**齐墩果酸对小鼠肠道免疫功能损伤的修复作用研究**

白瀚哲1,2，王丹1,2，倪蕾3，代雨鑫1,2，王畅1,2，商宇1\*，杨玉1\*

（1. 佳木斯大学基础医学院微生态-免疫调节网络与相关疾病重点实验室，黑龙江 佳木斯 154000；2. 佳木斯大学临床医学院，黑龙江 佳木斯 154000；3. 佳木斯大学附属第一医院血液内科, 黑龙江 佳木斯 154000）[[1]](#footnote-1)

Repairing Effect of Oleanolic Acid on the Damage of Intestinal Immune Function in Mice

BAI Hanzhe1,2, WANG Dan1,2, NI Lei3, DAI Yuxin1,2, WANG Chang1,2, SHANG Yu1, YANG Yu1

(1. Key Laboratory of Microecology-Immune Regulatory Network and Related Diseases School of Basic Medicine, Jiamusi University, Heilongjiang Jiamusi, 154000; 2. School of Clinical Medicine, Jiamusi University, Heilongjiang Jiamusi 154000; 3. Department of Hematology, First Affiliated Hospital of Jiamusi University, HeiLongJiang, Jiamusi, 154000)

**【摘要】 目的**：揭示齐墩果酸（OA）对化疗后免疫缺陷小鼠肠道免疫功能的影响。**方法**：制备化疗后免疫缺陷动物模型并给予OA，分析各组动物免疫器官指数，通过流式细胞术分析与比较各组动物肠系膜淋巴结T淋巴细胞亚群，通过酶联免疫吸附试验（ELISA）分析与比较各组动物肠黏膜分泌型免疫球蛋白A（sIgA）水平。**结果**：造模三周后，与正常组动物比较，模型组动物的胸腺指数与脾脏指数显著下降（*P* <0.001或*P* <0.01）。OA治疗两周后，与模型组动物相比较，高剂量组动物的胸腺指数、脾脏指数、CD3+CD4+T淋巴细胞的百分比、CD3+CD8+T淋巴细胞的百分比和肠黏膜sIgA的含量均显著升高（*P* <0.001或*P* <0.05）。与模型组动物相比较，低剂量组动物的CD3+CD8+T淋巴细胞的百分比也显著升高（*P* <0.05）。**结论**：OA能够逆转化疗后小鼠肠道的免疫缺陷，有望作为免疫调节剂用于化疗副作用的预防与治疗。

**【关键词】**齐墩果酸；化疗副作用；肠道免疫；环磷酰胺

中国分类号：R392 文献标志码：A

**【ABSTRACT**】**OBJECTIVE**: To investigate the effect of oleanolic acid ( OA ) on intestinal immune function in immunodeficient mice after chemotherapy. **METHODS**: An animal model of immunodeficiency after chemotherapy was established and corresponding drugs were delivered firstly. Then, the immune organ indexes of each group were analyzed, and the T lymphocyte subsets of mesenteric lymph nodes of each group were analyzed and compared by flow cytometry. The levels of each group’s secretory immunoglobulin A ( sIgA ) in intestinal mucosa were analyzed and compared by enzyme-linked immunosorbent assay ( ELISA ). **RESULTS**: Three weeks after modeling, compared with the normal group, the thymus index and spleen index of the model group decreased significantly (*P* <0.001 or *P* <0.01). After two weeks of OA treatment, compared with the model group animals, the immune organ index, the percentage of CD3+CD4+T lymphocytes, the percentage of CD3+CD8+T lymphocytes and the content of intestinal mucosal sIgA in the high-dose group animals were significantly increased (*P* <0.001 or *P* <0.05). Compared with the model group animals, the percentage of CD3+CD8+T lymphocytes in the low-dose group animals was also significantly increased (*P* <0.05). **CONCLUSION**: OA can reverse the intestinal immune deficiency in mice after chemotherapy, and is expected to be used as an immunomodulator for the prevention and treatment of side effects of chemotherapy.

**【KEY WORDS】**Oleanolic acid; side effects of chemotherapy; intestinal immunity; Cyclophosphamid

尽管在近些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，化疗目前仍然是很多恶性肿瘤的常规治疗方法。但是，化疗药物的肾毒性、肝毒性、骨髓抑制等毒副作用对患者的健康有严重的影响[1]。环磷酰胺（Cyclophosphamide，CTX）是最成功的化疗药物之一，现在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会损伤肠道免疫功能，并促进肠黏膜炎症的发生[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。肠道免疫系统的功能损伤会导致继发的细菌移位与感染。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，增强动物巨噬细胞的吞噬功能。并且，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、抑制促炎细胞因子分泌，改善肠炎症状的作用[8]。因此，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，并通过小鼠体内模型实验予以了验证。

**1材料与方法**

**1.1受试物**

OA（粉末、纯度HPLC≥98%、货号IO0020）与CTX（粉末、纯度HPLC≥98%、货号IC3220）均购于北京索莱宝科技有限公司。

**1.2动物分组与造模**

SPF级昆明小鼠（合格证号230781211100005414）购置于哈尔滨珍宝制药有限公司，适应性饲养至8周龄后，随机分配至正常组（共10只）、模型组（共10只）、OA低剂量组（5mg/kg，共10只）、与OA高剂量组（25mg/kg，共10只）。模型组与OA各剂量组在实验第1~5天连续腹腔注射CTX（80mg/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天起通过灌胃给予相应剂量OA（OA用2%的Tween 80配成混悬液），每天给药1次，连续给药14天。

**1.3 免疫器官指数测定**：在实验的第21天，对小鼠称重后实施安乐死，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。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）。

**1.4 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培养液中。PBS清洗细胞，调整细胞数量为1\*106个并重悬于染色缓冲液。加入抗体Anti-Mouse CD3ε-PerCP-Cy5.5（1/20）、Anti-Mouse CD4-APC（1/20）与Anti-Mouse CD8α-FITC（1/20），室温避光孵育25分钟。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。抗体、染色缓冲液与流式缓冲液均购置于杭州联科生物技术股份有限公司。

**1.5 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。清除肠道内容物后，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100μl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结果**

**2.1对小鼠胸腺指数与脾脏指数的影响**

我们在第21天检测了各组小鼠胸腺指数与脾脏指数的变化，发现模型组小鼠的免疫器官指数（胸腺指数0.513±0.070，脾脏指数2.059±0.265）显著低于正常组的小鼠（胸腺指数0.725±0.117，脾脏指数2.561±0.332），表明我们通过给予CTX成功制备了化疗后免疫缺陷动物模型。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（胸腺指数0.690±0.027，脾脏指数2.441±0.257），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。结果详见表1。

表1，第21天各组动物免疫器官指数的比较

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 组别 | 体重  （kg） | 胸腺重量（g） | 脾脏重量（g） | 胸腺指数 | 脾脏指数 |
| 正常组 | 0.044±0.003 | 0.032±0.006 | 0.113±0.013 | 0.725±0.117  **\*\*\*** | 2.561±0.332  **\*\*** |
| 模型组 | 0.039±0.004 | 0.021±0.003 | 0.079±0.006 | 0.513±0.070 | 2.059±0.265 |
| OA低剂量组 | 0.040±0.003 | 0.021±0.003 | 0.085±0.004 | 0.560±0.061 | 2.125±0159 |
| OA高剂量组 | 0.045±0.003 | 0.029±0.003 | 0.101±0.007 | 0.690±0.027  **\*\*\*** | 2.441±0.257  **\*** |

注：**\***表示与模型组比较*P* <0.05，**\*\***表示模型组比较*P* <0.01，**\*\*\***表示与模型组比较*P* <0.001。

**2.2对肠道T细胞亚群缺陷的影响**

模型组动物MLN中CD3+CD4+T淋巴细胞占全部淋巴细胞的百分比为32.15±2.51（%）显著低于正常组的44.68±3.59（%），而OA高剂量组动物CD3+CD4+T淋巴细胞占全部淋巴细胞的百分比42.70±5.31（%）显著高于模型组动物，结果如图1与表2所示。与CD3+CD4+T淋巴细胞的结果相似，模型组动物MLN中CD3+CD8+T淋巴细胞占全部淋巴细胞的百分比为13.68±0.80（%），显著低于正常组的百分比17.88±1.34（%），而OA低、高剂量组动物的CD3+CD8+T淋巴细胞占全部淋巴细胞的百分比（16.48±3.80（%）与18.33±1.90（%））均显著高于模型组动物，结果如图2与表3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。

图1，CD3+CD4+T淋巴细胞亚群分析的代表流式结果

表2，CD3+CD4+T淋巴细胞百分比的统计数据

|  |  |
| --- | --- |
| 组别 | CD3+CD4+T淋巴细胞百分比（%） |
| 正常组 | 44.68±3.59  **\*\*\*** |
| 模型组 | 32.15±2.51 |
| OA低剂量组 | 35.88±3.80 |
| OA高剂量组 | 42.70±5.31  **\*\*\*** |

注：**\*\*\***表示与模型组比较*P* <0.001。

图2，CD3+CD8+T淋巴细胞亚群分析的代表流式结果

表3，CD3+CD8+T淋巴细胞百分比的统计数据

|  |  |
| --- | --- |
| 组别 | CD3+CD8+T淋巴细胞百分比（%） |
| 正常组 | 17.88±1.34  **\*\*\*** |
| 模型组 | 13.68±0.80 |
| OA低剂量组 | 16.48±3.80  **\*** |
| OA高剂量组 | 18.33±1.90  **\*\*\*** |

注：**\***表示与模型组比较*P* <0.05，**\*\*\***表示与模型组比较*P* <0.001。

**2.3促进肠道sIgA的生成**

模型组动物肠黏膜sIgA的含量0.94±0.23（ng/ml）与正常组动物sIgA的含量1.80±0.23（ng/ml）相比明显下降，而OA高剂量组的动物其肠黏膜sIgA的含量1.38±0.38（ng/ml）明显高于模型组动物sIgA的含量，说明OA能够促进肠道sIgA的生成，如表4所示。

表4，各组动物肠黏膜sIgA含量的比较

|  |  |
| --- | --- |
| 组别 | sIgA含量（ng/ml） |
| 正常组 | 1.80±0.23  **\*\*\*** |
| 模型组 | 0.94±0.23 |
| OA低剂量组 | 1.11±0.28 |
| OA高剂量组 | 1.38±0.38  **\*** |

注：**\***表示与模型组比较*P* <0.05，**\*\*\***表示与模型组比较*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[10]。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）[10~11]。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。但是，大多数细胞毒性化疗手段都对免疫系统有影响，包括肠道免疫系统。在本实验中，我们通过给予小鼠CTX构建了化疗后免疫缺陷动物模型，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[12]。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能够提高免疫缺陷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。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。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[13]。研究发现，CTX导致小鼠MLN中CD3+CD4+T细胞的数量占比下降至32.15%，而CD3+CD8+T细胞的数量占比下降至13.68%。而高剂量的OA能够使小鼠MLN中CD3+CD4+T与CD3+CD8+T细胞的数量占比分别增加至42.7%与18.33%。CD3+CD4+T与CD3+CD8+T细胞数量增加表明模型小鼠肠道的免疫功能抑制有所恢复。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[14]。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、盲肠和升结肠区域的引流[13]。因此，进一步研究OA对小鼠回肠黏膜表面sIgA合成分泌的影响发现，OA能够明显增加免疫缺陷小鼠肠黏膜表面sIgA的含量。

综合以上结果发现，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。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 AI, 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] 李宏伟，孔德钦，于卫华，等.齐墩果酸对酒精诱导的大鼠胃壁氧化损伤的保护作用[J].癌变·畸变·突变，2021，33（05）：365-369.

[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] Xu Qian-Fei,Peng Hui-Ping,Lu Xi-Rong,et al.Oleanolic acid regulates the Treg/Th17 imbalance in gastric cancer by targeting IL-6 with miR-98-5p[J].Cytokine,2021,148(2021):155656-155664.

[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] Nam Ju Hyun,Choi JeongUn,Monmai Chaiwat,et al. Immune-Enhancing Effects of Crude Polysaccharides from Korean Ginseng Berries on Spleens of Mice with Cyclophosphamide-Induced Immunosuppression[J].J Microbiol Biotechnol,2022, 32(2):256-262.

[10] 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.

[11] 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.

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

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

[14] 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.

[15] Grases-Pintó Blanca,Abril-Gil Mar,Rodríguez-Lagunas Maria J,et al. Leptin and adiponectin supplementation modifies mesenteric lymph node lymphocyte composition and functionality in suckling rats[J].Br J Nutr,2018,119(5):486-495.

1. 基金项目: 黑龙江省大学生创新创业训练计划项目（202010222058，20200705180309），黑龙江省卫生健康委科研课题（20210202040066），黑龙江省省属高等学校基本科研业务费项目（2019-KYYWF-1340），佳木斯大学博士专项科研基金启动项目（JMSUBZ2019-03）。

   作者信息：白瀚哲，E-mail：bnndyo@163.com \*通信作者：杨玉，E-mail：teacheryang2006@163.com。商宇，E-mail：shangyu0454@outlook.com。 [↑](#footnote-ref-1)