

当归四逆汤防治奥沙利铂致慢性周围神经病变

胡莹¹, 霍介格², 曹鹏², 王小宁^{2*}, 胡春萍², 蔡雪婷², 丁蓉^{1,3}, 李松林¹
(1. 江苏省镇江市中医院, 江苏 镇江 212003; 2. 江苏省中医药研究院, 南京 210028;
3. 南京中医药大学, 南京 210029)

[摘要] 目的:通过观察化疗致周围神经病变(CIPN)大鼠疼痛行为学变化、脊髓 *N*-甲基-*D*-天冬氨酸受体 2B 亚基(NR2B)的表达,探讨当归四逆汤对奥沙利铂致 CIPN 的防治作用。方法:52 只成年 Wistar 雌性大鼠随机分为 5 组,正常组、模型组、甲钴胺组(104 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)、当归四逆汤低、高剂量组(5.59,22.36 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)。造模前预防性给药 7 d,当归四逆汤高、低剂量组 5 $\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}\text{ig}$,1 次/d;甲钴胺组 ip,2 次/周;造模过程中继续给药,持续 50 d。除正常组其余 4 组按照奥沙利铂 4 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 2 次/周 ip 共 8 次。给药期间每 3 日称体重;每周测定机械性缩足阈值(MWT)。给药结束后,处死大鼠,剖取腰段 L2~4 脊髓、L4~5 背根神经节(DRG),实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测 L2~4 脊髓 NR2B mRNA 水平。结果:大鼠体重 d_{40} 后当归四逆汤低、高剂量组体重均上升,高于模型组及甲钴胺组($P<0.01$);模型组与正常组比较,MWT 明显下降($P<0.05$),当归四逆汤低、高剂量组、甲钴胺组与模型组比较 MWT 明显增高($P<0.05$);模型组 NR2B mRNA 水平显著高于正常组($P<0.05$),当归四逆汤低、高剂量组可显著下调模型大鼠 NR2B mRNA 水平($P<0.05$),甲钴胺组效果不明显。结论:当归四逆汤组使 CIPN 大鼠 L2~4 脊髓 NR2B mRNA 水平减少,且与行为学表现有明显的相关性,当归四逆汤可能在 CIPN 的防治中起重要作用。

[关键词] 奥沙利铂; CIPN; *N*-甲基-*D*-天冬氨酸受体 2B 亚基; 当归四逆汤
[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2013)20-0255-04
[doi] 10.11653/syfy2013200255

Danggui Sini Decoction for Prevention and Treatment
of Chronic CIPN Caused by Oxaliplatin

HU Ying¹, HUO Jie-ge², CAO Peng², WANG Xiao-ning^{2*}, HU Chun-ping²,
CAI Xue-ting², DING Rong^{1,3}, LI Song-lin¹
(1. Zhenjiang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhenjiang 212003, China;
2. Jiangsu province Academy of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210028, China;
3. Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, China)

[Abstract] Objective: To investigated the preventive and therapeutic effects of Danggui Sini decoction (DSD) on oxaliplatin induced chronic chemotherapy induced peripheral neuropathy (CIPN) by observing the pain response of rats, the expression of NR2B mRNA level. Method: Fifty-two adult female Wistar rats were divided randomly into 5 groups: blank control group, model control group, positive control group of mecobalamin (104 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$), DSD group of (5.59, 22.36 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$). Animal model of chronic CIPN was induced by oxaliplatin (4 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, ip, twice a week for 8 times), rats were pretreated by DSD (ig, daily) and mecobalamin (ip, twice in a week) from 7 days before making models and continued for 50 days after modeling. The body weight (every three

[收稿日期] 20121202(003)
[基金项目] 江苏省六大人才高峰项目(第六批),第五批全国老中医药专家学术经验继承项目;江苏省名老中医工作室建设项目;国家自然科学基金项目(81274150)
[第一作者] 胡莹,硕士研究生,从事肿瘤中西医结合的临床与科研工作,Tel:13775532553,E-mail:hy_ok12@yahoo.cn
[通讯作者] *王小宁,主任中医师,硕士研究生导师,从事肿瘤中西医结合的临床与科研工作,Tel:025-85637363,E-mail:hjg1668@yahoo.com.cn

days) and MWT (weekly) of rats were measured. The expression of NR2B mRNA in L2-4 spinal sample was tested by Q-PCR. **Result:** Rat weights in DSD groups were significantly higher than those in model and positive control group after day 40th ($P < 0.01$). Comparing to the model group, there were significant increasing on MWT in both DSD and mecobalamin groups ($P < 0.05$). The significant decrease of NR2B mRNA and the increase of pNF-H were spotted in tissue samples from DSD group, compared with those in the model group, however, the changes on NR2B and pNF-H was not obvious in mecobalamin group ($P < 0.05$). **Conclusion:** The chronic CIPN in rats could be alleviated by treatment of DSD by decreasing the expression of NR2B mRNA in L2-4 spine. Hence, treatment of DSD could be a potential alternative therapy for chronic CIPN.

[**Key words**] oxaliplatin; chemotherapy induced peripheral neuropathy; NR2B; Danggui Sini decoction

化疗致周围神经病变(CIPN)是常见的化疗相关毒副反应,患者可因不能耐受神经病变所致的疼痛、麻木而中断治疗,影响预后。然而,无论是预防性治疗,还是对症治疗均未显示确切疗效。奥沙利铂(OXA)主要用于大肠癌晚期一、二线治疗和术后辅助化疗^[1];近年多项研究表明对胃癌、胰腺癌、卵巢癌、非小细胞肺癌、黑色素瘤、睾丸肿瘤和淋巴瘤等也均有效^[1],预示该药适用范围逐渐扩大。但OXA所致的慢性CIPN使患者面临减低化疗药物剂量甚至停药的困境,故寻找防治方法尤为重要。临床中当归四逆汤针对经脉不利之四肢厥寒、脉细欲绝等证,对OXA致CIPN效果尚佳。本实验参照Yuki Mihara^[3]的方法建立OXA致慢性CIPN模型,评估行为学变化,并应用RT-PCR的方法观察背角和背根神经节N-甲基-D-天冬氨酸受体2B亚基(NR2B)的表达和变化,初步探讨中药当归四逆汤在慢性CIPN的防治中的作用。

1 材料

1.1 动物 雌性Wistar大鼠52只,体质量180~200 g,清洁级,购自上海斯莱克实验动物中心,并饲养于江苏省中医药研究所SPF级实验动物房。动物饲养于安静、通风和空气过滤系统的环境中,保持室温20~25℃,相对湿度40%~60%,自由进食和饮水。为保持动物昼夜生物节律,实验室每日8:00至20:00开灯,20:00至次日8:00熄灯。本实验严格按照国际疼痛学会(IASP)关于应用清醒动物进行疼痛实验研究纲要的要求实施和完成。

1.2 药物 当归四逆汤(当归12 g,桂枝9 g,细辛9 g,芍药9 g,甘草6 g,通草6 g,大枣8枚)成人处方生药量为61 g(根据张仲景《伤寒论》剂量,生药低剂量5.59 g·kg⁻¹,高剂量22.36 g·kg⁻¹),中药均购自江苏省中西医结合医院药房,4℃保存备用;奥沙利铂(艾恒)注射液,50 mg,批号11032111,江苏恒瑞医药股份有限公司;甲钴胺(弥可保)注射液,

批号110470A,海南斯达制药有限公司。

1.3 试剂及仪器 上下游引物Rat NR2B-F、RatNR2B-R(上海英骏生物技术有限公司),抗NMDAR2B(D15B3)Rabbit mAb抗体(Cell Signaling Technology公司,批号42125);58011型Von frey hairs疼痛触觉测试套件(Stoelting公司,USA),OMIC433型Tail-Flick Analgesla Meter(Harvard公司,USA)。

2 方法

2.1 分组、造模与给药 将健康雌性Wistar大鼠适应性喂养5 d后称重,随机分为正常组(8只)、模型组(11只)、甲钴胺组(11只,104 μg·kg⁻¹,ip,2次/周;)、当归四逆汤低剂量组(11只,5.59 g·kg⁻¹)、高剂量组(11只,22.36 g·kg⁻¹),ig给药,1次/d,预防性给药7 d后,参照Yuki Mihara等^[3]的方法,除正常组第8天5%葡萄糖注射液5 mL·kg⁻¹,ip外,其余4组予奥沙利铂4 mg·kg⁻¹,ip,2次/周(将奥沙利铂200 mg溶于50 mL的5%葡萄糖溶液中,终质量浓度为4 g·L⁻¹,现配现用)。共8次造模,分别是第8,9,15,16,22,23,29,30天(实验组奥沙利铂ip共约30 mg·kg⁻¹,按照实验动物与人的剂量换算方法,相当于临床单药剂量180 mg·m⁻²,已大于人临床实际推荐剂量130 mg·m⁻²)。各组给药共持续50 d。

2.2 一般情况观察 大鼠每3日称体重,每日观察大鼠给药后反应、饮食、大便。

2.3 痛觉行为测试 机械性痛觉超敏:参照Chaplan等^[2]的方法,以机械性缩足阈值(MWT)评估大鼠的机械性痛觉超敏。方法是用von Frey纤维细丝(折力梯度分别为1.0,1.4,2.0,4.0,6.0,8.0,10.0,15.0 g)以上下法推算缩足阈值:将一有机玻璃箱(22×12×22)cm。置于金属筛网上,待大鼠在有机玻璃箱中适应15 min后处于静止时,用von Frey纤维细丝垂直刺激大鼠一侧后肢足底中部,持续时间≤4 s,大鼠出现抬足或舔足行为视为阳性反

应,否则为阴性反应。测定时首先从折力 2.0 g 开始,当该力度的刺激不能引起阳性反应时,则给予相邻大一级力度的刺激;若出现阳性反应则给予相邻小一级力度的刺激,如此连续进行,直至出现第 1 次阳性和阴性反应的骑跨,每个折力的 von Frey 纤维细丝均连续测定 5 次,每次刺激间隔 30 s,5 次中有 ≥ 3 次的阳性反应视为有机械痛敏,最大力度为 15 g,此值记为 15 g。折力梯度(g)分别为 1.0,1.4,2.0,4.0,6.0,8.0,10.0,15.0,折合成 4.08,4.17,4.31,4.56,4.74,4.93,5.07,5.18 进行计算。

2.4 RT-PCR 检测 NR2B 表达量 给药 50 d 后,每组取 6 只,脱椎处死,解剖,取出腰段脊髓(L2~4)并剥除硬脊膜,分离后迅速移至 -80℃ 冰箱保存。各组分别取 100 mg 组织样本采用 Trizol(Invitrogen US)法抽提 RNA,1 μg RNA 用于 cDNA 第一链的合成,第一链合成用 maxima First strand cDNA synthesis 试剂盒(Fermentas, USA)。按照 Maxima SYBR

Green qPCR 试剂盒(Fermentas USA) 配制 20 μL 反应体系,PCR 引物序列如下:NR2B 上游引物:5'-TACGGGAGGGATAGGGC-3',下游引物 5'-GCGAGGGAGGAGAAATG-3'。内参基因为 β -actin。PCR 在 ABI 7500 PCR 仪上进行,反应程序如下:50℃ 预处理 2 min,95℃ 预变性 10 min,95℃ 变性 15 s 和 60℃ 退火 60 s 共 40 循环。扩增结果采用 $\alpha^{\Delta\Delta CT}$ 法进行分析。

2.6 统计学方法 采用 SPSS 16.0 统计软件,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析检验,以 $P < 0.05$ 表示具统计学意义。

3 结果

3.1 对模型大鼠体重的影响 正常组体重随时间平稳上升,与正常组比较,造模 14 d 后模型组体重显著下降($P < 0.01$),与模型组比较,当归四逆汤低剂量组在 43 d 和 49 d、高剂量组在 8 d 和 49 d 体重均上升($P < 0.05$)。

表 1 当归四逆汤对模型大鼠体重的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	n	体重							
			1 d	8 d	14 d	21 d	28 d	35 d	43 d	49 d
正常	-	8	193.13 ± 11.13	205.00 ± 11.33	208.38 ± 12.93 ¹⁾	217.12 ± 12.47 ²⁾	222.63 ± 12.58 ²⁾	233.38 ± 14.54 ²⁾	241.13 ± 14.88 ²⁾	243.25 ± 15.57 ²⁾
模型	-	11	186.45 ± 8.00	199.45 ± 7.74	194.09 ± 9.55	189.45 ± 9.75	193.45 ± 11.32	192.64 ± 11.84	202.64 ± 11.20	197.09 ± 13.23
甲钴胺	1.04 × 10 ⁻⁴	11	192.91 ± 9.93	206.64 ± 12.32	201.18 ± 11.57	192.91 ± 11.65	194.45 ± 6.65	195.45 ± 7.90	202.45 ± 10.44	206.82 ± 11.84 ¹⁾
当归四逆汤	5.59	8	187.00 ± 8.11	199.25 ± 8.56	199.25 ± 10.01	198.38 ± 6.05	196.13 ± 12.12	199.38 ± 10.99	211.25 ± 12.43 ¹⁾	216.00 ± 14.83 ¹⁾
	22.36	9	189.22 ± 8.29	199.11 ± 13.05 ¹⁾	196.89 ± 9.09	194.00 ± 9.92	195.78 ± 9.72	195.44 ± 10.92	206.22 ± 9.55	208.56 ± 10.97 ¹⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (表 2~3 同)。

3.2 对模型大鼠机械性缩足阈值的影响 正常组的机械性缩足阈值趋于稳定。开始造模 10 d 后各组出现明显触诱发痛,表现为机械性缩足阈值与基

础值和正常组相比明显下降($P < 0.01$),甲钴胺组及当归四逆汤低、高剂量组从给药 13 d 后与模型组相比有升高($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表 2。

表 2 当归四逆汤对模型大鼠机械性缩足阈值的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	n	缩足阈							
			1 d	10 d	13 d	20 d	27 d	34 d	42 d	48 d
正常	-	8	5.05 ± 0.09	5.02 ± 0.05	5.05 ± 0.08	5.07 ± 0.11	5.03 ± 0.09 ¹⁾	5.07 ± 0.10 ¹⁾	5.05 ± 0.09 ¹⁾	5.08 ± 0.05
模型	-	11	5.11 ± 0.08	5.12 ± 0.09	4.98 ± 0.15	4.78 ± 0.15	4.62 ± 0.21	4.56 ± 0.18	4.42 ± 0.18	4.33 ± 0.14
甲钴胺	1.04 × 10 ⁻⁴	11	5.10 ± 0.06	5.12 ± 0.07	5.13 ± 0.06	4.95 ± 0.16	4.86 ± 0.20	4.72 ± 0.22	4.58 ± 0.18	4.67 ± 0.23 ¹⁾
当归四逆汤	5.59	8	5.09 ± 0.09	5.13 ± 0.09	5.12 ± 0.11 ¹⁾	4.94 ± 0.15 ¹⁾	4.90 ± 0.23 ¹⁾	4.76 ± 0.25 ¹⁾	4.78 ± 0.22 ²⁾	4.88 ± 0.23 ²⁾
	22.36	9	5.07 ± 0.10	5.11 ± 0.11	5.13 ± 0.08 ¹⁾	4.98 ± 0.12 ¹⁾	4.90 ± 0.16 ¹⁾	4.74 ± 0.24 ¹⁾	4.73 ± 0.26 ²⁾	4.80 ± 0.20 ²⁾

3.3 对模型大鼠 NR2B mRNA 表达的影响 模型组 NR2B mRNA 相对表达量(RQ)在大鼠脊髓中表达明显升高,与正常组比较差异显著($P < 0.01$);当归四逆汤 NR2B mRNA 表达下调($P < 0.01$),其相

对表达量最小值(RQ_{min})与相对表达量最大值(RQ_{max})均显著低于模型组($P < 0.01$)。与大鼠机械性缩足阈呈明显负相关(以 2^{- $\Delta\Delta CT$} 表示大鼠脊髓 NR2B mRNA 的表达)。见表 3。

表 3 当归四逆汤对大鼠脊髓 NR2B mRNA 的相对表达量的影响 (n=6) 2^{-ΔΔCT}

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	RQ	RQ _{min}	RQ _{max}
正常	-	0.091 ²⁾	0.08 ²⁾	0.102 ²⁾
模型	-	1	0.431	2.318
甲钴胺	1.04×10 ⁻⁴	1.101	0.772	1.569 ¹⁾
当归四逆汤	5.59	0.068 ²⁾	0.057 ²⁾	0.108 ²⁾
	22.36	0.087 ²⁾	0.057 ²⁾	0.132 ²⁾

4 讨论

奥沙利铂导致的外周感觉神经毒性以肢体末端关节及肌肉麻木、重着、屈伸不利等为主症的一类病证,具有遇冷空气或冰物刺激加重的特点,属“痹证”、“麻木”范畴。根据长期临床观察和治疗经验,作者认为本病的病机特点为正气不足、寒凝络脉。

当归四逆汤出自汉代张仲景《伤寒论》,由当归、桂枝、芍药、细辛、通草、甘草、大枣组成,功能温经养血、通脉止痛,主治血虚寒凝、经脉不利之四肢厥寒等证。许宏在《金镜内台方议》中谓:“阴血内虚,则不能荣于脉;阳气外虚,则不能温于四末……。故用当归为君,以补血;以芍药为臣,辅之而养营气;以桂枝、细辛之苦,以散寒温气为佐;以大枣、甘草之甘为使,而益其中,补其不足;以通草之淡,而通行其脉道与厥也。”在临床上曾被应用于风湿寒性关节痛的治疗^[3],笔者在临床中运用当归四逆汤取得了良好的疗效。

目前关于中药对 CIPN 大鼠模型防治作用的实验研究鲜有报道,本研究是在原有研究基础上的进一步深入的实验研究,探究当归四逆汤在动物体内对 CIPN 的影响及其可能的机制。

本实验中发现大鼠注射奥沙利铂后无明显自发性疼痛表现,但随病程发展出现不同程度的触诱发痛,证明实验模型制备成功。背根神经节(DRG)是痛觉传入的第 1 级神经元,而脊髓背角为痛觉信号传入及处理的初级中枢。外周敏化的持续兴奋性冲动可经过 DRG 的 Aδ 和 C 纤维传入脊髓背角,使中枢痛信息传递神经元的兴奋性增高,敏感性增强,这一状态被称为中枢敏化^[5],触诱发痛即是中枢敏化的结果。NR2B 蛋白首先由 DRG 合成,再分布于脊

髓背角浅层的突触前膜。多项研究表明,抑制 NR2B 亚基具有神经保护作用^[3]。本实验结果显示:在 OXA 致慢性 CIPN 大鼠脊髓背角和 L4 DRG 中 NR2B mRNA 表达均增加,且与行为学表现有明显的相关性。在给予当归四逆汤干预后,NR2B 在脊髓的水平减少,疼痛中枢敏化激活降低,痛觉较前不敏感,表明当归四逆汤对神经有一定的保护作用。

综上,应用当归四逆汤对防治 OXA 致 CIPN 有一定的效果,可为 CIPN 的患者减轻痛苦,提高患者的耐受能力,提高患者的生活质量,增加治疗效果。其机制可能与当归四逆汤使 CIPN 大鼠 L2~4 脊髓 NR2B mRNA 水平下降有关。

[参考文献]

[1] Andre T, Boni C, Mounedji-Boudiaf L, et al. Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer [J]. New Engl J Med,2004, 350(23):2343.

[2] Alcindor T, Beauger N. Oxaliplatin:a review in the era of molecularly targeted therapy [J]. Current Oncology, 2011,18(1):18.

[3] Yuki Mihara, Nobuaki Egashira, et al. Involvement of spinal NR2B-containing NMDA receptors in oxaliplatin-induced mechanical allodynia in rats[J]. Molecular Pain, 2011, 20(7):8.

[4] Chaplan S R, Bach F W, Pogrel J W, et al. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw [J]. J Neurosci Methods, 1994, 53(1):55.

[5] 崔新生,陈志军. 当归四逆汤加味治疗风湿寒性关节痛 51 例报告 [J]. 中国实验方剂学杂志,2001,7(6):51.

[6] 刘喜赖. 当归四逆汤治疗血虚寒凝型糖尿病周围神经病变 40 例[J]. 陕西中医,2010,31(5):555,

[7] Chizh B A, Headley P M, Tzschentke T M. NMDAreceptor antagonists as analgesics: focus on theNR2B subtype[J]. Trends Pharmacol Sci, 2001,22(12):636.

[8] Wing C X, Shuaib A. NMDA/NR2B selectiue antagomsts in the treatment of ischemic brain injury[J]. Curr Drug Targets CNS Neurol Disord, 2005,4(2):143.

[责任编辑 李玉洁]