

复方谷氨酰胺肠溶胶囊对 Beagle 犬化疗性肠炎模型的影响

陈琼芳¹, 彭冬冬¹, 刘学武¹, 唐海亮¹, 杨 柳¹, 彭熙琳², 王小青^{1*}

1. 湖南普瑞玛药物研究中心有限公司 新药药效与安全评价湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410329

2. 地奥集团成都药业股份有限公司, 四川 成都 610000

摘要: 目的 评价复方谷氨酰胺肠溶胶囊 (CGEC) 对 Beagle 犬化疗性肠炎模型的影响。方法 Beagle 犬随机分为对照组、模型组、美沙拉嗪肠溶片 (MECT, 阳性药, 每只 500 mg) 组和 CGEC 低、中、高剂量 (48、96、192 mg·kg⁻¹) 组, 各组 Beagle 犬 ig 给予相应剂量药物, 对照组和模型组分别给予与高剂量组同等剂量的肠溶明胶空心胶囊, 每天 1 次, 连续 7 d。除对照组外, 其余各组 Beagle 犬均于给药第 3 天开始连续 5 d ip 8 mg·kg⁻¹ 5-氟尿嘧啶 (5-FU) 诱导肠炎模型, 对照组给予等体积的 0.9% 氯化钠注射液。每天观察各组 Beagle 犬的一般状况表现; 于给药后第 7 天称质量, 观察动物摄食量; 苏木精-伊红 (HE) 染色观察回肠组织结构的病理变化, 采用 BX43+MD50 数码医学图像分析系统测定回肠绒毛高度及隐窝深度; 试剂盒法检测回肠组织白细胞介素 (IL)-1 β 、肿瘤坏死因子 (TNF)- α 的水平; 免疫组化检测回肠组织中增殖细胞核抗原 (PCNA) 和 G 蛋白偶联受体 5 (Lgr5) 表达; 体外培养人骨髓间充质干细胞 (HMSC) 至第 3 代, 诱导分化为肠道干细胞, 分为对照组、模型组、CGEC (10、20、40 mg·mL⁻¹) 组、CGEC (20 mg·mL⁻¹) + FH535 [Wnt/ β -连环蛋白 (β -catenin) 抑制剂, 50 μ mol·L⁻¹] 组, 除对照组外, 其余各组均在给药同时添加 3 μ g·mL⁻¹ 5-FU 造模; 48 h 后通过 Western blotting 实验检测 Lgr5、 β -catenin、Wnt1、糖原合成酶激酶-3 β (GSK3 β) 的蛋白表达。结果 模型组动物造模第 1~3 天呕吐大量未消化的食糜或黄色黏稠液体, 摄食量减少, 自主活动减少, 粪便呈水样便, 造模第 4 天粪便呈脓血水样便; CGEC 中、高剂量组动物自主活动减少, 摄食量减少, 呕吐少量未消化的食糜。模型组回肠黏膜上皮变性、坏死, 黏膜层充血, 肠腺上皮细胞变性、坏死, CGEC 各组可明显缓解上述症状。与模型组比较, CGEC 各剂量组动物体重显著增加, 摄食量显著增加 ($P < 0.01$), 结肠组织 IL-1 β 、TNF- α 含量均显著降低 ($P < 0.01$); 中、高剂量组隐窝深度与绒毛高度的比值显著增加 ($P < 0.01$); 免疫组化结果显示, CGEC 低、中、高剂量能够显著增加回肠组织中 PCNA 的表达 ($P < 0.01$), 中、高剂量能够显著增加回肠组织中 Lgr5 的表达 ($P < 0.05$ 、0.01); 细胞实验结果显示, 与模型组比较, CGEC 20、40 mg·mL⁻¹ 均能够增加 Lgr5、 β -catenin、Wnt1 和 GSK3 β 的蛋白表达 ($P < 0.05$ 、0.01); 当联用 Wnt/ β -catenin 抑制剂时, 能够显著削弱 CGEC (20 mg·mL⁻¹) 对 Lgr5、 β -catenin、Wnt1 和 GSK3 β 的促进作用 ($P < 0.05$ 、0.01)。结论 CGEC 对化疗性肠炎具有显著治疗作用, 且 Wnt/ β -catenin 信号通路介导了其回肠黏膜的保护作用。

关键词: 复方谷氨酰胺肠溶胶囊; 化疗性肠炎; Beagle 犬; 5-氟尿嘧啶; Wnt/ β -catenin 信号通路

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2026)03-0796-09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2026.03.006

Effect of Compound Glutamine Enteric Capsules on 5-fluorouracil-induced enteritis in Beagle dogs

CHEN Qiongfang¹, PENG Dongdong¹, LIU Xuewu¹, TANG Hailiang¹, YANG Liu¹, PENG Xilin², WANG Xiaoqing¹

1. Hunan Provincial Key Laboratory for Efficacy and Safety Evaluation of New Drugs, Hunan Purima Pharmaceutical Research Center Co., Ltd., Changsha 410329, China

2. Di Ao Group Chengdu Pharmaceutical Co., Ltd., Chengdu 610000, China

Abstract: Objective To evaluate the effect of Compound Glutamine Enteric-coated Capsules (CGEC) on the chemotherapy-induced enteritis model in Beagle dogs. **Methods** Beagle dogs were randomly divided into the control group, the model group, the mesalazine enteric-coated tablets (MECT, positive drug, 500 mg per dog) group, and the low-, medium-, and high-dose CGEC (48, 96, and 192 mg·kg⁻¹) groups. Each group of Beagle dogs was ig administered the corresponding dose of the drug, and the control group and

收稿日期: 2025-10-29

基金项目: 湖南省自然科学基金资助项目 (2024JJ8140)

作者简介: 陈琼芳, 女, 硕士研究生, 助理研究员, 研究方向为新药临床前药理毒理学研究。E-mail: chenqiongfang@hnse.org

*通信作者: 王小青, 女, 博士研究生, 副研究员, 研究方向为新药临床前药理毒理学研究。E-mail: wangxiaqing@hnse.org

the model group were respectively given the same dose of enteric-coated gelatin capsules as the high-dose group, once a day for 7 consecutive days. Except for the control group, the other groups of Beagle dogs were intraperitoneally (ip) administered $8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 5-FU to induce the enteritis model from the third day of administration for 5 consecutive days, while the control group was given the same volume of 0.9% sodium chloride injection. The general condition of each group of Beagle dogs was observed daily; on the 7th day after administration, the body weight was measured, and the food intake was observed. The pathological changes of the ileal tissue structure were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining, and the height of the ileal villi and the depth of the crypts were measured by BX43 + MD50 digital medical image analysis system. The levels of interleukin (IL)-1 β and tumor necrosis factor (TNF)- α in the ileal tissue were detected by kit method. The expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and G protein-coupled receptor 5 (Lgr5) in the ileal tissue was detected by immunohistochemistry. Human bone marrow mesenchymal stem cells (HMSC) were cultured *in vitro* to the third generation and induced to differentiate into intestinal stem cells, and were divided into the control group, the model group, the CGEC (10, 20, 40 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) groups, and the CGEC (20 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) + FH535 [Wnt/ β -catenin inhibitor, 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$] group. Except for the control group, the other groups were simultaneously administered 3 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 5-FU to establish the model during administration. After 48 h, the protein expression of Lgr5, β -catenin, Wnt1, and glycogen synthase kinase-3 β (GSK3 β) was detected by Western blotting. **Results** On the first to third days of modeling, the model group of animals vomited a large amount of undigested chyme or yellow viscous liquid, had reduced food intake, decreased spontaneous activity, and watery stools. On the fourth day of modeling, the stools were purulent bloody water. In the medium- and high-dose CGEC groups, the animals had decreased spontaneous activity, reduced food intake, and vomited a small amount of undigested chyme. The ileal mucosal epithelium of the model group was degenerated and necrotic, the mucosal layer was congested, and the intestinal gland epithelial cells were degenerated and necrotic. CGEC groups could significantly alleviate the above symptoms. Compared with the model group, the body weight of the animals in each dose group of CGEC significantly increased, and the food intake significantly increased ($P < 0.01$). The content of IL-1 β and TNF- α in the colonic tissue was significantly decreased ($P < 0.01$). The ratio of crypt depth to villus height in the medium- and high-dose groups was significantly increased ($P < 0.01$). Immunohistochemical results showed that low-, medium-, and high-dose CGEC could significantly increase the expression of PCNA in the ileal tissue ($P < 0.01$), and medium- and high-dose CGEC could significantly increase the expression of Lgr5 in the ileal tissue ($P < 0.05, 0.01$). Cell experiments showed that compared with the model group, CGEC 20 and 40 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ could increase the protein expression of Lgr5, β -catenin, Wnt1, and GSK3 β ($P < 0.05, 0.01$). When combined with the Wnt/ β -catenin inhibitor, the promoting effect of CGEC (20 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) on Lgr5, β -catenin, Wnt1, and GSK3 β was significantly weakened ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** CGEC has a significant therapeutic effect on chemotherapy-induced enteritis, and the Wnt/ β -catenin signaling mediates its protective effect on intestinal mucosa.

Key words: Compound Glutamine Enteric Capsules; chemotherapy-induced enteritis; Beagle dogs; 5-fluorouracil; Wnt/ β -catenin signaling pathway

5-氟尿嘧啶 (5-FU) 是肠癌化疗最常用药物, 然而其引起的化疗性肠黏膜炎是肿瘤患者治疗失败及影响患者生活质量的严重不良反应^[1-3]。目前针对化疗治疗引起的肠黏膜炎的治疗手段有限, 探究能够减轻化疗性肠黏膜炎的肠道保护药物具有重要意义^[4-7]。复方谷氨酰胺肠溶胶囊 (CGEC) 是由 L-谷氨酰胺和四君子汤 (人参、白术、茯苓、甘草) 组成的一种复方制剂, 适应证为各种原因所致的急、慢性肠道疾病和肠道功能紊乱, 是一种专用于肠黏膜保护的药物^[8]。本研究拟采用 5-FU 诱导 Beagle 犬肠炎模型, 观察 CGEC 对化疗性肠黏膜炎的作用, 为其临床应用提供实验基础。

1 材料

1.1 动物与细胞

Beagle 犬 48 只, 普通级, 雌雄各半, 体质量

6.40~9.80 kg, 购自江苏亚东实验动物研究院有限公司, 实验动物生产许可证号 SCXK (苏) 2016-0009。饲养于湖南省药物安全评价研究中心犬猴实验区实验室, 饲养温度 16~28 $^{\circ}\text{C}$, 相对湿度 30%~70%, 本实验经湖南普瑞玛药物研究中心有限公司动物福利与伦理审查委员会批准, 伦理审查编号为 IACUC-2019 (2) 006。

人骨髓间充质干细胞 (HMSC), 货号 HUXMA-01001, 购自赛业 (广州) 生物科技有限公司。

1.2 药物与主要试剂

CGEC (批号 190407, 规格: 每粒 0.2 g 内容物)、肠溶明胶空心胶囊 (批号 F059-C21901003) 购自地奥集团成都药业股份有限公司; 美沙拉嗪肠溶片 (MECT, 批号 18A05668L, 规格: 每片 0.5 g) 购自德国 Losan Pharma GmbH 公司; 5-氟尿嘧啶注

射液 (5-FU, 批号 FA171202) 购自上海旭东海普药业有限公司; Wnt/ β -连环蛋白 (β -catenin) 抑制剂 FH535 (批号 10187) 购自 MedChemExpress 公司。

RIPA 裂解液、SDS-PAGE 凝胶快速配制试剂盒、彩色预染蛋白相对分子质量标准、ECL 化学发光试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司; 聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜购自 Merck Millipore 公司; β -catenin antibody (货号 AB32572) 购自 Abcam 公司; HRP-Goat Anti-Rabbit IgG (H + L) (货号 AS014)、Wnt1 antibody (货号 AB36092-100)、糖原合成酶激酶 3 β (GSK-3 β) antibody (货号 AB32391)、G 蛋白偶联受体 5 (Lgr5) antibody (货号 ab75850)、 β -actin (货号 AC026), 购自 Abclonal 公司。

1.3 实验仪器

BL-420SAUY220 型分析天平 (日本岛津仪器有限公司); Defender5000 型电子台秤 (奥豪斯仪器常州有限公司); TP1020 型全自动脱水机、EG1150H+C 型组织包埋机、RM2235 型石蜡切片机、CV5030+HV 型全自动封染一体机 (德国 Leica 公司); CX31 型生物显微镜、BX43+MD50 型生物显微镜、数码成像系统 (日本奥林巴斯公司); 电泳仪 (上海天能科技有限公司)。

2 方法

2.1 分组与给药

取检疫合格 Beagle 犬 48 只, 雌雄各半, 体质量 6.40~9.80 kg, 按性别及体质量随机分为 6 组, 分别为对照组、模型组、MECT (阳性药, 每只 500 mg) 组和 CGEC 低、中、高剂量 (48、96、192 mg·kg⁻¹, 其中低剂量为临床等效剂量) 组, 每组 8 只。各组 Beagle 犬 ig 给予相应剂量药物, 对照组和模型组分别给予与高剂量组同等剂量的肠溶明胶空心胶囊, 每天 1 次, 连续 7 d。除对照组外, 其余各组 Beagle 犬均于给药第 3 天开始连续 5 d ip 8 mg·kg⁻¹ 5-FU 诱导肠炎模型 (在预试验中, 对 Beagle 犬进行了不同剂量 5-FU 的探索性给药, 观察了犬的体质量变化、腹泻情况、血象改变以及肠道组织病理学变化, 根据预试验结果, 同时结合小鼠化疗性肠炎模型中 5-FU 剂量^[9]换算, 选择了 8 mg·kg⁻¹ 作为造模剂量, 该剂量表现出了明显的肠道损伤特征, 同时保证了犬的生存率; 采用连续 5 d ip 的方式模拟化疗药物对肠道的持续损伤, 更贴近临床实际情况), 对照组给予等体积的 0.9%

氯化钠注射液。

2.2 一般状态观察

每天观察各组 Beagle 犬的一般状况表现, 包括粪便、精神状态及自主活动等。

2.3 观察体质量、摄食量

于给药后第 7 天称质量, 观察动物摄食量。

2.4 肠组织病理学检查

各组 Beagle 犬于末次给药后按 17 mg·kg⁻¹ iv 丙泊酚乳状注射液麻醉放血处死, 剖开腹腔, 取 5 cm×5 cm 回肠组织, 沿肠系膜纵向剪开, 0.9% 氯化钠溶液清洗干净, 滤纸吸干水分, 于 12% 中性福尔马林固定, 苏木精-伊红 (HE) 染色, 光学显微镜下观察回肠组织结构的病理变化。

2.5 回肠绒毛高度及隐窝深度测量

回肠组织经 12% 中性福尔马林固定, 常规脱水、石蜡切片、HE 染色, 采用 BX43+MD50 数码医学图像分析系统随机全盲测定各组回肠绒毛高度及隐窝深度。

2.6 回肠组织细胞因子检测

取 5 cm×5 cm 回肠组织, 用 0.9% 氯化钠溶液洗净内容物, 称 0.3 g 回肠组织后加入 3 mL 冷 0.9% 氯化钠溶液手动研磨制备 10% 的组织匀浆, 4 000 r·min⁻¹ 离心 20 min, 取上清液-20 °C 保存。按试剂盒说明书检测回肠组织白细胞介素 (IL)-1 β 、肿瘤坏死因子 (TNF)- α 的水平。

2.7 免疫组化检测 Beagle 犬回肠组织中增殖细胞核抗原 (PCNA) 和 Lgr5 表达

将 Beagle 犬回肠组织切片分别放入二甲苯、梯度乙醇溶液中脱蜡与水化, 经抗原修复、阻断过氧化氢酶后, 进行一抗、二抗孵育, 最后进行 DAB 染色、复染与封片。随机选择 5 个视野, 通过 Image Pro Plus 软件测量出每张图片的累积吸光度值。

2.8 体外实验方法

HMSC 培养至第 3 代, 待细胞融合度达到 80%~90%, 将细胞消化后, 以每孔 5×10⁵ 个转移至 6 孔板中。24 h 后, 细胞贴壁, 培养液更换为 0.5% 胎牛血清 (FBS)+DMEM 培养基, 并加入 5 ng·mL⁻¹ 的激活素 A (Activin A), 诱导 5 d, 每 2 天补充 Activin A; Activin A 诱导 5 d 后, 进入诱导的第 2 阶段, 诱导体系换为 2% FBS+DMEM/F12+250 ng·mL⁻¹ 碱性成纤维细胞生长因子 2 (FGF2), 诱导 4 d, 每 2 天补充诱导体系, 将

HMSC 诱导分化为肠道干细胞。

然后将肠干细胞（每孔 $1.0 \times 10^6 \sim 1.2 \times 10^6$ 个）接种于 6 孔培养板，待细胞贴壁后，分为对照组、模型组、CGEC（10、20、40 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ）组、CGEC（20 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ）+FH535（Wnt/ β -catenin 抑制剂，50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ）组，除对照组外，其余各组均在给药同时添加 3 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 5-FU 造模（参考预试验及文献报道^[10]确定）。48 h 后收集细胞进行蛋白提取，通过 Western blotting 实验检测 Lgr5、 β -catenin、Wnt1、GSK3 β 的蛋白表达， β -actin 用作内参。

2.9 统计学分析

使用 GraphPad Prism 9.0.0 软件进行图像绘制，采用 SPSS 16.0 软件进行实验数据分析，采用单因素方差分析（One-Way ANOVA）进行统计分析。两两比较用 LSD-*t* 检验。

3 结果

3.1 一般临床观察

造模期间，对照组动物饮食饮水，自主活动未见异常；模型组动物造模第 1~3 天呕吐大量未消化的食糜或黄色黏稠液体，摄食量减少，自主活动减少，粪便呈水样便，造模第 4 天粪便呈脓血水样便；MECT 组动物自主活动减少，摄食量减少，呕吐少量的黄色黏稠液体或未消化的食糜，粪便呈糊状便或水样便，同时伴有少量的血丝；CGEC 低剂量组动物自主活动减少，摄食量减少，呕吐少量的黄色黏稠液体或未消化的食糜，粪便呈水样便，CGEC 中、高剂量组动物自主活动减少，摄食量减

少，呕吐少量未消化的食糜。

3.2 CGEC 对 Beagle 犬化疗性肠炎模型体质量、摄食量的影响

如图 1 所示，与对照组比较，模型组 Beagle 犬体质量显著减轻，摄食量显著减少（ $P < 0.01$ ）；与模型组比较，MECT 组及 CGEC 各剂量组 Beagle 犬体质量显著增加，摄食量显著增加（ $P < 0.01$ ）。

3.3 CGEC 对 Beagle 犬化疗性肠炎模型回肠组织细胞因子的影响

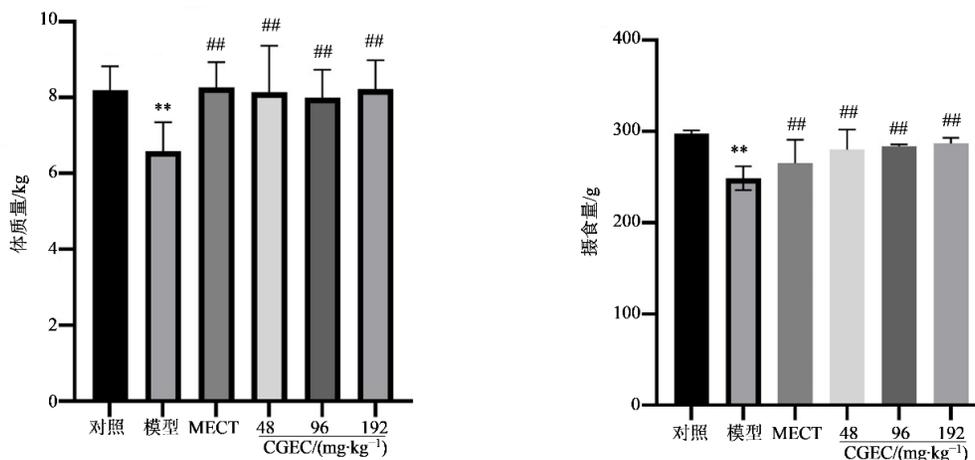
如图 2 所示，与对照组比较，模型组 Beagle 犬回肠组织中 IL-1 β 、TNF- α 含量均显著增加（ $P < 0.01$ ）；与模型组比较，CGEC 低、中、高剂量组 IL-1 β 、TNF- α 含量均显著降低（ $P < 0.01$ ）。

3.4 CGEC 对 Beagle 犬化疗性肠炎模型回肠绒毛高度及隐窝深度的影响

如图 3 所示，与对照组比较，模型组 Beagle 犬回肠隐窝深度与绒毛高度的比值显著降低（ $P < 0.01$ ）；与模型组比较，CGEC 中、高剂量组隐窝深度与绒毛高度的比值显著增加（ $P < 0.01$ ）。

3.5 CGEC 对 5-FU 引起 Beagle 犬回肠组织损伤的影响

如图 4 所示，与对照组比较，模型组回肠黏膜上皮变性、坏死，黏膜层充血，肠腺上皮细胞变性、坏死；MECT 组回肠黏膜结构基本完整，无明显充血、水肿及炎症细胞浸润等病理变化；CGEC 各组可明显缓解上述症状，且随着剂量增加，缓解效果越显著。



与对照组比较：** $P < 0.01$ ；与模型组比较：### $P < 0.01$ 。

** $P < 0.01$ vs control group; ### $P < 0.01$ vs model group.

图 1 CGEC 对 Beagle 犬化疗性肠炎模型体质量、摄食量的影响（ $\bar{x} \pm s, n=8$ ）

Fig. 1 Impact of CGEC on body weight and food intake in Beagle dog model of chemo-induced enteritis ($\bar{x} \pm s, n=8$)

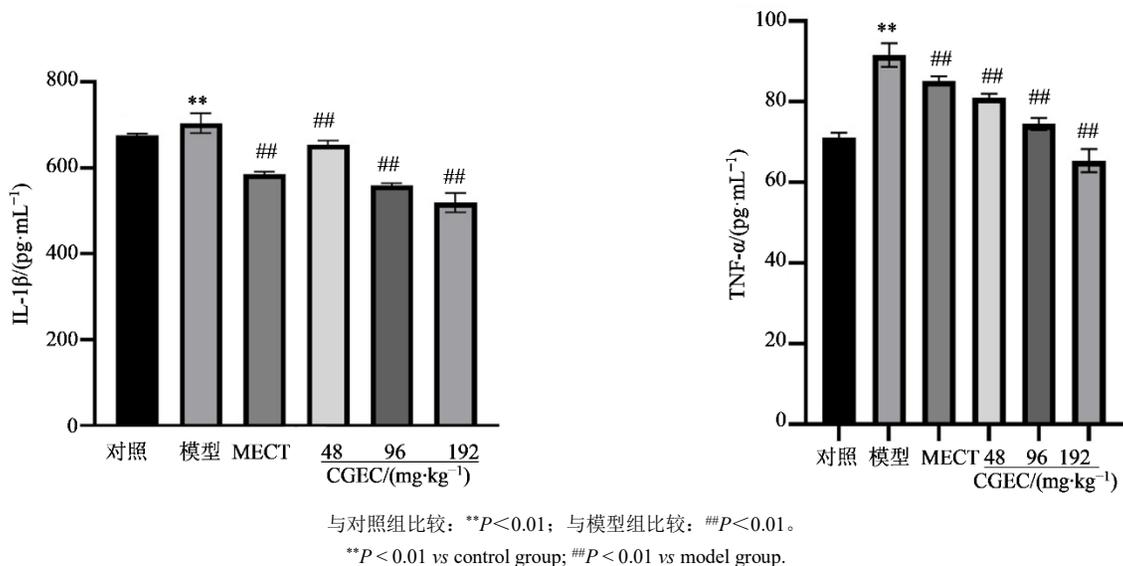


图 2 CGEC 对 Beagle 犬化疗性肠炎模型回肠组织细胞因子的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Fig. 2 Impact of CGEC on cytokines in ileum tissue of Beagle dogs with chemotherapeutic enteritis model ($\bar{x} \pm s, n=8$)

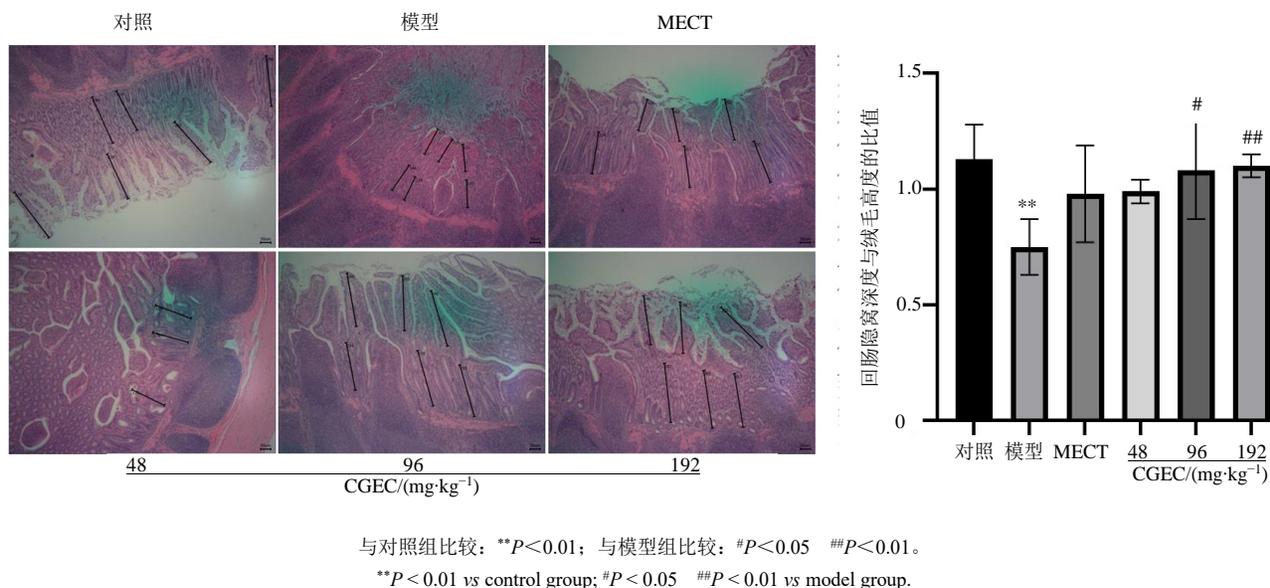


图 3 CGEC 增加 Beagle 犬化疗性肠炎模型回肠隐窝深度与绒毛高度的比值 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Fig. 3 CGEC increased ratio of ileum crypt depth to villus length in Beagle dogs with chemotherapeutic enteritis model ($\bar{x} \pm s, n=8$)

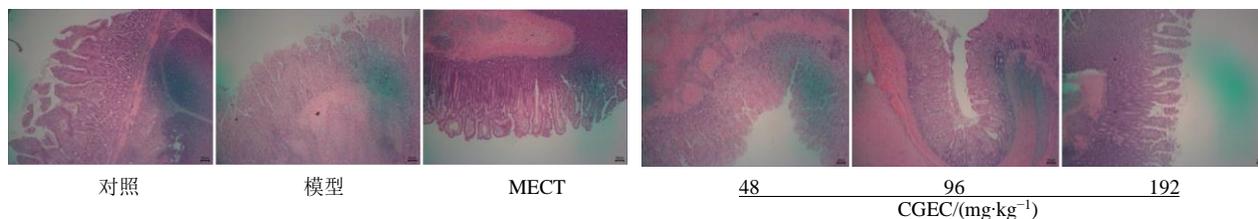
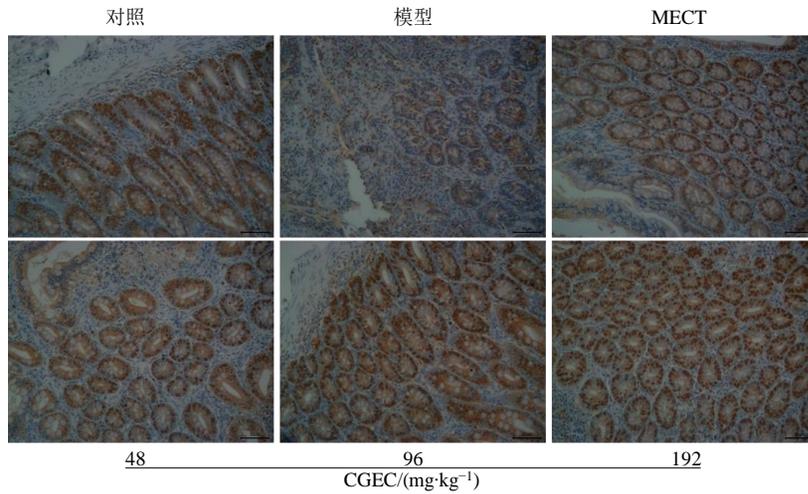


图 4 CGEC 对 5-FU 引起 Beagle 犬回肠组织损伤的影响 (HE 染色, $\times 100$)

Fig. 4 Impact of CGEC on 5-FU-induced ileal tissue damage in Beagle dogs (HE staining, $\times 100$)

3.6 CGEC 对 Beagle 犬回肠组织中 PCNA 表达的影响

如图 5 所示, 与对照组比较, 模型组回肠组织中 PCNA 表达明显降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, CGEC 低、中、高剂量能够显著增加 Beagle 犬回肠组织中 PCNA 的表达 ($P < 0.01$), 且随着剂量增加, PCNA 表达越高。

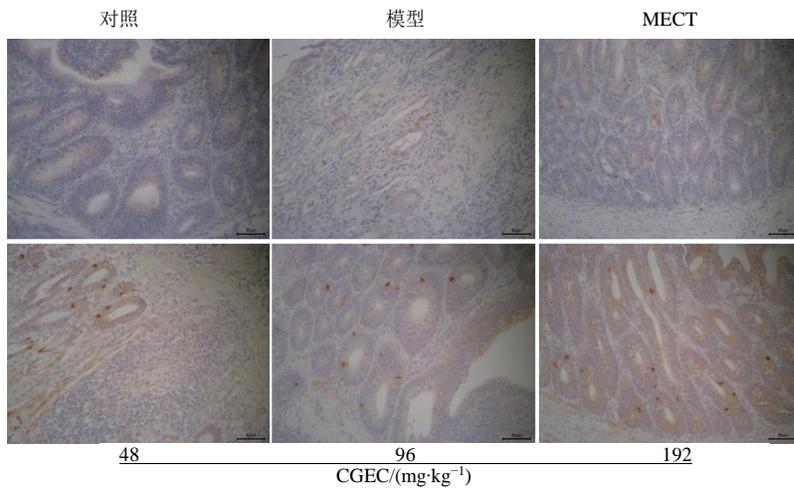


与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: ## $P < 0.01$ 。

** $P < 0.01$ vs control group; ## $P < 0.01$ vs model group.

图 5 CGEC 对 Beagle 犬回肠组织中 PCNA 表达的影响 (免疫组化, $\times 400$, $\bar{x} \pm s, n=8$)

Fig. 5 Impact of CGEC on PCNA expression in ileum tissue of Beagle dogs (immunohistochemistry, $\times 400$, $\bar{x} \pm s, n=8$)



与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ 。

** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group.

图 6 CGEC 对 Beagle 犬回肠组织中 Lgr5 表达的影响 (免疫组化, $\times 400$, $\bar{x} \pm s, n=8$)

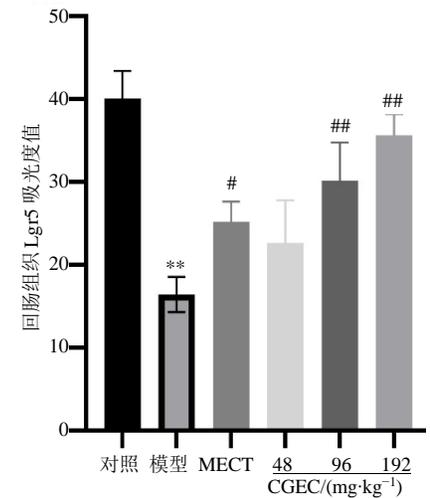
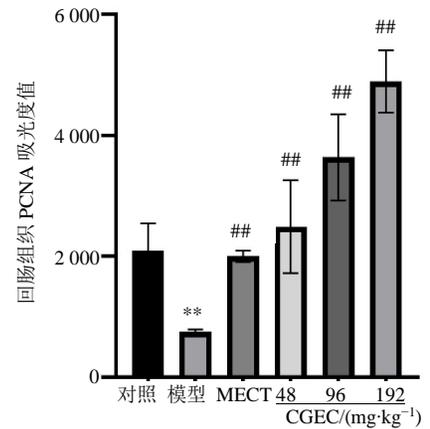
Fig. 6 Impact of CGEC on Lgr5 expression in ileum tissue of Beagle dogs (immunohistochemistry, $\times 400$, $\bar{x} \pm s, n=8$)

3.8 Wnt/ β -catenin 信号介导 CGEC 对肠干细胞的保护作用

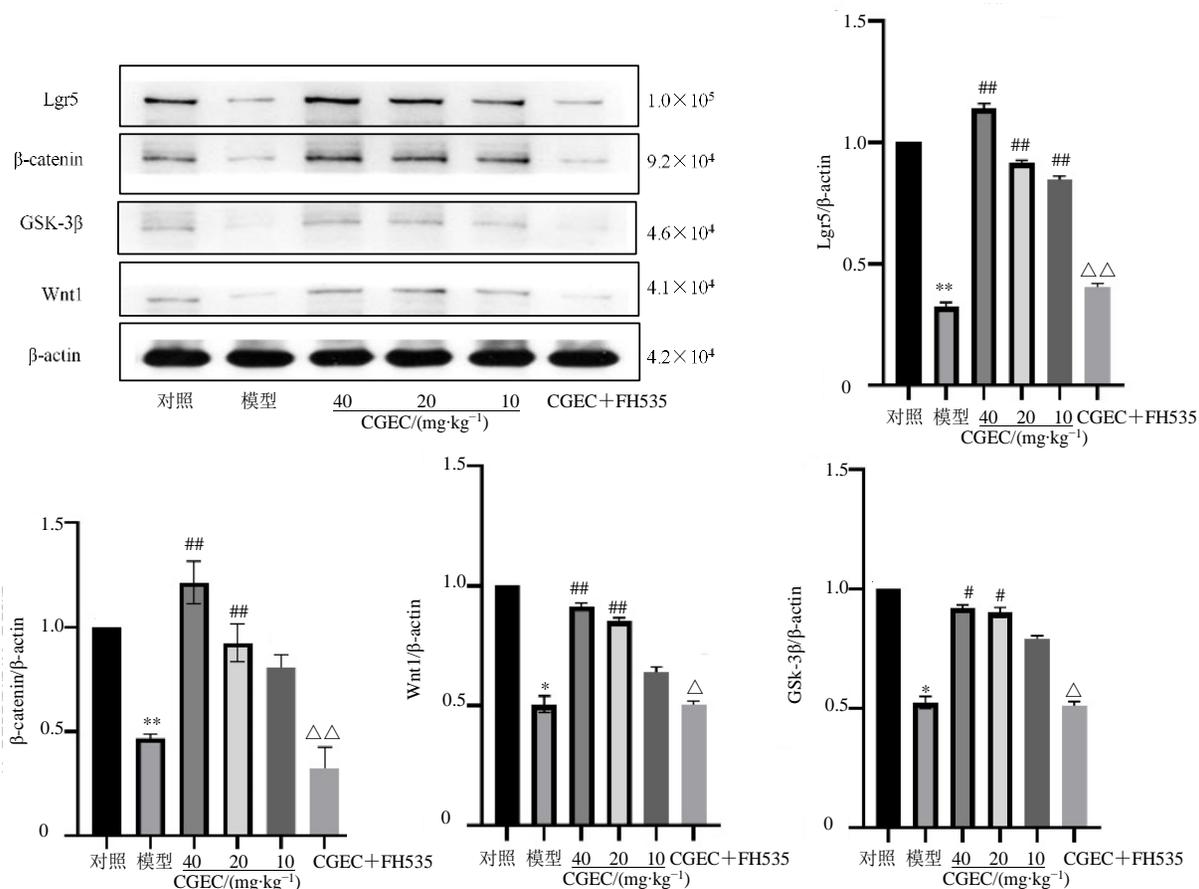
如图 7 所示, 与对照组比较, 模型组中 Lgr5、

3.7 CGEC 对 Beagle 犬回肠组织中 Lgr5 表达的影响

如图 6 所示, 与对照组比较, 模型组回肠组织中 Lgr5 表达明显降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, CGEC 中、高剂量能够显著增加 Beagle 犬回肠组织中 Lgr5 的表达 ($P < 0.05, 0.01$), 且随着剂量增加, Lgr5 表达越高。



β -catenin、Wnt1 和 GSK3 β 蛋白表达显著降低 ($P < 0.05, 0.01$); 与模型组比较, CGEC 20、40 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 均能够增加 Lgr5、 β -catenin、Wnt1 和 GSK3 β 的蛋



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$; 与 CGEC 20 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 组比较: $\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$ 。
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group; $\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$ vs CGEC 20 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ group.

图 7 Wnt/ β -catenin 信号介导 CGEC 对肠干细胞的保护作用 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Fig. 7 Wnt/ β -catenin signaling mediates protective effect of CGEC on intestinal stem cells ($\bar{x} \pm s, n=8$)

白表达 ($P < 0.05, 0.01$)。当联用 Wnt/ β -catenin 抑制剂时,能够显著削弱 CGEC ($20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)对 Lgr5、 β -catenin、Wnt1 和 GSK3 β 的促进作用 ($P < 0.05, 0.01$)。结果表明, Wnt/ β -catenin 信号介导了 CGEC 对肠道干细胞的保护作用。

4 讨论

5-FU 是临床上一线的化疗药物,然而其引起的化疗性肠炎是常见且严重的不良反应,为了改善这一现象,大量关于如何减轻化疗性肠炎的研究被陆续报道^[10-15]。例如,广藿香醇通过 Toll 样受体 2 (TLR2)-髓样分化因子 88 (MyD88)-核转录因子 κB (NF- κB) 信号通路缓解 5-FU 诱导的肠黏膜炎^[10];百里酚通过 NF- κB 下调转化生长因子- β (TGF- β)/MAPK 信号通路改善 5-FU 诱导的肠黏膜炎^[13];青蒿琥酯通过抑制细胞衰老减轻 5-FU 诱导的肠道损伤,并增强其抗肿瘤活性^[15]。本研究发现 CGEC 对化疗性肠炎具有显著治疗作用,且 Wnt/ β -catenin

信号介导了其肠黏膜的保护作用。

CGEC 是由 L-谷氨酰胺和四君子汤(人参、白术、茯苓、甘草)组成的一种复方制剂,是一种专用于肠黏膜保护及肠道疾病的药物。已有研究表明,CGEC 对 5-FU 诱导的小鼠肠黏膜炎具有保护作用,且对肠黏膜炎的保护作用优于其 L-谷氨酰胺和四君子汤组分单用的效果^[16]。为了进一步探究 CGEC 对 5-FU 诱导的肠黏膜炎的保护作用,本研究以 Beagle 犬为研究对象,使用 5-FU 诱导肠炎模型,观察其对化疗性肠黏膜炎的作用,为其临床应用提供进一步实验基础。

首先,通过 5-FU 构建了 Beagle 犬化疗性肠炎模型,结果显示,5-FU 造模后,Beagle 犬出现体质量减轻、摄食量减少、自主活动减少、精神萎靡及腹泻,而 CGEC 能显著增加模型 Beagle 犬体质量,改善其摄食、自主活动以及精神状态。化疗性肠炎病理特征表现为肠绒毛萎缩、隐窝破坏、出现水肿

充血及炎症浸润。采用 HE 染色法观察了各组 Beagle 犬小肠组织的病理变化,结果表明,5-FU 造模后 Beagle 犬出现明显的病理改变,肠绒毛上皮细胞脱落,隐窝结构破坏或消失,出现炎症细胞浸润,肠绒毛高度和隐窝深度明显降低。CGEC 能不同程度改善 Beagle 犬小肠组织的病理改变,增加肠绒毛高度和隐窝深度,改善 5-FU 诱导的肠黏膜炎病理损伤。此外,CGEC 低、中及高剂量组能显著降低 IL-1 β 、TNF- α 水平,同时能显著增加回肠组织 PCNA 阳性表达,提示 CGEC 对化疗性肠炎具有显著疗效。

Wnt/ β -catenin 信号通路是一种进化的细胞间协调机制,参与调控多种生理过程,包括干细胞再生、增殖、分裂、迁移、细胞极性等^[17-18]。研究表明,Wnt/ β -catenin 信号通路有利于肠干细胞增殖^[19-21],且参与炎症的调节^[22]。为了探究 Wnt/ β -catenin 信号是否介导 CGEC 对肠道的保护作用,检测了 CGEC 对 Wnt/ β -catenin 信号的影响,发现不同浓度的 CGEC 均能够增加 Lgr5、 β -catenin、Wnt1 和 GSK3 β 的表达。当使用 Wnt/ β -catenin 抑制剂时,能够显著削弱 CGEC 对 Lgr5、 β -catenin、Wnt1 和 GSK3 β 的促进作用。结果表明,Wnt/ β -catenin 信号介导了 CGEC 对肠道干细胞的保护作用。

本研究结果表明,CGEC 能显著增加 Beagle 犬肠炎模型体质量和摄食量,也能增加肠绒毛高度和隐窝深度,改善 5-FU 诱导的肠黏膜炎病理损伤。此外,CGEC 也能显著降低 IL-1 β 、TNF- α 水平,增加回肠组织中 PCNA 阳性表达,增加肠干细胞中 Lgr5、 β -catenin、Wnt1 和 GSK3 β 的表达。总之,CGEC 对 Beagle 犬化疗性肠炎具有显著治疗作用,且 Wnt/ β -catenin 信号介导了 CGEC 对肠黏膜的保护作用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] He S Y, Xia J, Jia H J, et al. Peficitinib ameliorates 5-fluorouracil-induced intestinal damage by inhibiting aging, inflammatory factors and oxidative stress [J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 123: 110753.
- [2] Vodenkova S, Buchler T, Cervena K, et al. 5-fluorouracil and other fluoropyrimidines in colorectal cancer: Past, present and future [J]. *Pharmacol Ther*, 2020, 206: 107447.
- [3] Blondy S, David V, Verdier M, et al. 5-Fluorouracil resistance mechanisms in colorectal cancer: From classical pathways to promising processes [J]. *Cancer Sci*, 2020, 111(9): 3142-3154.
- [4] 李兆栋, 陈银潇, 李佳颖, 等. 生脉胶囊对 5-氟尿嘧啶致小鼠化疗性肠黏膜炎的保护作用研究 [J]. *天津中医药*, 2023, 40(12): 1581-1586.
Li Z D, Chen Y X, Li J Y, et al. Study on the Protective Effect of Shengmai Capsule on chemotherapy-induced intestinal mucositis in mice caused by 5-fluorouracil [J]. *Tianjin Journal of TCM*, 2023, 40(12): 1581-1586.
- [5] 周卫东, 卢汉祺, 陈泽伟, 等. 五子衍宗丸对化疗性肠黏膜炎小鼠的保护作用及其机制研究 [J]. *光明中医*, 2021, 36(5): 729-733.
Zhou W D, Lu H Q, Chen Z W, et al. Research on the protection and mechanism of Wuzi Yanzong Pill on chemotherapy-induced intestinal inflammation in mice [J]. *Guangming J Chin Med*, 2021, 36(5): 729-733.
- [6] Zhang L, Jin Y Y, Peng J, et al. Qingjie Fuzheng Granule attenuates 5-fluorouracil-induced intestinal mucosal damage [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 118: 109223.
- [7] Deng S H, Wu D M, Li L, et al. TBHQ attenuates ferroptosis against 5-fluorouracil-induced intestinal epithelial cell injury and intestinal mucositis via activation of Nrf2 [J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2021, 26(1): 48.
- [8] 张志亮, 常廷民. 补脾益肠丸联合复方谷氨酰胺治疗腹泻型肠易激综合征的临床研究 [J]. *现代药物与临床*, 2019, 34(4): 1059-1064.
Zhang Z L, Chang T M. Clinical study on Bupi Yichang Pills combined with compound glutamine in treatment of diarrhea-predominant irritable bowel syndrome [J]. *Drugs Clin*, 2019, 34(4): 1059-1064.
- [9] Wang L, Song B, Hu Y, et al. Puerarin ameliorates 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in mice by inhibiting JAKs [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2021, 379(2): 147-155.
- [10] Wu J Z, Gan Y X, Li M X, et al. Patchouli alcohol attenuates 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis via TLR2/MyD88/NF- κ B pathway and regulation of microbiota [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 124: 109883.
- [11] Wang L, Song B H, Hu Y, et al. Puerarin ameliorates 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in mice by inhibiting JAKs [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2021, 379(2): 147-155.
- [12] Oliveira M M B, de Araújo A A, Ribeiro S B, et al. Losartan improves intestinal mucositis induced by 5-fluorouracil in mice [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 23241.
- [13] Al-Khrashi L A, Badr A M, Al-Amin M A, et al. Thymol ameliorates 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis:

- Evidence of down-regulatory effect on TGF- β /MAPK pathways through NF- κ B [J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2022, 36(1): e22932.
- [14] Madani F, Kazemi S, Shirafkan F, et al. Thymoquinone protects against 5-fluorouracil-induced mucositis by NF- κ β and HIF-1 mechanisms in mice [J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2023, 37(9): e23405.
- [15] Xia J, Dai Q L, He S Y, et al. Artesunate alleviates 5-fluorouracil-induced intestinal damage by suppressing cellular senescence and enhances its antitumor activity [J]. *Discov Oncol*, 2023, 14(1): 139.
- [16] 熊晏, 邹文俊, 瞿礼萍. 复方谷氨酰胺肠溶胶囊治疗 5-FU 诱导肠黏膜炎及其免疫机制研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2019.
- Xiong Y, Zou W J, Qu L P. Efficacy and immune mechanism of Compound Glutamine Entersoluble Capsules in the treatment of 5-FU-induced intestinal mucositis [D]. Chengdu: Chengdu University of TCM, 2019.
- [17] Hayat R, Manzoor M, Hussain A. Wnt signaling pathway: A comprehensive review [J]. *Cell Biol Int*, 2022, 46(6): 863-877.
- [18] Liu J, Xiao Q, Xiao J, et al. Wnt/ β -catenin signalling: function, biological mechanisms, and therapeutic opportunities [J]. *Signal Transduct Tar*, 2022, 7(1): 3.
- [19] Han B, Yan S, Wei S, et al. YTHDF1-mediated translation amplifies Wnt-driven intestinal stemness [J]. *EMBO rep*, 2020, 21(4): e49229.
- [20] Rock S A, Jiang K, Wu Y, et al. Neurotensin regulates proliferation and stem cell function in the small intestine in a nutrient-dependent manner [J]. *Cell Mol Gastroenter*, 2022, 13(2): 501-516.
- [21] Sun H, Shami Shah A, Chiu D C, et al. Wnt/ β -catenin signaling within multiple cell types dependent upon kramer regulates *Drosophila* intestinal stem cell proliferation [J]. *iScience*, 2024, 27(6): 110113.
- [22] Tan W, Qiu Y, Chen N, et al. The intervention of intestinal Wnt/ β -catenin pathway alters inflammation and disease severity of CIA [J]. *Immunol Res*, 2021, 69(4): 323-333.

[责任编辑 兰新新]