

· 经典名方 ·

## 附子理中丸通过调节MAPK信号通路改善顺铂诱导CIPN模型小鼠损伤的作用机制

左铮云<sup>1</sup>, 黄艳美<sup>1</sup>, 崔言坤<sup>1</sup>, 王琳<sup>1</sup>, 李永鑫<sup>1</sup>, 刘蕊<sup>1</sup>, 姚风云<sup>2\*</sup>

(1. 江西中医药大学方-证研究中心, 南昌 330004; 2. 江西中医药大学中医学院, 南昌 330004)

**[摘要]** 目的: 基于丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路, 探讨附子理中丸改善顺铂诱导化疗所致周围神经病变(CIPN)模型小鼠损伤的作用机制。方法: KM雌性小鼠40只, 随机分为正常组, 模型组, 附子理中丸组(3.5 g·kg<sup>-1</sup>), 阿司匹林组(0.026 g·kg<sup>-1</sup>)。每日腹腔注射顺铂(3 mg·kg<sup>-1</sup>), 连续5 d, 制备CIPN模型; 造模同时灌胃给予相应药物, 连续12 d。观察其一般情况和行为学表现; 末次给药后取材, 苏木素-伊红(HE)染色观察足掌部皮肤组织病理变化。采用生化检测血清中超氧化物歧化酶(SOD), 过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), 丙二醛(MDA), 一氧化氮(NO)的水平; 采用酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测肾脏组织中白细胞介素-6(IL-6), 白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ), 肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ), 谷胱甘肽过氧化物酶-3(GPX-3)的含量。蛋白免疫印迹法(Western blot)检测肾脏组织中细胞外调节蛋白激酶1/2(ERK1/2)及其磷酸化(p-ERK1/2), p38 MAPK及其磷酸化p38 MAPK(p-p38 MAPK)的表达水平。结果: 与正常组比较, 模型组小鼠足掌部皮肤病理损伤明显, 表皮角化过度呈网篮状结构, 棘层萎缩, 细胞数量减少, 细胞内水肿; 与模型组比较, 附子理中丸组足掌部皮肤组织的病理损伤明显降低。与正常组比较, 模型组小鼠体质量、机械痛阈值、热痛阈值显著下降( $P < 0.01$ ), SOD活性明显降低( $P < 0.05$ ), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, MDA, NO含量显著升高( $P < 0.01$ ), IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ 表达显著升高( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 附子理中丸组小鼠体质量、机械痛阈值、热痛阈值显著升高( $P < 0.01$ ), SOD活性明显升高, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, MDA和NO含量明显降低( $P < 0.05$ ), IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ 表达显著降低( $P < 0.01$ ); 与正常组比较, 模型组ERK1/2, p-ERK1/2, p38 MAPK, p-p38 MAPK蛋白表达显著上升( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 附子理中丸组ERK1/2, p-ERK1/2, p38 MAPK, p-p38 MAPK蛋白表达显著下降( $P < 0.01$ )。结论: 附子理中丸能够改善顺铂诱导CIPN模型小鼠的神经功能损伤, 提高小鼠的疼痛阈值, 其作用机制可能与调节MAPK信号通路, 抑制炎症反应及机体氧化应激水平相关。

**[关键词]** 附子理中丸; 顺铂; 周围神经病变(CIPN); 丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路; 抗炎; 氧化应激

**[中图分类号]** R2-0; R22; R285.5; R289; R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)05-0001-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20220407

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20211220.1437.001.html>

**[网络出版日期]** 2021-12-21 13:27

### Mechanism of Fuzi Lizhongwan Improving Injury in Cisplatin-induced CIPN Mice by Regulating MAPK Signaling Pathway

ZUO Zheng-yun<sup>1</sup>, HUANG Yan-mei<sup>1</sup>, CUI Yan-kun<sup>1</sup>, WANG Lin<sup>1</sup>, LI Yong-xin<sup>1</sup>,  
LIU Rui<sup>1</sup>, YAO Feng-yun<sup>2\*</sup>

(1. Formula-pattern Research Center of Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China;  
2. College of Traditional Chinese Medicine, Jiangxi University of Chinese Medicine,  
Nanchang 330004, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the mechanism of Fuzi Lizhongwan alleviating the damage of

**[收稿日期]** 20210927(016)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(82104725); 江西省教育厅科技重点项目(190623); 江西省中医药科技计划项目(2021B708); 江西省“双一流”学科(中医学)建设资助项目(JXSYLXK-ZHY1051); 江西省中医药中青年骨干人才培养计划项目(赣中医药科教字[2020]2号)

**[第一作者]** 左铮云, 硕士, 教授, 从事方剂作用机理及药效物质基础研究, Tel: 0791-87118923, E-mail: zzy61@163.com

**[通信作者]** \* 姚风云, 博士, 教授, 从事方剂配伍规律与现代研究, Tel: 0791-87118923, E-mail: hrbyayao2000@163.com

chemotherapy-induced peripheral neuropathy (CIPN) mice caused by cisplatin based on mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway. **Method:** A total of 40 female KM mice were randomized into blank group (distilled water, *ig*), model group (distilled water, *ig*), Fuzi Lizhongwan group ( $3.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ , *ig*), and aspirin group ( $0.026 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ , *ig*). Cisplatin ( $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , *ip*, 5 days) was used to induce CIPN in mice. Administration began while modeling and lasted 12 days. The general conditions and behaviors of mice were observed. After the last administration, samples were collected. Pathological changes of the soles were observed based on hematoxylin-eosin (HE) staining. Biochemical assay was employed to determine the levels of serum superoxide dismutase (SOD), hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), malondialdehyde (MDA), and nitric oxide (NO), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) the content of interleukin-6 (IL-6), interleukin- $1\beta$  (IL- $1\beta$ ), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), and glutathione peroxidase-3 (GPX-3) in kidney tissue, and Western blotting the expression of extracellular signal-regulated kinase1/2 (ERK1/2), phosphorylated-ERK1/2 (p-ERK1/2), p38 MAPK, and phosphorylated-p38 MAPK (p-p38 MAPK) in kidney tissue. **Result:** Compared with the blank group, model group demonstrated obvious pathological damage on the soles, hyperkeratosis of the epidermis with a basketweave pattern, atrophy of stratum spinosum, reduction of cells, and intracellular edema. Compared with the model group, Fuzi Lizhongwan significantly alleviated the pathological damage of the skin tissue of the soles. The model group showed lower body weight, mechanical pain threshold, thermal pain threshold ( $P < 0.01$ ), and SOD activity ( $P < 0.05$ ), higher content of  $\text{H}_2\text{O}_2$ , MDA, and NO ( $P < 0.01$ ), and higher expression of IL-6, IL- $1\beta$ , and TNF- $\alpha$  ( $P < 0.01$ ) than the blank group. Fuzi Lizhongwan group demonstrated higher body weight, mechanical pain threshold, thermal pain threshold ( $P < 0.01$ ), and SOD activity ( $P < 0.05$ ), lower content of  $\text{H}_2\text{O}_2$ , MDA, and NO ( $P < 0.05$ ), and lower expression of IL-6, IL- $1\beta$ , and TNF- $\alpha$  ( $P < 0.01$ ) than the model group. The expression of ERK1/2, p-ERK1/2, p38 MAPK, and p-p38 MAPK increased significantly ( $P < 0.01$ ) in the model group compared with that in the blank group, while the expression decreased significantly ( $P < 0.01$ ) in the Fuzi Lizhongwan group compared with that in the model group. **Conclusion:** Fuzi Lizhongwan can relieve the neurological injury of cisplatin-induced CIPN mice and increase the pain threshold of mice, possibly by regulating the MAPK signaling pathway and inhibiting inflammatory response and oxidative stress.

**[Keywords]** Fuzi Lizhongwan; cisplatin; chemotherapy-induced peripheral neuropathy (CIPN); mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway; anti-inflammation; oxidative stress

顺铂(CDDP)是一种含铂的抗癌药物,因其广谱、高效的特点广泛用于治疗非小细胞肺癌<sup>[1]</sup>、睾丸癌<sup>[2]</sup>、卵巢癌<sup>[3]</sup>等实体瘤,其抗肿瘤活性达到60%以上<sup>[4]</sup>。但临床治疗中有30%~40%的患者会出现化疗所致周围神经病变(CIPN),通常表现为各种疼痛症状(热性痛觉超敏反应、机械性痛觉超敏反应和自发性疼痛)、感觉异常和感觉障碍(四肢麻木、刺痛、烧灼感)、疼痛区域神经感觉缺陷(戴袜套或手套样异常感)。由于CIPN患病率与化疗药物的剂量具有依赖关系,会导致化疗药物应用剂量的减少甚至提前停止药物的使用,影响治疗效果的同时增加疾病复发风险并降低患者存活率<sup>[5]</sup>。现代医学对CIPN的发生机制进行了多方探索,认为可能与氧化应激<sup>[6-8]</sup>、线粒体功能障碍<sup>[9-10]</sup>、轴突变性<sup>[11-12]</sup>、胶质细胞活化<sup>[13-14]</sup>、钙稳态受损<sup>[15]</sup>、神经炎症<sup>[16]</sup>和免疫系统激活<sup>[17]</sup>等相关,但其确切的发病机制尚未阐明。

目前,临床缺乏有效治疗并阻止CIPN发生发展的方案。因此,进一步明确CIPN发生的机制,寻找安全有效的防治方法是当前亟需解决的问题。

附子理中丸出自《太平惠民和剂局方》,由附子、党参、干姜、白术、炙甘草组成,具有温阳祛寒,益气健脾的功效。目前,临床研究多集中于治疗肠易激综合征<sup>[18-19]</sup>、溃疡性结肠炎<sup>[20]</sup>、糖尿病<sup>[21]</sup>等病症,限制了该方在临床的广泛应用。前期研究发现,附子理中丸能增强小鼠的耐寒能力,具有明显的镇痛作用,故本实验选用附子理中丸进行干预治疗<sup>[22]</sup>。通过观察附子理中丸对顺铂诱导CIPN模型小鼠的一般情况、行为学表现、足掌部皮肤组织病理改变、血清生化学水平及肾脏组织白细胞介素-6(IL-6),白细胞介素- $1\beta$ (IL- $1\beta$ ),肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ),谷胱甘肽过氧化物酶-3(GPX-3)含量,丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)通路相关蛋白[细胞外

信号调节激酶1/2(ERK1/2), p38 MAPK, 磷酸化(p)-ERK1/2, p-p38 MAPK]表达水平的影响, 探讨其可能的作用机制, 为临床应用附子理中丸防治CIPN提供科学的实验依据。

## 1 材料

**1.1 动物** 健康SPF级KM雌性小鼠, 40只, 体重(18.0±2.0)g, 由江西中医药大学实验动物中心提供, 实验动物合格证号SCXK(赣)2018-0003。此实验开展经江西中医药大学实验动物伦理委员会审查批准(批准号JZLLSC20210051)。

**1.2 药物与试剂** 附子理中丸(仲景宛西制药股份有限公司, 批号191003); 阿司匹林肠溶片(石药集团欧意药业有限公司, 批号2862010052); 顺铂(美国Sigma公司, 批号MKCM2435); 超氧化物歧化酶(SOD), 过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), 丙二醛(MDA), 一氧化氮(NO)试剂盒(南京建成生物工程研究所, 批号分别为20200814, 20200813, 20200812, 20200812); 白细胞介素-6(IL-6), 白细胞介素-1β(IL-1β), 肿瘤坏死因子-α(TNF-α), 谷胱甘肽过氧化物酶-3(GPX-3)酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(武汉云克隆科技股份有限公司, 批号分别为L210413814, L210501723, L210423372, L210423377); ERK1/2, p-ERK1/2, p38 MAPK, p-p38 MAPK, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH), 抗兔免疫球蛋白(Ig)G抗体(美国Cell Signaling Technology公司, 批号分别为4695S, 4370S, 8690S, 4511S, 5174S, 7074S); 蛋白免疫印迹法(Western blot)及IP细胞裂解液, BCA蛋白浓度测定试剂盒(福州飞净生物科技有限公司, 批号分别为20210310, 202110301); PVDF膜(美国Millipore公司, 批号R1BB08550); ECL检测试剂盒(江苏凯基生物技术股份有限公司, 批号21210406); 苏木素, 伊红染液(南昌雨露实验器材有限公司, 批号分别为200901, 201201)。

**1.3 仪器** XRS+型化学发光成像系统(美国Bio-Rad公司); YLS-3E型电子压痛仪(上海玉研科学仪器有限公司); 5430R型高速冷冻离心机(德国Eppendorf公司); SN3001型多功能酶标仪(芬兰Thermo Fisher Scientific公司); EG1150型石蜡包埋机, RM2255型石蜡切片机, DM2000型正置荧光显微镜(德国Leica公司)。

## 2 方法

**2.1 分组与模型制备** 实验动物经适应性饲养7d后, 按体重随机分为4组, 分别为正常组、模型组、附子理中丸组、阿司匹林组, 每组10只。饲养温度

(23±2)℃, 相对湿度60%~70%, 光照和黑暗周期为12h。根据相关文献[23]及本课题组前期研究, 通过小鼠腹腔注射顺铂3mg·kg<sup>-1</sup>, 每天1次, 连续注射5d, 累积剂量15mg·kg<sup>-1</sup>, 制备顺铂CIPN小鼠模型; 同时, 正常组小鼠腹腔注射等体积生理盐水。

**2.2 药物制备方法** 根据小鼠与人体表面积等效剂量换算系数计算, 将附子理中丸研磨成细粉状后, 加入1.5倍蒸馏水煎煮, 配制成0.35g·mL<sup>-1</sup>的混悬液, 4℃保存备用, 每次使用前取相应剂量温水浴加热至37℃; 阿司匹林组: 取阿司匹林肠溶片1片, 加温开水38mL溶解, 现用现配。

**2.3 给药方法** 于每天上午9h灌胃给予相应药物1次, 附子理中丸组3.5g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>, 阿司匹林组0.026g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>, 正常组与模型组给予相同体积的蒸馏水, 给药体积为10mL·kg<sup>-1</sup>, 连续给药10d。

**2.4 一般情况观察** 观察小鼠的精神状态、活动情况、毛发色泽及脱落情况、体质量、进食量及饮水量变化等。

### 2.5 行为学检测

**2.5.1 机械痛阈值测定** 将小鼠固定在电子压痛仪透明有机玻璃罩内, 在小鼠尾部后1/3处施加压力, 以小鼠发出痛苦嘶叫做为量化伤害性阈值的参数, 测试2次, 2次间隔30min以上, 以2次平均值代表其痛阈值。

**2.5.2 热痛阈值测定** 将烧杯置于恒温水槽中加热至温度恒定在55℃后, 将小鼠置于烧杯内, 秒表记录小鼠舔后爪的行为反应时间, 60s及以上记为60s, 测试2次, 2次刺激间隔30min以上, 以2次平均值代表其热痛阈值。

**2.6 标本采集与处理** 各组动物末次给药后, 禁食不禁水12h, 称体质量, 通过摘取眼球取血, 将采集的血液经4℃条件下3500r·min<sup>-1</sup>离心15min(离心半径8.8cm), 收集血清后保存于-20℃冰箱中备用。分离肾脏后剥去包膜, 置于液氮中保存备用。

**2.7 足掌部皮肤组织病理学观察** 足掌部皮肤置于4%多聚甲醛固定后, 经乙醇梯度脱水后进行石蜡包埋, 切成片厚4μm的皮肤组织进行苏木素-伊红(HE)染色, 显微镜下观察足掌部皮肤组织病理变化。

**2.8 血清SOD, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, MDA, NO的含量检测** 严格按照试剂盒说明书使用微板法检测血清中SOD, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, MDA, NO的含量。

**2.9 肾脏组织中IL-6, IL-1β, TNF-α, GPX-3的含量检测** 取肾脏组织制备为浓度10%的肾脏组织

匀浆,按照ELISA试剂盒说明书测量肾脏组织中IL-6,IL-1 $\beta$ ,TNF- $\alpha$ ,GPX-3的含量。

**2.10 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测肾脏组织中ERK1/2,p-ERK1/2,p38 MAPK,p-p38 MAPK的蛋白表达水平** 取肾脏组织制备总蛋白样品,取蛋白30  $\mu$ g电泳分离后转印至PVDF膜,室温封闭后加一抗(ERK1/2,p38 MAPK,p-p38 MAPK,GAPDH 1:1 000;p-ERK1/2 1:2 000)孵育,加入二抗(1:2 000)孵育,化学发光法显影。采用Image lab图像分析软件,以目的蛋白灰度值与GAPDH灰度值的比值表示该样品的目的蛋白相对含量。

**2.11 统计学分析** 采用SPSS 20.0软件,计量资料数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表1 附子理中丸对CIPN模型小鼠体质量的影响( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Table 1 Effect of Fuzi Lizhongwan on body weight of CIPN model mice ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	体质量/g						
		第0天	第2天	第4天	第6天	第8天	第10天	第12天
正常		21.86 $\pm$ 1.82	22.70 $\pm$ 1.92	23.73 $\pm$ 1.68	24.34 $\pm$ 0.26	25.54 $\pm$ 3.15	26.82 $\pm$ 3.28	27.29 $\pm$ 3.28
模型		21.51 $\pm$ 1.23	20.43 $\pm$ 0.79 <sup>2)</sup>	19.21 $\pm$ 0.95 <sup>2)</sup>	18.26 $\pm$ 0.81 <sup>2)</sup>	17.42 $\pm$ 1.14 <sup>2)</sup>	17.68 $\pm$ 1.26 <sup>2)</sup>	18.20 $\pm$ 1.12 <sup>2)</sup>
附子理中丸	3.5	21.69 $\pm$ 1.25	21.32 $\pm$ 1.02 <sup>3)</sup>	20.47 $\pm$ 0.78 <sup>4)</sup>	19.68 $\pm$ 0.45 <sup>4)</sup>	18.70 $\pm$ 0.49 <sup>3)</sup>	19.32 $\pm$ 0.83 <sup>4)</sup>	20.02 $\pm$ 1.19 <sup>3)</sup>
阿司匹林	0.026	21.64 $\pm$ 1.38	20.59 $\pm$ 1.02	19.57 $\pm$ 1.00	18.53 $\pm$ 0.87	17.81 $\pm$ 0.89	18.43 $\pm$ 0.79	19.04 $\pm$ 0.59

注:与正常组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup> $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>3)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>4)</sup> $P < 0.01$ (表2~6同)。

**3.3 对CIPN模型小鼠机械痛阈值的影响** 与正常组比较,模型组小鼠机械痛阈值显著下降( $P < 0.01$ );与模型组比较,附子理中丸组小鼠机械痛阈值显著升高( $P < 0.01$ )。见表2。

表2 附子理中丸对CIPN模型小鼠机械痛阈值的影响( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Table 2 Effect of Fuzi Lizhongwan on threshold of mechanical pain in CIPN model mice ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	机械痛阈值
正常		908.70 $\pm$ 180.57
模型		547.92 $\pm$ 95.46 <sup>2)</sup>
附子理中丸	3.5	721.01 $\pm$ 150.70 <sup>4)</sup>
阿司匹林	0.026	750.86 $\pm$ 160.11 <sup>4)</sup>

**3.4 对CIPN模型小鼠热痛阈值的影响** 与正常组比较,模型组小鼠第5天,第10天热痛阈值显著降低( $P < 0.01$ );与模型组比较,附子理中丸组第5天,第10天热痛阈值显著升高( $P < 0.01$ )。见表3。

**3.5 对CIPN模型小鼠血清生化学的影响** 与正常组比较,模型组SOD活性明显降低( $P < 0.05$ ),H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,MDA,NO活性显著升高( $P < 0.01$ );与模型组比较,附子理中丸组能够明显提高SOD活力( $P < 0.05$ ),

### 3 结果

**3.1 各组小鼠一般状态观察** 正常组小鼠精神状态良好,饮食正常,活动灵敏,毛发有光泽且脱落正常;与正常组相比,模型组小鼠精神萎靡,食欲下降,活动迟缓,弓背蜷缩抱团,饮水减少,毛发晦暗无光泽且大量脱落;与模型组比较,附子理中丸组及阿司匹林组精神状态、饮食、活动情况和毛发情况有明显改善。

**3.2 对CIPN模型小鼠体质量的影响** 与正常组比较,注射顺铂第2天后模型组体质量呈下降趋势,差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),初步证实CIPN模型建立成功。与模型组比较,给药第2天后,附子理中丸组体质量明显升高,差异有统计学意义( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见表1。

表3 附子理中丸对CIPN模型小鼠热痛阈值的影响( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Table 3 Effect of Fuzi Lizhongwan on heat pain threshold in CIPN model mice ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	热痛阈值/s		
		第0天	第5天	第10天
正常		44.67 $\pm$ 8.70	50.40 $\pm$ 11.07	49.90 $\pm$ 7.94
模型		43.75 $\pm$ 9.83	21.00 $\pm$ 8.88 <sup>2)</sup>	25.20 $\pm$ 5.69 <sup>2)</sup>
附子理中丸	3.5	44.56 $\pm$ 10.35	32.27 $\pm$ 10.66 <sup>3)</sup>	37.20 $\pm$ 5.43 <sup>4)</sup>
阿司匹林	0.026	44.67 $\pm$ 8.27	46.17 $\pm$ 8.09 <sup>4)</sup>	47.60 $\pm$ 4.93 <sup>4)</sup>

明显降低H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,MDA和NO活性( $P < 0.05$ ),差异有明显统计学意义。见表4。

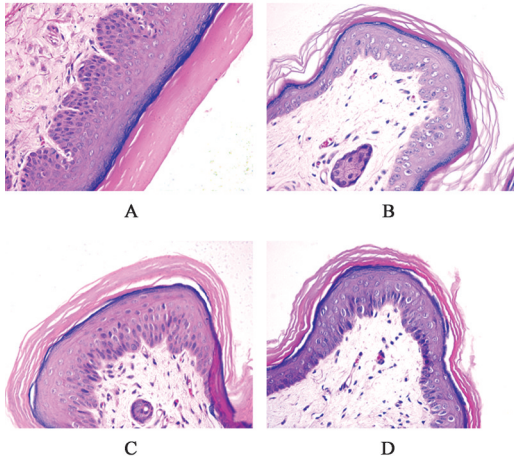
**3.6 对CIPN模型小鼠足掌部皮肤组织病理变化的影响** 正常组小鼠表皮结构正常,细胞排列规则,细胞内无水肿。与正常组比较,模型组小鼠足掌部皮肤病理损伤明显,角化过度表皮呈网篮状结构,颗粒层减少,棘层萎缩,细胞排列紊乱,数量减少,细胞内水肿;与模型组比较,附子理中丸组小鼠足掌部皮肤组织病理损伤明显降低。见图1。

**3.7 对CIPN模型小鼠肾组织匀浆IL-6,IL-1 $\beta$ ,TNF- $\alpha$ ,GPX-3水平的影响** 与正常组比较,模型组

表 4 附子理中丸对 CIPN 模型小鼠血清 SOD, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, MDA, NO 水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Table 4 Effect of Fuzi Lizhongwan on serum SOD, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, MDA and NO levels in CIPN model mice ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	SOD/U·mL <sup>-1</sup>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /mmol·L <sup>-1</sup>	MDA/μmol·L <sup>-1</sup>	NO/μmol·L <sup>-1</sup>
正常		206.79±28.71	160.78±16.82	10.87±1.40	109.29±4.45
模型		181.01±12.20 <sup>1)</sup>	188.92±12.86 <sup>2)</sup>	13.08±1.15 <sup>2)</sup>	121.70±7.52 <sup>2)</sup>
附子理中丸	3.5	198.20±16.13 <sup>3)</sup>	169.93±15.06 <sup>3)</sup>	11.64±0.56 <sup>3)</sup>	108.95±10.97 <sup>3)</sup>
阿司匹林	0.026	204.10±14.52 <sup>4)</sup>	178.18±24.75	11.57±0.57 <sup>4)</sup>	120.15±4.07



A. 正常组; B. 模型组; C. 附子理中丸组; D. 阿司匹林组(图 2 同)  
图 1 附子理中丸对 CIPN 模型小鼠足掌部皮肤组织病理变化的影响(HE, ×400)

Fig. 1 Effect of Fuzi Lizhongwan on pathological changes of skin of feet of CIPN model mice (HE, ×400)

IL-6, IL-1β, TNF-α 水平显著升高 ( $P < 0.01$ ), GPX-3 水平有降低趋势; 与模型组比较, 附子理中丸组显著降低 IL-6, IL-1β, TNF-α 水平 ( $P < 0.01$ ), 升高 GPX-3 水平。见表 5。

表 5 附子理中丸对 CIPN 模型小鼠肾组织匀浆 IL-6, IL-1β, TNF-α, GPX-3 水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Table 5 Effect of Fuzi Lizhongwan on expression of IL-6, IL-1β, TNF-α, GPX-3 in kidney homogenate of CIPN model mice ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	IL-6/ng·L <sup>-1</sup>	IL-1β/ng·L <sup>-1</sup>	TNF-α/ng·L <sup>-1</sup>	GPX-3/μg·L <sup>-1</sup>
正常		119.69±18.15	199.34±50.28	127.91±17.00	12.29±4.95
模型		207.75±26.23 <sup>2)</sup>	294.31±47.01 <sup>2)</sup>	164.91±14.61 <sup>2)</sup>	9.46±1.91
附子理中丸	3.5	132.54±22.36 <sup>4)</sup>	205.48±41.69 <sup>4)</sup>	129.56±18.92 <sup>4)</sup>	12.17±3.71
阿司匹林	0.026	151.71±22.93 <sup>4)</sup>	215.82±47.47 <sup>4)</sup>	124.30±17.81 <sup>4)</sup>	10.32±2.57

表 6 附子理中丸对 CIPN 模型小鼠肾脏组织中 ERK1/2, p-ERK1/2, p38 MAPK, p-p38 MAPK 蛋白表达水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

Table 6 Effect of Fuzi Lizhongwan on expression levels of ERK1/2, p-ERK1/2, p38 MAPK and p-p38 MAPK proteins in kidney tissue of CIPN model mice ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	ERK1/2/GAPDH	p38 MAPK/GAPDH	p-ERK1/2/GAPDH	p-p38 MAPK/GAPDH
正常		0.73±0.19	0.81±0.11	0.56±0.14	0.51±0.09
模型		1.05±0.19 <sup>2)</sup>	1.36±0.14 <sup>2)</sup>	0.97±0.11 <sup>2)</sup>	0.90±0.17 <sup>2)</sup>
附子理中丸	3.5	0.76±0.11 <sup>4)</sup>	0.89±0.12 <sup>4)</sup>	0.70±0.12 <sup>4)</sup>	0.66±0.10 <sup>4)</sup>
阿司匹林	0.026	0.92±0.23	0.91±0.12 <sup>4)</sup>	0.83±0.12	0.82±0.12

3.8 对 CIPN 模型小鼠肾脏组织中 ERK1/2, p-ERK1/2, p38 MAPK, p-p38 MAPK 蛋白表达水平的影响 与正常组比较, 模型组 ERK1/2, p-ERK1/2, p38 MAPK, p-p38 MAPK 蛋白表达水平显著升高 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 附子理中丸组 ERK1/2, p-ERK1/2, p38 MAPK, p-p38 MAPK 的蛋白表达水平显著降低 ( $P < 0.01$ )。见图 2, 表 6。

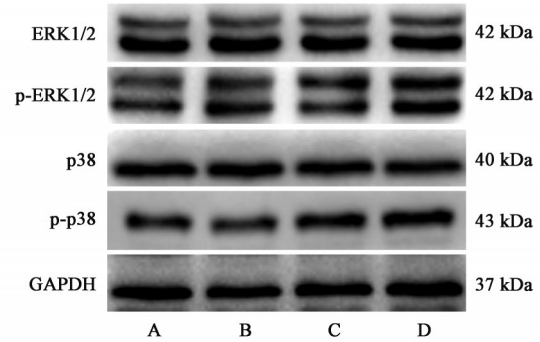


图 2 各组小鼠肾脏组织中 ERK1/2, p-ERK1/2, p38 MAPK, p-p38 MAPK 蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of ERK1/2, p-ERK1/2, p38 MAPK and p-p38 MAPK protein expression in kidney tissue of each group mice

#### 4 讨论

《黄帝内经·灵枢·百病始生篇》云：“积之始生，得寒乃生，厥乃成积也”，意指肿瘤的生长乃人体长期阳气不足、脏腑失衡，阴寒积聚所致。《脾胃论·脾胃虚实传变论》曰：“元气之充足，皆由脾胃之气无所伤，而后能滋养元气”，提示化疗后患者机体所受到的不可逆损伤需固护中焦脾胃之气，扶养人体之正气，以补助攻，达到提高患者生存质量的目的。附子理中丸方中附子为君温肾暖脾、补火助阳，配以干姜温运中阳，党参味甘性平、补中益气，白术苦温、健脾燥湿，佐以炙甘草补中扶正，缓急止痛，调和诸药；五药相配，共奏温阳祛寒，益气健脾之功。

本研究采用顺铂制备CIPN小鼠模型，观测附子理中丸对小鼠一般情况以及行为学表现的影响，行为学指标尤其是机械性痛阈降低是评价CIPN最常用的指标之一。本研究发现随着给药时间的增长，附子理中丸能缓解小鼠体质量降低的趋势，并且可提高CIPN模型小鼠耐疼痛阈值，说明附子理中丸在改善CIPN疼痛方面具有良好效果。

氧化应激是指机体致氧化程度超过对氧化物清除能力，造成抗氧化系统失衡从而导致组织损伤的过程<sup>[8]</sup>，现阶段化疗诱导线粒体功能障碍和相应的氧化应激导致的CIPN被广泛关注<sup>[24]</sup>。SOD和GPX-3是具有还原活性的催化酶，能够通过还原反应来清除氧自由基，起到保护机体免受氧化应激损伤的作用<sup>[25]</sup>。MDA、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>和NO是氧自由基攻击机体发生氧化反应的产物，能够反映氧化应激的损伤程度。本研究结果表明，附子理中丸给药治疗不仅能降低H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、MDA和NO的含量，抑制脂质过氧化，还能提高SOD、GPX-3的含量。

研究表明，疼痛的发生可能是由于促炎细胞因子改变伤害感受器的活性，从而导致疼痛超敏反应<sup>[26]</sup>。IL-6是炎症反应中重要的细胞因子，一方面可以活化T淋巴细胞，促进炎症的发生，另一方面可以促使B细胞产生抗体，在肿瘤的发生发展中发挥了重要作用<sup>[27]</sup>。有研究报道<sup>[13]</sup>，化疗药物可能通过活化星形胶质细胞，促使释放炎症因子TNF- $\alpha$ 和IL-1 $\beta$ ，导致神经病理性疼痛的产生。由此推测，附子理中丸可能是通过抑制胶质细胞活化、下调炎症介质而发挥治疗作用。

MAPK由ERK、p38 MAPK和c-Jun氨基末端激酶(JNK)组成。有研究表明<sup>[28-29]</sup>，MAPK的激活会表现为大脑前皮质神经元的增加，加重慢性炎症和神经病理性疼痛啮齿动物模型中的痛觉过敏和超

敏反应。受到生长因子、病毒感染和致癌物质的刺激后周围神经功能受到损伤，将导致ERK在胶质细胞中被激活变成p-ERK，致使促炎或促炎介质合成从而增强或延长疼痛<sup>[30]</sup>。p38 MAPK通常由细胞应激和促炎因子激活变成p-p38 MAPK，并通过转录调节促进神经病理性和炎症疼痛的发展<sup>[31-32]</sup>。由此推测，附子理中丸可能通过抑制MAPK信号通路，降低炎症因子的表达，从而缓解CIPN的疼痛。

综上，附子理中丸能够降低血清H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、MDA和NO的水平，抑制肾脏组织IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 及MAPK通路ERK1/2、p-ERK1/2、p38 MAPK、p-p38 MAPK蛋白表达，改善血清SOD、肾脏组织GPX-3的水平，减轻机体氧化应激反应，有效缓解CIPN症状，降低不良反应发生率。由此推断，附子理中丸对CIPN的治疗作用可能与抑制MAPK信号通路、下调炎症介质、清除氧自由基有关，这为扩大附子理中丸在临床中的应用以及进一步研究提供了数据支撑。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] 丁燕,南娟,刘谦,等. 美国临床肿瘤学会IV期非小细胞肺癌化疗的临床实践指南更新[J]. 中国肺癌杂志, 2010, 13(3): 171-189.
- [2] 李涛,张延榕,高祥勋,等. 2008年欧洲泌尿外科学会睾丸癌诊治指南南编译整理[J]. 中华男科学杂志, 2009, 15(12): 1142-1147.
- [3] LEDERMANN J A, RAJA F A, FOTOPOULOU C, et al. Newly diagnosed and relapsed epithelial ovarian carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up [J]. Ann Oncol, 2013, 24(6): i24-i32.
- [4] 朱珊珊,陈鑫,颜巧妍,等. 抗肿瘤药物的临床应用进展[J]. 中国现代医生, 2019, 57(9): 164-168.
- [5] KIM E. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: bench to clinical practice [J]. Korean J Pain, 2020, 33(4): 291-293.
- [6] MA J, KAVELAARS A, DOUGHERTY P M, et al. Beyond symptomatic relief for chemotherapy-induced peripheral neuropathy: targeting the source [J]. Cancer, 2018, 124(11): 2289-2298.
- [7] ELDRIDGE S, GUO L, HAMRE J. A comparative review of chemotherapy-induced peripheral neuropathy *in vivo* and *in vitro* models [J]. Toxicol Pathol, 2020, 48(1): 190-201.
- [8] 王永闯,肖兴军. 氧化应激在周围神经病变发病机制中的作用[J]. 卒中与神经疾病, 2016, 23(1): 73-

- 74, 封3.
- [ 9 ] CHEN Y F, CHEN L H, YE H Y M, et al. Minoxidil is a potential neuroprotective drug for paclitaxel-induced peripheral neuropathy[J]. *Sci Rep*, 2017, 7:45366.
- [ 10 ] JIA M, WU C, GAO F, et al. Activation of NLRP3 inflammasome in peripheral nerve contributes to paclitaxel-induced neuropathic pain [J]. *Mol Pain*, 2017, 13:1744806917719804.
- [ 11 ] OGIHARA T, NAKAGAWA T, HAYASHI M, et al. Improvement of peripheral vascular impairment by a phosphodiesterase type 5 inhibitor tadalafil prevents oxaliplatin-induced peripheral neuropathy in mice[J]. *J Pharmacol Sci*, 2019, 141(4):131-138.
- [ 12 ] MALACRIDA A, MEREGALLI C, RODRIGUEZ-MENENDEZ V, et al. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy and changes in cytoskeleton[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(9):2287.
- [ 13 ] 魏丹萌. 小胶质细胞和星形胶质细胞参与神经病理性痛和慢性炎性痛的机制[J]. *中国疼痛医学杂志*, 2013(3):176.
- [ 14 ] SINGHMAR P, HUO X, LI Y, et al. Orally active Epac inhibitor reverses mechanical allodynia and loss of intraepidermal nerve fibers in a mouse model of chemotherapy-induced peripheral neuropathy[J]. *Pain*, 2018, 159(5):884-893.
- [ 15 ] CHINE V B, AU N P B, KUMAR G, et al. Targeting axon integrity to prevent chemotherapy-induced peripheral neuropathy [J]. *Mol Neurobiol*, 2019, 56(5):3244-3259.
- [ 16 ] MARUTA T, NEMOTO T, HIDAKA K, et al. Upregulation of ERK phosphorylation in rat dorsal root ganglion neurons contributes to oxaliplatin-induced chronic neuropathic pain[J]. *PLoS One*, 2019, 14(11): e0225586.
- [ 17 ] GUO R, CHEN L H, XING C, et al. Pain regulation by gut microbiota: molecular mechanisms and therapeutic potential[J]. *Br J Anaesth*, 2019, 123(5):637-654.
- [ 18 ] 林夏, 黄友, 杨莎莎, 等. 高通量测序技术研究附子理中丸对脾阳虚 IBS-D 大鼠肠道菌群的影响[J]. *南京中医药大学学报*, 2021, 37(3):388-395.
- [ 19 ] 郑超伟, 李建锋, 刘礼剑, 等. 附子理中丸联合当归生姜羊肉汤治疗脾肾阳虚证腹泻型肠易激综合征临床观察[J]. *中国中西医结合消化杂志*, 2019, 27(3):175-178.
- [ 20 ] 黄友, 杨莎莎, 林夏, 等. 基于网络药理-分子对接研究附子理中丸治疗溃疡性结肠炎的作用机制[J]. *药*
- 学学报, 2020, 55(8):1812-1822.
- [ 21 ] 李景花, 刘建涛, 张自强, 等. 附子理中丸和真武汤加减联合治疗糖尿病肾病脾肾阳虚证的临床研究[J]. *辽宁中医杂志*, 2020, 47(5):135-137.
- [ 22 ] 李东安, 王普民, 贾冬, 等. 附子理中丸的药理作用研究[J]. *中成药*, 1990(5):25-26.
- [ 23 ] KOZIOL J A, FALLS T J, SCHNITZER J E. Impact of cisplatin dosing regimens on mammary tumor growth in an animal model[J]. *Arch Cancer Biol Ther*, 2020, 1(1):18-21.
- [ 24 ] ARETI A, YERRA V G, NAIDU V, et al. Oxidative stress and nerve damage: role in chemotherapy induced peripheral neuropathy [J]. *Redox Biol*, 2014, 2:289-295.
- [ 25 ] SILVA F B, ROMERO W G, CARVALHO A, et al. Effects of treatment with chemotherapy and/or tamoxifen on the biomarkers of cardiac injury and oxidative stress in women with breast cancer [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2017, 96(47):e8723.
- [ 26 ] REYES-GIBBY C C, WANG J, YEUNG S J, et al. Informative gene network for chemotherapy-induced peripheral neuropathy[J]. *BioData Min*, 2015, 8:24.
- [ 27 ] 蔡蕾. 二甲双胍通过下调IL-6改善卵巢癌顺铂耐药的作用机制研究[D]. 郑州:郑州大学, 2020.
- [ 28 ] MENG J, ZHANG Q, YANG C, et al. Duloxetine, a balanced serotonin-norepinephrine reuptake inhibitor, improves painful chemotherapy-induced peripheral neuropathy by inhibiting activation of p38 MAPK and NF- $\kappa$ B[J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10:365.
- [ 29 ] INYANG K E, MCDUGAL T A, RAMIREZ E D, et al. Alleviation of paclitaxel-induced mechanical hypersensitivity and hyperalgesic priming with AMPK activators in male and female mice[J]. *Neurobiol Pain*, 2019, 6:100037.
- [ 30 ] JI R R, GEREAU R W, MALCANGIO M, et al. MAP kinase and pain [J]. *Brain Res Rev*, 2009, 60(1):135-148.
- [ 31 ] 韦琳, 宗伟, 曾庆鸿, 等. 花椒抗炎镇痛网络药理学分析及实验验证研究[J]. *中国中药杂志*, 2021, 46(12):3034-3042.
- [ 32 ] LI Y, ZHANG H, KOSTURAKIS A K, et al. MAPK signaling downstream to TLR4 contributes to paclitaxel-induced peripheral neuropathy [J]. *Brain, Behavior, and Immunity*, 2015, 49:255-266.

[责任编辑 周冰冰]