

益肾骨康方对骨转移癌疼痛大鼠脊髓背角的作用

刘蔚霞¹, 张平^{2*}, 周磊², 冯利²

(1. 河南中医学院 第一附属医院, 郑州 450003; 2. 中国中医科学院 望京医院, 北京 100102)

[摘要] **目的:**研究益肾骨康方对骨转移癌疼痛大鼠脊髓背角胶质原纤维酸性蛋白(GFAP), c-fos, P 物质蛋白表达的调控作用。**方法:**建立裸鼠肺腺癌溶骨性骨转移模型,采用免疫组织化学染色法分别观察各组裸鼠脊髓背角 GFAP, c-fos, P 物质等蛋白的表达,使用 MIA4.0 分析软件进行图像分析,每张切片取 5 个视野,显微镜放大倍数为 400 倍,统计每个高倍镜视野中表达的阳性物质的光密度值。**结果:**模型组裸鼠发生了 100% 的骨转移,免疫组织化学结果显示模型组脊髓背角 GFAP, c-fos, P 物质蛋白过表达;而益肾骨康方低剂量组与中西药组裸鼠未发生骨转移,免疫组织化学结果显示 GFAP, c-fos, P 物质蛋白的表达处于较低水平;益肾骨康方中、高剂量组裸鼠也发生了骨转移,但这两组裸鼠脊髓背角 GFAP, c-fos, P 物质蛋白等与疼痛相关的蛋白表达明显低于模型组。**结论:**益肾骨康方可通过抑制裸鼠脊髓背角 GFAP, c-fos, P 物质蛋白的表达而起到一定镇痛作用。

[关键词] 益肾骨康方; 脊髓背角; 骨转移癌疼痛; 胶质原纤维酸性蛋白

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)21-0197-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014210197

Regulating Effect of Yishen Gukang Prescription on Protein Expression in Dorsal Horn of Spinal Cord in a Rat Model of Osseous Metastasis Tumor Pain

LIU Wei-xia¹, ZHANG Ping^{2*}, ZHOU Lei², FENG Li²

(1. The First Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450003, China;
2. Wangjing Hospital of China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100102, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate regulating effect of Yishen Gukang prescription on protein expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP), c-fos and P substances in dorsal horn of spinal cord in a rat model of osseous metastasis tumor pain. **Method:** On the basis of osteolytic osseous metastasis model of adenocarcinoma of lung in nude mice, immunohistochemical staining method was adopted to observe expression of GFAP, c-fos and P substances in dorsal horn of spinal cord in a rat model in each group. Image analysis was conducted by image analysis software MIA4.0, five visual fields were chosen from each section to count optical density value of the positive substances expressed in each high magnification visual field under 400 microscope magnification. **Result:** 100% osseous metastasis occurred in nude mice of the model group, immunohistochemistry data indicated that GFAP, c-fos and P substances in dorsal horn of spinal cord in the model group were over expressed; no osseous metastasis occurred in nude mice of the group with lower dosage of Yishen Gukang prescription and the Chinese drug plus western drug group, immunohistochemistry data indicated that protein expression of GFAP, c-fos and P substances was at a lower level; osseous metastasis occurred in nude mice of the groups with moderate and higher dosage of Yishen Gukang prescription, but proteins expression in relation to

[收稿日期] 20131211(008)

[基金项目] 北京市自然科学基金项目(7122203)

[第一作者] 刘蔚霞,主治医师,从事肿瘤的中西医结合治疗研究,Tel:15938736777,E-mail:liuwx@sina.com

[通讯作者] *张平,副主任医师,从事肿瘤的中西医结合治疗研究,Tel:010-84739886,E-mail:pinglele@sina.com

pain such as GFAP, c-fos and P substances in dorsal horn of spinal cord in nude mice of these two groups were obviously lower than that of the model group. **Conclusion:** Yishen Gukang prescription has a certain abirritation by inhibiting protein expression of GFAP, c-fos and P substances in dorsal horn of spinal cord in nude mice.

[Key words] Yishen Gukang prescription; dorsal horn of spinal cord; osseous medtastasis tumor pain; glial fibillary acidic protein

骨转移癌疼痛是癌症患者最常见的一种疼痛, 西医现有治疗措施存在一定局限性和不可克服的毒副作用, 使得约 45% 癌症患者的疼痛不能得到有效控制^[1]。益肾骨康方是望京医院肿瘤科治疗肺癌骨转移的临床验方, 由熟地黄、山药、山茱萸、牡丹皮、泽泻、茯苓、骨碎补、白花蛇舌草等组成, 具有扶正解毒化痰的功效, 治疗骨转移癌疼痛疗效确切^[2], 但其作用机制尚不清楚。伤害性刺激后, 原癌基因 c-fos 转录后的 mRNA 及翻译后的 c-fos 蛋白, 在痛觉传导路径上表达, 被称为第三信使, 是痛觉传导的重要蛋白; 星形胶质细胞在骨转移癌疼痛中发挥重要作用, 胶质原纤维酸性蛋白 (glial fibillary acidic protein, GFAP) 是星形胶质细胞的标志蛋白, 下调 GFAP 蛋白的表达可减轻骨转移癌疼痛; P 物质是痛觉传导通路上的主要神经递质。在前期试验基础上, 本实验深入研究益肾骨康方对骨转移癌裸鼠脊髓背角的影响, 探讨该方镇痛的作用机制, 为该复方的临床应用提供参考。

1 材料

EG1150H 型包埋机, RM2235 型切片机, H II 210 型摊片机 (德国 LEICA 公司), BX51 型显微镜 (日本 Olympus 公司), HF SAFE1500 型生物安全柜 (中国上海力申科学仪器有限公司), BB16UV/BB5060UV 型二氧化碳培养箱 (德国 Heraeus 仪器有限公司), TE2000-S 型倒置显微镜 (日本 Nikon 株式会社)。

哈瑞氏苏木素染液 (天合力恩试剂公司, 批号 20100106), 硫酸软骨素蛋白多糖 (CSPGs) 一抗 (英国 Abcam 公司, 批号 667209), EnVision + 抗兔型免疫组化检测试剂盒 (基因科技上海有限公司, 批号 11A1178A), AM 细胞培养液 (美国 ScienCell 公司, 批号 6143), RPMI 1640 培养液和胎牛血清 (美国 Gibco 公司), 人肺腺癌溶骨性骨转移细胞株 CPA-Yang1 (上海市胸科医院杨顺芳教授赠送), 水为去离子水, 试剂均为分析纯。熟地黄、山药、泽泻等药味均购自望京医院药房, 经作者鉴定均符合 2010 年版《中国药典》一部相关项下要求。

免疫缺陷 BNX 小鼠, 8 ~ 10 周龄, 体重 18 ~ 20

g, 雄性共 60 只, 由上海西浦尔-必凯实验动物有限公司提供, 动物合格证号 SCXK (沪) 2008-0043, 在 SPF 环境下饲养。

2 方法

2.1 药液的制备 取复方 5 剂 (2.40 kg) 装入 10 L 圆底烧瓶中, 加水淹没药材高 5 cm, 浸泡 30 min, 加热浸提 2 次, 每次 40 min, 提取液双层纱布过滤, 滤液于 ≤ 70 °C 旋转蒸发成稠浸膏, 经水浴锅和鼓风干燥箱干燥至一定程度后, 放入减压干燥箱中 ≤ 70 °C 干燥, 烘干后浸膏总质量 712.7 g, 计算浸膏得率 29.7%, 于 4 °C 冷藏。

2.2 左心室注射溶骨性骨转移癌模型的建立 细胞培养液内含 10% 胎牛血清, 100 mg·L⁻¹ 青霉素, 100 mg·L⁻¹ 链霉素, 3.7 g·L⁻¹ 碳酸氢钠, 1% L-谷氨酰胺及 10⁵ U·L⁻¹ RPMI 1640 培养液, pH 7.0。于 37 °C, 5% CO₂ 培养。将人肺腺癌细胞亲代 CPA-Yang1 细胞株用 PBS 缓冲液制成 1 × 10⁷ 个的单细胞悬液。采用腹腔注射硫喷妥钠 (0.75 mg/只) 及腿部肌肉注射氯胺酮 (1.5 mg/只) 麻醉体重 > 20 g 的免疫缺陷小鼠 (裸鼠)。将麻醉后的裸鼠仰卧固定, 消毒腹面皮肤, 注射细胞悬液进入裸鼠左心室, 接种量 0.1 mL/只, 进针部位为裸鼠剑突右侧, 进针深度约 0.8 cm, 进针后, 轻轻回抽注射器时见压力较高的浅红色细柱状血液进入针筒说明针尖已经进入左心室, 此时缓慢注射细胞悬液, 速度 0.1 mL·min⁻¹, 注射完毕后消毒裸鼠皮肤, 将鼠放回笼中。2 周后隔日称量裸鼠体重, 记录各组裸鼠体重变化情况, 若体重 < 16 g 时应严密观察。

2.3 分组及给药 随机分为益肾骨康方低剂量组 (剂量 3 g·kg⁻¹, 1 次/日 × 5 周, 灌胃)、中剂量组 (剂量 12 g·kg⁻¹, 1 次/日 × 5 周, 灌胃)、高剂量组 (剂量 24 g·kg⁻¹, 1 次/日 × 5 周, 灌胃)、帕米膦酸二钠组 (剂量 4.5 mg·kg⁻¹, 2 次/周 × 5 周, 皮下注射给药)、益肾骨康方 (低) + 帕米膦酸二钠组 (中 + 西组) (益肾骨康方浸膏剂混悬液 3 g·kg⁻¹, 1 次/日 × 5 周, 灌胃; 帕米膦酸二钠 4.5 mg·kg⁻¹, 2 次/周 × 5 周, 皮下注射给药)、模型对照组 (生理盐水 0.5 mL, 2 次/周 × 5 周, 皮下注射; 生理盐水 1 mL, 1 次/日 ×

5周,灌胃)。

2.4 免疫组织化学染色 引颈处死裸鼠,每只裸鼠分别取其脊髓的腰膨大组织及颈膨大组织,脱水,蜡块包埋,蜡块切片及免疫组织化学染色,石蜡切片厚度 $3\mu\text{m}$ 。烤片温度 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$,时间 30 min ;光镜下分别观察各组裸鼠脊髓背角GFAP蛋白,c-fos蛋白及P物质的表达。使用MIA4.0图像分析软件进行图像分析,每张切片取5个视野,统计每个高倍镜视野中表达的阳性物质的积分吸光度(IA)。免疫组织化学染色步骤为取裸鼠脊髓腰膨大及颈膨大组织制备石蜡切片,按照免疫组织化学染色方法,将切片脱蜡后置于水中,用PBS缓冲液洗 5 min 后进行抗原修复,加PBS缓冲液洗(3次,每次 5 min ,下同),3%过氧化氢孵育 10 min ,加PBS缓冲液洗,一抗于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 作用 2 h ,加PBS缓冲液洗,二抗于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 作用 1 h ,加PBS缓冲液洗,显色,苏木素复染,盐酸乙醇分色,饱和碳酸锂返蓝,上行脱水,透明,封片。采用SPSS 12.0软件进行统计分析,多组间比较采用单因素方差分析。

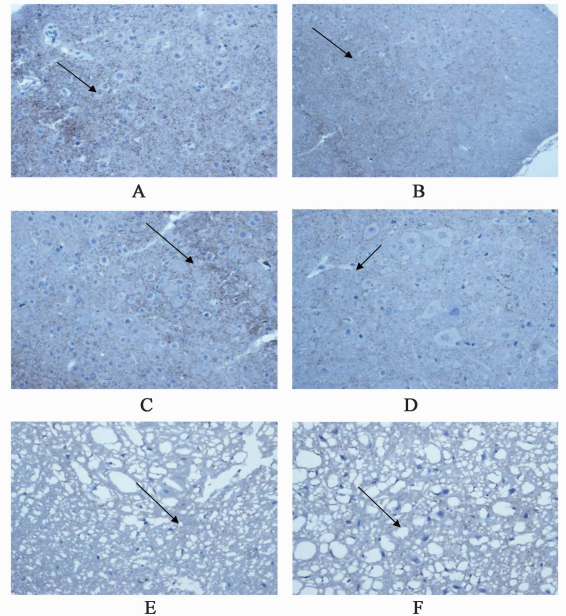
3 结果

3.1 脊髓背角GFAP蛋白表达的调控作用 计算模型组、帕米磷酸二钠组、益肾骨康方高剂量组、益肾骨康方中剂量组、益肾骨康方低剂量组、中西药组的IA($\bar{x} \pm s, n = 6$)分别为 $86.25 \pm 17.95, 51.56 \pm 12.25, 48.63 \pm 11.72, 46.81 \pm 13.14, 10.23 \pm 2.31, 11.50 \pm 3.22$ 。结果表明与模型组相比,帕米磷酸二钠组、益肾骨康方高、中剂量组脊髓背角GFAP蛋白的表达明显下降,均具有显著性差异;益肾骨康方低剂量组与中西药组未发生骨转移瘤,均具有极显著性差异。帕米磷酸二钠组、益肾骨康方高、中剂量组脊髓背角GFAP蛋白的表达则无显著性差异,说明益肾骨康方与帕米磷酸二钠均能降低脊髓背角GFAP蛋白的表达。

3.2 脊髓背角c-fos蛋白表达的调控作用 计算模型组、帕米磷酸二钠组、益肾骨康方高、中、低剂量组、中西药组的IA($\bar{x} \pm s, n = 6$)分别为 $46.94 \pm 9.66, 27.14 \pm 5.29, 23.57 \pm 4.61, 22.63 \pm 3.99, 7.62 \pm 1.85, 9.22 \pm 1.78$ 。结果表明帕米磷酸二钠组、益肾骨康方高、中剂量组脊髓背角c-fos蛋白的表达较模型组明显下降,具有显著性差异;益肾骨康方低剂量组与中西药组未发生骨转移瘤,与模型组相比具有极显著性差异。帕米磷酸二钠组、益肾骨康方高、中剂量组股骨脊髓背角c-fos蛋白的表达无显著性差异,说明益肾骨康方与帕米磷酸二钠能够

降低脊髓背角c-fos蛋白的表达。

3.3 脊髓背角SP蛋白表达的调控作用 计算模型组、帕米磷酸二钠组、益肾骨康方高、中、低剂量组、中西药组的IA($\bar{x} \pm s, n = 6$)分别为 $134.47 \pm 25.16, 78.29 \pm 18.46, 89.31 \pm 22.09, 68.62 \pm 23.17, 37.12 \pm 11.93, 40.33 \pm 15.08$ 。与3.1和3.2项下结果一致,表明益肾骨康方与帕米磷酸二钠均能降低脊髓背角SP蛋白的表达,见图1。



A. 模型组;B. 帕米磷酸二钠组;C. 益肾骨康方高剂量组;
D. 益肾骨康方中剂量组;E. 益肾骨康方低剂量组;F. 中西药组

图1 益肾骨康方对小鼠脊髓背角SP蛋白表达的影响($\times 400$)

4 讨论

骨转移癌疼痛在中医学医籍中早有论述,《灵枢》中记载:“骨疼而肉枯,内伤骨为骨蚀,为昔瘤,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”。骨转移癌疼痛特点是疼痛较重,部位固定,夜间更甚。患者多舌质紫暗,脉涩。疼痛部位固定是瘀血疼痛之特点,舌质紫暗、脉涩为内有瘀血之象。患者病久、疼痛难忍则情志抑郁,肝失疏泄,气机阻滞,气为血帅,气滞则血凝,瘀血停留,脉络痹阻,不通则痛^[3]。脊髓背角星形胶质细胞、神经元合成的c-fos蛋白表达及传导疼痛的神经递质SP物质与骨转移癌疼痛的发生具有密切关系,益肾骨康方可能是通过抑制星形胶质细胞的活化增殖和抑制c-fos蛋白,SP蛋白的表达来发挥止痛作用的。

4.1 脊髓背角星形胶质细胞与骨转移疼痛 星形胶质细胞对神经元起到支撑和营养的作用,二者共

同维持神经系统的动态平衡,在痛觉的产生和传递过程中特别是在癌性疼痛中发挥重要作用。GFAP 是星形胶质细胞的特异性标志蛋白,存在于星形胶质细胞中胶质丝的胶质原纤维内。肢体疼痛发生后,脊髓后角星形胶质细胞反应性增生,出现 GFAP 表达的上调^[4-6]。任炳旭等^[3]探讨身痛逐瘀汤对骨癌痛小鼠痛行为的作用及对脊髓水平 GFAP 表达的影响,结果显示身痛逐瘀汤具有镇痛作用,抑制脊髓水平星形胶质细胞的增殖活化可能是其机制之一。本文证实左心室注射溶骨性骨转移癌模型中发生肿瘤骨转移的裸鼠,其脊髓后角星形胶质细胞增生和肥大,表现为星形胶质细胞的特征性标记物 GFAP 蛋白表达显著增加,表明模型组动物脊髓星形胶质细胞呈明显激活状态。试验中益肾骨康方低剂量(临床常用剂量)及帕米膦酸二钠组 GFAP 表达非常低;而中剂量和大剂量组能够下调相应脊髓后角 GFAP 蛋白的表达,具有较好的镇痛作用;帕米膦酸二钠 + 益肾骨康方(低剂量)组 GFAP 的表达亦较模型组低。提示益肾骨康方抑制星形胶质细胞的激活呈剂量依赖性,可阻断由此引起的痛觉敏化而起到抗癌痛作用,与帕米膦酸二钠联合使用亦可达到一定的镇痛效果,此结果与临床研究相吻合。

4.2 脊髓背角 c-fos 蛋白表达与骨转移疼痛 细胞原癌基因 c-fos 是一种早期即刻基因,在正常情况下很少表达,当机体受到各种刺激后,可迅速在与痛觉传递相关的神经细胞内表达其产物——c-fos 蛋白,使细胞产生长期适应性变化。c-fos 蛋白被称为第三信使,参与了痛觉传导路径。原癌基因 c-fos 表达可作为接受一定刺激的神经元激活的标志,是痛觉过敏状态发展的反映,参与了疼痛中枢整合和中枢敏化的形成,脊髓背角 c-fos 表达的上调与伤害性信号的传导增加密切相关^[7]。试验结果发现,模型组脊髓背角神经 c-fos 阳性细胞数目较多,且胞浆内棕色阳性颗粒较多,呈深染,表明模型组 c-fos 蛋白的表达上调明显;而益肾骨康方低剂量组 c-fos 的表达很低,中剂量及高剂量组 c-fos 的表达明显低于模型组但高于低剂量组及帕米膦酸二钠组,说明益肾骨康方下调骨转移癌痛裸鼠脊髓后角神经元 c-fos 蛋白的表达呈剂量依赖性。提示益肾骨康方可能通过某种途径作用于脊髓初级中枢,减少 c-fos 蛋白的表达从而达到对骨转移癌痛模型的镇痛作用,作用机制与拮抗伤害感受器并且抑制痛觉在脊髓水平的放大有关。

4.3 脊髓背角 SP 蛋白表达与骨转移疼痛 P 物质

作为一种已公认的传递痛觉的神经递质^[8],在痛觉传递中起着十分重要的作用。P 物质(SP 蛋白)是疼痛传导到脊髓的最重要神经递质,SP 蛋白主要由背根神经节中神经元合成,可通过快速轴浆运输系统同时向初级传入神经元的中枢突和外周端传递。在脊髓背角胶质区富含 SP 蛋白传入纤维末梢,持续癌痛作为一种外周伤害性刺激可引起传入纤维末梢 SP 蛋白的释放,脊髓背角的 SP 蛋白明显增多^[9]。试验结果证实益肾骨康方可减少模型鼠脊髓背角 P 物质的释放,提示该方的镇痛作用可能与脊髓水平的阿片受体及神经递质 SP 的释放减少有关。

[参考文献]

- [1] Meuser T, Pietruck C, Radbruch L, et al. Symptoms during cancer pain treatment following WHO-guidelines: a longitudinal follow-up study of symptom prevalence, severity and etiology[J]. Pain, 2001, 93(3):247.
- [2] 冯利,花宝金,朴炳奎. 肺癌平 II 号改善肺癌患者生存质量临床研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2006, 13(12):12.
- [3] 任炳旭,马正良,靳艳卿,等. 身痛逐瘀汤对骨癌痛小鼠痛行为及脊髓星形胶质细胞活化的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2011, 31(3):381.
- [4] Hald A, Nedergaard S, Hansen R R, et al. Differential activation of spinal cord glial cells in murine models of neuropathic and cancer pain[J]. Eur J Pain, 2009, 13(2):138.
- [5] Schwei M J, Honore P, Rogers S D, et al. Neurochemical and cellular reorganization of the spinal cord in a murine model of bone cancer pain[J]. J Neurosci, 1999, 19(24):10886.
- [6] Honore P, Luger N M, Sabino M A, et al. Osteoprotegerin blocks bone cancer-induced skeletal destruction, skeletal pain and pain-related neurochemical reorganization of the spinal cord[J]. Nat Med, 2000, 6(5):521.
- [7] Ma W, Quirion R. Increased phosphorylation of cyclic AMP response element-binding protein (CREB) in the superficial dorsal horn neurons following partial sciatic nerve ligation[J]. Pain, 2001, 93(3):295.
- [8] 胡兴国,张云翔,曾因明,等. 鞘内吗啡对切口疼痛模型大鼠脊髓背角 P 物质的影响[J]. 中华麻醉学杂志, 2001, 21(11):663.
- [9] 王贤裕,杨光,傅南安. P 物质在脊髓参与痛觉调控机制的研究进展[J]. 国外医学:麻醉学与复苏分册, 2001, 22(5):306.

[责任编辑 刘德文]