

· 基础研究 ·

黄连碱通过调控 I κ B α /NF- κ B 通路防治化疗相关性腹泻的实验研究

张新峰¹ 乔翠霞² 程旭锋³ 刘琦³ 王怀璋¹ 刘怀民¹ 高启龙¹ 杨峰¹

摘要 目的 观察黄连碱对化疗相关性腹泻(CID)裸鼠的保护作用,并探讨其作用机制。**方法** 32 只裸鼠随机分为正常组、模型组、洛哌丁胺组、黄连碱组,每组 8 只;正常组腹腔注射 1 mL 生理盐水,模型组、洛哌丁胺组、黄连碱组均腹腔注射伊立替康溶液(剂量为 350 mg/kg)进行造模。正常组、模型组均灌胃 1 mL 0.5% CMC-Na 溶液,洛哌丁胺组灌胃洛哌丁胺混悬液(0.3 mg/kg),黄连碱组灌胃黄连碱混悬液(30 mg/kg),2 次/天,共 4 天。观察裸鼠腹泻情况、小肠病理改变,ELISA 法检测回肠组织中肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白介素-6(IL-6)含量,Western blot 法检测核因子 κ B(NF- κ B)抑制蛋白 α (I κ B α)、NF- κ B p65 蛋白表达。**结果** 正常组均未发生腹泻,模型组、洛哌丁胺组及黄连碱组均出现腹泻;与模型组比较,洛哌丁胺组、黄连碱组 2~3 分腹泻发生率及腹泻评分均明显下降($P < 0.05$, $P < 0.01$)。洛哌丁胺组回肠破坏程度较模型组稍减轻,差异无统计学意义($P > 0.05$),黄连碱组裸鼠回肠黏膜损伤程度较模型组及洛哌丁胺组均明显减轻($P < 0.01$)。与正常组比较,模型组回肠组织中 TNF- α 、IL-6 及 NF- κ B p65 表达均升高($P < 0.01$),I κ B α 表达明显降低($P < 0.01$);与模型组和洛哌丁胺组比较,黄连碱组 TNF- α 、IL-6 及 NF- κ B p65 表达均明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),I κ B α 表达均明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论** 黄连碱可降低伊立替康引起的 CID 发生率,减轻腹泻程度及回肠黏膜损伤,其机制可能与其上调 I κ B α 表达,抑制 NF- κ B 通路活化,减轻肠道炎症反应有关。

关键词 黄连碱;化疗相关性腹泻;炎症细胞因子;核因子 κ B 抑制蛋白 α ;核因子 κ B

Coptisine Regulated I κ B α /NF- κ B Signaling Pathway to Treat Chemotherapy-induced Diarrhea Mice
ZHANG Xin-feng¹, QIAO Cui-xia², CHENG Xu-feng³, LIU Qi³, WANG Huai-zhang¹, LIU Huai-min¹,
GAO Qi-long¹, and YANG Feng¹ 1 Department of Integrated TCM & Western Medicine, Cancer Hospital Affiliated to Zhengzhou University, Zhengzhou (450008); 2 Department of Oncology, Henan Academy of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou (450008); 3 Office of Academic Research, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou (450008)

ABSTRACT Objective To observe the therapeutic efficacy of coptisine on mice with chemotherapy-induced diarrhea (CID), and to study its underlying mechanisms of action. **Methods** Totally 32 nude mice were randomly divided into the normal group, the model group, the loperamide group, and the coptisine group, 8 in each group. Irinotecan solution (350 mg/kg) was injected into the abdominal cavity to establish CID model to mice of all groups except the normal group. Physiological saline (1 mL) was injected into the abdominal cavity of mice in the normal group. Mice in the coptisine group were administered with coptisine (30 mg/kg) by gastrogavage. Mice in both normal group and model group were administered with 1 mL physiological saline (0.5% CMC-Na) by gastrogavage. Mice in the loperamide group were administered with loperamide (0.3 mg/kg) by gastrogavage. All treatments were performed twice

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81603469);河南省科技攻关项目(No. 162102310331);河南省基础与前沿技术研究(No. 132300410042, 152300410240)

作者单位:1.郑州大学附属肿瘤医院中医内科(郑州 450008);2.河南省中医药研究院肿瘤科(郑州 450008);3.河南中医药大学科研处(郑州 450008)

通讯作者:杨峰, Tel: 0371-65587091, E-mail: 15890114393@163.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20180620.141

per day for a total of 4 days. Diarrhea and pathological changes of small intestine were observed. Contents of cytokines (TNF- α and IL-6) in ileum were detected using ELISA. Expressions of nuclear factor- κ B α arrestin (I κ B α) and nuclear factor- κ B p65 (NF- κ B p65) were detected by Western blot. Results No diarrhea occurred in naked mice of the normal group. But diarrhrea occurred in the rest 3 groups. The incidence of grade II-III diarrhea and diarrhea score were lower in the loperamide group and the coptisine group than in the model group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The destruction of the ileum were slightly ameliorated in the loperamide group than in the model group, but with no statistical difference ($P > 0.05$). The degree of ileum mucosal damage in the coptisine group was significantly lessened, as compared with that in the model group and the loperamide group ($P < 0.01$). Compared with the normal group, the expressions of TNF- α and IL-6, NF- κ B p65 in the model group increased significantly ($P < 0.01$), I κ B α expression decreased significantly ($P < 0.01$). Compared with the model group and the loperamide group, the expressions of TNF- α and IL-6, NF- κ B p65 in the coptisine group were significantly reduced ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and the expression of I κ B α increased significantly ($P < 0.01$). Conclusion Coptisine could reduce the incidence of CID induced by irinotecan, attenuate the degree of diarrhea and ileum mucosal damage, and its mechanisms might be associated with up-regulating I κ B α expression, inhibiting the activation of NF- κ B signaling pathway, and attenuating intestinal inflammatory response.

KEYWORDS coptisine; chemotherapy-induced diarrhea; inflammatory cytokine; I κ B α ; NF- κ B

化疗是恶性肿瘤的重要治疗手段,伴随而来的化疗相关性腹泻(chemotherapy-induced diarrhea, CID),可严重影响患者的生活质量,使化疗延期或中断,甚至导致患者死亡^[1];大剂量的洛哌丁胺、奥曲肽等西药虽可部分缓解 CID 的症状,但其不良反应又为患者增加了新的痛苦,临床上依然缺乏安全、有效的 CID 防治方案^[2]。前期研究发现香连丸防治 CID 安全、有效^[3-5];黄连碱为香连丸的主要活性成分之一,具有抗感染^[6]、保护消化道黏膜^[7]、抗肿瘤^[8]等多种药理活性。本研究旨在探究黄连碱对 CID 裸鼠肠道损伤的影响及其作用机制,为其在 CID 治疗中的应用提供一定的实验依据。

材料与方 法

1 动物 32 只 6~7 周龄雄性 SPF 级 BALB/c 裸鼠,体重 20~22 g,由上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供,许可证证号:SCXK(沪)2013-0016,饲养温度 22~25℃,相对湿度 50%~60%,自由进食和饮水,适应性饲养 1 周后开始实验。该实验对动物的处理严格遵守中华人民共和国科技部 2006 年颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》。

2 药物 盐酸黄连碱(纯度 >98%),购自中国食品药品检定研究院(批号:110733);伊立替康(CPT-11),购自江苏恒瑞医药股份有限公司(批号:14110616);洛哌丁胺购自西安杨森制药有限公司(批号:131211658)。

3 试剂与仪器 核因子 κ B p65(NF- κ B p65)

抗体(批号:ab95020)、NF- κ B 抑制蛋白 α (I κ B α) 抗体(批号:ab32518)和 β -肌动蛋白(β -actin)抗体(批号:ab54724),均购于英国 Abcam 公司;白介素 6(IL-6)酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒购于上海蓝基生物科技有限公司(批号:E02I0006);肿瘤坏死因子 α (TNF- α) ELISA 试剂盒购于武汉博士德生物工程有限公司(批号:EK0526)。

仪器:AS20500A 超声波清洗器(购自天津奥特赛恩斯仪器有限公司);Millipore 纯水系统(购自美国 Millipore 公司);XS-105 十万分之一电子天平(购自瑞士 Mettler Toledo 公司);Backman Allegra 64R 高速冷冻离心机(购自美国 Backman Coulter 公司);Thermo 902-ULTS 超低温冰箱和 Multiskan MK3 酶标仪(均购自美国 Thermo 公司);POWER PAC1000 蛋白电泳系统和 Gel Doc XR+凝胶成像仪(均购自美国 Bio-Rad 公司)。

4 药物配制 精密称取黄连碱,溶于 0.5% 羧甲基纤维素钠(CMC-Na)生理盐水溶液,制备浓度为 600 mg/L 的黄连碱混悬液;以同样的方法制备浓度为 6 mg/L 的洛哌丁胺混悬液。伊立替康溶于生理盐水,制备成 7 mg/mL 的生理盐水溶液,避光,4℃保存。

5 动物模型制备、分组与给药 CID 模型制备方法:根据参考文献[4,5],采用腹腔内注射 CPT-11 溶液(剂量为 350 mg/kg)法建立 CID 裸鼠模型。

分组与给药:采用 Excell“随机数发生器”将 32 只裸鼠随机分为正常组、模型组、洛哌丁胺组、黄连

碱组,每组 8 只。正常组腹腔灌注 1 mL 生理盐水,模型组、洛哌丁胺组、黄连碱组均按照“CID 模型制备方法”进行处理。造模后,正常组、模型组均灌胃 1 mL 0.5% CMC-Na 溶液,洛哌丁胺组灌胃洛哌丁胺混悬液(0.3 mg/kg,2 次/d)^[4,5],黄连碱组灌胃黄连碱混悬液(30 mg/kg,2 次/d,相当于 60 kg 的成人每日口服 400 mg)^[9];灌胃给药 4 天。于末次给药后 12 h,处死裸鼠,解剖,于回盲瓣上方 3 cm 处取回肠组织 2 cm,一部分组织采用甲醛固定,另一部分液氮保存。

6 检测指标及方法

6.1 腹泻情况 末次给药结束后,将裸鼠置于代谢笼中,每笼 1 只,笼底铺滤纸,观察每只裸鼠大便情况、肛周及尾巴粪便污染情况,按照文献^[4,5]对各组裸鼠的腹泻情况进行评分,计算各组裸鼠 2~3 分腹泻发生率(%)。腹泻评分方法:0 分,大便正常;1 分,大便较轻微湿软;2 分,大便较湿、不成形,肛周轻度污迹;3 分,大便呈水样,肛周重度污迹。

2~3 分腹泻发生率(%) = (2 分腹泻的裸鼠数量 + 3 分腹泻的裸鼠数量) / 8 × 100。

6.2 回肠组织病理形态学观察 回肠组织石蜡包埋,HE 染色,观察肠黏膜组织病理变化,评价肠黏膜损伤程度^[4,5]:0 分,黏膜绒毛正常;1 分,上皮间隙增大,伴毛细血管瘀血;2 分,上皮间隙扩张,伴上皮层同固有层中度分离;3 分,绒毛两侧上皮层同固有层分离,部分绒毛顶端破损;4 分,绒毛破损,固有层毛细血管暴露;5 分,固有层破坏和不完整、出血和溃疡。

6.3 回肠组织中 TNF-α 和 IL-6 含量测定 采用 ELISA 试剂盒测定肠组织中 TNF-α 和 IL-6 含量,具体步骤按参考文献^[4,5]及试剂盒说明书进行操作。

6.4 Western blot 法检测回肠组织中 NF-κB p65、IκBα 蛋白表达 取裸鼠回肠组织加入组织裂解液,0℃匀浆,离心,分离上清,进行蛋白定量;取等量蛋白样品(50 μg/孔),进行聚丙烯酰胺(12%)凝胶电泳,半干转膜仪转膜,5%脱脂奶粉封闭,加入 1:300 的 NF-κB p65、IκBα 一抗,1:500 的 β-actin,4℃过夜;次日 PBS 洗涤后加入 1:3 000 的抗 NF-κB p65、IκBα 二抗及 1:5 000 的 β-actin 二抗,室温孵育 1 h, PBS 洗涤;ECL 显色,X 线胶片曝光。采用 Quantity One(BIO-RAD 公司)软件测量各个显色条带的吸光度值。目标蛋白的定量以目标蛋白印迹的密度与内参(β-actin)印迹密度的比值表示。

7 统计学方法 采用 SPSS 17.0 统计软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,计数资料组间比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异

有统计学意义。

结 果

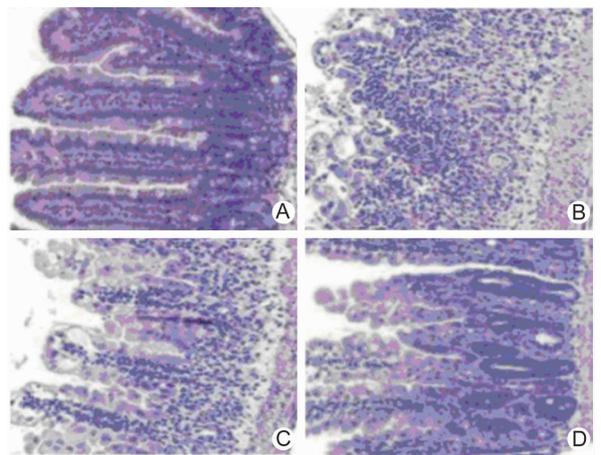
1 各组裸鼠腹泻情况比较(表 1) 正常组均未发生腹泻,模型组、洛哌丁胺组及黄连碱组均出现腹泻,但各组腹泻程度不同;与模型组比较,洛哌丁胺组、黄连碱组 2~3 分腹泻发生率及腹泻评分均明显下降($P < 0.05, P < 0.01$)。

表 1 各组裸鼠 2~3 分腹泻发生率、腹泻评分和回肠损伤程度比较

组别	n	2~3 分腹泻发生情况[只(%)]	腹泻评分(分, $\bar{x} \pm s$)	回肠损伤程度(分, $\bar{x} \pm s$)
模型	8	8(100)	2.52 ± 0.57	4.36 ± 0.62
洛哌丁胺	8	4(50)*	1.64 ± 0.75*	3.89 ± 0.65
黄连碱	8	2(25)**	1.25 ± 0.46**	2.75 ± 0.71** [△]

注:与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与洛哌丁胺组比较,[△] $P < 0.01$

2 各组裸鼠回肠损伤程度(表 1、图 1) 正常组回肠黏膜腺体排列正常,结构完整;模型组回肠黏膜形态被破坏,结构不完整,小肠绒毛高度降低及数量减少、溃疡形成,小肠隐窝细胞破坏、减少,腺体排列紊乱,黏膜下水肿,炎症细胞浸润;洛哌丁胺组回肠破坏程度较模型组稍减轻($P > 0.05$);黄连碱组裸鼠回肠黏膜损伤程度较模型组及洛哌丁胺组均明显减轻($P < 0.01$)。



注:A 为正常组;B 为模型组;C 为洛哌丁胺组;D 为黄连碱组

图 1 各组裸鼠回肠组织病理结果 (HE, ×200)

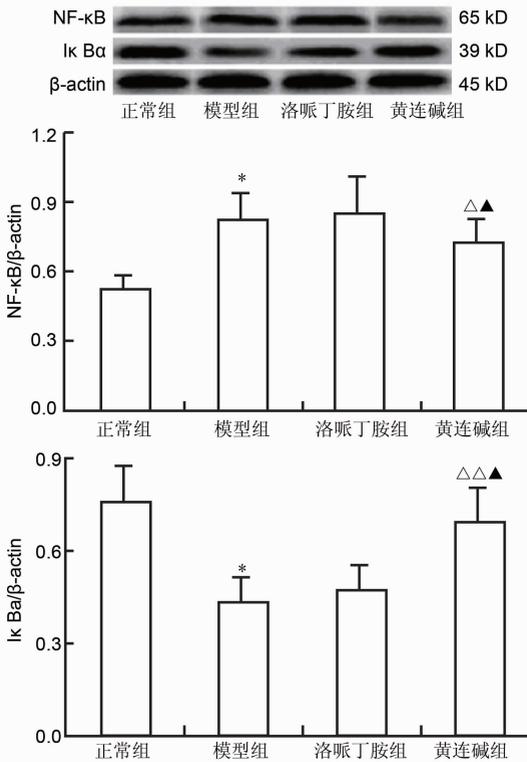
3 各组裸鼠回肠组织中 TNF-α、IL-6 含量比较(表 2) 与正常组比较,模型组 TNF-α 和 IL-6 表达均升高($P < 0.01$);与模型组和洛哌丁胺组比较,黄连碱组 TNF-α 和 IL-6 表达均明显降低($P < 0.05, P < 0.01$)。

表 2 各组裸鼠回肠组织中 TNF- α 、IL-6 含量比较 (pg/g, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	TNF- α	IL-6
正常	8	45.82 \pm 7.35	24.85 \pm 2.90
模型	8	67.95 \pm 11.07 *	35.03 \pm 2.72 *
洛哌丁胺	8	65.32 \pm 11.59	32.76 \pm 2.86
黄连碱	8	57.05 \pm 9.97 $\Delta\Delta$	28.21 \pm 3.09 $\Delta\Delta\Delta$

注:与正常组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$;与洛哌丁胺组比较, $\Delta P < 0.05$

4 各组裸鼠回肠组织中 NF- κ B p65 和 I κ B α 表达比较(图 2) 与正常组比较,模型裸鼠小肠组织中 NF- κ B p65 表达明显升高,I κ B α 表达明显降低($P < 0.01$);与模型组和洛哌丁胺组比较,黄连碱组 NF- κ B p65 表达均明显降低,I κ B α 表达均明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$)。



注:与正常组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$;与洛哌丁胺组比较, $\Delta P < 0.05$

图 2 各组裸鼠回肠组织中 NF- κ B p65 和 I κ B α 表达

讨 论

CID 形成机理十分复杂,细胞毒类化疗药物以及一些靶向治疗药物,可引起小肠上皮细胞损伤、脱落,肠壁表层坏死及炎症反应等,进而导致小肠内吸收和分泌失衡,最终形成 CID^[2,10]。临床上 CID 的防治常

采用综合治疗方案,包括对症止泻、保护胃肠黏膜、抗感染和营养支持治疗^[2],以及中医药治疗^[3-5]。前期临床研究发现,西医常规治疗联合香连丸防治 CID(湿热证),可进一步提高疗效^[3]。本实验发现,黄连碱组 2~3 分 CID 的发生率及腹泻程度均较模型组明显下降;黄连碱组裸鼠肠黏膜损伤程度较模型组明显减轻、肠道损伤程度也明显降低。

炎症反应是 CID 发病的重要病理过程;TNF- α 、IL-6 是重要的促炎因子,在炎症反应过程中起重要作用,研究显示 CID 发生后,TNF- α 、IL-6 的释放可加剧炎症反应,进而加重肠黏膜损伤^[11]。本研究发现,模型组裸鼠回肠组织中 TNF- α 、IL-6 含量均明显高于正常组,而黄连碱组裸鼠回肠组织中 TNF- α 、IL-6 含量均明显低于模型组;提示黄连碱可减少 CID 裸鼠回肠组织中 TNF- α 和 IL-6 的分泌,从而减轻肠道炎症反应和肠道损伤。

NF- κ B 是调控炎症因子表达的重要转录激活因子^[12-14],与各种炎症损伤密切相关;化疗药物可激活 NF- κ B,产生大量炎症因子,从而加重炎症反应;NF- κ B p65 亚单位是 NF- κ B 家族参与炎症因子基因转录的主要成分。I κ B 是 NF- κ B 的特异性抑制因子,I κ B 家族主要成员 I κ B α 是细胞内最主要的 NF- κ B 抑制蛋白。生理状态下 I κ B α 与 NF- κ B p65 结合,使 NF- κ B p65 处于非活化状态;病理状态下,I κ B α 被磷酸化而降解,从而使 NF- κ B 进入细胞核,参与多种炎症因子的调控^[15]。本研究发现,与模型组比较,黄连碱组 NF- κ B p65 表达明显降低,I κ B α 表达则明显升高,说明黄连碱可抑制 CID 裸鼠小肠组织中 NF- κ B p65 的表达,并抑制 I κ B α 的降解,抑制 NF- κ B 信号通路的激活,从而抑制各种炎症细胞因子的表达而发挥抗炎作用。

综上所述,上调 I κ B α 表达,抑制 NF- κ B 通路活化,进而下调促炎细胞因子 TNF- α 、IL-6 的表达,从而减轻肠道炎症反应,修复肠道损伤,可能是黄连碱防治 CID 的作用机制之一。

利益冲突:无。

参 考 文 献

[1] Tveit KM, Guren T, Glimelius B, et al. Phase III trial of cetuximab with continuous or intermittent fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (Nordic FLOX) versus FLOX alone in first-line treatment of metastatic colorectal cancer: the NORDIC-VII study [J]. J Clin Oncol, 2012, 30(3): 1755-1762.

[2] Jervoise A, Paul R, Clare D, et al. Guidance on

the management of diarrhea during cancer chemotherapy[J]. *Lancet Oncol*, 2014, 15(10): 447 - 460.

[3] 张新峰, 乔翠霞, 程旭锋, 等. 中西医结合治疗不同中医证型化疗相关性腹泻[J]. *中成药*, 2015, 37(9): 1914 - 1916.

[4] 张新峰, 乔翠霞, 程旭锋, 等. 香连丸对化疗相关性腹泻裸鼠模型的作用观察[J]. *中成药*, 2016, 38(7): 1598 - 1601.

[5] 张新峰, 乔翠霞, 程旭锋, 等. 香连丸对化疗相关性腹泻裸鼠生存时间与回肠组织中促炎因子的影响[J]. *辽宁中医杂志*, 2016, 43(12): 2307 - 2310.

[6] Wu J, Zhang H, Hu B, et al. Coptisine from *Coptis chinensis* inhibits production of inflammatory mediators in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 murine macrophage cells[J]. *Eur J Pharmacol*, 2016, 780(16): 106 - 114.

[7] Zhang ZH, Zhang HJ, Deng AJ, et al. Synthesis and structure-activity relationships of quaternary coptisine derivatives as potential antiulcerative colitis agents[J]. *J Med Chem*, 2015, 58(18): 7557 - 7571.

[8] 钱平, 杨秀伟. 左金方的生物碱类成分及其对肿瘤细胞的细胞毒活性[J]. *中草药*, 2014, 45(1): 8 - 15.

[9] 李峰, 张浩, 华桦, 等. 黄连碱对应激所致小鼠胃黏膜损伤的保护作用[J]. *华西药学杂志*, 2007, 22(6): 713 - 714.

[10] Pessi MA, Zilembo N, Haspinger ER, et al. Targeted therapy-induced diarrhea: A review of the literature[J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2014, 90(2): 165 - 179.

[11] 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(10): e0141402.

[12] Cortez M, Carmo LS, Rogero MM, et al. A high-fat diet increases IL-1, IL-6, and TNF- α production by increasing NF- κ B and attenuating PPAR- γ expression in bone marrow mesenchymal stem cells[J]. *Inflammation*, 2013, 36(2): 379 - 386.

[13] 马武开, 陆道敏, 姚血明, 等. 苗药金乌健骨方对胶原诱导关节炎模型大鼠 NF- κ B 及 IL-17 表达的影响[J]. *中国中西医结合杂志*, 2016, 36(5): 624 - 628.

[14] 王东, 王亿平, 程敏, 等. 清肾颗粒对慢性肾功能衰竭湿热证患者 NF- κ B 信号通路的干预作用[J]. *中国中西医结合杂志*, 2017, 37(1): 23 - 27.

[15] 邹福兰, 骆娟, 黄蓉, 等. I κ B α 在 NF- κ B 信号通路中的作用及临床意义[J]. *中华临床医师杂志(电子版)*, 2014, 8(3): 513 - 516.

(收稿: 2017 - 03 - 28 在线: 2018 - 07 - 02)

责任编辑: 李焕荣

英文责编: 张晶晶

第二十二次全国儿科中西医结合学术会议征文通知

由中国中西医结合学会儿科专业委员会主办, 深圳市儿童医院承办的第二十二次全国儿科中西医结合学术会议定于 2018 年 9 月 7—9 日在广东省深圳市召开, 届时将进行有关小儿呼吸、神经、血液、泌尿、新生儿等中西医结合学术交流, 并将举行第七届中国中西医结合学会儿科专业委员会常委和全体委员会议。会议期间还将进行换届工作, 选举产生第八届儿科专业委员会。开展第三届优秀论文征文评选工作, 并设优秀论文奖。诚挚邀请全国儿科相关医务人员参会并积极投稿。现将会议有关征文事宜通知如下:

征文内容 (1) 中西医结合及中医、西医各专业的临床论著、实验研究、护理经验和专题综述。(2) 临床疑难、重症、少见病例报道。(3) 中西医结合药理、药效研究。(4) 中西医结合理论及方法研究。(5) 对儿科中西医结合工作的建议等。

征文要求 (1) 稿件 2017 年 12 月 31 日后未公开发表。(2) 稿件需有摘要和/或全文(3) 稿件一律用 Microsoft Word 文档, 摘要要求 800 ~ 1 000 字, 包括目的、方法、结果、结论等要素。(4) 稿件请注明作者单位、准确通信地址、邮政编码、电话及 E-mail 等联系信息。(5) 文档名称请注明各亚专科方向, 文件名如: “呼吸 - 论文题目”、“肾脏 - 论文题目”等便于分专业顺利审稿。(6) 稿件请发至: miaodoom@foxmail.com; 截止日期: 2018 年 7 月 23 日; 联系人: 赵森 (15914010085)。