

华蟾素对骨癌痛大鼠镇痛机制探讨

焦良波¹, 刘 丹², 陈 涛³, 张继红¹, 胡 卫^{3*}

1. 三峡大学第二人民医院/宜昌市第二人民医院, 湖北 宜昌 443002

2. 黄冈市中医医院, 湖北 黄冈 438000

3. 三峡大学医学院/国家中医药管理局中药药理(肿瘤)科研三级实验室, 湖北 宜昌 443003

摘要: 目的 探讨华蟾素对骨癌痛(cancer-induced bone pain, CIBP)大鼠镇痛作用机制。方法 筛选痛阈值满足条件的雌性SD大鼠构建CIBP模型,华蟾素各组大鼠在造模第7天开始ip低、中、高浓度的华蟾素注射液,假手术组与模型组ip等量的生理盐水,连续给药7d,各组大鼠分别在造模前和造模后及单次注射华蟾素后的0.5、1、2、4、6、8、24h检测大鼠机械痛阈值与热痛阈值,Western blotting检测丝裂原激活的蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPKs)相关蛋白的表达,ELISA法检测脊髓细胞因子白细胞介素-1 β (Interleukin-1 β , IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (TNF tumor necrosis factor- α , TNF- α)、单核细胞趋化蛋白(monocyte chemoat tractant protein, MCP-1)的含量。结果 大鼠造模后,模型组大鼠的热痛阈值、机械痛阈值明显降低($P<0.01$);予以华蟾素干预后,大鼠的热痛阈值、机械痛阈值升高,且浓度越高,痛阈值越高($P<0.05$ 、 0.01);单次给药后,华蟾素在ip后6h作用最强,而后作用缓慢减弱;但华蟾素对正常大鼠的痛阈值无影响($P>0.05$)。Western blotting的结果显示,模型组大鼠脊髓MAPKs相关蛋白的活化水平增加($P<0.05$);华蟾素能下调大鼠脊髓中活化的氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinases, JNK)、p38蛋白的表达量,而p-ERK蛋白的表达未见明显差异($P>0.05$)。ELISA结果显示,模型组大鼠脊髓中TNF- α 、IL-1 β 、MCP-1的含量明显增多($P<0.05$),华蟾素能显著抑制其释放($P<0.05$)。结论 华蟾素可能是通过抑制脊髓MAPKs信号通路相关蛋白(JNK、p38)的活化,减少细胞因子释放,从而发挥缓解CIBP的作用。

关键词: 华蟾素; 骨癌痛; 镇痛; 丝裂原激活的蛋白激酶; 机械痛; 热痛; 细胞因子

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)14-3734-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.14.017

Analgesic mechanism of cinobufagin in rats with bone cancer pain

JIAO Liang-bo¹, LIU Dan², CHEN Tao³, ZHANG Ji-hong¹, HU Wei³

1. The Second People's Hospital Affiliated to Three Gorges University; Yichang Second People's Hospital, Yichang 443002, China

2. Huanggang Traditional Chinese Medicine Hospital, Huanggang 438000, China

3. Third-grade Pharmacological Laboratory on Traditional Chinese Medicine/State Administration of Traditional Chinese Medicine, Medical College of Three Gorges University, Yichang 443003, China

Abstract: Objective To investigate the analgesic mechanism of cinobufagin in rats with bone cancer pain. **Methods** Female SD rats meeting the conditions of pain threshold were selected to construct cancer-induced bone pain (CIBP) model. On the 7th day after modeling, the sham group and the model group were administrated by saline, while the treatment groups were administrated with the low, medium and high concentrations of cinobufagin for consecutive 7 d. The pain behavior (mechanical withdrawal threshold and thermal pain threshold) was tested before modeling and after modeling, and single injection of cinobufagin after 0.5, 1, 2, 4, 6, 8 and 24 h at the first day. The expression of MAPKs protein was detected by Western Blotting, and the content of spinal cytokines (IL-1 β , TNF- α , MCP-1) was detected by ELISA. **Results** The mechanical pain threshold and thermal pain threshold were significantly decreased in the model group, compared with the sham group ($P < 0.01$). After injected with cinobufagin, the pain threshold increased with a certain concentration dependence ($P < 0.05$, 0.01). After a single dose, the effect of cinobufagin was the strongest at

收稿日期: 2019-12-27

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81503381)

作者简介: 焦良波, 男, 硕士。E-mail: 15771178117@163.com

*通信作者 胡 卫, 女, 副教授, 博士, 研究生导师, 主要从事中药药理研究。E-mail: 331323129@qq.com

6 h after intraperitoneal injection, and then gradually decreased. However, cinobufagin had no effect on the pain threshold of normal rats ($P > 0.05$). Protein levels of MAPKs were increased in the model group, while the levels of JNK and p38 were decreased in the cinobufagin group ($P < 0.05$), while had no effect on the levels of p-ERK ($P > 0.05$). ELISA results showed that cinobufagin significantly decreased the content of cytokines in the spinal cord, when compared with the model group ($P < 0.05$). **Conclusion** Cinobufagin can inhibit the expression of MAPKs proteins in the spinal cord of the rat model with bone cancer pain, ultimately decrease the content of IL-1 β , TNF- α , and MCP-1 to alleviate the pain during the process of cancer pain.

Key words: cinobufagin; CIBP; analgesia; MAPKs; mechanical pain; thermal pain; cytokines

当今世界,癌症已经严重威胁人类的健康,大部分晚期肿瘤(其中包括乳腺癌、肺癌、前列腺癌等)在其原位组织中很难被检测,但会发生骨转移,超过三分之一的骨转移患者会产生极大地疼痛,称之为骨癌痛(cancer-induced bone pain, CIBP)^[1]。CIBP产生主要是由于肿瘤组织通过骨膜的伸展或感觉神经的侵犯在骨内扩张,而表现出的一种躯体疼痛及神经性疼痛,往往这类患者会产生焦虑、抑郁及负面情绪,严重影响其生活质量^[2-3]。随着癌症发病率、生存率的升高,CIBP已成为人们日益关注的一个健康问题,对于CIBP的预防策略也变得尤为重要^[4]。目前,临床上对于CIBP的治疗方法很多,但目前的治疗往往不能充分缓解患者疼痛,并常常由于药物剂量产生许多不可避免的副作用,而传统中医药在恶性肿瘤和癌痛的防治中发挥越来越重要的作用,华蟾素(cinobufagin)是蟾蜍科动物中华大蟾蜍或黑眶蟾蜍等阴干全皮经加工提取的水溶性制剂,是我国自主研发的二类新药,具有清热解毒、利水消肿、化瘀溃坚等作用^[5-6]。课题组前期证实华蟾素可以通过上调肿瘤组织CD3/4/8淋巴细胞POMC/ β -END/ μ -OR相关信号通路增加阿片受体的含量,提高大鼠的机械痛与热痛阈值,发挥局部镇痛作用^[7-10]。前期的预试验进一步观察到华蟾素能够抑制CIBP大鼠脊髓相关炎症因子的释放,但具体作用机制还不清楚,本课题拟在前期基础上,进一步深入研究华蟾素的镇痛作用机制。

1 材料与方法

1.1 主要材料

筛选出大鼠机械痛阈值处于26.0~32.0 g、热痛阈值处于14.0~19.0 s的SPF级雌性SD大鼠,体质量160~180 g,由三峡大学医学院实验动物中心提供,实验动物许可证号SCXK(鄂)2017-0061。Walker-256乳腺癌细胞由三峡大学医学院国家中医药管理局中药药理/肿瘤科研三级实验室提供,保存于-80℃冰箱中。华蟾素注射液,安徽华润金蟾药业股份有限公司,批准文号国药准字Z34020274,

规格10 mL/支,产品批号161207-1。

小鼠单抗 β -actin(42 000),武汉博士德生物工程有限公司,货号BM0627,批号BST17374212;兔单抗ERK(42 000/44 000),Cell signaling公司,货号4695,批号14;兔单抗p-ERK(42 000/44 000),Cell signaling公司,货号4370,批号17;兔多抗p-JNK(t183, 50 000),Abcam公司,货号Ab47337,批号GR297606-4;兔多抗JNK(40 000~45 000、50 000~55 000),武汉三鹰生物技术有限公司,货号10023-1-ap,批号00070315;鼠单抗p-p38(40 000),Thermo公司,货号Ma5-15218,批号UE2771694;鼠单抗p38(38 000~42 000),武汉三鹰生物技术有限公司,货号66234-1-ig,批号00054597。IL-1 β 酶联免疫吸附测定试剂盒,货号E-EL-R0012c,批号YDVNNNDYDX;MCP-1酶联免疫吸附测定试剂盒,货号E-EL-R0633c,批号NLFBNNNDNYR;TNF- α 酶联免疫吸附测定试剂盒,货号E-EL-R0019c,批号3YJQ4TH51K,均购于武汉伊莱瑞特生物科技有限公司。

1.2 骨癌痛模型制备

取雌性幼鼠(体质量60~80 g,由三峡大学医学院实验动物中心提供,实验动物许可证号SCXK(鄂)2017-0061)ip乳腺癌Walker256细胞0.5 mL(细胞浓度为 4×10^7 /mL),接种第7天收集腹水,以无菌PBS(0.01 mol/L)漂洗细胞3次,制成细胞悬液,细胞浓度调整至 4×10^5 个/mL,置于冰上备用。大鼠(体质量160~200 g)麻醉后,仰卧固定于大鼠操作台,备皮后碘伏消毒右侧后肢胫骨处皮肤,于胫骨上段作1 cm切口,暴露胫骨,在胫骨结节下0.5~1 cm胫骨平台上用1 mL注射器针头垂直钻孔至骨髓腔,待骨髓血液无明显外流后,再用微量注射器将Walker256细胞悬液0.01 mL缓慢注入骨髓腔,注射完毕后用医用无菌骨蜡封住针孔,常规消毒伤口,局部给予少许青霉素后缝合伤口,具体操作见参考文献方法^[9-11]。假手术组采用同样的方法骨髓腔注射等量的灭活的Walker256细胞。

1.3 实验分组及给药

实验分为假手术组、模型组、华蟾素各浓度(低、中、高)组及假手术+华蟾素(高浓度)组,在造模后第 0、2、5、7 天进行各组大鼠左右后肢行为学检测。在造模第 7 天(造模成功)后,各组大鼠 ip 相应药物、模型组 ip 生理盐水,连续给药 7 d,并在造模后第 9、13 天进行各组大鼠左后肢行为学检测。华蟾素低、中、高浓度注射液的配制:购买的华蟾素注射液原浓度为高浓度,将华蟾素原液与生理盐水按 3:1 稀释后得到中浓度,按 1:1 稀释后得到低浓度,大鼠的给药量为 5 mL/kg。

1.4 大鼠行为学检测

1.4.1 大鼠机械痛行为检测 分别于造模前、造模后隔天检测各组大鼠左右后肢机械痛阈值。将大鼠置于安静环境中,室温(22 ± 1) $^{\circ}\text{C}$,机械性痛觉超敏采用 IITC von Frey 2391 测定,将大鼠置于底为网格的特制有机玻璃内,适应一段时间待大鼠安静后,将 von Frey 2391 的探针分别刺激大鼠左右后足脚掌中部皮肤,观察大鼠缩足反应,并记录大鼠的机械性痛阈值。每只大鼠测定 3 次,取平均值,前后 2 次不同刺激间隔为 10 min。

1.4.2 大鼠热痛行为检测 分别于造模前、造模后隔天检测各组大鼠左右后肢热痛阈值。大鼠处于安静环境中,室温(22 ± 1) $^{\circ}\text{C}$,热痛觉过敏采用辐射热测痛仪,大鼠置于底为光滑玻璃的有机玻璃格子内,适应一段时间待大鼠安静后,将强热光束分别照射大鼠左右后足脚掌中心皮肤,引起大鼠缩爪反应时间为大鼠缩爪潜伏期。本实验根据前期实验结果将刺激强度设定为 35%,每只大鼠测定 3 次,取平均值,2 次间隔 10 min。为防止大鼠热辐射烫伤,将自动切断电时间定为 20 s。

1.5 Western blotting 法检测大鼠脊髓 MAPK 信号通路相关蛋白的表达

大鼠麻醉后,冰上取大鼠 L4-6 段脊髓匀浆^[12],组织裂解满意后离心测定蛋白浓度。95 $^{\circ}\text{C}$ 高温煮沸

10 min 使蛋白灭活,制胶板,上样完成后,接好电极,电泳完成后夹好转膜夹,置于冰上开始转膜,完成后依次将 PVDF 膜浸泡于含 5%牛奶封闭液中、含一抗混合液中孵育,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。抗体稀释浓度为 β -actin: 1:200; ERK、p-ERK、p38、p-p38、JNK、p-JNK 为 1:1 000。TBST 洗涤 PVDF 膜 5~6 遍,然后将 PVDF 膜置于二抗孵育液中,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床上震荡 2 h, TBST 洗涤 PVDF 膜 5~6 遍。将 ECL 试剂中的增强液同稳定的过氧化物酶溶液等体积混合,滴于 PVDF 膜上反应,出现明显的荧光带后吸走剩余的底物液,盖上保鲜膜,在 Bioshine Chemi Q4800 mini 化学发光成像系统中成像。最后用 BandScan 软件分析胶片灰度值。转膜条件: β -actin、ERK、p-ERK、p38、p-p38: 200 mA, 90 min; JNK、p-JNK: 200 mA, 120 min。

1.6 ELISA 检测相关炎症因子表达情况

实验最后 1 d,大鼠麻醉后,冰上取出 L4-6 段脊髓,匀浆后离心取上清液。按 ELISA 试剂盒的说明进行相关炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 、MCP-1 的检测。

1.7 统计学处理

运用 SPSS 19.0 软件包进行统计分析处理。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 来表示。采用方差分析(有重复测量资料方差分析、单因素方差分析):两组间的两两比较,方差齐时用 LSD 法进行分析,方差不齐时,用 Dunnett T3 法进行分析。

2 结果

2.1 骨癌痛大鼠疼痛行为学变化

各组大鼠分别于造模前(第 0 天)、造模后第 2、5、7 天^[7-8]测左、右后肢的机械痛阈值与热痛阈值。假手术组各大鼠左、右后肢的机械痛阈值与热痛阈值差异无统计学意义($P > 0.05$);模型组各大鼠左后肢的机械痛阈值与热痛阈值明显低于右后肢,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结果见表 1、2。

与对照组相比,假手术组机械痛阈值与热痛阈值差异无统计学意义($P > 0.05$);与假手术组相比,

表 1 大鼠左、右后肢热痛阈值的变化 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Changes of thermal pain threshold of each limb in rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	大鼠左后肢热痛阈值/s				大鼠右后肢热痛阈值/s			
	第 0 天	第 2 天	第 5 天	第 7 天	第 0 天	第 2 天	第 5 天	第 7 天
假手术	16.02 $\pm$ 1.92	16.12 $\pm$ 1.99	16.21 $\pm$ 1.57	15.79 $\pm$ 1.62	15.78 $\pm$ 1.82	16.25 $\pm$ 1.87	16.01 $\pm$ 1.62	16.06 $\pm$ 1.59
模型	16.12 $\pm$ 1.56	13.13 $\pm$ 1.01	10.49 $\pm$ 1.23 [#]	6.89 $\pm$ 1.03 [#]	16.17 $\pm$ 1.45	15.98 $\pm$ 1.32	15.76 $\pm$ 1.54	16.12 $\pm$ 0.89

与右后肢同时时间比较: $^{\#}P < 0.05$

$^{\#}P < 0.05$ vs right limbs at the same time

表 2 大鼠左、右后肢机械痛阈的变化 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Changes of mechanical pain threshold of each limb in rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	大鼠左后肢机械痛阈/g				大鼠右后肢机械痛阈/g			
	第 0 天	第 2 天	第 5 天	第 7 天	第 0 天	第 2 天	第 5 天	第 7 天
假手术	28.90±2.30	27.95±2.01	28.20±1.90	28.56±2.05	28.45±1.96	28.21±2.12	28.54±1.83	27.89±1.95
模型	29.06±1.89	25.82±1.30	21.89±1.89 [#]	16.07±1.54 [#]	28.90±1.99	27.95±1.42	26.98±1.90	26.12±1.64

与右后肢同时时间比较: [#] $P < 0.05$

[#] $P < 0.05$ vs right limbs at the same time

模型组从第 5 天开始机械痛阈与热痛阈显著降低, 差异有明显统计学意义 ($P < 0.05$)。结果见表 3。

2.2 连续注射华蟾素对骨癌痛大鼠热痛阈与机械痛阈的影响

检测各组大鼠热痛阈与机械痛阈, 造模前各组大鼠痛阈无明显差异 ($P > 0.05$); 与假手术组相比, 造模后模型组与华蟾素各浓度组的热痛阈与机械痛阈逐渐降低, 差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$ 、 0.01)。与假手术组相比, 假手术+华蟾素 (高浓度) 组热痛阈与机械痛阈无明显变化 ($P > 0.05$)。与模型组相比, 给药后华蟾素各浓度 (低、中、高) 组热痛阈与机械痛阈较模型组升高, 差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$ 、 0.01)。结果见表 4、5。

2.3 单次注射华蟾素对骨癌痛大鼠热痛阈与机械痛阈的影响

根据连续注射华蟾素对骨癌痛大鼠热痛阈与机械痛阈的行为影响结果, 选择高浓度的华蟾素检测单次注射后对骨癌痛大鼠热痛阈与机械痛阈的影响。在骨癌痛模型造模后第 7 天开始 ip 华蟾素注射液, 并在单次注射后的 0.5、1、2、4、6、8、24 h 内检测各组大鼠的热痛阈与机械痛阈。与假手术组相比, 模型组大鼠热痛阈与机械痛阈均降低, 差异均具有显著的统计学意义 ($P < 0.01$); 假手术+华蟾素组的热痛阈与机械痛阈较假手术组未见明显差异 ($P > 0.05$)。与模型组相比, 予以华蟾素干预后, 在注射后的 0.5 h 内, 华蟾素组大鼠的热痛阈与机械痛阈较模型组未见明显升高

表 3 造模后各组大鼠热痛阈与机械痛阈的变化 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 3 Changes of thermal pain threshold and mechanical pain threshold of rats after modeling ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	大鼠左后肢热痛阈/s				大鼠右后肢机械痛阈/g			
	第 0 天	第 2 天	第 5 天	第 7 天	第 0 天	第 2 天	第 5 天	第 7 天
对照	16.34±1.87	15.74±1.78	15.87±1.61	16.22±1.69	29.40±2.01	28.42±1.34	27.61±2.06	28.12±2.11
假手术	16.02±1.92	16.12±1.99	16.21±1.57	15.79±1.62	28.90±2.30	27.95±2.01	28.20±1.90	28.56±2.05
模型	16.12±1.56	13.13±1.01	10.49±1.23 [#]	6.89±1.03 [#]	29.06±1.89	25.82±1.30	21.89±1.89 [#]	16.07±1.54 [#]

与假手术组同时时间相比: [#] $P < 0.05$

[#] $P < 0.05$ vs Sham group at the same time

表 4 连续注射华蟾素对骨癌痛大鼠热痛阈的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 4 Effect of cinobufagin on thermal pain threshold of CIBP rats ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	各组大鼠左后肢热痛阈/s					
	造模第 0 天	造模第 2 天	造模第 5 天	造模第 7 天	造模第 9 天	造模第 13 天
假手术	16.32±1.92	16.12±1.99	15.89±1.57	15.87±1.62	16.03±1.49	15.88±1.75
模型	16.12±1.56	13.13±1.01 ^{###}	10.49±1.23 ^{###}	6.89±1.03 ^{###}	5.78±0.90 ^{###}	5.40±1.45 ^{###}
假手术+华蟾素	15.89±1.89	15.79±1.96	16.32±1.54	16.16±1.61	15.77±1.39	16.12±1.63
低剂量华蟾素	16.03±1.91	13.15±1.00	10.59±1.13	7.49±1.32	7.79±0.98 [*]	8.54±1.01 [*]
中剂量华蟾素	16.03±1.91	13.15±1.00	10.59±1.13	7.49±1.32	8.34±0.89 [*]	9.21±1.24 [*]
高剂量华蟾素	16.03±1.91	13.15±1.00	10.59±1.13	7.49±1.32	8.89±0.95 ^{**}	10.56±1.59 ^{**}

与假手术组同时时间比较: ^{###} $P < 0.01$; 与模型组同时时间比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$

^{###} $P < 0.01$ vs Sham group at the same time; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group at the same time

表 5 连续注射华蟾素对骨癌痛大鼠机械痛阈值的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)Table 5 Effect of cinobufagin on mechanical pain threshold of CIBP rats ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	各组大鼠左后肢机械痛阈值/g					
	造模第 0 天	造模第 2 天	造模第 5 天	造模第 7 天	造模第 9 天	造模第 13 天
假手术	28.90±2.30	27.54±2.01	28.20±1.90	28.34±2.05	27.69±2.16	28.19±1.51
模型	29.06±1.89	25.82±1.30 ^{##}	21.89±1.89 ^{##}	16.07±1.54 ^{##}	15.21±1.82 ^{##}	13.03±1.59 ^{##}
假手术+华蟾素	28.32±2.01	28.12±1.98	27.34±1.89	28.01±2.03	28.34±2.10	27.53±1.49
低剂量华蟾素	29.64±1.91	25.96±1.33	22.51±1.69	17.71±1.45	18.12±1.53*	19.99±1.49*
中剂量华蟾素	29.64±1.91	25.96±1.33	22.51±1.69	17.71±1.45	18.54±1.45*	21.09±1.35*
高剂量华蟾素	29.64±1.91	25.96±1.33	22.51±1.69	17.71±1.45	19.04±1.61**	22.90±1.59**

与假手术组同时时间比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组同时时间比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ ^{##} $P < 0.01$ vs Sham group at the same time; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group at the same time

($P > 0.05$); 在注射后的 1、2、4、6、8、24 h 内, 华蟾素组大鼠的热痛阈值与机械痛阈值较模型组明显升高, 差异均具有显著的统计学意义 ($P < 0.05$ 、0.01); 且华蟾素在单次注射后的 6 h 作用达到高峰而后作用缓慢减弱。结果见表 6、7。

2.4 华蟾素对骨癌痛大鼠脊髓 MAPK 信号通路相关蛋白表达的影响

采用 Western blotting 检测连续给药 7 d 后各组大鼠 L4-6 段脊髓中 MAPKs 信号通路相关蛋白表达

情况, 与假手术组相比, 模型组大鼠脊髓中 p-JNK、p-p38、p-ERK 蛋白的表达量上调, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。与模型组相比, 华蟾素组 ip 华蟾素注射液后, 大鼠脊髓中 p-JNK、p-p38 蛋白的表达量下调 ($P < 0.05$), 而 p-ERK 蛋白的表达未见明显差异 ($P > 0.05$)。结果见图 1。

2.5 华蟾素对骨癌痛大鼠脊髓中相关细胞因子表达的影响

连续给药 7 d 后, 末次大鼠疼痛行为学检测结

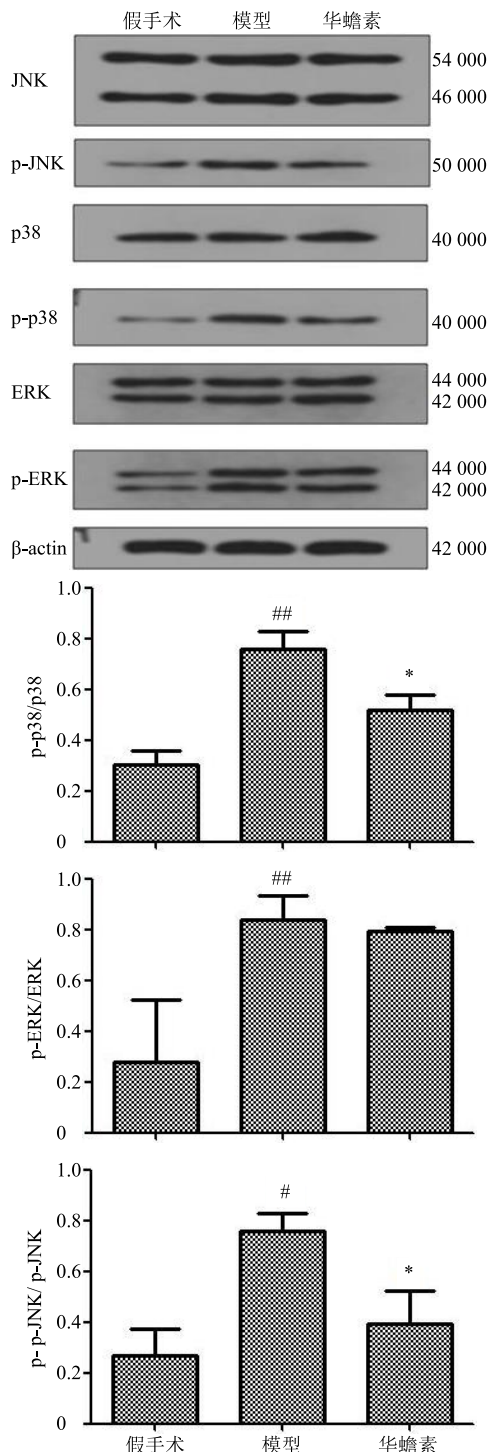
表 6 单次注射华蟾素对骨癌痛大鼠热痛阈值的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)Table 6 A single dosages of cinobufagin on thermal pain threshold of CIBP rats ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	各组大鼠热痛阈值/s								
	第 0 天	第 7 天	单次注射华蟾素后作用时间						
			0.50 h	1.00 h	2.00 h	4.00 h	6.00 h	8.00 h	24.00 h
假手术	16.32±1.92	15.87±1.62	16.10±0.57	16.57±0.47	16.09±0.17	16.21±0.33	15.75±0.37	16.12±0.47	16.03±1.49
模型	16.12±1.56	6.89±1.03 ^{##}	7.35±0.15 ^{##}	6.87±0.05 ^{##}	6.38±0.23 ^{##}	6.01±0.04 ^{##}	6.67±0.31 ^{##}	6.25±0.34 ^{##}	5.78±0.90 ^{##}
假手术+华蟾素	15.89±1.89	16.16±1.61	15.85±0.07	15.89±0.61	15.95±0.09	16.12±0.12	15.67±0.51	15.85±0.23	16.25±0.35
华蟾素	16.03±1.91	7.49±1.32	6.70±0.28	8.12±0.16*	9.13±0.11**	12.95±0.09**	13.62±0.24**	10.93±0.19**	6.21±0.95*

与假手术组同时时间比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组同时时间比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ ^{##} $P < 0.01$ vs Sham group at the same time; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group at the same time表 7 单次注射华蟾素对骨癌痛大鼠机械痛阈值的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)Table 7 A single dosages of cinobufagin on mechanical pain threshold of CIBP rats ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	各组大鼠机械痛阈值/g								
	第 0 天	第 7 天	单次注射华蟾素后作用时间						
			0.50 h	1.00 h	2.00 h	4.00 h	6.00 h	8.00 h	24.00 h
假手术	28.90±2.30	28.34±2.05	28.00±0.57	27.72±0.38	27.22±0.46	26.22±0.46	26.90±0.16	27.80±0.30	27.69±2.16
模型	29.06±1.89	16.07±1.54 ^{##}	16.23±1.06 ^{##}	15.44±0.49 ^{##}	14.99±0.30 ^{##}	14.32±0.47 ^{##}	15.52±0.39 ^{##}	15.99±0.02 ^{##}	15.21±0.94 ^{##}
假手术+华蟾素	28.32±2.01	28.01±2.03	27.86±0.53	26.85±0.41	26.92±0.46	26.30±0.41	27.05±0.11	27.84±0.21	28.34±2.10
华蟾素	29.64±1.91	17.71±1.45	16.90±0.17	18.10±0.16**	19.54±0.47**	22.80±0.30**	24.06±0.11**	20.45±0.47**	18.21±0.59*

与假手术组同时时间比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组同时时间比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ ^{##} $P < 0.01$ vs Sham group at the same time; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group at the same time



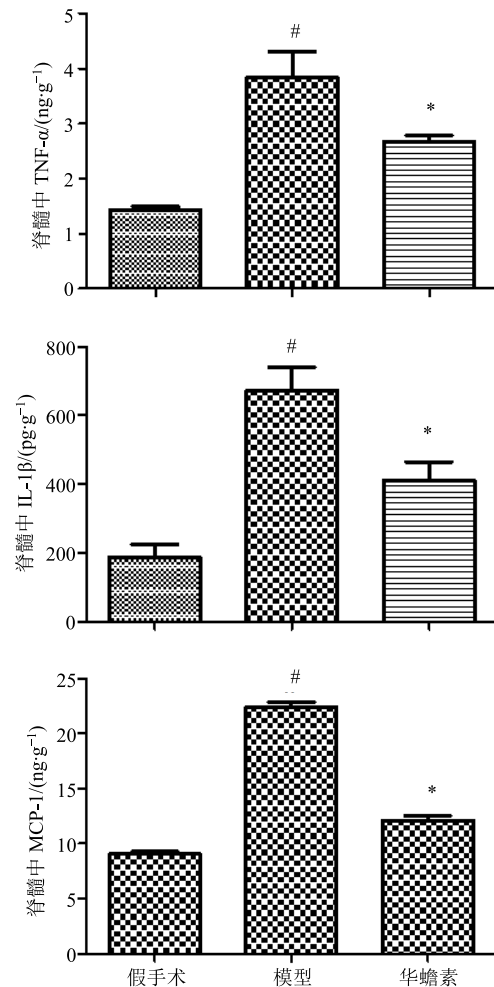
与假手术组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs Sham group; * $P < 0.05$ vs model group

图 1 华蟾素对骨癌痛大鼠脊髓 MAPK 信号通路相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 1 Effect of cinobufagin on expression of proteins related to MAPK signaling pathway in spinal cord on CIBP rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

束后处理动物,冰上取脊髓,研磨后,采用 ELISA 进行相关细胞因子的检测,实验结果表明;与假手

术组大鼠相比,模型组大鼠脊髓中相关细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 、MCP-1 的表达均明显上调,差异均具有统计学意义 (P 均 < 0.05);与模型组相比,华蟾素组大鼠脊髓中 TNF- α 、IL-1 β 、MCP-1 的含量均降低,差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$)。结果见图 2。



与假手术组比较: # $P < 0.05$; 与模型组比较: * $P < 0.05$
$P < 0.05$ vs Sham group; * $P < 0.05$ vs model group

图 2 华蟾素对骨癌痛大鼠脊髓中相关细胞因子表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 2 Effect of cinobufagin on expression of cytokines in spinal cord in each CIBP group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

3 讨论

大量的实验研究证实,CIBP 发生往往是由于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^[13-14]。CIBP 的机制错综复杂、病因也尚未完全阐明,但 CIBP 所诱发的神经化学病理变化是与其他慢性疼痛(如神经性疼痛、炎症性疼痛)不同的,这些变化有助

于疼痛的产生和维持。

MAPKs 通路在调控细胞生长、增值、分化和凋亡等细胞过程中发挥重要作用,是持续性疼痛发生的必要条件,在神经细胞损伤后,MAPKs 表现出明显的磷酸化水平^[15]。MAPKs 信号通路激活后可以调节细胞因子的合成,而细胞因子又是联系免疫系统与中枢系统的重要物质,是周围神经系统和中枢神经系统疼痛超敏反应的关键调节剂,引起热痛敏与机械痛敏^[16]。其中细胞因子 TNF- α 可以增加前列腺素、交感神经递质等间接作用或直接激活感受神经纤维上受体加重机体损伤,另一方面,能通过介导胶质细胞内的 MAPK 和蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 相关信号通路使特异热传感的辣椒素受体阳离子通道 (transient receptor potential vanilloid 1, TRPV1) 敏化,增加疼痛^[17-18]。趋化因子,如单核细胞趋化蛋白 (MCP-1, 又称 CCL2),与受体 CCR2 结合后激活小胶质细胞,使胞内 p38 MAPK 相关蛋白磷酸化,产生细胞因子 (如 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 和 IL-18 等),加速疼痛进程,其中 TNF- α 又可反向刺激星形胶质细胞活化释放 CCL2,如此周而复始,在疼痛的发生发展中占有重要地位^[19-21]。MAPKs 家族有 3 个主要成员:细胞外信号调节激酶 1 和 2 (extracellular signal-regulated kinase 1/2, ERK1/2)、p38、c-jun 氨基末端激酶 (c-Jun N-terminal kinases, JNK)。其中, p38 蛋白的磷酸化水平主要表现在小胶质细胞中, JNK 蛋白的磷酸化主要在星形胶质细胞中,而 ERK 蛋白的磷酸化呈现为动态变化,在损伤早期其活化主要表现在小胶质细胞、后期逐渐过渡到星形胶质细胞^[22]。传统中医药在恶性肿瘤和癌痛的防治中发挥越来越重要的作用,开发了一批抗癌、镇痛效果显著的中药制剂,如苦参碱、华蟾素等^[23]。临床上,华蟾素常被用于治疗各种类型的肿瘤,如肝癌、肺癌、胰腺癌及结直肠癌等;此外,还当作清热剂、解毒剂、麻醉剂、强心剂及利尿剂使用。其化学成分比较繁多,主要含蟾毒配基类、吲哚生物碱类、蟾蜍毒素类、多肽类、核酸类、氨基酸类等成分,对其抗癌和镇痛作用的深入研究,发现其中蟾毒配基类成分被认为是主要抗肿瘤活性成分;而华蟾素注射剂中有约 50% 以上为水溶性多肽类成分,该类成分具有一定的镇痛作用,但其作用机制仍需进一步研究^[24]。研究证实华蟾素可以抑制肿瘤细胞减少对组织神经压迫侵蚀参与其部分镇痛机制,且华蟾素的镇痛镇痛作用能被不能通过血

脑屏障的、选择性外周阿片受体拮抗剂纳洛酮的四价盐的衍生物 (NAL-M) 阻断,由此提示华蟾素的镇痛作用由外周而非中枢的阿片受体所介导;而课题组前期也已经证实华蟾素可通过增加细胞因子的含量来促进 β -内啡肽 (β -END) 的释放,增加免疫细胞中前阿片黑素细胞皮质激素 (POMC) 的表达来提高 β -END 的合成,从而增加 β -END 与 μ -阿片受体在肿瘤病变、组织的结合机会而发挥外周镇痛作用^[9-10]。

本实验研究中,通过大鼠患侧与健侧热痛阈值与机械痛阈值的比较,发现 CIBP 模型大鼠只出现患肢的痛敏,予以中药华蟾素干预后,能明显提高模型组大鼠的痛阈值。随后,进行单次给药、连续给药及药物浓度的比较,发现华蟾素的镇痛作用具有浓度依赖性,浓度越大,作用越显著,故后续实验均选用高浓度的华蟾素,单次给药后的 6 h 华蟾素的镇痛作用最强,随后镇痛作用逐渐降低。在假手术组中予以华蟾素后,发现华蟾素对假手术组大鼠痛阈值无影响,也就是说,华蟾素并不能够提高正常大鼠的痛阈值。进行脊髓相关蛋白检测时,发现模型组中 MAPKs 各相关蛋白的表达水平较假手术组明显增强;华蟾素组 ip 华蟾素注射液后,大鼠脊髓中 p-JNK、p-p38 蛋白的表达量下调,而 p-ERK 蛋白的表达未见明显差异。由此得出华蟾素可能是通过抑制脊髓 MAPKs 信号通路相关蛋白 (JNK、p38) 的活化,减少细胞因子释放,从而减轻中枢敏化作用发挥缓解 CIBP 的作用。

参考文献

- [1] Buga S, Sarria J E. The management of pain in metastatic bone disease [J]. *Cancer Control*, 2012, 19(2): 154-166.
- [2] Van D B E M, de Rijke J, Kessels A, et al. Prevalence of pain in patients with cancer: A systematic review of the past 40 years [J]. *Ann Oncol*, 2007, 18(9): 1437-1449.
- [3] Goblirsch M J, Zwolak P, Clohisy D R. Advances in understanding bone cancer pain [J]. *J Cell Biochem*, 2010, 96(4): 682-688.
- [4] Mantyh P W. Bone cancer pain: From mechanism to therapy [J]. *Curr Opin Support & PA*, 2014, 8(2): 83-89.
- [5] Figura N, Smith J, Yu H M. Mechanisms of, and adjuvants for, bone pain [J]. *Hematol Oncol Clin N*, 2018, 32(3): 447-458.
- [6] Kolb A D, Shupp A B, Mukhopadhyay D, et al. Osteoblasts are "educated" by crosstalk with metastatic breast cancer cells in the bone tumor microenvironment

- [J]. *Breast Cancer Res*, 2019, 21(1): 31-38.
- [7] 郭 宁, 李彩霞, 朱德淼, 等. 华蟾素胶囊联合吡柔比星治疗晚期乳腺癌的临床研究 [J]. *现代药物与临床*, 2019, 34(1): 200-204.
- [8] 彭 贝, 巩仔鹏, 陈 涛. 华蟾素注射液治疗肝癌的基础和临床研究进展 [J]. *药物评价研究*, 2011, 34(1): 63-66.
- [9] Chen T, Hu W, He H, *et al.* A study on the mechanism of cinobufagin in the treatment of paw cancer pain by modulating local β -endorphin expression *in vivo* [J]. *Evid Based Compl Alt*, 2013, 2013(5): 851256-851265.
- [10] Tao C, Yuan S, Wan X N, *et al.* Chinese herb cinobufagin-reduced cancer pain is associated with increased peripheral opioids by invaded CD3/4/8 lymphocytes [J]. *Oncotarget*, 2016, 8(7): 11425-11441.
- [11] 刘 丹, 张 文, 王心怡, 等. 华蟾素对骨癌痛大鼠的镇痛效应及对脊髓胶质细胞活化的影响 [J]. *癌变·畸变·突变*, 2018, 30(4): 56-60.
- [12] Peters C M, Ghilardi J R, Keyser C P, *et al.* Tumor-induced injury of primary afferent sensory nerve fibers in bone cancer pain [J]. *Exp Neurol*, 2005, 193(1): 85-100.
- [13] Honore P, Rogers S D, Schwei M J, *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*, 2015, 98(3): 585-598.
- [14] Sun P, Matthew E, Brooke D.W, *et al.* Role of the bone microenvironment in the development of painful complications of skeletal metastases [J]. *Cancers*, 2018, 10(5): 141-155.
- [15] Ji R R, Gereau R W, Malcangio M, *et al.* MAP kinase and pain [J]. *Brain Res Rev*, 2009, 60(1): 135-148.
- [16] Kiguchi N, Kobayashi Y, Kishioka S. Chemokines and cytokines in neuroinflammation leading to neuropathic pain [J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2012, 12(1): 55-61.
- [17] Dai W L, Yan B, Jiang N, *et al.* Simultaneous inhibition of NMDA and mGlu1/5 receptors by levo-Corydalmine in rat spinal cord attenuates bone cancer pain [J]. *Int J Cancer*, 2017, 141(4): 805-815.
- [18] Li P, Chen X R, Xu F, *et al.* Alamandine attenuates sepsis-associated cardiac dysfunction via inhibiting MAPKs signaling pathways [J]. *Life Sci*, 2018, 206(3):106-116.
- [19] Kiguchi N, Kobayashi Y, Kishioka S. Chemokines and cytokines in neuroinflammation leading to neuropathic pain [J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2012, 12(1): 55-61.
- [20] Kwiatkowski K, Piotrowska A, Rojewska E, *et al.* The RS504393 influences the level of nociceptive factors and enhances opioid analgesic potency in neuropathic rats [J]. *J Neuroimmun Pharmacol*, 2017, 12(3): 402-419.
- [21] Mika J. Modulation of microglia can attenuate neuropathic pain symptoms and enhance morphine effectiveness [J]. *Pharmacolo Rep*, 2008, 60(3): 297-307.
- [22] Ni H D, Yao M, Huang B, *et al.* Glial activation in the periaqueductal gray promotes descending facilitation of neuropathic pain through the p38 MAPK signaling pathway. [J]. *J Neurosci Res*, 2015, 94(1): 50-61.
- [23] Wang Z X, Qi F H, Cui Y G, *et al.* An update on Chinese herbal medicines as adjuvant treatment of anticancer therapeutics [J]. *BioSci Trends*, 2018, 12(30): 220-239.
- [24] 高 波, 吴 旭, 边宝林. 华蟾素注射液多肽成分分析和镇痛活性评价 [J]. *中华中医药杂志*, 2018, 33(7): 3134-3137.