DOI:10.16016/j.1000-5404.201911199

奥沙利铂致大鼠慢性外周神经毒性的背根神经节内神经递质类物质靶标定量检测研究

郑文玲,陈艳荣,欧娟娟,梁后杰 400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)第一附属医院肿瘤科

[**摘要**] **目的** 观察大鼠慢性外周神经毒性模型中奥沙利铂对背根神经节中神经递质类物质浓度的影响。**方法** 24只雄性SD大鼠(SPF级)按抽签法完全随机分为2组,每组12只,分别为模型组和对照组。采用多累积剂量、多频次腹腔注射(累积剂量48 mg/m^2,模拟人体剂量>1 200 mg/m^2)的方法建立慢性外周神经毒性模型,利用神经递质类物质靶标定量检测筛选出背根神经内浓度显著改变的神经递质类物质。**结果** 在奥沙利铂累积剂量为48 mg/m^{2}时,可成功构建大鼠慢性外周神经毒性模型;其背根神经节内谷氨酰胺[(58.54±10.46)nmol/L,P<0.05]、L-谷氨酸[(43.12±7.76) nmol/L,P<0.05]、多巴胺[(0.03±0.02)nmol/L,P<0.01]、去甲肾上腺素[(0.25±0.04) nmol/L,P<0.05]、3、4-二羟基苯乙酸[(0.41±0.01) nmol/L,P<0.01]、香草扁桃酸[(3.30±0.63)nmol/L,P<0.05]的浓度较对照组明显增加,尤其以多巴胺及其代谢产物3、4-二羟基苯乙酸的增加最为显著。**结论** 奥沙利铂慢性蓄积可导致背根神经节内部分神经递质类物质的浓度发生改变,可能与神经元损伤及慢性外周神经毒性发生有关。

[**关键词**] 奥沙利铂;慢性外周神经毒性;背根神经节;神经递质类物质
[**中图法分类号**] R322.85; R979.1; R996 [**文献标志码**] A

Quantitative detection of targeted neurotransmitters in dorsal root ganglia in rats with chronic peripheral neurotoxicity caused by oxaliplatin

ZHENG Wenling, CHEN Yanrong, OU Juanjuan, LIANG Houjie Department of Oncology, First Affiliated Hospital, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038, China

[**Abstract**] **Objective** To observe the effects of oxaliplatin on the concentration of neurotransmitters in dorsal root ganglia in a rat model of chronic peripheral neurotoxicity. **Methods** A total of 24 male SD rats (SPF grade) were randomly divided into model group and normal control group (n=12 in each group). The model of chronic peripheral neurotoxicity was established by multiple cumulative doses and multiple intraperitoneal injections (cumulative dose of 48 mg/m^2, simulated human dose >1 200 mg/m^2). The neurotransmitters with significant concentration changes in the dorsal root were screened out by a quantitative detection. **Results** At a cumulative dose of 48 mg/m^2 oxaliplatin, a rat model of chronic peripheral neurotoxicity was established successfully. In the dorsal root, the neurotransmitters with obviously increase in concentration were L-glutamine (58.54±10.46 nmol/L, P<0.05), L-glutamic acid (43.12±7.76 nmol/L, P<0.05), dopamine (0.03±0.02 nmol/L, P<0.01), norepinephrine (0.25±0.04 nmol/L, P<0.05), 3、4-dihydroxyphenylacetic acid (0.41±0.01 nmol/L, P<0.01), and vanillylmandelic acid (3.30±0.63 nmol/L, P<0.05) when compared with the normal control group. Among them, dopamine and its metabolite 3、4-dihydroxyphenylacetic acid were the most significant. **Conclusion** Chronic accumulation of oxaliplatin can cause changes in the concentration of neurotransmitters in the dorsal root ganglia, which may be related to neuronal damage and chronic peripheral neurotoxicity.

[**Key words**] oxaliplatin; chronic peripheral neurotoxicity; dorsal root ganglion; neurotransmitters

Corresponding author: LIANG Houjie, E-mail: lianghoujie@sina.com

[**通信作者**] 梁后杰,E-mail: lianghoujie@sina.com

奥沙利铂作为第3代铂类抗肿瘤药物,在多种肿瘤的治疗中发挥着非常重要的作用。在临床使用过程中,由奥沙利铂剂量累积导致的慢性外周神经毒副作用非常常见,80%~90%的患者在奥沙利铂治疗后,出现不同程度的外周神经毒性症状,主要表现为四肢末端感觉丢失、感觉异常、痛觉过敏、触诱发痛等[1-2]。外周神经毒副作用已经成为终止奥沙利铂在临床中使用的主要原因之一。

目前研究已经证实,奥沙利铂主要蓄积在背根神经节(dorsal root ganglion, DRG)内,然而其外周神经毒性具体机制仍存在争议,研究表明可能与铂类螯合物导致的线粒体功能障碍和细胞膜钠钾离子通道活性改变相关[3-5]。由于在感觉的产生和传导过程中,神经递质类物质发挥着直接而关键的作用,因此对其在背根神经节内的进一步研究,可能为奥沙利铂外周神经毒副作用的发生机制及治疗提供新的理论基础和方向。

神经递质类物质主要包括神经递质及其代谢物、神经活性物质、神经调节因子以及与其代谢相关的内源性代谢物。神经递质靶标定量检测(LC-MS/MS检测)是通过色谱分析对实验样本的神经递质类物质进行定性定量的检测,可客观反映在内因、外因作用后的效果、规律,属于代谢组学方法范畴[6-7]。本研究旨在探究奥沙利铂作用于背根神经节后是否可引起内源性神经递质类物质的浓度变化,为神经元损伤及慢性外周神经毒性症状的研究提供新方向。

1 材料与方法

1.1 药物

奥沙利铂粉剂(上海阿拉丁生化科技股份有限公司,产品编号:O124003);5%葡萄糖注射液(四川科伦药业股份有限公司,批号019042101-3)由陆军军医大学第一附属医院肿瘤科提供。将100 mg奥沙利铂干粉溶解在100 mL 5%葡糖糖注射液中,获得浓度为1 mg/mL的奥沙利铂注射液,将其分装后放置4 ℃冰箱保存备用。

1.2 动物分组与给药

24只雄性Sprague Dawley大鼠,6周龄,体质量180~200 g,购于陆军军医大学特色医学中心实验动物中心。按3只/笼进行饲养,所有实验对象均可自由进食和饮水,在恒定温度(23±1)℃、湿度(55±10)%、明暗周期为12 h:12 h(照明时间为8:00-20:00)的条件下进行实验。在实验开始前,所有大鼠进行适应性饲养1周。按照完全随机抽签法将大鼠分成2组,每组12只,分别为外周神经毒性模型组和对照组。

结合文献[8-12]及我们前期相关预实验结果,外周神经毒性模型组每隔1 d给予3 mg/kg奥沙利铂腹腔注射,共计16次腹腔注射;对照组每隔1 d给予同等体积的5%葡萄糖注射液腹腔注射,共计16次腹腔注射。

1.3 慢性外周神经毒性模型评估

1.3.1 体质量变化 每天10:00称量,记录2组大鼠的体质量。

1.3.2 机械性异常性疼痛检测 分别在连续注射第0、3、6、9、12、15、16次时检测大鼠机械性异常性疼痛。机械性异常性疼痛使用Von Frey纤维丝(BME 403:0.09、0.17、0.30、0.57、1.04、4.10、6.10、7.70、10.7、20.3、36.6和63.2 g)和塑料有机玻璃箱(为保证检测方便,有机玻璃箱底部均匀分布的圆孔,大小为0.5 cm×0.5 cm)进行测量。从4.10 g Von Frey纤维丝开始,将纤维丝垂直作用于大鼠右后肢足底中部,持续时间3~5 s,以纤维丝弯曲作为完全受力的标准,如大鼠出现缩足、抬足,或者舔足等逃避行为则视其为阳性反应,并记录为"X",然后换相邻小一级的纤维丝,当该力度的刺激不足引起阳性反应,则记录为"O",直至出现第1次阳性和阴性反应的骑跨,再连续记录4次,每次刺激间隔1 min。多次记录为"X"、"O"可以通过up-down表查询到相应的K值,带入公式:缩足阈值=10xF+Kσ/1 000,即得到大鼠机械性异常性疼痛阈值。其中,xF为最后一次使用的纤维丝的克数,σ值为0.261,是Von Frey纤维丝的平均差[13-14]。

1.3.3 冷化学异常性疼痛检测 分别在连续注射第0、3、6、9、12、15、16次时检测大鼠冷化学异常性疼痛。将大鼠放置在底端带有网格的有机玻璃圆桶中,将100 μL丙酮喷雾喷到大鼠的爪子表面上进行测试。记录喷雾后大鼠20 s内的所有反应,并以4分制对反应进行评分:0:无反应;1:快速缩足或晃动爪子;2:长时间缩足或反复晃动爪子(大于10 s);3:反复晃动爪子并同时舔足。当第1次喷雾观察结束后,间隔5 min后再次将丙酮喷雾喷到大鼠爪上并记录其20s内所有反应,重复上述操作1次后,可获得单个大鼠丙酮喷雾后3次反应累积得分,其最低得分为0,最高得分为9[14-16]。

1.3.4 热痛觉过敏(冷板试验)检测 分别在连续注射第0、3、6、9、12、15、16次时进行大鼠热痛觉过敏(冷板试验)检测。将每只大鼠放置在热板仪(PE34, IITC Life Sciences)上的有机玻璃圆筒中,在开始检测前使其适应60 s。热板仪起始温度为30 ℃;以10 ℃/min递增,当大鼠出现抬足、舔足或缩爪时,视为伤害行为,即阳性,并记录伤害行为出现时热板温度,作为结果度量。当大鼠出现伤害行为后,刺激停止,热板温度立即回到30 ℃,大鼠被放回笼中。每只大鼠各检测痛阈值2次,在2次检测之间需间隔至少30 min后,再重复上述操作,最终得到2次温度的平均值[14,16]。

1.4 组织样本收集、预处理

连续注射16次后(药物累积剂量为48 mg/m^2),

使用1%戊巴比妥钠麻醉后,断颈处死所有动物。解剖获取每组大鼠的L4~L6背根神经节(DRG)[17],将其经PBS漂洗后,取每组4对L4~L6背根神经节浸入4%多聚甲醛中固定6 h后,进行HE、尼氏体染色,用于光学显微镜下形态观察;每组剩下的8对L4~L6背根神经节经PBS漂洗、冷却、提取等处理后进行神经递质类物质靶标定量检测。

1.5 背根神经节组织HE、尼氏体染色及图像分析

在每个神经节中抽取连续切片3张,通过光学显微镜观察并采集图像,在每张图像中随机选取5个较大神经元(我们将其定义为典型神经元),利用ImageJ软件对其进行相应测量分析,包括神经元细胞胞体、细胞核直径及面积、尼氏体颗粒大小及数量等。

1.6 神经递质类物质靶标定量检测(UHPLC-MS/MS)及分析条件

1.6.1 流动相条件 使用Agilent 1290 Infinity Ⅱ series (Agilent Technologies)超高效液相色谱仪,通过Waters ACQUITY UPLC HSS T3 (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm, Waters)液相色谱柱对目标化合物进行色谱分离。液相色谱A相为10 mmol/L甲酸铵/0.1%甲酸水溶液,B相为乙腈。柱温箱温度为35 ℃,样品盘设为4 ℃,进样体积为5 μL。

1.6.2 质谱条件 使用装备AJS-ESI离子源的Agilent 6460三重四极杆质谱仪,以多反应监测(MRM)模式进行质谱分析。离子源参数如下:电离电压=+4 000/−3 500 V,喷嘴电压=+500/−500 V,氮气温度=300 ℃,氮气流速=5 L/min,雾化氮气温度=250 ℃,雾化氮气流速=11 L/min,雾化器压强=45 psi。进行UHPLC-MS/MS分析之前,通过标准品配置,将目标化合物标准溶液引入质谱中以建立校准曲线。针对每个目标化合物,选取信号强度最高的数个母离子-子离子对(transition),对其MRM参数进行优化,并选取其中响应最好的离子对用于定量分析,其他离子对用于目标化合物定性分析。

1.6.3 数据采集与定量分析 所有质谱数据采集及目标化合物定量分析工作,均通过Agilent Mass Hunter Work Station Software (B.08.00, Agilent Technologies)来完成。对检测样本的原始数据进行峰解卷积、积分、峰对齐、标准化预处理。通过原始总离子流(TIC)色谱图,初步观察仪器的保留时间重现性,通过提取离子流色谱图(EIC)观察所测得物质的情况,样品最终测得浓度为仪器直接测得浓度乘以稀释因子,单位为nmol/L。

1.7 统计学分析

采用GraphPad Prism 8.0统计软件对体质量变化、机械性异常性疼痛检测、冷化学异常性疼痛、热痛觉过敏检测、Image J采集分析的原始数据进行多因素方差分析,检验水准$\alpha=0.05$。

2 结果

2.1 对体质量的影响

如图1A所示,当药物累积剂量<27 mg/m^2(药物处理第1~16天)时,模型组体质量呈缓慢增加趋势;在药物累积剂量≥27 mg/m^2(药物处理第17天)后,模型组体质量呈逐渐下降趋势,当累积剂量≥36 mg/m^2(药物处理第23天)后体质量下降趋势显著,处理后期体质量较对照组显著减小($P<0.05$);整个药物处理过程对照组大鼠体质量呈逐渐增加状态。

2.2 对疼痛行为的影响

2.2.1 对机械性异常性疼痛和痛觉过敏的影响 如图1B所示,在药物累积剂量<27 mg/m^2(药物处理第1~16天)时,两组缩足阈值差异无统计学意义;药物累积剂量为27 mg/m^2(药物处理第18天)时,模型组大鼠缩足阈值开始与基线分离并呈下降趋势,大鼠出现机械性异常性疼痛及痛觉过敏表现;在药物累积剂量为36、45、48 mg/m^2(药物处理第24、30、32天)时,模型组大鼠缩足阈值较对照组显著减小($P<0.01$),出现典型机械性异常性疼痛及痛觉过敏表现。

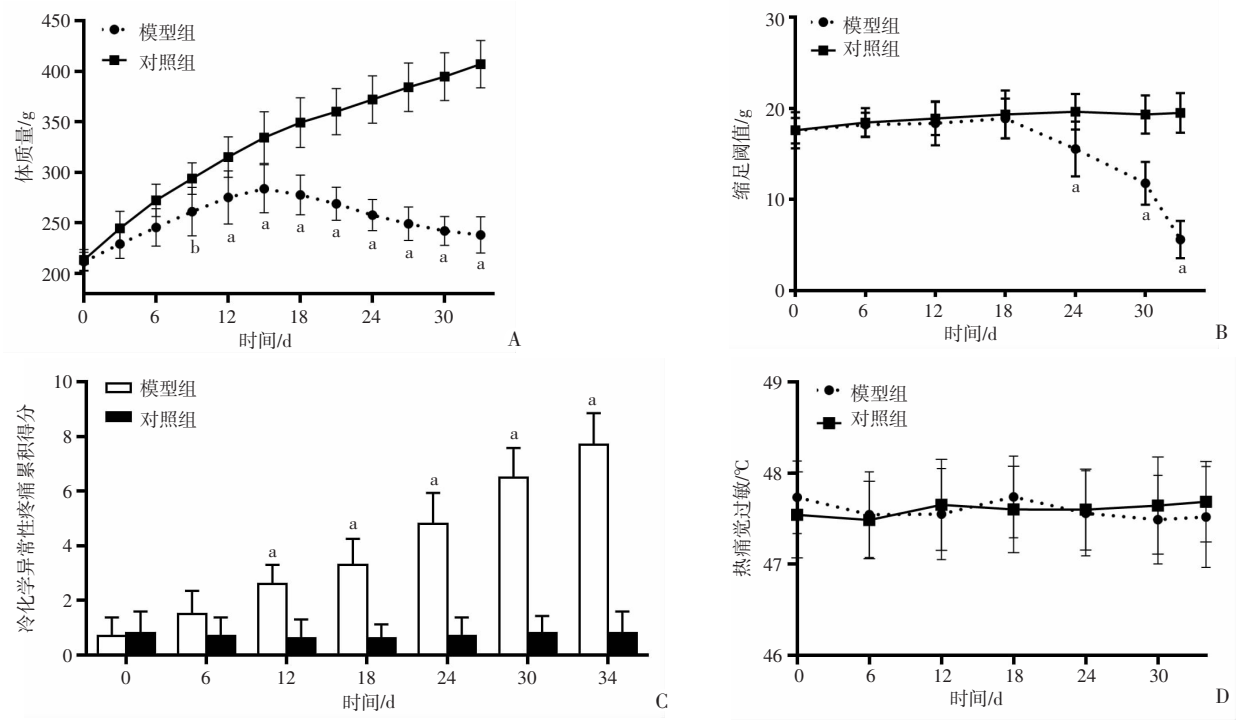
2.2.2 对冷化学异常性疼痛的影响 如图1C所示,当药物累积剂量<18 mg/m^2(药物处理第1~11天)时,两组丙酮喷雾反应的累计得分无统计学差异;当药物累积剂量≥18 mg/m^2(药物处理第12天)后,模型组丙酮喷雾反应的累计得分较对照组明显升高($P<0.01$),大鼠出现冷化学异常性疼痛;随着药物累积剂量继续增加,模型组冷化学异常性疼痛表现更加显著。

2.2.3 对热痛觉过敏(冷板试验)的影响 如图1D所示,在整个实验过程中,两组热板仪温度差异并无统计学意义($P>0.05$),表明在使用奥沙利铂后,大鼠热痛觉阈值并无明显改变。

2.3 对背根神经节的组织形态学影响

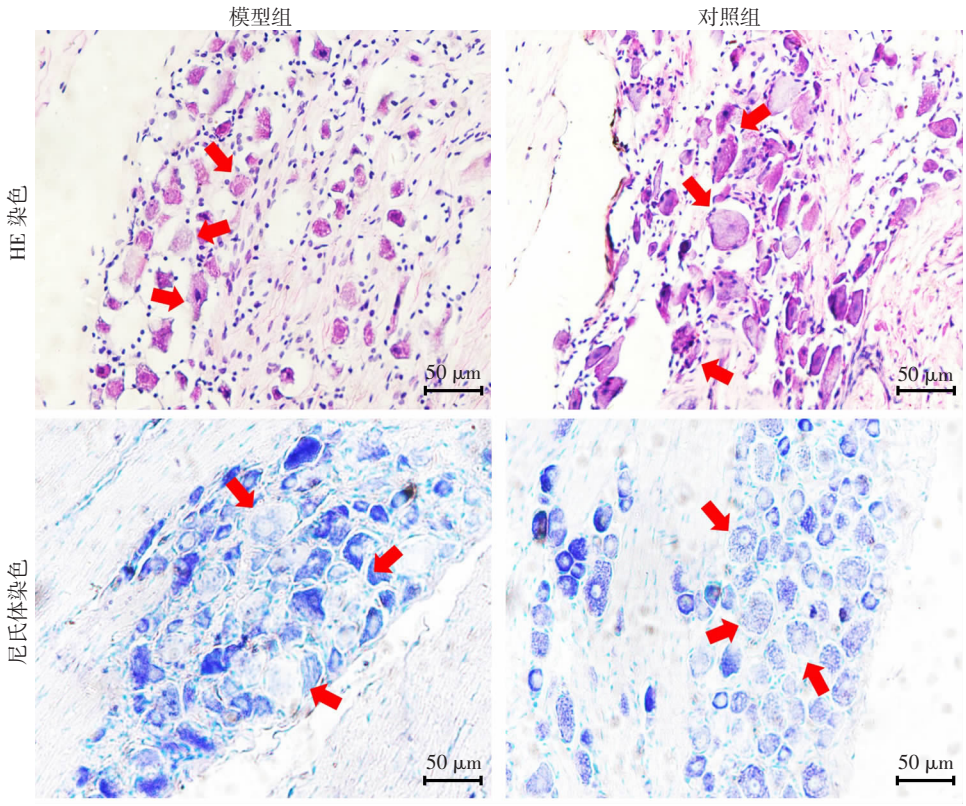
如图2 HE染色所示,模型组DRG神经元基本轮廓较对照组未见明显变化,可见部分神经元胞体面积缩小,胞质浓缩,与周围其他神经元细胞相分离;同时一些大神经元细胞直径稍减小,胞质密度明显下降,内含大量空泡;部分细胞核染色较浅,细胞核、核仁形态模糊、不规则。如图3所示,通过ImageJ软件对两组典型神经元细胞直径、细胞面积及细胞核面积进行测量计算,发现模型组细胞直径较对照组减小($P<0.05$),细胞面积及细胞核面积与对照组相比差异无统计学意义。

如图2尼氏体染色所示,对照组的背根神经节,其大、小神经元内均可见均匀散在分布的嗜碱性颗粒;而在模型组中大神经元内的嗜碱性团块及颗粒明显减少,小神经元与对照组差异无统计学意义。如图3所示,通过ImageJ软件对典型神经元进行测量分析,模型组中尼氏体颗粒数量较对照组显著减少($P<0.01$),但两组尼氏体颗粒大小差异无统计学意义。



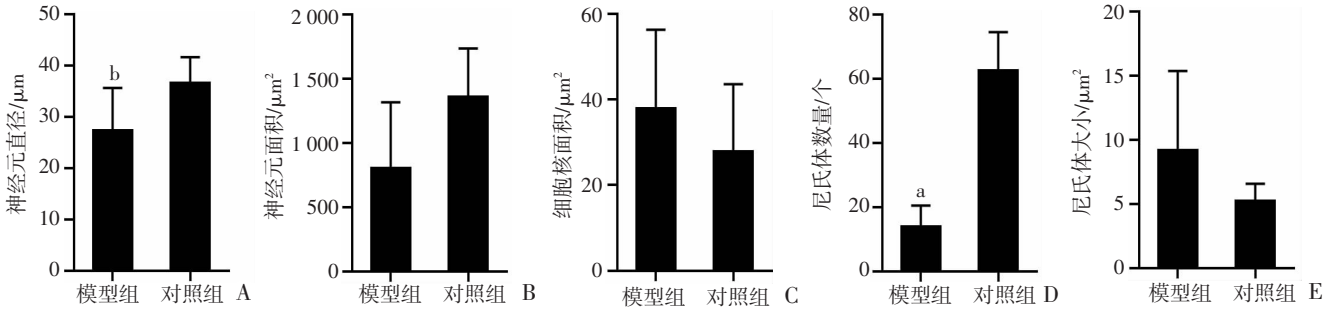
A:体质量;B:机械性异常性疼痛及痛觉过敏;C:冷化学异常性疼痛;D:热痛觉过敏 a:$P<0.01$,b:$P<0.05$,与对照组比较

图 1 奥沙利铂的慢性蓄积对大鼠体质量、疼痛行为的影响



红色箭头示典型改变神经元

图 2 奥沙利铂的慢性蓄积对大鼠背根神经节组织形态学的改变



A:神经元直径;B:神经元面积;C:细胞核面积;D:尼氏体数量;E:尼氏体大小 a:$P<0.01$,b:$P<0.05$,与对照组比较

图 3 奥沙利铂的慢性蓄积对大鼠背根神经节统计分析

表 1 奥沙利铂对背根神经节内 23 种神经递质类物质的含量影响(nmol/L,$n=8$,$\bar{x}\pm s$)

序号	神经递质	模型组	对照组	模型组/对照组 比值	P 值	CAS NO
1	谷氨酰胺	58.54±26.65	39.67±12.83	1.48	0.046	56-85-9
2	L-谷氨酸	43.13±19.43	26.59±10.18	1.62	0.026	56-86-0
3	多巴胺	0.03±0.01	0.01±0.00	2.54	<0.001	62-31-7
4	去甲肾上腺素	0.26±0.08	0.16±0.06	1.63	0.009	51-41-2
5	3、4-二羟基苯乙酸	0.04±0.01	0.01±0.00	3.48	<0.001	102-32-9
6	香草扁桃酸	3.30±1.67	2.00±0.64	1.65	0.029	55-10-7
7	乙酰胆碱	0.41±0.08	0.51±0.20	0.80	0.104	60-31-1
8	组胺	4.46±2.72	3.66±2.41	1.22	0.271	51-45-6
9	4-氨基丁酸	1.70±1.15	1.05±0.71	1.62	0.099	56-12-2
10	组氨酸	6.81±3.89	4.30±1.91	1.58	0.062	71-00-1
11	5-羟色胺	0.04±0.00	0.03±0.01	1.43	0.051	153-98-0
12	酪氨酸	5.88±1.51	4.92±1.17	1.19	0.089	60-18-4
13	5-羟吲哚乙酸	0.05±0.02	0.06±0.02	0.77	0.080	54-16-0
14	色氨酸	0.91±0.22	0.92±0.26	0.99	0.468	73-22-3
15	犬尿氨酸	0.07±0.04	0.18±0.28	0.40	0.169	2922-83-0
16	精氨酸	17.05±7.10	12.24±4.83	1.39	0.068	74-79-3
17	肾上腺素	0.05±0.04	0.03±0.00	1.81	0.235	329-63-5
18	酪胺	<LLOQ	<LLOQ			51-67-2
19	高香草酸	N.D	N.D			306-08-1
20	色胺	N.D	N.D			61-54-1
21	褪黑素	N.D	N.D			73-31-4
22	左旋多巴	N.D	N.D			59-92-7
23	5-羟基色氨酸	N.D	N.D			4350-09-8

CAS NO:该目标化合物在美国化学会下设组织化学文摘社中的相应编号;N.D:该样品中目标化合物未检出;<LLOQ:该样品中目标化合物有明显色谱峰,但其响应强度低于定量下限(LLOQs),不能准确定量;比值为模型组/对照组

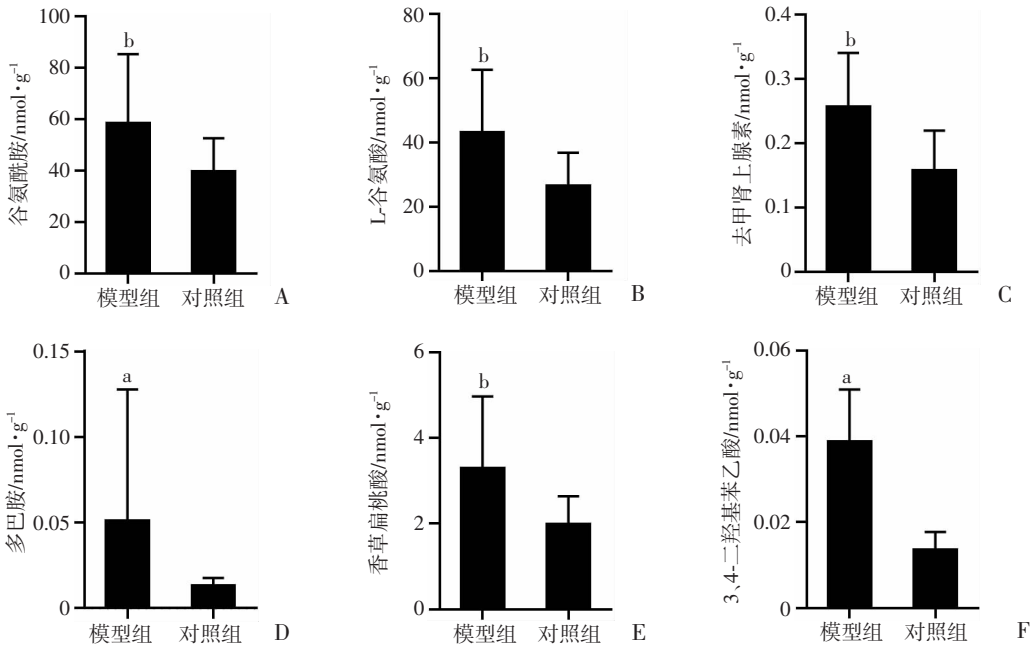
2.4 背根神经节内差异神经递质类物质分析

为寻找差异性神经递质类物质,将 Agilent Technologies 软件收集、处理得到靶标神经递质类物质的最终有效浓度数据进行 t 检验。在奥沙利铂累积剂量达到 48 mg/m^2 时,对 23 种常见的神经递质类物质中进行了色谱分析,每种物质的具体浓度值见表 1。如图 4 所示,我们共筛选出了 6 种在奥沙利铂处理后浓度变化具有统计学差异的神经递质类物质,分别是氨基酸类:谷氨酰胺($P<0.05$)、L-谷氨酸($P<0.05$);单胺类:多巴胺($P<0.01$)、去甲肾上腺素($P<0.05$);以及内源性儿茶酚胺类代谢产物:3、4-二羟基苯乙酸($P<0.01$)、香草扁桃酸($P<0.05$),尤其以多巴胺及其代谢产物 3、4-二羟基苯乙酸的增加最为显著。

3 讨论

3.1 大鼠外周神经毒性模型的建立与评价

铂类化疗药物导致的神经毒副反应发生概率高,已逐渐引起临床的关注。由于奥沙利铂所致的外周神



A:谷氨酰胺;B:L-谷氨酸;C:去甲肾上腺素;D:多巴胺;E:香草扁桃酸;F:3,4-二羟基苯乙酸 a:$P<0.01$,b:$P<0.05$,与对照组比较

图 4 背根神经节内差异性神经递质类物质含量比较

经毒性呈剂量依赖型,即药物累积剂量越大,外周神经毒性症状越严重[2,4-5,12]。因此,采用多累积剂量、多频次的方法建立慢性外周神经毒性模型,从而获得更典型、更严重的神经毒性模型,确保在后续神经递质类物质的检测中,差异结果趋势将更为显著。

本研究根据大鼠体质量、疼痛行为及背根神经节组织形态学的改变等重要指标,来评价模型是否成功建立。其中体质量变化反映动物饮食水平和机体生理代谢状态;疼痛行为包括机械性异常性疼痛、冷化学异常性疼痛、热痛觉过敏均反映大鼠对不同种类疼痛的阈值改变;背根神经节 HE 染色、尼氏体染色反映大鼠在奥沙利铂作用后的神经元病理改变。相较对照组,随着药物累积剂量的逐渐增加,尤其当累积剂量≥36 mg/m^{2}后,模型组大鼠的体质量显著下降($P<0.01$),其机械性疼痛、冷化学异常性疼痛阈值均明显下降($P<0.01$),即出现典型的机械性异常性疼痛、冷化学异常性疼痛及痛觉过敏的症状,与临床患者及其他文献中奥沙利铂慢性神经毒性动物模型产生的症状相一致[3,10,14-16];模型组较对照组并未发生热痛觉过敏,临床患者及其他动物模型也无相关症状报道。结合 HE 染色、尼氏体染色,我们猜测或许奥沙利铂可选择性损伤一些体积较大的神经元,而这部分神经元在热痛觉的传导并无明显作用。因此,这种奥沙利铂慢性外周神经毒性模型可基本模拟人类临床状况。模型组 DRG 的 HE 染色提示典型神经元直径较对照组稍减小,但切面面积差异无统计学意义,典型神经元内胞浆不匀质,细胞核边界模糊、核仁形态不规则,与文献[8]报道基本一致。尼氏体参与合成细胞结构蛋白、神经递质合成所需的酶类以及肽类的神经调质,可反映细胞的代谢状况;当神经元发生损伤时,可表现为尼氏体的溶解和消失[18]。因此,尼氏体常作为神经元功能状态及损伤的敏感指标。本实验通过尼氏体染色发现在模型组的 DRG 中,大神经元内嗜碱性团块及颗粒显著减少和消失,进一步证实奥沙利铂慢性蓄积可导致 DRG 大神经元的病理损伤。以上结果均提示模型构建成功,可用于后续相关研究。

3.2 奥沙利铂对背根神经节内神经递质类物质浓度的影响

神经递质类物质是由神经元合成的、具有特殊活性的物质,在感觉的产生、传导、接收中发挥着非常重要的作用。目前,神经递质类物质在中枢神经系统中的表达和功能已取得一些研究成果,然而它们在外周神经系统中,尤其是在背根神经节中的表达、作用还尚不明确。背根神经节属于初级感觉神经元,接收来自身体感受器的全部神经冲动,并将其传入脊髓;它同时也是奥沙利铂作用的主要靶器官,是神经毒性效应、机制的研究重点[8,11,19-20]。我们通过对 23 种常见的神经递质类物质进行色谱分析后发现:在背根神经节内,氨基酸类神经递质浓度比较丰富,包括谷氨酰胺、L-谷氨酸、精氨酸、组胺、组氨酸、酪氨酸等,其中谷氨酰胺

和 L-谷氨酸在模型组中显著升高;而单胺类神经递质浓度则相对偏低,包括多巴胺、去甲肾上腺素、肾上腺素,其中多巴胺和去甲肾上腺素在模型组中显著升高;同时,多巴胺及去甲肾上腺素的代谢产物 3,4-二羟基苯乙酸、香草扁桃酸在模型组中也显著升高。

3.2.1 谷氨酰胺、L-谷氨酸 谷氨酰胺作为抑制性神经递质,是一种电生理惰性物质,在生理状态下,一般不发挥具体效应,但当它大量表达在神经元内时,可取代某些氨基酸类神经递质,进而引起神经生理功能的异常[21];L-谷氨酸属于兴奋性神经递质,当其发生病理性蓄积时,可介导神经细胞过度兴奋,促使细胞发生变性、损伤,甚至出现凋亡、坏死[22];此外,谷氨酰胺、谷氨酸二者可在相关酶的作用下相互转换,以维持神经元正常的生理功能,当谷氨酸-谷氨酰胺循环被破坏时,可导致神经系统内兴奋性神经递质和抑制性神经递质失衡[23-25];二者在模型组内浓度均增高,提示可能与神经元损伤、外周神经毒性的发生相关,可进一步完善相关干预实验加以验证。

3.2.2 多巴胺、去甲肾上腺素 多巴胺、去甲肾上腺素均属于儿茶酚胺类神经递质,是兴奋性神经递质,在脊髓背角广泛分布着含有多巴胺、去甲肾上腺素的纤维和末梢。虽然两者在镇痛的作用更广为周知,但亦有研究表明,它们可在疼痛和镇痛中发挥双刃剑的角色,尤其是多巴胺,可通过作用于不同的受体来改变神经兴奋性,进一步出现促进疼痛或抑制疼痛的效应[26-27]。本研究中,模型组内多巴胺、去甲肾上腺素含量均增加($P<0.05$),但二者是否可作用于相关受体进而促进异常感觉神经冲动向中枢神经系统传导,还有待进一步研究。

3.2.3 3,4-二羟基苯乙酸、香草扁桃酸 3,4-二羟基苯乙酸(DOPAC)和香草扁桃酸(VMA)均属于是儿茶酚胺类神经递质代谢产物;多巴胺主要经单胺氧化酶(MAO)、儿茶酚氧位甲基转移酶、多巴胺-β-羟化酶等作用后可生成 3,4-二羟基苯乙酸和去甲肾上腺素,去甲肾上腺素再经单胺氧化酶作用生成香草扁桃酸[28]。本研究中,模型组内多巴胺、3,4-二羟基苯乙酸浓度较对照组显著升高($P<0.01$),去甲肾上腺素、香草扁桃酸升高($P<0.05$),提示模型组内可能以多巴胺代谢改变为主,猜测奥沙利铂可能参与调控多巴胺代谢,但仍需进一步干预实验加以验证。

综上,本研究成功建立大鼠奥沙利铂慢性外周神经毒性模型,对背根神经节内的神经递质类物质进行了靶标定量检测分析,通过色谱分析筛选出了 6 种浓度改变具有统计学差异的神经递质类物质,旨在从新角度探讨奥沙利铂对神经损伤的作用。由于背根神经节解剖结构复杂,可获取的组织量少,因此,它在感觉传导中发挥的功能作用仍存在很多研究盲区;基于奥沙利铂的蓄积致使 6 种内源性神经递质类物质浓度的改变,猜测奥沙利铂可能通过影响神经递质类物质的浓度,导致神经元的损伤,进而促使外周神经毒性症状的发生。

参考文献:

[1] BEIJERS A J, MOLS F, VREUGDENHIL G. A systematic review on chronic oxaliplatin-induced peripheral neuropathy and the relation with oxaliplatin administration[J]. Support Care Cancer, 2014, 22(7): 1999-2007. DOI: 10.1007/s00520-014-2242-z.

[2] WOLF S, BARTON D, KOTTSCHADE L, *et al*. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: prevention and treatment-strategies[J]. Eur J Cancer, 2008, 44(11): 1507-1515. DOI: 10.1016/j.ejca.2008.04.018.

[3] GENT P, MASSEY K. An overview of chemotherapy-induced peripheral sensory neuropathy, focusing on oxaliplatin[J]. Int J Palliat Nurs, 2001, 7(7): 354-359. DOI: 10.12968/ijpn.2001.7.7.9020.

[4] ARGYRIOU A A. Updates on oxaliplatin-induced peripheral neurotoxicity (OXAIPN)[J]. Toxics, 2015, 3(2): 187-197. DOI: 10.3390/toxics3020187.

[5] ARGYRIOU A A, POLYCHRONOPOULOS P, ICONOMOU G, *et al*. A review on oxaliplatin-induced peripheral nerve damage[J]. Cancer Treat Rev, 2008, 34(4): 368-377. DOI: 10.1016/j.ctrv.2008.01.003.

[6] AHMED K E M, FRØYSA H G, KARLSEN O A, *et al*. LC-MS/MS based profiling and dynamic modelling of the steroidogenesis pathway in adrenocarcinoma H295R cells[J]. Toxicol In Vitro, 2018, 52: 332-341. DOI: 10.1016/j.tiv.2018.07.002.

[7] OBWALD A, WANG R, BEUSCHLEIN F, *et al*. Performance of LC-MS/MS and immunoassay based 24-h urine free cortisol in the diagnosis of Cushing's syndrome[J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2019, 190: 193-197. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2019.04.004.

[8] JAMIESON S M, LIU J, CONNOR B, *et al*. Oxaliplatin causes selective atrophy of a subpopulation of dorsal root ganglion neurons without inducing cell loss[J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2005, 56(4): 391-399. DOI: 10.1007/s00280-004-0953-4.

[9] STOJANOVSKA V, MCQUADE R M, FRASER S, *et al*. Oxaliplatin-induced changes in microbiota, $TLR4^+$ cells and enhanced HMGB1 expression in the murine colon[J]. PLoS ONE, 2018, 13(6): e0198359. DOI: 10.1371/journal.pone.0198359.

[10] CAVALETTI G, TREDICI G, PETRUCCIOLI M G, *et al*. Effects of different schedules of oxaliplatin treatment on the peripheral nervous system of the rat[J]. Eur J Cancer, 2001, 37(18): 2457-2463. DOI: 10.1016/s0959-8049(01)00300-8.

[11] KIM S T, CHUNG Y H, LEE H S, *et al*. Protective effects of phosphatidylcholine on oxaliplatin-induced neuropathy in rats[J]. Life Sci, 2015, 130: 81-87. DOI: 10.1016/j.lfs.2015.03.013.

[12] WOLF S, BARTON D, KOTTSCHADE L, *et al*. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: prevention and treatment strategies[J]. Eur J Cancer, 2008, 44(11): 1507-1515. DOI: 10.1016/j.ejca.2008.04.018.

[13] 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): 55-63. DOI: 10.1016/0165-0270(94)90144-9.

[14] RENN C L, CAROZZI V A, RHEE P, *et al*. Multimodal assessment of painful peripheral neuropathy induced by chronic oxaliplatin-based chemotherapy in mice[J]. Mol Pain, 2011, 7: 29. DOI: 10.1186/1744-8069-7-29.

[15] SCRENCI D, MCKEAGE M J, GALETTIS P, *et al*. Relationships between hydrophobicity, reactivity, accumulation and peripheral nerve toxicity of a series of platinum drugs[J]. Br J Cancer, 2000, 82(4): 966-972. DOI: 10.1054/bjoc.1999.1026.

[16] ARETI A, KOMIRISHETTY P, AKUTHOTA M, *et al*. Melatonin prevents mitochondrial dysfunction and promotes neuroprotection by inducing autophagy during oxaliplatin-evoked peripheral neuropathy[J]. J Pineal Res, 2017, 62(3): e12393. DOI: 10.1111/jpi.12393.

[17] SLEIGH J N, WEIR G A, SCHIAVO G. A simple, step-by-step dissection protocol for the rapid isolation of mouse dorsal root Ganglia[J]. BMC Res Notes, 2016, 9: 82. DOI: 10.1186/s13104-016-1915-8.

[18] CARRIEL V, CAMPOS A, ALAMINOS M, *et al*. Staining methods for normal and regenerative myelin in the nervous system[J]. Methods Mol Biol, 2017, 1560: 207-218. DOI: 10.1007/978-1-4939-6788-9_15.

[19] LUO F R, WYRICK S D, CHANEY S G. Comparative neurotoxicity of oxaliplatin, ormaplatin, and their biotransformation products utilizing a rat dorsal root Ganglia *in vitro* explant culture model[J]. Cancer Chemother Pharmacol, 1999, 44(1): 29-38. DOI: 10.1007/s002800050941.

[20] PULVERS J N, MARX G. Factors associated with the development and severity of oxaliplatin-induced peripheral neuropathy: a systematic review[J]. Asia Pac J Clin Oncol, 2017, 13(6): 345-355. DOI: 10.1111/ajco.12694.

[21] JAYAKUMAR A R, NORENBERG M D. Glutamine synthetase: role in neurological disorders[J]. Adv Neurobiol, 2016, 13: 327-350. DOI: 10.1007/978-3-319-45096-4_13.

[22] DABROWSKA K, SKOWRONSKA K, POPEK M, *et al*. Roles of glutamate and glutamine transport in Ammonia neurotoxicity: state of the art and question marks[J]. Endocr Metab Immune Disord Drug Targets, 2018, 18(4): 306-315. DOI: 10.2174/1871520618666171219124427.

[23] NEU J, LI N. Pathophysiology of glutamine and glutamate metabolism in premature infants[J]. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2007, 10(1): 75-79. DOI: 10.1097/MCO.0b013e328011923c.

[24] NEWSHOLME P, PROCOPIO J, LIMA M M, *et al*. Glutamine and glutamate: their central role in cell metabolism and function[J]. Cell Biochem Funct, 2003, 21(1): 1-9. DOI: 10.1002/cbf.1003.

[25] TIAN Y, DU W, CAO S, *et al*. Systematic analyses of glutamine and glutamate metabolisms across different cancer types[J]. Chin J Cancer, 2017, 36(1): 88. DOI: 10.1186/s40880-017-0255-y.

[26] SAGHEDDU C, ARONI S, DE FELICE M, *et al*. Enhanced serotonin and mesolimbic dopamine transmissions in a rat model of neuropathic pain[J]. Neuropharmacology, 2015, 97: 383-393. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2015.06.003.

[27] WOOD P B. Role of central dopamine in pain andanalgesia[J]. Expert Rev Neurother, 2008, 8(5): 781-797. DOI: 10.1586/14737175.8.5.781.

[28] YOSHIKAWA M, NISHIYAMA S, TAKAITI O. Metabolism of dopamine prodrug, docarpamine[J]. Hypertens Res, 1995, 18(Suppl 1): S211-S213. DOI: 10.1291/hypres.18.supplementi_s211.

(收稿:2019-11-25;修回:2020-02-02)

(编辑 张 维)