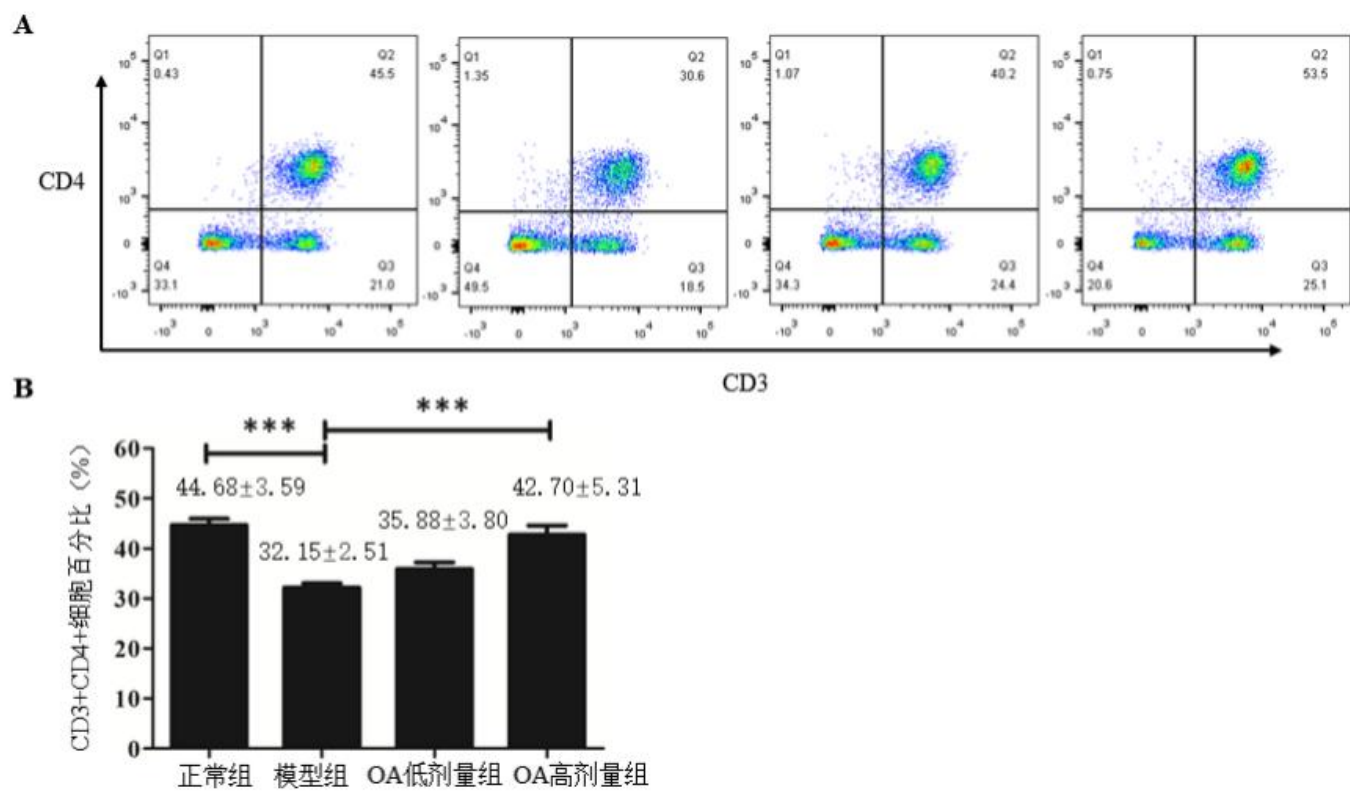


图 3，第 21 天各组动物 CD3+CD4+T 细胞亚群百分比的比较

注：A. 代表性流式结果；B. 各组动物 CD3+CD4+T 细胞百分比的统计数据。

***表示 $P < 0.001$ 。

型组动物 MLN 中 CD3+CD8+T 淋巴细胞的百分比显著低于正常组，而 OA 低、高剂量组动物 CD3+CD8+T 淋巴细胞的百分比均显著高于模型

动物其肠黏膜 sIgA 的含量明显高于模型组动物，说明 OA 能够促进肠道 sIgA 的生成，如图 5 所示。

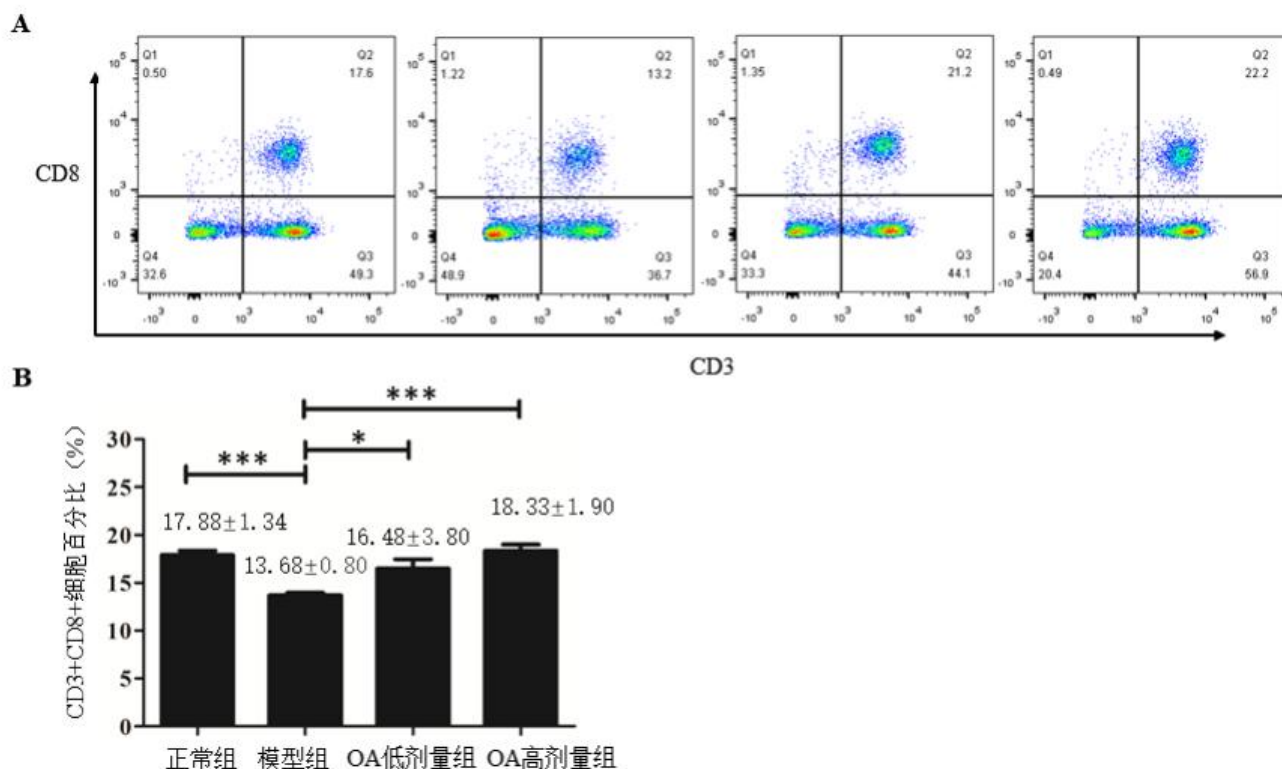


图 4, 第 21 天各组动物 CD3+CD8+T 细胞亚群百分比的比较

注: A. 代表性流式结果; B. 各组动物 CD3+CD8+T 细胞百分比的统计数据。

*表示 $P < 0.05$, ***表示 $P < 0.001$ 。

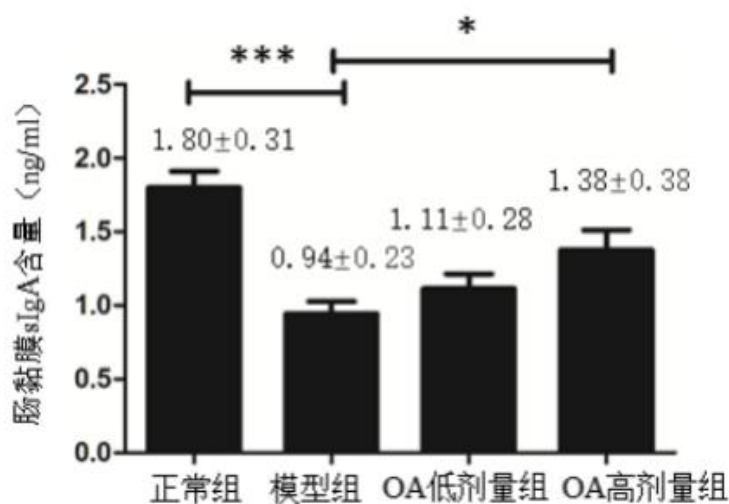


图 5, 第 21 天各组动物肠黏膜 sIgA 含量的比较

注: *表示 $P < 0.05$, ***表示 $P < 0.001$ 。

3 讨论

正常的肠道一方面将肠道致病菌与机体内环境隔离开来, 另一方面又为数量巨大的肠道益生菌提供定殖的空间。肠道免疫系统必须对益生菌作出适当的耐受反应, 同时还要对侵袭的病原

体予以强有力的抵抗与杀伤。因此, 肠道免疫系统的稳定与平衡对于维持肠道内环境的健康至关重要[11]。肠道免疫系统的缺陷会导致各种疾病, 如炎症性肠病(克罗恩病、溃疡性结肠炎等)与肠道感染性疾病(抗生素相关腹泻、艰难梭菌

相关腹泻和幽门螺杆菌感染等) [11、12]。尽管靶向药物在癌症治疗手段中的比重逐渐升高,但是化疗仍然是很多癌症治疗的常规手段,如非小细胞肺癌、乳腺癌等。在本实验中,我们通过给予小鼠 CTX 构建了化疗后免疫抑制动物模型,并基于此模型研究了 OA 对肠道免疫系统的调节作用。

OA 在临床上目前被用于急慢性肝炎的辅助治疗,但是其药理作用十分广泛,是天然产物研究的热点分子。在 2010 至 2021 年间国际上有超过 1.8 万篇关于 OA 的研究成果发表,可见研究人员对其的关注程度[13]。在本次研究中,我们首先探索了 OA 对中枢与外周免疫的调节作用。我们发现,高剂量的 OA 能够提高免疫抑制小鼠的免疫器官指数,表明 OA 在整体上具有免疫促进作用。MLN 及肠道相关淋巴组织是肠道免疫系统的诱导位点,肠道黏膜内的免疫反应在此起始。因此,MLN 一方面是机体抵御肠道病原体感染的第一道防线,也是宿主与外环境间黏膜稳态建立和维持的关键节点[14]。我们发现,CTX 导致小鼠 MLN 中 CD4+T 与 CD8+T 细胞的数量明显下降,而 OA 能够明显增加小鼠 MLN 中 CD4+T 与 CD8+T 细胞的数量。CD4+T 与 CD8+T 细胞是参与适应性免疫应答的 T 细胞的两个基本亚群,也是肠道适应性细胞免疫应答发生的物质基础。CD4+T 与 CD8+T 细胞数量增加表明模型小鼠的免疫功能抑制有所恢复。尽管派氏集合淋巴结是 sIgA 的主要诱导位点,但是 MLN 同样通过其微

环境中淋巴细胞分泌的 IL-6、IL-10、IL-4、IL-5 等细胞因子对 sIgA 的合成发挥重要的促进作用 [15]。MLN 负责空肠、回肠的、盲肠和升结肠区域的引流[14]。因此,我们进一步研究了 OA 对小鼠回肠黏膜表面 sIgA 合成分泌的影响。我们发现,OA 能够明显增加免疫抑制小鼠肠黏膜表面 sIgA 的含量。

综合以上结果,我们认为 OA 是具有潜在转化价值的肠道免疫调节剂,有望用于化疗后肠道副作用的预防与治疗。在本次研究中,我们从免疫器官与免疫细胞层次探讨了 OA 的药理作用。

但是,我们没有在分子层面进一步阐述其机制。这点不足我们将在今后的研究中予以探索与阐明。

参考文献:

- [1] Liu Yong-Qiang,Wang Xiao-Lu,He Dan-Hua,et al. Protection against chemotherapy- and radiotherapy-induced side effects: A review based on the mechanisms and therapeutic opportunities of phytochemicals[J]. Phytomedicine, 2021, 80(2021): 153402-153418.
- [2] Madondo Mutsa Tatenda,Quinn Michael,Plebanski Magdalena.Low dose cyclophosphamide: Mechanisms of T cell modulation[J].Cancer Treat Rev, 2016, 42(2016): 3-9.
- [3] Elazzazy Shereen,Mohamed Asmaa Elhassan,Gulied Amaal.Cyclophosphamide-induced symptomatic hyponatremia, a rare but severe side effect: a case report[J].Onco Targets Ther, 2014, 7(2014): 1641-5.
- [4] Khan Al,Rehman AU,Farooqui NA,et al.Effects of Shrimp Peptide Hydrolysate on Intestinal Microbiota Restoration and Immune Modulation in Cyclophosphamide-Treated

Mice[J].Molecules,2022,27(5):1720-1739.

[5] 沈晓静,赵红梅,赵蕾,等.齐墩果酸研究进展[J].

广州化工,2019,47(24):16-19.

[6] Sen A.Prophylactic and therapeutic roles of oleanolic acid and its derivatives in several diseases[J]. World J Clin Cases,2020,8(10):1767-1792.

[7] 李旻,刘卓刚,吴斌. 齐墩果酸的抗肿瘤作用机

制[J]. 实用医学杂志, 2010 (20) :174-176.

[8] Na Dong,Chenyu Xue,Lei Zhang,et al.Oleanolic acid enhances tight junctions and ameliorates inflammation in Salmonella typhimurium-induced diarrhea in mice via the TLR4/NF-kappa B and MAPK pathway[J].Food & Function,2020,11(1):1122-1132.

[9] 齐丽娟,宋雁,王伟,等.用环磷酰胺建立小鼠免

疫抑制动物模型[J]. 卫生研

究,2010,39(03):313-315+325.

[10] Ding Mengfan,Yang Bo,Ross R Paul et al. Crosstalk between sIgA-Coated Bacteria in Infant Gut and Early-Life Health[J].Trends Microbiol,2021,29(8):725-735.

[11] Mörbe UM, Jørgensen PB, Fenton TM, et al. Human gut-associated lymphoid tissues (GALT); diversity, structure, and function[J]. Mucosal Immunol,2021,14(4):793-802.

[12] Julio Plaza-Díaz,Ruiz-Ojeda F J,Gil-Campos Mercedes,et al. Immune-Mediated Mechanisms of Action of Probiotics and Synbiotics in Treating Pediatric Intestinal Diseases[J].Nutrients,2018,10(42):1052-1072.

[13] Castellano JM, Ramos-Romero S, Perona JS. Oleanolic Acid: Extraction, Characterization and Biological Activity[J]. Nutrients,2022,14(3):623-652.

[14] Mowat AM, Agace WW. Regional specialization within the intestinal immune system[J]. Nat Rev Immunol,2014,14(10):667-85.

[15] Santiago AF,Fernandes RM,Santos BP,et al.Role of mesenteric lymph nodes and aging in secretory IgA production in mice[J].Cellular Immunology,2008,253(1-2):5-10.