

## 基于小鼠异食癖模型的常山碱盐呕吐机制

马丽娜, 李健, 李思迪, 代宝强, 张广平, 侯红平, 苏萍, 王凤玉, 叶祖光\*  
(中国中医科学院 中药研究所, 博士后科研流动站, 北京 100700)

**[摘要]** **目的:** 探究常山碱盐(dichroa alkali salt, DAS)诱导呕吐的可能机制。**方法:** 采用小鼠异食癖模型, 分别观察 3 种不同机制的镇吐药, 多巴胺受体拮抗剂甲氧氯普胺, 5-羟色胺 3(5-hydroxytryptamine 3, 5-HT<sub>3</sub>)受体拮抗剂昂丹司琼, 神经激肽-1 受体拮抗剂阿瑞匹坦, 对 DAS 所致小鼠体质量、正常饲料摄入量、高岭土摄入量及腹泻和死亡情况的影响, 明确 DAS 可能的致吐途径; 然后采用酶联免疫法针对性的检测 DAS 干预后不同时间点小鼠回肠和延髓中 5-HT 和 P 物质(substance P, SP)的表达情况, 以确认 DAS 是否可影响这 2 种神经递质的变化。**结果:** 配伍昂丹司琼和阿瑞匹坦后, 连续给药第 4 天和药后第 1 天均可显著改善 DAS 诱导的小鼠摄食量降低现象( $P < 0.01$ ), 自连续给药第 3 天起均可显著改善 DAS 诱导的小鼠体质量降低现象( $P < 0.01$ ), 降低 DAS 诱导的小鼠腹泻率和死亡率, 同时可有效拮抗 DAS 诱导的小鼠异食行为, 但是甲氧氯普胺对上述指标则无明显改善作用; 进一步检测呕吐相关神经递质, 发现与空白组比较, 给予 DAS 后 4, 12 h 回肠和延髓中 5-HT 含量显著增加, 48 h 时回肠和延髓中 SP 含量显著升高。**结论:** 小鼠异食癖模型可有效表征 DAS 诱导的呕吐现象, 其诱导的呕吐行为可能与回肠和延髓中 5-HT 和 SP 含量升高有关, 配伍昂丹司琼和阿瑞匹坦可有效拮抗 DAS 诱导的小鼠异食现象。

**[关键词]** 常山碱盐; 呕吐作用; 小鼠异食癖; 配伍; 镇吐药

**[中图分类号]** R22; R242; R2-031; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)22-0034-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20191722

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190521.1519.001.html>

**[网络出版时间]** 2019-05-22 16:38

### Mechanism of Dichroa Alkali Salt Inducing Vomiting Based on Pica in Mice

MA Li-na, LI Jian, LI Si-di, DAI Bao-qiang, ZHANG Guang-ping, HOU Hong-ping, SU Ping,  
WANG Feng-yu, YE Zu-guang\*

(Post-doctoral Scientific Research Center, Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of  
Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the possible mechanism of dichroa alkali salt (DAS) in inducing vomiting. **Method:** Mice pica model was used to observe the antagonistic effect of the three different kinds of antiemetic drugs [dopamine receptor antagonist metoclopramide, 5-hydroxytryptamine 3 (5-HT<sub>3</sub>) receptor antagonist ondansetron and neurokinin-1 receptor antagonist aprepitant] on body mass, food intake, kaolin consumption, diarrhea and death induced by DAS to preliminarily clarify the possible pathogenic pathway of DAS. Then, the expression of 5-HT and substance P (SP) in ileum and medulla of mice induced by DAS alone at different time points was detected by enzyme-linked immunosorbent assay to confirm whether DAS could affect the changes of these two neurotransmitters. **Result:** After treatment with ondansetron and aprepitant, DAS-induced reduction in food intake of mice was significantly improved on the 4<sup>th</sup> day after continuous administration and on the 1<sup>st</sup> day after drug administration ( $P < 0.01$ ), since the 3<sup>rd</sup> day after administration, DAS-induced body mass loss of mice was significantly improved ( $P < 0.01$ ), and DAS-induced diarrhea and mortality in mice were significantly

**[收稿日期]** 20190106(008)

**[基金项目]** 北京市自然科学基金项目(7174327)

**[第一作者]** 马丽娜, 博士, 助理研究员, 从事中药药理与毒理学研究, E-mail: malina8512@163.com

**[通信作者]** \* 叶祖光, 硕士, 研究员, 从事中药药理与毒理学研究, E-mail: zgye@icmm.ac.cn

reduced, while DAS-induced pica in mice was effectively antagonized. However, metoclopramide did not significantly improve the above indicators. Further detection of vomiting-related neurotransmitters found that compared with the blank group, the expressions of 5-HT at 4 h, 12 h and SP at 48 h after treatment with DAS were significantly increased in ileum and medulla of mice. **Conclusion:** The mice pica model can be used to effectively characterize DAS-induced vomiting. DAS-induced pica in mice may be associated with the increase of 5-HT and SP in ileum and medulla. Ondansetron and aprepitant can effectively antagonize DAS-induced pica in mice.

[ **Key words** ] dichroa alkali salt; vomiting; pica in mice; compatibility; antiemetic drug

常山为虎耳草科植物常山 *Dichroa febrifuga* 的干燥根,性味苦、辛、寒,功能截疟、祛痰,《神农本草经》记载:“主伤寒寒热、温疟鬼毒、胸中痰结、吐逆”,《药性本草》曰:“治诸疟,吐痰涎。”传统临床常用于治疗寒热往来之间日疟、恶性疟、新旧疟等各种疟疾及老痰积饮等证。现代研究亦证实,常山具有抗阿米巴原虫、抗钩端螺旋体、抗心律失常、催吐以及兴奋子宫平滑肌等多种药理作用,临床上主要用于治疗疟疾、鸡球虫等寄生虫类疾病<sup>[1-2]</sup>。但是由于常山临床呕吐不良反应大,且致吐机制不清,严重制约了其在临床使用。

早在 20 世纪 50,60 年代,神经药理学家张昌绍教授分别采用鸽子和手术犬模型,通过配伍中枢镇吐剂氯丙嗪,发现破坏犬呕吐中枢对常山碱呕吐作用未见明显影响,但是手术全部切断胃肠道迷走神经后,常山碱不仅在阈剂量不呕吐,甚至在很大剂量也不发生呕吐现象,因此认为常山碱的催吐作用主要是通过刺激胃肠道引起的反射作用<sup>[3-4]</sup>。但是相关研究认为常山碱对鸽子的催吐作用是中枢性的,但其实验资料未足以证明之<sup>[5]</sup>。总之,有关常山碱呕吐机制的研究主要集中于 20 世纪 50,60 年代,但至今,常山碱到底是通过何种途径产生呕吐作用的,尚不清楚。

新近研究表明,毒性物质可直接作用于肠道黏膜,或通过血液循环作用于肠嗜铬细胞并使肠嗜铬细胞释放神经递质,作用于腹腔迷走传入神经末梢的相关受体,而迷走传入神经纤维投射到背侧脑干,从而引起呕吐<sup>[6]</sup>。在迷走背核复合体(位于延髓)中存在大量可能在呕吐机制中扮演重要角色的神经递质受体,其中比较重要的有神经激肽-1 (neurokinin-1, NK-1) 受体<sup>[7]</sup>, 5-羟色胺 3 (5-hydroxytryptamine 3, 5-HT<sub>3</sub>) 受体<sup>[8]</sup>, 多巴胺 (dopamine, DA) 受体<sup>[9]</sup>, 可分别与 P 物质 (substance P, SP), 5-HT 和 DA 结合,刺激迷走神经,最终作用于呕吐中枢,引发呕吐。因此,本研究借助现在呕吐研究新成果,采用小鼠异食癖模型,通过与目前呕吐

机制比较清楚的 3 种镇吐剂(甲氧氯普胺,DA 受体拮抗剂;阿瑞匹坦, NK-1 受体拮抗剂;昂丹司琼, 5-HT<sub>3</sub>受体拮抗剂)配伍,寻找能够有效对抗 DAS 呕吐的镇吐剂,同时采用酶联免疫吸附测定 (ELISA) 检测相应途径的神经递质变化,初探其呕吐机制。

## 1 材料

**1.1 药物** 常山药材购自禹州中药材市场,经中国中医科学院中药研究所叶祖光研究员鉴定为虎耳草科植物常山 *D. ferifuga* 的干燥根。DAS 制备工艺参考文献[10],常山药材,70%乙醇回流提取,三氯甲烷萃取,浸膏经反复硅胶柱色谱,得常山总碱,之后溶于无水乙醇,通入盐酸气体得沉淀物,重结晶后得 DAS 样品,纯度 >98%。

**1.2 动物** 雄性 ICR 小鼠,SPF 级,体质量 18 ~ 20 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号 SCXK(京)2016-0011;饲养于中国中医科学院中药研究所 SPF 级屏障系统,适应性饲养 3 d 后正式实验,研究方案符合中国中医科学院中药研究所实验动物伦理委员会批准,编号 20172007。

**1.3 试药** 顺铂 (DDP, Hospripra Australia Pty Lty 公司,批号 D061881AA);甲氧氯普胺 (Met, 遂成药业股份有限公司,批号 1612141);昂丹司琼 (Ond, 宁波天衡制药有限公司,批号 160502C11);阿瑞匹坦 (Apr, 杭州默沙东制药有限公司,批号 N013708);生理盐水 (山东华鲁制药有限公司,批号 13116040408);高岭土 (分析纯,天津市科密欧化学试剂开发中心);阿拉伯树胶粉 (国药集团化学试剂有限公司,批号 20160222);5-HT<sub>3</sub> P 物质 ELISA 试剂盒 (武汉华美公司,批号分别为 P25037666, M25038792)。

**1.4 仪器** XS105DU 型分析天平 (梅特勒-托利多仪器上海有限公司);Sartorius BSA3202S-CW 型电子天平 (德国赛多利斯公司);CT06037 型涡旋混合器 (美国赛洛捷克公司);902 型 -80 °C 超低温冰箱,MB100-2A 型摇床 (美国 Thermo 公司);DMG-9070A 型恒温干燥箱 (北京陆希科技有限公司);

363703637 型酶标仪(美国美谷分子仪器公司)。

## 2 方法

### 2.1 基于小鼠异食模型的 DAS 配伍镇吐实验

**2.1.1 高岭土制备** 为避免动物啃咬出现过多碎屑,实验前对高岭土质地进行专门考察,制备工艺依文献[11]适当调整,将高岭土同 1% 阿拉伯胶混匀后加入蒸馏水制成团块,再将团块放入模具中,挤成长条状高岭土颗粒,大小与饲料相似,室温晾干。最终确定的高岭土处方工艺制备的高岭土,在实验过程中几无明显碎屑,偶见较大颗粒,可进行捡拾。

**2.1.2 动物分组及给药** 按体质量随机分组,分别为空白组,DDP 组,DAS 单用组,DAS 配伍组(分别配伍临床等效剂量或 2 倍临床等效剂量的镇吐剂 Met, Ond, Apr, 镇吐剂提前 30 min 给予),每组 10 只,实验前,高岭土适应性饲养 3 d,待动物无明显啃食高岭土行为,正式实验,药前禁食 14 h。空白组灌胃生理盐水;DDP 组给药剂量参考文献[12]及预实验结果,在实验第 1 天腹腔注射  $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  DDP; DAS 单用剂量依据课题组前期研究结果<sup>[13-14]</sup>,选择效毒重合剂量,即从实验第 1 天开始,灌胃  $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  DAS,连续 4 d,为区分给药期和停药期,将给药期第 1 天称为“给药第 1 天”,给药结束后的第 1 天称为“药后第 1 天”,以此类推;DDP + Met, DDP + Ond, DDP + Apr 组分别先给予单倍或两倍临床等效剂量的 Met ( $3, 6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), Ond ( $1.2, 2.4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), Apr ( $18.96, 37.92 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ),临床等效剂量按临床给药说明书人用剂量,成人体质量按 60 kg 折算。

**2.1.3 异食行为观察** 从实验当天起,每日上午 9:00 定时定量记录药后 24 h 高岭土摄食量,撒落的高岭土碎屑收集后一起称量。同时每天观察并记录小鼠一般状态、体质量、正常饲料摄食量和腹泻、死亡情况等,死亡小鼠,立刻进行大体解剖,并对异常器官进行苏木素-伊红(HE)染色观察。给药后小鼠腹泻现象主要表现为尾根部毛发变湿,未见大量稀便,实验中通过在鼠笼底部放置一层厚度适中的垫料,既可有效吸收小鼠产生的些许液体,又可方便捡拾高岭土,通过以上处理高岭土损耗量基本可忽略。

### 2.2 DAS 对 5-HT 和 SP 影响

**2.2.1 动物分组及给药** 动物按体质量随机分为 0(空白组), 4, 12, 24, 48, 72 h 组,每组 6 只,均灌胃给予  $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  DAS,给药后严格按照上述时间点,分别采集回肠和延髓标本。

**2.2.2 回肠和延髓标本采集** 各组在给药后不同

时间点,经麻醉后取出延髓,沿矢状线一分为二;同时迅速剖腹沿盲肠上端取 1 cm 左右回肠,一分为二,液氮冷冻后置  $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$  冷冻保存,严格按照 ELISA 试剂盒说明书分别测定回肠和延髓中 5-HT 和 SP 含量。

**2.3 统计学分析** 采用 SPSS 20.0 软件对各组数据进行单因素方差分析;计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, DAS 单用与配伍组间腹泻率、死亡率等计数资料,采用卡方检验进行比较分析。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 不同镇吐药对 DAS 诱导小鼠异食行为影响

**3.1.1 摄食量** 整个实验期间,空白组小鼠活泼好动,毛色光亮,进食饮水均正常,未见粪尿异常改变;与空白组比较,DDP 组小鼠出现活动减少、行为倦怠、毛色无光、进食减少等现象,但随着时间推移逐渐恢复;而 DAS 组小鼠除上述行为外,尤见脱毛,畏冷、蜷缩,腹泻等症状,严重者甚可见便血及后肢抽搐、站立不稳等现象。定量观察 DAS 对小鼠摄食行为影响。与空白组比较,DAS 组在给药第 4 天摄食量开始显著下降( $P < 0.01$ ),药后第 1 天降至 1 g 左右,药后第 3 天小鼠全部死亡;与 DAS 组比较,DAS + Ond 组和 DAS + Apr 组在给药第 4 天和药后第 1 天均可显著改善 DAS 诱导的摄食量降低现象( $P < 0.01$ ),但仍显著低于空白组( $P < 0.01$ ),提示两者只能部分改善 DAS 诱导的小鼠正常饲料摄食量降低现象, Met 对此则无明显影响。见表 1。

**3.1.2 体质量** 由于 DAS 对胃肠道有明显刺激,小鼠摄食量显著降低,且有腹泻现象,因此动物体质量亦随之下降。与空白组比较,DAS 组小鼠体质量在给药第 3 天即显著下降( $P < 0.01$ ),随后持续下降,直至药后第 3 天动物全部死亡;与 DAS 组比较,DAS + Ond 组和 DAS + Apr 组自给药第 3 天起均可显著改善 DAS 诱导的小鼠体质量降低现象( $P < 0.01$ ),且低剂量 DAS + Ond 组和高、低剂量 DAS + Apr 组在给药第 3 天可使 DAS 诱导的小鼠体质量降低恢复至正常对照水平,而 DA 拮抗剂 Met 对 DAS 诱导的体质量降低现象则无明显改善。见表 2。

**3.1.3 异食行为** 由于动物一般状态和摄食量会影响动物高岭土摄食量<sup>[15]</sup>,从而使摄入高岭土量与呕吐程度不匹配,因此为准确刻画 DAS 诱导的呕吐现象,研究中根据上述原则,仅定量观察了状态较好的适应期和连续给药期间的高岭土摄食量。与空白

表 1 不同镇吐剂对 DAS 诱导的小鼠正常饲料摄食量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 1 Effect of different antiemetic drugs on DAS-induced food intake of mice ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	给药第 1 天	给药第 2 天	给药第 3 天	给药第 4 天
空白	-	4.50 ± 0.44	5.32 ± 0.37	5.98 ± 0.91	8.18 ± 0.61
DDP	3	4.75 ± 0.28	5.50 ± 0.37	5.58 ± 1.20	4.85 ± 0.34 <sup>2)</sup>
DAS	2	5.13 ± 0.16	5.31 ± 0.16	5.05 ± 0.72	3.38 ± 0.31 <sup>2)</sup>
DAS + Met	2 + 3	4.97 ± 0.12	5.26 ± 0.28	5.17 ± 0.33	4.11 ± 0.29 <sup>2)</sup>
	2 + 6	4.85 ± 0.20	4.75 ± 0.30	5.34 ± 0.72	3.32 ± 1.17 <sup>2)</sup>
DAS + Ond	2 + 1.2	5.11 ± 0.13	4.95 ± 0.13	5.62 ± 0.70	6.58 ± 0.95 <sup>1,4)</sup>
	2 + 2.4	4.72 ± 0.35	4.98 ± 0.23	5.48 ± 0.40	5.11 ± 0.23 <sup>2,4)</sup>
DAS + Apr	2 + 18.96	4.86 ± 0.25	4.72 ± 0.08	5.44 ± 0.43	5.50 ± 0.37 <sup>2,4)</sup>
	2 + 37.92	5.22 ± 0.31	4.83 ± 0.47	5.25 ± 0.39	5.46 ± 1.19 <sup>2,4)</sup>

  

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	药后第 1 天	药后第 2 天	药后第 3 天	药后第 4 天	药后第 5 天
空白	-	6.23 ± 1.86	6.33 ± 0.57	6.29 ± 0.16	5.68 ± 0.31	5.67 ± 0.18
DDP	3	3.73 ± 0.17 <sup>2)</sup>	3.51 ± 0.36 <sup>2)</sup>	4.12 ± 0.72 <sup>1)</sup>	3.53 ± 0.23 <sup>1)</sup>	4.12 ± 0.51
DAS	2	1.06 ± 0.17 <sup>2)</sup>	0.33 ± 0.05 <sup>2)</sup>	-	-	-
DAS + Met	2 + 3	1.49 ± 0.45 <sup>2)</sup>	0.43 ± 0.08 <sup>2)</sup>	0.51 ± 0.08 <sup>2)</sup>	-	-
	2 + 6	1.55 ± 0.62 <sup>2)</sup>	0.63 ± 0.19 <sup>2)</sup>	0.60	1.20	1.75
DAS + Ond	2 + 1.2	3.48 ± 1.12 <sup>2,4)</sup>	2.05 ± 0.33 <sup>2)</sup>	3.63 ± 0.80 <sup>2)</sup>	2.89 ± 0.71 <sup>2)</sup>	3.53 ± 0.04 <sup>2)</sup>
	2 + 2.4	2.46 ± 0.22 <sup>2,4)</sup>	1.88 ± 0.37 <sup>2)</sup>	1.97 ± 0.54 <sup>2)</sup>	2.37 ± 0.77 <sup>2)</sup>	3.02 ± 0.57 <sup>2)</sup>
DAS + Apr	2 + 18.96	1.94 ± 0.98 <sup>2,3)</sup>	1.62 ± 0.45 <sup>2)</sup>	1.15 ± 0.40 <sup>2)</sup>	2.90 ± 0.61 <sup>2)</sup>	3.13
	2 + 37.92	2.53 ± 0.78 <sup>2,4)</sup>	2.27 ± 0.55 <sup>2)</sup>	2.25 ± 0.38 <sup>2)</sup>	4.74 ± 0.30	4.60 ± 0.36

注:与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ;与 DAS 组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>4)</sup>  $P < 0.01$ (表 2, 3 同)。

组比较,适应期不同组别小鼠均未见明显高岭土摄食行为。与空白组比较,DDP 组小鼠在给药后第 1, 2, 3, 4 天均出现显著异食行为 ( $P < 0.01$ ),提示造模成功;与空白组比较,DAS 组小鼠在连续给药后第 1, 2, 3, 4 天亦有显著异食行为 ( $P < 0.01$ ),提示小鼠异食模型可有效表征 DAS 诱导的呕吐现象。与 DAS 组比较,不同剂量 DAS + Met 组对 DAS 诱导的小鼠异食行为均无明显改善,但不同剂量 DAS + Ond 组和 DAS + Apr 组给药后第 3, 4 天均可明显改善 DAS 诱导的异食行为 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ),但与空白组比较仍有显著升高 ( $P < 0.01$ ),提示两药均可有效拮抗 DAS 诱导的异食行为,但是尚不能完全消除 DAS 诱导的异食现象。见表 3。

**3.1.4 腹泻情况** 与空白组比较,DAS 组小鼠在给药第 1 天即出现大量腹泻现象,至连续给药的第 4 天全部动物均出现显著腹泻现象 ( $P < 0.01$ );与 DAS 组比较,DAS + Ond 组和 DAS + Apr 组给药第 3, 4 天明显延迟 DAS 诱导的腹泻现象,剂量依赖性的降低 DAS 诱导的腹泻率,其中高剂量的 DAS + Ond 组和 DAS + Apr 组均可明显降低 DAS 诱导的

腹泻率 ( $P < 0.05$ ),但不同剂量 DAS + Met 组对 DAS 诱导的腹泻现象无明显影响。见表 4。

**3.1.5 死亡情况** 与空白组比较,DDP 组小鼠未见死亡现象,DAS 组则在连续给药后的第 1 天即见大量动物死亡,至药后第 2 天动物全部死亡 ( $P < 0.01$ );与 DAS 组比较,DAS + Met 组仅可延迟但不能降低 DAS 诱导的死亡率,DAS + Ond 低、高剂量组和 DAS + Apr 高剂量组可明显延迟 DAS 诱导的死亡情况 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ),呈剂量依赖性。大体解剖发现,与空白组比较,DAS 组死亡小鼠胃均出现明显膨大、胀气,胃壁薄而透明,整个肠道内容物呈泔水样,尤以盲肠为甚。见表 5。

**3.2 DAS 对小鼠回肠和延髓中 5-HT 和 SP 表达影响** 采用 ELISA 检测 DAS (2 mg·kg<sup>-1</sup>) 给药后不同时间点 (0, 4, 12, 24, 48, 72 h) 神经递质 5-HT 和 SP 的变化情况。与空白组比较,DAS 给药后 4, 12 h 回肠和延髓中 5-HT 含量显著增加 ( $P < 0.01$ ),随后 24, 48 和 72 h 下降,与空白组比较无统计学差异;与空白组比较,回肠和延髓中 SP 蛋白表达水平在药后 24 h 内虽略有升高,但无统计学差异,而药后 48 h

表 2 不同镇吐剂对 DAS 诱导的小鼠体质量的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 2 Effect of different antiemetic drugs on DAS-induced body mass of mice( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	给药第 1 天	给药第 2 天	给药第 3 天	给药第 4 天
空白	-	19.78 ± 0.85	23.51 ± 1.28	25.90 ± 0.87	27.84 ± 1.13
DDP	3	19.78 ± 0.47	22.41 ± 0.92	22.90 ± 0.98 <sup>2)</sup>	22.73 ± 0.98 <sup>2)</sup>
DAS	2	19.35 ± 0.44	22.40 ± 0.93	21.40 ± 0.91 <sup>2)</sup>	19.09 ± 1.23 <sup>2)</sup>
DAS + Met	2 + 3	19.40 ± 0.57	22.44 ± 1.06	21.98 ± 0.72 <sup>2)</sup>	19.23 ± 1.29 <sup>2)</sup>
	2 + 6	19.56 ± 0.80	23.31 ± 0.69 <sup>3)</sup>	21.70 ± 1.02 <sup>2)</sup>	18.40 ± 3.02 <sup>2)</sup>
DAS + Ond	2 + 1.2	19.25 ± 0.96	23.00 ± 0.75	24.05 ± 0.98 <sup>4)</sup>	22.96 ± 1.13 <sup>2,4)</sup>
	2 + 2.4	19.33 ± 0.78	22.39 ± 0.87	23.06 ± 0.77 <sup>1)</sup>	21.38 ± 1.05 <sup>2)</sup>
DAS + Apr	2 + 18.96	19.60 ± 0.62	23.00 ± 0.78	23.76 ± 1.23 <sup>4)</sup>	21.39 ± 1.18 <sup>2,3)</sup>
	2 + 37.92	19.36 ± 0.71	22.92 ± 0.69	23.72 ± 1.37 <sup>3)</sup>	22.12 ± 1.67 <sup>2,3)</sup>

  

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	药后第 1 天	药后第 2 天	药后第 3 天	药后第 4 天	药后第 5 天
空白	-	29.06 ± 1.19	29.76 ± 1.09	30.72 ± 1.02	31.76 ± 1.15	33.53 ± 1.61
DDP	3	21.15 ± 1.19 <sup>2)</sup>	21.72 ± 1.04 <sup>2)</sup>	22.10 ± 1.52 <sup>2)</sup>	23.12 ± 1.65 <sup>2)</sup>	26.69 ± 1.77 <sup>2)</sup>
DAS	2	17.59 ± 0.84 <sup>2)</sup>	16.77 ± 0.38 <sup>2)</sup>	-	-	-
DAS + Met	2 + 3	17.24 ± 1.15 <sup>2)</sup>	16.57 ± 0.98 <sup>2)</sup>	16.37 ± 1.66 <sup>2)</sup>	-	-
	2 + 6	17.31 ± 1.26 <sup>2)</sup>	16.68 ± 1.49 <sup>2)</sup>	17.80	20.40	23.50
DAS + Ond	2 + 1.2	20.57 ± 1.67 <sup>2,4)</sup>	19.61 ± 1.88 <sup>2)</sup>	20.23 ± 4.20 <sup>2)</sup>	22.95 ± 3.33 <sup>2)</sup>	26.77 ± 2.58 <sup>2)</sup>
	2 + 2.4	19.26 ± 1.21 <sup>2)</sup>	18.71 ± 2.02 <sup>2)</sup>	18.16 ± 3.07 <sup>2)</sup>	19.93 ± 3.13 <sup>2)</sup>	24.94 ± 1.47 <sup>2)</sup>
DAS + Apr	2 + 18.96	19.38 ± 1.08 <sup>2,3)</sup>	18.77 ± 1.30 <sup>2)</sup>	17.60 ± 3.46 <sup>2)</sup>	21.20	24.80
	2 + 37.92	19.98 ± 1.55 <sup>2,3)</sup>	17.87 ± 2.19 <sup>2)</sup>	20.23 ± 3.51 <sup>2)</sup>	22.35 ± 2.07 <sup>2)</sup>	26.62 ± 1.61 <sup>2)</sup>

表 3 不同镇吐剂对 DAS 诱导的小鼠高岭土摄食百分含量的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 3 Effect of different antiemetic drugs on DAS-induced kaolin intake of mice( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	适应期	给药第 1 天	给药第 2 天	给药第 3 天	给药第 4 天
空白	-	0.70 ± 0.10	0.87 ± 0.13	0.62 ± 0.08	0.76 ± 0.16	0.49 ± 0.12
DDP	3	0.88 ± 0.25	4.10 ± 0.17 <sup>2)</sup>	3.64 ± 0.17 <sup>2)</sup>	3.61 ± 0.63 <sup>2)</sup>	3.91 ± 0.39 <sup>2)</sup>
DAS	2	0.69 ± 0.26	2.97 ± 0.33 <sup>2)</sup>	2.80 ± 0.07 <sup>2)</sup>	2.38 ± 0.12 <sup>2)</sup>	2.04 ± 0.36 <sup>2)</sup>
DAS + Met	2 + 3	0.75 ± 0.12	2.93 ± 0.14 <sup>2)</sup>	2.59 ± 0.09 <sup>2)</sup>	2.70 ± 0.22 <sup>2)</sup>	2.13 ± 0.34 <sup>2)</sup>
	2 + 6	0.68 ± 0.09	2.59 ± 0.41 <sup>2)</sup>	2.61 ± 0.41 <sup>2)</sup>	2.23 ± 0.26 <sup>2)</sup>	2.34 ± 0.52 <sup>2)</sup>
DAS + Ond	2 + 1.2	0.74 ± 0.21	2.17 ± 0.25 <sup>2,4)</sup>	2.24 ± 0.07 <sup>2,4)</sup>	1.57 ± 0.29 <sup>2,4)</sup>	1.05 ± 0.12 <sup>1,4)</sup>
	2 + 2.4	0.82 ± 0.39	1.88 ± 0.32 <sup>2,4)</sup>	2.48 ± 0.08 <sup>2)</sup>	1.51 ± 0.22 <sup>2,4)</sup>	1.34 ± 0.32 <sup>2,3)</sup>
DAS + Apr	2 + 18.96	0.85 ± 0.20	2.42 ± 0.22 <sup>2,3)</sup>	1.94 ± 0.11 <sup>2,4)</sup>	1.38 ± 0.26 <sup>4)</sup>	1.25 ± 0.10 <sup>2,4)</sup>
	2 + 37.92	0.77 ± 0.15	2.17 ± 0.42 <sup>2,4)</sup>	2.21 ± 0.30 <sup>2,4)</sup>	1.25 ± 0.14 <sup>4)</sup>	1.26 ± 0.12 <sup>2,4)</sup>

注:高岭土摄食百分含量 = 高岭土摄食量/(高岭土 + 饲料摄食量) × 100%。

回肠和延髓中 SP 蛋白表达显著增加( $P < 0.01$ ), 随后 72 h 又下降, 与空白组比较无统计学差异。见表 6。

#### 4 讨论

异食行为可在一定程度上等同于其他有呕吐反射动物的恶心、呕吐反应, 而且还可通过动态检测动物异食行为重现药物临床呕吐特点<sup>[16-17]</sup>。目前尚未见采用异食模型表征 DAS 诱导的呕吐现象, 因此

首先以 DDP 作为阳性对照判定模型是否成功, 结果发现 3 mg·kg<sup>-1</sup> DDP 腹腔注射可使小鼠出现明显异食行为; 进一步观察 DAS 诱导的小鼠异食行为, 发现其也可诱导小鼠出现明显异食现象, 但程度低于 DDP, 提示该小鼠异食模型可有效表征 DAS 诱导的呕吐现象。

此外, 由于动物天性好奇, 刚接触高岭土时有摄食行为, 因此适应期必须按照正式实验条件适应性

表 4 不同镇吐剂对 DAS 诱导的小鼠腹泻情况的影

Table 4 Effect of different antiemetic drugs on DAS-induced diarrhea of mice

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	给药 第 1 天 /只	给药 第 2 天 /只	给药 第 3 天 /只	给药 第 4 天 /只	腹泻率 /%
DAS	2	6	2	1	1	100 <sup>1)</sup>
DAS + Met	2 + 3	3	2	2	3	100
	2 + 6	7	2	1	-	100
DAS + Ond	2 + 1.2	1	-	3	2	60
	2 + 2.4	-	-	4	-	40 <sup>2)</sup>
DAS + Apr	2 + 18.96	-	3	4	-	70
	2 + 37.92	-	3	1	-	40 <sup>2)</sup>

注:仅记录当天新发生腹泻动物数;空白组和 DDP 组腹泻动物数均为 0;与空白组比较<sup>1)</sup>P < 0.01;与 DAS 组比较<sup>2)</sup>P < 0.05,<sup>3)</sup>P < 0.01(表 5 同)。

表 5 不同镇吐剂对 DAS 诱导的小鼠死亡情况的影响

Table 5 Effect of different antiemetic drugs on DAS-induced death of mice

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	给药 第 4 天 /只	药后 第 1 天 /只	药后 第 2 天 /只	药后 第 3 天 /只	死亡率 /%
DAS	2	1	7	2	-	100 <sup>1)</sup>
DAS + Met	2 + 3	0	3	4	3	100
	2 + 6	0	1	4	4	90
DAS + Ond	2 + 1.2	0	1	1	2	40 <sup>2)</sup>
	2 + 2.4	1	1	0	1	30 <sup>3)</sup>
DAS + Apr	2 + 18.96	0	1	3	2	60
	2 + 37.92	0	0	2	1	30 <sup>3)</sup>

注:仅记录当天新发生死亡动物数;空白组和 DDP 组死亡动物数均为 0;各组给药后第 4 天死亡动物数为 0。

表 6 DAS 对小鼠回肠和延髓中不同时间点 5-HT 和 SP 表达的影响( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 6 Effect of DAS on 5-HT and SP expressions in ileum and medulla of mice( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

ng·g<sup>-1</sup>

t/h	5-HT		SP	
	回肠	延髓	回肠	延髓
0	376.59 ± 10.96	468.09 ± 15.42	9.42 ± 2.16	16.24 ± 5.31
4	481.61 ± 17.17 <sup>1)</sup>	563.73 ± 21.45 <sup>1)</sup>	10.14 ± 1.44	16.76 ± 3.55
12	475.48 ± 12.45 <sup>1)</sup>	677.52 ± 15.42 <sup>1)</sup>	13.22 ± 5.36	17.98 ± 2.31
24	352.33 ± 17.70	495.50 ± 13.89	7.18 ± 2.74	18.26 ± 4.83
48	364.70 ± 14.98	464.88 ± 9.63	24.87 ± 5.75 <sup>1)</sup>	37.91 ± 3.31 <sup>1)</sup>
72	373.90 ± 19.88	466.79 ± 27.79	7.30 ± 1.34	13.43 ± 1.22

注:与 0 h(即未给药时间点)比较<sup>1)</sup>P < 0.01。

饲养 3 ~ 5 d,直到动物无明显啃食高岭土现象时,方可正式实验;其次高岭土质地需软硬适中,过硬动物摄食量可能小于应摄入量,过软则碎屑多、误差大。实验中还发现,小鼠摄食高岭土的绝对量小、称量误差较大,通过尝试发现 3 或 4 只一笼,反而称量更准确、误差更小且便于操作。动物一般状态和摄食量会影响动物高岭土摄食量,因此在实验中需选择合适的给药剂量和能够客观反映小鼠高岭土摄食行为真实情况的时间段。因前期研究已明确了 DAS 在小鼠模型上的药效和毒性剂量范围<sup>[13-14]</sup>,故经综合分析和预实验,确定本研究中 DAS 给药剂量为效毒重合剂量 2 mg·kg<sup>-1</sup>。因在该剂量下不仅感染疟原虫的小鼠全部转阴,而且动物在连续给药后会出现明显的腹泻和死亡情况,可有效观察配伍镇吐药对其减毒增效作用的改善情况,因此最终确定该剂量为配伍给药剂量。此外,因高岭土摄食量与动物状态和正常饲料摄食量相关,因此,本研究重点关注了小鼠一般状态较好、摄食量相对正常的连续给药期(即给药第 1 ~ 4 天)高岭土变化情况,以更准确反映 DAS 诱导的呕吐现象。最后通过与不同机制的镇吐剂配伍发现,DAS + Ond 和 DAS + Apr 均可有效拮抗 DAS 诱导的异食现象,但不能完全拮抗,而 DAS + Met 则无明显影响,提示 DAS 诱导的异食行为可能与 5-HT 和 SP 两种呕吐途径有关,但是尚存在其他机制。

进一步考察 DAS 对 5-HT 和 SP 表达影响。结果发现,DAS 在给药后 4,12 h 可明显增加回肠和延髓中 5-HT 含量,而 5-HT 是急性期呕吐的关键神经递质,因此推测 5-HT 可能是 DAS 诱导早期呕吐的主要原因。观察 SP,发现其仅在药后 48 h 增加,

在药后 4,12 h 略微增加,但无显著差异,SP 主要介导延迟期呕吐,因此推测 SP 可能在 DAS 诱导的后

期呕吐中发挥重要作用。此外,检测时发现神经递质类物质易降解,取材时需及时液氮保存,并尽快检

测。综上,常山活性成分 DAS 可能同时通过 5-HT 和 SP 两种途径诱导呕吐反应,再加上生物碱本身强烈的胃肠道刺激作用,这可能是为什么 DAS 能够诱发如此剧烈的呕吐现象的原因。但是 DAS 具体是通过何种途径产生的神经递质,是直接刺激胃肠道,通过迷走神经作用于中枢,还是直接作用于中枢神经系统,引发呕吐现象,尚不清楚,有待进一步深入研究。

研究发现,Ond 和 Apr 不仅可有效拮抗 DAS 诱导的呕吐现象,尚可有效降低 DAS 引发的小鼠腹泻率和死亡率。江文德<sup>[4]</sup>报道常山碱具有直接胃肠道刺激作用,课题组前期也发现 DAS 组小鼠肉眼可见胃膨大,肠道内容物稀泔水样,镜检发现胃黏膜出现不同程度损伤、坏死,盲肠黏膜表面坏死脱落,出现小溃疡,这可能是 DAS 诱发的小鼠摄食量降低和腹泻的原因<sup>[14]</sup>。5-HT 是肠道内分泌系统最重要的神经递质之一,可通过激活肠神经反射环路促进肠运动<sup>[18]</sup>和上皮细胞分泌,从而介导迷走神经和脊髓传入纤维激活导致的胃排空、饱腹、不适以及恶心和呕吐等生理反应<sup>[19-21]</sup>。提示 Ond 可能通过阻断上述神经反射环路改善 DAS 诱导的胃胀、腹泻和呕吐等症状,而这一现象与临床上应用 5-HT<sub>3</sub> 受体拮抗剂治疗肠易激综合征患者出现的腹泻或便秘症状相一致<sup>[22]</sup>。

NK-1 受体拮抗剂 Apr 也可明显改善 DAS 诱导的腹泻和死亡现象,但与 Ond 机制可能不大相同。现代研究表明,SP 主要通过不同受体(NK-1, NK-2, NK-3)结合实现对各种功能的调节,其中与 NK-1 受体亲和力最强,因而常将 NK-1 受体称为 SP 受体<sup>[23]</sup>。SP 在机体对各种刺激反应(如炎症、紧张和呕吐等)的调节过程中都发挥了重要作用<sup>[24-25]</sup>。SP 可通过激活核转录因子(NF)- $\kappa$ B 使免疫细胞如巨噬细胞产生更多的细胞因子肿瘤坏死因子(TNF)- $\alpha$ 、白细胞介素(IL)-1 和 IL-6<sup>[26]</sup>,药物则可通过干扰 SP 与 NK-1 受体相互作用,降低炎症反应<sup>[27]</sup>,提示 Apr 可能是通过上述途径发挥拮抗 DAS 诱导的胃肠道刺激作用。Bang 等<sup>[28]</sup>报道 NK-1 受体拮抗剂 CP-96,345 和 L-733,060 还可防止老鼠免受细胞因子介导的肝脏损伤。前期研究表明常山碱具有明显的肝损伤现象<sup>[5,14]</sup>,细胞因子介导的肝脏疾病可通过 NK-1 受体拮抗剂作用于 NK-1 受体进行治疗,因此推测 Apr 还可通过此途径拮抗 DAS 诱导的肝损伤作用。综上,Apr 可能通过调节炎症和拮抗肝损伤 2 种途径发挥降低 DAS 诱导的腹泻和

死亡情况。

总之,通过本研究不仅发现 DAS 可能通过 5-HT<sub>3</sub> 和 SP 两种途径诱导呕吐现象,而且发现 Ond 和 Apr 可有效拮抗 DAS 诱导的腹泻和死亡情况,提示临床可用这 2 种药物拮抗 DAS 诱导的副作用。

#### [参考文献]

- [1] 张昌绍,周廷冲. 国产抗疟药材之研究(一)常山(临床实验报告)[J]. 上海中医药杂志, 1955(8): 29.
- [2] Pandey R K, Kumbhar B V, Srivastava S, et al. Febrifugine analogues as Leishmania donovani trypanothione reductase inhibitors: binding energy analysis assisted by molecular docking, ADMET and molecular dynamics simulation [J]. J Biomol Struct Dyn, 2017, 35(1): 141-158.
- [3] 江文德,张昌绍,杨藻宸. 常山碱催吐作用的研究—I. 常山碱对鸽催吐作用的机制[J]. 上海第一医学院学报, 1957(3): 253-258.
- [4] 江文德. 常山碱对狗催吐作用的机制[J]. 生理学报, 1961, 24(3/4): 180-186.
- [5] Henderson F G, Rose C L, Harris P N, et al.  $\gamma$ -Dichroine, the antimalarial alkaloid of chang shan [J]. J Pharmacol Exp Ther, 1949, 95(2): 191-200.
- [6] Rojas C, Slusher B S. Pharmacological mechanisms of 5-HT<sub>3</sub> and tachykinin NK<sub>1</sub> receptor antagonism to prevent chemotherapy-induced nausea and vomiting[J]. Eur J Pharmacol, 2012, 684(1/3): 1-7.
- [7] Saito R, Takano Y, Kamiya H. Roles of substance P and NK<sub>1</sub> receptor in the brainstem in the development of emesis[J]. J Pharmacol Sci, 2003, 91(2): 87-94.
- [8] GAN T J. Selective serotonin 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonists for postoperative nausea and vomiting: are they all the same? [J]. Cns Drugs, 2005, 19(3): 225-238.
- [9] Fortin S M, Chartoff E H, Roitman M F. The aversive agent lithium chloride suppresses phasic dopamine release through central GLP-1 receptors [J]. Neuropsychopharmacol, 2016, 41(3): 906-915.
- [10] CHOU T Q, FU F Y, KAO Y S. Antimalarial constituents of Chinese drug, chang shan, *Dichroa febrifuga* Lour [J]. J Am Chem Soc, 1948, 70(5): 1765-1767.
- [11] Yamamoto K, Asano K, Matsukawa N, et al. Time-course analysis of pica in rats using an automatic feeding monitoring system [J]. J Pharmacol Toxicol, 2010, 63(1): 30-34.
- [12] 颜艳. 灵芝多糖对顺铂诱导的小鼠异食癖和脑内 Fos 表达的影响[D]. 石家庄:河北师范大学, 2008.
- [13] 李思迪,李春,代宝强,等. 常山碱盐急性毒性及其

- 与青蒿素类药物联合用药增效减毒作用[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2016, 30(8): 808-814.
- [14] 李健, 杜江, 马丽娜, 等. 常山碱盐灌胃给药抗疟药效及急性毒性[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(13): 141-146.
- [15] Rudd J A, Yamamoto K, Yamatodani A, et al. Differential action of ondansetron and dexamethasone to modify cisplatin-induced acute and delayed kaolin consumption (“pica”) in rats[J]. Eur J Pharmacol, 2002, 454(1): 47-52.
- [16] Mehendale S R, Aung H H, YIN J J, et al. Effects of antioxidant herbs on chemotherapy-induced nausea and vomiting in a rat-pica model[J]. Am J Chinese Med, 2005, 32(6): 897-905.
- [17] WANG C Z, Basila D, Aung H H, et al. Effects of *Ganoderma lucidum* extract on chemotherapy-induced nausea and vomiting in a rat model[J]. Am J Chinese Med, 2005, 33(5): 807-815.
- [18] Gershon M D. Review article: serotonin receptors and transporters-roles in normal and abnormal gastrointestinal motility[J]. Aliment Pharm Therap, 2004, 20: 3-14.
- [19] Mawe G M, Hoffman J M. Serotonin signalling in the gut-functions, dysfunctions and therapeutic targets[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2013, 10(8): 473-486.
- [20] 王迎寒, 刘玉玲, 赵素微, 等. 腹泻型 IBS 脾虚肝郁证候与 5-HT, CRH 的相关性[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(18): 124-129.
- [21] 陈锡强, 刘可春, 韩利文, 等. 醋酸直肠刺激对大鼠肠道 P 物质、5-HT 免疫阳性神经纤维的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2008, 14(11): 71-73.
- [22] 张婧娴, 芮俊乾, 陈逸凡, 等. 四逆散有效成分对内脏高敏感大鼠 5-HT 信号通路的多靶点协同调控[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(16): 115-123.
- [23] Mantyh P W. Neurobiology of substance P and the NK<sub>1</sub> receptor[J]. J Clin Psychiat, 2002, 63: 6-10.
- [24] Andrews P L R, Bhandari P. Resiniferatoxin, an ultrapotent capsaicin analogue, has anti-emetic properties in the ferret[J]. Neuropharmacology, 1993, 32(8): 799-806.
- [25] LAI J P, LAI S, Tuluc F, et al. Differences in the length of the carboxyl terminus mediate functional properties of neurokinin-1 receptor[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105(34): 12605-12610.
- [26] Kennedy P G E, Rodgers J, Jennings F W, et al. A substance P antagonist, RP-67, 580, ameliorates a mouse meningoencephalitic response to *Trypanosoma brucei*[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94(8): 4167-4170.
- [27] 严晶, 刘丽娜, 陆茵, 等. 金荞麦提取物对肠易激综合征大鼠肥大细胞 PAR-2, SP 的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(2): 92-97.
- [28] Bang R, Sass G, Kierner A K, et al. Neurokinin-1 receptor antagonists CP-96,345 and L-733,060 protect mice from cytokine-mediated liver injury [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2003, 305(1): 31-39.

[责任编辑 张丰丰]