·论著·

杜仲多糖对慢性吗啡耐受小鼠的影响及机制研究

江增宏　徐飞飞　周民举

【摘要】 **目的**　考察杜仲多糖(EOP)对慢性吗啡耐受小鼠镇痛作用的影响并探索其可能的机制。**方法**　采用水浴甩尾法测定不同剂量 EOP 对吗啡耐受小鼠痛阈的影响;实时荧光定量核酸扩增技术检测白介素-1β(IL-1β)、白介素-6(IL-6)和肿瘤坏死因子-α(TNF-α)水平。**结果**　中、高剂量的 EOP 能够明显抑制慢性吗啡耐受的进展($P<0.05$);EOP 中、高剂量给药组能够明显抑制慢性吗啡耐受小鼠脊髓水平炎症因子 IL-1β 和 IL-6 mRNA 的表达($P<0.05$),EOP 三个剂量给药组均能明显抑制慢性吗啡耐受小鼠脊髓水平 TNF-α mRNA 的表达($P<0.05$)。**结论**　杜仲多糖能够抑制慢性吗啡耐受的进展,可能是通过抑制脊髓的炎症因子 IL-1β、IL-6 以及 TNF-α 的表达发挥镇痛作用。

【关键词】 杜仲多糖;　吗啡耐受;　镇痛;　机制

[中图分类号]R965　[文献标识码]A　DOI:10.3969/j.issn.1002-1256.2019.17.003

吗啡作为最有效的镇痛药物之一,用于治疗不同类型的急慢性疼痛。长期的临床实践证明,吗啡具有耐受性,使其应用受到限制。吗啡耐受的作用机制涉及很多方面,其中胶质细胞的作用及其分泌分子,特别是促炎症因子,在吗啡耐受的发展以及吗啡戒断诱导的痛觉过敏中发挥着重要作用[1-2]。大鼠慢性吗啡耐受模型的脊髓水平能够观察到胶质细胞的激活以及促炎症性因子的增强[3],抑制胶质细胞的活化或减少促炎症因子水平,IL-1β、IL-6 以及 TNF-α 能够减轻吗啡耐受的发展[2,4]。阿片类药物与细胞因子之间存在明显的相互作用,吗啡能够增强巨噬细胞和小胶质细胞释放的炎症因子[5]。研究表明,无论是中枢还是外周给予 IL-1β、IL-6 以及 TNF-α 都能诱发动物痛觉过敏[2]。此外,给予炎症因子抑制剂或基因敲出炎症因子手段均能缓解痛觉过敏[6]。杜仲多糖为来源于杜仲提取的一种多糖成分,已发现其具有提高免疫力、降低血糖、抗肿瘤、抗炎镇痛等现代药理学活性[7-10]。因此,本文提取杜仲多糖探索其对慢性吗啡耐受发展的作用,并探索其可能的机制研究。

一、材料与方法

1.实验动物与分组:健康清洁级 ICR 小鼠(雄性),体重(20±2)g,购于安徽省安徽医科大学动物中心。随机将小鼠分成空白组、模型组、模型+EOP 给药组,模型+EOP 给药组又分别分为低剂量组、中剂量组和高剂量组,给药剂量分别为 20 mg/kg、40 mg/kg和 80 mg/kg。EOP 来自本院天然药化实验室(采用水提醇沉法提取,含量 54.23%),吗啡(沈阳第一制药厂)。

2.慢性吗啡耐受试验和痛阈测定:慢性吗啡耐受模型:采用皮下注射,剂量为 10 mg/kg,一天 1 次,连续 7 天;模型+EOP 给药组:每天吗啡给药前 15 分钟腹腔注射不同剂量的 EOP;空白组:每天同等体积的生理盐水腹腔注射。实验前和给药后半小时将小鼠尾浸入恒温水浴中,水温(52±0.5)℃,浸入深度 1.5~3 cm。从小鼠尾浸入水中开始计时,到出现甩尾结束,这段时间作为甩尾反应潜伏期(Tail flick latency,TFL),为了防止组织损伤,以 10 秒为界限,即若小鼠超过 10 秒未出现甩尾,那么记录 TFL 为 10 秒。统计用最大效应百分数表示(MPE):MPE=(给药后 TFL-给药前 TFL)/(10-给药前 TFL)×100%。

3.小鼠脊髓的各炎症因子测定:连续给药 7 天,第 7 天吗啡给药后半小时,水合氯醛深度麻醉后,取小鼠脊髓 L4-L6,提取总 RNA。DNasel 处理总 RNA 后,进行定量 PCR。采用 TaKaRa PrimeScript 试剂盒的 SYBR Green Assay 进行逆转录。引物序列见表 1。

表 1　小鼠脊髓的各炎症因子的引物序列

炎症因子	引物序列
IL-1β	正:5'-TCATTGTGGCTGTGGAGAAG-3'
	反:5'-AGGCCACAGGTATTTTGTCG-3'
IL-6	正:5'-ATCCAGTTGCCTTCTTGGGACTGA-3'
	反:5'-TAAGCCTCCGACTTGTGAAGTGGT-3'
TNF-α	正:5'-CATCTTCTCAAAATTCGAGTGACAA-3'
	反:5'-TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC-3'

4.统计学处理:采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析,计量资料以($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较进行 t 检验,$P<0.05$表示组间差异具有统计学意义。

基金项目:合肥职业技术学院自然科学重点项目(201714KJA011)

作者单位:238000 安徽合肥,合肥职业技术学院(江增宏、徐飞飞),238000 安徽合肥,巢湖市中医院(周民举)

通信作者:江增宏,Email:jiangzengh@126.com

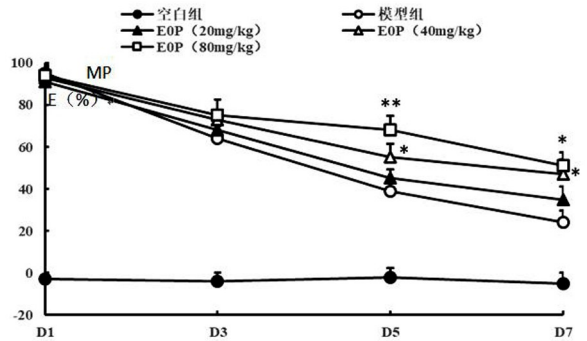
二、结果

1.不同剂量 EOP 对慢性吗啡耐受的影响:如图 1 所示,与空白组相比,模型组吗啡给药后,随着时间的推移,其镇痛作用慢慢降低。与吗啡给药模型组相比,不同剂量的 EOP 预处理能够抑制吗啡镇痛耐受的进程,且具有剂量依赖性,高剂量组(80 mg/kg)作用最为显著。

2.不同剂量 EOP 对慢性吗啡耐受小鼠脊髓水平的 IL-1β、IL-6 和 TNF-α mRNA 表达的影响:慢性吗啡耐受小鼠脊髓的 IL-1β、IL-6 和 TNF-α mRNA 表达水平与空白组比较,明显升高($P<0.05$),详见图 2A、2B、2C。EOP 对小鼠脊髓 IL-1β、IL-6 和 TNF-α mRNA 表达的抑制作用与模型组进行比较,具有剂量性。中、高剂量组的 EOP 均能明显抑制小鼠脊髓 IL-1β、IL-6 mRNA 的表达(见图 2A、2B),而对于慢性吗啡耐受小鼠脊髓 TNF-α mRNA 的表达,除了中、高剂量 EOP 给药组,低剂量给药组也具有明显的抑制作用。

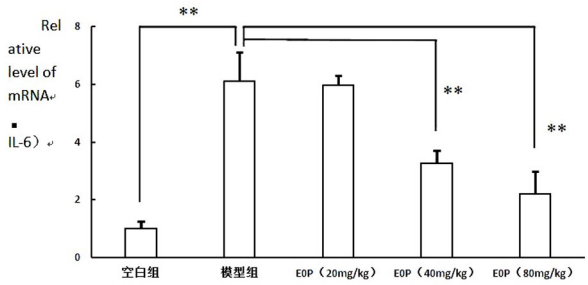
讨论　杜仲皮作为常用中药,具有补中益气、强健筋骨的功效。近年来,有研究发现杜仲不仅具有抗肿瘤、增强免疫、抗炎作用[7-9],还有镇痛作用[10]。研究表明,痛觉过敏与吗啡耐受作用机制具有相似的细胞和分子机制,两者之间有着不可切割的联系[11]。因此,本研究探讨了杜仲多糖对慢性吗啡耐受镇痛作用的影响,与杜仲多糖对慢性疼痛的影响一致,其对慢性吗啡耐受的进展具有抑制作用(见图 1)。可见,杜仲多糖可能作为延缓慢性吗啡耐受进展的有效药物。

目前,吗啡依然是临床上用于治疗急慢性疼痛的常用药物,但吗啡的耐受性越来越引起临床工作者的注意。有研究表明[6],痛觉易化系统、胶质细胞活化、以及胶质细胞活化后释放的促炎症因子和细胞因子都参与了吗啡耐受性过程。已经证实脊髓炎症因子和细胞因子能够抑制吗啡镇痛作用,最终导致机械学诱发痛和热痛觉超敏的形成[11]。但是研究证实,在慢性吗啡鞘内注射而不是急性吗啡鞘内注射模型中,脊髓水平的 IL-1β、IL-6 和 TNF-α mRNA 表达明显上调。本文的实验结果一致,在慢性吗啡给药的小鼠模型中,脊髓的 IL-1β、IL-6 和 TNF-α mRNA 水平均明显上调($P<0.05$)。此外,杜仲多糖不同剂量腹腔给药能够抑制脊髓 IL-1βIL-6 和 TNF-α mRNA 的表达发挥其抑制吗啡耐受作用。因此,本研究证实,杜仲多糖发挥吗啡耐受抑制作用可能与抑制脊髓促炎症因子和细胞因子的释放有关,但其具体机制仍需要进一步研究探索。



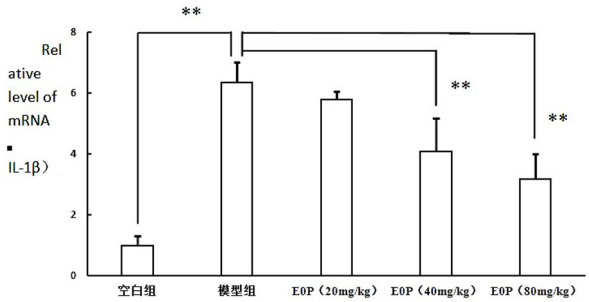
注:　与模型组相比,* $P<0.05$;** $P<0.01$

图 1　不同剂量 EOP 抑制慢性吗啡耐受的进展



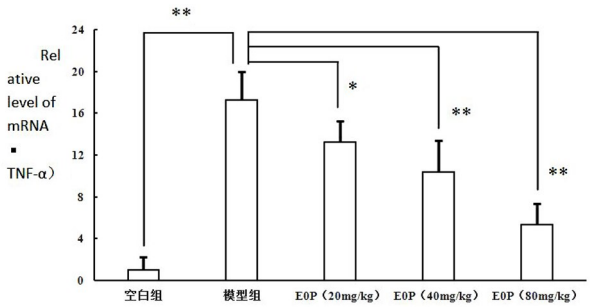
注:　** $P<0.01$

图 2A　不同剂量 EOP 对验证因子 IL-6 mRNA 表达的影响情况



注:　** $P<0.01$

图 2B　不同剂量 EOP 对验证因子 IL-1β mRNA 表达的影响情况



注:　* $P<0.05$;** $P<0.01$

图 2C　不同剂量 EOP 对验证因子 TNF-α mRNA 表达的影响情况

参　考　文　献

[1]　Song P,Zhao ZQ.The involvement of glial cells in the development of morphine tolerance[J].Neurosci Res,2001,39(3):281-286.

[2]　Raghavendra V,Tanga FY,DeLeo JA. Attenuation of morphine tolerance, withdrawal-induced hyperalgesia,and associated spinal

inflammatory immune responses by propentofylline in rats[J]. Neuropsychopharmacology,2004,29(2):327.
[3] Raghavendra V, Rutkowski MD, DeLeo JA. The role of spinal neuroimmune activation in morphine tolerance/hyperalgesia in neuropathic and sham-operated rats[J]. J Neurosci, 2002, 22(22):9980-9989.
[4] Johnston I,Chacur M,O'Dell K,et al.Role of glial interleukin 1 in morphine analgesia and analgesic tolerance[J]. J Pain, 2003, 4(Suppl 1):52.
[5] Ossipov MH, Lai J, Vanderah TW, et al. Induction of pain facilitation by sustained opioid exposure: relationship to opioid antinociceptive tolerance[J].Life Sci,2003,73(6):783-800.
[6] VHutchinson MR, Coats BD, Lewis SS, et al. Proinflammatory cytokines oppose opioid-induced acute and chronic analgesia[J]. Brain Behav Immun,2008,22(8):1178-1189.
[7] 辛晓明,王大伟,王远丽,等.杜仲多糖镇痛作用研究[J]. 现代中西医结合杂志,2009,18(5):487-488.
[8] 徐贤柱,饶华,蔡险峰,等.杜仲叶多糖提取及对小鼠免疫功能影响研究[J].时珍国医国药,2013,(3):541-542.
[9] 苏卓,郭诚,梁韬.杜仲多糖对链脲佐菌素致糖尿病小鼠的作用[J].中国实验方剂学杂志,2016,22(14):159-162.
[10] 辛晓明,王大伟,王远丽,等.杜仲多糖镇痛作用研究[J].现代中西医结合杂志,2009,18(5):487-488.
[11] Mao J, Sung B, Ji RR, et al. Chronic morphine induces downregulation of spinal glutamate transporters: implications in morphine tolerance and abnormal pain sensitivity[J].J Neurosci, 2002,22(18):8312-8323.

(收稿日期:2019-03-11)
(本文编辑:卜明)

化疗联合 TKIs 靶向治疗 BCR/ABL 融合基因阳性急性淋巴细胞白血病的疗效观察

姜丽波　姚宇宁　霍梅　张淑英　王苏亮　刘娜

【摘要】 **目的**　研究观察化疗联合 TKIs 靶向治疗 BCR/ABL 融合基因阳性急性淋巴细胞白血病的疗效。**方法**　选择 2014 年 1 月—2017 年 12 月本院收治的 BCR/ABL+ALL 患者 12 例为研究组,另选同期住院的 BCR/ABL-ALL 患者 20 例为对照组,在患者诊断时进行 MICM 分型检测、BCR/ABL 融合基因检查。研究组采用多药化疗联合 TKIs 治疗,对照组采用多药化疗治疗,复查骨髓像、血常规、白血病 MRD、BCR/ABL 融合基因及缓解率(初治 d15、d33、d180、d360)。结果采用统计学方法检测分析。**结果**　治疗后两组的白血病 MRD、缓解率(初治 d15、d33、d180、d360)比较,无显著性差异(P>0.05)。研究组 d33(CR+CRi)为 11/12(91.67%),与传统化的 55%比较,差异有统计学意义(X^2=4.0605,P=0.0439<0.05)。**结论**　TKIs 联合化疗显著提高了 BCR/ABL+ALL 的疗效,是目前除移植外首选治疗 BCR/ABL+ALL 的方法。

【关键词】 化疗; 联合; TKIs; 急性淋巴细胞白血病; 疗效
[中图分类号]R733.7　[文献标识码]A　DOI:10.3969/j.issn.1002-1256.2019.17.004

成人急性淋巴细胞白血病(ALL)相对于急性髓系白血病预后不佳,而 BCR/ABL+是成人急性淋巴细胞白血病最危因素之一,既往此型白血病化疗效果极差[1-2]。因此,本研究通过靶向药物络氨酸激酶抑制剂(TKI)联合化疗的治疗观察 BCR/ABL+ALL 的治疗效果,为临床该疾病的治疗提供更多的临床依据。

一、资料与方法

1.一般资料:选择 2014 年 1 月—2017 年 12 月本院收治的 BCR/ABL+ALL 患者 12 例为研究组,占本院同期治疗的 ALL 患者的 37.5%(12/32),男 5 例,女 7 例,年龄 19.1~68.5 岁,平均 41.8 岁。另选同期住院的 BCR/ABL-ALL 患者 20 例为对照组,男 8 例,女 12 例,年龄 15.4~73.5 岁,平均 46.2 岁。患者全部符合 FAB 及 WHO2016 的 ALL 分型诊断标准。

2.检测方法:(1)骨髓细胞形态学分析:采用常规瑞氏-吉姆萨染色分析并经免疫组织化学染色分析。(2)染色体核型分析:检查应用 G 显带技术,根据 ISCN(2013)标准进行核型分析。(3)BCR/ABL 融合基因检测分析:患者均在入院时使用荧光定量 PCR 仪常规检测白血病 43 种融合基因筛选出 BCR/ABL+ALL 患者。(4)免疫分型检测分析:用四色免疫荧光标记(FITC/PE/PerCP/APC)流式细胞术(流式细胞仪 BD Canto Ⅱ)分析细胞膜表面抗原:HLA-DR、CD2、cCD3、CD3、CD4、CD5、CD7、CD8、CD10、CD11b、CD13、CD14、CD15、CD16、CD19、CD20、CD22、CD33、CD34、CD38、CD42b、CD45、CD56、CD64、CD71、CD117、cCD79a、cIgM、Kappa、Lambda、MPO、TdT 等。

3.临床表现:研究组 91.67%患者有贫血表现,

基金项目:黑龙江省教育厅科学技术研究项目(12541936)
作者单位:161000 黑龙江齐齐哈尔,齐齐哈尔医学院附属第二医院
通信作者:姜丽波,Email:jlb0710@126.com