

5-氟尿嘧啶诱导小鼠化疗性肠黏膜炎模型的建立

谭婉贤¹, 熊晏¹, 赖莉敏¹, 颜霞², 陈超¹, 瞿礼萍^{1*}, 邹文俊^{1*}

(1. 成都中医药大学药学院, 成都 611137; 2. 地奥集团成都药业股份有限公司, 成都 610000)

【摘要】 目的 研究5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)诱导小鼠化疗性肠黏膜炎动物模型。**方法** 采用不同剂量的5-FU单次或连续5 d腹腔注射给予小鼠, 每日观察小鼠体重、腹泻情况, 并分别于末次给药后72 h或24 h, 观察小鼠外周血象及小肠组织病理形态学改变。**结果** 与正常组比较, 单次或连续5 d给予5-FU后, 各剂量组小鼠出现不同程度的腹泻及体重降低, 外周血象白细胞和血小板水平明显降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 其中单次给药400 mg/kg组、连续给药50, 100 mg/kg组出现明显的肠黏膜炎病理特征, 100 mg/kg组剂量过高, 死亡率达100%。**结论** 单次或连续5 d给予5-FU诱导小鼠肠黏膜炎的作用呈剂量相关性, 其中单次给药以400 mg/kg为合适剂量, 连续5 d给药以50 mg/kg为合适剂量。

【关键词】 5-氟尿嘧啶; 化疗性肠黏膜炎; 小鼠; 模型

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2018) 03-0372-06

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2018.03.016

Establishment of a mouse model of 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis

TAN Wanxian¹, XIONG Yan¹, LAI Limin¹, YAN Xia², CHEN Chao¹, QU Liping^{1*}, ZOU Wenjun^{1*}

(1. School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China.

2. Di Ao Group Chendu Pharmaceutical Co., Ltd, Chengdu 610000)

Corresponding author: ZOU Wenjun. E-mail: zouwenjun@163.com

【Abstract】 Objective To establish a mouse model of 5-fluorouracil (5-FU)-induced intestinal mucositis. **Methods** Different doses of 5-FU were intraperitoneally injected into mice for once or 5 consecutive days. The body weight and diarrhea score of the mice were recorded every day, and peripheral blood and the morphological changes of small intestine were examined at 24 h or 72 h after the last 5-FU administration. **Results** Compared with the control group, after administered 5-FU, the dosage groups showed various degrees of body weight loss and diarrhea, and the white blood cell and platelet counts in peripheral blood decreased significantly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The small intestine showed evident pathological changes after the single dose 400 mg/kg and the continuous injection of 50 mg/kg, 100 mg/kg. The mortality rate was 100% in the 100 mg/kg group. **Conclusions** A mouse model of intestinal mucositis can be successfully established by a single injection of 5-FU or for consecutive 5 days, in a dose-dependent manner. The optimal dose for single injection is 400 mg/kg, and that of the continual injection for 5 consecutive days is 50 mg/kg.

【Key words】 5-fluorouracil; chemotherapy-induced intestinal mucositis; mouse; model

Conflict of interest statement: We declare that we have no conflict of interest statement.

化疗性肠黏膜炎(chemotherapy-induced intestinal mucositis, CIM)是肿瘤患者化疗时常见的剂量限制性不良反应。欧洲肿瘤医学协会

(European Society for Medical Oncology, ESMO)将其定义为由肿瘤治疗引起的肠道炎性病变, 其病理特征为肠绒毛萎缩、隐窝破坏及炎性细胞浸润, 临床

【基金项目】 成都中医药大学青年教师创新基金项目(No. ZRQN1769)。

Fund by Young Teacher Innovation Foundation of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine (No. ZRQN1769).

【作者简介】 谭婉贤(1991—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 中药理论与应用研究。E-mail: 2368462848@qq.com

【通信作者】 邹文俊(1966—), 女, 博士, 教授, 研究方向: 中药理论与应用研究。Email: zouwenjun@163.com;

瞿礼萍(1984—), 女, 博士后, 研究方向: 中药药理、中药欧盟注册研究。E-mail: qulp2017@163.com

症状主要表现为厌食、恶心、呕吐、腹泻和腹痛等^[1]。CIM 不仅直接影响化疗效果,而且降低肿瘤患者的生存质量。目前 CIM 发病机制尚不明确,且缺乏有效的临床治疗药物。合适的动物模型对疾病研究和药物筛选尤为重要。目前已有多篇化疗诱导动物肠黏膜炎模型的研究报道^[2],其中,5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)诱导建立小鼠肠黏膜炎模型方法简便快速,且基本符合患者化疗后胃肠黏膜炎的病理特点,为 CIM 研究常用动物模型。进一步查阅文献发现,5-FU 诱导小鼠肠黏膜炎模型的造模方法主要涉及单次或连续腹腔注射,但其给药剂量差异较大,其中,单次给药剂量范围为 100~450 mg/kg^[3-6];连续给药剂量范围为 30~150 mg/kg^[7-11]。因此,为进一步研究化疗性肠黏膜炎动物模型,本实验模拟了 5-FU 在临床应用中单次大剂量及分次维持剂量的给药方法^[12-14],观察不同剂量 5-FU 单次或连续 5 d 腹腔注射对小鼠肠黏膜损伤的影响。考虑文献报道连续给药周期多为 5 d,因此本实验以 5 d 作为连续给药的周期。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级 ICR 小鼠 96 只,雄性,体重 23~26 g,购买于成都达硕实验动物有限公司【SCXK(川)2015-030】。饲养于成都中医药大学药学院动物观察室【SYXK(川)2014-124】。动物饲养环境:温度(25±1)℃,相对湿度(60±5)%,12 h/12 h 明暗周期交替,标准饲料喂养,自由饮水。

1.1.2 试剂与仪器

5-FU(美国 Sigma 公司,批号 WXBC2 167 V);4%多聚甲醛固定液(北京 Biosharp 公司,批号 1704464);血细胞分析用溶血剂(上海光电医用电子仪器有限公司,批号 17060582);血细胞分析用稀释液(上海光电医用电子仪器有限公司,批号 17070830)等。

Sorvall ST-16R 离心机(美国 Thermo 公司);BS323S 电子天平(德国 Sartorius 公司);全自动血液分析仪(日本光电公司);光学显微镜(日本 Nikon 公司)等。

1.2 方法

1.2.1 造模方法

(1)动物分组

96 只雄性 ICR 小鼠适应性饲养 3 d,按体重随机分为 8 组,包括单次给药造模和连续给药造模实验各 4 组,每组 12 只。单次给药造模实验分为正常组、5-FU 100 mg/kg 组、5-FU 200 mg/kg 组和 5-FU 400 mg/kg 组。连续给药造模实验分为正常组、5-FU 30 mg/kg 组、5-FU 50 mg/kg 组和 5-FU 100 mg/kg 组。

(2)模型制作

单次给药造模各组小鼠分别单次腹腔注射 5-FU 100、200 和 400 mg/kg。连续给药造模各组小鼠分别腹腔注射 5-FU 30、50 和 100 mg/kg,连续 5 d。正常组小鼠腹腔注射等体积的生理盐水,给药体积为 20 mL/kg。

1.2.2 观察指标

(1)一般状态观察

5-FU 给药第 1 天起,每天观察小鼠的体重、饮食、毛色、活动、精神状态及死亡等情况。

(2)小鼠腹泻情况

5-FU 给药第 1 天起,每天观察小鼠腹泻情况,并参考 Akinobu Kurita^[15]报道方法进行评分:0 分,大便正常或没有;1 分,轻度腹泻,大便可见轻微湿软;2 分,中度腹泻,大便较湿且不成形并伴有轻度肛周污迹;3 分,重度腹泻,水样便并伴有重度肛周污迹。

(3)小鼠外周血象

单次给药造模和连续给药造模各组小鼠分别于末次给药后 72 h 和 24 h,小鼠眼底静脉丛取血 20 μ L,加入预装 2 mL 稀释液的 EP 管中,混匀,使用血细胞分析仪检测各组小鼠白细胞、红细胞、血红蛋白、血小板等血常规指标。

(4)组织病理学观察

单次给药造模和连续给药造模各组小鼠分别于末次给药后 72 h 和 24 h,各处死 4 只小鼠,剖开腹腔,取距回肠末端 3 cm 处的回肠 2 cm,4%多聚甲醛固定、石蜡包埋、切片(4 μ m)、HE 染色,光学显微镜下观察小肠组织结构的病理变化。

1.3 统计方法

实验数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据分析采用 SPSS 21.0 统计软件处理,正态性数据采用 *t* 检验,非正态性数据使用非参数秩和检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

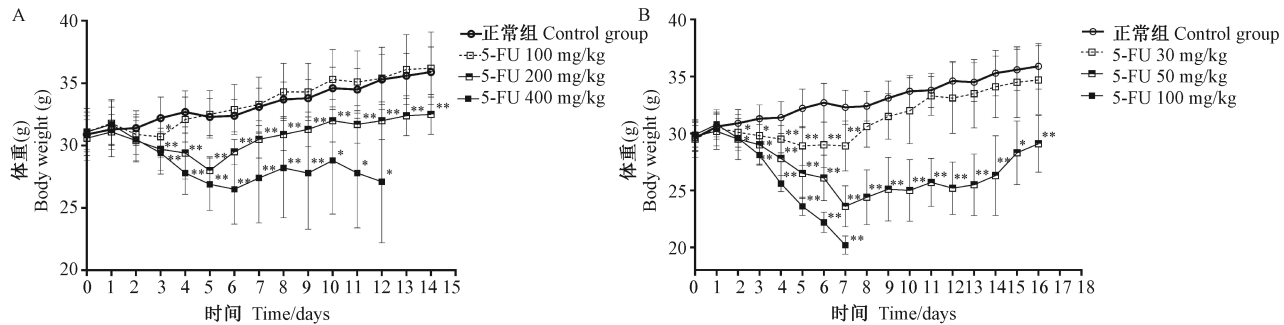
2 结果

2.1 一般状态、体重和腹泻观察

正常组小鼠反应灵敏、毛发光泽,饮食及活动

均正常。单次或连续给予不同剂量 5-FU 后,小鼠出现不同程度的腹泻、体重降低、进食减少、毛发枯槁、精神萎靡及活动减少。单次给予 5-FU,100、200 mg/kg 组无动物死亡,400 mg/kg 组小鼠死亡率为 63%;连续给予 5-FU 5 d 后,30 mg/kg 组无动物死亡,50、100 mg/kg 组动物死亡率分别为 38% 和 100%。

体重方面,单次或连续给予 5-FU 后,与正常组比较,各剂量组小鼠体重在第 2 或 3 天出现明显降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),其中,单次给予 5-FU,400、200 mg/kg 组小鼠体重分别在给药后第 12 或 14 天仍明显低于正常组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);

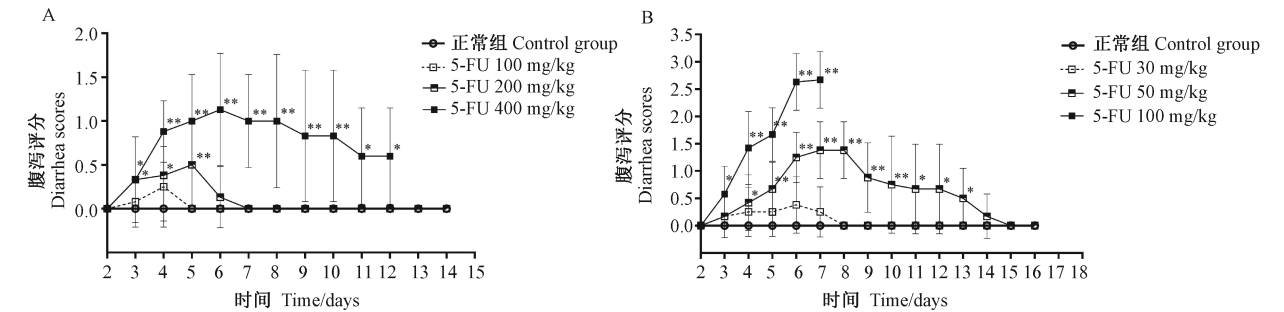


注:A. 5-FU 单次给药对小鼠体重的影响;B. 5-FU 连续给药对小鼠体重影响。与正常组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 1 5-FU 单次及连续给药对小鼠体重的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Note. A. Single administration of 5-FU. B. Continuous administration of 5-FU. Compared with the control group, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

Fig. 1 Effect of single and continuous administration of 5-FU on the body weight of mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)



注:A. 5-FU 单次给药对小鼠腹泻评分的影响;B. 5-FU 连续给药对小鼠腹泻评分的影响。与正常组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 2 5-FU 单次及连续给药对小鼠腹泻评分的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Note. A. Single administration of 5-FU. B. Continuous administration of 5-FU. Compared with the control group, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

Fig. 2 Effect of single and continuous administration of 5-FU on scores of diarrhoea in the mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

2.2 不同剂量 5-FU 单次及连续给药对小鼠外周血象的影响

结果见表 1 和表 2。与正常组比较,单次给予 5-FU,各剂量组小鼠白细胞和血小板水平均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),红细胞和血红蛋白水平

连续给予 5-FU 5 d 后,50 mg/kg 组小鼠在给药后第 16 天仍有显著差异($P < 0.01$),100 mg/kg 组小鼠体重一直持续下降,直至动物死亡。见图 1。

腹泻方面,与正常组比较,单次给予 5-FU 后,100 mg/kg 组未出现明显腹泻症状,200、400 mg/kg 组小鼠在给药后第 3 天出现明显腹泻($P < 0.05$),其中,400 mg/kg 组腹泻维持时间较长;连续给予 5-FU 5 d,各剂量组小鼠在给药第 3 或 4 天出现明显腹泻($P < 0.05$),50 mg/kg 组腹泻评分在给药后第 13 天仍有显著差异($P < 0.05$),100 mg/kg 组小鼠腹泻一直持续加重,直至动物死亡。见图 2。

无明显变化;连续给予 5-FU 5 d,各剂量组小鼠血小板均明显降低($P < 0.01$),50、100 mg/kg 组小鼠白细胞显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),100 mg/kg 组小鼠红细胞和血红蛋白水平出现明显升高($P < 0.01$)。

表 1 5-FU 单次给药对小鼠外周血象的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Tab.1 Effect of single administration of 5-FU on peripheral blood of the mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别 Groups	白细胞 WBC ($10^9/L$)	红细胞 RBC ($10^{12}/L$)	血红蛋白 HGB (g/L)	血小板 PLT ($10^9/L$)
正常组 Control group	4.9 ± 0.8	7.47 ± 0.59	107 ± 5	348 ± 86
5-FU 100 mg/kg	3.2 ± 0.9 **	7.41 ± 0.50	99 ± 6	173 ± 34 **
5-FU 200 mg/kg	3.8 ± 0.8 *	7.55 ± 0.54	106 ± 9	168 ± 31 **
5-FU 400 mg/kg	3.1 ± 1.0 **	8.11 ± 0.63	111 ± 9	158 ± 52 **

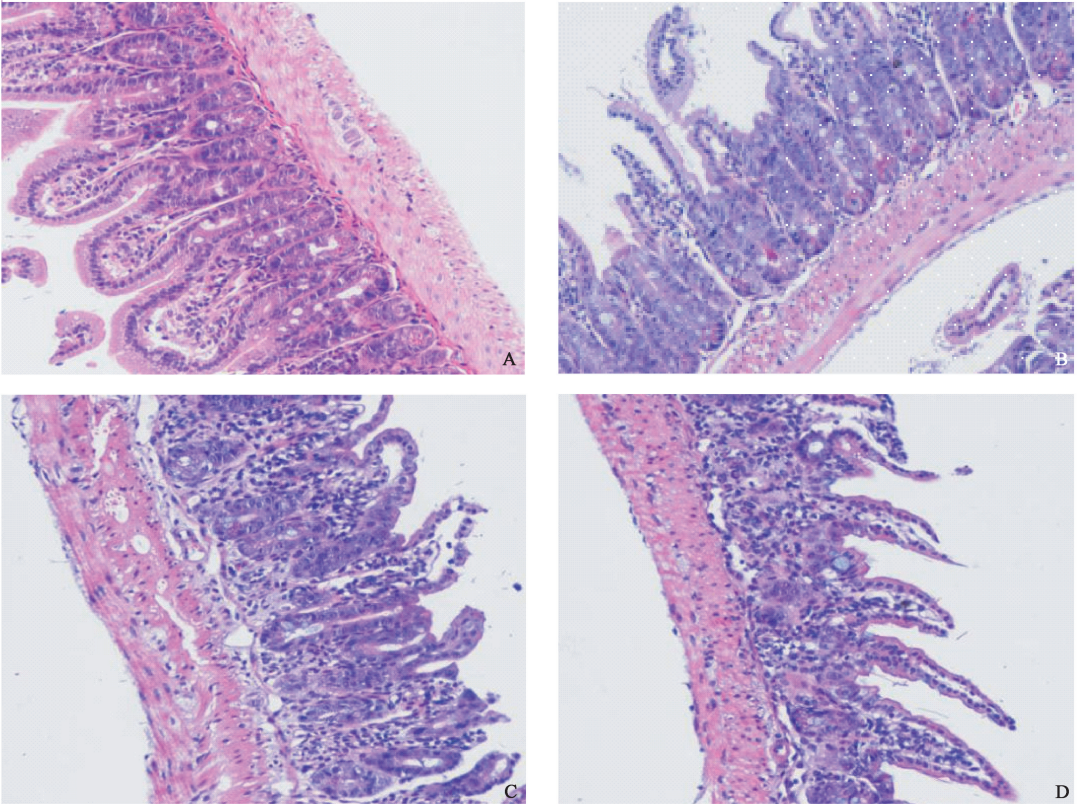
注:与正常组比较, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。
Note. Compared with the control group, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

表 2 5-FU 连续给药对小鼠外周血象的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Tab.2 Effect of continual administration of 5-FU on peripheral blood of the mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别 Groups	白细胞 WBC ($10^9/L$)	红细胞 RBC ($10^{12}/L$)	血红蛋白 HGB (g/L)	血小板 PLT ($10^9/L$)
正常组 Control group	5.4 ± 0.4	7.63 ± 0.48	107 ± 5	347 ± 94
5-FU 30 mg/kg	4.2 ± 1.2	7.42 ± 0.33	103 ± 5	218 ± 56 **
5-FU 50 mg/kg	3.4 ± 1.5 *	7.85 ± 0.47	114 ± 10	164 ± 18 **
5-FU 100 mg/kg	1.3 ± 0.4 **	9.52 ± 0.44 **	138 ± 9 **	110 ± 22 **

注:与正常组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。
Note. Compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.



注:A. 正常组;B. 5-FU 100 mg/kg 组;C. 5-FU 200 mg/kg 组;D. 5-FU 400 mg/kg 组。

图 3 5-FU 单次给药对小鼠小肠组织形态病理改变的影响(HE, ×200)

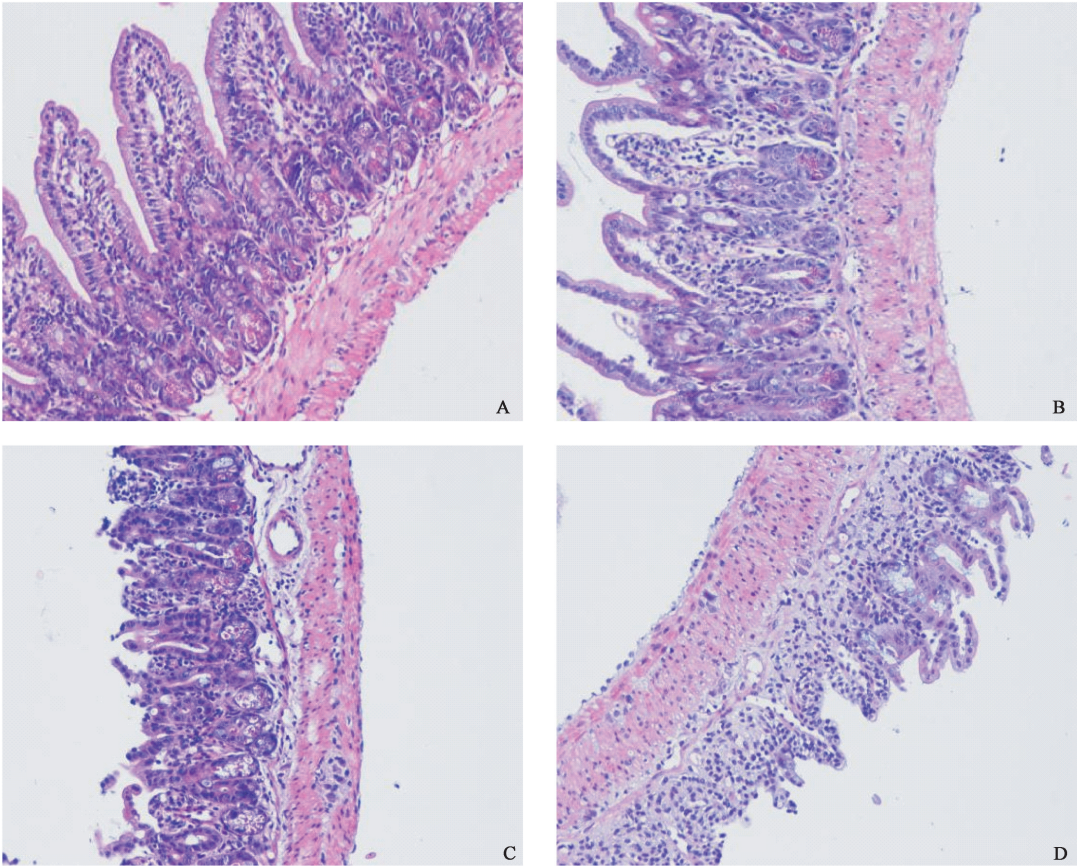
Note. A. Control group. B. 5-FU 100 mg/kg group. C. 5-FU 200 mg/kg group. D. 5-FU 200 mg/kg group.

Fig.3 Effect of single administration of 5-FU on pathological changes in the small intestinal tissues of the mice(HE, ×200)

2.3 不同剂量 5-FU 单次及连续给药对小鼠小肠组织形态病理改变的影响

正常组小鼠肠黏膜组织结构完整,腺体形态完好,绒毛上皮细胞排列整齐,无炎性细胞浸润。单次给予 5-FU 后,100 mg/kg 组小鼠肠绒毛上皮细胞部分脱落;200 mg/kg 组可见脱落的绒毛上皮细胞,肠腺结构消失,少量炎性细胞浸润;400 mg/kg 组肠

绒毛缩短、萎缩,肠腺结构消失,结缔组织增生,可见大量炎性细胞浸润。连续给予 5-FU 5 d,30 mg/kg 组肠绒毛结构破坏,隐窝细胞数量减少,伴有少量炎性细胞浸润;50 mg/kg 组肠绒毛上皮细胞脱落,隐窝结构破坏,可见炎性细胞浸润;100 mg/kg 组大量肠绒毛及隐窝结构消失,结缔组织增生,可见大量炎性细胞浸润。结果见图 3 和图 4。



注:A. 正常组;B. 5-FU 30 mg/kg 组;C. 5-FU 50 mg/kg 组;D. 5-FU 100 mg/kg 组。
图 4 5-FU 连续给药对小鼠小肠组织形态病理改变的影响 (HE, ×200)
Note. A. Control group. B. 5-FU 30 mg/kg group. C. 5-FU 50 mg/kg group. D. 5-FU 100 mg/kg group.

Fig. 4 Effect of continual administration of 5-FU on pathological changes in the small intestinal tissues of the mice (HE, ×200)

3 讨论

5-FU 是临床常用抗消化道肿瘤药物,约 80% 患者在接受治疗后出现肠黏膜炎^[16],是复制化疗性肠黏膜炎的常见造模药物。本研究前期文献查阅发现 5-FU 诱导小鼠肠黏膜炎模型的给药剂量差异较大,因此本实验采用不同剂量的 5-FU 单次或连续 5 d 腹腔注射给予小鼠,并通过观察小鼠体重、腹泻、外周血象及病理组织形态改变等指标进行综合评价。

实验结果表明,单次或连续 5 d 给予不同剂量

的 5-FU,小鼠出现不同程度的腹泻及体重下降。单次给予 5-FU,100、200 mg/kg 组小鼠腹泻评分偏低,病理损伤较轻,未见或少见炎性细胞浸润;400 mg/kg 组小鼠出现明显腹泻,肠绒毛脱落,隐窝消失,可见大量炎性细胞浸润,符合肠黏膜炎病理特征。连续给予 5-FU 5 d,30 mg/kg 组小鼠未出现明显腹泻,病理损伤较轻,少见炎性细胞浸润;50 mg/kg 组小鼠肠绒毛上皮细胞脱落,隐窝结构破坏,可见炎性细胞浸润,且腹泻维持时间较长;100 mg/kg 组小鼠出现严重腹泻,大量肠绒毛上皮细胞脱落,隐窝结构消失,但由于剂量过大,动物死亡率高达 100%。

此外,骨髓抑制也是化疗常见的不良反应之一,主要表现为白细胞、血小板、红细胞减少,严重时会引起血红蛋白降低甚至全血细胞减少^[17]。因而,本研究对外周血象也进行了观察。结果显示,单次给药各剂量组和连续给药 30、50 mg/kg 组小鼠白细胞和血小板水平均明显降低,红细胞和血红蛋白无明显变化,连续给药 100 mg/kg 组小鼠白细胞和血小板水平显著降低,红细胞和血红蛋白水平却明显升高。血细胞中红细胞平均寿命最长,血小板次之,白细胞最短,因而,当骨髓造血功能受损后,白细胞及血小板首先受到影响,而对寿命较长的红细胞影响相对滞后。本实验主要观察到白细胞和血小板水平下降,推测可能与此有关。同时,本研究中连续给药 5-FU 100 mg/kg 引起红细胞升高,可能与白细胞和血小板急剧减少,造血干细胞更多分化为红系祖细胞,进而导致红细胞暂时升高有关,但还需进一步证实。

综上所述,单次或连续 5 d 给予 5-FU 诱导小鼠肠黏膜炎的作用呈剂量相关性,其中单次给药以 400 mg/kg 为造模合适剂量,连续 5 d 给药以 50 mg/kg 为造模合适剂量。

参 考 文 献 (References)

- [1] Sonis ST. The pathobiology of mucositis [J]. Nat Rev Cancer, 2004, 4(4): 277–284.
- [2] 张敏,陈锦秀,谭景予,等. 化疗致胃肠道黏膜炎动物模型构建方法的研究进展 [J]. 世界华人消化杂志, 2012, 20(08): 649–655.
Zhang M, Chen JX, Tan JY, et al. Progress towards the development of animal models of chemotherapy-induced gastrointestinal mucositis [J]. World Chin J Digestol, 2012, 20(08): 649–655.
- [3] Chang CT, Ho TY, Lin H, et al. 5-Fluorouracil induced intestinal mucositis via nuclear factor- κ B activation by transcriptomic analysis and in vivo bioluminescence imaging [J]. PLoS One, 2012, 7(3): e31808.
- [4] Leocádio PC, Antunes MM, Teixeira LG, et al. L-arginine pretreatment reduces intestinal mucositis as induced by 5-FU in mice [J]. Nutr Cancer, 2015, 67(3): 486–493.
- [5] Maioli TU, de Melo Silva B, Dias MN, et al. Pretreatment with *Saccharomyces boulardii* does not prevent the experimental mucositis in Swiss mice [J]. J Neg Results Biomed, 2014, 13: 6.
- [6] Justino PF, Melo LF, Andre F, Nogueira AF, et al. Treatment with *Saccharomyces boulardii* reduces the inflammation and dysfunction of the gastrointestinal tract in 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in mice [J]. Br J Nutr, 2014, 111(9): 1611–1621.
- [7] Yeung CY, Chan WT, Jiang CB, et al. Amelioration of

- chemotherapy-induced intestinal mucositis by orally administered probiotics in a mouse model [J]. PLoS One, 2015, 10(9): e0138746.
- [8] Kawashima R, Fujimaki M, Ikenoue Y, et al. Influence of an elemental diet on 5-fluorouracil-induced morphological changes in the mouse salivary gland and colon [J]. Support Care Cancer, 2016, 24(4): 1609–1616.
- [9] Kato S, Hayashi S, Kitahara Y, et al. Saireito (TJ-114), a Japanese traditional herbal medicine, reduces 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in mice by inhibiting cytokine-mediated apoptosis in intestinal crypt cells [J]. PLoS One, 2015, 10(1): e0116213.
- [10] Gou H, Gu LY, Shang BZ, et al. Protective effect of Bu-Zhong-Yi-Qi decoction, the water extract of Chinese traditional herbal medicine, on 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in mice [J]. Human Exp Toxicol, 2016, 35(12): 1243–1251.
- [11] Luo YQ, Wu CT, Wen Y, et al. The expression of msi-1 and its significance in small intestinal mucosa severely damaged by high-dose 5-Fu [J]. Digest Dis Sci, 2008, 53(9): 2436–2442.
- [12] 周亮华. 奥沙利铂、亚叶酸钙联合 5-FU 的新辅助化疗方案在进展期胃癌治疗中的疗效及安全性 [J]. 实用癌症杂志, 2015, 30(05): 744–746.
Zhou LH. Efficacy and safety of oxaliplatin leucovorin combined with 5-FU in neoadjuvant chemotherapy for advanced gastric cancer [J]. Pract J Cancer, 2015, 30(05): 744–746.
- [13] 张献东,王生力,苗成林,等. 奥沙利铂联合亚叶酸钙/5-氟尿嘧啶治疗晚期胃癌临床观察 [J]. 实用诊断与治疗杂志, 2008, 22(05): 379–380.
Zhang XD, Wang SL, Miao CL, et al. Clinical observation of oxaliplatin leucovorin combined with 5-FU in advanced gastrointestinal cancer [J]. J Pract Diagn Ther, 2008, 22(05): 379–380.
- [14] 陈绍锋,胡建新,劳逸. 大剂量 5-FU 持续 96 小时静脉输注联合方案治疗晚期头颈部鳞癌 55 例报告 [J]. 实用肿瘤杂志, 1999, 14(01): 20–22.
Chen SF, Hu JX, Lao Y. Combination chemotherapy with continuous high-dose 5-FU infusion for advanced squamous cell carcinoma of the head and neck [J]. J Pract Oncol, 1999, 14(01): 20–22.
- [15] 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.
- [16] Elting LS, Cooksley C, Chambers M, et al. The burdens of cancer therapy. Clinical and economic outcomes of chemotherapy-induced mucositis [J]. Cancer, 2003, 98(7): 1531–1539.
- [17] Wang SS, Zheng G, Tian SS, et al. Echinacoside improves hematopoietic function in 5-FU-induced myelosuppression mice [J]. Life Sci, 2015, 123: 86–92.