

小柴胡汤对伊立替康致迟发性腹泻模型小鼠血便的防治作用^Δ

周 圆^{1*}, 杨光义², 宛 蕾^{1#}(1. 贵州医科大学药理教研室, 贵阳 550025; 2. 十堰市太和医院武当中医药研究所, 湖北十堰 442000)

中图分类号 R965.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)13-1762-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.13.10

摘要 目的: 考察小柴胡汤对伊立替康(CPT-11)致迟发性腹泻模型小鼠血便的防治作用。方法: 将40只小鼠随机分为正常对照组(等体积生理盐水)、模型对照组(等体积生理盐水)、小柴胡汤组(1 500 mg/kg, 以生药计)和洛哌丁胺组(阳性对照, 0.533 3 mg/kg), ig给药, 每天1次, 连续17 d。于实验第4~10天, 除正常对照组外, 其余各组小鼠均ip CPT-11诱导迟发性腹泻。测定小鼠体质量变化、血便率并观察小鼠大肠、小肠黏膜组织病理改变。结果: 给药17 d后, 造模组小鼠的体质量较正常对照组均明显下降($P < 0.05$), 但小柴胡汤组小鼠体质量高于模型对照组($P < 0.05$)。实验第11~17天, 小柴胡汤组和洛哌丁胺组小鼠血便率均显著低于模型对照组($P < 0.01$), 且小柴胡汤组小鼠血便率低于洛哌丁胺组($P < 0.05$)。病理观察结果显示, 模型对照组小鼠大肠和小肠黏膜上皮细胞伴明显弥漫性坏死脱落和炎症细胞浸润, 给药组小鼠肠黏膜组织均趋于正常。结论: 小柴胡汤能有效降低血便率、改善肠黏膜组织损伤, 对CPT-11致小鼠血便具有防治作用, 且效果优于阳性药物洛哌丁胺。

关键词 小柴胡汤; 伊立替康; 迟发性腹泻; 肠黏膜损伤; 血便; 小鼠

Preventive and Treatment Effects of Xiaochaihu Decoction on Irinotecan-induced Bloodystool in Model Mice with Delayed Diarrhea

ZHOU Yuan¹, YANG Guangyi², WAN Lei¹(1. Pharmacology Teaching and Research Office, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China; 2. Institute of Wudang Herbal Medicine Research, Shiyan Taihe Hospital, Hubei Shiyan 442000, China)

- 脂质过氧化及淋巴细胞增殖的影响[J]. 中国药科大学学报, 2007, 38(5): 442-445.
- [6] Sun J, Wang F, Hong GL, *et al.* Antidepressant-like effects of sodium butyrate and its possible mechanisms of action in mice exposed to chronic unpredictable mild stress[J]. *Neurosci Lett*, 2016, doi: 10.1016/j.neulet.2016.03.003.
- [7] 匡胜男, 罗映, 田小燕, 等. 美洛昔康改善慢性应激大鼠抑郁行为的机制初探[J]. 中国药理学通报, 2016, 32(2): 263-268.
- [8] 于红, 郭蕾, 柴金苗, 等. 逍遥散对肝郁证大鼠治疗作用的实验研究[J]. 辽宁中医杂志, 2014, 41(11): 2485-2487.
- [9] Kinn AM, Grnli J, Fiske E, *et al.* A double exposure to social defeat induces sub-chronic effects on sleep and open field behaviour in rats[J]. *Physiol Behav*, 2008, 95(4): 553-561.
- [10] 刘丽琴, 罗艳, 张瑞睿, 等. 人参皂苷对慢性应激抑郁模型大鼠行为学及HPA轴、BDNF的影响[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(10): 1342-1347.
- [11] 付红勇, 王星华, 殷盛明, 等. 抑郁症分子机制中5-羟色胺2C受体的作用[J]. 生理科学进展, 2014, 12(3): 221-224.
- [12] 黄满丽, 许毅. 抑郁症与细胞因子的研究进展[J]. 国际精神病学杂志, 2012, 39(1): 14-17.
- [13] 韦云龙, 农玉贤, 潘江艳, 等. 舍曲林辅助治疗对抑郁症合并冠心病患者血清炎症因子水平及预后的影响[J]. 现代生物医学进展, 2014, 14(4): 752-754.
- [14] Sara PP, Carolina V, Matias M, *et al.* How are neuroticism and depression related to the psychophysiological stress response to acute stress in healthy older people[J]. *Physiol Behav*, 2016, doi: 10.1016/j.physbeh.2016.01.015.
- [15] Doane LD, Franz CE, Prom-Wormley E, *et al.* Negative emotionality, depressive symptoms and cortisol diurnal rhythms: analysis of a community sample of middle-aged males[J]. *Horm Behav*, 2011, 60(2): 202-209.
- [16] Dziurkowska E, Wesolowski M. Salivary cortisol in women with major depressive disorder under selective serotonin reuptake inhibitors therapy[J]. *Arch Womens Ment Health*, 2013, 16(2): 139-147.
- [17] Koo JW, Duman RS. IL-1 beta is an essential mediator of the antineurogenic and anhedonic effects of stress[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(2): 751-756.

Δ 基金项目: 湖北省卫生和计划生育委员会2017-2018年度科研立项项目(No. WJ2017F079)

* 药师, 硕士研究生。研究方向: 药理学。电话: 0719-8801106。E-mail: 89680313@qq.com

通信作者: 教授, 硕士生导师。研究方向: 药理学。电话: 0719-8801106。E-mail: 1325164635@qq.com

(收稿日期: 2016-10-13 修回日期: 2017-01-16)

(编辑: 林 静)

ABSTRACT OBJECTIVE: To investigate the prevention and treatment effect of Xiaochaihu decoction on irinotecan (CPT-11)-induced bloodstool in model mice with delayed diarrhea. METHODS: 40 mice were randomly divided into normal control group (equal volume of normal saline), model control group (equal volume of normal saline), Xiaochaihu decoction group (1 500 mg/kg, calculated by crude drug) and loperamide group (positive control, 0.533 3 mg/kg), ig, once a day, for 17 days. Except for normal control group, other groups were intraperitoneally injected CPT-11 to induce delayed diarrhea in 4th-10th day. Body mass changes, bloodstool rate of mice were determined, and pathological changes in large intestine and small intestine were observed. RESULTS: After 17 days of administration, compared with normal control group, the body mass in modeling groups was obviously declined ($P<0.05$), while body mass in Xiaochaihu decoction group was higher than model control group ($P<0.05$). In the 11th-17th day, bloodstool rate in Xiaochaihu decoction group and loperamide group were significantly lower than model control group ($P<0.01$), and bloodstool rate in Xiaochaihu decoction group was lower than loperamide group ($P<0.05$). Pathological results showed, obvious diffuse necrosis and inflammatory cell infiltration were observed in mucosal epithelial cells of large intestine and small intestine in model control group, and the intestinal mucosal tissue in administration groups tended to be normal. CONCLUSIONS: Xiaochaihu decoction can effectively reduce bloodstool rate, improve intestinal mucosa injury, and has prevention and treatment effect on CPT-11-induced bloodstool in mice, with superior effect to loperamide.

KEYWORDS Xiaochaihu decoction; Irinotecan; Delayed diarrhea; Intestinal mucosa injury; Bloodstool; Mice

伊立替康(Irinotecan, CPT-11)为临床大肠癌化疗的一线药物,剂量限制性毒性为迟发性腹泻^[1]。临床观察发现,CPT-11导致的腹泻发病率高达60%~80%,患者可出现腹痛、水样便甚至血便等严重毒性症状,单药iv后发生首次稀便的平均时间是给药后第5天^[2-4]。腹泻是癌症化疗中最常见的、需要医疗干预的毒副作用之一,需高度重视。目前,对于化疗引起的腹泻的治疗药品以阿片肽受体阻断剂为主,临床常用的有洛哌丁胺、可待因、奥曲肽等,虽然用药后能减缓腹泻、提高患者化疗的耐受性,但药物本身的副作用较大。中药有悠久的历史,利用中药或中药复方调控CPT-11的体内代谢,可为防治由其导致的腹泻提供一条有效的解决途径。

小柴胡汤是汉代张仲景《伤寒论》少阳病症的主方,由柴胡、黄芩、人参、半夏、甘草、生姜、大枣7味药材组成,以寒热往来、口苦咽干、胸胁苦满、舌苔薄白、弦脉为辨证要点,为和解少阳之代表方^[5]。文献表明,中药及其复方治疗CPT-11致迟发性腹泻具有较好疗效^[6-7];朱克奇^[8]采用小柴胡汤加味治疗肠易激综合征腹泻患者效果良好。本课题组前期研究表明,小柴胡汤能干预CPT-11及其代谢产物的体内药动学过程,抑制其胆汁外排,从而降低其肠毒性(血痢)^[9]。在本研究,笔者拟以CPT-11诱导小鼠发生迟发性腹泻,以小鼠体质量、血便率和肠道损伤程度为指标,以洛哌丁胺胶囊为阳性药物,初步探索小柴胡汤对CPT-11所致迟发性腹泻模型小鼠血便及肠黏膜损伤的防治作用,为进一步研究小柴胡汤降低CPT-11肠毒性机制提供参考。

1 材料

1.1 仪器

JJ200精密电子天平(美国双杰兄弟集团有限公司);MOTIC BA600-4数字切片扫描仪[麦克奥迪(厦门)电气股份有限公司]。

1.2 药品与试剂

注射用盐酸CPT-11(江苏恒瑞医药股份有限公司,批号:16061715,规格:100 mg/支);小柴胡汤浸膏[自制,水煎后浓缩至2 g/mL(以生药计),批号:20160426];盐酸洛哌丁胺胶囊(以下简称为洛哌丁胺,西安杨森制药有限公司,批号:160215551,规格:2 mg/粒);右旋糖酐40葡萄糖注射液(四川科伦药业股份有限公司,批号:T16031502-2,规格:500 mL/瓶);氯化钠注射液(石家庄四药有限公司,批号:1606213702,规格:250 mL/瓶);尿粪便隐血定性检测试剂盒(上海源叶生物科技有限公司,批号:R21596-100T);甲醛、乙醚为分析纯。

1.3 动物

健康C57BL6小鼠40只,♂,体质量为25~30 g,由湖北医药学院实验动物中心提供,许可证号:SYXK(鄂)2011-0031。实验动物饲养于湖北医药学院实验动物中心SPF级实验室,环境温度为(25±2)℃、湿度为(50±5)%、明暗周期为12 h,饲喂高脂饲料3周后开始实验。

2 方法

2.1 分组、给药与造模

将40只小鼠随机分为正常对照组、模型对照组、小柴胡汤组和洛哌丁胺组,每组10只。正常对照组和模型对照组小鼠ig等体积生理盐水;小柴胡汤组小鼠ig小柴胡汤(0.2 mL/25 g),剂量为1 500 mg/kg;洛哌丁胺组小鼠ig洛哌丁胺(0.2 mL/25 g),剂量为0.533 3 mg/kg,每天1次,连续17 d。于实验第4~10天,正常对照组小鼠在给药同时每天1次ip右旋糖酐40葡萄糖注射液;其余各组小鼠均每天1次ip CPT-11,剂量为50 mg/kg,以诱导迟发性腹泻的发生。

2.2 取材与指标测定

每天测量小鼠体质量。实验第4~17天按照试剂盒说明书操作检测小鼠是否血便,并计算血便发生率。给药结束后,所有小鼠乙醚麻醉处死,取大肠、小肠组织,用生理盐水冲洗干净,置于4%甲醛溶液固定,经常

规脱水、透明、浸蜡和石蜡包埋切片(厚度4 μm)后,苏木精-伊红(HE)染色,用数字切片扫描仪在100倍物镜下观察小鼠大肠、小肠黏膜组织的病理改变。

2.3 统计学方法

采用SPSS 19.0软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析;血便率采用卡方检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 体质量测定结果

各组小鼠实验第1、4、10、17天的体质量测定结果见表1,17 d内体质量变化趋势见图1。

表1 实验第1、4、10、17天的小鼠体质量测定结果($\bar{x} \pm s, n=10, g$)

Tab 1 Determination results of body mass at 1st, 4th, 10th, 17th day of mice ($\bar{x} \pm s, n=10, g$)

组别	第1天	第4天	第10天	第17天
正常对照组	29.00 ± 0.44	29.48 ± 0.47	30.85 ± 0.60	31.66 ± 0.67
模型对照组	29.21 ± 0.38	29.00 ± 0.50	25.12 ± 1.35*	21.74 ± 2.43*
小柴胡汤组	29.30 ± 1.97	30.03 ± 1.85	26.39 ± 1.07*	24.40 ± 1.66**
洛哌丁胺组	29.12 ± 1.76	28.30 ± 1.67	25.48 ± 1.60*	22.51 ± 2.65*

注:与正常对照组比较,* $P < 0.05$;与模型对照组比较,# $P < 0.05$

Note: vs. normal control group, * $P < 0.05$; vs. model control group, # $P < 0.05$

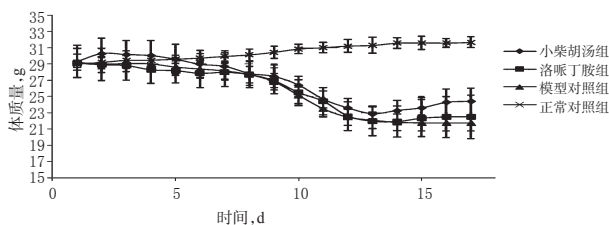


图1 17 d内小鼠体质量变化趋势

Fig 1 The variation tendency of body mass of mice within 17 days

由表1可知,在实验第1、4天时,各组小鼠的体质量差异均无统计学意义($P > 0.05$),提示ig小柴胡汤和洛哌丁胺不会影响正常小鼠的体质量;实验第10天时,各造模组小鼠的体质量较正常对照组均显著降低($P < 0.05$),验证了迟发性腹泻能显著降低小鼠体质量;实验第17天时,虽各造模组小鼠的体质量较正常对照组小鼠仍显著降低($P < 0.05$),但小柴胡汤组小鼠的体质量显著高于模型对照组($P < 0.05$),提示小柴胡汤能一定程度改善小鼠体质量缺失。

由图1可知,在实验期间,正常对照组小鼠的体质量逐渐上升;其余各组小鼠体质量的变化趋势相近,均在5 d后开始下降,8 d后急剧下降。这表明CPT-11所致迟发型腹泻能快速降低小鼠体质量,且用药时间越长体质量下降越明显,这可能是由于CPT-11在体内蓄积加大了肠毒性而引起的;但13 d后,体质量下降程度减缓,这可能是由于停止给予CPT-11后CPT-11开始外排;15 d后模型对照组和洛哌丁胺组小鼠体质量无明显变化,然

而小柴胡汤组小鼠的体质量却明显增加,这可能是由于小柴胡汤保护胃肠道,从而使小鼠体质量正常增长。

3.2 血便率测定结果

实验第4~10天各组小鼠均未检出血便;实验第11天时,模型对照组小鼠有60%小鼠首次出现血便,而小柴胡汤组和洛哌丁胺组小鼠均在实验第12天时首次出现血便,提示小柴胡汤和洛哌丁胺均可一定程度地延缓血便发生。小柴胡汤组和洛哌丁胺组小鼠实验第11~17天的血便率均显著低于模型对照组($P < 0.01$),提示这两种药物均能有效降低血便率,改善小鼠胃肠道状况;且实验第12~17天小柴胡汤组小鼠血便率较洛哌丁胺组明显降低($P < 0.05$),提示小柴胡汤治疗血便效果比洛哌丁胺好。实验第11~17天各组小鼠血便率测定结果见表2。

表2 实验第11~17天小鼠血便率测定结果(%)

Tab 2 Determination results of blood stool rate in 11th -17th day of mice (%)

组别	第11天	第12天	第13天	第14天	第15天	第16天	第17天
正常对照组	0	0	0	0	0	0	0
模型对照组	60**	80**	80**	80**	80**	90**	90**
小柴胡汤组	0##	30## ^Δ	40## ^Δ	40## ^Δ	50## ^Δ	50## ^Δ	50## ^Δ
洛哌丁胺组	0##	40##	50##	50##	60##	60##	60##

注:与正常对照组比较,** $P < 0.01$;与模型对照组比较,# $P < 0.01$;与洛哌丁胺组比较,^Δ $P < 0.05$

Note: vs. normal control group, ** $P < 0.01$; vs. model control group, # $P < 0.01$; vs. loperamide group, ^Δ $P < 0.05$

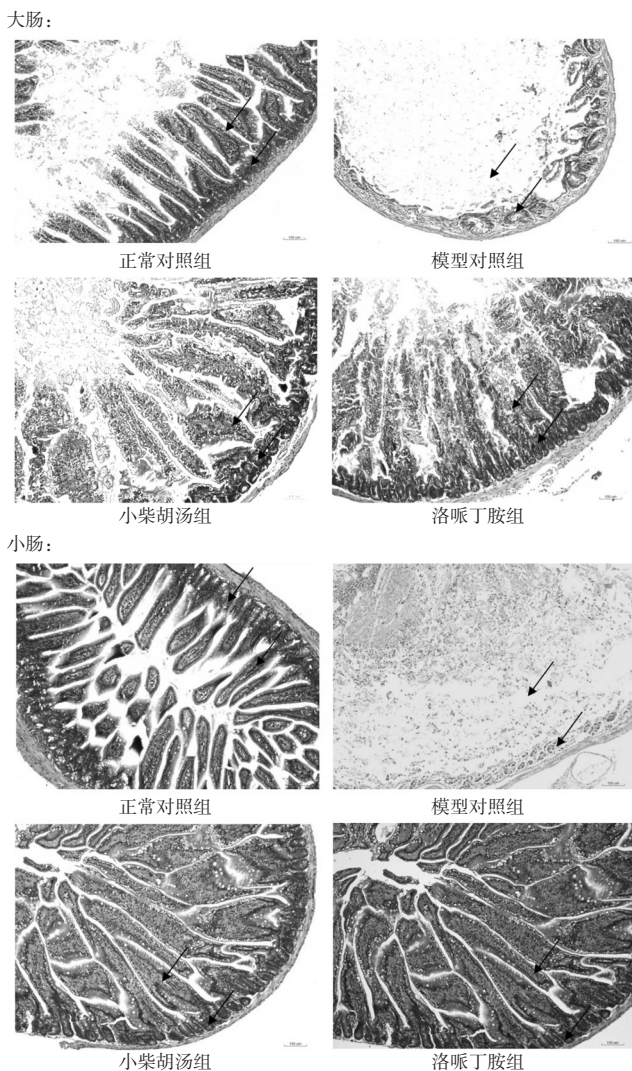
3.3 病理观察结果

3.3.1 大肠黏膜组织病理观察结果 正常对照组小鼠大肠黏膜结构完整,杯状细胞形态正常。模型对照组小鼠大肠杯状细胞消失,上皮黏膜细胞伴明显弥漫性坏死脱落和炎症细胞浸润。与正常对照组比较,小柴胡汤组和洛哌丁胺组小鼠大肠杯状细胞受损、肠绒毛萎缩,但较模型对照组有较大改善。各组小鼠大肠黏膜组织病理观察结果见图2。

3.3.2 小肠黏膜组织病理观察结果 正常对照组小鼠小肠绒毛完整。模型对照组小鼠小肠上皮黏膜细胞伴明显弥漫性坏死脱落和炎症细胞浸润,小肠绒毛消失。小柴胡汤组和洛哌丁胺组小鼠小肠绒毛较完整,接近正常。各组小鼠小肠黏膜组织病理观察结果见图2。

4 讨论

在造模方法优选的预实验中,笔者对CPT-11的给药剂量、给药天数以及饲料类型进行了筛选。笔者分别以25、50、75、100 mg/kg CPT-11的注射剂量给药,结果在50 mg/kg剂量下小鼠血便率为100%且死亡率为0,故选择50 mg/kg CPT-11为本研究的给药剂量。接着,笔者又考察了连续ip CPT-11(50 mg/kg)6、7、8、9 d后小鼠的血便率,结果连续ip 6 d后小鼠血便率为40%,连续ip 7、8、9 d后小鼠血便率均为100%,故在本研究中采用连续ip CPT-11(50 mg/kg) 7 d的方法进行造模。此外,笔



注:图中箭头所指为病变部位

Note: the point of the arrow in the picture is the diseased region

图2 小鼠大肠、小肠黏膜组织病理观察结果(HE, ×100)

Fig 2 Pathological observation results of mucosal tissue of large and small intestine of mice (HE, ×100)

者还对比了饲喂普通饲料和高脂饲料对小鼠血便发生的影响,结果普通饲料组小鼠血便率为0,高脂饲料组小鼠血便率为100%,故在本研究中采用高脂饲料饲喂。造模成功后,笔者还考察了小柴胡汤ig剂量分别为500、1 000、1 500、2 000 mg/kg的效果,结果1 500 mg/kg给药剂量下效果最佳,故在本研究中以1 500 mg/kg剂量进行实验。

洛哌丁胺治疗慢性腹泻的临床使用剂量为4 mg/75 kg,换算成小鼠剂量即为0.533 3 mg/kg。本研究采用小柴胡汤在ip CPT-11前3天开始给药,连续给药17 d。结果显示,小柴胡汤组小鼠血便率明显低于模型对照组和洛哌丁胺组,且体质量较模型对照组和洛哌丁胺组得到改善,提示预先ig小柴胡汤对CPT-11所致血便具有预防作用,且实验结果显示小柴胡汤对CPT-11所致血便

的防治效果比洛哌丁胺更好。CPT-11主要通过影响肠道上皮细胞腺体细胞的分裂和破坏肠道的消化酶,诱导前列腺素和多种炎症因子释放,破坏肠腔中水和电解质的吸收、外排平衡,从而导致腹泻^[10]。从CPT-11的体内代谢过程可发现肠黏膜在血便的发生及预防上起重要作用。在本研究中,模型对照组小鼠大肠和小肠正常结构消失,黏膜上皮细胞伴明显弥漫性坏死脱落和炎症细胞浸润,小柴胡汤组和洛哌丁胺组大肠、小肠基本正常,提示预先ig小柴胡汤和洛哌丁胺均能维持肠道结构基本形态和功能,从而预防血便的发生。

综上所述,小柴胡汤能有效降低血便率、改善肠组织损伤,对CPT-11所致血便具有防治作用,且效果较洛哌丁胺好,具有广阔的临床应用前景。本实验结果为进一步深入研究小柴胡汤抑制CPT-11肠毒性的机制奠定了一定基础。

参考文献

- [1] 方青芳.化疗相关性腹泻的发生机制和治疗策略[J].中国临床药理学与治疗学,2009,14(3):351-355.
- [2] Gibson RJ, Keefe DM. Cancer chemotherapy-induced diarrhoea and constipation: mechanisms of damage and prevention strategies[J]. *Support Care Cancer*, 2006, 14(9): 890-900.
- [3] 许丽娟,杨维维,许丽艳.伊立替康联合治疗转移性大肠癌致迟发性腹泻的护理体会[J].中外医疗,2011,30(24):154.
- [4] 孙伟,于振涛,胡晓文,等.伊立替康不良反应及其临床干预进展[J].中国药房,2007,18(35):2781-2783.
- [5] 万文蓉,张仲景小柴胡汤临床运用发微[J].中华中医药杂志,2013,28(1):124-127.
- [6] Lam W, Bussom S, Guan F, et al. The four-herb Chinese medicine PHY906 reduces chemotherapy-induced gastrointestinal toxicity[J]. *Sci Transl Med*, 2010, 2(45): 45-59.
- [7] Li C, Zhang L, Zhou L, et al. Comparison of intestinal absorption and disposition of structurally similar bioactive flavones in radix scutellariae[J]. *AAPS J*, 2012, 14(1): 23-34.
- [8] 朱可奇.小柴胡汤加味治肠易激综合征56例疗效观察[J].江西中医药,2000,31(5):24-25.
- [9] Basu S, Zeng M, Yin T, et al. Development and validation of an UPLC-MS/MS method for the quantification of Irinotecan, SN-38 and SN-38 glucuronide in plasma, urine, feces, liver and kidney: application to a pharmacokinetic study of irinotecan in rats[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2016, doi: 10.1016/j.jchromb.2016.02.012.
- [10] Kornblau S, Benson AB, Catalano R, et al. Management of cancer treatment-related diarrhea: issues and therapeutic strategies[J]. *J Pain Symptom Manage*, 2000, 19(2): 118-129.

(收稿日期:2016-11-14 修回日期:2017-03-08)

(编辑:林 静)