

曾信豪, 谢东可, 郑皓, 等. 苦杏仁苷对新生大鼠坏死性小肠结肠炎的保护作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(1): 75-81.

Zeng XH, Xie DK, Zheng H, et al. Protective effect of amygdalin against necrotizing enterocolitis in neonatal rats [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(1): 75-81.

doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2022. 01. 010

苦杏仁苷对新生大鼠坏死性小肠结肠炎的保护作用

曾信豪^{1,2*}, 谢东可^{1,2}, 郑皓^{1,2}, 徐沛^{1,2}, 王小勇^{1,2}

(1.西南医科大学附属医院儿外科,四川 泸州 646000;2.四川省出生缺陷临床医学研究中心,四川 泸州 646000)

【摘要】 目的 分析苦杏仁苷对新生大鼠坏死性小肠结肠炎(NEC)的保护作用。**方法** 将 60 只出生 7 d 的健康新生 SD 大鼠按随机数字表法分为对照组、模型组、苦杏仁苷低剂量组、苦杏仁苷中剂量组、苦杏仁苷高剂量组和柳氮磺嘧啶组,每组 10 只。除对照组外,其他各组大鼠均采用缺氧冷应激联合配方奶侵袭性喂养法建立 NEC 模型。同时低、中、高剂量组分别给予 20、40、80 mg/kg 苦杏仁苷,柳氮磺嘧啶组给予 300 mg/kg 柳氮磺嘧啶,连续给药 5 d。末次干预 12 h 后,记录大鼠体重变化,取小肠回盲部组织进行 HE 染色,并进行回盲部肠组织损伤评分;通过 TUNEL 染色检测细胞凋亡率;通过酶联免疫法检测血清炎症因子:肿瘤坏死因子(TNF-α)、白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-1β(IL-1β)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)水平。通过 Western blot 检测 NOD 样受体蛋白 3(NLRP3)、凋亡相关斑点样蛋白(ASC)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶(Caspase-1)蛋白表达水平。**结果** 与对照组相比,模型组大鼠体重显著下降,肠组织损伤评分、肠组织细胞凋亡率、TNF-α、IL-6、IL-1β、SOD、MDA、GSH-Px 水平以及 NLRP3、ASC、Caspase-1 蛋白表达水平显著升高($P<0.05$);与模型组相比,苦杏仁苷中剂量组、苦杏仁苷高剂量组、柳氮磺嘧啶组大鼠体重显著上升,肠组织损伤评分、肠组织细胞凋亡率显著下降,TNF-α、IL-6、IL-1β、SOD、MDA、GSH-Px 水平、NLRP3、ASC、Caspase-1 蛋白表达水平显著下降($P<0.05$)。**结论** 苦杏仁苷对新生大鼠坏死性小肠结肠炎有一定保护作用,可以有效减少肠组织损伤、降低机体炎症反应、氧化应激反应,减少肠组织细胞凋亡率,但具体的反应机制尚不够明确,有待临床进一步探究。

【关键词】 苦杏仁苷;小肠结肠炎;大鼠;氧化应激水平

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 01-0075-07

Protective effect of amygdalin against necrotizing enterocolitis in neonatal rats

ZENG Xinhao^{1,2,*}, XIE Dongke^{1,2}, ZHENG Hao^{1,2}, XU Pei^{1,2}, WANG Xiaoyong^{1,2}

(1. Department of Pediatrics, the Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, China.
2. Sichuan Clinical Research Center for Birth Defects, Luzhou 646000)

【Abstract】 Objective To analyze the protective effect of amygdalin against necrotizing enterocolitis (NEC) in neonatal rats. **Methods** 60 healthy 7-day old SD rats were divided into control, model and low-dose, middle-dose and high-dose amygdalin groups, and salazosulfadimidine group by a random number table with 10 rats in each group. Except for the control group, hypoxic cold stress combined with formula milk for invasive feeding was applied to establish NEC models in the other groups. The low-dose, middle-dose and high-dose amygdalin groups were administered with 20, 40 and 80 mg/kg amygdalin, respectively, whereas the salazosulfadimidine group was administered with 300 mg/kg

[基金项目] 四川省科技厅项目(2020YFSY0033)。

[作者简介] 曾信豪(1990—),男,硕士,医师,研究方向:新生儿外科。E-mail: zengxinhao1990@163.com

salazosulfadimidine for 5 days. At 12 h after the last treatment, changes in weight were recorded. HE staining of ileocecal tissues was conducted. Ileocecal tissue damage was scored by intestinal damage criteria. The apoptosis rate was determined by TUNEL staining. The serum levels of inflammatory factors (tumor necrosis factor α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), interleukin-1 β (IL-1 β), superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA) and glutathione peroxidase (GSH-Px) were measured by enzyme-linked immunosorbent assays. The expression levels of NOD-like receptor protein 3 (NLRP3), apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC) and cysteine aspartase (Caspase-1) were measured by Western blot. **Results** Compared with the control group, the weight of rats was significantly decreased in the model group, while the intestinal damage score, apoptosis rate of intestinal tissues, TNF- α , IL-6, IL-1 β , SOD, MDA and GSH-Px levels, and expression levels of NLRP3, ASC and Caspase-1 were increased significantly ($P < 0.05$). Compared with the model group, the weight of rats was significantly increased in middle-dose and high-dose amygdalin groups, and the salazosulfadimidine group, while the intestinal damage score, apoptosis rate of intestinal tissues, TNF- α , IL-6, IL-1 β , SOD, MDA and GSH-Px levels, and expression levels of NLRP3, ASC and Caspase-1 were decreased significantly ($P < 0.05$). **Conclusions** Amygdalin has a protective effect against NEC in neonatal rats, which effectively reduces intestinal tissue damage, relieves the inflammatory response and oxidative stress, and reduces the apoptosis rate in intestinal tissues. However, the specific mechanism is unclear, which requires further clinical exploration.

[Keywords] amygdalin; enterocolitis; rat; oxidative stress level

坏死性小肠结肠炎 (necrotizing enterocolitis, NEC) 是一种肠道炎症性疾病, 在新生儿群体中发病率、病死率均较高^[1]。NEC 极易引发新生儿肠穿孔、多器官衰竭、败血症等, 甚至导致患儿死亡^[2]。目前, 临床可以采取外科手术的方式治疗 NEC, 但由于创伤大, 术后并发症多, 术后死亡率仍较高, 且较高的手术费会增加患者经济压力。如何利用其他方式避免 NEC 病情进展是新生儿外科医生和内科医生所需要共同面对的难题。抗炎药物、控制肠道菌群等药物进行保守治疗^[3-4], 可以规避临床手术风险, 但此类药物耐药性较强, 不良反应多, 且部分患者疗效不佳。苦杏仁苷 (amygdalin) 是苦杏仁的有效成分之一, 又称维生素 B17, 临床上常用于治疗祛痰止咳以及抗肿瘤的辅助治疗, 可有效改善咳喘、肺纤维化、抗高氧诱导肺损伤等呼吸疾病^[5]。相关研究表明, 苦杏仁苷可用于治疗缓解胃肠道疾病, 提高机体免疫功能、抑制肠道炎症、缓解肠组织损伤等^[6]。因此, 本研究探讨了苦杏仁苷对新生大鼠 NEC 的保护作用, 以期为临床提供更多治疗 NEC 的方法。

1 材料和方法

1.1 实验动物

选择 7 日龄的健康 SD 大鼠共 60 只, SPF 级, 雌雄不限, 体重约 15 g, 购自西南医科大学 [SCXK (川) 2018-17], 饲养于西南医科大学 [SYXK (川) 2018-065]。经本院西南医科大学附属医院伦理委员会批准 (IACUC20201207); 实验研究过程中符合

3R 原则。饲养条件: 采用清洁层流架小环境控制饲养。每 3 d 换 1 次垫料, 每天 09:00 和 20:00 各饲喂 1 次, 自由饮水。温度控制在 18℃ ~ 22℃, 湿度 50% ~ 60%。

1.2 主要试剂与仪器

强化配方乳、组织及细胞裂解液 (北京伊塔生物科技有限公司, 批号: 20200608、20200512、20200416); 苦杏仁苷 (上海韵泰信息科技有限公司, 批号: 20200226); PMSF 蛋白酶抑制剂混合物 (伊塔生物有限公司, 批号: 20200614); 细胞凋亡试剂盒 (武汉益普生物科技有限公司, 批号: 20200816)。肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 检测试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司, 批号: 20201012、20200924、20200916); 超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 检测试剂盒、丙二醛 (malondialdehyde, MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px) 检测试剂盒 (天津本生健康科技有限公司, 批号: 20200706、20200815、20200724); 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 抗体 (北京百奥莱博, 批号: BL0899); β -actin 鼠单克隆抗体 (北京百奥莱博, 批号: WK347-XHA)。

Bio-Rad 多功能酶标检测仪 (型号 iMark680); OLYMPUS 光学显微镜 (型号 BX60); Bio-Rad SDS-PAGE 电泳仪和转膜仪 (型号 Mini Protean 3 Cell)。

1.3 方法

1.3.1 动物模型建立和分组

将 60 只出生 7 d 的健康新生 SD 大鼠按随机数字表法分为对照组、模型组、苦杏仁苷低剂量组、苦杏仁苷中剂量组、苦杏仁苷高剂量组和柳氮磺嘧啶组,每组 10 只。利用配制代乳品(脂肪 120 g/L、蛋白质 75 g/L、乳糖 28 g/L、热量 5.9 mJ/L)喂养,每 5 h 喂养 1 次。除对照组外,将其他组大鼠放入缺氧箱内,向箱内注入浓度 100% 的氮气,当测氧仪每 min 测得箱内氧气浓度降为 0 时开始计时,1 min 后关闭阀门,取出大鼠;5 min 后立即将其置于 4℃ 冰箱中 10 min 进行冷刺激,每天 3 次;脂多糖 10 mg/kg 灌胃,每天 1 次,连续 3 d 重复上述操作。末次干预后第 2 天,低、中、高剂量组分别给予 20、40、80 mg/kg 苦杏仁苷,阳性对照组给予 300 mg/kg 柳氮磺嘧啶,连续给药 5 d;模型组给予等体积的氯化钠注射液;对照组则不予任何处理。若造模后大鼠出现吐奶、腹胀、腹泻、血便等症状,且 HE 染色显示肠组织病理损伤评分 ≥ 2 分为 NEC 建模成功。

1.3.2 评估回盲部肠组织病理组织损伤及大鼠体重变化

末次人工喂养 12 h 后,处死大鼠,记录体重。取各组回盲部肠组织,利用 4% 的多聚甲醛固定,进行石蜡包埋切片处理,并将回盲部肠组织进行苏木精-伊红染色,观察其病理学变化,根据参考文献^[7]对各组大鼠进行回盲部肠组织损伤评分:回盲部肠组织结构正常、绒毛及上皮均完整为 0 分,回盲部肠组织黏膜固有层有轻微肿胀或分离为 1 分;回盲部肠组织黏膜固有层中度肿胀分离为 2 分;回盲部肠组织黏膜固有层重度肿胀分离,且黏膜下肌层水肿并伴局部绒毛脱落为 3 分;肠坏死且回盲部肠组织绒毛消失为 4 分。

1.3.3 TUNEL 法检测肠组织细胞凋亡情况

将肠组织细胞处理为 5 μ m 切片,烤片 30 min 后,进行脱蜡水化处理,利用苏木素染色 1 min 后,蒸馏水冲洗,再用盐酸乙醇分化 10 s,冲洗,氨水返蓝 30 s 后,冲洗,伊红染色 20 s,乙醇脱水,利用二甲苯透明,最后封片。用显微镜下观察细胞染色情况。

将各组大鼠回盲部肠组织进行石蜡包埋切片处理,脱蜡至水,利用原位末端标记(TUNEL)法检测大鼠肠组织细胞的凋亡情况,严格按照细胞凋亡试剂盒说明书步骤操作,最后用抗荧光淬灭剂封片液封片并镜检。

1.3.4 酶联免疫法检测炎症因子

取回盲部肠组织,按照 20 mg 加入 100 μ L 组织裂解液的比例加入组织裂解液和蛋白酶抑制剂(苯甲基磺酰氟),在 4℃ 下,14000 r/min 离心 10 min,取上层清液,采用酶联免疫吸附试验测定 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平,严格按照试剂盒说明书操作。

1.3.5 酶联免疫法检测氧化应激水平

采用玻璃匀浆器,将各组回盲部肠组织制成组织匀浆液,利用酶联免疫吸附法检测匀浆液中的 GSH-Px、SOD、MDA 含量,严格按照试剂盒说明书操作。

1.3.6 Western blot 检测 NLRP3/ASC/Caspase-1 信号通路

利用 Western blot 检测 NOD 样受体蛋白 3 (NOD-like receptor protein 3, NLRP3)、凋亡相关斑点样蛋白 (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD, ASC)、活化半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 (Caspase-1, ASC) 蛋白表达水平。采用细胞裂解液裂解,组织匀浆,4℃ 下 14000 r/min 离心 5 min,取上清提取各组回盲部肠组织总蛋白,严格按照操作说明进行。采用 BCA 法进行蛋白定量,取 20 μ g 蛋白进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,电转至 PVDF 膜上,采用洗膜缓冲液洗膜并加一抗(NLRP3、ASC、cleaved cas1/cas1),4℃,孵育过夜,洗膜加羊抗兔 IgG 二抗(1 : 3000),摇床震荡,于室温下孵育 2 h。电化学发光显影,用 β -actin 作为内参,用凝胶图像处理系统分析对比条带强弱。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 17.0 软件进行数据分析,满足正态性的计量资料均以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用单因素方差分析比较组间差异,SNK- q 比较多组两两组间差异,以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 苦杏仁苷剂量依赖性减轻肠组织病理组织损伤、增加大鼠体重

与对照组相比,模型组大鼠体重显著下降,肠组织损伤评分显著增加($P<0.05$);与模型组相比,苦杏仁苷中、高剂量组、柳氮磺嘧啶组大鼠体重显著上升,肠组织损伤评分显著下降($P<0.05$),提示苦杏仁苷有抑制组织损伤的作用,并且剂量越高这种抑制作用越显著。见表 1。

2.2 苦杏仁苷剂量依赖性抗细胞凋亡

HE 染色显示肠组织细胞被染成紫红色,肠组织

细胞核被染成紫蓝色。对照组大鼠肠组织细胞横纹清晰、结构完整、大小正常、排列整齐、灰白质分界清晰且核仁清晰可见;空白对照组和阴性对照组大鼠肠组织细胞显著增大、组织内存在较多空腔、排列紊乱,间质增多,灰白质分界不清晰,有明显成纤维细胞增生;阳性对照组大鼠肠组织细胞排列稍紊乱,间质稍增多,有少量成纤维细胞增生,见图 1。

TUNEL 法检测大鼠肠组织细胞显示,与对照组(2.02%)相比,模型组的细胞凋亡率(45.45%)显著升高($P<0.05$),与模型组相比,苦杏仁苷中剂量组(20.20%)、苦杏仁苷高剂量组(10.39%)、柳氮磺嘧啶组(7.58%)细胞凋亡率显著下降($P<0.05$),见图 2、表 2。

2.3 苦杏仁苷剂量依赖性降低炎症因子水平

与对照组相比,模型组的 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平显著升高($P<0.05$),与模型组相比,苦杏仁苷中剂量组、苦杏仁苷高剂量组、柳氮磺嘧啶组 TNF- α 、

IL-6、IL-1 β 显著下降($P<0.05$),提示苦杏仁苷有抑制炎症的作用,并呈现剂量依赖性。见表 3。

2.4 苦杏仁苷剂量依赖性降低氧化应激水平

与对照组相比,模型组的 SOD、MDA、GSH-Px 水平显著升高($P<0.05$),与模型组相比,苦杏仁苷中、高剂量组和柳氮磺嘧啶组 SOD、MDA、GSH-Px 水平显著下降($P<0.05$),提示苦杏仁苷有减缓氧化应激水平的作用,随着剂量增加,减轻氧化应激水平的效果越显著。见表 4。

2.5 苦杏仁苷剂量依赖性降低 NLRP3、ASC、Caspase-1 蛋白表达

与对照组比,模型组的 NLRP3、ASC、Caspase-1 表达水平显著升高($P<0.05$),与模型组相比,苦杏仁苷中、高剂量组和柳氮磺嘧啶组 NLRP3、ASC、Caspase-1 水平显著下降($P<0.05$),说明苦杏仁苷可以通过调控 NLRP3、ASC、Caspase-1 等蛋白表达水平保护大鼠肠组织。见图 3、表 5。

表 1 苦杏仁苷剂量依赖性减轻肠组织病理组织损伤、增加大鼠体重($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Amygdalin dose-dependently reduces pathological tissue damage and increased body weight in rats			
分组 Groups	剂量 (mg/kg) Dose	体重变化 (g) Weight change	肠组织损伤评分 (分) Intestinal tissue injury score
对照组 Control group	—	2.16 $\pm$ 1.47	0.17 $\pm$ 0.07
模型组 Model group	—	-14.99 $\pm$ 6.66 [*]	3.32 $\pm$ 0.55 [*]
苦杏仁苷低剂量组 Amygdalin low-dose group	20	-14.80 $\pm$ 6.86	3.22 $\pm$ 0.70
苦杏仁苷中剂量组 Amygdalin middle-dose group	40	-4.55 $\pm$ 4.21 [#]	2.41 $\pm$ 0.57 [#]
苦杏仁苷高剂量组 Amygdalin high-dose group	80	-1.59 $\pm$ 1.25 [#]	1.24 $\pm$ 0.36 [#]
柳氮磺嘧啶组 Sulfasalazine group	300	0.59 $\pm$ 1.37 [#]	0.92 $\pm$ 0.31 [#]

注:与对照组相比,* $P<0.05$;与模型组相比,[#] $P<0.05$ 。
Note. Compared with control group,* $P<0.05$. Compared with model group,[#] $P<0.05$.

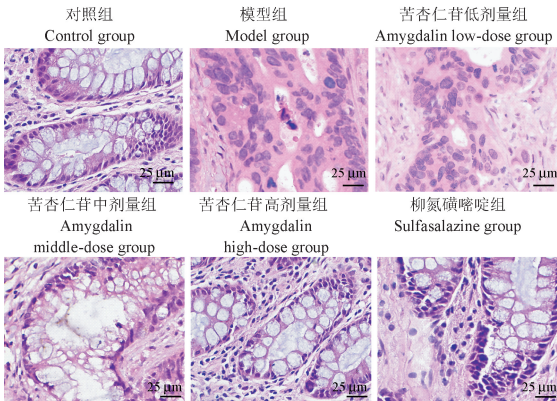


图 1 肠组织 HE 染色情况比较

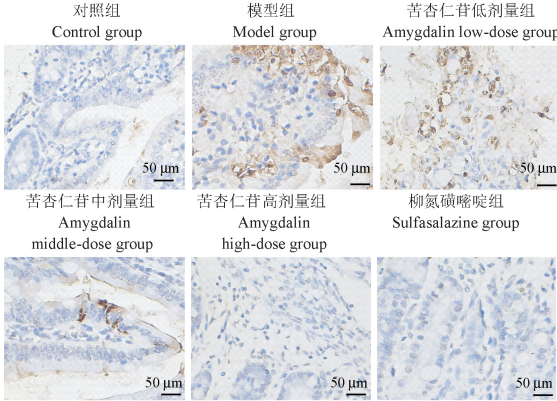


图 2 肠组织细胞凋亡情况比较

Figure 1 Comparison of HE staining of intestinal tissue

Figure 2 Comparison of cell apoptosis in intestinal tissue

3 讨论

NEC 是新生儿期常见的严重消化道疾病,极低出生体重儿的 NEC 发病率为 7%,病死率可达 30%^[8]。新生儿缺氧缺血、异常细菌定植、胎龄不足、配方奶喂养等被认为是 NEC 发生的主要影响因素^[9]。苦杏仁苷取自于杏仁,在蔷薇科植物的成熟干燥种子广泛存在。有研究显示,苦杏仁苷有抗肿瘤、抑制炎症、抑制组织损伤的作用^[10-11]。本研究结果显示,与对照组相比,模型组大鼠体重显著下降,肠组织损伤评分显著增加;与模型组相比,苦杏仁苷中剂量组、苦杏仁苷高剂量组、柳氮磺嘧啶组大鼠体重显著上升,肠组织损伤评分显著下降,与上述研究结论相符,说明苦杏仁苷与柳氮磺嘧啶作用相近,可以抑制肠组织损伤恢复大鼠体重,且与苦杏仁苷浓度呈正相关。

苦杏仁苷在机体内通过白糖苷酶作用分解,从而释放出氰化物,氰化物本身具有很强的细胞毒性,可抑制线粒体的功能,拮抗炎症因子延缓细胞凋亡^[10]。有研究显示,苦杏仁苷可以通过 JAK2-STAT3 通路促进 T 淋巴细胞增殖,进而缩短细胞分裂周期,增强细胞干扰和杀伤性细胞因子的分泌。苦杏仁苷经抗 CEA-单抗-葡萄糖苷酶偶联物特异激活后,可以促进癌细胞凋亡,对癌细胞具有靶向细胞毒作用^[12]。TUNEL 法检测结果显示,与对照组相比,模型组的细胞凋亡率显著升高,与模型组相比,苦杏仁苷中剂量组、苦杏仁苷高剂量组、柳氮磺嘧啶组细胞凋亡率显著下降。本研究说明苦杏仁苷可以改善细胞凋亡,且与苦杏仁苷浓度呈正相关。

本研究结果显示,与对照组相比,模型组的 TNF-α、IL-6、IL-1β 显著升高;与模型组相比,苦杏仁苷中剂量组、苦杏仁苷高剂量组、柳氮磺嘧啶组 TNF-α、IL-6、IL-1β 显著下降。TNF-α、IL-6、IL-1β 常被作为临床炎症反应指标,对炎症的发展有预示作用^[13]。既往研究显示,脑组织损伤严重的大鼠伴随血清中 IL-6、IL-1β、TNF-α 等炎症因子水平升高,提示组织损伤可能与血清炎症水平较高有关,当炎症水平降低后,组织病理损伤和细胞凋亡发生好转^[14]。有研究显示,苦杏仁苷可以拮抗炎症因子诱导、促进细胞的凋亡,苦杏仁苷对多种炎症性疾病有缓解作用,可明显降低炎症因子^[15]。结合本研究说明苦杏仁苷降低了肠组织细胞中的炎

症反应,促进肠道细胞恢复。

本研究结果显示,与对照组相比,模型组的 SOD、MDA、GSH-Px 水平显著升高;与模型组相比,苦杏仁苷中剂量组、苦杏仁苷高剂量组、柳氮磺嘧啶组 SOD、MDA、GSH-Px 水平显著下降。既往研究显示,苦杏仁苷可以通过抑制氧化应激及炎症反应减轻肝纤维化^[16]、抑制肿瘤的作用。SOD、GSH-Px 作为自由基解毒酶可以清除机体氧自由基,自由基清除与产生之间的平衡对机体正常运转、抗衰老、抗病理变化起到重要作用,测定氧化应激反应的代谢产物 MDA 可以进一步了解机体过氧化损伤的情况^[17]。本研究中 SOD、MDA、GSH-Px 水平显著下降提示了,苦杏仁苷中可能通过抑制组织细胞的氧化应激反应缓解炎症反应,保护肠组织。

表 2 苦杏仁苷剂量依赖性抗细胞凋亡($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Amygdalin dose-dependently anti-apoptosis

分组 Groups	剂量 (mg/kg) Dose	细胞凋亡率 (%) Apoptosis rate
对照组 Control group	—	2.02±0.02
模型组 Model group	—	45.45±7.07 [*]
苦杏仁苷低剂量组 Amygdalin low-dose group	20	42.42±7.58
苦杏仁苷中剂量组 Amygdalin middle-dose group	40	20.20±8.08 [#]
苦杏仁苷高剂量组 Amygdalin high-dose group	80	10.39±5.53 [#]
柳氮磺嘧啶组 Sulfasalazine group	300	7.58±4.55 [#]

注:与对照组相比,* $P<0.05$;与模型组相比,[#] $P<0.05$ 。
Note. Compared with control group, * $P<0.05$. Compared with model group, [#] $P<0.05$.

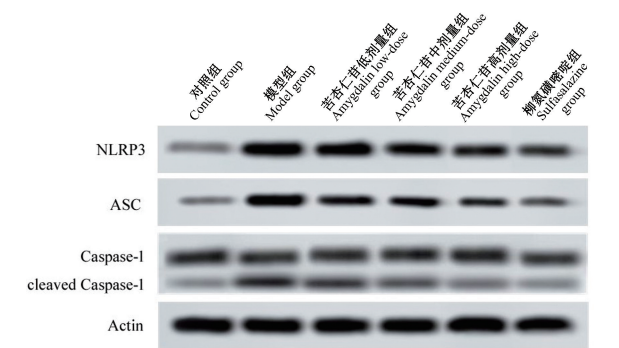


图 3 肠组织细胞 NLRP3、ASC、Caspase-1 蛋白表达图谱
Figure 3 Intestinal tissue cell NLRP3, ASC, Caspase-1 protein expression profile

表 3 苦杏仁苷剂量依赖性降低炎症因子水平($\bar{x}\pm s$)
Table 3 Amygdalin dose-dependently reduces the level of inflammatory factors

分组 Groups	剂量 (mg/kg) Dose	TNF- α (ng/mL)	IL-6 (ng/mL)	IL-1 β (ng/mL)
对照组 Control group	—	79. 87 $\pm$ 14. 70	138. 05 $\pm$ 12. 51	96. 64 $\pm$ 13. 37
模型组 Model group	—	439. 53 $\pm$ 37. 24 *	579. 07 $\pm$ 58. 39 *	625. 58 $\pm$ 61. 35 *
苦杏仁苷低剂量组 Amygdalin low-dose group	20	394. 45 $\pm$ 31. 85	425. 29 $\pm$ 34. 72	563. 80 $\pm$ 53. 36
苦杏仁苷中剂量组 Amygdalin middle-dose group	40	270. 45 $\pm$ 26. 46 [#]	371. 73 $\pm$ 32. 25 [#]	396. 32 $\pm$ 32. 18 [#]
苦杏仁苷高剂量组 Amygdalin high-dose group	80	137. 69 $\pm$ 18. 62 [#]	309. 74 $\pm$ 23. 38 [#]	220. 84 $\pm$ 25. 44 [#]
柳氮磺吡啶组 Sulfasalazine group	300	98. 49 $\pm$ 17. 64 [#]	300. 25 $\pm$ 19. 82 [#]	169. 79 $\pm$ 12. 32 [#]

注:与对照组相比, * $P<0. 05$;与模型组相比, [#] $P<0. 05$ 。
Note. Compared with control group, * $P<0. 05$. Compared with model group, [#] $P<0. 05$.

表 4 苦杏仁苷剂量依赖性降低氧化应激水平($\bar{x}\pm s$)
Table 4 Amygdalin dose-dependently reduces oxidative stress levels

分组 Groups	剂量 (mg/kg) Dose	SOD (U/mg)	MDA (U/mg)	GSH-Px (U/mg)
对照组 Control group	—	239. 69 $\pm$ 29. 39	2. 04 $\pm$ 0. 49	152. 48 $\pm$ 13. 87
模型组 Model group	—	86. 62 $\pm$ 10. 19 *	17. 56 $\pm$ 2. 33 *	54. 90 $\pm$ 2. 57 *
苦杏仁苷低剂量组 Amygdalin low-dose group	20	160. 63 $\pm$ 23. 77	15. 81 $\pm$ 2. 72	71. 59 $\pm$ 8. 93
苦杏仁苷中剂量组 Amygdalin middle-dose group	40	188. 08 $\pm$ 15. 91 [#]	12. 42 $\pm$ 0. 97 [#]	96. 22 $\pm$ 6. 96 [#]
苦杏仁苷高剂量组 Amygdalin high-dose group	80	223. 59 $\pm$ 25. 51 [#]	14. 74 $\pm$ 1. 84 [#]	109. 03 $\pm$ 11. 67 [#]
柳氮磺吡啶组 Sulfasalazine group	300	222. 81 $\pm$ 16. 20 [#]	8. 54 $\pm$ 1. 36 [#]	126. 10 $\pm$ 12. 82 [#]

注:与对照组相比, * $P<0. 05$;与模型组相比, [#] $P<0. 05$ 。
Note. Compared with control group, * $P<0. 05$. Compared with model group, [#] $P<0. 05$.

表 5 苦杏仁苷剂量依赖性降低 NLRP3、ASC、Caspase-1 蛋白表达($\bar{x}\pm s$)
Table 5 Amygdalin dose-dependently decreased NLRP3, ASC and Caspase-1 protein expression

分组 Groups	剂量 (mg/kg) Dose	NLRP3	ASC	Caspase-1
对照组 Control group	—	0. 02 $\pm$ 0. 01	0. 01 $\pm$ 0. 01	0. 01 $\pm$ 0. 01
模型组 Model group	—	0. 28 $\pm$ 0. 04 *	0. 26 $\pm$ 0. 06 *	0. 37 $\pm$ 0. 04 *
苦杏仁苷低剂量组 Amygdalin low-dose group	20	0. 25 $\pm$ 0. 04	0. 25 $\pm$ 0. 05	0. 33 $\pm$ 0. 05
苦杏仁苷中剂量组 Amygdalin middle-dose group	40	0. 07 $\pm$ 0. 03 [#]	0. 11 $\pm$ 0. 04 [#]	0. 07 $\pm$ 0. 03 [#]
苦杏仁苷高剂量组 Amygdalin high-dose group	80	0. 03 $\pm$ 0. 01 [#]	0. 04 $\pm$ 0. 02 [#]	0. 03 $\pm$ 0. 02 [#]
柳氮磺吡啶组 Sulfasalazine group	300	0. 02 $\pm$ 0. 01 [#]	0. 02 $\pm$ 0. 01 [#]	0. 02 $\pm$ 0. 02 [#]

注:与对照组相比, * $P<0. 05$;与模型组相比, [#] $P<0. 05$ 。
Note. Compared with control group, * $P<0. 05$. Compared with model group, [#] $P<0. 05$.

本研究结果显示,与对照组相比,模型组的 NLRP3、ASC、Caspase-1 表达水平显著升高;与模型组相比,苦杏仁苷中剂量组、苦杏仁苷高剂量组、柳氮磺嘧啶组 NLRP3、ASC、Caspase-1 水平显著下降。有研究显示,ASC、Caspase-1 可导致 NLRP3 的激活,参与组织损伤的发生、发展。受体蛋白 NLRP3、凋亡相关点样蛋白 ASC、Caspase-1 均是 NLRP3 炎性小体的组成部分,收到外来刺激时,ASC 使 pro-Caspase-1 转化为有活性的 Caspase-1,进而促进 pro-IL-1 和 pro-IL-18 向白细胞介素 1 (IL-1)、白细胞介素 18 (IL-18) 转化,增加了 IL-1、IL-18 含量,介导炎症反应的发生^[18-19]。结合本研究结果说明苦杏仁苷可以通过调控 NLRP3、ASC、Caspase-1 来缓解炎症反应,改善肠组织损伤。

综上所述,苦杏仁苷对新生大鼠坏死性小肠结肠炎有一定保护作用,可以有效减少肠组织损伤、降低机体炎症反应、氧化应激反应,减少肠组织细胞凋亡率,但具体的反应机制尚不够明确,有待临床进一步探究。

参考文献:

[1] 熊迪,贺巍,李颖,等. 溃疡性结肠炎患者结肠黏膜基因表达谱生物信息学分析 [J]. 解放军医药杂志, 2019, 31(11): 50-55.

[2] 邓国清,鲁利群,黄莉,等. 维生素 D 辅助治疗小儿轮状病毒性肠炎的效果及对免疫功能、胃肠激素的影响 [J]. 临床误诊误治, 2020, 3(8): 22-26.

[3] 吴美玉,黄永德,陈建兴,等. 康复新液、地衣芽孢杆菌及美沙拉嗪联合对活动期溃疡性结肠炎疗效及对 IL-23、IL-17、氧自由基、肠道菌群的改善作用 [J]. 解放军医药杂志, 2020, 236(2): 85-89.

[4] 程琳,徐发林,牛铭,等. 早产儿败血症的病原体及其临床特征 [J]. 中国当代儿科杂志, 2019, 21(9): 42-46.

[5] Elsaed WM. Amygdalin (Vitamin B17) pretreatment attenuates experimentally induced acute autoimmune hepatitis through reduction of CD4⁺ cell infiltration [J]. Ann Anat, 2019, 22(4): 124-132.

[6] Badr El-Kholy W, Abdel-Rahman SA, Abd El-Hady El-Safti FE, et al. Effect of vitamin B17 on experimentally induced colon cancer in adult male albino rat [J]. Folia Morphol (Warsz), 2021, 80(1): 158-169.

[7] Afrazi A, Sodhi CP, Good M, et al. Intracellular heat shock

protein-70 negatively regulates TLR4 signaling in the newborn intestinal epithelium [J]. J Immunol, 2012, 188(9): 4543-4557.

[8] 赵梅,张志宏,郭忠燕,等. 直肠癌患者外周血中 Galectin-3 mRNA、MUC1 mRNA 的表达及临床意义 [J]. 分子诊断与治疗杂志, 2019, 11(4): 68-72.

[9] 杜越,钟琴,冯慧,等. 影响新生儿坏死性小肠结肠炎严重程度的危险因素 [J]. 儿科药学杂志, 2019, 25(2): 22-25.

[10] 史佳民,范理宏. 苦杏仁苷抗肿瘤机制的研究进展 [J]. 生命的化学, 2019, 39(1): 147-152.

[11] 张莉野,田成旺,刘素香,等. 桂枝茯苓方的化学成分、药理作用及质量标志物 (Q-marker) 的预测分析 [J]. 中草药, 2019, 50(2): 6-13.

[12] Yang Y, Zhao J, Song X, et al. Amygdalin reduces lipopolysaccharide-induced chronic liver injury in rats by down-regulating PI3K/AKT, JAK2/STAT3 and NF- κ B signalling pathways [J]. Artif Cells Nanomed Biotechnol, 2019, 47(1): 2688-2697.

[13] El-Masry T, Al-Shaalan N, Tousson E, et al. Potential therapy of vitamin B17 against Ehrlich solid tumor induced changes in Interferon gamma, Nuclear factor kappa B, DNA fragmentation, p53, Bcl2, survivin, VEGF and TNF- α Expressions in mice [J]. Pak J Pharm Sci, 2020, 33(1): 393-401.

[14] 岳凌晨,马敬,王宁. 松果菊苷对大鼠抑郁模型线粒体损伤的修复作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(4): 63-69.

[15] Wang R, Zhang D, Sun K, et al. Amygdalin promotes the activity of T cells to suppress the progression of HBV-related hepatocellular carcinoma via the JAK2/STAT3 signaling pathway [J]. BMC Infect Dis, 2021, 21(1): 56.

[16] 王诗洋,王泉,徐祖清,等. 苦杏仁苷通过抑制氧化应激及炎症反应减轻四氯化碳诱导的大鼠肝纤维化作用 [J]. 现代免疫学, 2020, 40(6): 33-37, 43.

[17] Abboud MM, Awaida W, Alkhateeb HH, et al. Antitumor action of amygdalin on human breast cancer cells by selective sensitization to oxidative stress [J]. Nutr Cancer, 2019, 71(3): 483-490.

[18] 谢玥,张绍衡,熊瑶,等. PBMC 中 CARD9、MDC、IL32 在溃疡性结肠炎诊断和病情评估中价值 [J]. 分子诊断与治疗杂志, 2021, 13(8): 1329-1332.

[19] 吴可,苏鹏飞,佟延新. 美沙拉秦联合双歧杆菌嗜酸乳杆菌肠球菌三联活菌治疗溃疡性结肠炎效果及对患者血清 sRAGE、Vaspin、炎症因子等影响 [J]. 临床误诊误治, 2020, 33(2): 37-42.

[收稿日期] 2021-09-10