

氨甲喋呤诱导的大鼠持续性肠黏膜 损伤模型的建立与评价

涂杜¹, 徐志宏¹, 张名位², 张瑞芬², 邓媛元^{2*}

- (1. 广东省农业科学院动物卫生研究所, 广东省兽医公共卫生公共实验室, 广东省畜禽疫病防治研究重点实验室, 广州 510640;
2. 广东省农业科学院蚕业与农产品加工研究所, 农业部功能食品重点开放实验室, 广州 510610)

【摘要】 目的 建立一种大鼠肠黏膜持续损伤模型。方法 采用两次腹腔注射氨甲喋呤(methotrexate、MTX)建立大鼠肠黏膜持续损伤模型。实验期间记录进食量、体重变化, HE染色进行病理学分析, 分析血浆中的D-乳酸(D-lactate)、二胺氧化酶(diamine oxidase, DAO)及小肠组织中的髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)、丙二醛(malonaldehyde, MDA)水平。结果 造模后, 大鼠体重减轻、摄食量减少, 第4天大鼠小肠组织损伤评分(Chiu评分)均明显升高($P < 0.05$), D-乳酸含量、DAO与MPO活力、MDA含量均显著升高($P < 0.05$)。第5天大鼠开始恢复, 在第6天时空白组基本恢复正常。第二次注射后, 大鼠症状与第一次相似, 损伤后再次恢复, 第12天基本恢复正常。结论 20 mg/kg MTX诱发的大鼠肠黏膜损伤是一个急性损伤过程, 整个病程大约为4~5d, 适用于药物治疗评价; 两次间歇式10 mg/kg注射MTX可以造成大鼠肠黏膜的持续损伤, 由此成功建立肠黏膜持续损伤大鼠模型。

【关键词】 肠黏膜损伤; 模型; 氨甲喋呤; 营养治疗

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2015)04-0382-07

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2015.04.010

Establishment and assessment of a rat model of persistent intestinal mucosal injury induced by methotrexate

TU Du¹, XU Zhi-hong¹, ZHANG Ming-wei², ZHANG Rui-fen², DENG Yuan-yuan^{2*}

- (1. Guangdong Lab for Animal Diseases, Guangdong Open Laboratory of Veterinary Public Health, Institute of Animal Health, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China;
2. Key Laboratory of Functional Food, Ministry of Agriculture, Sericultural and Agri-Food Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510610)

【Abstract】 Objective To establish a rat model of persistent intestinal mucosal injury. **Methods** The rat model of persistent intestinal mucosal injury was induced by intraperitoneal injection of methotrexate. The food intake and body weight of all the rats were recorded. Pathological changes were observed using HE staining, the level of D-lactate and diamine oxidase in plasma, and myeloperoxidase and malondialdehyde in the intestinal tissue were measured by biochemistry. **Results** After modeling, the rat body weight and food intake were decreased. On day 4, the scores of mucosal damage, the levels of plasma D-lactate, DAO, MPO and MDA were significantly increased ($P < 0.05$). On day 5, the intestinal damages of rats began to restore, and there was no significant difference among groups on day 6. The symptoms after the secondary injection were similar to those after the first injection, and the rats recovered gradually at day 12. **Conclusions** Intestinal mucosal injury in rats induced by 20 mg/kg MTX is an acute injury process, the course only lasts for 4-5 days.

[基金项目]“十二五”国家科技支撑计划项目(012BAD33B10、2012BAD37B08);广东省科技计划项目(2012B080701007);广东省重大科技专项(2011A080403019);广东省科技计划项目(2012A031100013);广州市对外科技合作项目(2013J4500023);广州市民生科技重大专项(201300000077)。

[作者简介]涂杜(1990-),女,硕士研究生,E-mail: tudu0719@sina.com。

[通讯作者]邓媛元,(1982-),女,硕士,副研究员,E-mail: yuanyuan_deng@yeah.net。

Intermittent injections twice of 10 mg/kg MTX can cause persistent intestinal mucosal injury in rats. This persistent injury model is more suitable for nutritional therapy evaluation in medium-and long-term studies of nutritional therapy.

【Key words】 Intestinal mucosal injury, persistent; Rat; Model; Methotrexate; Nutritional therapy

肠黏膜屏障损伤是肿瘤患者化疗过程中常见的并发症^[1]。化疗药物尤其是大剂量化疗药物可对胃肠道造成损伤,引起恶心、呕吐、腹泻、食欲减退等一系列胃肠道症状,严重影响患者化疗进程以及疾病预后^[2-3]。为了评价机体在化疗过程中由于肠黏膜损伤引起的代谢、营养、免疫等多方面的生理病理改变,为合理的营养膳食和药物治疗提供指导,建立合适的化疗型肠黏膜损伤动物模型显得尤为重要。

化疗造成的肠黏膜炎动物模型的建立以前已有报道,其方法为一次性腹腔注射大剂量(20 mg/kg) MTX 造成大鼠肠黏膜损伤。Mehmet 等^[4]研究发现 20 mg/kg MTX 可导致 Wistar 大鼠小肠黏膜损伤严重。该方法造成的肠黏膜损伤为急性损伤,持续时间一般为 4~5d,之后逐渐恢复,也有部分动物在该过程中因损伤严重造成死亡。该模型展现了化疗造成的肠黏膜损伤的典型发病特征,主要用于评价短期内作用显著的化学药物或单一营养素的治疗效果,但不适合中长期营养支持的整体效果评价。化疗是间歇性用药的周期过程,在化疗期间给予患者全面的肠内营养支持不仅可以恢复肠道功能、维护肠黏膜屏障功能,对于加强机体免疫能力和促进康复也有积极作用。为了更好的模拟化疗进程,评估中长期营养支持对化疗造成的肠黏膜炎康复促进作用,本研究以 SD 大鼠(Sprague-Dawley rats)为实验动物,建立一种大鼠持续性肠黏膜损伤模型,以达到损伤持续周期长、不会因用药剂量过大造成动物死亡等效果,适用于研究化疗造成的肠黏膜损伤对机体的生理病理影响和评价长期营养支持的整体应用效果。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级 SD 雄性大鼠 100 只,体重(200 ± 20)g,由南方医科大学实验动物中心【SCXK(粤)2013-0020】提供,整个实验过程均在标准的 SPF 级动物实验室【SYCK(粤)2011-0116】中进行,室温维持在 22~25℃,湿度为(50 ± 5)%,每笼 5 只,采用 12 h:12 h 昼夜间断照明,每天定量添加饲料 1 次(饲料为普通实验鼠颗粒饲料,由南方医科大学实验动物中心提供),换水 1 次。适应性饲养一周后

随机分为四组,开始实验。

1.1.2 试剂

注射用氨甲喋呤购于山西普德药业股份有限公司;D-乳酸标准品及 D-乳酸脱氢酶(D-LDH)、二胺氧化酶标准品(DAO)均购于 Sigma 公司,尸胺二氯化物购于东京化成工业株式会社,邻联茴香胺、辣根过氧化物酶、氧化型辅酶 I 和肝素钠均购于广州市齐云生物技术有限公司,MPO、MDA 试剂盒购于南京建成生物研究所,其他试剂均为国产分析纯。

1.1.3 主要仪器

高速/冷冻离心机(Thermo,美国),-80℃低温冰箱(Thermo,美国),低速离心机(Thermo,美国),酶标仪(Tecan,瑞士),紫外分光光度计 UV-1800(岛津,日本),差相荧光倒置显微镜(Leica,德国)。

1.2 方法

1.2.1 大鼠肠黏膜炎模型的建立

采用 MTX 诱导肠黏膜损伤动物模型^[6]。100 只大鼠随机分为空白组(control group)、模型组 I(MTX group I)、模型组 II(MTX group II)和模型组 III(MTX group III),MTX group I 10 只,其余每组各 30 只。第 0 天,MTX group I 大鼠注射 MTX(20 mg/kg);MTX group II 和 MTX group III 大鼠注射 MTX(10 mg/kg)。在第 6 天,MTX group II 大鼠再次注射 10 mg/kg MTX;MTX group III 大鼠再次注射 5 mg/kg MTX。control group 在第 0 天和第 6 日均注射等量的生理盐水。MTX group I 在第 4 天全部处死;其余每组于造模后第 4、5、6、10、11、12 天各处死 5 只大鼠,进行指标分析。

1.2.2 标本收集

乙醚麻醉大鼠后,将其仰卧固定于手术台,沿腹部正中切口,首先心脏取血 5 cm,置于装有肝素钠的离心管,离心分离血浆后 -80℃ 保存待测。然后分离小肠组织,沿肠系膜纵轴剪开,用冰生理盐水冲洗净,肉眼观察大体形态并进行评分,同时取距回盲瓣 5 cm 处的 3 cm 回肠组织置于 4% 中性甲醛溶液固定,HE 染色,光镜下观察组织学改变并评分,距 10 cm 处取 5 cm 小肠称重,-80℃ 保存待测。

1.2.3 观察指标及测定方法

(1) 体重和进食量记录:实验期间,每日上午 9 时喂食,并记录大鼠体重,次日 9 时称剩余饲料重,计算大鼠 24 h 进食量,摄食量 = (饲料总量 - 饲料

余量)/只数。

(2)形态学观察、病理学分析及小肠组织损伤评分:将在甲醛中固定的小肠组织,常规石蜡包埋、切片、酒精梯度脱水、苏木素-伊红(HE)染色、在光镜下观察组织形态学改变。肠黏膜损伤程度按 Chiu 氏六级评分法^[6]进行组织病理评分。其中采用盲法进行评分,评分人数为 2 人。

(3) D-乳酸测定:参照文献^[7]方法测定。

(4) DAO 测定:参照文献^[8]方法测定。

(5) MPO 测定:采用比色法测定,实验步骤参照试剂盒说明书要求严格操作。

(6) MDA 测定:采用硫代巴比妥酸(TBA)法,实验步骤参照试剂盒说明书要求严格操作。

1.3 统计学分析

所有结果均使用 SPSS 17.0 统计软件分析。多组间比较采用单因素方差分析,两两比较

采用 Duncan 法;两组间比较采用两独立样本的 *t* 检验。结果以均数 ± 标准差表示, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 大鼠进食量和体重变化

如图 1 和图 2 所示,在实验期间,空白组大鼠的进食量和体重正常,呈缓慢增加。MTX group I 大鼠的进食量明显下降,同时伴随着体重的显著降低。从第 1 天开始,MTX group II 和 MTX group III 的进食量和体重逐渐下降,到第 4 天降到最低,从第 5 天开始两组大鼠进食迅速恢复,体重也逐渐回升;第 2 次注射 MTX 后大鼠的进食量和体重变化与第 1 次相似,但程度均有减弱,且 MTX group III 第 2 次注射 MTX 后进食量和体重下降程度均低于 MTX group II。由此可见 MTX 导致的肠黏膜损伤是一个急性损伤过程,病程较短,且随着剂量增加,损伤程度加重。

2.2 大鼠小肠 HE 染色切片观察

显微镜下观察大鼠 HE 染色切片,发现空白组大鼠小肠肠壁层次清晰,结构完整,小肠绒毛排列紧密,如图 3A。MTX group I 大鼠在第 4 天小肠黏膜和黏膜下层间质水肿严重,毛细血管充血,小肠绒毛排列紊乱,高矮不一,大量倒伏、融合,绒毛尖端大量脱落,与固有层分离,隐窝形态和杯状细胞缺失,炎症细胞浸润(图 3B)。MTX group II 和 MTX group III 大鼠(图 3C)小肠黏膜与 MTX group I 形态相似,但损伤程度稍轻,第 5 天绒毛排列比较整齐,部分绒毛脱落,与固有层分离,如图 3D;第 6 天大鼠小肠上

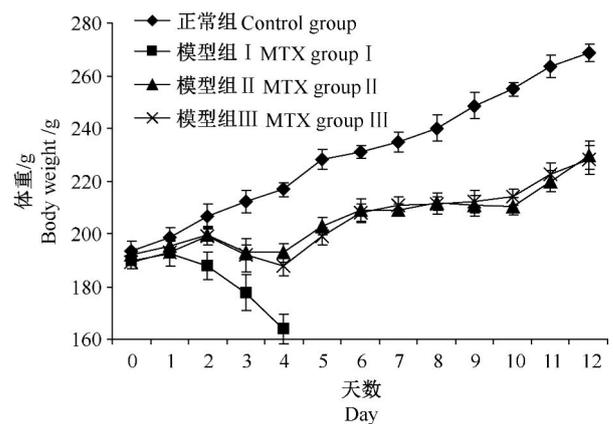


图 1 实验期间大鼠体重的变化

Fig. 1 Changes of body weight of the rats during the experiment

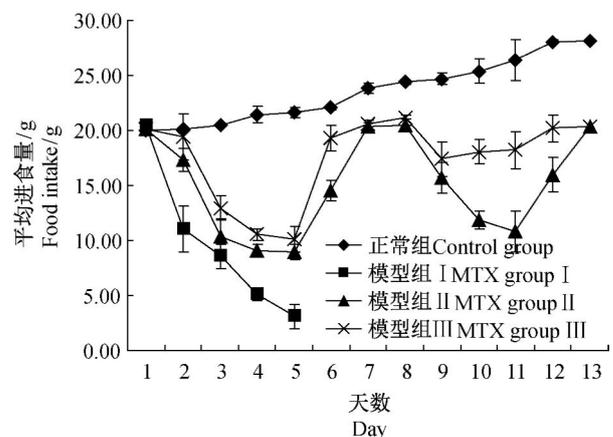


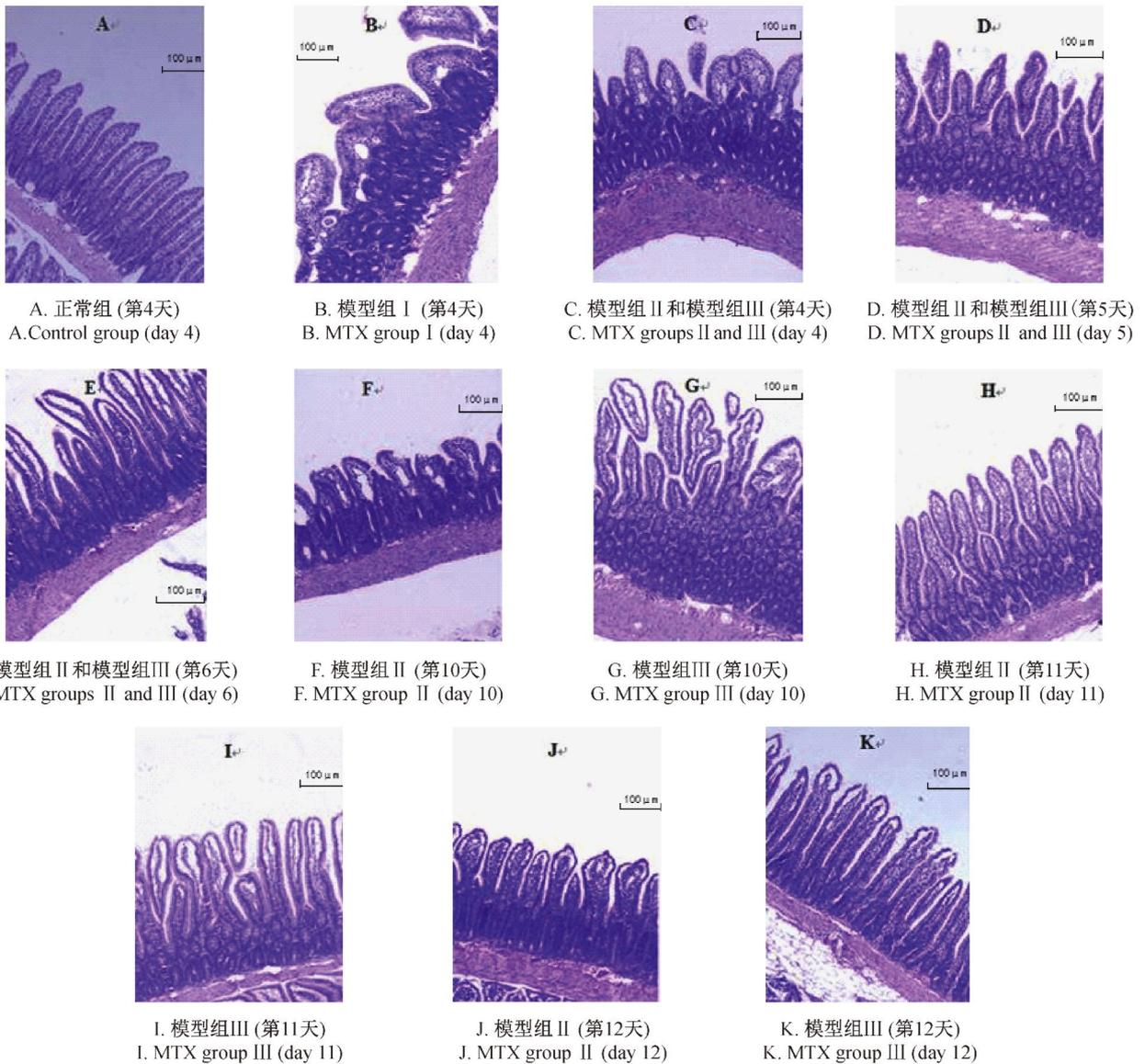
图 2 实验期间大鼠进食量变化

Fig. 2 Changes of food intake of the rats during the experiment

皮结构比较完整,只有部分绒毛高矮不一,基本恢复正常如图 3E。第 10 天 MTX group II 大鼠小肠黏膜形态出现小肠绒毛融合、肿大,固有层水肿等(图 3 F),MTX group III 大鼠小肠黏膜损伤程度小于 MTX group II,仅部分绒毛脱落,间质水肿(图 3 G)。第 11、12 天 MTX group II 大鼠开始慢慢好转,小肠上皮结构也较第 10 天完整(图 3 H, J)。MTX group III 第 11 天已经基本恢复正常(图 3 I),第 12 天与空白组无明显差异(图 3 K)。

2.4 大鼠小肠组织损伤程度评分

如表 1 所示,三个模型组 Chiu 评分在第 4 天达到最大,与空白组差异有显著性($P < 0.05$)。到第 6 天,MTX group II、MTX group III 和空白组的 Chiu 评分差异仍有显著性($P < 0.05$);第 2 次注射 MTX 后,MTX group II 和 MTX group III Chiu 评分在第 10 天达到最大,与空白组差异均有显著性($P < 0.05$),



注:图中 MTX group II 和 MTX group III (day 4, 5, 6) (图 C、D、E) 为该两组中随机抽取的大鼠小肠组织切片。

图 3 大鼠小肠 HE 染色切片 (×200)

Note. Fig. C, D and E: Intestine samples randomly selected from the MTX groups II and III.

Fig. 3 Histology of the rat small intestine. HE staining, ×200

且 MTX group II 显著高于 MTX group III ($P < 0.05$), 第 11 天开始两模型组 Chiu 评分逐渐减小, 但仍然显著高于空白组 ($p < 0.05$), 且 MTX group II 与 MTX group III 之间差异也有显著性, MTX group II 显著高于 MTX group III ($P < 0.05$), 到第 12 天时, 三组差异无显著性。

2.5 大鼠血浆 D-乳酸含量

D-乳酸是哺乳动物肠道内固有细菌发酵代谢的终产物, 血液中的 D-乳酸基本上来源于肠道。当肠黏膜屏障受损时, 肠黏膜绒毛顶端上皮脱落, 通透性增加, 同时局部细菌大量增殖, 产生的 D-乳酸即可通过受损肠黏膜经循环入血, 并在血中蓄积, 使血浆 D-

乳酸水平快速升高。D-乳酸在外周血中水平可反映肠黏膜损害程度和通透性变化^[9]。如图 4 所示, 在第 4 天, 造模后的三组大鼠血浆中 D-乳酸含量明显高于空白组 ($P < 0.05$), 说明 20 和 10 mg/kg MTX 均可以导致大鼠小肠黏膜严重损伤。第 5 天开始, MTX group II 和 MTX group III 的 D-乳酸含量逐渐下降, 但第 6 天其含量仍显著性高于空白组 ($P < 0.05$)。第 2 次注射 MTX 后, 第 10 天 MTX group II 和 MTX group III 的 D-乳酸含量达到最大, 与空白组均有显著性差异 ($P < 0.05$), 且 MTX group II 的 D-乳酸含量显著性高于 MTX group III ($P < 0.05$)。到第 12 天, 三组大鼠血浆中 D-乳酸含量差异无显著性。

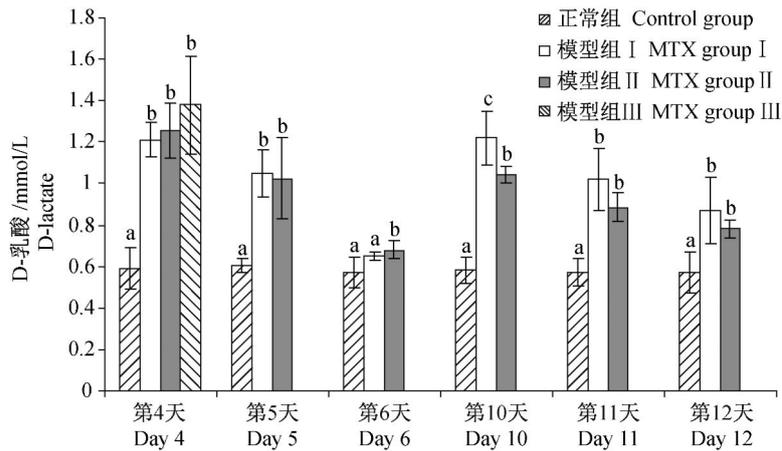
表 1 大鼠小肠组织损伤程度评分($n=5$)

Tab.1 The scores for small intestine tissue injury in the rats (Chiu scores)

组别 Groups	第 4 天 Day 4	第 5 天 Day 5	第 6 天 Day 6	第 10 天 Day 10	第 11 天 Day 11	第 12 天 Day 12
正常组 Control group	0.40 ± 0.14 ^a	0.44 ± 0.23 ^a	0.44 ± 0.15 ^a	0.36 ± 0.15 ^a	0.36 ± 0.23 ^a	0.48 ± 0.27
模型组 I MTX group I	3.12 ± 0.11 ^c	—	—	—	—	—
模型组 II MTX group II	2.81 ± 0.33 ^b	1.56 ± 0.15 ^b	0.68 ± 0.20 ^b	3.00 ± 0.46 ^c	1.64 ± 0.15 ^c	0.64 ± 0.15
模型组 III MTX group III	2.85 ± 0.23 ^b	1.60 ± 0.23 ^b	0.72 ± 0.15 ^b	1.92 ± 0.23 ^b	0.8 ± 0.14 ^b	0.48 ± 0.11

注:不同小写字母表示同一天不同组别在 0.05 水平上差异有显著性($P < 0.05$),下表同。

Note. Values of different letter superscripts mean significant difference in the same day among different groups($P < 0.05$). The same as the follows.

图 4 大鼠血浆中 D-乳酸含量的变化($n=5$)Fig.4 Changes of D-lactate in the rat plasma ($n=5$)

2.6 大鼠血浆中 DAO 活力

DAO 是哺乳动物小肠黏膜上层绒毛细胞胞质中具有高度活性的细胞内酶,在肠黏膜绒毛受损时,由肠黏膜细胞释放的 DAO 大量地流入血液中,使其在血中浓度大幅上升,所以血液中 DAO 活性的高低反映了小肠黏膜上皮结构和功能的完整性^[10-11]。如图 5 所示,在第 4 天,造模后的三组大鼠血浆中 DAO 活力明显高于空白组($P < 0.05$)。第 5 天开始,MTX group II 和 MTX group III 活力逐渐下降,第 6 天 MTX group II、MTX group III 与空白组之间差异无显著性($P > 0.05$)。第 2 次注射 MTX 后,第 10 天 MTX group II 和 MTX group III 的 DAO 活力达到最大,与空白组比较差异均有显著性($P < 0.05$),且 MTX group II 的 DAO 活力显著性高于 MTX group III($P < 0.05$)。第 12 天 MTX group II 血浆中 DAO 活力仍显著性高于空白组($P < 0.05$),而此时 MTX group III 和空白组之间差异无显著性($P > 0.05$)。

2.7 大鼠小肠组织 MPO 活力

研究表明,中性粒细胞是引起组织损伤,乃至多器官功能衰竭的关键细胞。它在肠道损伤后引起局部和全身炎症反应中起到关键作用^[12]。而 MPO 是中性粒细胞特有的酶,其活性大小与中性粒细胞的数量相关,反映了肠组织损伤过程中中性粒细胞的

浸润程度^[13]。如图 6 所示,在第 4 天,造模后的三组大鼠小肠组织中 MPO 活性明显高于空白组($P < 0.05$),第 5 天开始,MTX group II 和 MTX group III MPO 活力逐渐下降,但两组与空白组之间仍差异有显著性($P < 0.05$)。第 6 天,三组间已无明显差异($P > 0.05$)。第 2 次注射 MTX 后,第 10 天 MTX group II 和 MTX group III 的 MPO 活力达到最大,其中 MTX group III 与空白组差异有显著性($P < 0.05$)。到第 11 天 MTX group II 中 MPO 活力仍显著高于空白组($P < 0.05$)。第 12 天三组之间 MPO 活力恢复到同一水平($P > 0.05$)。

2.8 大鼠小肠组织 MDA 含量

肠黏膜炎症过程中会产生大量的自由基(OFR),这些 OFR 可以攻击细胞各种成分,引发脂质过氧化反应,形成脂质自由基和过氧化物,从而造成细胞结构损伤,功能代谢障碍^[14]。小肠组织内有着丰富的不饱和脂肪酸,最易发生脂质过氧化反应而造成损伤。稳定性较高的脂质过氧化反应产物 MDA 的含量可以反映细胞脂质过氧化的程度^[15]。如图 7 所示,在第 4 天,造模后的三组大鼠小肠组织中 MDA 活性明显高于空白组($P < 0.05$),第 5 天开始,MTX group II 和 MTX group III 的 MDA 含量逐渐下降,但两组与空白组之间仍有显著性差异($P <$

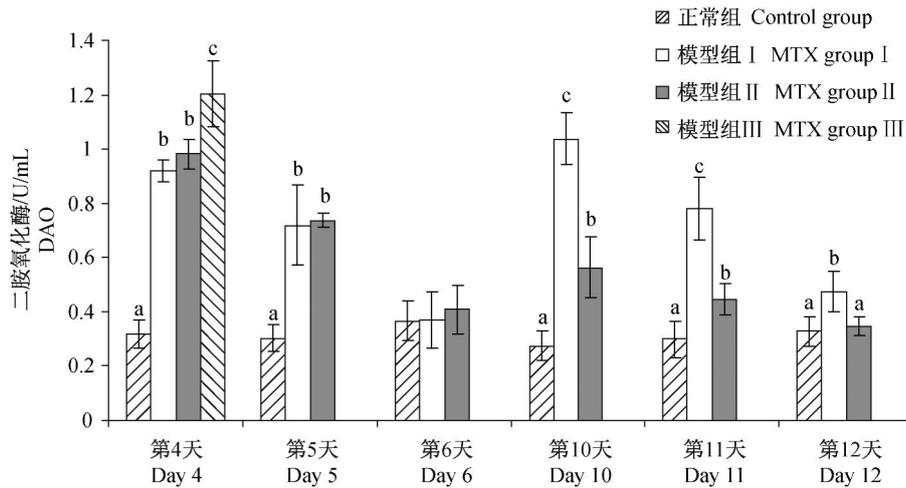


图5 大鼠血浆中 DAO 活力的变化 ($n = 5$)

Fig.5 Changes of DAO in the rat plasma ($n = 5$)

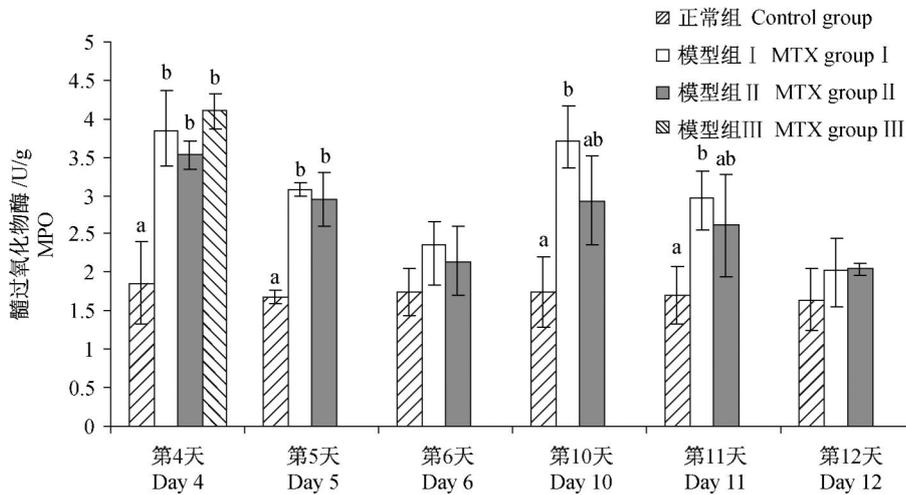


图6 大鼠小肠组织中 MPO 活力的变化 ($n = 5$)

Fig.6 Changes of MPO in the rat small intestine tissues ($n = 5$)

0.05)。第6天,三组间已无明显差异 ($P > 0.05$)。第2次注射 MTX 后,第10天 MTX group II 和 MTX group III 小肠组织中 MDA 含量达到最高,其中 MTX group II 与空白组有显著性差异 ($P < 0.05$)。到第11天 MTX group II 中 MDA 含量仍显著高于空白组 ($P < 0.05$)。第12天三组之间 MDA 含量恢复到同一水平 ($P > 0.05$)。

3 讨论

化疗代谢药物 MTX 引起肠黏膜损伤的作用机制主要是通过直接抑制小肠上皮细胞 DNA 的合成,从而导致肠隐窝细胞有丝分裂减弱和肠绒毛缩短,直至肠隐窝形态消失、绒毛皱缩脱落。本次实验发现大鼠注射 MTX 后小肠黏膜下层间质水肿,毛细血管充血,隐窝消失,绒毛萎缩、融合,混合细胞浸润,病理特征与 Kollı 等^[16]研究结果相似。本次实验发

现 SD 大鼠注射 MTX (20 mg/kg) 后,大鼠肠黏膜损伤严重,体重、进食量下降,腹泻严重,第4天发现有3只死亡。

本研究还发现,20 和 10 mg/kg 的 MTX 均可导致大鼠肠黏膜损伤,造模后大鼠血浆中 D-乳酸含量和 DAO 活力均显著升高,且小肠组织中 MPO 活力和 MDA 含量升高,其在第4天达到最高,之后慢慢下降,在第6天就基本恢复正常。结合前人的研究结果和本实验结果可知 MTX 引发的大鼠肠黏膜炎是一个急性损伤过程,整个周期只能维持 4 ~ 5d。而 Howarth 等^[17]的研究也证实 MTX 导致的肠黏膜损伤在第6或7天就基本可以恢复正常。由此可知单剂量注射 MTX 虽然展现了化疗造成的肠黏膜炎的典型发病特征,但仅适用于评价短期内作用显著的化学药物或单一营养素的治疗效果,不适合中长期营养支持的整体效果评价。为了延长大鼠肠黏膜

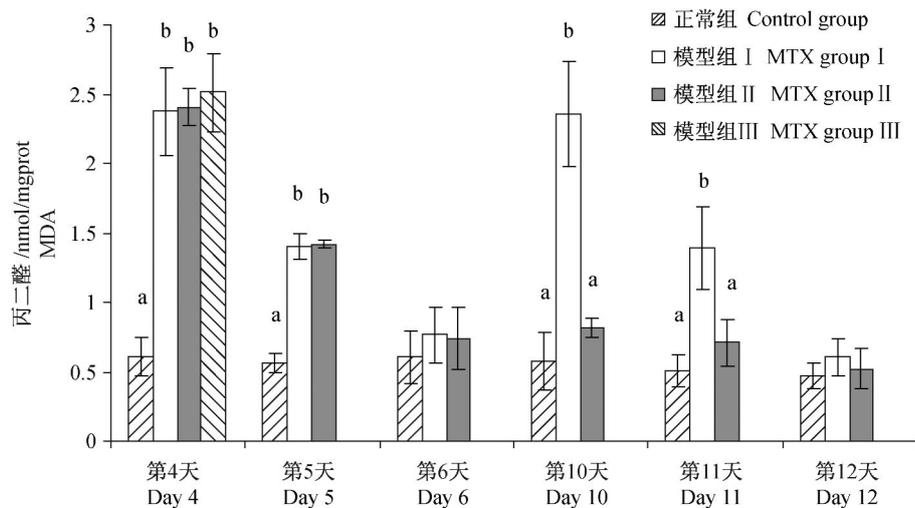


图 7 大鼠小肠组织中 MDA 含量的变化 ($n=5$)

Fig. 7 Changes of MDA in the rat small intestinal tissues ($n=5$)

损伤时间,降低死亡率,本文试图模拟临床上肿瘤患者连续化疗的方法,在损伤恢复后再次注射 MTX,造成持续性肠黏膜损伤。由于 20 mg/kg 剂量较高,一次性注射后已经造成 30% 的大鼠死亡,于是本文降低 MTX 剂量,并通过二次注射,造成大鼠肠黏膜二次损伤,由此整个损伤周期可以延长至 12d。此外,研究发现在第 2 次注射 MTX 后大鼠症状与第一次相似,但损伤程度低于第 1 次,可能是连续二次注射,大鼠对 MTX 产生了耐药性。同时我们还发现第 2 次以 5 mg/kg MTX 注射,大鼠肠黏膜损伤较轻微,修复较快,在第二次注射后 3~4 d 基本与正常组无差异。因此本研究采用间歇式两次腹腔注射 10 mg/kg MTX,造成肠黏膜持续损伤,由此成功建立肠黏膜持续损伤大鼠模型,其病理生理特征,与临床研究结果基本吻合。此模型更加适合于非药物型营养品的中长期治疗评价,为临床肠内营养品治疗肠黏膜损伤提供了评价平台。

参 考 文 献

- [1] Gibson RJ. Gut microbiome and intestinal mucositis: A new challenge for researchers [J]. *Cancer Biol Ther*, 2009, 8(6): 512-513.
- [2] Sonis ST. Regimen-related gastrointestinal toxicities in cancer patients [J]. *Curr Opin Support Palliat Care*, 2010, 4: 26-30.
- [3] Chipponi J, Huguier M, Pezet D, et al. Randomized trial of adjuvant chemotherapy after curative resection for gastric cancer [J]. *Am J Surg*, 2004, 187: 440-445.
- [4] Mehmet Y, Ayhan E, Ahmet C. Effect of aged garlic extract against methotrexate-induced damage to the small intestine in rats [J]. *Phytother Res*, 2006, 20: 504-510.
- [5] El-Boghdady NA. Protective effect of ellagic acid and pumpkin seed oil against methotrexate-induced small intestine damage in rats [J]. *Ind J Biochem Biophys*, 2011, 48(6): 380-387.
- [6] Chiu CJ, McArdle AH, Brown R, et al. Intestinal mucosal lesion in low-flow states: I. A morphological hemodynamic and metabolic reappraisal [J]. *Arch Surg*, 1970, 101(4): 478-483.
- [7] Brandt RB, Siegel SA, Waters MG, et al. Spectrophotometric assay for D-(-)-lactate in plasma [J]. *Anal Biochem*, 1980, 102(1): 39-46.
- [8] 黎君友, 于燕. 分光光度法测定血和小肠组织二胺氧化酶活性 [J]. *氨基酸和生物资源*, 1996, 18(4): 28-30.
- [9] Rub J, Vogel F, Schmidt E, et al. Effects of hydrogen peroxide scavenger catalase on villous microcirculation in the rat small intestine in a model of inflammation bowel disease [J]. *Microvasc Res*, 2000, 59(3): 329-337.
- [10] Hosoda N, Nishi M, Nakagawa M, et al. Structural and functional alterations in the gut of parenterally or enterally fed rats [J]. *J Surg Res*, 1989, 47(2): 129-133.
- [11] 袁丽珍, 董红林. 放射损伤后肠粘膜和血浆中二胺氧化酶活性的变化 [J]. *中华放射医学与防护杂志*, 1994, 14(1): 32-34.
- [12] Chosay JG, Essani NA, Dunn CJ, et al. Neutrophil margination and extravasation in sinusoids and venules of liver during endotoxin-induced injury [J]. *Am J Physiol*, 1997, 5(272): 195-200.
- [13] Masahiko S, Shinichi U, Kenji K, et al. A potential role of hyperbaric oxygen exposure through intestinal nuclear factor [J]. *Crit CareMed*, 2004, 32: 1722-1729.
- [14] Erdogan H, Fadillioglu E, Yagmurca M, et al. Protein oxidation and lipid peroxidation after renal ischemia-reperfusion injury: protective effects of erdosteine and N-acetylcysteine [J]. *Urol Res*, 2006, 34(1): 41-46.
- [15] 金惠铭, 王建枝. 病理生理学 [M]. 第 6 版. 北京: 人民卫生出版社, 2004, 202-205.
- [16] Kolli VK, Abraham P, Isaac B, et al. Preclinical efficacy of melatonin to reduce methotrexate-induced oxidative stress and small intestinal damage in rats [J]. *Dig Dis Sci*, 2013, 58(4): 959-969.
- [17] Howarth GS, Francis GL, Cool JC, et al. Milk growth factors enriched from cheese whey ameliorate intestinal damage by methotrexate when administered orally to rats [J]. *J NUTR*, 1996, 126(10): 2519-2530.

[收稿日期] 2015-01-23