

CQ 复方对骨癌痛模型大鼠的痛觉敏化干预作用及机制

张莹¹, 王志国², 欧阳竞锋², 李涛², 孙丹丹², 赵小亮², 焦玥²,
刘洋², 姜宇懋², 王丹巧^{2*}

(1. 首都医科大学 附属北京中医医院, 北京 100010; 2. 中国中医科学院 医学实验中心,
北京市中医药防治重大疾病基础研究重点实验室, 北京 100700)

[摘要] 目的:研究 CQ 复方对大鼠骨癌痛模型的痛觉敏化干预作用及其相关机制。方法:将雌性 Wistar 大鼠随机分为假手术组和手术组,分别进行操作对照和 Walker-256 乳腺癌细胞移植于胫骨的转移性癌痛造模手术。将造模成功的 40 只大鼠随机分为模型组,CQ 复方高、中、低剂量组(200,150,100 mg·kg⁻¹)及加巴喷丁组(100 mg·kg⁻¹),每组 8 只大鼠。以 Von frey 纤维丝测定的机械缩足阈值(mechanical withdrawal threshold,MWT)作为大鼠疼痛行为学评价指标;采用微透析分析仪检测脑脊液内谷氨酸(glutamate,Glu),放射免疫法检测脊髓 L4~L6 节段内 P 物质(substance P,SP)及 β-内啡肽(β-endorphin,β-EP)含量;采用 AimPlex 流式高通量多因子检测技术分析肿瘤局部组织中白细胞介素-12(interleukin-12,IL-12-P70),神经生长因子(β-nerve growth factor,β-NGF)含量。结果:与模型组相比,CQ 复方各组及加巴喷丁组均明显提高了大鼠的 MWT,前者投药 30 min 后 MWT 上升,60 min 升高最明显(P<0.05,P<0.01),CQ 复方高、中、低剂量组之间其阈值升高量效依赖关系,且连续 3 d 投药的镇痛效果强于第 1 次投药;与模型组相比,CQ 复方及加巴喷丁降低了骨癌痛模型大鼠脑脊液中 Glu,脊髓 L4~L6 节段中 SP,β-EP 和肿瘤局部组织中 β-NGF 水平(P<0.05),提高了 IL-12-P70 的浓度(P<0.05)。结论:CQ 复方具有干预骨癌痛大鼠痛觉敏化行为学指标的作用,强度与加巴喷丁相似;其机制可能与抑制中枢内兴奋性氨基酸类神经递质 Glu,肽类神经调质 SP,β-EP 及周围组织 β-NGF 的水平、并促进机体免疫反应的 IL-12-P70 有关。

[关键词] CQ 复方; 胫骨转移性癌痛; 机械缩足阈值; 镇痛; 机制

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)22-0119-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017220119

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170906.1427.076.html>

[网络出版时间] 2017-09-06 14:27

Analgesic Effect and Mechanism of CQ Compound on Rats Model with Tibia Metastatic Cancer Pain

ZHANG Ying¹, WANG Zhi-guo², OUYANG Jing-feng², LI Tao², SUN Dan-dan², ZHAO Xiao-liang²,
JIAO Yue², LIU Yang², JIANG Yu-mao², WANG Dan-qiao^{2*}

(1. Beijing Chinese Medicine Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100010, China;
2. China Academy of Traditional Chinese Medicine (TCM) Medical Experimental Center, Beijing Key Laboratory of Basic Research on Prevention and Treatment of Major Diseases by TCM, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To study the analgesic effect and central mechanism of CQ compound in rat models with tibia metastatic cancer pain. **Method:** Female Wistar rats were randomly divided into sham operation group and surgery group, with operation control and tibia metastatic cancer pain operation for Walker-256 breast

[收稿日期] 20170724(003)

[基金项目] 国家科技部国际科技合作专项(2010DFA31890);中国中医科学院自主选题研究项目(ZZ2013003)

[第一作者] 张莹,硕士,住院医师,从事中西医结合研究,Tel:18600353365,E-mail:rachelzy24@126.com

[通讯作者] *王丹巧,博士,研究员,博士生导师,从事中药药理学与中西医结合基础研究,Tel:010-64089530,E-mail:dq_wang96@163.com

cancer cells respectively. The 40 successfully modeled rats were randomly divided into model group, CQ high dose (CQ-H) group ($200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), CQ middle dose (CQ-M) group ($150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), CQ low dose (CQ-L) group ($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) and gabapentin group ($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 8 rats in every group. Mechanical withdrawal threshold (MWT) measured by von frey hairs fiber filament was used to evaluate rats' pain behavior. Microdialysis was used to detect glutamate (Glu) level of cerebrospinal fluid; radioimmunoassay was used to detect substance P (SP) and β -endorphin (β -EP) contents in L4-L6 spinal cord sections; and Aim Plex Multiple Immunoassay was used to detect the, interleukin-12 (IL-12-P70) and β -nerve growth factor (β -NGF) levels of tumor local tissues. **Result:** As compared with the model group, CQ compound groups and gabapentin group significantly increased MWT of rats; MWT of rats in CQ compound groups began to rise in 30 min after administration, and peaked in 60 min ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Threshold elevation in CQ-H, CQ-M, and CQ-L groups showed dose effect relationship, and the analgesic effect of three consecutive days administration was stronger than that of single dose administration; CQ compound and gabapentin reduced the level of glutamate, SP and β -EP ($P < 0.05$), and raise the level of IL-12-P70 ($P < 0.05$). **Conclusion:** CQ compound can relieve the bone cancer pain of rat models, and its effect intensity is similar to that of gabapentin. Its analgesic mechanism may be associated with suppressing the central excitatory amino acids, pain-associated neuromodulator and peripheral nerve growth factor and promoting IL-12-P70 in immunological reaction.

[**Key words**] CQ compound; bone cancer pain; mechanical withdrawal threshold; analgesic; mechanism

癌症骨转移是目前恶性肿瘤转移中最常见的形式,也是患者进入癌症晚期、预后生存期短暂(平均生存期 < 6 个月)的标志^[1-2]。所产生的最主要症状为癌症侵袭的骨骼、软组织及牵涉部位的持续性、顽固性疼痛,痛觉的敏化(包括痛觉超敏和过敏)是其主要特征。近年来,随着科技手段的不断进步,在初级感觉神经元和脊髓水平上,骨癌痛的分子和细胞机制研究取得了较大进展^[3]。但由于肿瘤局部微环境十分复杂,参与骨癌痛外周敏化的因素及其作用尚不十分清楚;脑内对痛觉信息应答增强的中枢敏化机制尚有待进一步研究;临床上治疗骨癌痛还缺乏镇痛疗效高、副作用小的药物。因此,骨癌痛机制的深入研究和新药研发是直接关系到临床患者治疗效果和生存质量的重要问题。

中医学认为骨癌痛是正气虚弱,邪气趁虚而入,气血瘀滞搏结伤骨所致,因此临床上行气活血是骨癌痛的重要治疗方法。本课题组自创 CQ 复方,具有通络止痛,行气活血的功效,前期研究显示,对于三叉神经痛、坐骨神经痛、切口痛、脊髓损伤痛等多种疼痛模型均显示出良好的镇痛作用^[4-5],但对于难以控制的骨癌痛是否也有干预作用,对外周和中枢敏化的影响如何尚未可知。

因此,本研究采用 Walker-256 乳腺癌细胞构建大鼠胫骨转移性癌痛模型,观察 CQ 复方对于该种癌痛模型大鼠行为学的影响,选取临床常用的非吗啡类镇痛药物加巴喷丁为阳性药,对比其作用的强

度,并采用 HPLC-荧光法检测脑脊液中兴奋性氨基酸谷氨酸 (glutamate, Glu),放射免疫法检测脊髓 L4 ~ L6 节段中 P 物质 (substance P, SP) 及 β -内啡肽 (β -endorphin, β -EP) 含量,采用 AimPlex 流式高通量多因子检测技术分析肿瘤局部组织中白细胞介素-12 (interleukin-12, IL-12-P70),神经生长因子 (β -nerve growth factor, β -NGF) 含量,探究 CQ 复方对中枢和周围敏化机制的影响,为 CQ 复方干预骨癌痛提供药理学依据。

1 材料

1.1 动物 雌性 Wistar 大鼠,180 ~ 200 g,购自中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心,合格证号 SCXK(军)2007-004。于中国中医科学院中医基础理论研究所动物房饲养,室温 18 ~ 22 °C,相对湿度 40% ~ 60%,动物自由饮水、进食。动物实验的开展取得了中国中医科学院中医基础理论研究所实验动物伦理委员会批准(编号 2013-022)。

1.2 药物及试剂 Walker-256 乳腺癌细胞,购于中国医学科学院细胞资源中心;加巴喷丁(江苏恒瑞医药股份有限公司,批号 12031291NO. 107);无菌骨蜡(上海三友医疗器械有限公司,批号 120401);SP, β -EP 检测试剂盒(上海第二军医大学,批号 20131231);Glu 检测试剂盒(瑞典 CMA,批号 T23423);Mouse/Rat Basic kit(北京旷博生物技术有限公司,批号 R200201)和 Aimplex[®] Rat custom 7-plex kit(北京旷博生物技术有限公司,批号

T311C07)。

1.3 仪器 ISCUS^{flex}型微透析分析仪,ICU pilot 型数据分析软件(瑞典 CMA 公司);DFM-96 γ 型放射免疫计数仪(合肥众成机电公司);51000-20C Von Frey hairs 型疼痛测试包(美国 Danmic 公司);NovoCyte D1040 型流式细胞仪(艾森生物有限公司)。

2 方法

2.1 CQ 复方制备 CQ 复方由川芎提取物和青风藤提取物组成,以其有效成分川芎嗪和青藤碱按质量 4:5 的比例,由课题组按特定的制备工艺在中试车间内制成冻干粉针剂。

2.2 骨癌痛模型大鼠模型的建立 将 Walker-256 乳腺癌细胞注射至大鼠腹腔并制备成细胞密度为 4.7×10^4 个/ μL 的腹水。对大鼠进行适应性刺激,筛选出连续 3 d 的机械缩足阈值 (mechanical withdrawal threshold, MWT) ≥ 26 g 的大鼠^[6],手术组参照 Medhurst^[7]的方法将 4.5 μL 腹水瘤细胞注入大鼠右侧后肢胫骨骨髓腔内,用骨蜡封口。假手术组注入同体积生理盐水。术后 9 ~ 13 d MWT 持续 ≤ 8 g 的大鼠视为造模成功,成模率约为 55%。

2.3 分组及给药 将成模大鼠随机分为模型组, CQ 高、中、低剂量组 (200, 150, 100 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 和加巴喷丁组 (100 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 每组 8 只。术后第 14 天开始给药,每天 1 次,连续给药 3 d,剂量设置参照课题组前期研究结果^[4-5],腹腔注射给药;假手术组和模型组腹腔注射同体积生理盐水。

2.4 疼痛的行为学测评方法

2.4.1 MWT 的测量 采用机械触痛法测定大鼠对机械刺激反应的阈值,将待测大鼠放在透明罩中,扣置于铁丝架上,待其探究活动基本消失后,依次用标准化的 Von frey 纤维丝,从较小刺激强度 2 g 开始,以每秒 1 次的频率,垂直刺激大鼠右后肢足爪底中外侧的皮肤表面,观察大鼠缩足反应,记录 5 次中出现 3 次或 3 次以上缩足反应的最小刺激量作为大鼠的缩足阈值。

2.4.2 行走痛评价 术后第 1 天开始,将大鼠置于宽敞的纸箱内,使其能够自由行走,待其适应后,观察其患肢行走情况。按如下标准进行评分,0 分为行为正常;1 分为患肢轻度跛行,后爪接触地面,足趾不能够正常外展;2 分为保护性体位(停步抬高患肢现象),跛行明显;3 分为部分不能使用患肢,且跛行明显;4 分为无法使用患肢。入选模型的大鼠在造模前自由行走痛评分均为 0 分,造模后评分增加,视为模型成功的指标之一。

2.5 CQ 复方对大鼠疼痛行为学影响的观察 术后第 14 天开始给药,第 1 次给药前 (0 min) 和给药后 (30, 60, 90, 120, 180, 240, 300 min) 对各组大鼠进行 MWT 测评。给药 3 次后按照以上时间点重复测评。

2.6 脑脊液中 Glu, 脊髓组织中 SP 及 β -EP 含量检测 连续给药 3 d 后,大鼠于麻醉下抽取脑脊液,之后处死大鼠,剥离 L4 ~ L6 段脊髓。脑脊液经高速低温离心后,利用微透析分析仪及 Glu 试剂盒,按说明书要求,设测量波长为 365, 546 nm;功率为 100 VA,对 Glu 含量进行检测,并应用 Laptop 计算机和 LABplotTM 软件进行含量的数据分析。L4 ~ L6 段脊髓剥离后,立即在沸腾的生理盐水中煮 5 min,滤干、称重,加入 1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙酸 1 mL,充分匀浆,室温静置 100 min,离心取上清,加入相应体积 1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠。之后按照 SP, β -EP 检测试剂盒说明书,采用平衡饱和和加样程序进行检测,并用 γ -放射免疫计数仪检测。

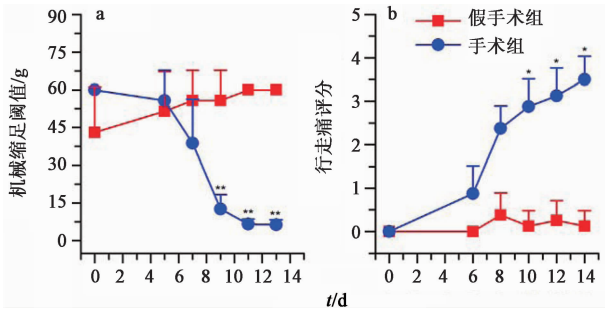
2.7 肿瘤组织内 IL-12-P70 及 β -NGF 含量的检测 脊髓和脑脊液采样后,剥离大鼠右侧患肢胫骨注射部位周围的肿瘤组织,每 100 mg 加入 0.5 mL 预冷 1 \times AimPlex Tissue Lysis Buffer, 2 ~ 8 $^{\circ}\text{C}$ 下匀浆,冰浴 5 min, 14 000 $\times g$ 离心 10 min,取上清,使用专用试剂盒和流式细胞仪进行 IL-12-P70 及 β -NGF 含量的 Aimplex 检测。

2.8 统计学方法 采用 SPSS 17.0 统计学软件,以 $\bar{x} \pm s$ 表示计量资料,对结果进行单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异具有显著性。

3 结果

3.1 骨癌痛大鼠模型的建立 手术后第 9 天开始,大鼠 MWT 与术前及假手术组相比显著下降 (均 $P < 0.01$);术后第 10 天以后,行走痛评分显著升高;术后第 13 天 X 射线下观察到大鼠患肢肿胀,且骨质不均匀,部分骨组织溶解,骨小梁和骨皮质模糊或缺失。结果见图 1。另本课题组^[8]曾以该方法对 25 只大鼠进行造模,并持续观察至 21 d,发现在第 13 天至 21 天大鼠 MWT 比较稳定。据此,实验干预用药确定从第 14 天开始。

3.2 CQ 复方对骨癌痛大鼠行为学指标的影响 手术第 14 天,造模的各组大鼠 MWT 均较假手术组显著降低 (均 $P < 0.01$);CQ 复方给药后 30 min 开始明显上升,60 min 达到药效高峰,高中低剂量组之间呈现量效依赖关系,其中 CQ 高剂量组在观察的 7 个时间点均显著升高了该阈值 ($P < 0.01$, $P < 0.05$),连续 3d 给药的镇痛效果强于第 1 次投药。



与假手术组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$

图 1 手术组和假手术组术后 MWT (a) 和行走痛评分 (b) 比较 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 1 Comparison of paw withdrawal mechanical threshold (a) and walk-associated pain score (b) between surgery group and sham group ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

表 1 CQ 复方对大鼠 MWT 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 Effect of CQ compound on paw withdrawal mechanical threshold (single-dose) ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	0 min	30 min	60 min	90 min
假手术	-	68.00 ± 16.86	60.60 ± 17.48	64.00 ± 12.64	64.00 ± 12.64
模型	-	7.75 ± 1.67 ²⁾	7.75 ± 1.67 ²⁾	7.50 ± 1.41 ²⁾	7.75 ± 1.67 ²⁾
CQ	200	5.70 ± 3.86	69.60 ± 37.24 ⁴⁾	82.40 ± 37.10 ⁴⁾	79.40 ± 35.40 ⁴⁾
	150	7.20 ± 2.35	52.80 ± 33.95 ³⁾	67.00 ± 27.50 ⁴⁾	66.80 ± 27.90 ⁴⁾
	100	7.20 ± 2.39	25.20 ± 32.72	41.18 ± 37.62	36.10 ± 17.50
加巴喷丁	100	6.66 ± 2.40	17.55 ± 8.45	44.33 ± 27.47 ³⁾	82.88 ± 27.60 ⁴⁾

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	120 min	180 min	240 min	300 min
假手术	-	64.00 ± 12.64	64.00 ± 12.64	68.00 ± 16.86	68.00 ± 16.86
模型	-	7.75 ± 1.67 ²⁾	11.13 ± 6.75 ²⁾	12.25 ± 6.34 ²⁾	12.25 ± 6.34 ²⁾
CQ	200	70.50 ± 33.66 ⁴⁾	62.90 ± 26.80 ⁴⁾	58.90 ± 24.34 ⁴⁾	48.80 ± 32.40 ³⁾
	150	55.60 ± 23.72 ⁴⁾	53.60 ± 23.72 ⁴⁾	41.80 ± 28.60	38.60 ± 16.78
	100	37.36 ± 26.50	35.54 ± 26.52	30.81 ± 19.93	30.29 ± 11.50
加巴喷丁	100	78.48 ± 27.47 ⁴⁾	74.00 ± 26.90 ⁴⁾	62.00 ± 32.07 ⁴⁾	58.22 ± 34.27 ⁴⁾

注:与假手术组相比¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与模型组相比³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ (表 2~4 同)。

3.4 CQ 复方对大鼠脑脊液中 Glu, L4 ~ L6 段脊髓中 SP 及 β -EP 水平的影响 与假手术组相比,模型组大鼠 Glu, SP 和 β -EP 浓度均显著升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$);与模型组相比,给予药物干预后各组 Glu, SP 和 β -EP 浓度均有不同程度的降低, CQ 高剂量组和加巴喷丁组对各项指标升高的抑制均有显著性差异 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表 4。

4 讨论

本研究采用 Walker-256 乳腺癌细胞构建胫骨转移性癌痛大鼠模型,该模型伴随转移部位癌组织的生长,疼痛行为学改变显著,可量化评价,且稳定性较好。对于该模型投与 CQ 复方 30 min 后,出现

与加巴喷丁组相比,二者的镇痛强度大致相当,但前者起效更快,后者持续效果略好。见表 1, 2。(由于该模型大鼠肿瘤生长迅速及骨组织破坏程度较重,造模第 14 天,给药 60 min 后的行走痛评分结果:CQ 复方高、中、低及加巴喷丁组评分虽低于模型组,但各组之间无显著性差异)。

3.3 CQ 复方对大鼠肿瘤局部组织中 β -NGF 及 IL-12-P70 水平的影响 与假手术组相比,模型组大鼠 β -NGF 水平显著升高, IL-12-P70 水平显著下降 (均 $P < 0.05$);与模型组相比, CQ 高、中、低剂量组和加巴喷丁组,上述 2 个指标均有不同程度的改变,其中 CQ 高剂量组、加巴喷丁组 β -NGF 浓度下降和 IL-12-P70 浓度升高 (均 $P < 0.05$)。见表 3。

剂量依赖性的疼痛指标明显改善, MWT 显著升高, 60 min 可达药效高峰, 快于加巴喷丁组 (90 min); 连续投药 3 d 效果更佳。表明本课题组具有自主知识产权的 CQ 复方不仅对于神经源性疼痛而且对于该种癌痛也有明显的镇痛作用。

引起骨癌痛的机制十分复杂,可概括为外周敏化和中枢敏化。前者由肿瘤或间质细胞分泌多种炎症、转化、生长因子和周围伤害性感受器的异常兴奋诱导;后者由脊髓背角、背根神经节和高级中枢在外周敏化信息的传递过程中神经元敏感性、兴奋性异常增高所引起。中枢和外周敏化导致了机体痛觉超敏及过敏,出现自发痛及触诱发痛,并维持慢性疼痛

表 2 CQ 复方连续 3 d 投药对 MWT 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Effect of CQ compound on paw withdrawal mechanical threshold (3 consecutive days dose) ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	0 min	30 min	60 min	90 min
假手术	-	60.66 ± 18.54	65.11 ± 22.69	68.89 ± 17.63	65.11 ± 22.69
模型	-	7.50 ± 1.40 ²⁾	7.00 ± 1.85 ²⁾	7.75 ± 1.67 ²⁾	7.50 ± 1.41 ²⁾
CQ	200	7.40 ± 4.40	71.60 ± 38.60 ⁴⁾	85.20 ± 31.20 ⁴⁾	92.00 ± 16.85 ⁴⁾
	150	6.80 ± 3.46	50.40 ± 23.65 ³⁾	55.50 ± 25.90 ⁴⁾	74.90 ± 32.10 ⁴⁾
	100	6.20 ± 2.39	21.60 ± 21.72	45.40 ± 20.97 ³⁾	52.20 ± 29.21 ³⁾
加巴喷丁	100	8.46 ± 5.07	37.00 ± 15.80	73.18 ± 29.51 ⁴⁾	76.27 ± 26.60 ⁴⁾

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	120 min	180 min	240 min	300 min
假手术	-	73.33 ± 20.00	73.33 ± 20.00	73.33 ± 20.00	73.33 ± 20.00
模型	-	7.75 ± 1.67 ²⁾	7.25 ± 2.10 ²⁾	7.00 ± 1.85 ²⁾	6.50 ± 2.07 ²⁾
CQ	200	96.00 ± 12.64 ⁴⁾	70.40 ± 20.65 ⁴⁾	60.20 ± 20.46 ⁴⁾	54.70 ± 24.03 ⁴⁾
	150	67.00 ± 28.20 ⁴⁾	56.60 ± 26.10 ⁴⁾	58.90 ± 26.00 ⁴⁾	44.10 ± 16.11 ³⁾
	100	44.30 ± 23.06 ³⁾	43.60 ± 20.89 ³⁾	39.60 ± 18.58	25.60 ± 14.69
加巴喷丁	100	72.63 ± 24.61 ⁴⁾	77.27 ± 24.61 ⁴⁾	77.27 ± 24.61 ⁴⁾	66.72 ± 16.59 ⁴⁾

表 3 CQ 复方对 IL-12-P70, β -NGF 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 3 Effect of CQ compound on IL-12-P70 and β -NGF of tumor local tissue ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	β -NGF	IL-12-P70
假手术	-	2.45 ± 5.86	8.60 ± 4.22
模型	-	64.95 ± 19.01 ¹⁾	3.56 ± 3.31 ¹⁾
CQ	200	34.66 ± 12.44 ³⁾	6.27 ± 3.59 ³⁾
	150	44.34 ± 18.98	5.58 ± 2.99
	100	57.85 ± 20.00	5.30 ± 2.45
加巴喷丁	100	35.80 ± 11.82 ³⁾	5.80 ± 3.30 ³⁾

表 4 CQ 复方对 Glu, SP, β -EP 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 4 Effect of CQ compound on glutamate of cerebrospinal fluid, substance P and β -EP in spinal segment ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	Glu/ μ mol·L ⁻¹	SP/ng·L ⁻¹	β -EP/ng·L ⁻¹
假手术	-	4.78 ± 4.03	0.77 ± 0.56	4.03 ± 2.85
模型	-	43.78 ± 20.00 ²⁾	4.21 ± 2.18 ¹⁾	49.94 ± 19.32 ²⁾
CQ	200	12.64 ± 3.43 ⁴⁾	1.04 ± 0.72 ³⁾	20.79 ± 10.10 ⁴⁾
	150	19.59 ± 11.57 ³⁾	2.23 ± 1.63	21.24 ± 20.39 ⁴⁾
	100	21.24 ± 6.81 ⁴⁾	5.73 ± 2.39	18.15 ± 7.16 ⁴⁾
加巴喷丁	100	11.24 ± 9.77 ⁴⁾	1.68 ± 1.19 ³⁾	19.68 ± 15.28 ⁴⁾

状态。

加巴喷丁是 γ -氨基丁酸的衍生物,是治疗神经源性疼痛的临床一线药物,作为非吗啡类镇痛药也应用于癌症性疼痛。课题组观察到该药对于骨转移性癌痛大鼠模型有确切的镇痛效应,并对其外周和中枢敏化的相关机制进行了探讨^[8]。

NGF 是一种亲神经因子,生理状态下周围组织中表达水平较低,但当肿瘤生长损伤到外周神经时 NGF 的释放显著增加。感觉神经元的反应特性及表型在高浓度 NGF 的诱导下,上调疼痛相关的 SP

和降钙素基因相关肽的水平^[9],产生并加重疼痛。因此,NGF 是骨癌痛周围敏化机制的重要参与因素之一。有研究报道,癌痛大鼠肿瘤组织的 NGF 水平及其受体表达显著高于对侧^[10];而 NGF 抗体能够减轻骨癌痛模型外周神经敏化程度^[11]。本研究中,模型组大鼠因癌组织生长旺盛,导致外周神经损伤较重,故其 β -NGF 的表达也明显增高;CQ 复方抑制了癌瘤组织中 NGF 的大量分泌,进而抑制了 P 物质和降钙素基因相关肽水平的上调,减轻了外周神经敏化程度。

IL-12-P70 由单核/巨噬细胞, NK 细胞和 B 细胞产生,可促进 T 细胞和 NK 细胞的增殖,促进 Th1 细胞生成,增强细胞的免疫功能,从而发挥抗肿瘤作用。另有研究表明^[12],肿瘤细胞释放的自噬小体可被 B 细胞所摄取,诱导 B 细胞活化并促进 B 细胞分泌高水平前列腺素 E₂ (PGE₂) 和 IL-10 等抑制性细胞因子,抑制 Th1 细胞的生成,从而反向抑制了 IL-12-P70 的分泌。本实验中,模型组大鼠 IL-12-P70 水平较假手术组显著降低可能与肿瘤细胞分泌抑制性因子有关,而 CQ 复方给药后 IL-12-P70 水平升高,考虑为小鼠疼痛得到改善的同时,机体的免疫应答水平相应提高。但 CQ 复方是通过直接促进细胞分泌 IL-12-P70,还是通过减少肿瘤细胞分泌抑制性因子从而提高 IL-12-P70 水平尚有待进一步研究。

Glu 和 SP 是疼痛的中枢机制中最主要的神经递质和调质。在疼痛状态下,过量的 Glu 被释放,作用于 NMDA 受体,引起 Ca²⁺ 大量内流和 K⁺, Na⁺ 通透性增加,使神经元发生去极化,增强了伤害性感受器和脊髓疼痛传递神经元突触联系,产生痛觉过

敏^[13];同时,背角神经元释放 SP,与突触后膜 NK-1 受体相结合,传递疼痛信息,促使兴奋性氨基酸 Glu 释放,形成两者之间的链条反应^[14]。神经病理性损伤^[15]、切口痛^[16]等研究已证实疼痛产生时,脑内 Glu,SP 含量均明显增加,本实验结果表明,骨癌痛模型大鼠中枢神经系统内的 Glu 和 SP 水平也有明显增高。CQ 复方不仅抑制了癌瘤组织中 NGF 的大量分泌,减轻了外周神经敏化的程度,而且通过抑制中枢内 Glu 和 SP 水平,减少了伤害性感受器和神经元的突触联系,进而通过抑制疼痛的中枢机制减轻骨癌痛的痛觉过敏和超敏。

β -EP 是疼痛和镇痛机制研究中一直倍受关注的一种内源性阿片肽,对疼痛起调制作用。急性疼痛和慢性疼痛的急性期,作为机体的一种保护性反应,中枢神经系统的内源性阿片肽增加以拮抗疼痛^[17]。本实验中模型组大鼠脊髓内 β -EP 水平较假手术组明显升高,考虑为机体对癌痛的应激性和保护性反应,而 CQ 复方和加巴喷丁抑制了癌痛、提高了痛阈、减弱了疼痛信号的传导,所产生的负反馈效应,降低了 β -EP 水平,维持了机体稳态。该结果与癌痛患者爆发疼痛时血浆中 β -EP 水平较高,给予吗啡缓解疼痛后其水平降低的研究报道相符合^[18]。关于 β -EP 水平对疼痛的影响,目前尚无一致性结论,本实验条件下 CQ 复方抑制癌痛并影响 β -EP 水平的机制还有待进行深入研究。

综上所述,本研究结果证实了 CQ 复方对 Walker-256 乳腺癌细胞转移所致的大鼠骨癌痛具有镇痛作用的假说,其主要机制体现在缓解中枢敏化和外周敏化,具体为①抑制脑和脊髓内兴奋性氨基酸类神经递质 Glu,肽类痛感调质 SP 的水平;②抑制参与周围敏化的组织 β -NGF 的表达;③提高增强机体免疫反应的 IL-12-P70 的水平。本研究从肿瘤局部对疼痛的感受和传导、神经中枢对疼痛的调制作用方面,为临床难治性骨癌痛的机制和 CQ 复方干预骨癌痛的药理作用提供了依据。

[参考文献]

[1] 王妙苗. 癌痛的发生机制及其相关药物治疗的研究状况[J]. 临床肿瘤学杂志,2011,16(7):662-663.
[2] Grávalos C, Rodríguez C, Sabino A, et al. SEOM clinical guideline for bone metastases from solid tumours (2016) [J]. Clin Transl Oncol,2016,18(12):1243-1253.
[3] 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.

[4] 李鹏,张美玉,王丹巧,等. 青藤碱对 SSNI 模型大鼠镇痛效应及脑内兴奋性氨基酸递质的影响[J]. 中国药理学通报,2012,28(10):1365-1369.
[5] 王晔,王丹巧,崔悦,等. CQM 对三叉神经痛模型大鼠的镇痛效应及其对脑内兴奋性氨基酸递质的影响[J]. 中国中药杂志,2013,38(20):3554-3558.
[6] Medhurst S J, Walker K, Bowes M, et al. A rat model of bone cancer [J]. Pain,2002,96(1/2):129-140.
[7] TONG Z, LUO W, WANG Y, et al. Tumor tissue derived formaldehyde and acidic microenvironment synergistically induce bone cancer pain [J]. PLoS One, 2010,5(4):e10234.
[8] 张莹,王志国,孙丹丹,等. 加巴喷丁对骨癌痛模型大鼠的镇痛作用及机制研究[J]. 中国生化药物杂志,2014,34(3):8-11.
[9] 黄四云,胡成平,潘频华. 神经生长因子诱导 PC12 细胞一氧化氮合酶和 P 物质表达及干扰素调节因子 1 的作用[J]. 内科理论与实践,2011,6(2):117-120.
[10] 姚鹏,蒋晶晶,张锦. 神经生长因子骨癌痛大鼠 DRG 的变换及其对疼痛行为学的影响[J]. 中国疼痛医学杂志,2011,17(7):426-427.
[11] Sevcik M A, Ghilardi J R, Peters C M, et al. Anti-NGF therapy profoundly reduces bone cancer pain and the accompanying increase in markers of peripheral and central sensitization [J]. Pain, 2005, 115 (1/2): 128-141.
[12] 周猛. 肿瘤细胞释放自噬小体诱导 IL-10 分泌型 B 细胞的产生其相关机制研究 [D]. 南京:东南大学,2015.
[13] Basbaum A I, Bautista D M, Scherrer G, et al. Cellular and molecular mechanisms of pain [J]. Cell,2009,139(2):267-284.
[14] 孙丹丹,王志国,李涛,等. 中枢内神经化学物质在癌症侵袭镜像痛中的作用及加巴喷丁对其的影响[J]. 中国生化药物杂志,2015,35(3):13-16.
[15] 马骋,余黎,闫丽萍. 电针对神经病理性疼痛模型大鼠脊髓腰段神经元离子型谷氨酸受体相关亚单位蛋白及其基因表达的影响[J]. 针刺研究,2010,35(6):403-402.
[16] 赵晓亮,刘洋,王焯,等. 青藤碱对切口痛模型大鼠的镇痛效应及其中枢神经系统中 P 物质含量的影响[J]. 标记免疫分析与临床,2013,20(6):422-426.
[17] 杨宝峰. 药理学[M]. 6 版. 北京:人民卫生出版社,2005:176.
[18] 陈丽. 癌性疼痛患者爆发疼痛时体内 β -内啡肽和吗啡的血浆浓度变化 [D]. 石家庄:河北医科大学,2011.

[责任编辑 邹晓翠]