

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.05.009

姜黄素对顺铂所致胃组织 ICC 损伤的保护作用及机制*

姜少萍 于晶 林鹏 刘艳婷 于小玲[△]

(青岛大学基础医学院 生理与病理生理学系 山东 青岛 266021)

摘要 目的:探索顺铂对胃组织 Cajal 间质细胞(Cajal interstitial cells, ICCs)结构和功能的损伤以及姜黄素的保护作用。**方法:**选用成年雄性昆明种小鼠,随机分为对照组、顺铂组和顺铂+姜黄素组,每组各 10 只。姜黄素(200 mg/kg/d)混悬液连续灌胃 15 天。顺铂于实验结束前 5 天开始腹腔注射(2 mg/kg/d)共 5 天。计算每只小鼠最后 5 天的体重增减值,停药 24 h 后测量小鼠的胃排空率。电镜检测胃组织 ICC 超微结构,并测定特异性反映 ICC 功能变化的 Ano1 蛋白和 mRNA 的表达情况。**结果:**注射顺铂后各组小鼠的体重和胃排空率均显著降低($P<0.01$);与顺铂组相比,姜黄素预先灌胃组小鼠体重下降较少($P<0.01$),胃排空率有所回升($P<0.05$)。注射顺铂后,胃组织中 ICCs 受损,尤其与周围神经和肌肉间的缝隙连接增大甚至断裂,而姜黄素可以减轻这种损伤。同时,顺铂组胃组织中 Ano1 mRNA 和蛋白表达均下降($P<0.01$),加姜黄素组有所改善($P<0.05$)。**结论:**而姜黄素可通过减轻顺铂所致胃组织 ICC 结构损伤以及增强 Ano1 表达进而增强 ICC 慢波起搏功能。

关键词:姜黄素;顺铂;胃排空率;Cajal 间质细胞;Ano1

中图分类号:R-33;R285.5;R57 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2019)05-838-04

Protective Effects and Mechanisms of Curcumin on the Damage of Cisplatin to ICC in Gastric Tissue*

JIANG Shao-ping, YU Jing, LIN Peng, LIU Yan-ting, YU Xiao-ling[△]

(Department of Physiology and Pathophysiology, Basic Medical Science of Qingdao University, Qingdao, Shandong, 266021, China)

ABSTRACT Objective: To explore the damage of cisplatin to the structure and function of cajal interstitial cells (ICCs) in gastric tissue and the protective effect of curcumin. **Methods:** Adult kunming male mice were randomly divided into control group (NC), cisplatin group (DDP) and cisplatin+curcumin group (DDP+Cur) with 10 mice in each group. Curcumin (200 mg/kg/d) mixed with the suspension by intragastric administration for a total period of 15 days. Intraperitoneal injection of cisplatin (2 mg/kg/d) was started from the last 5th day, for a total of 5 days. The weight gain and loss of each mouse on the last 5 days were calculated, and the gastric emptying rate of each mouse was measured after stopping the drug for 24 h. The ultrastructure of ICC in gastric tissue was detected by electron microscope and the expression of Ano1 protein and mRNA in gastric tissue, which specifically responded to the changes of ICCs, were detected also. **Results:** The weight and gastric emptying rate of mice were significantly decreased after injection of cisplatin ($P<0.01$). Compared with cisplatin group, cisplatin+curcumin group had less weight loss ($P<0.01$) and gastric emptying rate were significantly increased ($P<0.05$). After injection of cisplatin, ICCs in gastric tissue were damaged, especially the gap junctions between peripheral nerve and muscular cells were widened or even broken, and curcumin could alleviate these damage. In addition, the expression of Ano1 mRNA and protein in cisplatin group decreased ($P<0.01$), while it was improved significantly in cisplatin+curcumin group ($P<0.05$). **Conclusions:** Curcumin can reduce cisplatin-induced structural damage of ICC by increasing the expression of Ano1 and increasing the function of slow waves generation.

Key words: Curcumin; Cisplatin; Gastric emptying rate; Cajal interstitial cells; Ano1

Chinese Library Classification (CLC): R-33; R285.5; R57 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)05-838-04

前言

顺铂是临床上应用广泛的化疗药物,在顺铂众多副反应中,最易加重恶病质发展的便是胃肠道副反应。本实验室前期研究证实顺铂可引起小鼠胃肠食物蠕动障碍,而姜黄素可减轻这种损害^[1]。胃肠蠕动受多种因素的调节,在消化道自主神经和

平滑肌之间有一种特殊类型的 Cajal 间质细胞(Cajal interstitial cells, ICCs),这种细胞是胃肠慢波节律的起搏者,对胃肠正常蠕动功能起至关重要的作用^[2-4]。参与 ICC 起搏电位的是一种 Ca^{2+} 激活的氯离子通道 Anoctamin-1 (Ano1),在整个胃肠道 ICCs 中高度表达^[5],在 ICC 起搏活动中具有关键作用^[6]。本实验室前期研究显示,顺铂可引起 ICC 特异性信息分子 c-kit 表达减少^[7],

* 基金项目:山东省自然科学基金项目(ZR2014HM033)

作者简介:姜少萍(1987-),硕士研究生,主要研究方向:肿瘤防治病理生理学, E-mail: jlove2012@163.com

[△] 通讯作者:于小玲(1964-),硕士生导师,副教授,主要研究方向:肿瘤防治病理生理学, E-mail: xiaoling_yu2004@163.com

(收稿日期:2018-07-18 接受日期:2018-09-05)

提示 ICC 可能参与了顺铂导致的胃肠功能障碍。本研究将进一步检测 ICC 的超微结构和其功能蛋白 Ano1 表达的变化,旨在深入探索姜黄素减轻顺铂所致胃肠道副作用的机制。

1 材料与方法

1.1 动物分组与处理

健康昆明种雄性小鼠 30 只,体质量 22~25 g,购自山东省鲁抗医药股份有限公司实验动物室,合格证号 0014125,许可证号 SCXK 鲁 20080002。将小鼠随机分为对照组(NC)、顺铂组(DDP)、姜黄素 + 顺铂组 (DDP+Cur)。0.2 mL 姜黄素 (纯度 99.9%,美国 Sigma-Aldrich 公司)混悬液灌胃(200 mg/kg/d),共 15 天。从灌胃的第 11 天开始,DDP 组、DDP+Cur 组分别给予 0.2 mL 顺铂 (购自江苏豪森药业股份有限公司)腹腔注射(2 mg/kg/d),共 5 天。其余组分别给予等量溶媒溶液和生理盐水作为对照。观察小鼠一般状况并每天测量体重,计算每只小鼠最后 5 天的体重增减值。

1.2 试剂

总 RNA 提取的 Omega Bio-Tek 试剂盒购自 OMEGA 公司;逆转录以及荧光定量 PCR 试剂购自大连 TaKaRa 公司;Ano1、GADPH 引物由上海生工生物工程有限公司设计合成。Western blots 测定所用试剂:RIPA 裂解液、PMSF 溶液、SDS-PAGE 凝胶、电泳转移缓冲液(10X)、TBST(10X)、Albumin bovine serum 购自美国 Solarbio 公司;Tris-Glycine SDS Buffer (10X)、高灵敏度化学发光试剂盒购自康为世纪生物科技有限公司;Ano1 (Cat.NO.bs-3794R)、 β -actin 抗体 (Cat.NO.bs-0061R)、Goat Anti-rabbit IgG (Cat.NO.bs-0295G-HRP)均购自 Bioss 公司。

1.3 胃排空率检测

末次用药结束后,各组小鼠禁食 24 h,自由饮水,处死小鼠前 20 分钟时,分别给予 0.8 mL 80%质量分数的亚甲蓝混悬液灌胃。脱臼处死小鼠并解剖腹腔,切取胃并称其全重,然后剪开胃洗去胃内容物,再次称取胃净质量。胃排空率(%)=(1-(胃全重-胃净重)/0.8 mL 阿拉伯胶混悬液质量)× 100%。

1.4 电镜观察 ICC 超微结构

取小鼠新鲜胃窦组织约 1 mm³,置于含 3%戊二醛和 4%

多聚甲醛的固定剂中,pH 7.2,在 4℃下 2 小时。经冲洗、脱水、浸透和包埋等一系列处理后,制成 50-60 nm 的超薄切片,染色后电子镜下观察胃窦肌层组织中 ICC 超微结构变化。

1.5 实时荧光定量 PCR 法检测胃窦组织 Ano1 mRNA 的表达

取冷藏于 -80℃冰箱的各组胃窦和胃体组织,用硅胶柱纯化方式提取胃组织的总 RNA,逆转录成 cDNA,用 LightMix[®] 试剂盒进行实时荧光 qPCR,以 GAPDH 作为内参。反应条件为:95℃ 3 min;95℃ 10 s,60℃ 20 s,72℃ 30 s,40 cycles。每样本采用三管,计算其平均 CT 值。目的基因相对表达量计算公式: $2^{-\Delta\Delta CT}=2^{-(\Delta CT \text{ 目的基因} - \Delta CT \text{ 对照基因})}$ 。Ano1 荧光定量 PCR 上游引物为:5'-AGCGGAAGCAGCGCTATGA-3',下游引物为:5'-GGGTGACAAAGCCGAAGTGA-3'。内参照 GAPDH 基因上游引物为:5'-CGGAGTCAACGGATTGTCGTAT-3',下游引物为:5'-AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC-3'。

1.6 Western blotting 检测胃组织 Ano1 蛋白的表达

取冷藏于 -80℃冰箱的胃组织,裂解法提取组织总蛋白。取相应总蛋白量进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,然后将蛋白转至 PVDF 膜上。脱脂奶粉封闭后,Ano1 一抗 37℃孵育 1 h;洗涤后孵育二抗 1 h;洗涤之后在 PVDF 上滴加 ECL 发光染色液,显影拍照。在同一张 PVDF 膜上相应位置上以同样方式进行内参 GAPDH 抗体孵育、显影和拍照,然后用凝胶成像光密度分析软件对两对应条带进行分析比较,Ano1/GAPDH 作为蛋白相对定量。

1.7 统计学分析

采用 SPSS17.0 软件进行统计学分析,多组计量资料数据比较采用单因素方差分析,两两比较行 q 检验,以 P<0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠体重和胃排空率的变化比较

对照组和单用姜黄素组小鼠的体重随着天数增加而增加,两组比较差异均无统计学意义(P>0.05)。注射顺铂组小鼠体重不增反降(P<0.01),胃排空率明显降低(P<0.01);与顺铂组相比,姜黄素 + 顺铂组体重下降值明显减少(P<0.05),胃排空率有所回升(P<0.05),见表 1。

表 1 小鼠体重和胃排空率的变化($\bar{x} \pm s$, n=10)

Table 1 Changes of body weight and gastric emptying rate of mice

Group	Changes of body weight(g)	Gastric emptying rate(%)
NC	4.43± 1.06	44.49± 6.96
DDP	-4.64± 0.98**	22.56± 5.44**
DDP+Cur	-2.98± 0.93*** $\Delta\Delta$	30.72± 6.60*** $\Delta\Delta$

Note: Compared with Control group, **P<0.01; Compared with DDP group, $\Delta\Delta$ P<0.01.

2.2 各组胃组织 ICC 超微结构的比较

电镜观察顺铂组胃窦肌层 ICCs 细胞皱缩形状不规则,细胞与神经和平滑肌之间的连接缝隙增大,部分连接断裂;胞核形状不规则,异染色质增多,核边缘不清晰;胞质减少,线粒体减少,溶酶体增多;姜黄素治疗组上述改变明显减轻,见图 1。

2.3 各组胃组织 Ano1 mRNA 和蛋白的表达比较

顺铂组小鼠胃窦和胃体组织的 Ano1 mRNA 表达量较对照组明显降低(P<0.01);而顺铂 + 姜黄素组小鼠胃窦和胃体组织的 Ano1 mRNA 表达相较顺铂组均显著增加(P<0.05),见表 2。进一步检测胃体组织 Ano1 蛋白表达显示变化趋势和上述 mRNA 变化一致,见图 2。

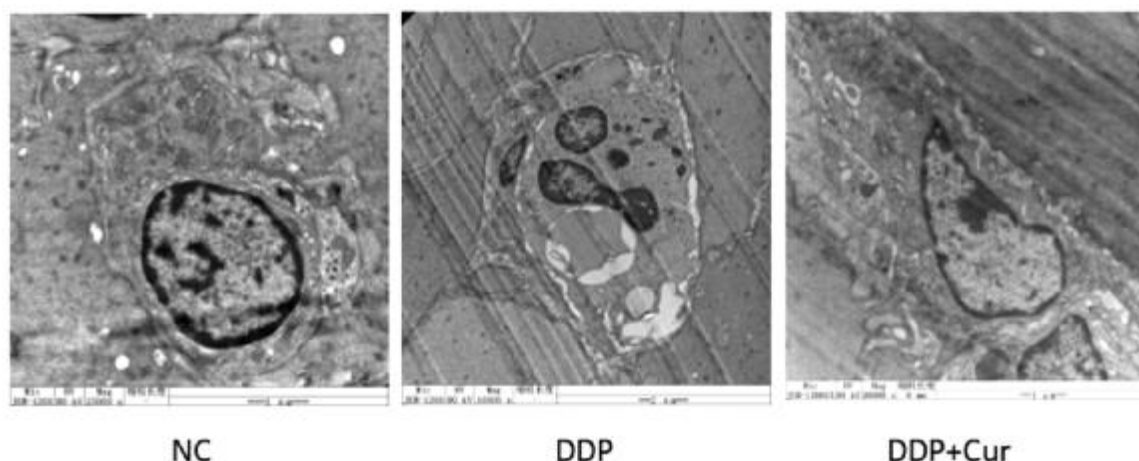


图1 各组小鼠胃组织 ICC 超微结构的比较

Fig.1 Comparison of ICC ultrastructure in gastric tissues of mice among different groups

表2 各组小鼠胃组织 Ano1 mRNA 表达变化($\bar{x} \pm s$, n=10)

Table 2 Changes of Ano1 mRNA expression in gastric tissues of mice

Group	Ano1 mRNA (Gastric antrum)	Ano1 mRNA (Gastric body)
NC	1.00 $\pm$ 0.11	1.00 $\pm$ 0.12
DDP	0.39 $\pm$ 0.11**	0.52 $\pm$ 0.15**
DDP+Cur	0.52 $\pm$ 0.13*** $\Delta\Delta$	0.67 $\pm$ 0.13*** $\Delta\Delta$

Note: Compared with Control group, **P<0.01; Compared with DDP group, $\Delta\Delta$ P<0.01.

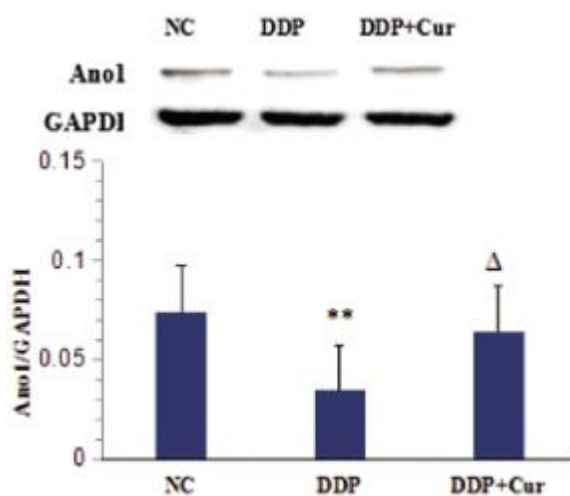


图2 小鼠胃体组织 Ano1 蛋白表达变化

Fig.2 Changes of Ano1 protein expression in gastric body of mice

Note: Compared with Control group, **P<0.01; Compared with DDP group, *P<0.05.

3 讨论

顺铂是目前临床治疗多种肿瘤的一线用药, 其抗肿瘤作用强、抗癌谱广, 被推荐为肺癌、膀胱癌、睾丸癌和卵巢癌等十余种肿瘤的首选化疗药物^[8,9]。但顺铂副反应发生率高, 且严重影响患者的健康状况, 主要副反应有胃肠道副反应、肝毒性、肾毒性、耳毒性等; 其中最为常见的是胃肠道副反应, 主要为胃肠动力障碍, 患者出现恶心呕吐、胃肠蠕动紊乱等消化道症状, 不仅影响患者的营养状态加重恶病质, 而且会降低患者对治疗的依从性^[8-10]。当前, 现代医学对胃肠动力障碍发病机制的认识及相

关疾病的诊治水平皆得到了显著提高, 但是治疗手段相对单一, 药物副作用大, 选择性低。含有多种药效物质的中成药以及中药复方, 副作用小, 对胃肠动力障碍性疾病的疗效明显优于西医药。姜黄素就是这样一类药物, 姜黄素(curcumin)是从姜黄中提取出来的一种脂溶性酚类色素, 是姜黄发挥药理作用最重要的化学成分^[11]。研究证明, 姜黄素具有抗炎、抗氧化、清除氧自由基、抗人类免疫缺陷病毒、抗肿瘤、降血脂、保护肝脏和肾脏、抗纤维化等多方面药理作用^[12,13]。姜黄素在抗胃肠道炎症方面也发挥着强大的效应^[12,13]。本实验室前期研究证实, 顺铂可引起小鼠胃肠食物蠕动障碍, 而姜黄素可减轻这种变化^[1]。

胃肠蠕动受多种因素的调节, 在消化道自主神经和平滑肌之间有一种特殊类型的间质细胞它由 Cajal 于 1893 年首次发现, 称为 Cajal 间质细胞(Cajal interstitial cells, ICCs), 这种细胞对胃肠正常蠕动功能起至关重要的作用^[14-16]。ICC 是胃肠慢波节律的起搏者^[4], 还参与胃肠神经系统支配的胃肠蠕动调控^[17]。ICCs 也被称为胃肠起搏细胞, 它可以混合食物, 促进胃排空, 调节胃肠道的迁移运动^[16-18]。有报道称糖尿病胃轻瘫时会出现 ICCs 的缺失^[19]。Cajal 间质细胞具有产生慢波、传导慢波电位、调节神经递质等功能, 是调节胃肠动力的重要环节^[14,18,20]。ICC 在维持正常胃肠动力方面发挥着重要作用, 同时其形态、数量及分布的改变会导致多种胃肠动力障碍性疾病^[19,21]。本实验室前期研究显示顺铂可引起 ICC 特异性信息分子 c-kit 表达减少^[7], 说明顺铂导致胃肠功能障碍与 ICC 有关。

为深入探索姜黄素减轻顺铂胃肠道副作用的机制, 本研究参照临床顺铂的用药方式给小鼠用药, 结果导致小鼠胃排空明显减弱, 体重呈负增长, 而姜黄素预先灌胃可显著减轻这种变化。通过进一步检测发现, 顺铂引起的胃功能障碍与胃组织 ICC 结构损伤有关, 其代表性功能蛋白 Ano1 也受到抑制, 而姜

黄素可以减轻顺铂导致的这种变化,说明姜黄素可以通过减轻 ICC 结构和功能损伤而减轻顺铂的胃肠道副作用。研究显示 ICC 异常与炎症性肠病、特发性慢传输型便秘、坏死性肠结肠炎等多种胃肠道疾病有关^[19,22,23]。本研究显示顺铂导致 ICC 超微结构损伤,尤其 ICC 与周围神经和平滑肌细胞间的连接缝隙增大甚至断裂,可能导致相关神经递质信号无法传递,胃肠蠕动调控障碍。

Anoctamin-1(Ano1)也被称为 Transmembrane member 16A (TMEM16A),是一种 Ca^{2+} 激活的氯离子通道,细胞内 Ca^{2+} 浓度升高可激活该氯离子通道,驱动胞内氯离子外流,从而产生大量内向电流,这种氯离子通道参与起搏电位的形成,在 ICC 起搏活动中具有关键作用,并经缝隙连接传递到邻近细胞^[5,24,25]。Ano1 在平滑肌和上皮细胞中表达^[22],并在整个胃肠道中 Cajal (ICC)间质细胞中高度表达^[5]。Ano1 通道活性的变化与 ICC 活动直接正相关^[5]。其在上皮细胞氯离子分泌中起重要作用,并介导肠运动^[5,24,26]。Ano1 阻断剂如尼氟酸已被证明能阻断人体肠道中产生慢波运动^[5,26]。Ano1 敲除小鼠不能完全产生慢波^[5,26]。因此,Ano1 激活对于 ICC 的正常功能及其在肠道平滑肌中产生的起搏活动是必需的^[5,26]。本研究显示顺铂引起胃组织 Ano1 mRNA 和蛋白表达均减少,由此会影响胃组织 ICC 起搏电位形成,导致慢波节律起搏障碍,胃肠蠕动减弱,从而导致胃排空延缓,而姜黄素可以抑制这种变化,因而改善胃排空,由此小鼠消化功能有所恢复,体重消耗减轻,生存状态好转。

姜黄素作为一种来源于姜科植物根茎的天然色素添加剂被广泛应用于日常食品加工,国内外众多实验证实姜黄素具有抗氧化、抗炎、抗肿瘤等多种生物学活性^[12,13]。国外早期临床试验确定姜黄素在患者应用中是安全的,未见明显的毒副效应^[27]。本研究充分证明姜黄素降低顺铂在胃中的副作用并由此减轻小鼠恶病质,这将对减轻患者化疗中的胃肠副作用有非常吸引力的前景。

参考文献(References)

- [1] 周燕,于小玲,高晶晶,等.姜黄素灌胃对顺铂所致的肠道损伤的保护效应[J].中国现代医学杂志,2012,22(3):3014-3016
- [2] Kito Y, Mitsui R, Ward SM, et al. Characterization of slow waves generated by myenteric interstitial cells of Cajal of the rabbit small intestine [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2015, 308 (5): G378-G388
- [3] 陈健海,仲婕,王凡,等.胃肠道 Cajal 间质细胞起搏功能的研究进展[J].中国病理生理杂志,2017,33(1):184-188
- [4] Sathar S, Trew ML, Cheng LK. Tissue specific simulations of interstitial cells of Cajal networks using unstructured meshes [J]. Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc, 2015, 2015: 8062-8065
- [5] Sanders KM, Mei HZ, Britton F, et al. Anoctamins and gastrointestinal smooth muscle excitability[J]. Experimental Physiology, 2012, 97(2): 200-206
- [6] Qian A, Means S, Cheng L K, et al. A mathematical model of the effects of anoctamin-1 loss on intestinal slow wave entrainment [J]. Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc, 2017, 2017: 2688-2691
- [7] 李培杰.姜黄素灌胃对顺铂所致小鼠胃排空障碍的改善作用及机制初探[D].青岛大学,2016
- [8] Dasari S, Tchounwou PB. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action [J]. European Journal of Pharmacology, 2014, 740: 364
- [9] Ho GY, Woodward N, Coward JI. Cisplatin versus carboplatin: comparative review of therapeutic management in solid malignancies[J]. Critical Reviews in Oncology/ hematology, 2016, 102: 37-46
- [10] Martin L. Diagnostic criteria for cancer cachexia: data versus dogma [J]. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2016, 19(3): 188-198
- [11] Mahmood K, Zia KM, Zuber M, et al. Recent developments in curcumin and curcumin based polymeric materials for biomedical applications: A review [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2015, 81: 877-890
- [12] Fadus MC, Lau C, Bikhchandani J, et al. Curcumin: An age-old anti-inflammatory and anti-neoplastic agent [J]. Journal of Traditional & Complementary Medicine, 2017, 7(3): 339-346
- [13] Hussain Z, Thu HE, Amjad MW, et al. Exploring recent developments to improve antioxidant, anti-inflammatory and antimicrobial efficacy of curcumin: A review of new trends and future perspectives [J]. Materials Science & Engineering C Materials for Biological Applications, 2017, 77: 1316-1326
- [14] Blair PJ, Bayguinov Y, Sanders KM, et al. Interstitial cells in the primate gastrointestinal tract [J]. Cell & Tissue Research, 2012, 350(2): 199-213
- [15] Lies B, Gil V, Groneberg D, et al. Interstitial cells of Cajal mediate nitroergic inhibitory neurotransmission in the murine gastrointestinal tract [J]. American Journal of Physiology Gastrointestinal & Liver Physiology, 2014, 307(1): G98-106
- [16] Sanders K M, Kito Y, Hwang S J, et al. Regulation of Gastrointestinal Smooth Muscle Function by Interstitial Cells[J]. Physiology, 2016, 31 (5): 316-326
- [17] Pasternak A, Szura M, Gil K, et al. Interstitial cells of Cajal (ICC) - systematic review[J]. Folia Morphologica, 2016, 75(3): 281
- [18] Al-Shboul OA. The importance of interstitial cells of cajal in the gastrointestinal tract[J]. Saudi Journal of Gastroenterology Official Journal of the Saudi Gastroenterology Association, 1900, 19(1): 3-15
- [19] Iwasaki H, Kajimura M, Osawa S, et al. A deficiency of gastric interstitial cells of Cajal accompanied by decreased expression of neuronal nitric oxide synthase and substance P in patients with type 2 diabetes mellitus[J]. Journal of Gastroenterology, 2006, 41(11): 1076-1087
- [20] Muller PA, Rajani GM, Stevanovic K, et al. Crosstalk between muscularis macrophages and enteric neurons regulates gastrointestinal motility[J]. Cell, 2014, 158(2): 300-313
- [21] Wood JD. Enteric Nervous System: Neuropathic Gastrointestinal Motility[J]. Digestive Diseases & Sciences, 2016, 61(7): 1-14
- [22] Burns AJ. Disorders of interstitial cells of Cajal [J]. Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition, 2007, 45 Suppl 2(12): S103
- [23] Giorgio RD, Sarnelli G, Corinaldesi R, et al. Advances in our understanding of the pathology of chronic intestinal pseudo-obstruction[J]. Gut, 2004, 53(11): 1549-1552
- [24] Pedemonte N, Galletta L JV. Structure and Function of TMEM16 Proteins (Anoctamins)[J]. Physiological Reviews, 2014, 94(2): 419-59
- [25] Radulovic M, Anand P, Korsten MA, et al. Targeting Ion Channels: An Important Therapeutic Implication in Gastrointestinal Dysmotility in Patients With Spinal Cord Injury[J]. Journal of Neurogastroenterology & Motility, 2015, 21(4): 494-502
- [26] Zhu M H, Sung I K, Zheng H, et al. Muscarinic activation of Ca^{2+} -activated Cl^{-} current in interstitial cells of Cajal [J]. Journal of Physiology, 2011, 589(Pt 18): 4565
- [27] Mirzaei H, Shakeri A, Rashidi B, et al. Phytosomal curcumin: A review of pharmacokinetic, experimental and clinical studies [J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2017, 85: 102-112