

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2024.16.011

实验研究

清化益肠方对急性放射性肠损伤模型小鼠肠组织 NLRP3 炎症小体的影响

秦媛媛^{1,2}, 朱玲艳¹, 李黎^{1,2}, 储博文^{3,4}, 姜泽群⁵, 吴勉华^{1,2}✉

1. 南京中医药大学第一临床医学院, 江苏省南京市栖霞区仙林大道 138 号, 210023; 2. 南京中医药大学江苏省中医药防治肿瘤协同创新中心; 3. 中国医学科学院国家癌症中心; 4. 皖南医学院; 5. 南京中医药大学医学院

[摘要] **目的** 基于 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (NLRP3) 炎症小体探讨清化益肠方对急性放射性肠损伤模型小鼠的作用及可能分子机制。**方法** 60 只 C57BL/6J 小鼠随机分为对照组、模型组、造模前给药组、造模后给药组、抑制剂组、中药联合抑制剂组, 每组 10 只。除对照组外, 其余 5 组小鼠均采用单次全剂量照射构建小鼠急性放射性肠损伤模型。造模前给药组、中药联合抑制剂组造模前 7 天连续给予浓度为 4 g/ml 清化益肠方水煎液灌胃, 每次 0.2 ml, 每日 1 次。造模后给药组、造模前给药组和中药联合抑制剂组造模后连续给予 4 g/ml 清化益肠方水煎液灌胃 14 天; 对照组、模型组和抑制剂组给予 0.2 ml 生理盐水灌胃, 每日 1 次, 连续 14 天。自照射后 2 h 起, 抑制剂组和中药联合抑制剂组予 NLRP3 抑制剂 MCC950 (浓度为 10 mg/kg) 腹腔注射 0.2 ml, 隔日 1 次, 共 7 次。HE 染色观察肠组织病理改变, Western Blot 法及 RT-qPCR 法检测肠组织 NLRP3 蛋白及 mRNA 表达水平, 免疫组织化学法检测肠组织 NLRP3、Caspase-1、GSDMD 蛋白表达水平; 流式细胞术检测小鼠脾脏 CD4⁺、CD8⁺T 细胞比例; ELISA 法测定小鼠血清 γ 干扰素 (IFN- γ)、白细胞介素 18 (IL-18)、白细胞介素 1 β (IL-1 β) 含量。**结果** HE 染色结果显示, 对照组小鼠肠组织无病变; 模型组小鼠肠绒毛长度减短、黏膜层变薄, 固有层多灶性黏膜坏死, 局部伴有中性粒细胞浸润; 各药物干预组小鼠肠组织病理损伤有不同程度的改善, 其中中药联合抑制剂组改善程度最明显。与对照组比较, 模型组小鼠肠组织中 NLRP3 蛋白及 mRNA 表达水平升高, 肠组织 NLRP3、Caspase-1、GSDMD 蛋白表达增加, 脾脏 CD4⁺T 细胞比例上升、CD8⁺T 细胞比例下降, 血清 IFN- γ 、IL-18、IL-1 β 含量升高 ($P<0.05$)。与模型组比较, 其余各给药组上述各指标均有所改善 ($P<0.05$)。造模前给药组 NLRP3、Caspase-1、GSDMD 蛋白较造模后给药组降低 ($P<0.05$); 中药联合抑制剂组 NLRP3 mRNA 水平较抑制剂组降低 ($P<0.05$)。**结论** 清化益肠方可能是通过抑制 NLRP3 炎症小体发挥防治急性肠损伤的作用。

[关键词] 放射性肠损伤; 清化益肠方; NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3; 炎症小体

放射性肠损伤又称放射性肠炎, 是腹部及盆腔恶性肿瘤放射治疗后常见的肠道并发症, 主要累及小肠、结肠及直肠^[1], 为临床上最常见的放射性损伤之一。目前, 现代医学对于急性放射性肠损伤的

治疗多以抗生素及糖皮质激素对症治疗为主, 总体疗效不理想且极易复发^[2-3]。近年来, 中医药凭借其临床疗效佳、不良反应少、安全性高的优势, 在急性放射性肠损伤的治疗方面取得了较大进展^[4-5]。本团队认为, 急性放射性肠损伤病位在肠, 涉及脾胃, 病理因素主要有虚、湿、瘀、热、毒等, 治当益气养阴、凉血散瘀、清肠化湿^[6], 将“瘀热”理论与多年临床经验相结合, 提出经验效方清化益肠方, 在临床上应用于急性放射性肠损伤的防治取得了较好的疗效^[7], 但其具体作用机制尚不明确。

基金项目: 国家中医药管理局第七批全国老中医药专家学术经验继承工作项目(国中医药人教函[2022]76号); 全国名老中医药专家传承工作室(国中医药人教函[2022]75号); 第二届全国名中医传承工作室(国中医药办人教函[2022]245号); 江苏省名老中医药专家传承工作室(苏中医科教[2021]7号); 江苏省研究生科研与实践创新计划(SJCX23_0875)

✉ 通讯作者: wmh7001@163.com

NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3, NLRP3) 是一种能够激活强效炎症介质的胞质超分子复合物, 能够驱动焦亡的发生^[8]。既往研究表明, NLRP3 炎症小体的激活参与了急性放射性肠损伤的发生与发展^[9]。本研究以 NLRP3 炎症小体为核心切入点, 旨在探讨清化益肠方减轻急性放射性肠损伤的可能作用机制, 为其临床应用提供依据。本实验经南京中医药大学动物伦理委员会批准 (批准号: 202210A008)。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠 60 只, 6~8 周龄, 体重 18~22 g, 购于杭州医学院, 实验动物生产许可证编号: SCXK (浙) 2019-0002, 实验动物使用许可证号: SYXK (苏) 2018-0049。饲养于南京中医药大学实验动物中心, 每 12 h 进行一次明暗循环, 温度 (24±2) °C, 湿度 (55±5) %, 自由获取食物及清洁饮用水。

1.2 药物

清化益肠方组成: 炙黄芪 15 g、麸炒白术 12 g、地榆 12 g、石斛 12 g、红藤 12 g、薏苡仁 12 g、煨木香 6 g、甘草 6 g。药物购于江苏省中医院, 中药饮片按照比例放入煎药锅中, 加入全药材重量 10 倍量的纯水, 浸泡 60 min, 武火煮沸后改用文火煎煮 30 min, 趁热滤取煎液, 再加全药材重量 8 倍量的纯水, 武火煮沸后改用文火煎煮 20 min, 过滤回收煎液, 合并 2 次水煎液, 将其置于旋转蒸发仪中减压浓缩为含生药量为 4 g/ml 的中药浓缩液。NLRP3 炎症小体抑制剂 MCC950, 购自美国 Selleck 公司, 货号 S7809。

1.3 主要试剂及仪器

1. 25% 即用型三溴乙醇无菌溶液 (南京爱贝生物科技有限公司, 货号 M2910); 4% 多聚甲醛、红细胞裂解液 (北京兰杰柯科技有限公司, 货号 BL539A、BL503B); 苏木素-伊红 (HE) 高清恒染试剂盒 (武汉赛维尔生物科技有限公司, 货号 G1076); DAB 染色液 (湖南艾方生物科技有限公司, 货号 AFIHC0); EDTA 抗原修复液、柠檬酸抗原修复液 (北京索莱宝科技有限公司, 货号 C1033、C1038); 苏木素染色液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、RIPA 裂解液、一抗稀释液、BSA (上海碧云天生物技术有限公司, 货号 C0107、P0010、

P0013B、P0256、ST025); 10%PAGE 凝胶快速制备试剂盒、磷酸酶抑制剂混合物、蛋白酶抑制剂 [翌圣生物科技 (上海) 股份有限公司, 货号 20325ES62、20109ES05、20124ES03]; TRIzol (美国 Invitrogen 公司, 货号 15596018CN); 逆转录试剂盒、SYBR Green 预混液 (美国 ThermoFisher 公司, 货号 K1622、A25743); 脱脂奶粉 (德国 BioFroxx 公司, 货号 1172GR500); 蛋白上样缓冲液 (上海雅酶生物医药科技有限公司, 货号 LT101S); NLRP3 抗体 (美国 CST 公司, 货号 #15101); 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 1 (Caspase-1)、消皮素 D (GSDMD)、actin 抗体 (美国 Abcam 公司, 货号 ab138483、219800、197345); HRP 结合山羊抗兔 IgG 抗体 (武汉三鹰生物技术有限公司, 货号 PR30011); 异硫氰酸荧光素 (FITC) CD3 抗体、藻红蛋白 (PE) CD4 抗体、别藻蓝蛋白 (APC) CD8 抗体 (美国 Biolegend 公司, 货号 17A2、GK1.5、16-10A1); γ 干扰素 (IFN- γ)、白细胞介素 18 (IL-18)、白细胞介素 1 β (IL-1 β) ELISA 检测试剂盒 (杭州联科生物技术股份有限公司, 货号 EK280、EK218、EK201B)。

AE41 型光学显微镜, 麦克奥迪实业集团有限公司; Centrifuge 5427R、5810R 型冷冻高速离心机, 德国 Eppendorf 公司; Spark10M 型多功能酶标仪, 瑞士 TECAN 公司; Chemidoc MP 型多功能凝胶成像分析系统, 美国 Bio-Rad 公司; Veriti、Quant-Studio5 型 PCR 仪器, 美国 Applied biosystems 公司; cytoflex 型流式细胞仪, 美国贝克曼库尔特有限公司。

1.4 动物分组、造模及给药

小鼠适应性饲养 1 周后开始实验。60 只小鼠按体重采用分层随机抽样法分为对照组、模型组、造模前给药组、造模后给药组、抑制剂组、中药联合抑制剂组, 每组 10 只。除对照组外, 其余各组小鼠先予 1.25% 三溴乙醇按 0.2 ml/10 g 腹腔注射麻醉, 麻醉成功后将小鼠以仰卧体位置于治疗床上, 按照课题组前期研究^[7]予 15Gy、6MV X 射线的单次全剂量照射构建小鼠急性放射性肠损伤模型。照射后第 7 天小鼠肠道 HE 切片出现中性粒细胞浸润、肠腺结构消失等炎性病理改变则证明造模成功^[7]。

造模前给药组、中药联合抑制剂组造模前 7 天连续给予浓度为 4 g/ml 清化益肠方水煎液灌胃, 每次 0.2 ml, 每日 1 次。造模后给药组、造模前给药组和中药联合抑制剂组造模后连续给予浓度为 4 g/ml 清化益肠方水煎液灌胃 14 天, 每次 0.2 ml, 每日 1

次, 药物剂量根据人与动物体表面积折算^[10]; 对照组、模型组和抑制剂组给予 0.2 ml 生理盐水灌胃, 每日 1 次, 连续 14 天。自照射后 2 h 起, 抑制剂组和中药联合抑制剂组予 NLRP3 抑制剂 MCC950 (浓度为 10 mg/kg) 腹腔注射 0.2 ml, 隔日 1 次, 共 7 次。灌胃期间, 小鼠允许自由进食及饮水, 每日称取并记录小鼠体质量变化。

1.5 观察指标及方法

干预后第 15 天予腹腔注射 1.25% 三溴乙醇 (0.2 ml/10 g) 麻醉后行小鼠眼底静脉取血, 并开腹剥取全部肠组织、脾脏组织, 将回盲瓣上 2 cm 肠段放入 4% 多聚甲醛中固定, 其余放入冷冻管, 液氮快速冷冻后 -80 ℃ 保存备用。小鼠血液室温静置 1 h 后, 4 ℃、3000 r/min 离心 15 min (离心半径 6.5 cm), 分离上层血清 -80 ℃ 保存备用。

1.5.1 肠组织病理分析 采用随机数字表法各组选取 5 只小鼠回盲瓣上 2 cm 肠组织经固定、包埋、切片后, 经 HE 染色, 采用树胶封片, 光学显微镜下采集图片。

1.5.2 RT-qPCR 法检测肠组织 NLRP3 mRNA 表达 各组剩余 5 只小鼠肠组织采用随机数字表法选取 3 只用于 mRNA、蛋白检测。称取 40 mg 肠组织, 加入 1 ml TRIzol 试剂提取总 RNA, 使用 NanoDrop 设备检测浓度, 随后进行逆转录得到 cDNA, 使用 SYBR Green 荧光染料按照说明书的反应体系进行扩增, $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析结果, 引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。NLRP3: 上游 CCA-GACCTCCAAGACCACTACG, 下游 CAGAGAAGA-GATGCTCCTCAATGC, 产物长度 92 bp; β -actin: 上游 ACTGCCGCATCCTCTTCCTC, 下游 AACCGC-TCGTTGCCAATAGTG, 产物长度 80 bp。

1.5.3 Western Blot 法检测肠组织 NLRP3 蛋白表达 称取 40 mg 小鼠肠组织匀浆提取蛋白, BCA 法测定蛋白浓度, 变性后的蛋白样本经电泳、转膜、封闭后, NLRP3 (1:1000) 及 β -actin (1:2000) 抗体 4 ℃ 孵育过夜, 兔二抗 (1:10 000) 室温孵育 60 min 后显影成像, Image 1.51 软件进行定量分析。

1.5.4 免疫组织化学法检测肠组织 NLRP3、Caspase-1、GSDMD 蛋白表达 将肠组织切片脱蜡水化, 随后进行抗原修复、DNA 变性、阻断内源性过氧化物酶、血清封闭、与 NLRP3 (1:200)、Caspase-1 (1:500) 及 GSDMD (1:500) 湿盒 4 ℃ 孵育过夜、二抗室温避光孵育 30 min、DAB 显色、苏木素复染细胞核, 再采用树胶封片, 光学显微镜

下采集图片, ImageJ 1.51 软件量化分析。

1.5.5 脾脏 CD4⁺、CD8⁺T 细胞检测 采用随机数字表法各组选取 3 只小鼠脾脏组织, 制备小鼠脾脏组织单细胞悬液, 加入 2 ml 红细胞裂解液重悬沉淀, 室温作用 5 min, PBS 重悬/洗涤 2 次后加入 FITC CD3、PE CD4 及 APC CD8 抗体进行细胞染色, 4 ℃ 避光 30 min, PBS 清洗后重悬细胞, 使用流式细胞仪检测 CD4⁺T 及 CD8⁺T 细胞水平。

1.5.6 ELISA 法测定小鼠血清 IFN- γ 、IL-18、IL-1 β 含量 采用随机数字表法各组选取 3 只小鼠血清, 按照试剂盒说明书检测小鼠血清中 IFN- γ 、IL-18、IL-1 β 含量, 使用酶标仪依序读取 450 nm 波长处各孔的吸光度。

1.6 统计学处理

使用 SPSS 25.0 软件进行处理与分析。计量资料均符合正态分布以均数标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组内比较采用配对 *t* 检验, 组间比较采用独立样本 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析。所有统计为双侧检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

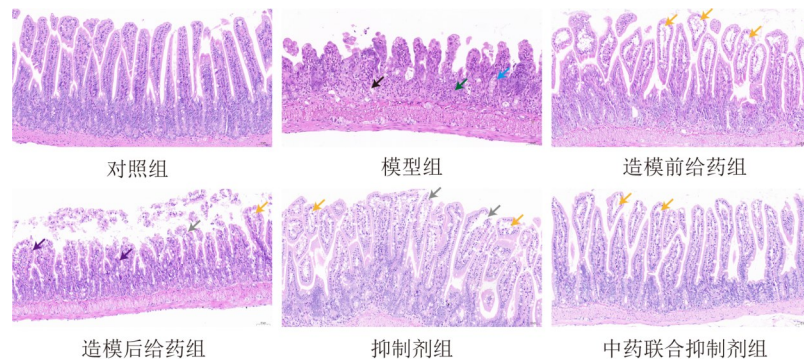
2 结果

2.1 各组小鼠肠组织病理结果比较

HE 染色结果 (图 1) 示, 对照组小鼠肠绒毛上皮完整、数量丰富, 固有层肠腺呈短管状, 排列密集, 肌层完整, 无明显的坏死及炎性细胞浸润。模型组小鼠肠绒毛长度缩短、黏膜层变薄, 固有层多灶性黏膜坏死、肠腺结构消失, 杯状细胞减少, 增生修复的结缔组织替代原有的肠腺, 局部伴有中性粒细胞浸润。与模型组比较, 各药物干预组小鼠肠绒毛黏膜上皮、固有层肠腺、局部坏死及炎性细胞浸润均有不同程度的改善, 其中中药联合抑制剂组仅有少量肠绒毛与固有层分离, 较模型组改善程度最为明显; 造模前给药组与抑制剂组改善程度相仿, 可见少量肠绒毛上皮与固有层分离或部分肠绒毛黏膜上皮细胞坏死脱落; 造模后给药组虽见多量肠绒毛黏膜上皮细胞水样变性, 但较模型组仍有改善。

2.2 各组小鼠肠组织 NLRP3 蛋白及 mRNA 表达比较

表 1 示, 与对照组比较, 模型组小鼠肠组织中 NLRP3 蛋白及 mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 其余各给药组小鼠肠组织中 NLRP3 蛋白及 mRNA 水平均有一定程度的降低 ($P < 0.05$)。造模前给药组 NLRP3 蛋白较造模后给药组降低



注：黑色箭头指示为增生修复的结缔组织替代原有的肠腺，绿色箭头指示为肠腺结构消失，蓝色箭头指示为中性粒细胞浸润，黄色箭头指示为肠绒毛上皮与固有层分离，紫色箭头指示为黏膜细胞水肿变性，灰色箭头指示为黏膜上皮细胞坏死脱落。

图1 各组小鼠肠组织HE染色(×200)

Figure 1 HE staining of intestinal tissues of mice in each group (×200)

($P<0.05$)。中药联合抑制剂组 NLRP3 mRNA 水平较抑制剂组降低 ($P<0.05$)。各组小鼠肠组织 NLRP3 蛋白电泳图见图 2。

表1 各组小鼠肠组织 NLRP3 蛋白及 mRNA 相对表达量比较

Table 1 Comparison of relative protein and mRNA expression levels of NLRP3 in intestinal tissue of mice in each group ($\bar{x}\pm s$)

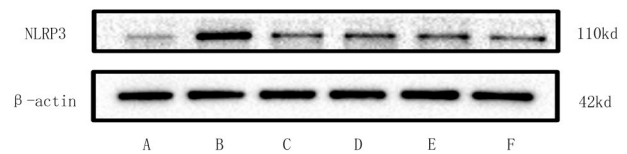
组别	鼠数	NLRP3 蛋白 /β-actin	NLRP3 mRNA
对照组	3	0.44±0.10 ^{a)}	1.00±0.00 ^{a)}
模型组	3	1.28±0.13	4.25±0.86
造模前给药组	3	0.75±0.03 ^{a)}	1.94±0.17 ^{a)}
造模后给药组	3	0.90±0.08 ^{a) b)}	2.27±0.46 ^{a)}
抑制剂组	3	0.71±0.08 ^{a)}	1.85±0.11 ^{a)}
中药联合抑制剂组	3	0.60±0.03 ^{a)}	1.12±0.09 ^{a) c)}

注：NLRP3，NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3。

a) 与模型组比较， $P<0.05$ ；b) 与造模前给药组比较， $P<0.05$ ；c) 与抑制剂组比较， $P<0.05$ 。

2.3 各组小鼠肠组织 NLRP3、Caspase-1、GSDMD 蛋白表达比较

表 2 示，与对照组比较，模型组小鼠肠组织 NLRP3、Caspase-1、GSDMD 蛋白表达明显增加 ($P<$



注：NLRP3，NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3；A，对照组；B，模型组；C，造模前给药组；D，造模后给药组；E，抑制剂组；F，中药联合抑制剂组。

图2 各组小鼠肠组织 NLRP3 蛋白电泳图

Figure 2 Electrophoresis of NLRP3 protein in intestinal tissue of mice in each group

0.05)。与模型组比较，其余各组小鼠肠组织中 NLRP3、Caspase-1、GSDMD 蛋白表达皆显著降低 ($P<0.05$)。造模前给药组较造模后给药组小鼠肠组织 Caspase-1、GSDMD 蛋白降低 ($P<0.05$)。中药联合抑制剂组较抑制剂组肠组织 Caspase-1、GSDMD 蛋白降低 ($P<0.05$)。各组小鼠肠组织 NLRP3、Caspase-1、GSDMD 蛋白免疫组织化学法染色图见图 3。

2.4 各组小鼠脾脏 CD4⁺、CD8⁺T 细胞比例比较

表 3 示，与对照组比较，模型组小鼠脾脏 CD4⁺T 细胞比例上升、CD8⁺T 细胞比例下降 ($P<0.05$)。

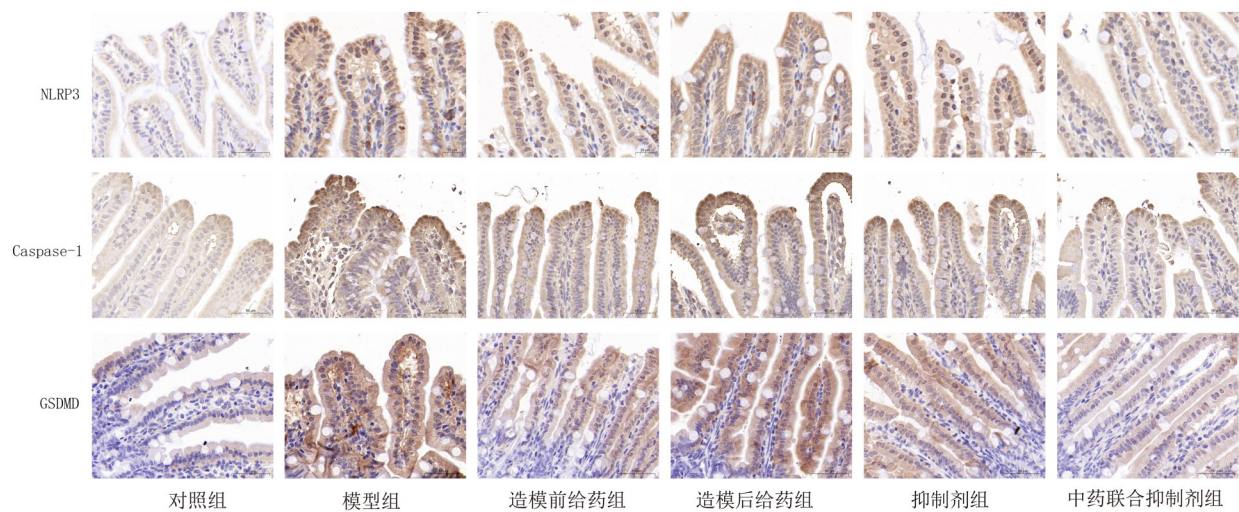
表2 各组小鼠肠组织 NLRP3、Caspase-1、GSDMD 蛋白含量比较

Table 2 Comparison of NLRP3, Caspase-1, and GSDMD protein levels in intestinal tissues of mice in each group (阳性强度, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	NLRP3	Caspase-1	GSDMD
对照组	3	0.98±0.21 ^{a)}	0.87±0.09 ^{a)}	4.44±0.18 ^{a)}
模型组	3	6.85±0.22	6.17±0.46	14.01±0.94
造模前给药组	3	3.04±0.07 ^{a)}	3.57±0.17 ^{a)}	8.30±0.40 ^{a)}
造模后给药组	3	4.10±0.16 ^{a) b)}	4.44±0.29 ^{a) b)}	9.67±0.68 ^{a) b)}
抑制剂组	3	3.39±0.08 ^{a)}	3.59±0.21 ^{a)}	8.27±0.42 ^{a)}
中药联合抑制剂组	3	2.64±0.33 ^{a) c)}	2.42±0.36 ^{a) c)}	6.64±0.49 ^{a) c)}

注：NLRP3，NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3；Caspase-1，半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 1；GSDMD，消皮素 D。

a) 与模型组比较， $P<0.05$ ；b) 与造模前给药组比较， $P<0.05$ ；c) 与抑制剂组比较， $P<0.05$ 。



注：图中棕黄褐色者为蛋白阳性表达；NLRP3，NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3；Caspase-1，半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 1；GSDMD，消皮素 D。

图 3 各组小鼠肠组织 NLRP3、Caspase-1、GSDMD 蛋白表达（免疫组化，×400）

Figure 3 Expression of NLRP3, Caspase-1, and GSDMD proteins in intestinal tissues of mice in each group (immunohistochemistry, ×400)

表 3 各组小鼠脾脏 CD4⁺T、CD8⁺T 细胞比例比较
 Table 3 Comparison of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocyte levels in spleen of mice in each group (%)

组别	鼠数	CD4 ⁺	CD8 ⁺
对照组	3	53.00±1.65 ^{a)}	38.60±2.51 ^{a)}
模型组	3	73.33±0.76	22.13±0.78
造模前给药组	3	61.87±1.19 ^{a)}	31.53±2.14 ^{a)}
造模后给药组	3	65.00±0.46 ^{a) b)}	29.03±0.95 ^{a)}
抑制剂组	3	60.97±0.55 ^{a)}	33.53±1.44 ^{a)}
中药联合抑制剂组	3	58.13±1.53 ^{a) c)}	29.93±0.40 ^{a) c)}

注：a) 与模型组比较，*P*<0.05；b) 与造模前给药组比较，*P*<0.05；c) 与抑制剂组比较，*P*<0.05。

与模型组比较，其余各组小鼠脾脏 CD4⁺T 细胞比例皆有下降、CD8⁺T 细胞比例皆有上升 (*P*<0.05)。与造模前给药组比较，造模后给药组脾脏 CD4⁺T 细胞比例升高 (*P*<0.05)。与抑制剂组比较，中药联合抑制剂组小鼠 CD4⁺、CD8⁺T 细胞比例下降 (*P*<

0.05)。
 2.5 各组小鼠血清 IFN-γ、IL-18、IL-1β 含量比较
 表 4 示，与对照组比较，模型组小鼠血清 IFN-γ、IL-18、IL-1β 含量显著升高 (*P*<0.05)。与模型组比较，其余各组小鼠血清 IFN-γ、IL-18、IL-1β 含量均降低 (*P*<0.05)。与造模前给药组比较，造模后给药组小鼠 IFN-γ 含量降低，IL-18、IL-1β 含量升高 (*P*<0.05)。与抑制剂组比较，中药联合抑制剂组小鼠血清 IFN-γ、IL-18、IL-1β 含量均降低 (*P*<0.05)。

3 讨论

据统计，约 50%~70% 的腹盆腔放疗患者在接受治疗后会出现急性放射性肠损伤^[11]。急性放射性肠损伤的发病机制十分复杂，迄今为止尚未被完全认识。目前认识到的机制有肠道黏膜损伤学说^[12]、血管内皮损伤学说^[13]、肠道菌群失调学

表 4 各组小鼠血清 IFN-γ、IL-18、IL-1β 含量比较
 Table 4 Comparison of serum IFN-γ, IL-18, and IL-1β levels in each group of mice (ng/ml, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	IFN-γ	IL-18	IL-1β
对照组	3	6.27±0.08 ^{a)}	6.23±0.07 ^{a)}	12.80±0.71 ^{a)}
模型组	3	12.63±0.40	12.76±0.39	29.00±0.94
造模前给药组	3	11.53±0.27 ^{a)}	10.41±0.33 ^{a)}	23.02±0.21 ^{a)}
造模后给药组	3	10.76±0.17 ^{a) b)}	12.18±0.39 ^{a) b)}	25.42±0.90 ^{a) b)}
抑制剂组	3	10.44±0.17 ^{a)}	9.84±0.67 ^{a)}	22.12±0.26 ^{a)}
中药联合抑制剂组	3	9.15±0.44 ^{a) c)}	8.78±0.53 ^{a)}	19.40±0.54 ^{a) c)}

注：IFN-γ，γ 干扰素；IL-18，白细胞介素 18；IL-1β，白细胞介素 1β。
 a) 与模型组比较，*P*<0.05；b) 与造模前给药组比较，*P*<0.05；c) 与抑制剂组比较，*P*<0.05。

说^[14]等。目前,认同度较高的肠道黏膜损伤学说认为辐射会诱导肠道黏膜干细胞产生损伤,急性期常表现为炎症反应,慢性期则因纤维细胞的增殖和胶原沉积表现为组织纤维化^[15]。根据急性放射性肠损伤的临床表现可归属于中医学“泄泻”“痢疾”“肠风”等范畴。《素问·阴阳应象大论篇》中记载“湿胜则濡泻”,《素问·至真要大论篇》又言“暴注下迫,皆属于热”,指出湿、热皆可致泄泻;《医林改错·久泄》曰:“泻肚日久,百方不效,是总提瘀血过多”,表明瘀血亦为久泻之因。本团队认为,急性放射性肠损伤基本病机为瘀热湿浊互结、气阴两伤。放射线辐照腹部及盆腔肿瘤,虽有攻毒之效,但其火毒之性,不循卫气营血、三焦等传变,而直中肠腑。火毒之邪与湿毒、瘀血相合为患,耗伤营血、阻滞脉络,进而导致瘀热互结,气阴两伤,肠腑功能失司^[16]。应以益气养阴、凉血散瘀、清肠化湿为治疗大法,遵循标本兼顾的原则,故而得出临床经验效方清化益肠方。方中炙黄芪、麸炒白术为君药,益气补中;地榆清热凉血止血,石斛清热养阴生津,红藤清热解毒活血,三药合用为臣,共奏凉血散瘀、清热解毒之效;薏苡仁渗湿健脾、止泻,煨木香调畅气机,二者合为佐药,共起健益脾气之功;甘草为使,既清热解毒,亦调和诸药。全方诸药共奏益气养阴、凉血散瘀、清肠化湿之功。

现代研究显示,当机体受到外来刺激或识别到损伤相关信号时,能激活 NLRP3 炎症小体,进而活化 Caspase-1,一方面切割 GSDMD,使质膜出现孔洞并释放内容物,促进细胞焦亡^[17-18];另一方面分泌大量 IL-1 β 和 IL-18,引发炎症反应,从而促进多种炎症疾病的发生与发展^[19]。因此, NLRP3 炎症小体在放射性损伤的发病机制中起着关键作用。本研究结果显示,模型组小鼠局部肠黏膜坏死伴有中性粒细胞浸润,提示急性放射性肠损伤小鼠构建成功。与模型组小鼠相比,造模后给药组、造模前给药组、抑制剂组及中药联合抑制剂组小鼠肠组织病理均有不同程度的改善,肠组织 NLRP3 蛋白及 mRNA 表达水平均有下降,且清化益肠方干预的小鼠肠组织 NLRP3、Caspase-1、GSDMD 蛋白相对表达量皆有一定程度的降低,说明清化益肠方可能是通过抑制 NLRP3 蛋白及 mRNA 的表达、焦亡相关蛋白 Caspase-1、GSDMD 的活化发挥治疗急性放射性肠损伤的作用。

NLRP3 炎症小体作为 Th1 适应性免疫应答的重

要组成部分,主要聚集于 CD4⁺T 细胞中,可通过自分泌途径加快 IFN- γ 产生,促进 Th1 细胞分化,从而引发免疫失衡^[20]。本研究结果显示,与模型组相比,经清化益肠方干预的急性放射性肠损伤小鼠脾脏 CD4⁺T 细胞比例下降、CD8⁺T 细胞比例上升,血清 IFN- γ 、IL-18、IL-1 β 含量下降,提示清化益肠方可能在抑制 NLRP3 蛋白及 mRNA 表达的同时调节小鼠免疫功能、抑制促炎因子分泌进而发挥治疗急性放射性肠损伤的作用。同时,本研究结果显示清化益肠方联合 MCC950 的效果更优于单用 MCC950 或清化益肠方,提示在急性放射性肠损伤小鼠模型中, MCC950 作为 NLRP3 炎症小体特异性抑制剂,清化益肠方亦能通过干预 NLRP3 炎症小体发挥作用,二者合用时效果更佳。

急性放射性肠损伤患者有肿瘤原发疾病,体内本癌毒炽盛,又易与素积之郁、热、痰、瘀、湿等病理因素搏结,耗伤正气,久则阴阳失衡^[21]。当腹盆腔肿瘤患者接受放射治疗时,火热之邪外袭,无形之热与体内有形之瘀极易胶结,继发病理产物“瘀热”^[16],瘀热盘踞人体,耗伤正气,煎熬阴津,致气阴不足,进而加重机体阴阳失衡。因此,我们认为在放射治疗开始前即予清化益肠方干预,既能补气阴之亏耗,清稽留之热毒,又可化久踞之瘀结,达益气固肠、清热化瘀之功。为验证清化益肠方是否具有防治急性放射性肠损伤的疗效,本研究另设了造模前给药组。研究结果显示,与造模后给药组相比,造模前给药组小鼠肠道病理改变、肠组织 NLRP3 蛋白及 mRNA 水平与脾脏 CD4⁺T 细胞比例、血清炎症因子水平均有所改善,说明清化益肠方确实具有预防及治疗急性放射性肠损伤的功效,可能是通过改善免疫功能、抑制炎症因子释放来发挥作用。

综上所述,清化益肠方具有改善急性放射性肠损伤小鼠肠组织病理改变、抑制 NLRP3 炎症小体的激活、减少 Caspase-1、GSDMD 蛋白的活化、调节免疫平衡、减少促炎因子表达的功效,从而达到防治急性放射性肠损伤的作用。本研究在动物实验水平阐明清化益肠方的有效机制,但未对关键蛋白 Caspase-1、GSDMD 的剪切体进行检测,未来期待各有效成分的作用机制及焦亡通路的进一步探索,为急性放射性肠损伤的防治提供治疗策略。

参考文献

[1]HAUER-JENSEN M, DENHAM JW, ANDREYEV HJN.

- Radiation enteropathy: pathogenesis, treatment, and prevention [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2014, 11 (8): 470-479.
- [2] 黄子健, 李纪强, 周洁灵, 等. 放射性肠炎的诊疗进展 [J]. *中国肿瘤临床*, 2019, 46(21): 1121-1125.
- [3] 李宏宇, 白朝辉, 祁兴顺, 等. 糖皮质激素在放射性肠炎中的应用进展[J]. *中华消化杂志*, 2021, 41(1): 68-70.
- [4] 王伟, 陈翰翰, 曹志群, 等. 放射性肠炎的中医药治疗研究进展[J]. *中国临床研究*, 2020, 33(1): 118-119, 123.
- [5] 王闯闯, 宁洪鑫, 李航, 等. 中药单体防治放射性肠损伤的作用及机制研究进展[J]. *中国中药杂志*, 2023, 48 (14): 3743-3752.
- [6] 季漪, 李柳, 李文婷, 等. 吴勉华从瘀热论治直肠癌放射性肠损伤[J]. *中医学报*, 2020, 35(12): 2592-2595.
- [7] 朱玲艳. 基于 GPX4 甲基化介导的铁死亡探讨清化益肠方防治急性放射性肠损伤的临床与机制研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2023.
- [8] COLL RC, SCHRODER K, PELEGRÍN P. NLRP3 and pyroptosis blockers for treating inflammatory diseases [J]. *Trend Pharmacol Sci*, 2022, 43(8): 653-668.
- [9] SUN H, CAI H, FU Y, et al. The protection effect of resveratrol against radiation-induced inflammatory bowel disease via NLRP-3 inflammasome repression in mice [J]. *Dose Response*, 2020, 8(2): 1559325820931292. doi: 10.1177/1559325820931292.
- [10] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1996: 1103.
- [11] ASHBURN JH, KALADY MF. Radiation-induced problems in colorectal surgery [J]. *Clin Colon Rectal Surg*, 2016, 29(2): 85-91.
- [12] HU B, JIN C, LI HB, et al. The DNA sensing AIM₂ inflammasome controls radiation induced cell death and tissue injury [J]. *Science*, 2016, 354(6313): 765-768.
- [13] RANNOU E, FRANÇOIS A, TOULLEC A, et al. In vivo evidence for an endothelium-dependent mechanism in radiation-induced normal tissue injury [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 15738. doi: 10.1038/srep15738.
- [14] MORAITIS I, GUIU J, RUBERT J. Gut microbiota controlling radiation-induced enteritis and intestinal regeneration [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2023, 34 (8): 489-501.
- [15] LU L, LI W, CHEN L, et al. Radiation-induced intestinal damage: latest molecular and clinical developments [J]. *Future Oncol*, 2019, 15(35): 4105-4118.
- [16] 吴勉华, 吴艳, 李文婷. 基于瘀热理论探讨放射性损伤的病因病机及防治原则[J]. *南京中医药大学学报*, 2020, 36(3): 300-302.
- [17] KOVACS SB, MIAO EA. Gasdermins: effectors of pyroptosis [J]. *Trends Cell Biol*, 2017, 27(9): 673-684.
- [18] HUANG Y, XU W, ZHOU R. NLRP3 inflammasome activation and cell death [J]. *Cell Mol Immunol*, 2021, 18 (9): 2114-2127.
- [19] RAO Z, ZHU Y, YANG P, et al. Pyroptosis in inflammatory diseases and cancer [J]. *Theranostics*, 2022, 12 (9): 4310-4329.
- [20] LIU Q, HUA M, ZHANG C, et al. NLRP3-activated bone marrow dendritic cells play antileukemic roles via IL-1 β /Th1/IFN- γ in acute myeloid leukemia [J]. *Cancer Lett*, 2021, 520: 109-120. doi: 10.1016/j.canlet. 2021. 06. 014.
- [21] 程海波, 王俊壹, 李柳. 癌毒病机分类及其在肿瘤临床治疗中的应用[J]. *中医杂志*, 2019, 60(2): 119-122.

Effect of *Qinghua Yichang Formula* (清化益肠方) on NLRP3 Inflammasome in Intestinal Tissue of Mice with Acute Radiation-Induced Intestinal Injury

QIN Yuanyuan^{1,2}, ZHU Lingyan^{1,2}, LI Li^{1,2}, CHU Bowen^{3,4}, JIANG Zequn⁵, WU Mianhua^{1,2}

1. The First Clinical Medical College, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, 210023; 2. Jiangsu Collaborative Innovation Center of Traditional Chinese Medicine in Prevention and Treatment of Tumor, Nanjing University of Chinese Medicine; 3. National Cancer Center, Chinese Academy of Medical Sciences; 4. Wannan Medical College; 5. Medical School, Nanjing University of Chinese Medicine

ABSTRACT Objective To explore the effect and possible molecular mechanism of *Qinghua Yichang Formula* (清化益肠方, QYF) in treating acute radiation-induced intestinal injury mice via NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3 (NLRP3). **Methods** Sixty C57BL/6J mice were randomly divided into control group, model group, pre-modeling medication group, post-modeling medication group, inhibitor group, and QYF plus inhibitor group, with 10 mice in each group. Except for the control group, the other five groups were irradiated with a single full dose to establish the acute radiation-induced intestinal injury mice model. The pre-modeling medication group and the QYF plus inhibitor group were continuously given 4 g/ml of QYF decoction by gavage before modeling, 0.2 ml each time, once a day for 7 days. The post-modeling medication group, pre-modeling medication group and QYF plus

inhibitor group were given 4 g/ml of QYF decoction for 14 days after modeling. The control group, model group and inhibitor group were given 0.2 ml of normal saline once a day for 14 consecutive days. Two hours after irradiation, the inhibitor group and the QYF plus inhibitor group were given an intraperitoneal injection of 0.2 ml of the NLRP3 inhibitor MCC950 (concentration: 10 mg/kg), once every two days. To observe the pathological changes in intestinal tissues, hematoxylin-eosin (HE) staining was used. Western blotting and RT-qPCR were used to detect the protein and mRNA expression levels of NLRP3 in intestinal tissues. Immunohistochemistry was used to detect the expression level of NLRP3, Caspase-1 and GSDMD in intestinal tissues. The proportion of CD4⁺ and CD8⁺ T cells in the spleens of mice were detected by flow cytometry. ELISA was used to determine the levels of IFN- γ , IL-18, and IL-1 β in mice serum. **Results** HE staining showed no lesions in the intestinal tissue of mice in the control group. The mice in the model group had shortened intestinal villi, thinned mucosal layers, multifocal mucosal necrosis in the lamina propria, and local neutrophil infiltration. The pathological damage of intestinal tissue of mice in each medication group was improved to varied degrees, among which the QYF plus inhibitor group showed most obvious improvement. Compared to those in the control group, the protein and mRNA expression levels of NLRP3 in the intestinal tissue of mice in the model group significantly increased, with higher NLRP3, Caspase-1, and GSDMD protein expression in the intestinal tissue, increased proportion of CD4⁺T cells in spleen, decreased proportion of CD8⁺T cells, and increased levels of IFN- γ , IL-18 and IL-1 β in serum ($P<0.05$). Compared to those in the model group, the above indicators in the other medication groups were all improved ($P<0.05$). The NLRP3, Caspase-1, and GSDMD proteins in the pre-modeling medication group were lower than those in the post-modeling medication group ($P<0.05$); and the NLRP3 mRNA level in the QYF plus inhibitor group was lower than that in the inhibitor group ($P<0.05$). **Conclusion** QYF may play a role in preventing and treating acute radiation-induced intestinal injury by inhibiting the expression of NLRP3. **Keywords** radiation-induced intestinal injury; Qinghua Yichang Formula (清化益肠方); NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3; inflammasome

(收稿日期: 2024-03-27; 修回日期: 2024-05-30)

[编辑: 邓媛]

广告

欢迎订阅 2024 年《中医杂志》

《中医杂志》(ISSN 1001-1668, CN 11-2166/R)是由中华中医药学会和中国中医科学院主办的全国性中医药综合性学术期刊。创刊以来始终坚持“以提高为主, 兼顾普及”的办刊方针, 是我国中医药界创刊早、发行量大、具有较高权威性和学术影响力的国家级中医药期刊之一, 是中文核心期刊和科技核心期刊、中国精品科技期刊、首届国家期刊奖获得者和中国期刊方阵双奖期刊、新中国 60 年有影响力的期刊、中国百强科技期刊、中国百种杰出学术期刊, 中医药科技期刊分级目录 T1 级期刊。荣获第五届中国出版政府奖期刊奖, 第二届、第三届、第四届中国出版政府奖期刊奖提名奖。

《中医杂志》主要栏目中当代名医和临证心得分别介绍名老中医和临床医生辨证用药治疗疑难病的经验; 临床研究介绍中医药治疗的新方法、新成果; 学术探讨、思路与方法、循证中医药、病例讨论、综述、百家园等栏目, 提供最新学术观点、研究成果与治疗方法, 成为学习中医药、研究中医药, 不断提高临床及研究水平的良师益友。

《中医杂志》为半月刊, 每月 2 日和 17 日出版, 每期定价 40.00 元, 全年 960 元。国内读者可以到全国各地邮局办理订阅手续(邮发代号: 2-698), 也可以与本刊读者服务部联系邮购, 邮购免邮费。电话: 010-64035632, 010-64089195。国外发行: 中国国际图书贸易集团有限公司(北京 399 信箱, 邮编: 100044, 代号: SM140)。

本社地址: 北京市东城区东直门内南小街 16 号, 邮政编码: 100700。

网址: <http://www.jtcm.net.cn>。

