

黄连总碱对大鼠结肠癌的化学预防作用

吴柯, 何百成, 周岐新*

(重庆医科大学药学院, 重庆市生物化学与分子药理学重点实验室, 重庆 400016)

[摘要] 目的: 观察黄连总碱对结肠癌的化学预防作用。方法: 以二甲胂(1-2 dimethylhydrazine, DMH) $40 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ sc}$ + 1% 葡聚糖硫酸钠(dextran sodium sulfate, DSS)水溶液饮用诱导形成大鼠结肠癌模型。观察黄连总碱($120 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 1周5d)和小檗碱($100 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 1周5d)ig, 连续16周。观察对大鼠体重、异常隐窝灶(abrrant crypt foci, ACF)和结肠癌发生率的影响。结果: 与模型组相比, 黄连总碱明显改善 DMH + DSS 诱癌过程中大鼠的恶液质状态并阻遏体重减轻, 显著减少大鼠结肠 ACF 数和明显降低结肠癌的发生率; 其作用与小檗碱相似。结论: 黄连总碱能抑制 DMH 和 DSS 联合使用诱导大鼠早期 ACF 的形成和结肠癌发生, 该作用可能与其主要成分小檗碱有关。

[关键词] 黄连总碱; 小檗碱; 结肠癌; 化学预防

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)08-0200-04

Chemopreventive Effect of Total Alkaloids from Corptidis Rhizoma on Experimental Colon Cancer in Rats

WU Ke, HE Bai-cheng, ZHOU Qi-xin*

(Department of Pharmacology, Chongqing Key Laboratory of Biochemistry and Molecular Pharmacology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the anti-colon cancer effects of total alkaloids from Corptidis Rhizoma. **Method:** Colon cancer model of Wistar rat was induced by 1-2 dimethylhydrazine (DMH) ($40 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ sc}$) in combination with 1% dextran sodium sulfate solution (DSS) (freely drinking). All rats were randomly divided into 3 groups: control (DMH + DSS + solvent), total alkaloids from Corptidis Rhizoma (Tal) (DMH + DSS + Tal $120 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ and berberine (Ber) (DMH + DSS + Ber $100 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$). The drugs were given orally once a day for 5 day per week. The body weight, the number of colon abrrant crypt foci (ACF), the incidence and number of colon cancer in rats, as well as the morphological changes in rat colon tissues were evaluated. **Result:** Tal significantly improved the dyscrasia induced by DMH + DSS, both of the body weight and general condition were better than that in control group. Tal also significantly inhibited ACF and colon cancer incidence in the rats treated by DMH + DSS for 10 weeks or 20 weeks, which was similar to that of Ber. **Conclusion:** Tal can inhibit ACF and tumor formation induced by DMH + DSS. This may be directly related to berberine existing in Tal.

[Key words] total alkaloids from corptidis Rhizoma; berberine; colon cancer; chemoprevention

结肠癌是一种常见恶性肿瘤, 严重威胁人类的

健康。近年来其发病率和致死率在全球大部分地区及我国均有明显上升趋势。因此, 如何防治结肠癌是当前医药界的重要课题^[1]。黄连总碱在我国作为消化道疾病用药已有 3 000 余年历史, 临床用于胃肠道细菌感染治疗。现代医学证明, 黄连总碱的作用主要与其根茎所含生物碱有关, 其中小檗碱约占 80% 左右。体内和体外实验均显示^[2-3], 小檗碱对结

[收稿日期] 20101109(007)

[第一作者] 吴柯, 讲师, 研究方向: 肿瘤药理研究, Tel: 13330200467, E-mail: wuke1997@yahoo.com.cn

[通讯作者] *周岐新, 教授, 博士生导师, 13527534910, E-mail: cqzhouqx@yahoo.com.cn

肠癌有预防和治疗的作用。然而与小檗碱对应剂量相比较,黄连总碱对结肠癌的化学预防作用是否比小檗碱更为优越?为此,我们以二甲胍(1-2 dimethylhydrazine, DMH) sc 加 1% 葡聚糖硫酸钠(dextran sodium sulfate, DSS)水溶液饮用诱导大鼠产生结肠癌,以小檗碱为对照,研究了黄连总碱对结肠癌产生的干预作用。

1 材料

1.1 动物 Wistar 大鼠,雌雄各半,体重 130 ~ 150 g,由重庆医科大学实验动物中心提供,医学动物合格证 SCXK(渝)2002-0003。

1.2 试剂 二甲胍(1-2 dimethylhydrazine, DMH), Sigma 公司,批号 D0741;葡聚糖硫酸钠(dextran sodium sulfate, DSS), Sigma 公司,批号 D6924;小檗碱(Ber),成都制药八厂,批号 940833;黄连总碱(Tal),由重庆医科大学化学教研室尚京川教授提供,批号 2003654,其小檗碱含量占总碱量的 86%。

2 方法

2.1 动物分组及处理 预实验证明大鼠正常饮食,不加 DMH + DSS 诱导 20 周没有出现结肠 ACF 和肿瘤。参照文献[4],所有大鼠随机分为 3 组,即模型组,小檗碱组,与小檗碱组剂量相当的黄连总碱组,每组 25 只。实验第 1 周各组大鼠给予 DMH 40 mg·g⁻¹腹股沟 sc,隔天 1 次,共 3 次;第 2 周给予所有大鼠含 1% DSS 水自由饮用;第 3 周大鼠饮用自来水和摄普通饲料。从第 4 周开始,除模型组外各组大鼠分别 ig 小檗碱 100 mg·g⁻¹·d⁻¹和黄连总碱 120 mg·g⁻¹·d⁻¹给药,每周 5 d。于实验第 10 周各组随机抽取大鼠 10 只,3% 戊巴比妥钠腹腔麻醉,取结肠组织观察各组大鼠 ACF 形成情况。实验第 20 周,剩余所有大鼠 3% 戊巴比妥钠腹腔麻醉,取结肠组织观察各组肿瘤形成情况。

2.2 一般情况和体重统计 每日上、下午分别观察 1 次各组大鼠的一般情况,如毛色、食量、大便性状、精神活动情况等,每周称量 1 次体重。

2.3 大鼠结肠 ACF 计数 取大鼠结肠,用冰生理盐水冲洗干净。纵向剖开,平铺于塑料板上,10% 甲醛固定 4 ~ 6 h 后,用 0.2% 亚甲蓝浸泡 30 s,40 倍光学显微镜下计数 ACF 个数。

2.4 大鼠结肠肿瘤检查 检查肝、脾、胰和肠系膜淋巴结等组织。结肠去脂肪组织,沿肠系膜附着物纵向剖开整个肠道,用生理盐水冲洗干净。肠组织

平铺于塑料板上,黏膜面向上,记录肿瘤的部位、形态和大小。标本用 10% 甲醛固定,石蜡包埋,常规切片和 HE 染色。

分类参考 Teague 提出的大鼠肿瘤分类标准。2 名病理医生采用盲法阅片。

2.5 数据处理 应用 SPSS 13.0 软件进行数据处理 所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较使用 *F* 检验进行统计处理,率的比较采用 Fisher's exact probability 检验。*P* < 0.05 为差异显著,*P* < 0.01 为差异非常显著。

3 结果

3.1 大鼠一般情况 给予 DMH 后 3 周,部分大鼠出现腹股沟溃疡,活动明显减少,摄食和饮水量下降,皮毛不洁黯淡。给予 DMH 第 5 周后,大鼠腹股沟溃疡开始逐渐痊愈,摄食和饮水有所好转,精神状态依然不佳。实验第 6 周,部分大鼠出现肛周溃疡伴有稀便和便血,以后逐渐增多,并延续至实验结束。Ber 和 Tal 处理组上述症状轻于模型组。

3.2 体重变化 所有大鼠经 DMH + DSS 处理后 3 周内,体重均出现不同程度下降,从实验第 5 周体重开始逐渐恢复并缓慢增长。实验结束时(第 20 周),模型组大鼠平均体重(266.67 ± 37.46)g 明显低于 Tal 干预组(346.33 ± 30.22)g 和 Ber 干预组(354.5 ± 33.52)g;但 Ber 和 Tal 干预组之间体重没有明显差异(表 1)。

表 1 Tal 对 DMH + DSS 诱导结肠癌形成模型大鼠体重影响($\bar{x} \pm s, n = 25$ 或 15) g

时间 / 周	DMH + DSS	模型大鼠体重影响($\bar{x} \pm s, n = 25$ 或 15) g	
		Tal 120 mg·g ⁻¹ ·d ⁻¹ + DMH + DSS	Ber 100 mg·g ⁻¹ ·d ⁻¹ + DMH + DSS
1	147 ± 8.70	146 ± 7.33	147 ± 12.56
3	141 ± 15.26	139 ± 14.23	134 ± 14.78
5	147 ± 11.56	156 ± 12.33	154 ± 16.45
7	163 ± 28.44	185 ± 22.21 ¹⁾	165 ± 24.56
10	182 ± 29.56	221 ± 23.40 ¹⁾	220 ± 22.78 ¹⁾
12	201 ± 32.45	260 ± 22.98 ¹⁾	270 ± 23.74 ¹⁾
14	224 ± 33.16	278 ± 24.58 ¹⁾	301 ± 27.46 ¹⁾
16	235 ± 34.88	300 ± 22.21 ¹⁾	321 ± 28.41 ¹⁾
18	243 ± 35.86	319 ± 28.34 ¹⁾	338 ± 30.20 ¹⁾
20	267 ± 37.46	346 ± 30.22 ¹⁾	355 ± 33.52 ¹⁾

注:与相应 DMH + DSS 组比较¹⁾ *P* < 0.01(表 2 ~ 3 同)。

3.3 大鼠结肠 ACF 形成情况 第 10 周各组随机抽取的所有大鼠结肠均有 ACF 形成,模型组形成 ACF 的平均数量明显多于各药物干预组(表 2)。病理切片观察,模型组可见结肠组织出现了比较严重的不典型增生,腺体排列紊乱,细胞层次明显增多且拥挤,黏液分泌显著减少。药物干预组出现了不同程度的细胞拥挤,核增大和复层(图 1)。

表 2 DMH + DSS 诱导第 10 周各组大鼠结肠 ACF 形成情况($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$	生成 ACF 大鼠/只	每鼠平均 ACF/个
DMH + DSS	-	10	19 ± 3.5
Tal + DMH + DSS	120	10	$12 \pm 2.2^{(1)}$
Ber + DMH + DSS	100	10	$10 \pm 3.3^{(1)}$

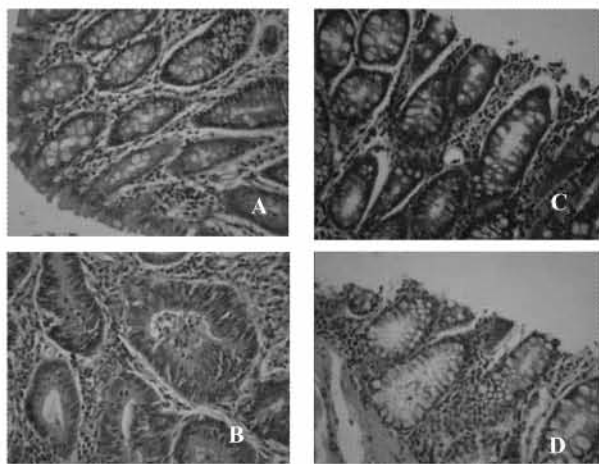


图 1 DMH + DSS 诱导第 10 周各组大鼠结肠 ACF 形成病理切片($\times 40$)

A. 正常组; B. DMH + DSS 组;

C. Tal 120 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 组; D. Ber 100 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 组

3.4 大鼠结肠癌形成情况 各大鼠肿瘤绝大多数位于降结肠和肛门之间,肠系膜未见淋巴结肿大,小肠和其他器官也未见肿瘤发生。每只大鼠的肿瘤灶数量多为 1 个,未见多发性肿瘤形成。肿瘤直径 2 ~ 8 mm,均见于黏膜面,凸向肠腔,色紫红,质脆,少数呈片状隆起,未见溃疡及菜花样变。模型组大鼠结肠癌的发生率为 80%;经 Tal 120 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 或 Ber 100 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 处理的大鼠结肠癌发生率为 33.3%。显示 2 药物处理组有明显疗效相当的预防 DMH + DSS 诱发大鼠癌的作用($P < 0.01$)(表 3)。

4 讨论

DMH 诱导的大鼠结肠癌变是一个长期、多因素共同参与的过程,其引起的细胞动力学及组织病理

表 3 DMH + DSS 诱导第 20 周各组大鼠结肠癌发病情况($n = 15$)

组别	生成 ACF 大鼠/只	生成肿瘤 大鼠/只	患肿瘤率 /%
DMH + DSS	15	12	80
Tal 120 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ + DMH + DSS	15	5	33.3 ⁽¹⁾
Ber 100 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ + DMH + DSS	15	5	33.3 ⁽¹⁾

学变化和肿瘤形成的分子机制等均与人类的结肠癌形成过程相似,是研究结肠癌形成的良好模型^[5]。因此,我们采用改良的 DMH + DSS 方法诱导大鼠结肠癌形成,以研究 Tal 和 Ber 是否对大鼠结肠癌有防治作用。ACF 的概念是由 Bird 最先提出,他研究氧化偶氮甲烷(AOM)诱导 C57BL/6J 及 CF1 小鼠结肠癌时在黏膜内观察到,在化学诱导的早期大肠黏膜隐窝出现变异而隐窝变大,上皮细胞层增厚,数个或十数个变异隐窝聚集在一起呈灶性分布。Bird 将其命名为异常隐窝灶(aberrant crypt foci, ACF)^[6]。分子水平研究发现^[7-9], ACF 缺乏细胞黏附分子,容易产生 APC 和 ras 基因突变。在结肠癌高危人群中,也发现了 ACF,但不是所有的 ACF 最终都转变为腺瘤,腺瘤中也只有很少一部分最终转变成腺癌。早有报道,结肠癌的发生具有家族性(即强的遗传倾向),高脂和高蛋白饮食及肠道慢性炎症等是重要的诱变因素^[10-12]。因此,在具有结肠癌发生的高危人群中,采用药物预防结肠癌形成的前期病理改变和癌变的最终形成具有重要的临床意义。我们的实验显示,使用 DMH + DSS 方法使几乎所有大鼠都被诱导形成 ACF,但是仅部分发展成结肠癌。而在人类结肠癌变过程中,ACF 也是一种癌前损伤,且被认为是用于评价抑制结肠肿瘤形成的药物作用疗效的良好生物学标志^[13-14]。本研究对 DMH + DSS 方法诱导结肠癌 10 周时各组大鼠 ACF 的数量进行了分析和统计,显示各组大鼠均有 ACF 形成。Tal 120 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 和 Ber 100 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 干预组均能显著抑制 ACF 的形成($P < 0.01$)。在实验第 20 周以大鼠结肠肿瘤发生率作为最终观察指标显示,各药物干预组也能明显抑制结肠癌的最终发生率($P < 0.01$),但 Tal 组与 Ber 组比较没有显著性差异。考虑到本研究采用的 Tal 中 Ber 的量占 86%,而前者 120 mg 大约含 100 mg Ber。因此,有理由认为, Tal 预防结肠癌发生的主要有效成分是 Ber。

[参考文献]

[1] 王振军,黄箴庭. 应进一步加强我国结肠癌的基础研

- 究[J]. 中华医学杂志,2004,84(9):705.
- [2] Thirupurasundari C J, Padmini R, Devaraj S N. Effect of berberine on the antioxidant status, ultrastructural modifications and protein bound carbohydrates in azoxymethane-induced colon cancer in rats [J]. Chem Biol Interact,2009,177(3):190.
- [3] Hsu W H, Hsieh Y S, Kuo H C, et al. Berberine induces apoptosis in SW620 human colonic carcinoma cells through generation of reactive oxygen species and activation of JNK/p38 MAPK and FasL [J]. Arch Toxicol,2007,81(10):719.
- [4] Onose J, Imai T, Hasumura M, et al. A new medium-term rat colon bioassay applying neoplastic lesions as endpoints for detection of carcinogenesis modifiers-validation with known modifiers[J]. Cancer Lett,2006,232(2):272.
- [5] Latham P, Lund E K, Johnson I T. Dietary n-3 PUFA increases the apoptotic response to 1, 2-dimethylhydrazine, reduces mitosis and suppresses the induction of carcinogenesis in the rat colon [J]. Carcinogenesis,1999,20(4):645.
- [6] Bird R P. Role of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer[J]. Cancer Lett,1995,93(1):55.
- [7] Cheng L, Lai M D. Aberrant crypt foci as microscopic precursors of colorectal cancer [J]. World J Gastroenterol,2003,9(12):2642.
- [8] Che T C, François S, Bouchet S, et al. Early lesions induced in rat colon epithelium by *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine[J]. Tissue Cell,2010,42(3):190.
- [9] Mutch M G, Schoen R E, Fleshman J W, et al. A multicenter study of prevalence and risk factors for aberrant crypt foci [J]. Clin Gastroenterol Hepatol,2009,7(5):568.
- [10] Abuli A, Bessa X, Gonzalez J R, et al. Susceptibility genetic variants associated with colorectal cancer risk correlate with cancer phenotype [J]. Gastroenterology,2010,139(3):788.
- [11] Levin B. Nutrition and colorectal cancer [J]. Cancer,1992,70(6 Suppl):1723.
- [12] Kerber R A, Slattery M L, Potter J D, et al. Risk of colon cancer associated with a family history, or colorectal polyps: the diet, activity, and reproduction in colon of cancer study [J]. Int J Cancer,1998,78(2):157.
- [13] Santarelli R L, Vendeuvre J L, Naud N, et al. Meat processing and colon carcinogenesis: cooked, nitrite-treated, and oxidized high-heme cured meat promotes mucin-depleted foci in rats [J]. Cancer Prev Res,2010,3(7):852.
- [14] Sangeetha N, Felix A J, Nalini N. Silibinin modulates biotransforming microbial enzymes and prevents 1, 2-dimethylhydrazine-induced preneoplastic changes in experimental colon cancer [J]. Eur J Cancer Prev,2009,18(5):385.

[责任编辑 聂淑琴]

本刊欢迎网上投稿

《中国实验方剂学杂志》2010年正式施行网上投稿,请登录本刊网站 www.syfjxzz.com 注册会员,登陆采编系统之后按照提示在线投稿。本刊对网上来稿免收稿件处理费。编辑部对来稿有修改权。经审后,如录用,请按通知要求交纳论文发表费。详见本刊稿约第7条:投稿及缴费。