

中药芷辛方对骨癌痛大鼠胶质细胞蛋白表达以及 TLRs 和 NF- κ B 的影响

张 斌^{1△} 孙松娴¹ 陈轶尘² 周春祥¹

摘要 目的 通过建立癌痛动物模型,探讨芷辛方的镇痛作用及对骨癌痛大鼠模型中脊髓胶质细胞蛋白[胶质原纤维酸性蛋白(GFAP)、CD11b]表达以及 Toll 受体(Toll-like receptors, TLRs)和核因子 κ B (NF- κ B)的影响。**方法** 将 20 只 SD 雄性大鼠随机分为空白组(10 只)、骨癌痛模型组(10 只),通过左胫骨内接种含有 3×10^3 个 Walker256 嫁接的腹水瘤细胞液造模,并对这两组的大鼠进行行为学检测、X 光片检测及 HE 染色的检测证实造模成功。依照此法将 70 只雄性 SD 大鼠随机分为 7 组,每组 10 只。空白组(10 只)、骨癌痛模型组(简称模型组,10 只)、西药盐酸曲马多对照组(简称西药对照组,10 只)、芷辛方高、中、低剂量组(每组各 10 只)、中药五灵止痛胶囊对照组(简称中药对照组,10 只)。造模 14 天后开始灌胃,芷辛方高、中、低剂量组分别给予芷辛方水煎浓缩制剂(9、4.5、2.25 g/kg 生药)。每天灌胃 1 次,连续 7 天。第 21 天取脊髓 L4 ~ L5 段背角,分别应用免疫组化、逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)及蛋白质印迹法(Western blot)的方法,分别检验星形胶质细胞的标志性蛋白 GFAP 的变化,小胶质细胞的标志性蛋白 CD11b 表达变化以及髓内 TLRs (TLR2、TLR4)和 NF- κ B 的影响。**结果** 与空白组比较,模型组大鼠体重增加迟缓甚至呈下降趋势($P < 0.01$);自发性运动疼痛评分(SAPS)明显上升($P < 0.01$);触诱发痛阈值(PWT)明显下降($P < 0.05$, $P < 0.01$);手术侧胫骨 X 线影像以及 HE 染色示:骨结构发生明显改变和破坏。免疫组化检测髓内星形胶质细胞的标记蛋白 GFAP 明显升高;NF- κ B 蛋白水平升高($P < 0.01$)。与模型组比较,CD11b、TLR2、TLR4 及 NF- κ B 水平芷辛方中、高剂量组均明显下降($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论** 芷辛方可抑制脊髓水平胶质细胞的增殖活化和 TLRs (TLR2、TLR4)、NF- κ B 蛋白的激活,这可能是其镇痛机制之一。

关键词 骨癌痛;芷辛方;胶质原纤维酸性蛋白;小胶质细胞;Toll 样受体;核因子 κ B

Effect of Zhixin Formula on Gliocyte Protein Expressions, TLRs and NF- κ B in Bone Cancer Pain Model Rats ZHANG Bin¹, SUN Song-xian¹, CHEN Yi-chen², and ZHOU Chun-xiang¹ 1 School of Basic Medicine, Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing (210023), China; 2 Ningbo Institute of Medical Sciences, Zhejiang (315000), China

ABSTRACT Objective To explore the analgesic effect of Zhixin Formula (ZF) and its effects on spinal glial fibrillary acidic protein (glial fibrillary acidic protein, GFAP, a marker of astrocyte), CD11b (a marker of microglia), Toll like receptors (TLR2 and TLR4) and nuclear factor κ B (NF- κ B) in bone cancer pain model rats. **Methods** Totally 20 male SD rats were randomly divided into the blank control group and the bone cancer pain group, 10 in each group. The bone cancer pain model was induced by injecting ascites tumor fluid containing 3×10^3 Walker256 cell line from the left tibia. Ethological tests, X-ray test, and HE staining were performed to confirm a successful modeling. After model was successfully established, 70 male SD rats were randomly divided into seven groups, 10 in each group: the blank control group, the bone cancer pain group (as the model group), the Western medicine (WM) group (Tramadol Hydrochloride), the high dose ZF group, the middle dose ZF group, the low dose ZF group, and the Chinese medicine (CM)

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81273639)

作者单位:1.南京中医药大学基础医学院(南京 210023);2.浙江省宁波市医学科学研究所(浙江 315000)

通讯作者:周春祥, Tel:025-85811772, E-mail: chunxiangzhou@sina.com

[△]现在浙江省宁波市中医院脾胃病科(浙江 315000)

DOI: 10.7661/CJIM.2015.06.0704

group (Wulin Zhitong Capsule). Fourteen days after modeling, rats in the high, middle, and low dose ZF groups were administrated by gastrogavage with 9, 4.5, and 2.25 g/kg ZF water condensed preparation respectively, once a day for seven consecutive days. On day 21 MS typical protein expressions including GFAP, CD11b, TLR(2,4) and NF- κ B from cornu dorsal medullae spindis L4-L5 were detected by immunohistochemistry, reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot. Results Compare with the blank control group, increased weight in the model group was slow and showed a decreasing trend ($P < 0.01$), spontaneous ambulatory pain score (SAPS) obviously increased ($P < 0.01$), paw withdrawal threshold (PWT) obviously decreased in the model group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Results of lateral tibial X-ray and HE staining showed obvious changes and damage occurred in bone structures of rats in the model group. Immunohistochemistry showed that GFAP expression significantly increased in the model group ($P < 0.05$). Protein levels of NF- κ B also significantly increased in the model group ($P < 0.05$). Compared with the model group, CD11b expressions obviously decreased in the middle and high dose ZF groups ($P < 0.01$). Meanwhile, protein expressions of TLR2 and TLR4, as well as NF- κ B also obviously decreased ($P < 0.05$). Conclusion ZF had analgesic effect, which might be probably related to inhibiting proliferation and activation of gliocytes, as well as activation of TLRs and NF- κ B.

KEYWORDS bone cancer pain; Zhixin Formula; glial fibillary acidic protein; microglia; Toll like receptor; nuclear factor κ B

目前癌症的发病率呈现出上升的趋势,大多数癌症患者的首发症状就是疼痛,75%~95%的晚期癌症患者都承受着难以忍受的剧烈疼痛^[1,2]。据估计约有1/3的晚期癌症患者都会发生骨转移^[3]。与此同时随着诊断技术的进步及治疗方案的改良,恶性肿瘤患者病死率明显降低,生存时间显著延长,因此如何改善癌症患者的生活质量成为当前亟待解决的问题。芷辛方由白芷、细辛、川芎等药物组成,具有温经通络、活血化瘀、祛风止痛的功效。芷辛方是河南省中医药研究院研究员张海岑根据家族传承的经验方和中医理论结合的成果,在临床上用于治疗神经性疼痛^[4],其效果显著。本研究通过观察芷辛方干预后骨癌痛模型大鼠的行为学以及髓内胶质细胞蛋白[胶质原纤维酸性蛋白(glia fibillary acidic protein, GFAP); CD11b]、Toll受体(Toll-like receptors, TLRs)和核因子 κ B(nuclear factor-kappa B, NF- κ B)表达影响,进一步探讨其可能的作用机制。

材料与方法

1 动物及分组 雌性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 10 只(体重 60~80 g),雄性 SD 大鼠 90 只(体重 150~180 g),购自南京中医药大学实验动物中心[动物生产许可证号 SCXK(浙)2008-0033]。其中雌性大鼠 10 只用来嫁接含有 Walker256 的腹水瘤实验,雄性大鼠 90 只用来制作骨癌痛的造模实验。预实验将 20 只 SD 雄性大鼠随机分为空白组(10 只)、模型组(10 只),进行实验造模,造模成功后,依照此法

将 70 只雄性 SD 大鼠随机分为 7 组(每组 10 只)。空白组(10 只)、骨癌痛模型组(简称模型组,10 只)、西药盐酸曲马多对照组(简称西药对照组,10 只)、芷辛方高、中、低剂量组(每组各 10 只)、中药五灵止痛胶囊对照组(简称中药对照组,10 只)。动物饲养于 12 h 昼夜交替,室温(24 ± 0.5) $^{\circ}\text{C}$ 环境中自由摄食和饮水。让大鼠在此环境中适应 7 天后进行实验。

2 细胞株 Walker 256 肿瘤细胞株由南京中医药大学新药与海洋药物研究中心提供。

3 药物 芷辛方:白芷 12 g 细辛 3 g 川芎 9 g 蜈蚣 3 g 白芍 6 g 乳香 6 g 附子 3 g 甘草 3 g,生药由南京中医药大学附属医院中药房提供,南京中医药大学药学院制剂中心用水提法制备浓缩含生药 2.25 g/kg 的药液;盐酸曲马多(50 mg,北京四环医药科技股份有限公司,批号:H10960043);五灵止痛胶囊(五灵脂、蒲黄、冰片。每粒 0.3 g,相当于原药材 0.5 g,广州中一药业有限公司,批号:Z44022539)。

4 试剂及仪器 逆转录酶 M-MLV 和 Oligo(d_T)引物(美国 Promega 公司);PCR 所需试剂(日本 TaKaRa 公司);兔抗大鼠 NF- κ B 单克隆抗体(美国 Cell Signal 公司);过氧化物酶标记的羊抗兔二抗(丹麦 Dako 公司);兔抗大鼠 GAPDH 单克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司;SC-8008);Envision 免疫组化检测试剂盒(福建迈新生物技术有限公司, MAB-0582)。

5 模型制备 参照 Medhurst SJ^[5]等报道的方

法建立骨癌痛模型。首先用 10% 水合氯醛 (3 g/kg) 对大鼠进行腹腔注射。待大鼠麻醉后,将其仰卧位固定于操作台上。按照大鼠实验操作标准的动物角反射消失以及动物脚趾对有齿镊钳夹无反应为标准。将大鼠小腿左侧后肢部位剃毛,并对手术部位胫骨消毒。对手术胫骨上段部位进行切开,小心暴露胫骨骨面。用牙科钻头对胫骨轻柔打孔,打孔完毕后,用微量注射器针头试探是否通畅,再用 25 μ L 微量注射器进入骨髓腔,缓慢注入 10 μ L 含有 Walker 256 传代大鼠腹水瘤的悬置细胞 3×10^3 ,注射完毕后用骨蜡快速封闭钻孔处,并用 75% 乙醇和生理盐水冲洗。伤口进行分层缝合后在创口处撒少许青霉素以防感染。

6 给药方法 造模 14 天后开始灌胃,每天 1 次,连续 7 天。参照《中药药理实验方法学》^[6] 给药量按人与动物表面积折算, $D_B = D_A \times \frac{R_A}{R_B} \left(\frac{W_B}{W_A} \right)^{\frac{1}{3}}$ 。 D_A 、 D_B 是 AB 两种动物的每千克体重的剂量。 R_A 、 R_B 是动物的体形系数, R 与表面积 (m^2) / 体重 (kg) 的 $1/3$ 次方成正比。 W_A 、 W_B 是动物的体重 (kg) 数值。

西药对照组盐酸曲马多按照给药体积 1 mL 浓度为 0.01 g/kg; 中药对照组五灵止痛胶囊按照给药体积 1 mL 浓度为 0.06 g/kg; 芷辛方中剂量组的给药量约为每只 4.5 g/kg 生药,上下各取 1 个剂量,芷辛方低剂量组每只为 2.25 g/kg 生药和芷辛方高剂量组 9 g/kg 生药。

7 观察指标及方法

7.1 疼痛行为学评估 对两组大鼠进行日常的观察和注意,并在手术的第 0、4、7、11、14、17、21 天进行体重、走路姿态等相关测试评分。测试的时间限定为 9:00 ~ 16:00。骨癌痛的模型评估包括除了行为学测试以外的 X 摄片和 HE 染色等方法。

7.2 行为学 大鼠的行为学测定包括大鼠自发性运动疼痛评分 (spontaneous ambulatory pain score, SAPS)、热板法测量热刺激和触诱发痛阈值的测定。

7.2.1 大鼠 SAPS 将大鼠置于光滑平台面任意自由走动,观察术后走路的姿态、手术侧着地情况、脚趾负重的程度,并进行评分 (0 ~ 3 分之间)^[7]。

7.2.2 热痛觉过敏实验 (paw withdrawal latency, PWL) 先将热板设定为 (48 ± 0.1) $^{\circ}\text{C}$ 后将大鼠置于在热板上,在 20 s 之内对其大鼠出现的抬腿、逃跑和舔后足的潜伏期值作为痛阈值。为了防止烫伤,将 PWL 的上限值定为 20 s。

7.2.3 触诱发痛阈值测定 (paw withdrawal

threshold, PWT) 将大鼠放入底部为金属筛网的有机玻璃笼中,用 Von Frey 丝垂直刺激大鼠后肢足底中部,当大鼠出现抬足或添足反应行为视为阳性,否则为阴性反应^[8]。用 0.4、0.7、1.2、3.6、5.5、8.5、15.0 g 7 种毛针,先采用 2.0 g 毛针刺激,上下法,直至出现大鼠出现阳性反应,则记录相应的数值,设置截断值为 15.0 g,两次试验之间至少间隔 5 min,连测 4 次取平均值。

7.3 观察骨破坏 于造模后第 18 天分别随机抽取每组大鼠,进行 X 线摄片,评估肿瘤诱发的骨破坏程度。

7.4 观察骨质 取成功造模后各组的大鼠手术侧后肢,并将胫骨和少数软组织固定于甲醛液中,再用甲酸复合脱钙液脱钙后石蜡切片,HE 染色,观察其骨质变化。

7.5 观察髓内角质细胞蛋白 GFAP 表达 采用免疫组化。腹腔注射 10% 水合氯醛 400 mg/kg 麻醉下开胸,经左心室插管至升主动脉,生理盐水冲净血液后以 4% 多聚甲醛 400 mL 灌注固定。取脊髓 L4 ~ L5 段背角。组织标本经 4% 多聚甲醛固定后,常规脱水,石蜡包埋。石蜡切片常规脱蜡至水。先 PBS 洗 3 次,每遍 5 min。再用蒸馏水或 PBS 配置新鲜的 3% H_2O_2 室温封闭 10 min,蒸馏水洗 1 次。进行抗原修复,然后用 PBS 洗 5 min。甩去多余液体滴加一抗室温下孵育 60 min 或 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜 (过夜后在 37 $^{\circ}\text{C}$ 复温 45 min)。先用 PBS 洗 3 次各 5 min,甩去 PBS 液,每张切片加 50 μ L 聚合物增强剂 (试剂 A),室温下孵育 20 min。PBS 洗 2 次各 5 min 甩去 PBS 液,每张切片加 50 μ L 酶标抗鼠/兔聚合物 (试剂 B),室温下孵育 30 min。PBS 洗 2 次各 5 min 甩去 PBS 液,每张切片加 100 μ L 新鲜配制的 DAB 溶液,显微镜下观察 3 ~ 10 min,阳性显色为棕色。蒸馏水洗终止染色,苏木素复染,0.1% 盐酸分化,自来水冲洗,PBS 冲洗返蓝。最后梯度酒精脱水,透明,封片。每张切片取 5 个高倍视野,用 Image Pro Plus 5.0.2 图像分析软件测定各组光密度值。

7.6 观察 CD11b、TLR2 及 TLR4 蛋白表达 采用逆转录 - 聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测。Trizol Reagent 法从脊髓背角组织中提取 RNA,260 nm 下测定所提取的 RNA 的紫外吸收 OD 值及 RNA 含量。取 0.1 μ g RNA 加入 1 μ L 的 Oligo (d_T)₁₅, -37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 5 min 后,立刻取出至冰上冷却,加入 5 $\times$ RT buffer 5 μ L, dNTP 1.25 μ L, Rnase inhibitor 0.625 μ L, M-MLV 反转录酶 1 μ L,加入 ddH₂O 至反转录体系总

体积为 25 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 60 min, 再 70 $^{\circ}\text{C}$ 15 min 灭活反转录酶的活性, 反转录成 cDNA 之后 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。引物的设计以及目的基因在目的组织中的 PCR 扩增在 Genebank 里面找到目的基因的全序列(或者 mRNA 序列), 用 Primer5 软件设计相关引物。引物序列以及 PCR 产物大小: TLR2: Forward: 5'-ACACTTGGACTTGTCTAATAAT-3', Reverse: 5'-GTTACCGTTTCTACTTTACCT-3'; TLR4: Forward: 5'-CTTTCCTGCCTGAGACCA-3', Reverse: 5'-A GATTATGAGCCACATTTAGT - 3'; CD11b: Forward: 5'-TCTGGCGACAGTCCTAAC-3', Reverse: 5'-CACCAAAC TTTTCTCCGT-3'; GAPDH: Forward: 5'-TCAACGGCACAGTCAAGG-3', Reverse: 5'-ACCAGTGGATGCAGGGAT-3'; PCR 体系: 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 54 $^{\circ}\text{C}$ 35 s, 35 cycles, 72 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。PCR 产物电泳用 PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 在凝胶影像分析仪(Bio-Rad ChemiDoc XRS)上进行成像, 并对条带进行吸光度分析。计算待测基因与 GAPDH 的比值, 从而得到待测基因的相对表达值。结果经 Image J 软件处理, 分析空白组和模型组条带与各对照组条带面积、灰度比值。

7.7 观察脊髓 NF- κ B 表达变化 采用 Western blot 检测。大鼠处死后, 取脊髓 L4 ~ L5 段背角称重, 加入裂解液(80 mg/L), 置冰浴中匀浆机匀浆 15 ~ 20 s, 静置 30 min, 16 000 r/min 离心, 4 $^{\circ}\text{C}$, 20 min, 将上清液取至新的 EP 管中 100 $^{\circ}\text{C}$ 加热 5 min, BCA 蛋白含量测定。将大鼠脊柱骨用液氮研磨后加入 RIPA (含 PMSF 蛋白酶抑制剂) 置于冰上裂解, 并将裂解后的蛋白样品转移至 100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴加热 5 min 使蛋白变性。Bio-Rad DC Protein Assay Kit 蛋白定量, 统一总蛋白上样量为 40 μg 。SDS-PAGE 蛋白电泳后将 gel 转移至 PVDF 膜上, 恒流 200 mA 湿转 1 h 45 min。将转膜后的 PVDF 膜 blocking 室温 1 h (blocking buffer: PBST + 5% 脱脂奶粉), 加 Anti-NF- κ B (兔抗鼠) 按说明书 1:1 000 稀释, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。弃一抗, 用 PBS-T 洗膜 3 次, 10 min/次, 加入 Anti-rabbit 二抗(1:5 000 稀释), 室温孵育 1 h。弃二抗, PBS-T 洗去多抗抗体, 3 次,

10 min/次, 加入 ECL-plus 发光显示液体, 曝光。电泳条带经 Image J 软件处理, 分析空白组、模型组条带与各对照组条带面积、灰度比值。

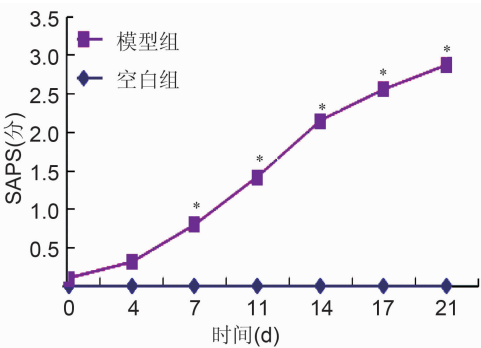
8 统计学方法 应用 SPSS 17.0 统计软件进行统计分析。计量数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较, 采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD 检验, 若方差不齐则采用 Tamhane 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1 一般情况 通过影像学 and 病理学检测到模型组未成功的大鼠 4 只, 致瘤率为 94.3%。直至观察期满结束时, 剩余每组大鼠各为: 空白组 10 只, 模型组 8 只, 西药组 8 只, 中药组 10 只, 芷辛方高剂量组 10 只, 芷辛方中剂量组 10 只, 芷辛方低剂量组 10 只。以上各组的生长环境相同, 模型组和西药组术后的大鼠活动明显下降, 精神长期处于低靡昏睡中, 毛色暗淡无光, 饮食明显减少, 术后 1 周左右开始出现跛行, 并且左后肢明显突肿。模型组少数的大鼠鼻子周围可以见到少量出血并有血块结痂。芷辛方高、中、低治疗组明显好于模型组, 饮食活动明显多余模型组。

2 空白组与模型组不同时间的体重变化比较 (表 1) 与空白组比较, 模型组体重增加迟缓并呈下降趋势, 差异均有统计学意义(P < 0.01)。

3 两组大鼠 SAPS 比较 (图 1) 与空白组比较, 模型组 SAPS 明显上升。两组比较, 差异有统计学意义(P < 0.01)。



注: 与空白组同期比较, *P < 0.01

图 1 两组术后大鼠 SAPS 比较

表 1 空白组与模型组不同时间的体重变化比较 (g, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	体重						
		0	4	7	11	14	17	21 (d)
空白	10	171.3 ± 11.7	175.5 ± 15.8	180.2 ± 22.9	185.7 ± 13.8	191.6 ± 25.1	197.3 ± 18.9	213.3 ± 12.6
模型	56	169.4 ± 20.1	168.1 ± 11.4 *	171.6 ± 25.7 *	163.7 ± 14.4 *	165.7 ± 17.5 *	167.2 ± 12.6 *	166.5 ± 20.7 *

注: 与空白组同期比较, *P < 0.01

4 两组大鼠 PWL 比较(图 2) 两组大鼠术后 PWL 比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。

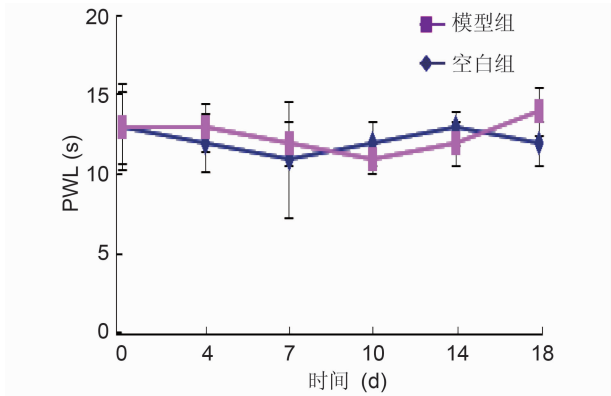
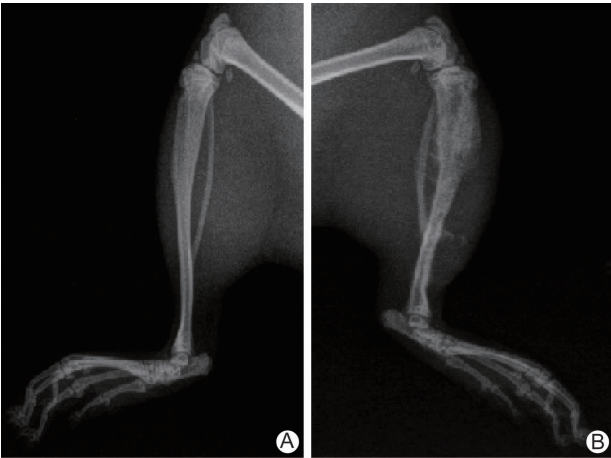


图 2 两组大鼠 PWL 比较

5 两组大鼠 PWT 比较(表 2) 大鼠肿瘤细胞接种后 7 天时,PWT 开始降低($P<0.05$),且呈现下降趋势($P<0.01$)。

6 两组大鼠胫骨的 X 线影像比较(图 3) 与 A 组比较,B 组的骨结构发生明显改变和破坏。模型大鼠胫骨骨质密度不均匀,并伴有缺失,骨皮质缺损,周围组织肿胀。而 A 组大鼠为正常骨组织影像,骨质密度均匀,骨皮质连续,无缺失。

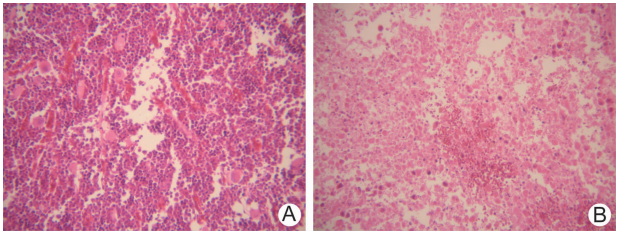
7 两组大鼠胫骨病理学变化比较(图 4) A 组



注:A 为空白组;B 为模型组

图 3 两组大鼠胫骨 X 线影像比较

大鼠胫骨结构正常。而 B 组有明显痛行为学改变史,局部骨组织有明显肿胀,影像学有明显骨质破坏将大鼠进行病理切片,HE 染色见肿瘤细胞充满骨髓腔,骨小梁广泛破坏,正常骨结构缺失,严重的肿瘤细胞穿破骨皮质,侵及周围肌肉和软组织。



注:A 为空白组;B 为模型组

图 4 两组大鼠胫骨病理学变化 (HE 染色, $\times 200$)

8 各组 GFAP 免疫组化结果比较(图 5) 与 A 组比较,B 组大鼠的脊髓背角星形胶质细胞标记蛋白 GFAP 存在明显的被激活,脊髓 GFAP 染色阳性细胞增多,颜色更深,突起显著增多。

9 各组 CD11b、TLR2 及 TLR4 蛋白水平比较(图 6,表 3) 与空白组比较,模型组 CD11b、TLR2、TLR4 差异有统计学意义($P<0.01$)。与模型组比较,西药对照组,芷辛方中、高剂量组小胶质细胞的标志性蛋白 CD11b 差异有统计学意义($P<0.01$);芷辛方高、中剂量组、西药对照组 TLR2 蛋白水平差异亦有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$);西药对照组及芷辛方高、中、低剂量组 TLR4 蛋白水平差异均有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$)。

10 各组 NF- κ B 蛋白表达比较(图 7,表 4) 模型组的 NF- κ B 蛋白水平明显高于空白组表达($P<0.01$)。而芷辛方高、中剂量组低于模型组表达($P<0.05$)。

讨 论

胫骨模型的方法是 2002 年由 Medhurst SJ^[5]等首先报道的(多选用大鼠接种同系乳腺癌细胞)。有资料显示乳腺癌与肺癌、前列腺癌等在临床上是常见的容易发生骨转移引起骨癌痛的肿瘤,因此以 Walker

表 2 两组大鼠 PWT 比较 (g, $\bar{x}\pm s$)

组别	n	PWT						
		0	4	7	11	14	17	21 (d)
空白	10	5.43 $\pm$ 0.18	5.51 $\pm$ 0.22	5.33 $\pm$ 0.23	5.62 $\pm$ 0.14	5.56 $\pm$ 0.21	5.34 $\pm$ 0.21	5.55 $\pm$ 0.12
模型	56	5.53 $\pm$ 0.21	5.21 $\pm$ 0.18	4.32 $\pm$ 0.15 *	3.89 $\pm$ 0.12 **	3.41 $\pm$ 0.13 **	2.87 $\pm$ 0.08 **	1.43 $\pm$ 0.06 **

注:与空白组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

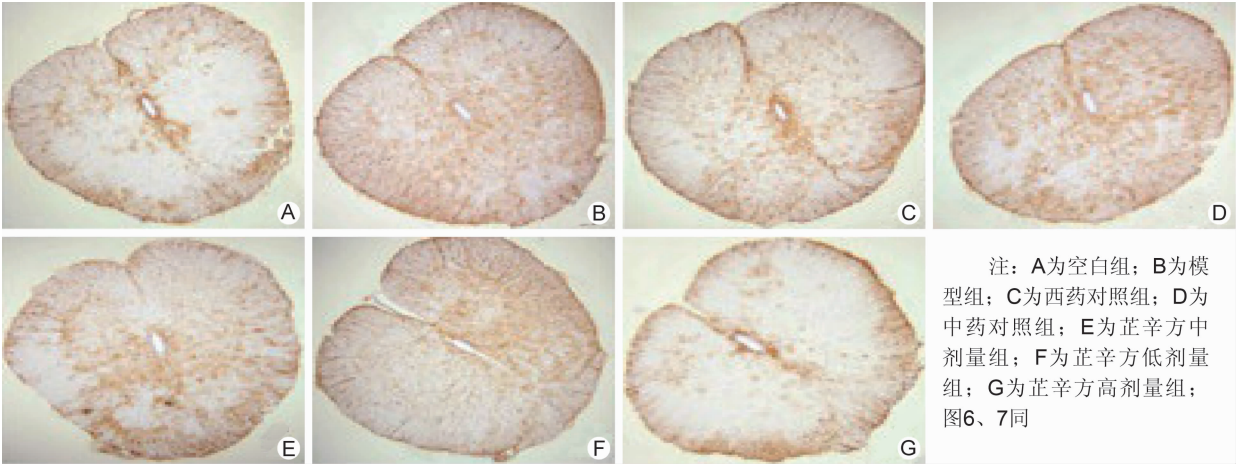


图 5 各组 GFAP 免疫组化结果 (×400)

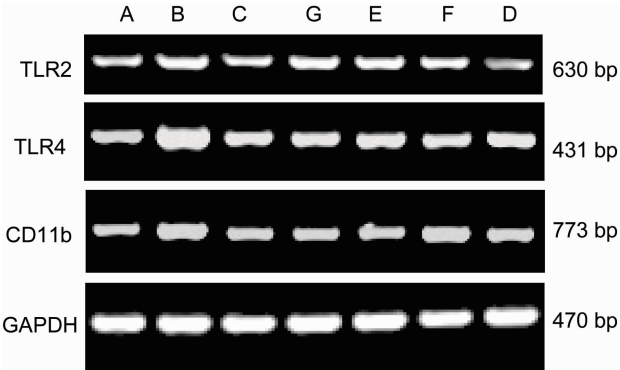


图 6 各组 CD11b、TLR2 及 TLR4 蛋白电泳图

表 3 各组 CD11b、TLR2 及 TLR4 蛋白水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	CD11b	TLR2	TLR4
空白	10	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000
模型	8	2.734 ± 0.393 *	2.075 ± 0.127 *	2.589 ± 0.599 *
西药对照	8	1.164 ± 0.057 $\Delta\Delta$	1.160 ± 0.194 $\Delta\Delta$	1.345 ± 0.112 $\Delta\Delta$
芷辛方高剂量	10	1.269 ± 0.063 $\Delta\Delta$	1.272 ± 0.389 $\Delta\Delta$	1.274 ± 0.057 $\Delta\Delta$
芷辛方中剂量	10	1.350 ± 0.021 $\Delta\Delta$	1.309 ± 0.075 Δ	1.367 ± 0.239 $\Delta\Delta$
芷辛方低剂量	10	1.708 ± 0.620	1.547 ± 0.300	1.416 ± 0.658 Δ
中药对照	10	1.506 ± 0.071	1.431 ± 0.048	1.378 ± 0.253

注:与空白组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

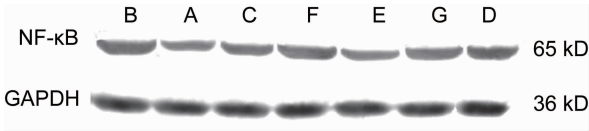


图 7 各组 NF-κB 蛋白电泳图

表 4 各组 NF-κB 蛋白水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	NF-κB
空白	10	1.000 ± 0.000
模型	8	1.398 ± 0.012 *
西药对照	8	1.238 ± 0.039
芷辛方高剂量	10	1.114 ± 0.013 Δ
芷辛方中剂量	10	1.178 ± 0.008 Δ
芷辛方低剂量	10	1.310 ± 0.078
中药对照	10	1.300 ± 0.090

注:与空白组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$

等方法,验证大鼠胫骨癌痛的模型,其结果和以往实验结果大致相同。

近年研究表明癌痛时脊髓背角星形胶质细胞显著增生肥大^[10]。Zhang RX 等^[11]发现骨癌痛小鼠存在星形胶质细胞的广泛激活。实验结果显示 GFAP 表达增加主要由星形胶质细胞肥大引起,骨癌痛时脊髓星形胶质细胞显著增生肥大。根据以往的研究提示,星形胶质细胞与神经痛密切相关^[12,13],这一现象在炎症痛中比较罕见,在神经痛模型上只有外周神经严重损伤时才会出现。在本实验中通过 RT-PCR 检测 CD11b 表达变化发现芷辛方中、高剂量组与模型组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$)。星型胶质细胞的标志性蛋白 GFAP 的激活在芷辛方中、高剂量组明显被抑制。近来的研究发现,脊髓星型胶质细胞和小胶质细胞的增殖活化参与痛觉过敏和痛觉超敏的形成从而调控骨癌痛病理性疼痛过程。在多种病理性疼痛模型中,选择性抑制小胶质细胞功能的药物米诺环素,它能够阻断伤害性感受所致的疼痛放大状态,而对于已经建立的疼痛过敏或疼痛超敏产生逆转^[14]。由此推测,小胶质细胞在伤害性刺激疼痛放大阶段起着关键的作用。而星形胶质细胞对慢性疼痛的有着可以逆转

256 细胞建立大鼠的骨转移性癌痛模型,具有临床研究价值^[9]。本实验通过对大鼠痛行为学测试、胫骨 X 摄片、HE 染色和免疫组化星型胶质细胞的标志性蛋白

的功能。进一步揭示芷辛方对角质胶质细胞的有效抑制从而治疗骨癌痛的发生和发展。

TLRs 不但是参与固有免疫的主要受体之一,而且在获得性免疫和固有免疫之间起着桥梁作用^[15],参与天然免疫的主要是 TLR2 和 TLR4 并呈限制性表达,存在于树突状细胞、多形核白细胞和巨噬细胞中。由于 TLRs 是炎症信号传递的门户蛋白,在免疫防御反应中起重要作用,所以日益被人们所关注^[16,17]。在人类中枢神经系统(central nervous system, CNS)中 TLRs 广泛表达,有文献报道,TLR1~9 mRNA 表达小胶质细胞上^[18,19]。CNS 中小胶质细胞主要表达 TLR2、TLR4^[20,21]。本实验中 TLR4 的 RT-PCR 结果显示,模型组大鼠与空白组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$),与芷辛方高、中、低剂量组比较,差异亦有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$),被激活的 TLR4 经过分化因子 88 (myeloid differentiation factor 88, MyD88) 依赖途径或者 MYD88 非依赖途径而激活不同的下游信号,最终活化 NF- κ B 等转录因子,模型组的 NF- κ B/GAPDH 的蛋白水平明显要高于空白组($P < 0.01$),诱发趋化炎症细胞的释放,并于其他疼痛相关介质共同产生中枢敏化,造成痛敏的发生。

NF- κ B 从 B 细胞核抽提物中发现的一种核蛋白因子^[22],是一种可与免疫球蛋白的轻链基因增强 κ B 序列特异结合,调控着细胞因子、炎症因子、趋化因子在内等多种炎症介质的基因表达。也是先天免疫核特异性免疫的跨膜受体 TLR4 与配体结合后的终端激活产物。被激活的 NF- κ B 可以调控炎症和免疫相关基因的表达。据报道,神经病理大鼠模型疼痛的产生和持续都与大鼠的 NF- κ B 活化有着密切的关系^[23-25]。本研究的实验结果显示,模型组的 NF- κ B/GAPDH 的蛋白水平明显要高于空白组,芷辛方中、高剂量可降低 NF- κ B/GAPDH 的表达($P < 0.05$)。

中医学未曾有“骨癌痛”病名,但其骨癌痛相似症状的记载。中医学认为导致癌症疼痛的原因不外乎有六淫邪毒,七情内伤,饮食失调,正气亏虚、脏腑功能紊乱等。而气滞血瘀、寒凝血癖、痰湿凝聚、气血亏虚、阴寒内阻证是骨癌痛的常见证型。芷辛方具有温经通络、活血化瘀、祛风止痛、温阳通痹的功效。根据现代药理学证实,止痛活血化瘀中药不仅可以降低血小板聚集性和黏附性还能降低纤维蛋白原,具有抗炎、镇痛、抑制免疫的作用^[26]。本实验进一步提示芷辛方可以抑制胶质细胞 TLR2、TLR4 和 NF- κ B 蛋白的激活,阻断由此引起的痛觉敏化而起到抗癌痛作用。为临床应用芷辛方治疗骨癌痛提供了实验数据,但是芷

辛方具体有效成分及抑制胶质细胞以及 TLRs-NF- κ B 转导信号通路蛋白增殖的具体机制仍需进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Mercadante S, Arcuri E. Breakthrough pain in cancer patients: pathophysiology and treatment [J]. *Cancer Treat Rev*, 1998, 24(6): 425-432.
- [2] Portenoy RK, Payne D, Jacobsen P. Breakthrough pain: characteristics and impact in patients with cancer pain [J]. *Pain*, 1999, 81(1-2): 129-34.
- [3] Thurlimann B, de Stoutoutz ND. Causes and treatment of bone pain of malignant origin [J]. *Drugs*, 1996, 51(3): 383-398.
- [4] 张国泰, 赵一, 刘方舟, 等. “三叉神经痛可停”治疗原发性三叉神经痛的临床研究 [J]. *世界中西医结合杂志*, 2006, 1(1): 49-50.
- [5] Medhurst SJ, Walker K, Bowes M, et al. A rat model of bone cancer pain [J]. *Pain*, 2002, 96(1-2): 129-140.
- [6] 陈奇主编. 中药药理实验方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1994: 55.
- [7] Luger NM, Sabino MA, Sehwei MJ, et al. Efficacy of systemic morphine suggests a fundamental difference in the mechanisms that generate bone cancer vs inflammatory pain [J]. *Pain*, 2002, 99(3): 397-406.
- [8] Vivancos GG, Verri WA Jr, Cunha TM, et al. An electronic pressure-meter nociception paw test for rats [J]. *Braz J Med Biol Res*, 2004, 37(3): 391-399.
- [9] Mantyh PW. Cancer pain and its impact on diagnosis, survival and quality of life [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2006, 7(10): 797-809.
- [10] Muta M, Matsumoto G, Nakashima E, et al. Mechanical analysis of tumor growth regression by the cyclooxygenase-2 inhibitor, DFU, in a Walker256 rat tumor model: importance of monocyte chemoattractant protein-1 modulation [J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(1): 264-272.
- [11] Zhang RX, Liu B, Wang L, et al. Spinal glial activation in a new rat model of bone cancer pain produced by prostate cancer cell inoculation of the tibia [J]. *Pain*, 2005, 118(1-2): 125-136.
- [12] Honre P, Roger SS, Schwei MJ, et al. Murine models of inflammatory, neuropathic and cancer pain each generates a unique set of neurochemical changes in the spinal cord and sensory neurons [J]. *Neuroscience*, 2000, 98(3): 585-598.
- [13] Watkins LR, Milligan ED, Maier SF. Glial activa-

- tion: a driving force for pathological pain [J]. Trends Neurosci, 2001, 24(8): 450-455.
- [14] Tikka TM, Koistinaho JE. Minocycline provides neuroprotection against N-methyl-D-aspartate neurotoxicity by inhibiting microglia [J]. Immunology, 2001, 166(12): 7527-7533.
- [15] Medzhitov R, Preston Hurlburt P, Janeway CA Jr, et al. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity [J]. Nature, 1997, 388(6640): 394-397.
- [16] Bohnenkamp HR, Papazisis KT, Burchell JM, et al. Synergism of Toll-like receptor-induced interleukin-12 p70 secretion by monocyte-derived dendritic cells is mediated through p38 MAPK and lowers the threshold of T-helper cell type 1 responses [J]. Cell Immunol, 2007, 247(2): 72-78.
- [17] Greene CM, Branagan P, McElvaney NG. Toll-like receptors as therapeutic targets in cystic fibrosis [J]. Expert Opin Ther Targets, 2008, 12(12): 1481-1495.
- [18] Jung DY, Lee H, Jung BY, et al. TLR4, but not TLR2, signals autoregulatory apoptosis of cultured microglia: a critical role of IFN β as a decision maker [J]. J Immunol, 2005, 174(10): 6467-6476.
- [19] Olson JK, Miller SD. Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs [J]. J Immunol, 2004, 173(6): 3916-3924.
- [20] 杨娟, 王国玮, 王振海. HCV 感染诱导 BV-2 细胞 TNF- α 分泌与 TLR2 mRNA 表达的关系 [J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志, 2011, 18(1): 20-23.
- [21] Laflamme N, Rivest S. Toll-like receptor 4: the missing link of the cerebral innate immune response triggered by circulating gamma-negative bacterial cell wall components [J]. Mol Immunol, 2005, 42(2): 155-163.
- [22] Mercurio F, Manning AM. Multiple signals covering on NF- κ B [J]. Curr Opin Cell Biol, 1999, 11(2): 226-232.
- [23] Ledeboer A, Gamanos M, Lai W, et al. Involvement of spinal cord nuclear factor B activation in rat models of proinflammatory cytokine-mediated pain facilitation [J]. Eur J Neurosci, 2005, 22(8): 1977-1986.
- [24] Luongo L, Sajic M, Grist J, et al. Spinal changes associated with mechanical hypersensitivity in a model of Guillain-Barre syndrome [J]. Neurosci Lett, 2008, 437(2): 98-102.
- [25] Fu ES, Zhang YP, Sagen J, et al. Transgenic inhibition of glial NF-kappa B reduces pain behavior and inflammation after peripheral nerve injury [J]. Pain, 2010, 148(3): 509-518.
- [26] 付焱, 运强. 身痛逐瘀汤结合唑来膦酸治疗骨转移癌痛疗效观察 [J]. 光明中医, 2008, 23(1): 48-49.

(收稿: 2013-12-18 修回: 2015-03-12)

中国中西医结合杂志社微信公共账号已开通

近日, 中国中西医结合杂志社已经开通微信公共账号, 可通过扫描右方二维码或者搜索微信订阅号“中国中西医结合杂志社”加关注。本杂志社将通过微信不定期发送《中国中西医结合杂志》、《Chinese Journal of Integrative Medicine》的热点文章信息, 同时可查看两本期刊的全文信息, 欢迎广大读者订阅。

