枳实总黄酮对 5-氟尿嘧啶诱导的肠黏膜炎小鼠肠道菌群失调的影响

刘丹宁，潘梦雪，杨璐嘉，黄洁瑶，任　巧*，袁吕江*

西南大学药学院，重庆　400715

摘　要：目的　研究枳实总黄酮对 5-氟尿嘧啶（5-fluorouracil，5-FU）诱导的肠黏膜炎和肠道菌群的影响及作用机制。**方法**　雄性昆明小鼠随机分为对照组、模型组及枳实总黄酮低、中、高剂量（50、100、200 mg/kg）组和洛哌丁胺（0.3 mg/kg 组），ip 5-FU（50 mg/kg）5 d 诱导肠黏膜炎模型，第 6 天开始，各给药组 ig 相应药物，1 次/d，连续 7 d，观察小鼠体质量、饮食量、饮水量、腹泻评分、胸腺指数、脾脏指数、结肠形态、隐窝深度；采用苏木素-伊红（HE）染色考察小鼠结肠组织病理变化；采用 ELISA 法检测小鼠结肠组织中白细胞介素-6（interleukin-6，IL-6）、IL-1β 和肿瘤坏死因子-α（tumor necrosis factor-α，TNF-α）水平；检测小鼠结肠组织中超氧化物歧化酶（superoxide dismutase，SOD）、谷胱甘肽过氧化物酶（glutathione peroxidase，GSH-Px）活性和丙二醛（maleic dialdehyde，MDA）水平；采用细菌 16S rRNA 基因 V3～4 区高通量测序技术分析小鼠肠道菌群变化。**结果**　与模型组相比，枳实总黄酮组小鼠体质量和饮食量增加，饮水量减少，腹泻评分降低，胸腺指数和脾脏指数显著增加（P＜0.05、0.01），结肠组织损伤减轻，结肠长度和隐窝深度显著增加（P＜0.05、0.01），结肠组织中促炎细胞因子 IL-6、IL-1β 和 TNF-α 水平显著降低（P＜0.05、0.01），SOD 和 GSH-Px 活性显著升高（P＜0.05、0.01），MDA 水平显著降低（P＜0.01）。16S rRNA 基因测序结果显示，模型组小鼠肠道菌群多样性和丰度降低，枳实总黄酮组小鼠肠道菌群多样性和丰度增加。门水平主要表现为厚壁菌门相对丰度升高；属水平上拟杆菌属 *Bacteroidetes*、unidentified_*Clostridiales*、拟普雷沃菌属 *Alloprevotella*、unidentified_*Ruminococcaceae* 和乳酸杆菌属 *Lactobacillus* 5 个菌属相对丰度升高。**结论**　枳实总黄酮能够有效改善 5-FU 所致的小鼠肠黏膜炎，其机制可能与抗氧化、抗炎、调节肠道菌群有关。

关键词：枳实总黄酮；5-氟尿嘧啶；肠黏膜炎；肠道菌群；抗氧化；抗炎；芸香柚皮苷；柚皮苷；橙皮苷

中图分类号：R285.5　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**0253 - 2670(2021)23 - 7204 - 10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.23.014

Effect of total flavonoids from *Aurantii Frutus Immaturus* on intestinal flora imbalance in mice with intestinal mucositis induced by 5-fluorouracil

LIU Dan-ning, PAN Meng-xue, YANG Lu-jia, HUANG Jie-yao, REN Qiao, YUAN Lyu-jiang

College of Pharmaceutical Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China

Abstract: Objective　To study the effect and mechanism of total flavonoids from Zhishi (*Aurantii Frutus Immaturus*, AFIF) on mice with intestinal mucositis induced by 5-fluorouracil (5-FU). **Methods**　Male Kunming mice were randomly divided into control group, model group, low-, medium- and high-dose AFIF (50, 100, 200 mg/kg) groups and loperamide (0.3 mg/kg) group. 5-FU (50 mg/kg) was injected intraperitoneally for 5 d to induce intestinal mucositis model. Beginning on day 6, rats in each administration group were ig corresponding drugs, once a day for 7 consecutive days. The body weight, diet intake, water intake, diarrhea score, thymus index, spleen index, colon morphology and crypt depth were observed. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to investigate the pathological changes of colon. Levels of interlerkin-6 (IL-6), IL-1β and tumor necrosis factor-α (TNF-α) in colon tissues were determined by ELISA; Superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) activities, and malondialdehyde (MDA) level were detected; 16S rRNA gene V3—4 regions for high throughput sequencing technology was used to analysis the changes of intestinal flora. **Results**　Compared with model group, body weight and food intake of mice in AFIF groups were increased, water intake and diarrhea score were decreased, thymus and spleen index were significantly increased (P < 0.05, 0.01), colon tissue damage

收稿日期：2021-08-16

基金项目：重庆科委社会事业与民生保障科技创新专项（cstc2017shmsA10004）

作者简介：刘丹宁（1993—），女，硕士研究生，主要从事中药活性成分研究。E-mail: 2427817565@qq.com

***通信作者：**袁吕江，教授，硕士生导师，主要从事中药活性成分研究。E-mail: yuanlujiang@hotmail.com

任　巧，副教授，硕士生导师，主要从事中药活性成分研究。E-mail: qren2014@swu.edu.cn

was reduced, colon length and crypt depth were significantly increased (P < 0.05, 0.01); Levels of pro-inflammatory cytokines IL-6, IL-1β and TNF-α in colon tissue were significantly reduced (P < 0.05, 0.01); Activities of SOD and GSH-Px were significantly increased (P < 0.05, 0.01), and MDA level was significantly decreased (P < 0.01). 16S rRNA gene sequencing results showed that diversity and abundance of intestinal flora of mice in model group was reduced, diversity and abundance of intestinal flora of mice in AFIF groups were increased. At phylum level, the relative abundance of Firmicutes was increased in AFIF groups. At genus level, the relative abundance of *Bacteroidetes*, unidentified_*Clostridiales*, *Alloprevotella*, unidentified_*Ruminococcaceae* and *Lactobacillus* were increased. **Conclusion** AFIF can effectively improve 5-FU induced intestinal mucositis in mice, and its mechanism may be related to the anti-oxidation, anti-inflammatory and regulation of intestinal flora.

Key words: total flavonoids from *Aurantii Frutus Immaturus*; 5-fluorouracil; intestinal mucositis; intestinal flora; anti-oxidant; anti-inflammatory; narirutin; naringin; hesperidin

5-氟尿嘧啶（5-fluorouracil，5-FU）是一种抗代谢药物，为治疗恶性肿瘤最常用的处方药之一[1]。由于 5-FU 对 DNA 合成抑制的作用是非靶向性的，它不仅攻击肿瘤细胞，还攻击正常细胞，导致增殖抑制、DNA 损伤和细胞死亡，引起广泛的不良反应[2-3]。其中最严重的不良反应之一为肠黏膜炎并伴有严重腹泻[4-5]。研究表明，活性氧（reactive oxygen species，ROS）[6]、炎性细胞因子[7-8]、细胞凋亡[9]以及肠道菌群失调是导致肠黏膜炎的主要因素[10-11]。50～80%接受 5-FU 治疗的患者发展为肠黏膜炎或伴有严重腹泻的黏膜炎[12-13]。目前治疗肠黏膜炎和肠黏膜炎腹泻的药物大多是以对症和短期治疗为原则[14-15]。因此，开发安全有效的药物对治疗 5-FU 诱导的肠黏膜炎有重要意义。

枳实是酸橙 *Citrus aurantium* L.及其栽培品种或甜橙 *C. sinensis* Osbeck 的干燥幼果，长期以来作为中药单味或入制剂治疗腹泻、胃胀胀痛和子宫脱垂等胃肠道疾病[16]。黄酮类、生物碱、挥发油和香豆素是枳实的主要活性成分[17-18]。枳实中的挥发油成分具有抗真菌[19]、抗焦虑[20]和抗乙酰胆碱酯酶活性[21]；辛弗林和 *N*-甲基酪胺等生物碱类成分通常作为食品补充剂，可以减轻体质量并改善体态[22]；黄酮类成分中的芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷具有抗氧化[23]、抗癌[24]、抗炎[25]、保护胃黏膜[26]、抗凝、调节肠道运动[27]、保护神经[28]等作用。然而，枳实黄酮类成分对化疗诱导的肠黏膜炎的作用及机制少有报道。本研究从枳实中制备得到总黄酮，探究其对 5-FU 诱导的肠黏膜炎小鼠的影响。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性昆明小鼠，体质量（20±2）g，8 周龄，购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司，动物许可证号 SCKK（湘）2016-0002。动物在 SPF 级动物房中饲养，自由进食饮水，动物房温度控制在（20±5）℃，湿度控制在（55±5）%，通风环境好，并且保持 12 h 明暗交替。动物实验均根据《实验动物的护理和使用指南》和《中国实验动物立法》（第 398-2006 号）进行操作，并由西南大学实验动物伦理审查委员会批准（批准号 yxy201912）。

1.2 药品与试剂

枳实（批号 20190801）购自重庆市忠县中药有限公司，经西南大学药学院李学刚教授鉴定为芸香科植物酸橙 *C. aurantium* L.；洛哌丁胺胶囊（批号 H10910085）购自西安杨森制药有限公司；5-FU 注射液（批号 H20051113）购自山西普德药业有限公司；白细胞介素-6（interleukin-6，IL-6）ELISA 试剂盒、IL-1β ELISA 试剂盒、肿瘤坏死因子-α（tumor necrosis factor-α，TNF-α）ELISA 试剂盒（批号分别为 20190426、20190319、20190321）购自上海酶联生物科技有限公司；超氧化物歧化酶（superoxide dismutase，SOD）试剂盒、谷胱甘肽过氧化物酶（glutathione peroxidase，GSH-Px）试剂盒、丙二醛（maleic dialdehyde，MDA）试剂盒（批号分别为 20190313、20190319、20190425）购自南京建成生物工程研究所；柚皮苷（批号 Y-006-171216，质量分数≥98%）、芸香柚皮苷（批号 Y-071-170917，质量分数≥98%）、橙皮苷（批号 C-006-170216，质量分数≥98%）购自成都瑞芬思生物科技有限公司。

1.3 仪器

LC-20AD 型高效液相色谱仪（HPLC，日本岛津公司）；KQ5200DB 型超声波清洗仪器（昆山市超声仪器有限公司）；QVSW-20A 型超纯水仪（美国 Millipore 公司）；RE-52A 型旋转蒸发仪（上海荣生化工仪器厂）；HHW-21CU-600B 型恒温水浴锅（上海福玛实验设备有限公司）；YP6000N 型电子天平（上海精密仪器科技有限公司）；WK1000A 型高

速多功能粉碎机（山东青州市精诚机械有限公司）；TDL-5A 型台式低速大容量离心机（上海菲恰尔分析仪器）；ELX808 型酶标分析仪（美国基因有限公司）；DY89 型电动玻璃匀浆机（宁波新芝生物科技股份有限公司）；SIM-FI40AY65 型制冰机（日本松下电器）；OMYSS-325 型全自动高压灭菌锅（日本 TOMY 公司）；低温微量高速离心机（重庆市医疗器械有限公司）；超净工作台（上海浦东荣丰科学仪器有限公司）。

2 方法

2.1 枳实总黄酮的制备

枳实总黄酮由本课题组采用低共熔溶剂（氯化胆碱/醋酸）进行超声波辅助提取，利用大孔吸附树脂富集分离技术对溶液中黄酮类成分富集分离，采用 HPLC 仪检测枳实总黄酮中芸香柚皮苷、柚皮苷和橙皮苷的质量分数分别为 3.36%、0.629%、15.96%。

2.2 造模、分组与给药

小鼠适应性饲养 1 周后随机分为对照组、模型组以及枳实总黄酮低、中、高剂量（50、100、200 mg/kg）组和洛哌丁胺（0.3 mg/kg）组，每组 10 只。对照组 ip 0.9%氯化钠溶液，其余各组 ip 5-FU（50 mg/kg）5 d 诱导肠黏膜炎模型；从第 6 天开始，各给药组 ig 相应药物，对照组和模型组 ig 0.9%氯化钠溶液，1 次/d，连续 7 d。自造模第 1 天起，每天记录各组小鼠体质量、饮食量、饮水量、大便形状及临床表现，并对腹泻状态进行腹泻评分，评分≥1 的小鼠被认为是腹泻，表现为自主活动减少、肛周污染、体质量减轻、粪便湿软或呈水样，评分为 0 表明小鼠大便正常，自主活动和体质量增加。

2.3 胸腺和脾脏指数的测定

各组小鼠于取材前 1 天（末次给药后）禁食但不禁水 12 h，样本采集当天首先称定小鼠体质量，小鼠 ip 3%戊巴比妥钠（45 mg/kg）麻醉，采血后脱颈椎处死小鼠，紧靠心脏处取下胸腺，胃后面取下脾脏，滤纸吸去血迹，分别称定质量。无菌条件下收集结肠中粪便并测量结肠长度，计算胸腺和脾脏指数。

胸腺（脾脏）指数＝胸腺（脾脏）质量/体质量

2.4 肠黏膜病理观察

取约 2 cm 长的结肠段固定在 4%甲醛溶液中，用石蜡包埋，切成 4 μm 切片，进行苏木素-伊红（HE）染色，于光学显微镜下观察肠黏膜病理变化，评估结肠的病理变化，同时测量隐窝深度。

2.5 ELISA 法测定结肠组织炎症因子水平

按照 ELISA 试剂盒说明书检测结肠组织中炎症因子 TNF-α、IL-6 和 IL-1β 水平。

2.6 比色法测定结肠组织氧化应激指标

按照试剂盒说明书检测结肠组织中 SOD、GSH-Px 活性和 MDA 水平。

2.7 肠道菌群测序

使用 QIAamp DNA 粪便 Mini Kit 从样品中提取微生物 DNA。用带条形码的特异引物（338F，806R）扩增细菌 16S rRNA 基因的区域（V3～4）。热循环包括以下条件：98 ℃、2 min（1 个循环）；95 ℃、30 s，50 ℃ 30 s，72 ℃、1 min（30 个循环）；最后在 72 ℃下延伸 5 min。PCR 产物的高通量测序在 Illumina MiSeq 平台上进行高质量的生物信息学分析读数，根据 UCLUST，基于 97%的序列相似性，每个样品的所有有效读数都被归类为可操作分类单元（operational taxonomic unit，OTU）。对于 α 多样性分析，将 OTU 划分为多个指标，包括 OTU 等级、稀释曲线以及 Shannon、Chao1、Simpson 和 ACE 的计算指标。对于 β 多样性分析，使用 QIIME 进行 RDA 识别的 OTU 热图、主成分分析（principal component analysis，PCA）、主坐标分析（principal coordinates analysis，PCoA）、非度量多维标度（non-metric multidimensional scaling，NMDS）和带算术平均值的非加权对组方法（unweighted-pair-group method with arithmetic averag，UPGMA）。进行线性判别分析效应大小（LEfSe）分析以定量分析各组之间的生物标志物。使用 LEfSe 分析，LDA 阈值＞4，非参数阶乘 Kruskal-Wallis（KW）和秩检验，然后（不成对的）Wilcoxon 秩和检验来识别差异最大的分类单元。

2.8 统计学分析

使用 SPSS 20 软件进行统计分析，所有数据均表示为 $\bar{x} \pm s$，多组间比较使用 ANOVA 方差分析。

3 结果

3.1 枳实总黄酮对肠黏膜炎小鼠腹泻相关指标的影响

如图 1 所示，对照组小鼠活动敏捷，体质量增加，饮食饮水正常，毛发光滑，无腹泻情况。模型组小鼠出现腹泻、扎堆、懒动、体质量减轻、饮食减少、饮水增加、翻毛和肛周污渍症状。各给药组小鼠体质量和饮食增加、饮水减少，第 12 天各给药

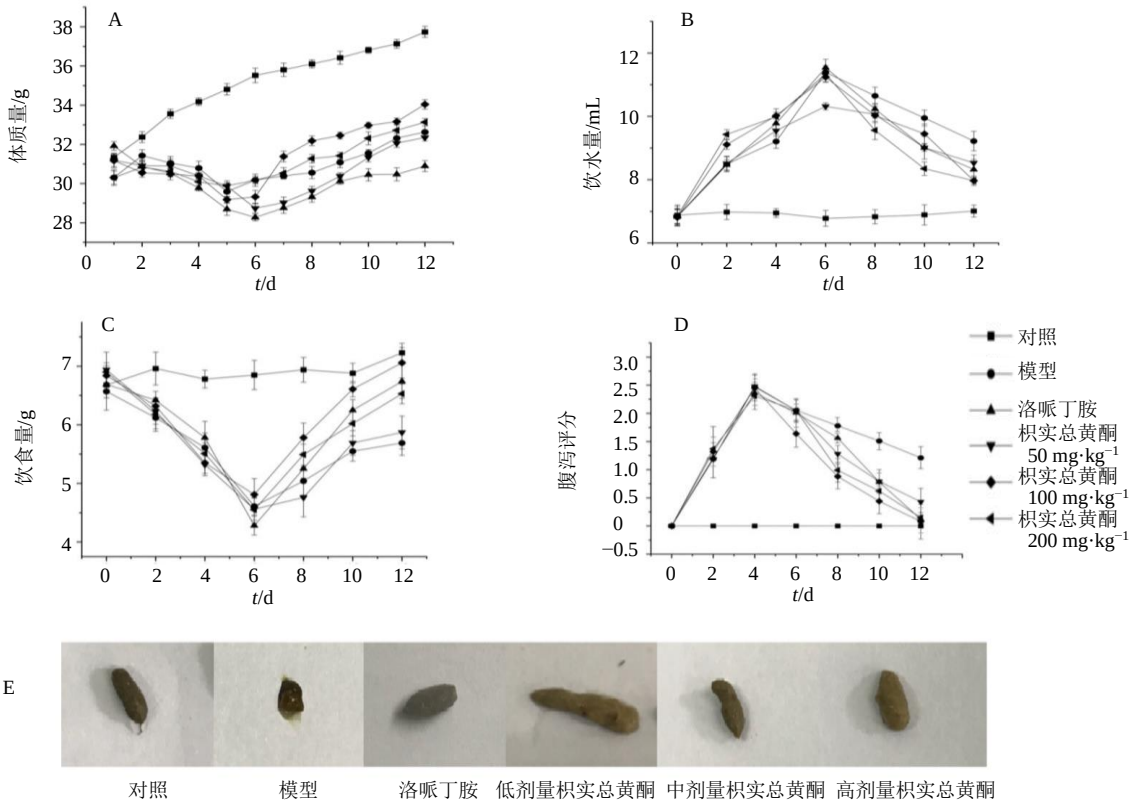


图 1 枳实总黄酮对肠黏膜炎小鼠体质量 (A)、饮水量 (B)、饮食量 (C)、腹泻评分 (D) 和粪便外观 (E) 的影响

Fig. 1 Effect of total flavonoids from *Aurantii Frutus Immaturus* on body weight (A), water intake (B), food consumption (C), diarrhea score (D) and fecal appearance (E) in mice with intestinal mucositis

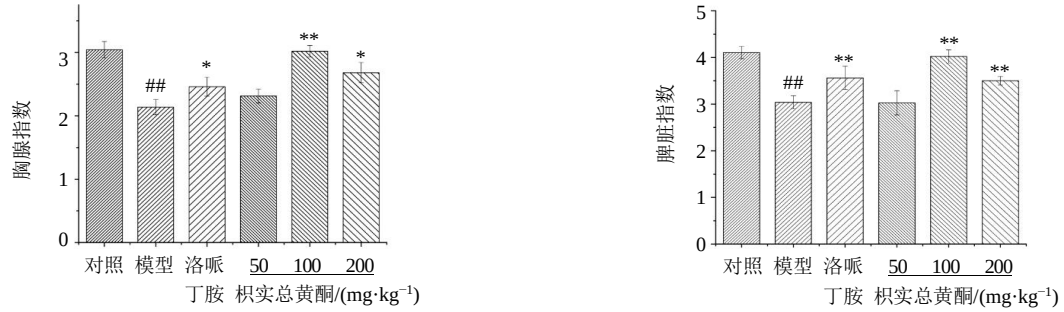
组腹泻评分接近正常，表明腹泻基本好转。第 12 天除模型组外，其余各组小鼠粪便基本正常，进一步说明枳实总黄酮明显改善了 5-FU 诱导的小鼠腹泻。

3.2 枳实总黄酮对肠黏膜炎小鼠胸腺指数和脾脏指数的影响

如图 2 所示，与对照组相比，模型组小鼠胸腺和脾脏指数显著降低（$P<0.01$）；与模型组比较，枳实总黄酮中、高剂量组和洛哌丁胺组小鼠胸腺和脾脏指数显著增加（$P<0.05$、0.01），表明枳实总黄酮可以使肠黏膜炎小鼠胸腺和脾脏指数恢复至正常水平。

3.3 枳实总黄酮对肠黏膜炎小鼠结肠形态和组织病理学的影响

如图 3-A、B 所示，与对照组相比，模型组小鼠结肠长度显著缩短（$P<0.01$）；与模型组相比，各给药组结肠长度显著增加（$P<0.05$、0.01）。如



与对照组比较：$^{\#}P<0.05$ $^{\#\#}P<0.01$；与模型组比较：$^{*}P<0.05$ $^{**}P<0.01$，下图同

$^{\#}P < 0.05$ $^{\#\#}P < 0.01$ *vs* control group; $^{*}P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$ *vs* model group, same as belows

图 2 枳实总黄酮对肠黏膜炎小鼠胸腺指数和脾脏指数的影响

Fig. 2 Effect of total flavonoids from *Aurantii Frutus Immaturus* on spleen index and thymus index in mice with intestinal mucositis

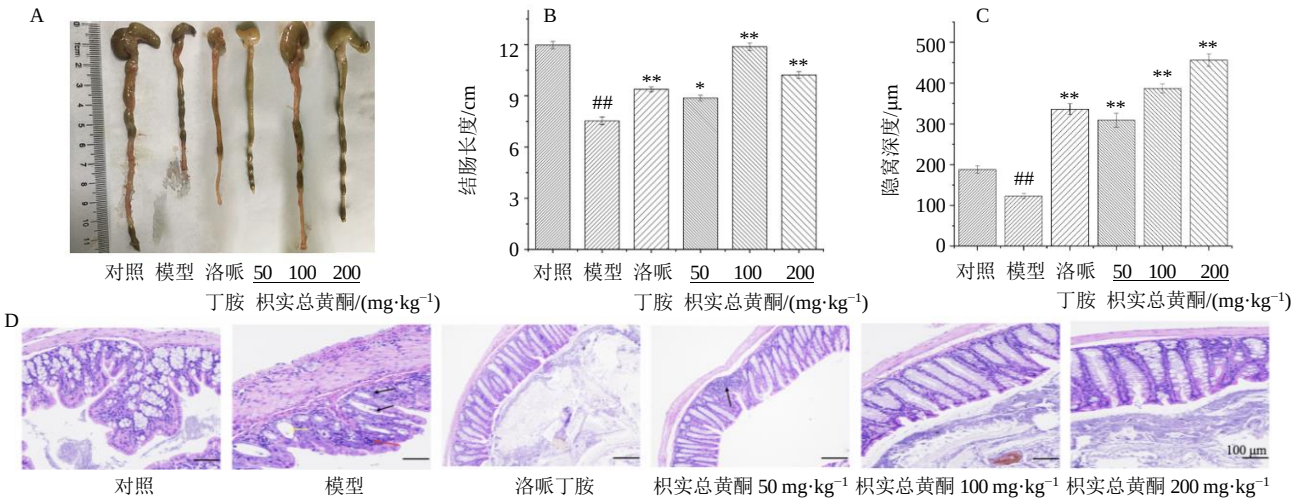


图 3　枳实总黄酮对肠黏膜炎小鼠结肠形态 (A)、结肠长度 (B)、隐窝深度 (C) 和结肠组织病理变化 (D) 的影响

Fig. 3　Effect of total flavonoids from *Aurantii Frutus Immaturus* on colonic morphology (A), colonic length (B), crypt depth (C) and pathological changes of colon tissue (D) in mice with intestinal mucositis

图 3-C 所示，模型组小鼠结肠组织隐窝深度显著降低（P＜0.01），各给药组隐窝深度明显恢复（P＜0.01），表明枳实总黄酮可以恢复肠黏膜炎小鼠结肠长度，增加隐窝深度。如图 3-D 所示，对照组小鼠基本没有出现炎性细胞浸润情况，隐窝结构保持完整且排列规则；模型组小鼠结肠组织中，上皮细胞坏死，隐窝结构被破坏，大量炎性细胞浸润到黏膜层；与模型组相比，各给药组肠上皮细胞、隐窝的形状和分布得以恢复，表明枳实总黄酮可以修复 5-FU 诱导的结肠黏膜损伤，减轻肠道炎症反应。

3.4　枳实总黄酮对肠黏膜炎小鼠结肠组织中炎症因子水平的影响

如图 4 所示，与对照组相比，模型组小鼠结肠组织中 TNF-α、IL-6 和 IL-1β 水平显著增加（P＜0.01）；与模型组相比，各给药组结肠组织中 TNF-α、IL-6 和 IL-1β 水平显著降低（P＜0.05、0.01），表明枳实总黄酮能够调节肠黏膜炎小鼠结肠组织中炎症因子水平。

3.5　枳实总黄酮对肠黏膜炎小鼠结肠组织中 SOD、GSH-Px 活性和 MDA 水平的影响

如图 5 所示，与对照组相比，各造模组小鼠结肠组织中 SOD 和 GSH-Px 活性显著降低（P＜0.01），MDA 水平显著增加（P＜0.01）；与模型组比较，洛哌丁胺组结肠组织中 GSH-Px 活性显著升高（P＜0.01），MDA 水平显著降低（P＜0.01）；枳实总黄酮各剂量组结肠组织中 SOD 和 GSH-Px 活性显著升高（P＜0.05、0.01），MDA 水平显著降低（P＜0.01），表明枳实总黄酮可以改善肠黏膜炎小鼠的氧化应激参数。

3.6　枳实总黄酮对肠黏膜炎小鼠肠道菌群整体结构的影响

如图 6-A 所示，每个样品的平均有效序列为 77 099 条，各组之间的 DNA 序列无显著差异。分析表明，尽管通过更高的测序覆盖率可以获得新的

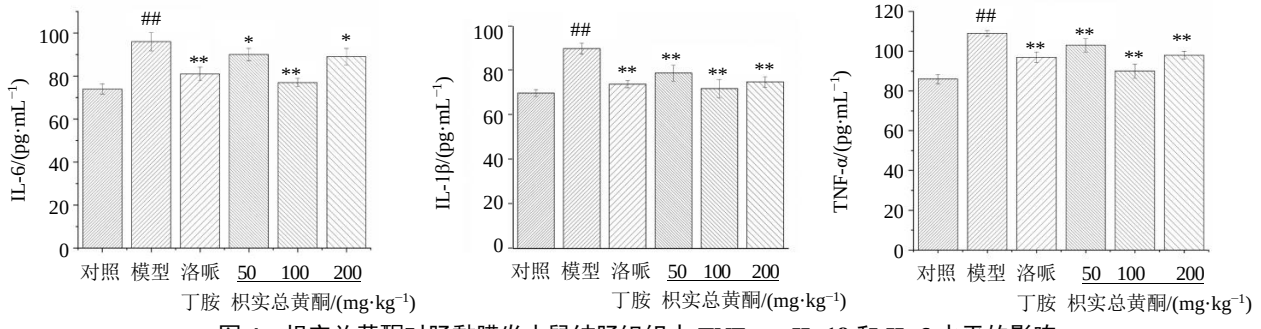


图 4　枳实总黄酮对肠黏膜炎小鼠结肠组织中 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 水平的影响

Fig. 4　Effect of total flavonoids from *Aurantii Frutus Immaturus* on TNF-α, IL-1β and IL-6 levels in colonic tissues of mice with intestinal mucositis

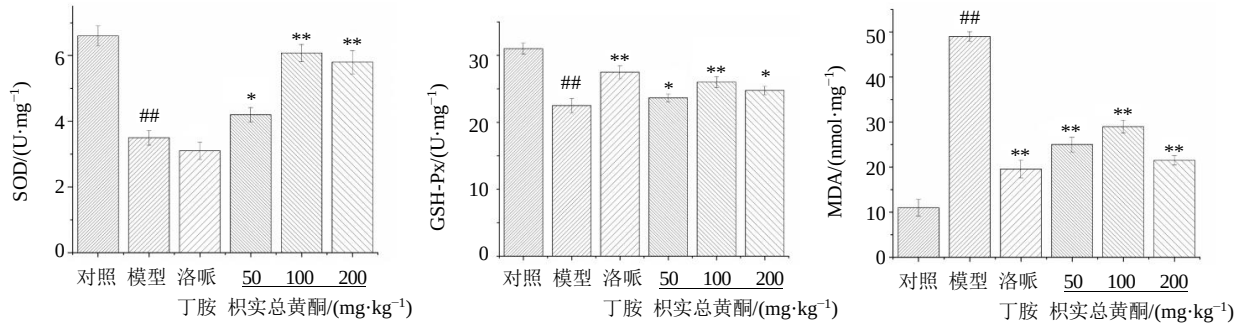
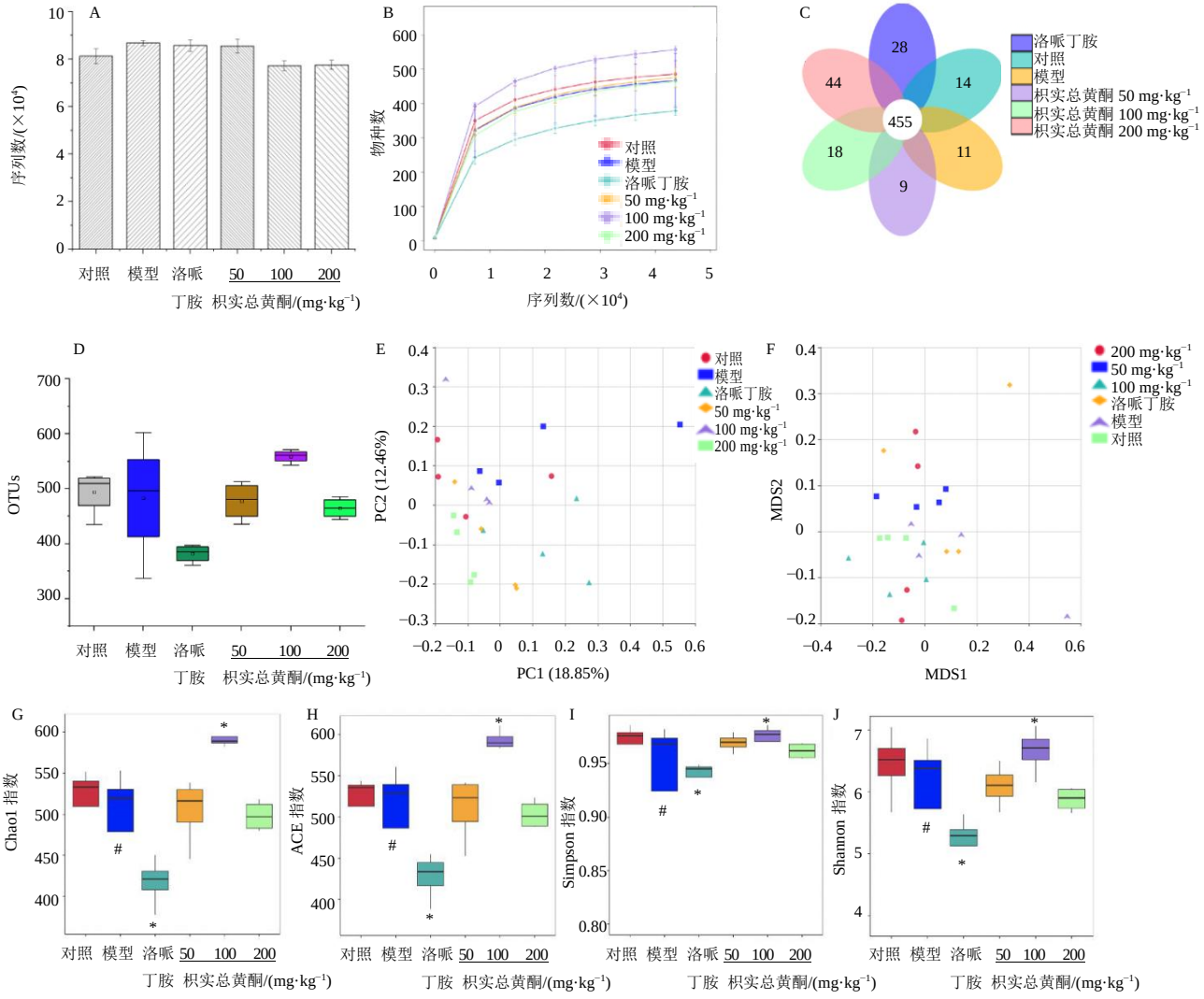


图 5 枳实总黄酮对肠黏膜炎小鼠结肠组织中 SOD、GSH-Px 活性和 MDA 水平的影响

Fig. 5 Effect of total flavonoids from *Aurantii Fructus Immaturus* on SOD, GSH-Px activities and MDA level in colonic tissues of mice with intestinal mucositis



A-每个粪便样品的质量序列均低于 97%一致性阈值 B-反光分析 C-OTU 维恩图 D-各组 OUT E-PCA 散点图 F-NMDS 散点图 G-Chao1 指数 H-ACE 指数 I-Simpson 指数 J-Shannon 指数

A-quality sequence of each stool sample which below the 97% consistency threshold B-reflective analysis C-Venn diagram of OUT D-OUT in each group E-PCA scatter plot F-NMDS scatter plot G-Chao1 index H-ACE index I-Simpson index J-Shannon index

图 6 枳实总黄酮对肠黏膜炎小鼠肠道菌群整体结构的影响

Fig. 6 Effect of total flavonoids from *Aurantii Fructus Immaturus* on overall structure of intestinal flora in mice with intestinal mucositis

系统，但每个样品中的肠道菌群多样性大都可以在当前测序深度下得到充分捕获（图 6-B）。Illumina Hiseg 测序系统产生了 929 个可操作分类单位，相似度截止为 97%。组间 OTU 重叠表明，6 组共有 455 个相同的 OTU，对照组、模型组、洛哌丁胺组以及枳实总黄酮低、中、高剂量组分别有 14、11、28、18、9、4 个独立的 OUT（图 6-C）。与对照组相比，模型组 OTU 数量略有减少；与模型组相比，枳实总黄酮中剂量组 OUT 数量明显增加，枳实总黄酮低、高剂量组对 OUT 数量没有产生影响（图 6-D）。OUT 数据表明，通过枳实总黄酮中剂量可以恢复肠道菌群的多样性。

为了阐明不同群体之间微生物群结构变化，进行 β 多样性分析包括 PCA 和 NMDS。如图 6-E 所示，PC1 和 PC2 变化的百分比分别为 18.85%和 12.46%，模型组与其他 5 组样本相距较远，枳实总黄酮各剂量组较洛哌丁胺组更接近对照组，NMDS 分析也观察到同样的结果（图 6-F）。如图 6-G～J 所示，与对照组比较，模型组小鼠 Chao1、ACE、Shannon 和 Simpson 指数显著降低（P＜0.05）；与模型组比较，枳实总黄酮中剂量组 Chao1、ACE、Shannon 和 Simpson 指数显著升高（P＜0.05），洛哌丁胺组 Chao1、ACE、Simpson 和 Shannon 指数显著降低（P＜0.05）。

综上，5-FU 通过减少微生物群落丰富度和多样性改变了肠道菌群的整体结构，枳实总黄酮中剂量有效地恢复了肠道菌群的整体结构，洛哌丁胺使肠道微生物的丰富性和多样性的降低，使得肠道菌群的整体结构进一步恶化。

3.7　枳实总黄酮对肠黏膜炎小鼠肠道菌群的影响

如图 7 所示，在门水平上，拟杆菌门、厚壁菌门和变形杆菌门是各组的主要菌门。拟杆菌门、厚壁菌门、变形杆菌门、unidentified_Bacteria 和放线菌门相对丰度分别为 58.31%、34.52%、1.45%、4.10%和 1.00%，占总丰度的 99.38%。与对照组比较，模型组拟杆菌门和变形杆菌门分别增加至 65.70%和 3.67%，厚壁菌门和放线菌门分别减少至 26.21%和 0.37%；洛哌丁胺组及枳实总黄酮低、中剂量组厚壁菌门相对丰度分别恢复到 31.70%、29.54%、37.86%。与对照组比较，模型组厚壁菌门/拟杆菌门（F/B）显著降低（P＜0.01）；与模型组比较，洛哌丁胺组及枳实总黄酮低、中剂量组 F/B 显著升高（P＜0.05、0.01）。

如图 8 所示，在属水平上，对照组拟杆菌属 *Bacteroides*、拟普雷沃菌属 *Alloprevotella*、乳酸杆菌属 *Lactobacillus*、unidentified_*Clostridiales*、*Allistipes*、unidentified_*Ruminococcaceae*、副拟杆菌属 *Parabacteroides*、幽门螺杆菌属 *Helicobacter*、*Romboutsia* 相对丰度分别为 10.47%、10.56%、7.03%、0.32%、2.50%、2.64%、2.12%、3.65%、0.07%，占总丰度的 39%以上；与对照组相比，模型组拟杆菌属、unidentified_*Clostridiales*、*Romboutsia* 相对丰度分别增加到 32.7%、1.69%、0.56%，拟普雷沃菌属、乳酸杆菌属、*Allistipes*、unidentified_*Ruminococcaceae* 相对丰度分别降低到 5.33%、6.07%、0.90%、0.96%。与模型组相比，各给药组拟杆菌属相对丰度降低，枳实总黄酮低、中剂量组 unidentified_*Clostridiales* 相对丰度降低；阳性药组和枳实总黄酮高剂量组拟普雷沃菌属相对丰度增加，枳实总黄酮高剂量组的乳酸杆菌属相对丰度升高。表明 5-FU 导致了明显的肠道菌群失调，枳实总黄酮可以有效地改善肠道菌群失调情况。

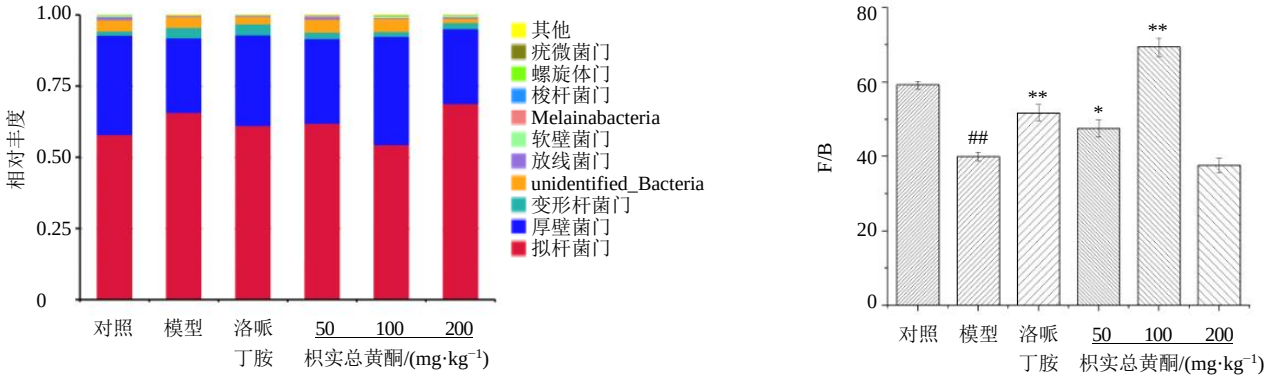


图 7　枳实总黄酮对肠黏膜炎小鼠肠道菌群门水平相对丰度的影响

Fig. 7　Effect of total flavonoids from *Aurantii Frutus Immaturus* on relative abundance of intestinal flora at phylum level in mice with intestinal mucositis

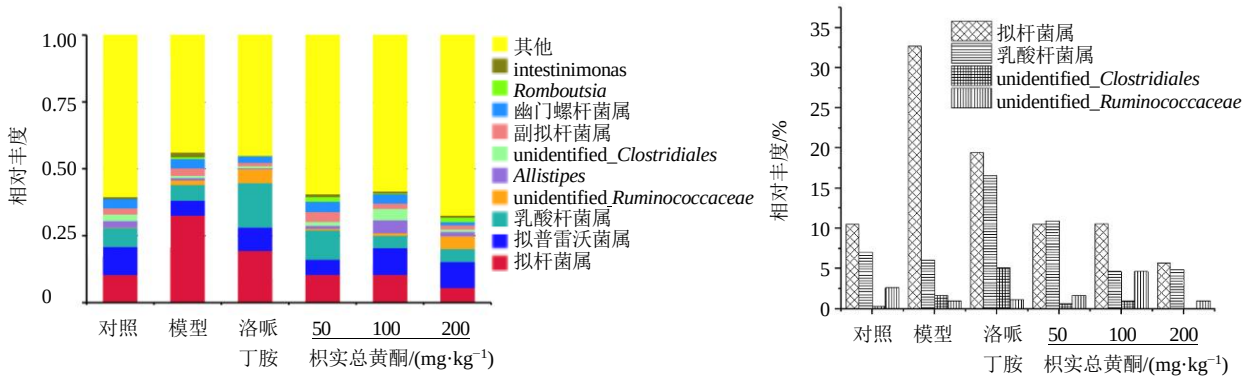


图 8　枳实总黄酮对肠黏膜炎小鼠肠道菌群属水平相对丰度的影响

Fig. 8　Effects of total flavonoids from *Aurantii Frutus Immaturus* on relative abundance of intestinal flora at genus level in mice with intestinal mucositis

4　讨论

本研究结果表明，小鼠给予 5-FU 后，体质量严重降低，腹泻、饮食减少，饮水增加，皮毛松弛，懒动；枳实总黄酮可显著改善肠黏膜炎小鼠的一般状态，表明枳实总黄酮可以改善 5-FU 引起的不良反应[29]；枳实总黄酮可以恢复肠黏膜炎小鼠的结肠长度，改善隐窝萎缩，抑制炎症因子水平，表明枳实总黄酮对结肠形态和黏膜具有保护作用；枳实总黄酮能够通过改善胸腺指数和脾脏指数恢复了肠黏膜炎小鼠受损的免疫功能。综上所述，枳实总黄酮可有效减轻 5-FU 引起的肠道不良反应，与文献报道一致[30-31]。

ROS、DNA、蛋白质和细胞膜相互作用以调节信号通路，通过产生促炎细胞因子导致组织破坏和炎症反应。5-FU 通过抑制内源性抗氧化剂（如 SOD、过氧化氢酶、GSH、GSH-Px）活性及升高 MDA 和促炎细胞因子（包括 TNF-α、IL-1β、IL-6）水平，诱导肠黏膜炎[32]。本研究发现，小鼠给予 5-FU 后，结肠组织中 SOD 和 GSH-Px 活性降低，MDA、TNF-α、IL-1β 和 IL-6 水平升高；枳实总黄酮能够提高 SOD 和 GSH-Px 活性，抑制 MDA、TNF-α、IL-1β、IL-6 水平。因此，枳实总黄酮能够通过抗氧化和抗炎来治疗 5-FU 诱导的肠黏膜炎。

5-FU 干扰肠道微生物群落。通过 16S rDNA 扩增测序技术分析了各组小鼠粪便样本中的微生物群。结果表明，5-FU 造模后小鼠肠道菌群的丰富度和多样性显著降低，从而肠道菌群的整体结构发生改变；枳实总黄酮中剂量组通过增加丰富度和多样性将肠道微生物群的整体结构调节到正常水平。

在门水平上，模型组小鼠肠道厚壁菌门相对丰度降低，拟杆菌门和变形杆菌门相对丰度增加，F/B 降低；枳实总黄酮使肠道厚壁菌门相对丰度增加，拟杆菌门和变形杆菌门相对丰度降低，从而提高 F/B。由于厚壁菌和变形杆菌是粪便相关菌，而拟杆菌被认为是黏膜相关菌，它们的丰度变化最有可能引发细菌感染和胃肠道疾病如腹泻和肠炎[33]。F/B 是评估肠易激综合征[34]、炎症性肠病[35]和代谢紊乱[36]等肠病患者的常用指标。

在属水平上，模型组小鼠肠道拟杆菌属、unidentified_*Clostridiales* 和 *Romboutsia* 相对丰度显著增加，而拟普雷沃菌属、乳酸杆菌属、*Alistipes* 和 unidentified_*Ruminococcaceae* 相对丰度显著降低。拟杆菌是与 5-FU 治疗相关的重要病原菌之一，一些梭状芽孢杆菌如肉毒梭菌，由于产生外毒素而被认为是致病菌。益生菌乳杆菌可以改善 5-FU 引起的肠道损伤和生态失调[37]。瘤胃球菌通过产生丁酸盐为肠上皮细胞提供必需的能量，以提高肠道免疫力[38]。枳实总黄酮能够抑制潜在致病菌并促进了粪便中的益生菌，从而改善 5-FU 诱导的肠道微生物群失调。

枳实总黄酮的黏膜保护作用、枳实总黄酮中活性成分与肠道微生物群之间的具体关系仍待进一步确定。一是粪便群落不能完全代表生活在肠道中的细菌群落[39]；二是当枳实总黄酮调节肠道微生物群的整体结构时，其黏膜保护作用和成分可能会受到肠道微生物代谢和药动学的影响[40]。例如，在枳实总黄酮中分别占 15.45%、39.19%的柚皮苷和橙皮苷对人体肠道微生物群（半乳糖拟杆菌、乳酸杆菌、肠球菌、链状双歧杆菌、布氏瘤胃球菌、大肠杆菌）没有表现出体外抑制活性，但苷元缺表现出体外抑

制活性[41]。因此，枳实总黄酮活性成分和肠道微生物群变异之间关系的系统和全面解释将是本课题组后续研究的重点。

综上所述，枳实总黄酮可以通过抑制氧化应激、抑制促炎细胞因子分泌并调节肠道微生物群的整体结构和组成，有效减轻 5-FU 诱导的肠黏膜炎。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Ducreux M, Bennouna J, Hebbar M, *et al*. Capecitabine plus oxaliplatin (XELOX) versus 5-fluorouracil/ leucovorin plus oxaliplatin (FOLFOX-6) as first-line treatment for metastatic colorectal cancer [J]. *Int J Cancer*, 2011, 128(3): 682-690.

[2] 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.

[3] Miura K, Kinouchi M, Ishida K, *et al*. 5-Fu metabolism in cancer and orally-administrable 5-fu drugs [J]. *Cancers* (Basel), 2010, 2(3): 1717-1730.

[4] 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.

[5] Daniele B, Secondulfo M, De Vivo R, *et al*. Effect of chemotherapy with 5-fluorouracil on intestinal permeability and absorption in patients with advanced colorectal cancer [J]. *J Clin Gastroenterol*, 2001, 32(3): 228-230.

[6] dos Santos Filho E X, Ávila P H M, Bastos C C C, *et al*. Curcuminoids from *Curcuma* longa L. reduced intestinal mucositis induced by 5-fluorouracil in mice: Bioadhesive, proliferative, anti-inflammatory and antioxidant effects [J]. *Toxicol Rep*, 2016, 3: 55-62.

[7] Sonis S T, Elting L S, Keefe D, *et al*. Perspectives on cancer therapy-induced mucosal injury: Pathogenesis, measurement, epidemiology, and consequences for patients [J]. *Cancer*, 2004, 100(9 Suppl): 1995-2025.

[8] Lee C S, Ryan E J, Doherty G A. Gastro-intestinal toxicity of chemotherapeutics in colorectal cancer: The role of inflammation [J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(14): 3751-3761.

[9] 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.

[10] Von Bültzingslöwen I, Adlerberth I, Wold A E, *et al*. Oral and intestinal microflora in 5-fluorouracil treated rats, translocation to cervical and mesenteric lymph nodes and effects of probiotic bacteria [J]. *Oral Microbiol Immunol*, 2003, 18(5): 278-284.

[11] van Vliet M J, Harmsen H J, de Bont E S, *et al*. The role of intestinal microbiota in the development and severity of chemotherapy-induced mucositis [J]. *PLoS Pathog*, 2010, 6(5): e1000879.

[12] Iacovelli R, Pietrantonio F, Palazzo A, *et al*. Incidence and relative risk of grade 3 and 4 diarrhoea in patients treated with capecitabine or 5-fluorouracil: A meta-analysis of published trials [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2014, 78(6): 1228-1237.

[13] Stein A, Voigt W, Jordan K. Review: Chemotherapy-induced diarrhea: Pathophysiology, frequency and guideline-based management [J]. *Ther Adv Med Oncol*, 2010, 2(1): 51-63.

[14] Benson A B, Ajani J A, Catalano R B, *et al*. Recommended guidelines for the treatment of cancer treatment-induced diarrhea [J]. *J Clin Oncol*, 2004, 22(14): 2918-2926.

[15] Gibson R J, Keefe D M K, Lalla R V, *et al*. Systematic review of agents for the management of gastrointestinal mucositis in cancer patients [J]. *Support Care Cancer*, 2013, 21(1): 313-326.

[16] 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.

[17] Liu W Y, Zhou C, Yan C M, *et al*. Characterization and simultaneous quantification of multiple constituents in *Aurantii Fructus Immaturus* extracts by HPLC-DAD-ESI-MS/MS [J]. *Chin J Nat Med*, 2012, 10(6): 456-463.

[18] 张霄潇, 李正勇, 马玉玲, 等. 中药枳实的研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(2): 185-190.

[19] Viuda-Martos M, Ruiz-Navajas Y, Fernández-López J, *et al*. Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils [J]. *Food Control*, 2008, 19(12): 1130-1138.

[20] de Moraes Pultrini A, Almeida Galindo L, Costa M. Effects of the essential oil from *Citrus aurantium* L. in experimental anxiety models in mice [J]. *Life Sci*, 2006, 78(15): 1720-1725.

[21] Zarrad K, Hamouda A B, Chaieb I, *et al*. Chemical composition, fumigant and anti-acetylcholinesterase activity of the Tunisian *Citrus aurantium* L. essential oils [J]. *Ind Crop Prod*, 2015, 76: 121-127.

[22] Fugh-Berman A, Myers A. *Citrus aurantium*, an ingredient of dietary supplements marketed for weight loss: Current status of clinical and basic research [J]. *Exp Biol Med* (Maywood), 2004, 229(8): 698-704.

[23] Yu J, Wang L, Walzem R L, *et al*. Antioxidant activity of *Citrus* limonoids, flavonoids, and coumarins [J]. *J Agric Food Chem*, 2005, 53(6): 2009-2014.

[24] Manthey J A, Guthrie N. Antiproliferative activities of *Citrus* flavonoids against six human cancer cell lines [J]. *J Agric Food Chem*, 2002, 50(21): 5837-5843.

[25] Kim J A, Park H S, Kang S R, *et al*. Suppressive effect of flavonoids from Korean *Citrus aurantium* L. on the expression of inflammatory mediators in L6 skeletal muscle cells [J]. *Phytother Res*, 2012, 26(12): 1904-1912.

[26] Takase H, Yamamoto K, Hirano H, *et al*. Pharmacological profile of gastric mucosal protection by marmin and nobiletin from a traditional herbal medicine, Aurantii fructus immaturus [J]. *Jpn J Pharmacol*, 1994, 66(1): 139-147.

[27] Tan W, Li Y, Wang Y, *et al*. Anti-coagulative and gastrointestinal motility regulative activities of *Fructus Aurantii Immaturus* and its effective fractions [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 90: 244-252.

[28] Nakajima A, Yamakuni T, Haraguchi M, *et al*. Nobiletin, a *Citrus* flavonoid that improves memory impairment, rescues bulbectomy-induced cholinergic neurodegeneration in mice [J]. *J Pharmacol Sci*, 2007, 105(1): 122-126.

[29] Atiq A, Shal B, Naveed M, *et al*. Diadzein ameliorates 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis by suppressing oxidative stress and inflammatory mediators in rodents [J]. *Eur J Pharmacol*, 2019, 843: 292-306.

[30] Wang J, Feng W, Zhang S, *et al*. Ameliorative effect of *Atractylodes macrocephala* essential oil combined with *Panax ginseng* total saponins on 5-fluorouracil induced diarrhea is associated with gut microbial modulation [J]. *J Ethnopharmacol*, 2019, 238: 111887.

[31] Wang J, Feng W, Zhang S, *et al*. Gut microbial modulation in the treatment of chemotherapy-induced diarrhea with Shenzhu Capsule [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2019, 19(1): 126.

[32] Ali J, Khan A U, Shah F A, *et al*. Mucoprotective effects of saikosaponin-A in 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in mice model [J]. *Life Sci*, 2019, 239: 116888.

[33] Rangel I, Sundin J, Fuentes S, *et al*. The relationship between faecal-associated and mucosal-associated microbiota in irritable bowel syndrome patients and healthy subjects [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2015, 42(10): 1211-1221.

[34] Louis S, Tappu R M, Damms-Machado A, *et al*. Characterization of the gut microbial community of obese patients following a weight-loss intervention using whole metagenome shotgun sequencing [J]. *PLoS One*, 2016, 11(2): e0149564.

[35] Rojas-Feria M, Romero-García T, Fernández Caballero-Rico J Á, *et al*. Modulation of faecal metagenome in Crohn's disease: Role of microRNAs as biomarkers [J]. *World J Gastroenterol*, 2018, 24(46): 5223-5233.

[36] Yakoob J, Abbas Z. Role of Omega-3 fatty acids in irritable bowel syndrome (IBS) [J]. *Int J Pharmacol Res*, 2016, 6(8): 271-277.

[37] Tang Y, Wu Y, Huang Z, *et al*. Administration of probiotic mixture DM#1 ameliorated 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis and dysbiosis in rats [J]. *Nutrition*, 2017, 33: 96-104.

[38] Leonel A J, Alvarez-Leite J I. Butyrate: Implications for intestinal function [J]. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2012, 15(5): 474-479.

[39] Liu S, da Cunha A P, Rezende R M, *et al*. The host shapes the gut microbiota via fecal MicroRNA [J]. *Cell Host Microbe*, 2016, 19(1): 32-43.

[40] Feng W, Ao H, Peng C, *et al*. Gut microbiota, a new frontier to understand traditional Chinese medicines [J]. *Pharmacol Res*, 2019, 142: 176-191.

[41] Duda-Chodak A. The inhibitory effect of polyphenols on human gut microbiota [J]. *J Physiol Pharmacol*, 2012, 63(5): 497-503.

[责任编辑　李亚楠]