

## 华蟾素致泻机制初步研究

孙丽丽, 罗川, 沈龙海, 潘绵立

(中国医药工业研究总院上海医药工业研究院创新药物与制药工艺国家重点实验室,  
上海市生物物质成药性评价专业技术服务中心, 上海 200437)

**[摘要]** **目的:** 研究华蟾素原液及其主要成分生物碱对大鼠体外结肠平滑肌收缩的影响、体内引起腹泻的相关通道蛋白异常表达的影响。**方法:** 取正常大鼠部分结肠组织标本放入浴槽中连接移位张力换能器, 待结肠标本张力稳定后给予不同剂量的华蟾素、生物碱溶液, 记录结肠标本收缩张力变化。给予大鼠等效临床剂量华蟾素及生物碱溶液, 连续灌胃给药 7 d, d 8 处死大鼠, 取结肠组织, 采用 Western blot 检测钙通道蛋白 CaV1.2 和 CaV1.3、钠通道蛋白 NHE2 和 NHE3、水通道蛋白 AQP3 和 AQP8 的表达变化。**结果:** 原液 < 0.10 mg (含药量 < 0.09 mg), 结肠标本张力无明显变化; 原液 0.10 ~ 18.74 mg (含药量 0.09 ~ 16.21 mg), 结肠标本张力变化增加; 原液 > 19.25 mg (含药量 > 16.64 mg), 结肠标本张力降低。生物碱 < 0.06  $\mu$ g, 结肠标本张力无明显变化; 生物碱 0.06 ~ 23.41  $\mu$ g, 结肠标本张力增加; 生物碱 > 24.03  $\mu$ g, 结肠标本张力降低。与正常组相比, 华蟾素组 NHE2, NHE3, AQP3, AQP8 显著降低 ( $P < 0.05$ ), CaV1.2 显著增加 ( $P < 0.05$ ); 生物碱组 NHE3 和 AQP3 显著降低 ( $P < 0.05$ )。其余蛋白表达均无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。**结论:** 致泻机制研究中, 离体结肠张力实验的结果表明, 一定剂量的华蟾素可促进肠蠕动, 提高腹泻的发生率; 高于一定剂量后可抑制肠蠕动。结肠中腹泻相关蛋白水平检测结果表明, 给予华蟾素和生物碱溶液均会引起腹泻相关通道蛋白的变化, 生物碱溶液对通道蛋白产生显著性影响的种类少于原液, 提示致泻成分除生物碱外还有其他成分。

**[关键词]** 华蟾素; 腹泻; 生物碱

**[中图分类号]** R965 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1003-3734(2023)22-2311-06

## A preliminary study on the mechanism of catharsis induced by cinobufagin

SUN Li-li, LUO Chuan, SHEN Long-hai, PAN Mian-li

(State Key Laboratory of New Drug and Pharmaceutical Process, Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry,  
China State Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai Professional and Technical Service Center for  
Biological Material Drug Gability Evaluation, Shanghai 200437, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the effects of cinobufagin and its main component alkaloids on the contraction of colonic smooth muscle in rats *in vitro* and their influence on abnormal expression of channel proteins related to diarrhea *in vivo*. **Methods:** Normal rat colon tissue samples were put into the bath to connect with the displacement tension transducer. After the tension of the colon sample was stabilized, different doses of cinobufagin and alkaloid solution were given to the colon sample, and the changes of the contraction tension of the colon sample were recorded. The rats were given the clinically equivalent dose of cinobufagin and alkaloid solution by gavage for 7 consecutive days, and the rats were killed on the 8th day. Colon tissues were taken, and the expressions of calcium channel proteins CaV1.2, CaV1.3, sodium channel proteins NHE2, NHE3, aquaporins AQP3, AQP8 were detected by

**[作者简介]** 孙丽丽, 女, 硕士研究生, 研究方向: 免疫药理。E-mail: sunll1204@163.com。

**[通讯作者]** 潘绵立, 男, 副研究员, 研究方向: 代谢与免疫药理。E-mail: robert.pan@163.com。

Western blot to observe the changes. **Results:** The tension of colon specimen did not change significantly when the original solution was  $<0.10$  mg (drug content  $<0.09$  mg);  $0.10 \sim 18.74$  mg stock solution ( $0.09 \sim 16.21$  mg) increased the tension of colon specimen. If the original solution was  $>19.25$  mg (drug content  $>16.64$  mg), the tension of colon specimen decreased. When alkaloids was  $<0.06$   $\mu\text{g}$ , the tension of colon specimen had no obvious change;  $0.06 \sim 23.41$   $\mu\text{g}$  alkaloid increased the tension of colon specimen. When alkaloids was  $>24.03$   $\mu\text{g}$ , the tension of colon specimen decreased. Compared with the normal group, the sodium channel proteins NHE2, NHE3 and aquaporins AQP3, AQP8 in the cinobufotalin group decreased significantly ( $P < 0.05$ ), while the calcium channel protein CaV1.2 increased significantly ( $P < 0.05$ ). Sodium channel protein NHE3 and aquaporin AQP3 were significantly decreased in the alkaloid group ( $P < 0.05$ ). There was no significant difference in the expression of other proteins ( $P > 0.05$ ). **Conclusion:** In the study of diarrhea mechanism, the results of colon tension test *in vitro* showed that a certain dose of cinobufagin could promote intestinal peristalsis and increase the incidence of diarrhea, and it could inhibit intestinal peristalsis when the dosage was higher than a certain level. The detection results of diarrhea-related proteins in the colon showed that the administration of cinobufotalin and alkaloid solution would cause changes in diarrhea-related channel proteins, and the number of alkaloid solutions that had significant effects on channel proteins was less than that of the original solution, suggesting that there were other components in the purgative component besides the alkaloids.

[ **Key words** ] cinobufagin; diarrhea; alkaloid

华蟾素是经水提醇沉法从中华大蟾蜍皮中提取,主要含有蟾毒内酯类、生物碱类、多肽类、胆固醇类等成分,具有解毒、止痛、消肿之功效。《神农本草经》中曾记载“蟾蜍味辛寒,主邪气,破癌坚血、痈肿、阴疮,服之不患热病”,为临床运用华蟾素治疗肿瘤提供了理论依据。目前,临床相关研究已证实华蟾素在抗病毒、诱导血管收缩、抑制血管内皮细胞生成、增强免疫力、抗肿瘤等方面具有重要的作用,现已广泛应用于治疗大肠癌、肺癌、肝癌、食管癌、胃癌等多种恶性肿瘤。与普通化疗药物相比,华蟾素具有不良反应少、抗癌活性高等优点,且能够提高患者机体免疫力、抑制肿瘤细胞增殖并诱导其凋亡、提高患者生活质量。但在用药过程中,其主要不良反应为腹泻。为了进一步厘清导致腹泻的原因,本文就华蟾素引起腹泻可能的机制进行探索研究,以期临床应用降低腹泻发生率提供解决思路及方法。

## 材料与方 法

### 1 药物与试剂

华蟾素由安徽华润金蟾药业股份有限公司提供,黄褐色液体(1 mL 原液含药量为 876 mg),气腥臭,用水提醇沉法提取。华蟾素原液中生物碱含量为 0.127% (质量百分比);原液经正丁醇萃取提纯得到生物碱溶液,含量为 2.115% (质量百分比)。

华蟾素原液称重:1 mL 为 1.013 g,生物碱溶液称重:1 mL 为 0.971 g。

对二甲氨基苯甲醛(上海麦克林生化科技有限公司);5-羟色胺盐酸盐(上海诗丹德标准技术服务有限公司)。Kreb's 缓冲液( $117 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaCl, $4.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  KCl, $2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{CaCl}_2$ , $1.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{MgCl}_2$ , $24.8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{NaHCO}_3$ , $1.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , $11.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  葡萄糖,pH 7.4;NaCl,KCl, $\text{MgCl}_2$ , $\text{NaHCO}_3$ , $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )和无水葡萄糖均购自国药集团化学试剂有限公司; $\text{CaCl}_2$ (上海美兴化工有限公司)。

兔抗-CACNA1D 多克隆抗体(批号:829A019)、兔抗-Cav1.2 多克隆抗体(批号:829A009)、兔抗-SLC9A2 多克隆抗体(批号:829A022)、兔抗-SLC9A3 多克隆抗体(批号:829A023)均购自 Absin 公司;兔抗-AQP3 多克隆抗体(批号:150218040302)、兔抗-AQP8 多克隆抗体(批号:A10620090802)均购自 Servicebio 公司。

RIPA 裂解液、cocktail(工作液浓度 50 倍)、PMSF( $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )、磷酸化蛋白酶抑制剂、BCA 蛋白定量检测试剂盒、蛋白上样缓冲液(工作液浓度 5 倍)、SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒、脱脂奶粉、ECL、显影定影试剂、肌动蛋白( $\beta$ -actin)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)、组蛋白 H3(histone H3)、辣根过

氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔、HRP 标记驴抗山羊、HRP 标记山羊抗小鼠、HRP 标记山羊抗大鼠、转移缓冲液、电泳缓冲液、TBS 缓冲液均购自 Servicebio 公司;聚偏二氟乙烯(PVDF)膜 0.45  $\mu\text{m}$ 、PVDF 膜 0.22  $\mu\text{m}$  均购自 Millipore 公司;蛋白 Marker 购自 Therm(Fermentas)公司。

## 2 仪器

MS105DU 半微量天平(瑞士 Mettler Toledo 公司);HEIDOLPH HI 旋转蒸发仪(德国 Heidolph 公司);UV-2600 紫外-可见分光光度计[岛津仪器(苏州)有限公司];RM6240BD 多道生理信号采集处理系统(成都仪器厂);YC-2 程控刺激器(成都仪器厂);SQG-4 四腔器官浴槽系统(成都仪器厂);ALC-CWB 数控恒温循环水槽(上海奥尔科特生物科技有限公司);PL-203 电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司];Rt2100c 酶标检测仪(Rayto 公司);neofuge 13R 冷冻离心机(Heal Force 公司);AJC-0501-P 纯水仪(重庆艾科浦公司);NO.8014 Paper Trimmer(Deli 公司);D1008E 掌上离心机(Servicebio 公司);MX-F 涡旋混合器(Servicebio 公司);MS-PB 磁力搅拌器(Servicebio 公司);TSY-B 脱色摇床(Servicebio 公司);DYY-6C 电泳仪(北京六一仪器厂);AX-II 暗匣(广东粤华医疗器械厂有限公司);V300 扫描仪(EPSON 公司);alphaEaseFC 灰度分析软件(Alpha Innotech 公司);Adobe Photo-Shop 图像分析软件(Adobe 公司);KZ-II 匀浆仪(Servicebio 公司)。

## 3 动物

雄性 SD 大鼠 35 只,SPF 级,体重 180~200 g,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司。在恒温(21  $^{\circ}\text{C}$ ~23  $^{\circ}\text{C}$ )、恒湿(45%~65%)、各 12 h 明暗周期的饲养室,同性别 5 只大鼠同笼饲养,用全价颗粒饲料喂养,自由进食和饮水。质量合格证号:20170005065245;使用许可证号:SYXK(沪)2019-0027。

## 4 供试品的制备

原液稀释液:取 5  $\mu\text{L}$  华蟾素原液,溶于 495  $\mu\text{L}$  Kreb's 缓冲液得原液 100 倍稀释液(1  $\mu\text{L}$  稀释液相当于 0.01  $\mu\text{L}$  原液(0.01 mg 原液))。

生物碱稀释液 1:取 6  $\mu\text{L}$  生物碱溶液,溶于 994  $\mu\text{L}$  的 Kreb's 缓冲液得生物碱溶液稀释液(1  $\mu\text{L}$  生物碱溶液稀释液 1 相当于 0.01  $\mu\text{g}$  生物碱)。

生物碱稀释液 2:取 30  $\mu\text{L}$  生物碱溶液,溶于

70  $\mu\text{L}$  Kreb's 缓冲液得生物碱溶液稀释液 2(1  $\mu\text{L}$  生物碱溶液稀释液 2 相当于 6.16  $\mu\text{g}$  生物碱)。

## 5 大鼠离体结肠平滑肌实验

### 5.1 华蟾素对大鼠离体结肠平滑肌张力的影响

健康雄性 SD 大鼠 10 只,实验前大鼠禁食不禁水 24 h,大鼠颈部脱臼处死,腹部正中打开腹腔,取结肠中段约 2~3 cm 的部分结肠,去除肠系膜并放入盛有 Kreb's 缓冲液的容器中。肠腔内注入 Kreb's 缓冲液冲洗肠腔,把肠管置于通有 10 mL 95%  $\text{O}_2$  和 5%  $\text{CO}_2$  的 Kreb's 缓冲液中备用。

将肠管标本下端离体组织器官连接于恒温灌流槽中的倒钩上,另一端垂直连接于平滑肌张力传感器上。使结肠平滑肌标本置于持续通有 95%  $\text{O}_2$  和 5%  $\text{CO}_2$  且恒温 37  $^{\circ}\text{C}$  的 5 mL Kreb's 缓冲液中。张力传感器通过 RM6240BD 多道生理信号采集处理系统连接至计算机。打开计算机上的 RM6240 生物信号采集处理系统,调节平滑肌张力传感器,使标本有 1 g 的前负荷,待结肠平滑肌标本自发性收缩稳定并平衡 15~20 min 后进行实验。华蟾素分次给药 0.01 mg(加入 1  $\mu\text{L}$  原液稀释液)、0.10 mg(加入 10  $\mu\text{L}$  原液稀释液)、2.38 mg(加入 2.35  $\mu\text{L}$  原液)、5.07 mg(加入 5.00  $\mu\text{L}$  原液)、10.13 mg(加入 10.00  $\mu\text{L}$  原液)、15.20 mg(加入 15.00  $\mu\text{L}$  原液)、18.74 mg(加入 18.50  $\mu\text{L}$  原液)、19.25 mg(加入 19.00  $\mu\text{L}$  原液),每次给药后记录肠管标本的活动 15 min,记录完成后将恒温灌流槽中的液体排出,用流动的 Kreb's 缓冲液轻轻冲洗,冲洗后加入 Kreb's 缓冲液 10 mL,结肠平滑肌标本自发性收缩稳定并平衡 15~20 min 后再次给药。

### 5.2 生物碱溶液对大鼠离体结肠平滑肌张力的影响

健康雄性 SD 大鼠 10 只,实验前各只大鼠均禁食 24 h,禁食期间可以自由饮水。实验前 SD 大鼠颈部脱臼处死,腹部正中打开腹腔,迅速取下距肛门 2 cm 约 2~3 cm 长的结肠肠管,去除结肠肠系膜并放入盛有 Kreb's 缓冲液的容器中。向结肠肠腔内注入 Kreb's 缓冲液冲洗肠腔,把肠管置于通有 10 mL 95%  $\text{O}_2$ 、5%  $\text{CO}_2$  的 Kreb's 缓冲液中备用。

将肠管标本下端离体组织器官连接于恒温灌流槽中的倒钩上,另一端垂直连接于平滑肌张力传感器上。使结肠平滑肌标本置于持续通有 95%  $\text{O}_2$  和 5%  $\text{CO}_2$  且恒温 37  $^{\circ}\text{C}$  的 10 mL Kreb's 缓冲液中。张力传感器通过 RM6240BD 多道生理信号采集处理系统连接至计算机。打开计算机上的 RM6240 生物

信号采集处理系统,调节平滑肌张力传感器,使标本有 1 g 的前负荷,待结肠平滑肌标本自发性收缩稳定并平衡 15 ~ 20 min 后进行实验。提纯生物碱分次给药 0.01  $\mu\text{g}$ (加入 1  $\mu\text{L}$  生物碱稀释液 1)、0.06  $\mu\text{g}$ (加入 5  $\mu\text{L}$  生物碱溶液稀释液 1)、0.12  $\mu\text{g}$ (加入 10  $\mu\text{L}$  生物碱溶液稀释液 1)、6.16  $\mu\text{g}$ (加入 1  $\mu\text{L}$  生物碱溶液稀释液 2)、12.32  $\mu\text{g}$ (加入 2  $\mu\text{L}$  生物碱溶液稀释液 2)、18.48  $\mu\text{g}$ (加入 3  $\mu\text{L}$  生物碱溶液稀释液 2)、22.80  $\mu\text{g}$ (加入 1.11  $\mu\text{L}$  生物碱溶液)、23.41  $\mu\text{g}$ (加入 1.14  $\mu\text{L}$  生物碱溶液)、24.03  $\mu\text{g}$ (加入 1.17  $\mu\text{L}$  生物碱溶液),每次给药后记录肠管标本的活动 15 min。

## 6 大鼠结肠腹泻相关通道蛋白检测

15 只 SD 大鼠,雄性,适应性饲养 1 周后,按照体重随机分为对照组、华蟾素等效人临床剂量组(等效人临床剂量 16 粒 $\cdot\text{d}^{-1}$ ,114.3  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )、生物碱溶液组(生物碱含量等效人临床剂量 16 粒 $\cdot\text{d}^{-1}$ ),每组 5 只。每天灌胃(*ig*)给药 1 次,连续 7 d。末次给药后禁食,d 8 处死各组大鼠,取距盲肠 2 cm 的新鲜结肠组织,采用 Western blot 检测结肠部位钙通道蛋白 CaV1.2 和 CaV1.3、钠通道蛋白 NHE2 和 NHE3、水通道蛋白(aquaporin, AQP3 和 AQP8) 的表达变化。将结肠组织剪成小块匀浆裂解,离心收集上清,得总蛋白溶液。将蛋白溶液按照 4:1 的比例加入蛋白上样缓冲液(工作液浓度 5 倍,稀释 5 倍后使用),沸水浴变性 15 min,收入  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱保存备用。将制备好的蛋白样本电泳分离后转膜,5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h,按各指标说明书(稀释一抗:TBST 溶解的 5% 脱脂牛奶,磷酸化蛋白使用 TBST 溶解的 5% BSA;稀释二抗:TBST 稀释 3 000 倍)稀释抗体后,加入一抗  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  孵育过夜,TBST 洗脱后二抗室温孵育 30 min,TBST 洗涤后 ECL 化学发光法显色。曝光后的胶片用显影、定影试剂进行显影和定影。将胶片进行扫描存档,PhotoShop 整理去色,Alpha 软件处理系统分析目标带的光密度值。

## 7 数据处理

实验数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示,用 ANOVA 进行统计学检验,组间比较  $P < 0.05$  视为差异有统计学意义。

# 结 果

## 1 大鼠离体结肠平滑肌实验结果

### 1.1 华蟾素对大鼠离体结肠平滑肌张力的影响

加入原液  $< 0.10\text{ mg}$ (生物碱含量  $< 0.13\text{ }\mu\text{g}$ ,含药量  $< 0.09\text{ mg}$ ),结肠标本张力无明显变化;加入原

液  $0.10 \sim 18.74\text{ mg}$ (生物碱含量  $0.13 \sim 23.80\text{ }\mu\text{g}$ ,含药量  $0.09 \sim 16.21\text{ mg}$ ),张力增加;当加入的原液  $> 19.25\text{ mg}$ (生物碱含量  $> 24.44\text{ }\mu\text{g}$ ,含药量  $> 16.64\text{ mg}$ ),结肠标本张力降低。见表 1。

表 1 给予不同剂量华蟾素前后结肠张力变化

$\bar{x} \pm s, n = 5$

原液质量/ $\text{mg}$	肌条张力变化值/ $\text{g}$
0.01	$0.013 \pm 0.022$
0.10	$0.750 \pm 0.124$
2.38	$1.039 \pm 0.100$
5.07	$0.874 \pm 0.110$
10.13	$0.709 \pm 0.393$
15.20	$0.709 \pm 0.373$
18.74	$0.386 \pm 0.153$
19.25	$-0.436 \pm 0.041$

### 1.2 生物碱溶液对大鼠离体结肠平滑肌张力的影响

加入生物碱  $< 0.06\text{ }\mu\text{g}$ ,结肠标本张力无明显变化;加入生物碱在  $0.06 \sim 23.41\text{ }\mu\text{g}$ ,结肠标本张力增加;加入生物碱  $> 24.03\text{ }\mu\text{g}$ ,结肠标本张力降低。可以观察到对结肠标本张力产生促进和抑制作用时,生物碱溶液给药剂量变化区间较华蟾素小。见表 2。

表 2 给予不同剂量生物碱前后结肠张力变化

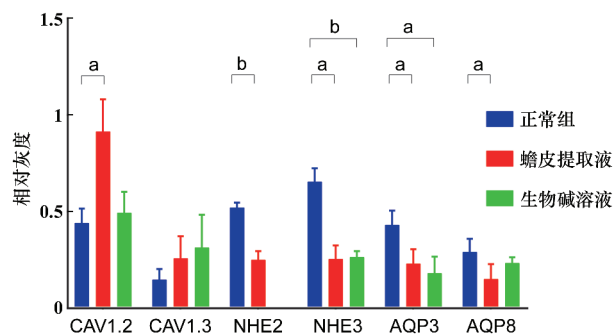
$\bar{x} \pm s, n = 5$

生物碱质量/ $\mu\text{g}$	肌条张力变化值/ $\text{g}$
0.0	$0.005 \pm 0.070$
0.06	$0.261 \pm 0.014$
0.12	$0.635 \pm 0.062$
6.16	$0.816 \pm 0.029$
12.32	$0.583 \pm 0.120$
18.48	$0.513 \pm 0.272$
22.80	$0.307 \pm 0.098$
23.41	$0.003 \pm 0.150$
24.03	$-0.026 \pm 0.110$

## 2 华蟾素及生物碱溶液对大鼠结肠腹泻相关通道蛋白表达的影响

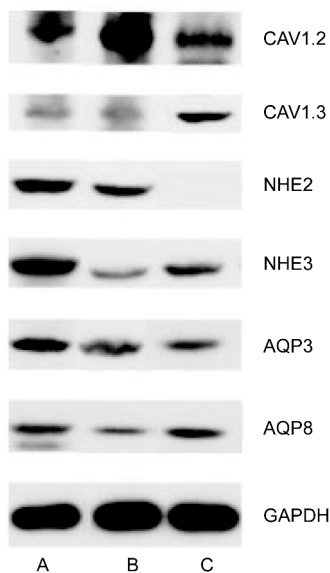
与正常组相比,华蟾素组钠通道蛋白 NHE2, NHE3 和水通道蛋白 AQP3, AQP8 表达显著降低( $P < 0.05$ ),钙通道蛋白 CaV1.2 表达显著增加( $P < 0.05$ );生物碱组钠通道蛋白 NHE3 和水通道

蛋白 AQP3 表达显著降低 ( $P < 0.05$ ), 钠通道蛋白 NHE2 表达量较少未测得数据。其余蛋白表达均无显著性差异 ( $P > 0.05$ ), 见图 1 和图 2。



与正常组相比, a:  $P < 0.05$ , b:  $P < 0.001$

图 1 目的条带灰度值和内参条带灰度值比值



A: 对照组; B: 华蟾素组; C: 生物碱溶液组

图 2 Western blot 检测各组之间 CaV1.2, CaV1.3, NHE2, NHE3, AQP3, AQP8 蛋白表达

## 讨 论

华蟾素是我国传统中药材中华大蟾蜍干皮的提取物,在抗炎、抗病毒、抗肿瘤、消肿止痛等方面具有重要的应用价值。近年来,华蟾素的抗肿瘤活性逐渐被国内外学者重视。华蟾素制剂作为我国自主研发的抗肿瘤中药制剂,目前临床应用普遍且抗肿瘤效果显著<sup>[1]</sup>。然而,临床使用华蟾素片,患者常出现不良反应腹泻。由于成药较早,我国当时还没有完善的药品注册法规制度,相关动物实验开展较少,

导致相关研究数据不足,暂未找到针对腹泻这一不良反应的解决措施。为此我们对华蟾素进行致泻机制的初步研究,希望能明确其不良反应腹泻具体的发生机制,同时对其中主要成分生物碱进行了考察。

本研究运用离体肠道平滑肌实验结合体内结肠腹泻相关通道蛋白检测实验,对华蟾素及生物碱进行研究。在离体肠道平滑肌实验中,按照华蟾素等效临床剂量  $9 \text{ 粒} \cdot \text{d}^{-1}$ , 计算出大鼠原液一次给药量为  $238 \text{ mg}$ , 换算成原液的体积约为  $235 \text{ } \mu\text{L}$ , 药物未经代谢直接作用于结肠标本,故将其剂量降低 100 倍,使用  $2.35 \text{ } \mu\text{L}$  进行起始实验。在此基础上探究不同剂量华蟾素对结肠标本张力的影响。根据生物碱溶液与华蟾素原液生物碱含量,设计生物碱溶液给药量,探究华蟾素中生物碱对结肠标本张力的影响,发现华蟾素对离体结肠平滑肌张力的促进和抑制作用与生物碱关系密切。

肠道的吸收和分泌的平衡对维持肠道内环境的稳态发挥着重要的作用,当致泻物质,如细菌、病毒和毒素作用于肠道时,相关离子通道及转运体的表达和(或)活性就会发生改变,大量的水、电解质在肠腔内聚集,从而形成腹泻<sup>[2]</sup>。研究表明大量的 NaCl 主要通过肠腔侧  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  交换子 (NHEs) 介导的电中性途径被吸收。目前发现在肠道主要有 4 种 NHEs (NHE1, NHE2, NHE3, NHE8), 是肠道电中性钠吸收的重要载体<sup>[3]</sup>。NHE2 和 NHE3 共同参与  $\text{Cl}^-$  的吸收,在结肠具有较高的表达<sup>[4-5]</sup>。此外,离子通道电流改变而引起肠道平滑肌电重构在肠运动功能障碍的发生、发展中的作用越来越受到重视。研究发现, L-型钙通道在神经元动作电位的产生和传递以及细胞膜兴奋性的维持中起着重要的作用<sup>[6-7]</sup>。其中,  $\alpha 1\text{C}$  (Cav1.2) 及  $\alpha 1\text{D}$  (Cav1.3) 亚基构成 L-型钙通道的离子通透性孔道部分,与肠道动力异常关系密切<sup>[8-9]</sup>。研究表明, AQP3 是负责跨细胞膜转运水分子的主要蛋白,同时还参与肠内黏液的分泌和肠道细胞内外环境的稳态维持。AQP3 发生结构或活性改变,会导致肠道对水的吸收和代谢发生紊乱,继而导致水在肠腔中聚集造成腹泻<sup>[10]</sup>。AQP3, AQP8 是结肠 AQP3 中较关键的亚型之一,其表达水平影响结肠上皮对肠道内水分的转运<sup>[11-13]</sup>。故进一步对结肠中腹泻相关蛋白水平进行探究,结果显示,与正常组相比较,华蟾素组钙通道蛋白 CaV1.2 表达显著性增加,钠通道蛋白 NHE2, NHE3 和水通道蛋白 AQP3, AQP8 表达显著下降,增加腹

泻出现的可能性;生物碱组钠通道蛋白 NHE3 和水通道蛋白 AQP3 表达显著下降,增加腹泻出现的可能性,钠通道蛋白 NHE2 表达量较少无法测得有效数据,变化趋势与增加腹泻出现趋势相一致。

综上所述,一定剂量的华蟾素与生物碱均可引起体外离体肠道肌张力的收缩,引起与腹泻相关通道蛋白变化。临床应用华蟾素,患者常出现不良反应腹泻,与药物中生物碱含量密切相关。尽管引起腹泻的因素不仅是生物碱,但是由于提取液中生物碱含量较高,推测通过改变华蟾素药物中生物碱含量(前期研究发现降低生物碱含量对药效影响不大)可以减少不良反应腹泻的发生,提高患者的顺应性,改善患者生活质量。

#### [ 参 考 文 献 ]

- [1] 刘旭,邵瑞,田晓轩,等. 华蟾素抗肿瘤研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(5): 229 - 234.
- [2] 陈洪浪,宋丽军,赵淑敏,等. NHEs 在腹泻中的研究进展[J]. 广东医学, 2017, 38(6): 963 - 966.
- [3] SINGH V, YANG J, CHEN TE, *et al.* Translating molecular physiology of intestinal transport into pharmacologic treatment of diarrhea: stimulation of Na<sup>+</sup> absorption[J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2014, 12(1): 27 - 31.
- [4] KATO A, ROMERO MF. Regulation of electroneutral NaCl ab-

sorption by the small intestine[J]. *Annu Rev Physiol*, 2011, 73: 261 - 281.

- [5] TSE CM, BRANT SR, WALKER MS, *et al.* Cloning and sequencing of a rabbit cDNA encoding an intestinal and kidney-specific Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform (NHE-3)[J]. *J Biol Chem*, 1992, 267(13): 9340 - 9346.
- [6] CHOUDHURY BK, SHI XZ, SARNA SK. Gene plasticity in colonic circular smooth muscle cells underlies motility dysfunction in a model of postinfective IBS[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2009, 296(3): G632 - G642.
- [7] EVANGELISTA S. Quaternary ammonium derivatives as spasmolytics for irritable bowel syndrome[J]. *Curr Pharm Des*, 2004, 10(28): 3561 - 3568.
- [8] 程伟,肖颖彬,王学锋,等. 快速起搏大鼠心房肌细胞 L-型钙通道及钾通道 Kv4.3 的表达变化[J]. 中华心血管病杂志, 2006, 34(4): 312 - 315.
- [9] HOFMANN F, OEKEN HJ, SCHNEIDER T, *et al.* The biochemical properties of L-type calcium channels[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1988, 12(Suppl 1): S25 - S30.
- [10] 陈文锋,宋丽军,赵文昌. 水通道蛋白在腹泻中的研究进展[J]. 医学综述, 2018, 24(6): 1041 - 1046.
- [11] IKARASHI N, KON R, SUGIYAMA K. Aquaporins in the colon as a new therapeutic target in diarrhea and constipation[J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(7): 1172.
- [12] 李慧霞,尤伟波,陈丽,等. 华蟾素诱导 AMPK 磷酸化促进结肠癌细胞免疫原性凋亡的抗肿瘤机制研究[J]. 中国现代应用药学, 2021(21): 2659 - 2664.
- [13] 姚忠强,李炜,王娟毅,等. 华蟾素胶囊联合阿帕替尼对二线治疗失败后晚期胃癌患者的免疫细胞及预后影响[J]. 世界中医药, 2023, 18(5): 654 - 657.

编辑:毕晓帆/接受日期:2023-03-06