

引用:宋程,任丽芝,唐蔚,孔贤,赵磊. 益肾活血止痛方对骨癌痛大鼠脊髓星形胶质细胞活化及 p38 MAPK 的影响[J]. 湖南中医杂志,2022,38(6):184-188.

益肾活血止痛方对骨癌痛大鼠 脊髓星形胶质细胞活化及 p38 MAPK 的影响

宋程¹,任丽芝¹,唐蔚²,孔贤³,赵磊³

(1. 湖南省肿瘤医院,湖南 长沙,410013;

2. 湖南省中医药研究院附属医院,湖南 长沙,410006;

3. 湖南中医药大学,湖南 长沙,410208)

[摘要] 目的:探讨益肾活血止痛方的镇痛作用及对骨癌痛大鼠热缩足潜伏期(PWTL)、骨质破坏程度、骨密度及脊髓星形胶质细胞神经胶质纤维酸性蛋白(GFAP)和 p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38 MAPK)表达的影响。方法:将 40 只大鼠随机分为中药组(1.92 g/ml)、唑来膦酸组(30 μg/kg)、假手术组、模型组,每组各 10 只。于大鼠左后肢体注射 Walker-256 细胞建立骨癌痛模型,于造模后第 5 天开始给药,连续 21 d。并于造模后第 7、14、21 天检测 PWTL,于造模后第 22 天采用 X 线检查各组大鼠骨质破坏程度及骨密度,并提取大鼠脊髓腰膨大处,采用荧光定量 PCR 及 Western blot 分别检测 GFAP 和 p38 MAPK 在 mRNA 及蛋白的表达情况。结果:行为学评估提示,造模后 7、14、21 天,中药组及唑来膦酸组 PWTL 值均高于模型组($P < 0.05$)。中药组、唑来膦酸组及模型组大鼠胫骨出现不同程度骨质破坏,且大鼠胫骨骨密度及骨矿物质水平均较模型组高($P < 0.05$)。中药组和唑来膦酸组 GFAP mRNA、p-p38 MAPK mRNA 及相应的蛋白含量均低于模型组($P < 0.05$)。结论:益肾活血止痛方的止痛机制可能与抑制脊髓星形胶质细胞活化,阻断中枢痛觉敏化 MAPK 通路有关。

[关键词] 骨性癌痛;益肾活血止痛方;GFAP;p38 MAPK 通路;实验研究

[中图分类号]R285.5 **[文献标识码]**A **DOI:**10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2022.06.043

Effect of Yishen Huoxue Zhitong prescription on spinal astrocyte activation and p38 mitogen-activated protein kinase in a rat model of bone cancer pain

SONG Cheng¹, REN Lizhi¹, TANG Wei², KONG Xian³, ZHAO Lei³

(1. Hunan Cancer Hospital, Changsha 410013, Hunan, China;

2. The Affiliated Hospital of Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha 410006, Hunan, China;

3. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, Hunan, China)

[Abstract] Objective: To investigate the analgesic effect of Yishen Huoxue Zhitong prescription and its effect on paw withdrawal thermal latency (PWTL), degree of bone destruction, bone mineral density, and expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP) and p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) in spinal astrocytes in a rat model of bone cancer pain. Methods: A total of 40 rats were randomly divided into traditional Chinese medicine (TCM) group (1.92 g/ml), zoledronic acid group (30 μg/kg), sham-operation group, and model group, with 10 rats in each group. The rats were given the injection of Walker-256 cells at the left hindlimb to establish a model of bone cancer pain, and drug administration was started on day 5 after modeling and lasted for 21 consecutive days. PWTL was measured on days 7, 14, and 21 after modeling, and X-ray examination was performed

第一作者:宋程,男,医学博士,副主任医师,研究方向:恶性肿瘤的中西医结合防治

通信作者:唐蔚,女,医学硕士,主治医师,研究方向:恶性肿瘤的中西医结合防治,E-mail:173521216@qq.com

on day 22 to observe the degree of bone destruction and bone mineral density. Samples were collected from spinal cord lumbar enlargement, and quantitative real-time PCR and Western blot were used to measure the mRNA and protein expression levels of GFAP and p38 MAPK. Results: Behavioral assessment showed that the TCM group and the zoledronic acid group had a significantly longer PWTl than the model group on days 7, 14, and 21 after modeling ($P < 0.05$). Varying degrees of bone destruction were observed in the TCM group, the zoledronic acid group, and the model group, and compared with the model group, the TCM group and the zoledronic acid group had significantly higher bone mineral density and bone mineral levels in the tibia ($P < 0.05$). The TCM group and the zoledronic acid group had significantly lower mRNA and protein expression levels of GFAP and p38 MAPK than the model group ($P < 0.05$). Conclusion: Yishen Huoxue Zhitong prescription may exert an analgesic effect by inhibiting spinal astrocyte activation, blocking pain sensation of the central nervous system, and sensitizing the MAPK pathway.

[**Keywords**] bone cancer pain; Yishen Huoxue Zhitong prescription; glial fibrillary acidic protein; p38 mitogen-activated protein kinase pathway; experimental study

骨转移是恶性肿瘤常见的远处转移,晚期骨转移患者中有 1/3 患有骨性癌痛(bone cancer pain, CBP)^[1-2],其表现初期多为钝痛,疼痛可呈持续性、进行性加重,从而影响患者的生存质量。CBP 的发生与脊髓星形胶质细胞的激活密切相关,而脊髓星形胶质细胞激活与痛觉过敏、痛觉超敏成正相关^[3]。激活后的脊髓星形胶质细胞能释放大量神经胶质纤维酸性蛋白(GFAP),引起神经活性物质及多种促炎细胞因子分泌并参与疼痛信号的传导与调控,此外中枢痛觉敏化 P38 丝裂原活化蛋白激酶(p38 MAPK)信号通路被认为能促进神经胶质细胞活化而引发癌痛^[4]。目前针对 CBP 的治疗有放疗、二磷酸盐以及非甾体类及阿片类镇痛药、针灸等多种手段^[5],但长期应用患者不良反应较多,耐受性差。中药益肾活血止痛方由身痛逐瘀方加减化裁而来,临床治疗 CBP 疗效显著,患者依从性好,且毒副作用较小^[6]。本研究通过建立 Walker-256 乳腺癌细胞骨癌痛模型,采用行为学、影像学及分子生物学等方法研究益肾活血止痛方对乳腺癌骨转移癌痛相关脊髓星形胶质细胞活化以及对中枢痛觉敏化通路 MAPK 的影响。

1 实验材料

1.1 动物及细胞 SPF 级雌性 SD 大鼠 40 只,4~6 周龄,体质量(110~130)g,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供,动物合格证号:SCXK(湘)2011-0003。大鼠乳腺癌 Walker 256 细胞购自上海生物医学工程研究所。

1.2 药物 益肾活血止痛方:淫羊藿 15 g,补骨脂 15 g,骨碎补 10 g,桃仁 10 g,红花 10 g,当归 10 g,香

附 6 g,川芎 6 g,牛膝 10 g,半枝莲 15 g,白花蛇舌草 15 g,甘草 6 g。上述饮片购自湖南省中医药研究院附属医院门诊中药房,为同一批次同一产地药材,经湖南省中医药研究院附属医院药剂科药师鉴定,符合 2015 年版《中华人民共和国药典》规定。以上药物加入 10 倍量水浸泡 1 h,置于药罐中煎制 1 h,滤过,将滤液储存,再加入 8 倍量水,煎煮 1 h,滤过,将 2 次滤液合并,浓缩至 1.92 g/ml 生药,将药液储存于 4℃ 冰箱保存备用。唑来膦酸注射液(江苏正大天晴药业股份有限公司,批准文号:国药准字 H20041346)。取唑来膦酸 0.75 ml 溶于 200 ml 0.9%氯化钠注射液中,制成 3 μg/ml 溶液,并且每 24 h 更换新配制的溶液。

1.3 主要试剂及仪器 RPMI 1640 细胞培养基(Hyclone 公司,批号:31800);胰酶溶液(Hyclone 公司,批号:00742);胎牛血清(FBS,Gibco 公司,批号:201508);青霉素/链霉素溶液(Gibco 公司,批号:15140);胶质纤维酸性蛋白(GFAP)抗体(Cell Signaling Technology 公司,批号:12389T);磷酸化 P38 丝裂原活化蛋白激酶(p-p38 MAPK)抗体(Cell Signaling Technology 公司,批号:9215S);甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(Cell Signaling Technology 公司,批号:10900R);山羊抗小鼠二抗(美国 Proteintech,批号:SA00001-1);RT-PCR 试剂盒(Takara 公司,批号:RR047);戊巴比妥钠(Sigma 公司,批号:P3761)。

CB160 型二氧化碳(CO₂)培养箱(德国 Binder 公司),Z32HK 型冷冻高速离心机(德国 Hermle 公司),IX37 型倒置显微镜(Olympus 公司),PLX8200

医用 X 光机(南京普爱医疗器械公司), JY2002 电子天平(上海精密科学仪器有限公司), Prodigy 双能 X 线骨密度仪(美国 GE 公司), 电泳仪(美国 Bio-rad 164-5050), 电泳槽(北京六一 DYCZ-24EN), 转膜仪(北京六一 DYCZ-40A), 荧光定量 PCR 仪(美国 Thermo SPL0960)。

2 实验方法

2.1 模型制备 参照文献[7]制备骨癌痛大鼠模型。大鼠乳腺癌 Walker 256 细胞采用 RPMI 1640 细胞培养基, 在 37℃、5%CO₂ 的环境下进行培养, 细胞贴壁并长满后进行传代, 配制成浓度 1×10⁶ 个/ml 的细胞悬液备用。将大鼠腹部向上置于鼠板上, 将左后肢皮毛用 0.9% 氯化钠注射液湿润后剪毛, 75% 乙醇消毒; 用手术刀片切开胫骨上部的皮肤和肌肉, 切口长度约 1cm, 暴露出左侧胫骨内侧; 在膝关节以下约 5mm 处的胫骨内侧面, 先用 21G 针头穿刺打孔, 针头穿透骨皮质进入骨髓腔后, 使用微量注射器吸取配制好的大鼠乳腺癌 Walker 256 细胞悬液 3μl(假手术组予以 0.9% 氯化钠注射液 3μl), 缓慢注入大鼠胫骨骨髓腔内; 撤出注射器后迅速用骨蜡密封针孔, 以防癌细胞悬液从骨髓腔溢出; 缝合肌肉和皮肤。

2.2 分组与给药 将 40 只大鼠按照随机数字表法随机分为中药组、西药组、假手术组、模型组, 每组各 10 只。各组大鼠均于造模后第 5 天开始给药。中药组: 益肾活血止痛方 0.5 ml, 灌胃, 每天 1 次; 西药组: 于造模后第 5、7、9、12、14、16、19 天腹腔注射唑来膦酸, 每次 30 μg/kg; 假手术组及模型组: 0.9% 氯化注射液 0.5 ml, 灌胃, 每天 1 次。各组干预时间均为 21 d。

2.3 指标观察与检测

2.3.1 行为学评估 采用热缩足潜伏期(PWTL)方法评估。用热辐射刺激仪检测, 将大鼠放置于底层为 3 mm 厚玻璃板的有机玻璃箱中。将热辐射刺激仪的光透过玻璃板聚焦在大鼠右后肢脚掌中心皮肤。大鼠被照射肢体出现特征性抬起或回缩认为是阳性, 记录时间(s), 即 PWTL。切断时间定为 15 s, 防止组织损伤。每只大鼠测试 5 次, 每次间隔 5 min, 取平均值。于造模后第 7、14、21 天检测并记录。

2.3.2 大鼠胫骨 X 线片检查 造模第 22 天, 各组

大鼠采用 0.45% 戊巴比妥钠(10 ml/kg) 进行腹腔麻醉, 在医用 X 光诊断系统的拍摄台上进行 X 线摄片, 电压 50 KV, 曝光时间 2 ms。摄片后观察各组大鼠右侧胫骨骨质破坏情况。

2.3.3 胫骨骨密度和骨矿物质测定 将固定的大鼠后肢剥去皮肤和肌肉组织, 保留完整的胫骨和骨转移肿瘤。将待测标本置于一个盛满水的塑料盒中, 将塑料盒放于 Prodigy 双能 X 线骨密度仪的平台上, 使用该仪器对标本进行扫描, 然后用该系统配备的小动物软件计算骨密度和骨矿物质含量。

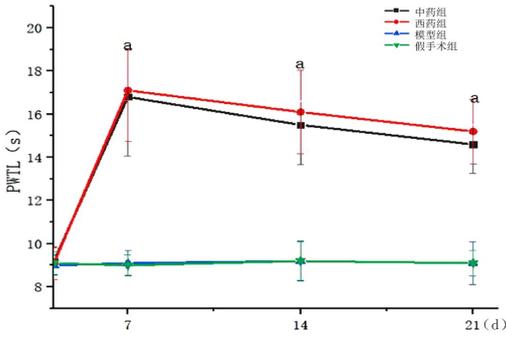
2.3.4 GFAP、p-p38 MAPK mRNA 表达的测定 采用荧光定量 PCR 测定。检测步骤: 1) 提取脊髓腰膨大组织总 RNA; 2) 分光光度法检测 OD 260 和 OD 280 吸光度, 计算提取标本总 RNA 的浓度和纯度; 3) 反转录试剂盒逆转录合成 cDNA; 4) RT-PCR 试剂盒进行 PCR 反应; 5) 引物设计采用 Primer 5.0 软件, 目的基因是 GFAP、p-p38 MAPK、GAPDH。引物设计和合成由上海吉凯基因科技有限公司完成。GFAP 引物: 上游 5'-GTGAAGGTCTATTCTGGTTGC-3'; 下游 3'-GTCTAGGCCGATACTCCGTACATG-5'。p-p38 MAPK 引物: 上游 5'-CCAGTGGCTGACCCTTATGA-3'; 下游 3'-CAGTGAAGTGGGATGGACAGAA-5'。GAPDH 引物: 上游 5'-GGCAAGTTCAACGGCACAG-3'; 下游 3'-CGCCAGTAGACTCCACGACAT-5'。结果用 2^{-ΔΔCt} 表示。

2.3.5 GFAP、p-p38 MAPK 蛋白表达的测定 采用 Western blot 测定。分别称取各组脊髓腰膨大组织 0.1 g, 用 PBS 洗涤 1 次后加入 200 μl RIPA 裂解液提取细胞总蛋白, 经过电泳及转膜后加入 100 ml/L 5% 脱脂奶粉, 封闭 60 min, 分别加入 GFAP、p-p38 MAPK、GAPDH 一抗体(稀释比例 1:200), 4℃ 过夜, TBS-T 洗涤 3 次后将稀释后的二抗(用封闭液稀释 HRP 标记的二抗, 稀释比例 1:3000)与膜共同孵育 60 min。TBS-T 洗涤 3 次后, 采用化学发光试剂曝光显影, 扫描底片, 分析条带灰度值。

2.4 统计学方法 采用 SPSS 23.0 软件进行数据分析。数值变量以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 方差齐采用 LSD 检验, 方差不齐采用 Dunnett 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 行为学评估结果 造模后第7、14、21天,中药组及西药组较模型组热痛觉阈值显著提高 ($P < 0.05$)。(见图1)



注:与模型组比较,^a $P < 0.05$ 。

图1 各组大鼠造模后第7、14、21天行为学变化

3.2 各组大鼠胫骨X线片检查结果 通过影像学检查发现,假手术组均为正常的骨结构,无明显骨质破坏;中药组及西药组、模型组均出现不同程度骨质破坏,其中模型组骨皮质侵蚀较重,出现病理性骨折,中药组和西药组骨皮质受损较轻。(见图2)



图2-1 模型组

图2-2 中药组



图2-3 西药组

图2-4 假手术组

图2 各组大鼠胫骨X线片检查结果

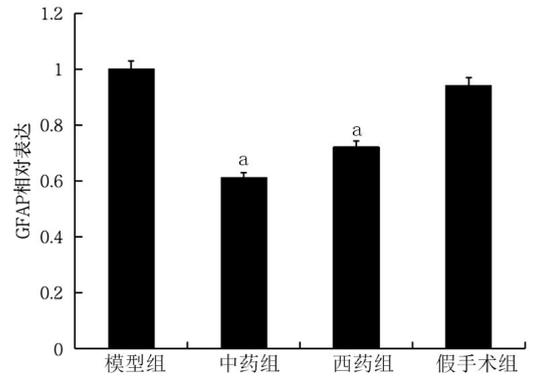
3.3 各组大鼠胫骨骨密度和骨矿物质水平比较 中药组和西药组大鼠胫骨骨密度及骨矿物质水平均较模型组升高 ($P < 0.05$)。(见表1)

3.4 各组大鼠GFAP、p-p38 MAPK mRNA表达比较 中药组和西药组GFAP、p-p38 MAPK mRNA表达均低于模型组 ($P < 0.05$)。(见图3、图4)

表1 各组大鼠胫骨骨密度和骨矿物质水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

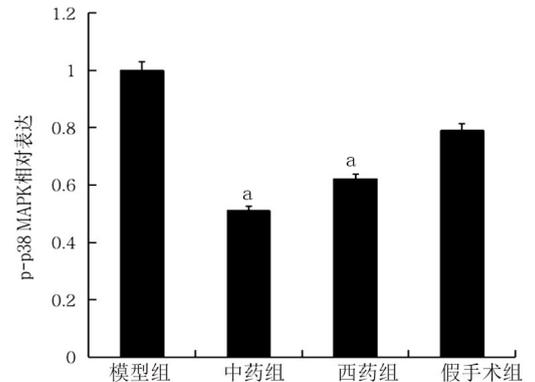
组别	只数	骨密度(g/cm^3)	骨矿物质(g)
假手术组	10	0.20 ± 0.02	3.69 ± 0.02
模型组	10	0.12 ± 0.01	3.09 ± 0.07
中药组	10	0.17 ± 0.01^a	3.42 ± 0.07^b
西药组	10	0.18 ± 0.02^a	3.65 ± 0.04^b

注:与模型组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$ 。



注:与模型组比较,^a $P < 0.05$ 。

图3 各组大鼠GFAP mRNA表达比较



注:与模型组比较,^a $P < 0.05$ 。

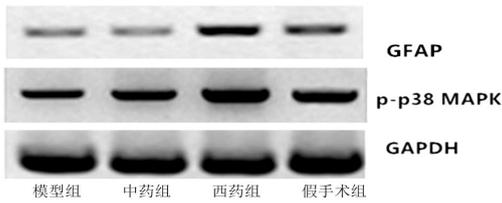
图4 各组大鼠p-p38 MAPK mRNA表达比较

3.5 各组大鼠GFAP、p-p38 MAPK蛋白表达比较 中药组和西药组GFAP、p-p38 MAPK蛋白表达均低于模型组 ($P < 0.05$)。(见表2、图5)

表2 各组大鼠GFAP、p-p38 MAPK蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	GFAP	p-p38 MAPK
假手术组	10	0.48 ± 0.03	1.04 ± 0.03
模型组	10	0.70 ± 0.05	1.16 ± 0.01
中药组	10	0.23 ± 0.02^a	0.60 ± 0.02^a
西药组	10	0.24 ± 0.02^a	0.61 ± 0.01^a

注:与模型组比较,^a $P < 0.05$ 。



注:GAPDH 为对照品。

图5 各组大鼠 GFAP、p-p38 MAPK 蛋白表达情况

4 讨论

骨转移瘤归属于中医学“骨蚀”“骨疽”“骨瘤”“骨痹”“石瘤”等范畴。《外科正宗·癭瘤论》载:“肾主骨,恣欲伤肾,肾火郁遏,骨无荣养而为肿,曰骨瘤”,指出肾虚是骨癌发生的发病基础,晚期肿瘤骨转移患者治疗当以补肾填髓、固护肾精为主。《灵枢·刺节真邪》载:“寒胜其热,则骨痛而肉枯,热胜其寒,则烂肉腐肌为脓,内伤骨,为骨蚀,以手按之坚,有所结,深中骨,气因于骨,骨与气并,日以益大,则为骨疽”,指出骨肿瘤疼痛的治疗当活血止痛。本研究中益肾活血止痛方由清代医家王清任《医林改错》身痛逐瘀汤加减化裁而来,既着重补肾气、温肾阳,又兼顾活血祛瘀解毒,以求攻补兼施,祛邪而不伤正,临床疗效显著。

目前研究认为,CBP 可由肿瘤压迫或浸润周围组织、肿瘤部位炎症、癌细胞释放等导致的神经纤维的病理活化所引起^[8]。在 CBP 的发展和维持中,脊髓胶质细胞(小胶质细胞和星形胶质细胞)具有重要作用,且在 Walker 256 乳腺癌细胞胫骨内注射骨癌痛模型中,星形胶质细胞激活更加明显^[9]。在病理性疼痛中,小胶质首先被激活细胞,而后活化的小胶质细胞再导致星形胶质细胞激活^[10]。GFAP 是仅存于中枢神经系统星形胶质细胞中的一种中间丝蛋白,可以作为星形胶质细胞活化的标志物。CBP 发作时 GFAP 蛋白表达增多^[11]。本课题组前期研究发现,益肾活血止痛方联合盐酸羟考酮较单用盐酸羟考酮能更好地减轻肾虚血瘀型骨转移癌痛^[6]。动物实验发现益肾活血止痛方能抑制大鼠骨转移瘤的生长^[7]。本研究发现益肾活血止痛方能减轻大鼠骨转移瘤热痛敏反应,抑制骨转移瘤骨质破坏,并显著降低骨转移癌痛大鼠星形胶质细胞活化标记物 GFAP mRNA 和相关蛋白的表达。此外,疼痛下的胶质细胞可通过胶质活化并表达 GFAP、改变胶质细胞内信号传递如 MAPK 的磷酸

化水平、调节受体与蛋白的表达合成和释放胶质源性介质等方式来调节疼痛^[12]。研究发现,在慢性疼痛中,p38 MAPK 表达增加,而 MAPK 为 CBP 的经典通路能在胶质细胞中被激活,并与产生某些促炎因子有关^[12-13]。本实验发现益肾活血止痛方可明显抑制 p-p38 MAPK mRNA 和蛋白表达,阻断由 MAPK 通路引起的中枢痛觉敏化,从而达到减轻疼痛的目的。由于 CBP 的产生机制非常复杂,益肾活血止痛方治疗 CBP 的具体机制还需后续实验进一步探究。

参考文献

- [1] AHMAD I, AHMED M M, AHSRAF M F, et al. Pain management in metastatic bone disease: A literature review [J]. Cureus, 2018, 10(9): e3286.
- [2] SULISTIO M, WOJNAR R, KEY S, et al. The role of methadone in cancer-induced bone pain: A retrospective cohort study [J]. Support Care Cancer, 2021, 29(3): 1327-1335.
- [3] 张文颖, 姜斌. 癌痛发生机制的研究进展 [J]. 现代肿瘤医学, 2019, 27(10): 1845-1848.
- [4] 金弘, 刘婷婷, 刘树民, 等. 电针联合身痛逐瘀胶囊改善慢性坐骨神经损伤模型大鼠疼痛及对 GFAP/p38 MAPK 信号通路的影响 [J]. 针灸临床杂志, 2020, 36(7): 70-74.
- [5] 张东鹏, 高杨杨, 孟伟宁. 骨癌疼痛的发生机制和治疗进展 [J]. 癌症进展, 2019, 17(13): 1506-1508.
- [6] 唐蔚, 潘博, 杨晓, 等. 益肾活血止痛方联合盐酸羟考酮缓释片治疗肾虚血瘀型骨转移癌痛临床观察 [J]. 湖南中医药大学学报, 2018, 38(7): 806-810.
- [7] 宋程, 潘博, 杨晓, 等. 益肾活血止痛方对骨转移癌大鼠胫骨组织 OPG、RANKL、RANK 表达的影响 [J]. 中医杂志, 2018, 59(15): 1323-1327.
- [8] ZAJACZKOWSKA R, KOCOT-KEPSKA M, LEPPERT W, et al. Bone pain in cancer patients: Mechanisms and current treatment [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(23): 233-235.
- [9] 杜俊英, 房军帆, 梁宜, 等. 基于脊髓层面的骨癌痛发生机制 [J]. 中国肿瘤, 2014, 23(10): 849-853.
- [10] WATKINS LR, HANSEN MK, NGUYEN KT, et al. Dynamic regulation of the proinflammatory cytokine, interleukin-1beta; Molecular biology for non-molecular biologists [J]. Life Sci, 1999, 65(5): 449-481.
- [11] 张建楠, 任炳旭, 倪坤, 等. 鞘内注射 AG-490 对骨癌痛小鼠脊髓水平星形胶质细胞活化和热痛觉的影响 [J]. 中南大学学报: 医学版, 2018, 43(11): 1182-1187.
- [12] 高永静, 纪如荣. 星形胶质细胞调节慢性疼痛的分子机制 [J]. 中国疼痛医学杂志, 2013, 19(9): 545-552.
- [13] ZHOU KX, HE XT, HU XF, et al. XPro 1595 ameliorates bone cancer pain in rats via inhibiting p38-mediated glial cell activation and neuroinflammation in the spinal dorsal horn [J]. Brain Res Bull, 2019, 149: 137-147.

(收稿日期: 2021-08-22)