

本文引文格式:罗菲,郭建宏,窦玉玉,等.附子理中丸通过NF- $\kappa$ B途径抗炎止泻的效应和机制[J].右江民族医学院学报,2023,45(2):247-252.

【论著与临床报道】

## 附子理中丸通过NF- $\kappa$ B途径抗炎止泻的效应和机制

罗菲,郭建宏,窦玉玉,唐汉庆,王谨莹,张旭清

(右江民族医学院,广西 百色 533000)

**摘要:**目的 探讨附子理中丸通过伊立替康诱导的腹泻大鼠模型抗炎止泻的作用。方法 将56只Wistar雄性大鼠按体质量随机分为对照组、模型组、小檗碱组、IKK- $\beta$ 抑制剂组、附子理中丸低剂量组、附子理中丸中剂量组、附子理中丸高剂量组(10 g/kg、20 g/kg、40 g/kg)。除对照组外,其余大鼠按照125 mg/kg体质量给予腹腔注射伊立替康溶液,对照组腹腔注射等容量生理盐水,连续5 d。造模成功后,每组灌胃相应的药物。运用HE染色,透射电子显微镜,酶联免疫吸附法(ELISA),实时荧光定量聚合酶链式反应法(qRT-PCR),蛋白免疫印迹法(Western Blot)实验检测相关指标。结果 与正常组相比,模型组的结肠组织肠黏膜损伤严重;结肠组织中各种超微结构变化明显;炎症因子TNF- $\alpha$ 与TGF- $\beta$ 1的含量升高( $P < 0.01$ ),IL-4及IL-10的含量降低( $P < 0.01$ );p65、p50以及IKK- $\beta$  mRNA的表达水平明显升高( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ );p65、p50以及IKK- $\beta$ 蛋白表达水平均明显升高( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ );与模型组相比,小檗碱组、IKK- $\beta$ 抑制剂组、附子理中丸各剂量组的实验结果与之相反。结论 附子理中丸可以通过调节NF- $\kappa$ B途径改善伊立替康诱导的大鼠结肠炎症以及腹泻情况。

**关键词:**大鼠;附子理中丸;腹泻;伊立替康;NF- $\kappa$ B途径

中图分类号:R442.2

文献标识码:A

文章编号:1001-5817(2023)02-0247-06

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2023.02.014

### Anti-inflammatory and anti-diarrheal effects and mechanisms of Fuzi Lizhong Wan by regulating NF- $\kappa$ B

Luo Fei, Guo Jianhong, Dou Yuyu, Tang Hanqing, Wang Jinying, Zhang Xuqing

(Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the anti-inflammatory and anti-diarrheal effects of Fuzi Lizhong Wan in rats with irinotecan-induced diarrhea. **Methods** Fifty-six Wistar male rats were randomly divided into the control group, the model group, berberine group, IKK- $\beta$  inhibitor group, low dose group of Fuzi Lizhong Wan (10 g/kg), medium dose group (20 g/kg) and high-dose group (40 g/kg) according to their body weight. Except for the control group, the other rats were intraperitoneally injected with irinotecan solution at a dose of 125 mg/kg according to body weight for 5 consecutive days, and at the same time the control group was intraperitoneally injected with an equivalent volume of normal saline. After modeling, each group was given the corresponding drugs by gavage. HE staining, transmission electron microscopy, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), real-time quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR), and Western Blot experiments were used to detect relevant indicators. **Results** The colonic mucosal injury of rats in the model group was much more severe, compared with that of the normal group. In the model group, various ultrastructural changes were obvious in colonic tissues. The contents of inflammatory factors TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$ 1 increased ( $P <$

基金项目:广西自然科学基金面上项目(2020GXNSFAA297159)

第一作者简介:罗菲(1996-),女,在读硕士研究生,研究方向:消化系统常见疾病基础研究,E-mail:1774685272@qq.com

通讯作者简介:唐汉庆(1976-),男,博士,教授,博士、硕士研究生导师,研究方向:消化系统常见疾病基础研究,E-mail:phd-tanghanqing@163.com

0.01), while the contents of IL-4 and IL-10 decreased ( $P < 0.01$ ). The expression levels of p65, p50, and IKK- $\beta$  mRNA significantly increased ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ), and the protein expression levels of p65, p50, and IKK- $\beta$  also significantly increased in the model group ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). Compared with the model group, the experimental results of the berberine group, IKK- $\beta$  inhibitor group, and low dose group, midium dose group and high dose group of Fuzi Lizhong Wan were opposite to those of the model group. **Conclusion** Fuzi Lizhong Wan can improve irinotecan-induced colonic inflammation and diarrhea in rats by regulating the NF- $\kappa$ B.

**Key words:** rats; Fuzi Lizhong Wan; diarrhea; irinotecan; NF- $\kappa$ B pathway

伊立替康是一种半合成喜树碱衍生物<sup>[1]</sup>。其活性代谢物 SN-38 通过肝脏中的葡萄糖醛酸化代谢为伊立替康葡萄糖醛酸化(SN-38G),然后经胆汁排泄进入小肠,但是肠道中的细菌产生  $\beta$ -葡萄糖醛酸酶(GUS),会将 SN-38G 分解回其活性形式 SN-38,其对肠上皮细胞有毒<sup>[2-3]</sup>。即使是低度腹泻也会明显干扰抗癌治疗效果,严重腹泻则会导致严重脱水、电解质失衡和营养不足,这与癌症患者的早期死亡有关。目前,伊立替康引起的腹泻治疗是基于饮食调整和使用止泻药物,如洛哌丁胺、生长抑素类似物奥曲肽等。然而,这些疗法往往会恶化现有的慢性胃肠道症状或诱发其他副作用<sup>[4-5]</sup>。因此本实验主要研究的是中成药附子理中丸对于伊立替康引起腹泻的干预作用,并通过 NF- $\kappa$ B 途径探讨其分子机制。

## 1 材料与方法

1.1 动物 SPF 级 8 周龄 Wistar 雄性大鼠 56 只,体重(180 $\pm$ 20) g,购自长沙市天勤生物技术有限公司[实验动物许可证号:SCXK(湘)2019-0013]。大鼠饲养于右江民族医学院 SPF 级动物实验中心,本实验的开展得到了右江民族医学院伦理委员会的认可。

1.2 药物与试剂 伊立替康(CPT-11)(MedChemExpress,批号:#106771,#120150);附子理中丸(河南省济源市济世药业有限公司,批号:国药准字 Z41020010);小檗碱(北京索莱宝科技有限公司,批号:No.924L022);IKK- $\beta$  抑制剂(MedChemExpress,批号:#24441);HE 染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号:No.20201215);TNF- $\alpha$  ELISA 试剂盒(Elabscience,批号:AK05PD281092);TGF- $\beta$ 1 ELISA 试剂盒(Elabscience,批号:AK02R28F7339);IL-4 ELISA 试剂盒(Elabscience,批号:AK064FLN1874);IL-10 ELISA 试剂盒(Elabscience,批号:AK042LPD0309);超纯 RNA 提取试剂盒(爱思进生物技术有限公司,批号:06421KD1);cDNA 第一链合成试剂盒(碧云天生物技术有限公司,批号:No.072522220912);实时荧光定量 PCR 检测试剂盒(翊圣生物科技有限公司,批号:H9001120);p65、p50 和 IKK- $\beta$  引物(上海捷瑞生物工程有限公司);兔抗鼠 GAPDH 多克隆抗体(武

汉三鹰生物技术有限公司,批号:00092829);兔抗鼠 p65 多克隆抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,批号:23002238);兔抗鼠 p50 多克隆抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,批号:00117644);兔抗鼠 IKK- $\beta$  多克隆抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,批号:00072558)。

1.3 仪器 CK41-32PH 型显微镜(日本 Olympus 公司);TGEM Plus 型微量紫外分光光度仪(北京天根生化科技有限公司);ME204E 型电子天平(奥豪斯电子仪器有限公司);5424R 小型台式高速冷冻离心机(上海艾本德国际贸易有限公司);酶标仪(河北慧采科技有限公司);Tanon-5200 multi 型全自动化学发光图像分析仪;LightCycler96 型实时荧光定量聚合酶链式反应系统(上海罗氏制药有限公司)。

1.4 动物分组、造模与给药 将 56 只 Wistar 雄性大鼠按体质量随机分为对照组、模型组、小檗碱组、IKK- $\beta$  抑制剂组,附子理中丸低剂量组、附子理中丸中剂量组、附子理中丸高剂量组,每组 8 只大鼠。除对照组外,其余大鼠按照 125 mg/kg 体质量给予腹腔注射伊立替康溶液,连续 5 d,对照组大鼠则腹腔注射等容量生理盐水。其间每日观察记录大鼠腹泻情况 2 次。在给药结束 48 h 内,除对照组外,其余组大鼠均发生不同程度的腹泻。造模成功后,阳性药物组给予 10:1 水溶液灌胃,给药量为 50 mg/kg;IKK- $\beta$  抑制剂组给予 1:1 水溶液灌胃,给药量为 2 mg/kg;将附子理中丸研磨成细粉状后,加入 1 倍蒸馏水煮 20 min,配制成 0.3 g/mL 的混悬液,附子理中丸低剂量组、附子理中丸中剂量组、附子理中丸高剂量组分别给予 10 g/kg、20 g/kg、40 g/kg 附子理中丸混悬液灌胃<sup>[6]</sup>;其余组则是给予等容量的蒸馏水灌胃;连续灌胃 30 d。随后取材检测相关指标。

1.5 HE 染色 将大鼠结肠组织石蜡切片依次放入二甲苯 I、二甲苯 II 各 20 min,然后依次放入无水乙醇 I、无水乙醇 II 各 15 min,之后放入 75% 的乙醇 5 min,然后用自来水冲洗,再放入苏木素染液中浸染 5 min,用分化液分化和返蓝液返蓝后将切片放入梯度酒精中各 5 min,然后将切片稍晾干后用中性树胶封固,最后用显微镜观察并进行图像采集分析。

1.6 透射电子显微镜 将组织固定后漂洗、脱水、浸透、包埋、修块、切片及染色后,用透射电子显微镜观察并进行图像采集分析。

1.7 ELISA 法 使用相对应的 ELISA 试剂盒检测,具体操作严格按照说明书进行。检测结肠组织中炎性因子 TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 1、IL-4 及 IL-10 的含量。

1.8 实时荧光定量聚合酶链式反应法检测大鼠结肠组织中 p65、p50 以及 IKK- $\beta$  mRNA 的表达情况 首先按照试剂盒说明书提取总 RNA,检测 RNA 浓度以及纯度 OD260/OD280 比值在 1.8~2.1 范围内的 RNA 样本可逆转录。然后用逆转录试剂盒将总 RNA 逆转录为 cDNA,其条件为 42  $^{\circ}$ C 孵育 60 min,80  $^{\circ}$ C 孵育 10 min。最后将 cDNA 进一步扩增,目的基因扩增所需的条件是 95  $^{\circ}$ C 预变性 5 min,95  $^{\circ}$ C 变性 10 s,60  $^{\circ}$ C 退火/延伸 30 s,整个过程 40 个循环。目的基因引物均由上海捷瑞生物工程有限公司合成,以 GAPDH 为内参,各目的 mRNA 用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  计算其相对表达量。引物序列见表 1。

1.9 蛋白免疫印迹法检测大鼠结肠组织中 p65、p50 以及 IKK- $\beta$  蛋白的表达情况 将大鼠结肠组织蛋白质提取完成后收集管内上清液;按 BCA 蛋白浓度测定试剂盒说明书测定总蛋白浓度,加入 5 $\times$ 蛋白上样缓冲液,放入 100  $^{\circ}$ C 水浴变性 10 min。对变性好的总蛋白进行凝胶电泳、转膜、封闭、一抗孵育、二抗孵育,应用自动化学发光图像分析仪显影,最后将 p65、p50 以及 IKK- $\beta$  蛋白的条带灰度值与内参条带灰度值的比值作为目的蛋白相对表达水平。

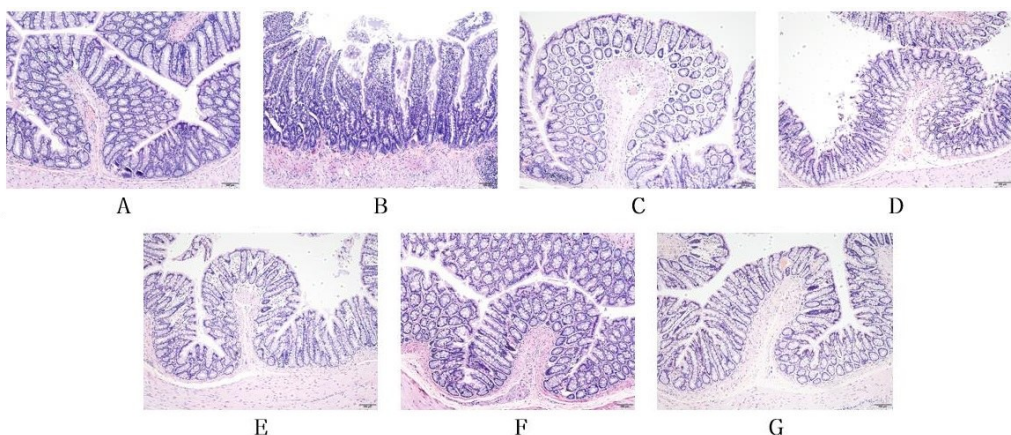
表 1 qRT-PCR 引物序列

| 引物名称            | 序列 5'-3'                  | 引物长度, bp |
|-----------------|---------------------------|----------|
| GAPDH-F         | GACATGCCCGCTGGAGAAAC      | 20       |
| GAPDH-R         | AGCCAGGATGCCCTTTAGT       | 20       |
| P-65-F          | GAGACCTGGAGCAAGCCATT      | 20       |
| P-65-R          | CTGTACCTGGAAGCAGAGG       | 20       |
| P-50-F          | TGTGGTGGAGGACTTGCTGAGG    | 22       |
| P-50-R          | AGTGCTGCCTTGCTGTTCTTGAG   | 23       |
| IKK- $\beta$ -F | CTGGTAGAACGGATGATGGCACTG  | 24       |
| IKK- $\beta$ -R | TGGCTTCTCCCTGAGTCTTCTGTAG | 25       |

1.10 统计学方法 采用 SPSS 26.0 软件对实验数据进行统计分析。结果采用( $\bar{x}\pm s$ )表示。两组间比较使用单因素方差分析,方差齐性时组间比较采用 LSD 检验;当方差不齐时比较采用 Tamhane's T2 检验,以  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

2.1 大鼠结肠组织形态学的变化 与对照组相比,模型组大鼠肠黏膜杯状细胞缺失,隐窝减少或缺失,腺体组织紊乱,黏膜和黏膜下层被炎性细胞浸润,上皮细胞间间隙明显扩大;与模型组相比,小檗碱组与 IKK- $\beta$  抑制剂组、附子理中丸低剂量组、附子理中丸中剂量组、附子理中丸高剂量组结肠黏膜相对光滑,杯状细胞形态正常,隐窝表面相对规则,腺体排列整齐,单层柱状上皮细胞形态正常但有些缺失,炎性细胞浸润减少;与小檗碱组相比,IKK- $\beta$  抑制剂组,附子理中丸低剂量组、附子理中丸中剂量组、附子理中丸高剂量组肠黏膜变化不太明显。见图 1。



注:A.对照组;B.模型组;C.小檗碱组;D. IKK- $\beta$  抑制剂组;E. 附子理中丸低剂量组;F. 附子理中丸中剂量组;G. 附子理中丸高剂量组。

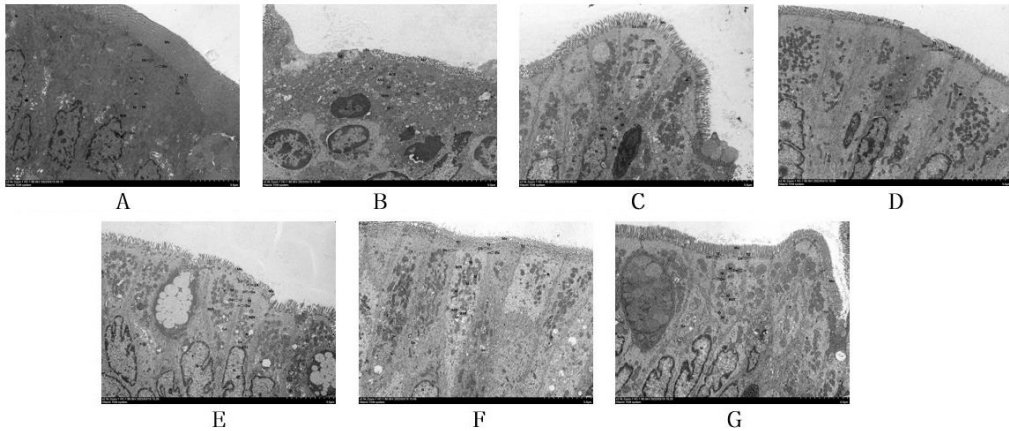
图 1 各组大鼠结肠组织形态学变化(HE,  $\times 200$ )

2.2 大鼠结肠组织超微结构的变化 与对照组相比,模型组肠黏膜上皮细胞损伤相对明显,细胞膜局部破损,细胞器明显肿胀,微绒毛(Mv)大面积退化,细胞间

隙局部明显增宽(箭头),线粒体(M)数量丰富,大多明显肿胀、变大,基质变淡,嵴断裂、减少;与模型组相比,小檗碱组与 IKK- $\beta$  抑制剂组、附子理中丸低剂量组、附

子理中丸中剂量组、附子理中丸高剂量组肠黏膜上皮细胞轻微水肿,细胞膜完整,个别细胞器轻微肿胀,微绒毛(MV)个别细胞退化,线粒体(M)数量丰富,膜完整,嵴存在,部分局部基质变淡;与小檗碱组相比,

IKK- $\beta$  抑制剂组、附子理中丸低剂量组、附子理中丸中剂量组、附子理中丸高剂量组肠黏膜超微结构变化不太明显。见图 2。



注:A. 对照组;B. 模型组;C. 小檗碱组;D. IKK- $\beta$  抑制剂组;E. 附子理中丸低剂量组;F. 附子理中丸中剂量组;G. 附子理中丸高剂量组。

图 2 各组大鼠结肠组织超微结构变化( $\times 2\ 500$ )

2.3 ELISA 法检测 TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 1、IL-4 及 IL-10 的含量 与对照组相比,模型组大鼠结肠组织 TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 1 含量明显升高,差异具有统计学意义( $P < 0.01$ );与模型组相比,小檗碱组、IKK- $\beta$  抑制剂组、附子理中丸各剂量组的 TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 1 含量降低,炎症有缓减的趋势,差异有统计学意义( $P < 0.01$ );与小檗碱组相比,IKK- $\beta$  抑制剂组、附子理中丸各剂量组的 TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 1 含量升高或降低,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。与对照组相比,模型组大鼠结肠组织 IL-4、IL-10 含量明显降低,差异具有统计学意义( $P < 0.01$ );与模型组相比,小檗碱组、IKK- $\beta$  抑制剂组、附子理中丸各剂量组的 IL-4、IL-10 含量升高,差异有统计学意义( $P < 0.01$ );与小檗碱组相比,IKK- $\beta$  抑制剂组、附子理中丸各剂量组的 IL-4、IL-10 含量升高或降低,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。见表 2、表 3。

表 2 各组大鼠结肠组织 TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 1 的含量

( $n = 5$ )

| 组别                | TNF- $\alpha$ /(pg $\cdot$ mL $^{-1}$ ) | TGF- $\beta$ 1/(ng $\cdot$ mL $^{-1}$ ) |
|-------------------|---|---|
| 对照组               | 111.935 $\pm$ 0.282                     | 0.941 $\pm$ 0.009                       |
| 模型组               | 164.952 $\pm$ 0.270 <sup>a</sup>        | 1.178 $\pm$ 0.004 <sup>a</sup>          |
| 小檗碱组              | 101.991 $\pm$ 0.427 <sup>b</sup>        | 0.697 $\pm$ 0.006 <sup>b</sup>          |
| IKK- $\beta$ 抑制剂组 | 150.995 $\pm$ 0.810 <sup>bc</sup>       | 0.833 $\pm$ 0.004 <sup>bc</sup>         |
| 附子理中丸低剂量组         | 143.226 $\pm$ 0.345 <sup>bc</sup>       | 0.774 $\pm$ 0.007 <sup>bc</sup>         |
| 附子理中丸中剂量组         | 110.276 $\pm$ 0.394 <sup>bc</sup>       | 0.757 $\pm$ 0.003 <sup>bc</sup>         |
| 附子理中丸高剂量组         | 84.420 $\pm$ 0.348 <sup>bc</sup>        | 0.842 $\pm$ 0.159 <sup>bc</sup>         |

注:①表内计量资料数据以( $\bar{x} \pm s$ )表示;②与对照组比较,a: $P < 0.01$ ;与模型组比较,b: $P < 0.01$ ;与小檗碱组比较,c: $P < 0.01$ 。

表 3 各组大鼠结肠组织 IL-4、IL-10 的含量

( $n = 5$ )

| 组别                | IL-4/(pg $\cdot$ mL $^{-1}$ )     | IL-10/(ng $\cdot$ mL $^{-1}$ )    |
|-------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| 对照组               | 109.308 $\pm$ 1.805               | 498.247 $\pm$ 3.726               |
| 模型组               | 70.401 $\pm$ 1.756 <sup>a</sup>   | 227.308 $\pm$ 1.037 <sup>a</sup>  |
| 小檗碱组              | 166.132 $\pm$ 3.053 <sup>b</sup>  | 333.737 $\pm$ 1.175 <sup>b</sup>  |
| IKK- $\beta$ 抑制剂组 | 188.506 $\pm$ 2.516 <sup>bc</sup> | 426.411 $\pm$ 4.395 <sup>bc</sup> |
| 附子理中丸低剂量组         | 117.542 $\pm$ 2.078 <sup>bc</sup> | 234.018 $\pm$ 0.444 <sup>bc</sup> |
| 附子理中丸中剂量组         | 166.266 $\pm$ 3.579 <sup>b</sup>  | 234.960 $\pm$ 1.415 <sup>bc</sup> |
| 附子理中丸高剂量组         | 172.261 $\pm$ 0.773 <sup>bc</sup> | 242.571 $\pm$ 0.899 <sup>bc</sup> |

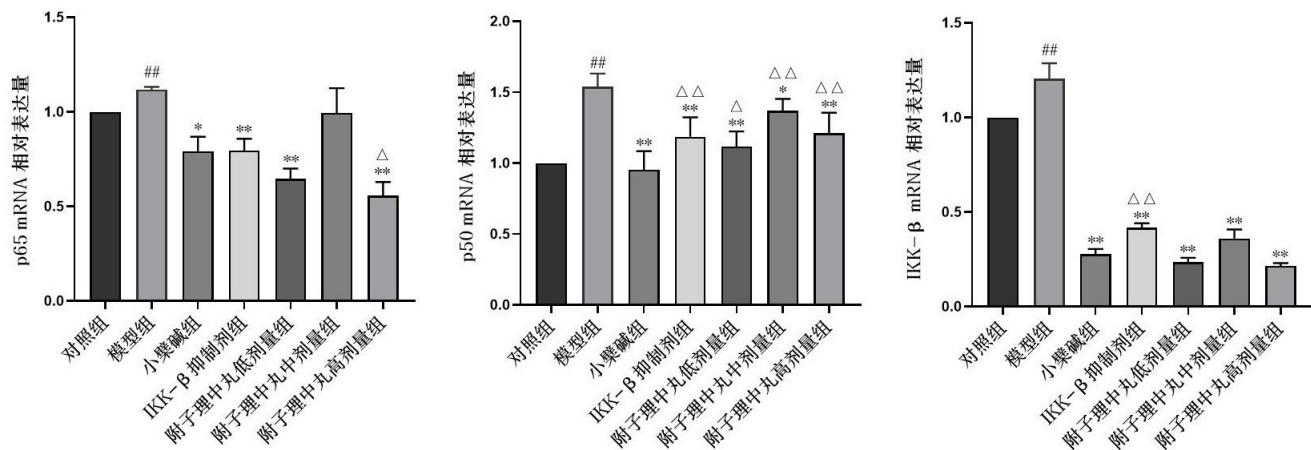
注:①表内计量资料数据以( $\bar{x} \pm s$ )表示;②与对照组比较,a: $P < 0.01$ ;与模型组比较,b: $P < 0.01$ ;与小檗碱组比较,c: $P < 0.01$ 。

2.4 实时荧光定量聚合酶链式反应法检测 p65、p50 以及 IKK- $\beta$  mRNA 的相对表达量 与对照组相比,模型组大鼠结肠组织 p65、p50 以及 IKK- $\beta$  mRNA 相对表达量明显升高,差异有统计学意义( $P < 0.01$ );与模型组相比,小檗碱组、IKK- $\beta$  抑制剂组、附子理中丸各剂量组的 p65、p50 以及 IKK- $\beta$  mRNA 相对表达量降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ );与小檗碱组相比,IKK- $\beta$  抑制剂组、附子理中丸各剂量组的 p65、p50 以及 IKK- $\beta$  mRNA 相对表达量升高或降低,部分组别差异有统计学意义( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。见图 3。

2.5 蛋白免疫印迹法检测 p65、p50 以及 IKK- $\beta$  蛋白的表达水平 与对照组相比,模型组大鼠结肠组 p65、p50 以及 IKK- $\beta$  蛋白的表达水平明显升高,差异具有统计学意义( $P < 0.01$ );与模型组相比,小檗碱组、

IKK-β 抑制剂组、附子理中丸各剂量组的 p65、p50 以及 IKK-β 蛋白的表达水平降低,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ );与小檗碱组相比,IKK-β 抑制剂

组、附子理中丸各剂量组的 p65、p50 以及 IKK-β 蛋白的表达水平升高或降低,部分组别差异有统计学意义 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。见表 4、图 4。



注:与对照组比较: #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ ;与模型组比较: \*  $P < 0.05$ ,

\*\*  $P < 0.01$ ;与小檗碱组比较: △  $P < 0.05$ , △△  $P < 0.01$ 。

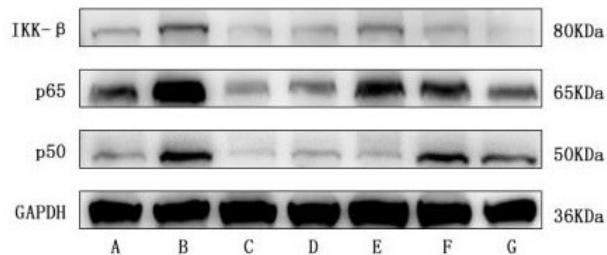
图 3 各组大鼠结肠组织 p65、p50、IKK-β mRNA 的相对表达量

表 4 各组大鼠结肠组织 p65、p50、IKK-β 蛋白表达水平

( $n = 3$ )

| 组别         | p65                         | p50                        | IKK-β                       |
|------------|-----------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| 对照组        | 0.925 ± 0.262               | 0.459 ± 0.134              | 0.687 ± 0.091               |
| 模型组        | 1.629 ± 0.154 <sup>a</sup>  | 1.132 ± 0.148 <sup>a</sup> | 1.273 ± 0.157 <sup>a</sup>  |
| 小檗碱组       | 1.169 ± 0.277 <sup>b</sup>  | 0.736 ± 0.188 <sup>c</sup> | 0.330 ± 0.036 <sup>c</sup>  |
| IKK-β 抑制剂组 | 1.033 ± 0.159 <sup>c</sup>  | 0.826 ± 0.156 <sup>b</sup> | 0.393 ± 0.088 <sup>c</sup>  |
| 附子理中丸低剂量组  | 0.931 ± 0.148 <sup>c</sup>  | 0.814 ± 0.093 <sup>b</sup> | 0.786 ± 0.143 <sup>ce</sup> |
| 附子理中丸中剂量组  | 0.735 ± 0.019 <sup>cd</sup> | 0.978 ± 0.078              | 0.262 ± 0.023 <sup>c</sup>  |
| 附子理中丸高剂量组  | 0.688 ± 0.184 <sup>ce</sup> | 0.926 ± 0.175              | 0.505 ± 0.111 <sup>c</sup>  |

注:①表内计量资料数据以( $\bar{x} \pm s$ )表示;②与对照组比较,a:  $P < 0.01$ ;与模型组比较,b:  $P < 0.05$ ,c:  $P < 0.01$ ;与小檗碱组比较,d:  $P < 0.05$ ,e:  $P < 0.01$ 。



注:A. 对照组;B. 模型组;C. 小檗碱组;D. IKK-β 抑制剂组;E. 附子理中丸低剂量组;F. 附子理中丸中剂量组;G. 附子理中丸高剂量组。

图 4 各组大鼠结肠组织 p65、p50、IKK-β 蛋白凝胶电泳图

### 3 讨论

附子理中丸是由张仲景《伤寒论》中名方理中丸加附子组方而成,2020年版《中华人民共和国药典》记载附子理中丸的功效为温中健脾,可用于脾胃虚寒,脘腹

冷痛,呕吐泄泻以及手足不温<sup>[7-8]</sup>。目前附子理中丸具有抗炎镇痛、调节免疫以及抗肿瘤等作用,但其主要还是作用在消化系统疾病方面<sup>[9]</sup>。另有研究表明附子理中丸可以通过降低 NF-κB1(p50)、RelA (p65)、TNF-α 因子,来减轻炎症反应<sup>[10]</sup>。

伊立替康是一种常用的化疗药物,据报道<sup>[11-12]</sup>,伊立替康作为二线疗法可以提高晚期癌症患者的总体生存率,其在 1996 年被食品和药物管理局批准用于治疗晚期结肠直肠癌。已有研究表明<sup>[13-14]</sup>,伊立替康会导致严重的肠屏障破坏,而屏障功能障碍与腹泻之间存在关联,但目前屏障功能障碍导致腹泻的机制尚不清楚。

本实验通过建立伊立替康诱导大鼠腹泻模型,用中成药附子理中丸去干预,旨在探讨附子理中丸通过 NF-κB 途径的抗炎止泻作用。腹泻以及炎症反应都会破坏肠黏膜屏障,因此通过 HE 染色以及透射电子显微镜两种实验观察肠黏膜的结构变化,以及超微结构

细胞器的改变。结果表明,附子理中丸对于肠黏膜有一定的改善作用。大多数情况下,促炎细胞因子和抗炎细胞因子同时释放,并同样作用于有效的免疫应答<sup>[15]</sup>。肿瘤坏死因子 TNF 超家族通常是膜结合蛋白,都能激活细胞内的信号转导途径。转化生长因子(TGF)超家族可以参与炎症和修复反应的调节,IL-4 与 IL-10 通常被认为是一种抗炎细胞因子,具有多种作用<sup>[16]</sup>。通过对 TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 1、IL-4 及 IL-10 炎症因子的检测,可以表明伊立替康诱导了肠道发生炎症反应,并且附子理中丸对于该反应有一定的调节作用。NF- $\kappa$ B 是一个转录因子家族,包括哺乳动物中的 NF- $\kappa$ B1 (p50/p105)、NF- $\kappa$ B2 (p52/p100)、RelA (p65)、RelB 和 c-Rel<sup>[17-18]</sup>。内源性炎症刺激(如细胞因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ )或病原体衍生物通过“经典”或“非经典”NF- $\kappa$ B 途径激活普遍存在的 p65 和 p50 同源/异源二聚体,其在胞质中与抑制蛋白 I  $\kappa$ B 结合形成了三聚体复合物而处于失活状态<sup>[19]</sup>。通过对 NF- $\kappa$ B 途径相关因子 p65、p50、IKK- $\beta$  mRNA 以及蛋白水平的检测,表明附子理中丸可能是通过调节 NF- $\kappa$ B 途径来减轻肠道的炎症反应,并且改善其免疫功能。

综上所述,本实验研究结果表明附子理中丸具有抗炎止泻的作用。其机制可能是附子理中丸通过调节 NF- $\kappa$ B 途径的上游以及下游因子,来改善肠道损伤。具体机制是降低促炎因子和升高抗炎因子来调节炎症反应,并且通过抑制 p65、p50 和 IKK- $\beta$  因子来干预 NF- $\kappa$ B 途径,进一步减轻肠道腹泻与炎症。

#### 参考文献:

[1] WANG Y Y, WEI B, WANG D P, et al. DNA damage repair promotion in colonic epithelial cells by andrographolide downregulated cGAS-STING pathway activation and contributed to the relief of CPT-11-induced intestinal mucositis[J]. *Acta Pharm Sin B*, 2022, 12(1): 262-273.

[2] QIN Y J, WANG N X, CHEN F, et al. Effects of cyclosporin on the pharmacokinetics and toxicities of irinotecan mediated by UGT1A1 in vitro and in vivo[J]. *Pharmazie*, 2020, 75(5): 186-190.

[3] LIN H Y, CHEN C Y, LIN T C, et al. Entropy-driven binding of gut bacterial  $\beta$ -glucuronidase inhibitors ameliorates irinotecan-induced toxicity[J]. *Commun Biol*, 2021, 4(1): 280.

[4] LI M, HUANG Y G, JIN H M, et al. Vitamin A ameliorated irinotecan-induced diarrhea in a piglet model involving enteric glia modulation and immune cells infiltration[J]. *Nutrients*, 2022, 14(23): 5120.

[5] COSTA D V S, COSTA D V S, SOUSA C N S, et al. The alpha-lipoic acid improves survival and prevents irinote-

can-induced inflammation and intestinal dysmotility in mice[J]. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2020, 13(11): 361.

- [6] 武志娟, 李建华, 郭海萍, 等. 附子理中汤对腹泻型肠易激大鼠模型免疫调节机制的研究[J]. *中华中医药学刊*, 2018, 36(12): 2921-2924, 3097.
- [7] 左铮云, 黄艳美, 崔言坤, 等. 附子理中丸通过调节 MAPK 信号通路改善顺铂诱导 CIPN 模型小鼠损伤的作用机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28(5): 1-7.
- [8] 汪云伟, 王兴灵, 何娅, 等. 附子理中汤(丸)药理作用与临床应用研究进展[J]. *中药与临床*, 2022, 13(4): 71-76.
- [9] 蔡秀江, 李红, 黄美艳. 附子理中汤临床应用研究进展[J]. *实用中医杂志*, 2021, 37(10): 1794-1797.
- [10] 孙健淇, 张若琛, 张颖利, 等. 基于网络药理学探究附子理中丸治疗溃疡性结肠炎的机制[J]. *中成药*, 2022, 44(6): 2027-2033.
- [11] LI M, WANG L X, WEI Y J, et al. Anti-colorectal cancer effects of a novel camptothecin derivative PCC0208037 in vitro and in vivo[J]. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2022, 16(1): 53.
- [12] GONG X, ZHANG Q S, RUAN Y J, et al. Chronic alcohol consumption increased bile acid levels in enterohepatic circulation and reduced efficacy of irinotecan[J]. *Alcohol Alcohol*, 2020, 55(3): 264-277.
- [13] WARDILL H R, BOWEN J M, VAN SEBILLE Y Z A, et al. TLR4-dependent claudin-1 internalization and secretagogue-mediated chloride secretion regulate irinotecan-induced diarrhea[J]. *Mol Cancer Ther*, 2016, 15(11): 2767-2779.
- [14] YU Q Q, ZHANG H, ZHAO S Y, et al. Systematic evaluation of irinotecan-induced intestinal mucositis based on metabolomics analysis[J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 958882.
- [15] LIBERALE L, MINISTRINI S, CARBONE F, et al. Cytokines as therapeutic targets for cardio- and cerebrovascular diseases[J]. *Basic Res Cardiol*, 2021, 116(1): 23.
- [16] WANG B R, SHEN J. NF- $\kappa$ B inducing kinase regulates intestinal immunity and homeostasis[J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 895636.
- [17] SHAO Y, CHENG Z J, LI X Y, et al. Immunosuppressive/anti-inflammatory cytokines directly and indirectly inhibit endothelial dysfunction—a novel mechanism for maintaining vascular function[J]. *J Hematol Oncol*, 2014, 7: 80.
- [18] LIU Y M, WANG J Z, ZHANG X M. An update on the multifaceted role of NF-kappaB in endometriosis[J]. *Int J Biol Sci*, 2022, 18(11): 4400-4413.
- [19] O'DEA E, HOFFMANN A. NF- $\kappa$ B signaling[J]. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*, 2009, 1(1): 107-115.

收稿日期: 2023-01-16; 修回日期: 2023-02-16