

• 实验研究 •

黄芪桂枝五物汤对化疗致大鼠周围神经损伤的作用

霍介格¹ 胡莹¹ 杨杰² 蔡雪婷² 胡春萍² 王小宁¹ 曹鹏^{2*}

1. 江苏省中医药研究院肿瘤科, 南京市红山路十字街 100 号, 210028;

2. 江苏省中医药研究院细胞与分子生物学实验室)

基金项目: 江苏省中医药领军人才培养基金资助项目

* 通讯作者: pcao79@yahoo.com, (025)85608666

[摘要] **目的** 评价黄芪桂枝五物汤对化疗致大鼠周围神经损伤的保护作用。 **方法** 将 55 只 Wistar 大鼠随机分为空白组、模型组、甲钴胺组、黄芪桂枝五物汤低、高剂量组, 每组 11 只。除空白组, 其余各组采用多次腹腔注射奥沙利铂的方式建立大鼠周围神经损伤模型, 黄芪桂枝五物汤高、低剂量组分别采用黄芪桂枝五物汤 19.40g/kg·d、4.85g/kg·d 灌胃, 连续 50 天; 甲钴胺组腹腔注射甲钴胺注射液 104μg/kg, 每周 2 次; 模型组给予黄芪桂枝五物汤低、高剂量组等体积的生理盐水灌胃, 连续 50 天; 空白组每周 2 次等体积腹腔注射 5% 葡萄糖及灌胃等体积生理盐水。分别于给药第 1、10、13、20、27、34、42、48 天进行大鼠机械性缩足阈值及大鼠尾部热痛觉潜伏期测试。给药结束后, 处死大鼠, 荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测 L4-6 脊髓 NR2B mRNA 水平的影响, 免疫组织化学法检测 L5 背根神经节(DRG)中 pNF-H 的表达。 **结果** 第 13 天后各时间点, 模型组的大鼠机械性缩足阈值与空白组比较明显下降($P < 0.05$); 黄芪桂枝五物汤低、高剂量组、甲钴胺组与模型组比较明显增高($P < 0.05$); 第 42、48 天, 黄芪桂枝五物汤低、高剂量组与甲钴胺组比较机械性缩足阈值差异有统计学意义($P < 0.05$); 各组大鼠不同时间点热辐射甩尾反应时间比较差异均无统计学意义($P > 0.05$); 与空白组比较, 模型组 NR2B mRNA 水平升高($P < 0.01$), 黄芪桂枝五物汤低、高剂量组大鼠 NR2B mRNA 水平较模型组降低($P < 0.01$); 黄芪桂枝五物汤低、高剂量组 pNF-H 阳性细胞数量较多, 胞体肥大, 染色加深, 呈多角形或圆形。 **结论** 黄芪桂枝五物汤可改善化疗致大鼠周围神经毒性, 其机制可能是通过下调大鼠 L4-6 脊髓中 NR2B 的表达以及上调 DRG 中 pNF-H 蛋白水平来介导。

[关键词] 黄芪桂枝五物汤; 奥沙利铂; 周围神经毒性; 周围神经损伤; 血痹证

Effect of Huangqi Guizhi Wuwu Decoction on Chemotherapy-induced Peripheral Nerve Injury in Rats

HUO Jiege, HU Ying, YANG Jie, CAI Xueting, HU Chunping, WANG Xiaoning, CAO Peng

(Jiangsu Province Academy of Traditional Chinese Medicine, Jiangsu Province 210028)

ABSTRACT **Objective** To study the protective effect of Huangqi Guizhi Wuwu Decoction (Astragalus and Cinnamon Twig Five Agents Decoction) on chemotherapy-induced peripheral nerve injury in rats. **Methods** Fifty-five adult female Wistar rats were randomized into five groups, i. e. blank group, model group, mecobalamin (104μg/kg) group, Huangqi Guizhi Wuwu Decoction small-dose (4.85g/kg·d) group and Huangqi Guizhi Wuwu Decoction large-dose (19.40g/kg·d) group, with 11 in each. Rat models with blood arthralgia syndrome were established with repeated intraperitoneal injection of oxaliplatin. The rats in Huangqi Guizhi Wuwu Decoction groups and mecobalamin group were preventively administered from 7 days before modeling and lasted for 50 days. The rat mechanical paw withdrawal threshold and rat tail thermal hyperalgesia latency were recorded on the 1st, 10th, 13th, 20th, 27th, 34th, 42nd, and 48th day during the administration. The rats were sacrificed after administration and the L4-6 lumbar spinal segments and L5 dorsal root ganglion (DRG) were resected. The level of NR2B mRNA in L4-6 lumbar spinal segments was detected with the real-time quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (qRT-PCR) method. The expression of pNF-H in L5 DRG was detected with immunohistochemistry assay. **Results** Comparing with the blank group, rat mechanical paw withdrawal threshold decreased obviously in the model group after the 13th day of experiment ($P < 0.05$). Rat mechanical paw withdrawal threshold increased obviously in Huangqi Guizhi Wuwu Decoction groups and mecobalamin group as compared with the model group ($P < 0.05$). There was a significant difference between Huangqi Guizhi Wuwu Decoction groups and mecobalamin group in rat mechanical paw withdrawal threshold after the 42nd day of experiment ($P < 0.05$). There was no significant difference in tail thermal pain incubation period between groups ($P > 0.05$). The level of NR2B mRNA in the model group was significantly higher than that in the blank group ($P < 0.05$). The levels of NR2B mRNA significantly decreased in Huangqi Guizhi Wuwu Decoction groups ($P < 0.05$), but the decrement in the mecobalamin group was not significant ($P > 0.05$). A large number of pNF-H positive cells and deeply stained cell body

could be seen in the normal group. A small number of pNF-H positive cells could be seen in the model group. A large number of pNF-H positive cells, cell hypertrophy and deeply stained cell body could be seen in Huangqi Guizhi Wuwu Decoction groups. **Conclusion** Huangqi Guizhi Wuwu Decoction could relieve pain of the blood arthralgia syndrome induced by chemotherapy and its mechanism may be relevant to down-regulating the expression of NR2B in the L4-6 lumbar spinal segments and up-regulating the level of pNF-H protein in DRG.

Keywords Huangqi Guizhi Wuwu Decoction; oxaliplatin; peripheral nerve hyperexcitability; blood arthralgia syndrome; peripheral nerve injury

血痹证与现代医学周围神经炎、周围神经麻痹、类风湿性关节炎等多种疾病相类似。黄芪桂枝五物汤是治疗血痹证的经典方剂,本研究通过建立奥沙利铂致大鼠周围神经损伤模型,研究大鼠神经传导速度变化的特点并利用黄芪桂枝五物汤对干预模型大鼠,评价黄芪桂枝五物汤对周围神经损伤的保护作用,探讨其与血痹证的相关性。

1 材料

1.1 药物

黄芪桂枝五物汤(药物组成:黄芪 15g,桂枝 12g,白芍 15g,生姜 6g,大枣 10g),由江苏省中医药研究院中药房提供,水煎后浓缩,含生药量 3g/ml,4℃保存备用;奥沙利铂注射液(艾恒,江苏恒瑞医药股份有限公司,批号:11032111),用 5%葡萄糖溶液稀释至终浓度为 4g/L;甲钴胺注射液(海南斯达制药有限公司,批号:110470A)。

1.2 动物

雌性 Wistar 大鼠 55 只,体重(190±10)g,清洁级,购自上海斯莱克实验动物中心,实验动物许可证号:SCXK(沪)2007-0005。

1.3 主要实验试剂及仪器

大鼠 NR2B 基因引物由上海英俊生物技术有限公司合成;抗神经丝蛋白 H 磷酸化亚型(pNF-H) IgG 抗体购自 Santa Cruz 公司;疼痛触觉测试套件(Von frey hairs)购自美国 Stoelting 公司;Tail-Flick Analgesia Meter 购自美国 Harvard 公司;Maxima First strand cDNA synthesis 试剂盒及 Maxima SYBR Greenq PCR 试剂盒购自美国 Fermentas 公司。

2 方法

2.1 动物分组及给药

采用随机数字表将大鼠分为 5 组,即空白组、模型组、甲钴胺组、黄芪桂枝五物汤低剂量组(低剂量组)、黄芪桂枝五物汤高剂量组(高剂量组),每组 11 只。高剂量组、低剂量组分别采用黄芪桂枝五物汤 19.40g/kg·d、4.85g/kg·d 灌胃,分别相当于成人

用量的 4 倍和 1 倍,连续给药 50 天;甲钴胺组腹腔注射甲钴胺注射液 104μg/kg,每周 2 次;空白组每周 2 次等体积腹腔注射 5%葡萄糖及等体积的生理盐水灌胃;模型组给予等体积生理盐水灌胃,连续 50 天。

2.2 动物模型的建立

参照文献[1]的造模方法,空白组腹腔注射 5%葡萄糖,其余各组按照 4mg/kg 的剂量腹腔注射奥沙利铂。腹腔注射时间点分别为第 8、9、15、16、22、23、29、30 天。给药结束后,奥沙利铂在大鼠体内累积剂量接近 32mg/kg,近似 180mg/m² 的人体应用剂量。造模与给药同时进行。

2.3 指标检测

2.3.1 机械性缩足阈值检测 参照文献[2]的方法,用 vonFrey 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、15.0g),折合成缩足阈值(分别为 4.08、4.17、4.31、4.56、4.74、4.93、5.07、5.18)。将有机玻璃箱(22cm×12cm×22cm)置于金属筛网上,待大鼠在有机玻璃箱中适应 15min 后处于静止时,用 vonFrey 纤维细丝垂直刺激大鼠一侧后肢足底中部,持续时间≤4s,大鼠出现抬足或舔足行为视为阳性反应。测定时首先从折力 2.0g 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,直至出现第一次阳性和阴性反应的骑跨,每个折力的 vonFrey 纤维细丝均连续测定 5 次,每次刺激间隔 30s,5 次当中有 3 次或 3 次以上的阳性反应视为有机机械痛敏,最大力度为 15.0g,大于此值时记为 15.0g,以相应的折合缩足阈值计算统计。分别于给药第 1、10、13、20、27、34、42、48 天测试 1 次。

2.3.2 辐射热测痛实验 参照文献[2]的方法,采用辐射热测痛仪,由 24V、250W 聚光灯泡制成,光线经外罩上的聚光漏斗集中照射于鼠尾,漏斗外口直径为 3mm,测痛时外口紧贴鼠尾,当鼠尾产生突然抽搐时,即为甩尾反应阳性,借助秒表记录甩尾反

应潜伏时间(以下简称痛阈),秒表记录最低限度为0.1s。取尾尖部起始的2cm处测痛,反复测痛3次,取平均值。分别于给药第1、10、13、20、27、34、42、48天检测1次。

2.3.3 背根神经节 pNF-H 免疫组织化学检测 给药50天后,空白组、模型组、黄芪桂枝五物汤低剂量组、高剂量组根据随机数字表法选取5只大鼠,心脏灌注200ml 4℃生理盐水,然后用4%多聚甲醛100ml先快后慢灌注固定。取出L5背根神经节(Dorsal root ganglia, DRG)并剥膜。L5 DRG置于4%多聚甲醛中,4℃过夜后行脱水、浸蜡、包埋。10%正常山羊血清封闭10min后滴加抗pNF-H抗体,4℃过夜。加适量生物素标记二抗兔抗羊IgG,37℃孵育30min, PBS清洗。滴加DAB显色液,显微镜观察。蒸馏水充分冲洗,苏木素轻度复染,0.1% HCl分化,自来水冲洗,脱水,透明,树胶封片。镜下观察拍照(100×)。

2.3.4 荧光定量PCR分析脊髓NR2B基因转录情况 给药50天后,各组剩余6只大鼠,行脱椎处死,解剖,取出腰段脊髓(L4-6)并剥除硬脊膜,分离后迅速移至-80℃保存。取100mg组织样本采用Trizol法抽提RNA,1μgRNA用于cDNA第一链的合成,PCR引物序列如下:上游引物NR2B-F: 5'-TACGGGAGGGATAGGGC-3',下游引物NR2B-R: 5'-GCGAGGGAGGAGAAATG-3'。实时荧光定量PCR反应在ABI7500PCR仪上进行,反应程序如下:50℃预处理(2min),95℃预变性(10min),95℃变性(15s)和60℃退火(60s)共40循环,扩增结

果采用 $\Delta\Delta CT$ 法进行分析。

2.3 统计学方法

采用SPSS 16.0统计软件包进行数据统计分析,计量资料采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用One-Way ANOVA方差分析,两组间比较用 t 检验。

3 结果

3.1 各组大鼠不同时间机械性缩足阈值比较

表1示,实验第13、20、27、34、42、48天模型组大鼠出现明显触诱发痛,机械性缩足阈值与空白组比较明显下降($P < 0.05$);低剂量组、高剂量组及甲钴胺组与模型组比较机械性缩足阈值明显增高($P < 0.05$);第42、48天,低剂量组、高剂量组与甲钴胺组比较机械性缩足阈值差异有统计学意义($P < 0.05$)。

3.2 各组大鼠不同时间热辐射甩尾反应时间比较

表2示,各组大鼠不同时间点热辐射甩尾反应时间比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

3.3 各组大鼠脊髓NR2B mRNA水平

表3示,模型组大鼠NR2B mRNA水平表达显著高于空白组($P < 0.01$);低剂量组、高剂量组大鼠NR2B mRNA水平较模型组降低($P < 0.01$)。

3.4 各组大鼠DRG中pNF-H蛋白表达比较

空白组大鼠pNF-H免疫反应阳性细胞在DRGL4-5中较多,神经元胞体肥大,着色深;模型组大鼠pNF-H免疫反应阳性细胞在DRGL4-5数量明显减少,神经元胞体相比正常组较小;低剂量组、高剂量组大鼠pNF-H免疫反应阳性细胞或产物

表1 各组大鼠不同时间机械性缩足阈值比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	第1天	第10天	第13天	第20天	第27天	第34天	第42天	第48天
空白组	11	5.06±0.09	5.10±0.05	5.03±0.09	5.06±0.12	5.03±0.09	5.06±0.09	5.06±0.09	5.10±0.05
模型组	11	5.10±0.10	5.13±0.06	4.98±0.14*	4.78±0.16*	4.63±0.22*	4.52±0.21*	4.40±0.16*	4.32±0.14*
甲钴胺组	11	5.12±0.06	5.12±0.06	5.13±0.06△	4.93±0.18△	4.88±0.21△	4.73±0.23△	4.57±0.19△	4.67±0.24△△
低剂量组	11	5.09±0.09	5.12±0.09	5.10±0.05△	4.96±0.16△	4.92±0.24△	4.75±0.26△	4.78±0.22△▲	4.90±0.23△▲
高剂量组	11	5.06±0.10	5.11±0.10	5.03±0.04△	4.98±0.12△	4.90±0.13△	4.75±0.25△	4.72±0.30△▲	4.84±0.20△▲

注:与空白组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,△ $P < 0.05$;与甲钴胺组比较,▲ $P < 0.05$

表2 各组大鼠热辐射甩尾反应时间比较(s, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	第1天	第10天	第13天	第20天	第27天	第34天	第42天	第48天
空白组	11	13.06±3.69	13.90±3.52	12.45±2.25	12.67±3.09	13.70±2.67	13.89±5.6	13.45±2.76	15.10±3.45
模型组	11	13.32±3.26	12.29±2.94	11.98±2.89	11.99±4.49	12.79±4.82	14.59±6.25	11.05±5.07	14.32±3.14
甲钴胺组	11	11.94±2.25	11.59±3.08	11.98±3.65	12.89±3.65	13.30±3.16	12.69±2.39	14.37±3.45	14.67±4.24
低剂量组	11	11.09±3.09	10.77±1.78	14.40±2.91	13.57±5.59	14.43±4.56	15.22±4.69	13.16±6.46	13.90±4.23
高剂量组	11	12.06±4.10	12.53±3.410	13.98±5.58	15.92±2.39	14.67±3.50	13.18±4.00	13.47±4.57	13.84±3.20

表 3 各组大鼠脊髓 NR2B mRNA 表达比较

组别	鼠数	相对定量(RQ)值
空白组	6	0.091
模型组	6	1*
甲钴胺组	6	1.101
低剂量组	6	0.068 Δ
高剂量组	6	0.087 Δ

注:与空白组比较,* $P<0.01$;与模型组比较, $\Delta P<0.01$;

在 DRGL4—5 数量与模型组比较明显增加,胞体肥大,染色加深,呈多角形或圆形。

4 讨论

血痹证是临床常见病症之一,最早出自《灵枢·九针》:“邪人于阴则为血痹”。血痹作为完整的病名概念出自张仲景《金匮要略》^[3]。奥沙利铂是常用铂类抗肿瘤药,其最为明显的毒副作用是对神经系统的毒性,且呈剂量相关性,最常见的症状是感觉异常,患者常出现手足麻木,感觉迟钝,寒冷刺激明显加重或诱发^[4]。古代文献对血痹的描述在临床表现与奥沙利铂导致周围神经毒性相似,因此可以将奥沙利铂导致的周围神经毒性辨证归纳为血痹范畴。黄芪桂枝五物汤具有益气通经,活血通痹的功效。对于皮肤炎、周围神经炎、中风后遗症等见有肢体麻木疼痛,属气虚血滞,微感风邪者均可加味用之^[5]。

研究表明奥沙利铂的慢性病变与奥沙利铂使用剂量相关^[6]。本实验采用对大鼠长期多次腹腔注射奥沙利铂模拟患者化疗的过程,大鼠痛觉阈值下降,可以导致大鼠周围神经损伤。在造模与用药过程中,运用痛觉行为测试随时监测造模是否成功以及黄芪桂枝五物汤的疗效,并能反映奥沙利铂用药后大鼠痛觉过敏的渐变过程。在造模结束后痛觉行为测试提示各用药组之间差别不明显,故本实验在造模结束后继续中药治疗两周,发现黄芪桂枝五物汤效果优于甲钴胺。

多项研究表明,抑制 NR2B 亚基具有神经保护作用^[7-8]。Wilson 等^[9]发现神经损伤后大鼠脊髓背角 NR2B 亚基的表达明显增加,选择性的 NR2B 拮抗剂能减轻神经源性疼痛,并且没有运动功能的损害。因此,推测 NR2B 在脊髓水平痛觉信息传递中可能起到重要作用。本研究发现大鼠在注射奥沙利铂后无明显自发性疼痛表现,但随病程发展可出现不同程度的触诱发痛。在使用奥沙利铂化疗后,其 NR2B mRNA 表达量上升显著,而应用黄芪桂枝五物汤治疗后,NR2B mRNA 表达量下降明显,降

至正常水平。pNF-H 主要分布在神经组织,对神经元的抗张强度及分子和细胞器在轴突内转运起着关键作用,有研究表明,pNF-H 的免疫反应停留在 DRG 神经纤维^[9-10]。免疫组织化学结果显示模型组大鼠 DRG 中 pNF-H 免疫反应阳性细胞数量减少,染色变淡,说明化疗损伤导致 pNF-H 水平降低,应用黄芪桂枝五物汤治疗后,pNF-H 免疫反应阳性细胞在数量增加,胞体肥大,染色加深,呈多角形或圆形,表明黄芪桂枝五物汤对于化疗损伤的 DRG 神经纤维具有修复功能。

本研究结果表明,黄芪桂枝五物汤对防治化疗诱导的大鼠周围神经损伤有确切的效果,为中药防治化疗所致血痹证提供了实验依据。

参考文献

- [1]Mihara Y, Egashira N, Sada H, et al. Involvement of spinal NR2B-containing NMDA receptors in oxaliplatin-induced mechanical allodynia in rats[J]. Mol Pain. 2011, (7):8.
- [2]Hartmann JT, Lipp HP. Toxicity of platinum compounds [J]. Expert Opin Pharmacother. 2003, 4(6):889-901.
- [3]陈纪藩. 中医药学高级丛书:金匮要略[M]. 北京:人民卫生出版社, 2000:181-183.
- [4]Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, et al. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw[J]. J Neurosci Methods, 1994, 53(1):55-63.
- [5]宿乐洲,张维. 黄芪桂枝五物汤临证新用[J]. 陕西中医药杂志,1999,4(14):38.
- [6]Grothey A. Clinical management of oxaliplatin-associated neurotoxicity[J]. Clin Colorectal Cancer[J]. 2005, 5 (Suppl 1):38-46.
- [7]Wang CX, Shuaib A. NMDA/NR2B selective antagonists in the treatment of ischemic brain injury[J]. Curr Drug Targets CNS Neurol Disord, 2005(4):143-151.
- [8]Williams AJ, Dave JR, Lu XM, et al. Selective NR2B NMDA receptor antagonists are protective against staurosporine-induced apoptosis[J]. Eur J Pharmacol, 2002, 452(1):135-136.
- [9]Wilson JA, Garry EM, Anderson HA, et al. NMDA receptor antagonist treatment at the time of nerve injury prevents injury induced changes in spinal NR1 and NR2B subunit expression and increases the sensitivity of residual pain behaviours to subsequently administered NMDA receptor antagonists[J]. Pain, 2005, 117 (3):421-432.
- [10]Jamieson SM, Subramaniam J, Liu JJ, et al. Oxaliplatin-induced loss of phosphorylated heavy neurofilament subunit in dorsal immunoreactivity in rat DRG tissue [J]. Mol Pain, 2009, (5):66.

(收稿日期:2012-05-11;修回日期:2012-08-28)

[编辑:洪涛]