

实验研究

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2015.02.016

芷辛方对骨癌痛大鼠胶质细胞蛋白表达及核因子 κ B 的影响张 斌¹, 魏冬梅¹, 卞尧尧², 白亢亢², 周春祥^{2*}

(1. 宁波市中医院, 浙江省宁波市丽园北路 819 号, 315010; 2. 南京中医药大学基础医学院)

摘要 目的 探讨芷辛方镇痛作用的可能机制。方法 将 70 只 SD 大鼠随机分为空白组、模型组、西药对照组 (盐酸曲马多, 0.01 g/kg)、芷辛方高剂量组 (芷辛方水煎浓缩制剂, 9 g/kg)、芷辛方正常剂量组 (芷辛方水煎浓缩制剂, 4.5 g/kg)、芷辛方低剂量组 (芷辛方水煎浓缩制剂, 2.25 g/kg)、中药对照组 (五灵止痛胶囊, 0.06 g/kg), 每组 10 只。除空白组外, 其余各组大鼠采用左侧后肢胫骨注射腹水瘤 Walker 256 细胞悬液的方法建立骨癌痛大鼠模型, 在造模后 14 天开始灌胃给予相应药物, 每日 1 次, 连续 7 天。取大鼠脊髓 L4-L5 部位检测脊髓组织神经胶质纤维酸性蛋白 (GFAP)、分化群 11b (CD11b) mRNA、核因子 κ B (NF- κ B) 的表达。结果 模型组 GFAP 染色阳性细胞明显多于空白组、芷辛方正常剂量组和芷辛方高剂量组。模型组 CD11b mRNA 表达较西药对照组、芷辛方正常剂量、芷辛方高剂量组明显升高 ($P < 0.01$), 各药物治疗组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。模型组 NF- κ B 表达高于空白组, 芷辛方高剂量组 NF- κ B 表达明显低于模型组 ($P < 0.01$)。结论 芷辛方对骨癌痛大鼠镇痛作用的机制可能与抑制脊髓胶质细胞增殖活化和下调 NF- κ B 蛋白有关。

关键词 骨癌痛; 芷辛方; 神经胶质酸性蛋白; 分化群 11b; 核因子 κ B

近年来随着癌症诊疗技术的进步, 癌症患者生存时间相对延长, 但癌症疼痛仍是影响癌症患者生存质量的一个严重问题, 大多数晚期癌症患者都承受着难以忍受的剧烈疼痛^[1-2]。芷辛方是河南省中医药研究院张海岑研究员的临床镇痛经验方, 具有温经通络、活血化痹、祛风止痛的功效。本研究建立骨癌痛大鼠模型并以芷辛方进行干预, 以探讨芷辛方可能的镇痛作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验细胞与动物

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。SPF 级 SD 大鼠, 雌性 10 只, 4 周龄, 体重 60~80 g; 雄性 70 只, 5 周龄, 体重 150~180 g, 购于南京中医药大学实验动物中心, 实验动物合格证号: SCXK (浙) 2008-0033。其中雌性大鼠用来嫁接 Walker 256 腹水瘤,

雄性大鼠用来制作骨癌痛动物模型。

1.2 实验药物

盐酸曲马多 (北京四环医药科技股份有限公司, 批号: H10960043); 五灵止痛胶囊 (广州中一药业有限公司, 批号: Z44022539); 芷辛方 (由白芷 12 g、细辛 3 g、川芎 9 g、蜈蚣 3 g、白芍 6 g、乳香 6 g、炮附片 3 g、甘草 3 g 组成) 采用水提法制备含生药 2.25 g/ml 的药液。

1.3 主要试剂及仪器

逆转录酶 M-MLV 和 Oligo (dT) 引物 (美国 Promega 公司, 货号: M1701、C1101); 兔抗大鼠核因子 κ B (NF- κ B) 单克隆抗体 (美国 Cell Signal 公司, 货号: E130); 过氧化物酶标记的羊抗兔二抗 (丹麦 Dako 公司, 货号: E0466); 兔抗大鼠 GAPDH 单克隆抗体 (美国 SantaCruz 公司, 货号: SC-8008); 神经胶质纤维酸性蛋白 (GFAP) 免疫组化检测试剂盒 (福建迈新生物技术有限公司, 货号: MAB-0582)。SpectraMax M2 酶标仪 (美国 MDC 公司); PCR 仪 (美国 Bio-Rad 公司)。

基金项目: 国家自然科学基金 (81273639)

* 通讯作者: chunxiangzhou@sina.com, (025) 85811772

1.4 造模方法

将雌性大鼠腹腔注射 0.5 ml Walker 256 肿瘤细胞悬液, 6~7 天后呈明显腹水症状时抽取大鼠腹水 3 ml, 离心弃上清, PBS 重悬计数。参照文献 [4] 方法建立骨癌痛大鼠模型。采用 10% 水合氯醛 (3 g/kg) 对雄性大鼠进行麻醉, 将其仰卧位固定于操作台上, 将大鼠左侧后肢胫骨上段部位打孔, 并用 25 μ l 微量注射器进入骨髓腔, 注入含有 Walker 256 雌性大鼠腹水瘤悬置细胞 3×10^3 细胞悬液 10 μ l, 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, 伤口进行分层缝合并给予青霉素预防感染。对造模后的大鼠进行疼痛行为学、X 线摄片和 HE 染色方法检测验证造模是否成功 [4-5]。

1.5 动物分组及给药

将 70 只雄性大鼠按照随机数字表分为空白组、模型组、西药对照组 (盐酸曲马多, 0.01 g/kg)、芷辛方高剂量组 (芷辛方水煎浓缩制剂, 9 g/kg)、芷辛方正常剂量组 (芷辛方水煎浓缩制剂, 4.5 g/kg)、芷辛方低剂量组 (芷辛方水煎浓缩制剂, 2.25 g/kg)、中药对照组 (五灵止痛胶囊, 0.06 g/kg), 每组各 10 只。造模 14 天后开始灌胃, 每日 1 次, 连续 7 天; 空白组、模型组不作任何干预。

1.6 观察指标及方法

1.6.1 GFAP 表达 取大鼠 L4-L6 脊髓组织标本, 常规脱水, 石蜡包埋, 石蜡切片常规脱蜡至水。用 SP 法进行 GFAP 免疫组织化学染色, 实验操作按照试剂盒说明书进行。

1.6.2 分化群 11b (CD11b) mRNA 表达 Trizol Reagent 法从大鼠脊髓背角组织中提取 RNA, 取 0.1 μ g RNA 加入 1 μ l 的 Oligo (dT) 15, 70℃ 温浴 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 μ l, 37℃ 60 min、70℃ 15 min 灭活反转录酶的活性, 反转录成 cDNA 之后 4℃ 保存备用。引物序列以及 PCR 产物大小: CD11b 前引物: 5'-TCTGGCGACAGTCCTAAC-3', 后引物: 5'-CAC-CAAACCTTTTCTCCGT-3'; GAPDH 前引物: 5'-TCAACGGCACAGTCAAGG-3', 后引物: 5'-ACCACTGGATGCAGGGAT-3'。PCR 体系: 95℃ 5 min、94℃ 30 s、54℃ 35 s, 35 个循环, 72℃ 45 s, 72℃ 10 min, 4℃ 保存。凝胶影像分析仪 (Bio-Rad Chemi Doc XRS) 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。

1.6.3 NF- κ B 表达 Western Blot 法测定, 脊髓 L4-L5 段背角称重, 加入裂解液 (80 mg/ml), 置冰浴中匀浆机匀浆 15~20 s, 静置 30 min, 离心 16 000 r/min, 4℃、20 min, 取上清, 蛋白含量测定。将裂解后的蛋白样品转移至 100℃ 水浴加热 5 min 使蛋白变性。SDS-PAGE 蛋白电泳后将 gel 转移至 PVDF 膜后室温封闭 1 h (PBST + 5% 脱脂奶粉), 加一抗 (1:1000 稀释), 4℃ 过夜。PBST 洗膜 3 次, 10 min/次, 加入二抗 (1:5000 稀释), 室温孵育 1 h。计算各实验组电泳条带与对照组电泳条带面积、灰度比值。

1.7 统计学方法

采用 SPSS17.0 统计软件进行统计分析, 计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 各组大鼠脊髓 GFAP 表达变化

模型组大鼠脊髓背角 GFAP 明显激活, 比空白组 GFAP 染色阳性细胞增多, 颜色更深, 突起显著增多, 提示模型组星型胶质细胞被激活, 且表现出增生肥大的特征。模型组 GFAP 表达明显高于空白组、芷辛方正常剂量组和芷辛方高剂量组; 芷辛方低剂量组、中药对照组, 西药对照组与模型组比较, GFAP 表达未见显著差异。

2.2 各组大鼠脊髓 CD11b mRNA 表达比较

表 1 示, 模型组 CD11b mRNA 表达与空白组比较明显升高 ($P < 0.01$); 模型组 CD11b mRNA 表达高于芷辛方正常剂量组、芷辛方高剂量组、西药对照组 ($P < 0.01$); 芷辛方各剂量组与中药对照组、西药对照组比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 1 各组骨癌痛大鼠脊髓 CD11b mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	CD11b mRNA
空白组	10	1.000 $\pm$ 0.000
模型组	10	2.734 $\pm$ 0.393*
西药对照组	10	1.164 $\pm$ 0.057 Δ
芷辛方高剂量组	10	1.269 $\pm$ 0.063 Δ
芷辛方正常剂量组	10	1.350 $\pm$ 0.021 Δ
芷辛方低剂量组	10	1.708 $\pm$ 0.620
中药对照组	10	1.506 $\pm$ 0.071

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

2.3 各组大鼠脊髓 NF- κ B 表达比较

表 2 示, 模型组 NF- κ B 表达与空白组比较显

著升高 ($P < 0.01$); 芷辛方高剂量组 NF- κ B 表达明显低于模型组 ($P < 0.01$); 芷辛方各剂量组与中药对照组、西药对照组比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 2 各组骨癌痛大鼠脊髓 NF- κ B 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	NF- κ B
空白组	10	1.000 $\pm$ 0.000
模型组	10	1.398 $\pm$ 0.013*
西药对照组	10	1.238 $\pm$ 0.039
芷辛方高剂量组	10	1.114 $\pm$ 0.013 $^{\Delta}$
芷辛方正常剂量组	10	1.178 $\pm$ 0.008
芷辛方低剂量组	10	1.310 $\pm$ 0.078
中药对照组	10	1.300 $\pm$ 0.090

注: NF- κ B, 核因子 κ B; 与空白组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, $^{\Delta}P < 0.01$

3 讨论

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调控骨癌痛病理性疼痛过程, 二者均参与了痛觉过敏和痛觉超敏的形成^[4], 而且起着伤害性刺激疼痛放大的作用。本研究结果显示, GFAP 作为星形胶质细胞的标志性蛋白在骨癌痛大鼠脊髓组织中的表达显著升高, 提示其参与了骨癌痛的发生。同时, 芷辛方正常剂量组和高剂量组 CD11b mRNA 表达与模型组比较明显降低, 揭示芷辛方能对小胶质细胞活化有效抑制从而抑制骨癌痛的发生和发展。NF- κ B 是从 B 细胞核抽提物中发现的一种核蛋白因子^[5], 可调控细胞因子、炎症因子、趋化因子等多种炎症介质的表达。被激活的 NF- κ B 可以调控炎症和免疫相关基因的表达, 与疼痛的产生和持续有着密切的关系^[6-8]。研究证实, 通过抑制神经细胞中的 NF- κ B 表达可以对炎症反应疼痛起到镇痛效果, 并且在炎性疼痛和神经病理疼痛模型中均能见 NF- κ B 的激活^[9-13]。本研究结果显示, 模型组 NF- κ B 表达与空白组比较显著升高; 芷辛方高剂量组 NF- κ B 表达明显低于模型组, 提示 NF- κ B 参与骨癌痛形成过程, 而芷辛方对骨癌痛有抑制作用。

芷辛方具有温经通络、活血化瘀、祛风止痛、温阳通痹的功效。研究证实, 活血化瘀的中药具有镇痛、抗炎、抑制免疫的功效^[14]。本研究结果进一步提示芷辛方可以减少胶质细胞的表达进而达到对 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依据。但是芷辛方是一个复方制剂, 成分物质复杂, 故其确切机制仍需进一步研究证实。

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): 129-134.
- [3] Medhurst SJ, Walker K, Bowes M, et al. A rat model of bone cancer pain [J]. Pain, 2002, 96(1-2): 129-140.
- [4] 张斌, 白亢亢, 卞尧尧, 等. 骨癌痛大鼠髓内 SIGIRR 的表达变化 [J]. 免疫学杂志, 2014, 30(5): 402-406.
- [5] Tikka TM, Koistinaho JE. Minocycline provides neuroprotection against N-methyl-D-aspartate neurotoxicity by inhibiting microglia [J]. Immunol, 2001, 166(12): 7527-7533.
- [6] Mercurio F, Manning AM. Multiple signals converging on NF- κ B [J]. Curr Opin Cell Biol, 1999, 11(2): 226-232.
- [7] 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.
- [8] Wu LC, Goettl VM, Madias F, et al. Reciprocal regulation of nuclear factor kappa B and its inhibitor ZAS3 after peripheral nerve injury [J]. BMC Neurosci, 2006, 7(1): 4.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] Niederberger E, Schmidtke A, Gao W, et al. Impaired acute and inflammatory nociception in mice lacking the p50 subunit of NF- κ B [J]. Eur J Pharmacol, 2007, 559(1): 55-60.
- [12] Zhu J, Wei X, Feng X, et al. Repeated administration of mirtazapine inhibits development of hyperalgesia/allodynia and activation of NF- κ B in a rat model of neuropathic pain [J]. Neurosci Lett, 2008, 433(1): 33-37.
- [13] O'Rielly DD, Loomis CW. Spinal nerve ligation-induced activation of nuclear factor kappa B is facilitated by prostaglandins in the affected spinal cord and is a critical step in the development of mechanical allodynia [J]. Neuroscience, 2008, 155(3): 902-913.
- [14] de Mos M, Laferriere A, Millicamps M, et al. Role of

NF- κ B in an animal model of complex regional pain

1161-1169.

syndrome-type I (CRPS-I) [J]. J Pain, 2009, 10(11):

Impact of *Xinzhi Formula* on the Expression of Glial Cell Protein and Nuclear Factor κ B in Bone Cancer Pain Rats

ZHANG Bin¹, WEI Dongmei¹, BIAN Yaoyao², BAI Kangkang², ZHOU Chunxiang²

(1. Ningbo Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhejiang province, 315010; 2. School of Basic Medical Sciences of Nanjing University of Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of analgesic effect of *Xinzhi Formula* (XZF).

Methods In total 70 SD rats were randomly divided into control group, model group and western medicine group (tramadol hydrochloride, 0.01 g/kg), XZF high dose group (concentrated decoction of XZF, 9 g/kg), XZF normal dose group (concentrated decoction of XZF, 4.5 g/kg), XZF low dose group (concentrated decoction of XZF, 2.25 g/kg) and TCM control group (*Wuling Zhitong Capsule*, 0.06 g/kg), with 10 rats in each. Except for the control group, all groups were injected with Walker256 ascites tumor cell suspension on the left hind tibia to establish bone cancer pain models. Fourteen days after modeling, corresponding medication was applied by gastric administration, once daily for 7 days. The expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP), cluster of differentiation 11b (CD11b) mRNA, nuclear factor- κ B (NF- κ B) in spinal cord tissue from L4-L5 of the rats was detected. **Results**

There were much more GFAP positive cells in the model group than that in the control group and XZF normal dose and high dose groups. The expression of CD11b mRNA in the model group was significantly higher than that in the western medicine group, and XZF normal dose and high dose groups ($P < 0.01$), but there was no significant difference among treatment groups. The expression of NF- κ B in the model group was higher than that in the control group, and the expression of NF- κ B in the XZF high dose group was significantly lower than that in the model group ($P < 0.01$). **Conclusion** The mechanism of analgesic effects of *Xinzhi Formula* on rat model of bone cancer pain may be related to the inhibition of cell proliferation and activation in the spinal glial cells and down-regulating of NF- κ B proteins.

Keywords bone cancer pain; *Xinzhi Formula*; glial fibrillary acidic protein; cluster of differentiation 11b; nuclear factor κ B

(收稿日期: 2014-01-14; 修回日期: 2014-10-08)

编辑: 洪 涛

当飞利肝宁胶囊临床应用及基础研究有奖征文活动通知

病毒性肝炎、药物性肝炎、脂肪肝等肝脏疾病严重威胁人们的身体健康,已成为当前重大公共卫生问题。消除传染性肝炎、防治肝损伤以及治疗肝病的合理用药,已经成为肝病防治领域的共同心声和行动。当飞利肝宁胶囊是由“肝炎草”当药与保肝药水飞蓟精炼组方而成的抗炎保肝中成药,具有保护肝细胞膜及线粒体,减轻肝细胞变性、坏死及炎症性反应,减轻肝脏脂质沉积,改善胰岛素抵抗及抗脂质过氧化作用。为了更好地探索当飞利肝宁胶囊抗炎保肝作用机理及对各类肝损伤患者的有效影响,完善肝病防治方案,中华中医药学会内科肝病专业委员会、中医杂志社、《中国脂肪肝防治与康复网》将联合开展“开启新视野,成就肝健康”当飞利肝宁胶囊临床应用及基础研究有奖征文活动。具体要求如下。

一、征文内容: 1. 当飞利肝宁胶囊在抗炎保肝方面的临床应用、基础研究的论著、荟萃分析、合理用药方案研究等; 2. 当药的药学研究、生物学研究、文献研究及基础理论研究等。二、论文要求: 1. 文章力求立意新颖、设计严格、数据完整,具有新颖性和指导性; 2. 内容具有严谨性和科学性,论点鲜明、论证充分、逻辑严谨,结果真实可靠; 3. 文章应符合学术期刊论文发表的要求,要求未公开发表及未在全国性会议上交流。三、投稿方式: 请将文章以 word 格式发至征文专用邮箱: jtcmen@163.com。四、征文截止日期: 2015 年 3 月 31 日。五、评选规则: 所有论文由中华中医药学会内科肝病专业委员会和中医杂志社邀请相关专家组成评选委员会进行评选,结果将公布在《中医杂志》、《中西医结合肝病杂志》、《胃肠病学和肝病学杂志》及《中国脂肪肝防治与康复网》。六、奖项设置: 特等奖 1 名,支持科研基金 20000 元; 一等奖 3 名,支持科研基金 10000 元; 二等奖 8 名,支持科研基金 8000 元; 三等奖 15 名,支持科研基金 5000 元; 纪念奖若干,支持科研基金 1000 元。特等奖论文将推荐在 SCI 期刊发表,一至三等奖符合发表要求论文将推荐发表在国内专业期刊上,优秀科研成果将邀请参加全国性学术大会报告及交流。