

鞘内注射 Quinpirole 对骨癌痛大鼠镇痛及脊髓小胶质细胞活化的影响*

100075 北京 北京市东城区第一人民医院麻醉科

孟根其其格, 张春玉¹, 罗建军, 张毅^{2,3}

【摘要】 目的 探讨鞘内注射 Quinpirole(QNP)对骨癌痛大鼠镇痛及脊髓小胶质细胞活化的影响。方法 选取健康成年雄性 SD 大鼠 60 只通过胫骨骨髓腔内注射 Walker256 乳腺癌细胞液制备骨癌痛模型。将骨癌痛大鼠随机分为高剂量 10 μ g/kg QNP(QNP-H)、低剂量 5 μ g/kg QNP(QNP-L)及生理盐水(NS)3 组,每组 20 只;QNP 采用每日鞘内注射方式,注射体积为 10 μ l。选取 20 只同周龄大鼠作对照(C),NS 组和 C 组仅给予等体积生理盐水。分别于治疗前、治疗 1、3、5、7d 后对各组进行行为学检测,分析以上观察时间点大鼠的机械缩足阈值(MWT)和缩足热潜伏期(WTL);采用免疫组化法检测脊髓离子钙接头蛋白分子-1(Iba-1)染色以及特异表达补体 C3 受体(OX-42)和大麻素受体 2(CB2)的荧光积分光密度(IOD);酶联免疫吸附法检测脊髓肿瘤坏死因子(TNF)- α 和白介素(IL)-1 β 水平;Western blotting 检测脊髓 Toll 样受体-4(TLR-4)及受体-2(TLR-2)蛋白表达水平。结果 与 C 组相比,其余 3 组各观察时间点的 MWT、WTL 降低;Iba-1 染色程度、OX-42 和 CB2 的 IOD、脊髓 TNF- α 和 IL-1 β 水平、TLR-4 和 TLR-2 水平均升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。在骨癌痛大鼠模型中,QNP-H 组、QNP-L 组在上述指标与 NS 组的差异均有统计学意义($P < 0.05$);且 QNP-H 组均优于 QNP-L 组($P < 0.05$)。结论 鞘内注射 QNP 对骨癌痛大鼠有较好的镇痛作用,同时可降低脊髓小胶质细胞活化及炎症反应。

【关键词】 Quinpirole; 癌痛; 镇痛; 脊髓小胶质细胞活化

中图分类号:R73-36 文献标识码:A 文章编号:1009-0460(2014)10-0871-05

Analgesia effects of quinpirole via intrathecal injection and its influence on spinal microglia activation in rats with bone cancer pain

MENGGEN Qiqige, ZHANG Chunyu, LUO Jianjun, ZHANG Yi. Department of Anesthesiology, First People's Hospital of Beijing Dongcheng District, Beijing 100075, China

Corresponding author: ZHANG Yi, E-mail: xjzhang1108@126.com

【Abstract】 Objective To explore the analgesia effects of quinpirole (QNP) via intrathecal injection and its influence on spinal microglia activation in rats with bone cancer pain. **Methods** Sixty adult male SD rats were used to establish bone cancer pain model by intra-tibia inoculation of Walker256 mammary gland carcinoma cells. The rats with bone cancer pain were randomly divided into 3 groups: high-dose QNP (QNP-H) group, low-dose QNP (QNP-L) group and normal saline (NS) group, with 20 rats in each group. QNP-H group and QNP-L group received intrathecal injection of 10 μ l QNP at the dose of 10 and 5 μ g/kg, respectively. Another 20 male SD rats were chosen as control (C) group and received the same volume of saline as NS group. Pain behaviors were assessed before treatment and 1, 3, 5 and 7d during treatment to analyze the paw mechanical withdrawal threshold (MWT) and paw withdrawal thermal latency (WTL). The immunohistochemistry was employed to evaluate the spinal microglia number ionized calcium binding adaptor molecule 1 and activation by the integral optical density (IOD) of C3 complement receptor (OX-42) and cannabinoid receptor 2 (CB2). The spinal levels of TNF- α and IL-1 β were measured by enzyme linked immunosorbent assay. Moreover, the protein levels of spinal Toll like receptor-4 (TLR-4) and its receptor-2 (TLR-2) were detected by Western blotting. **Results** Compared with C group, there were lower MWT and WTL, but higher spinal microglia number, IOD of OX-42 and CB2, TNF- α , IL-1 β , TLR-2 and TLR-4 in

* 基金项目:卫生部科技医药卫生研究发展中心资助项目(W2012ZT65)

1 102300 北京京煤集团总医院麻醉科

2 830000 新疆医科大学附属中医医院麻醉科

3 通讯作者,E-mail:xjzhang1108@126.com

NS, QNP-L and QNP-H groups with significant difference ($P < 0.05$). Intrathecal injection of QNP improved the above abnormalities of rats with bone cancer pain compared with NS group ($P < 0.05$). The effect of QNP-H group was stronger than that of QNP-L group ($P < 0.05$). **Conclusion** Intrathecal injection of QNP exhibits a good analgesic effect on bone cancer pain and inhibits spinal microglia activation and inflammatory reaction.

【Key Words】 Quinpirole; Cancer pain; Analgesia; Spinal microglia activation

骨是恶性肿瘤最常见的转移部位之一,转移性骨肿瘤患者常存在中重度骨癌痛,严重影响生活质量。肿瘤骨转移性疼痛多由乳腺癌、前列腺癌及肺癌转移引起。原发性骨肉瘤等也易诱发骨癌痛,严重干扰了患者的日常生活,并导致体能状态下降及焦虑或抑郁发生^[1]。因此,对癌痛的治疗及产生机制的研究越来越重要。研究发现脊髓中的多巴胺能神经元在疼痛传递中起了重要作用,且脊髓多巴胺能通路可调控痛觉^[2]。多巴胺 D_2 受体 (D_2 -type receptors, D_2R) 参与了多巴胺能药物在脊髓水平对疼痛的缓解作用,因此采用 D_2R 激动剂可起到较好的镇痛效果^[3]。小胶质细胞是痛觉信号触发胶质细胞活化的启动环节,可对中枢神经系统内的微小变化做出迅速反应,而其活化不仅参与了外伤、缺血及感染等疾病,还参与了慢性病理性疼痛^[4]。Quinpirole (QNP) 是一种 D_2R 激动剂,同时研究发现其对神经病理性疼痛有较好的镇痛效果^[5]。本研究采用鞘内置管方式给予骨癌痛大鼠 QNP 处理,分析其对骨癌痛的镇痛效果及脊髓小胶质细胞活化的影响,现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 试剂与主要仪器 Walker256 乳腺癌细胞购自上海生物医学工程研究院;QNP 购自美国 Tocris Cookson 公司, Triton X-100、Tris-HCl 购自美国 Sigma 公司;二喹啉甲酸 (BCA) 蛋白分析试剂盒购自碧云天生物科技公司;血浆肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和白介素-1 β (IL-1 β) 检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所;兔抗离子钙接头蛋白分子-1 (Iba-1) 抗体、羊抗大麻素受体 2 (CB2) 抗体购自美国 Abcam 公司,羊抗特异表达补体 C3 受体 (OX-42)、兔抗 Toll 样受体-4 (TLR-4) 及受体-2 (TLR-2) 抗体均购自美国 Santa Cruz 公司;绿色标记的二抗购自美国 Jackson 公司,红色标记的二抗购自上海亨代劳生物有限公司。仪器: Multiskan Mk3 酶标仪购自美国 Thermo 公司;5417R 小型台式冷冻离心机、移液枪均购自德国 Eppendorf 公司;Mini Protean 3 Cell 小

型垂直电泳槽购自美国 Bio-Rad 公司;全自动热辐射刺激仪购自中国科学院生物医学工程研究所。

1.2 动物与分组 选取健康成年雄性 SD 大鼠 60 只,体质量为 200~250g。采用胫骨骨髓腔内注射 Walker256 乳腺癌细胞液制备大鼠骨癌痛模型。将骨癌痛大鼠随机分为 3 组:高剂量 QNP (QNP-H) 组、低剂量 QNP (QNP-L) 组及生理盐水 (NS) 组,每组 20 只。QNP-H 与 QNP-L 组分别于模型制备 10 天后每日鞘内注射 10 μ g/kg 或 5 μ g/kg QNP (注射体积均为 10 μ l),连续注射 7 天。同时选取 20 只同周龄大鼠作为对照 (C),NS 组和 C 组仅给予等体积生理盐水鞘内注射。

1.3 骨癌痛模型制备及鞘内置管 根据文献[6]制备骨癌痛模型:腹腔注射戊巴比妥钠麻醉后 (40mg/kg),取仰卧位,对左侧后肢进行消毒和备皮,暴露胫骨后于胫骨结节下外 0.5~1cm 的胫骨平台位置,采用注射器针头打孔,采用 10 μ l 微量注射器向骨髓腔注射 Walker256 乳腺癌细胞液,注射完成后用骨蜡封住针孔并缝合。于骨癌痛模型制备 5 天后采用 Sluka 等^[7]的方法进行鞘内置管:切开枕部皮肤后,采用 22G 无菌注射器枕头刺破寰枕膜,待脑脊液流出后置入 PE-10 导管,将导管固定好后缝合皮肤。4 组大鼠术后 3d 均给予青霉素 20 万 U/d 肌肉注射预防感染。

1.4 行为学评价 分别于治疗前、治疗 1、3、5、7d 对各组进行行为学检测,分析以上观察时间点大鼠的机械缩足阈值 (MWT) 和缩足热潜伏期 (WTL) 来评价疼痛情况。采用不同折力的 Von Frey 纤维刺激足底中部,每次刺激持续 6~8s,间隔 1min,出现快速缩足或舔足即为阳性反应,每次重复 5 次,出现 3 次以上阳性反应的最小刺激力度计为 MWT。采用全自动热辐射刺激仪照射足底,每次照射不超过 25s,每次重复 3 次,间隔 5min,3 次出现抬腿反应的平均时间值计为 WTL。MWT 和 WTL 的数值越小,即痛觉越敏感。

1.5 免疫组化染色 根据脊髓小胶质细胞特异性标记物 Iba-1 的染色情况来评价其数量,采用 CB2 及 OX-42 的荧光积分光密度 (IOD) 值来评价其活化

情况。鞘内注射 7d 后将大鼠过量麻醉致死,取 L₄₋₆ 脊髓段,经 4% 多聚甲醛固定、蔗糖脱水后,制备冠状冰冻切片(厚度为 20 μ m),每 5 张片子保留 1 张,每个样本取 5 张用于免疫组化染色,将切片经 H₂O₂ 室温孵育及山羊血清封闭后,依次滴加 Iba-1、CB2 及 OX-42 的一抗(除 Iba-1 为 1:100 外,其余均为 1:50),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜后,滴加相应二抗,除 Iba-1 采用 DAB 显色外,CB2 及 OX-42 均直接置于荧光显微镜下观察。每张切片随机选取 5 个高倍视野(HPF),采用 Image Pro Plus 6.0 图像分析软件计数小胶质细胞并测定 IOD 值。

1.6 酶联免疫吸附法 大鼠麻醉处死后,迅速取出新鲜脊髓标本,采用裂解液冰上充分裂解,4 $^{\circ}$ C 下以 5000r/min 离心 5min,保留上清,采用酶联免疫吸附法检测各组脊髓提取液中 TNF- α 、IL-1 β 的水平,以上均严格遵照试剂盒说明书操作。

1.7 Western blotting 采用 BCA 法检测 1.6 中脊髓提取液中的蛋白浓度,取等量蛋白,与上样缓冲液混匀后煮沸,每孔加入混合液后行常规 10% SDS-PAGE 凝胶电泳,采用半干转法将电泳条带转移至 NC 膜,脱脂奶粉封闭后,根据膜面积加入 TLR-2(1:

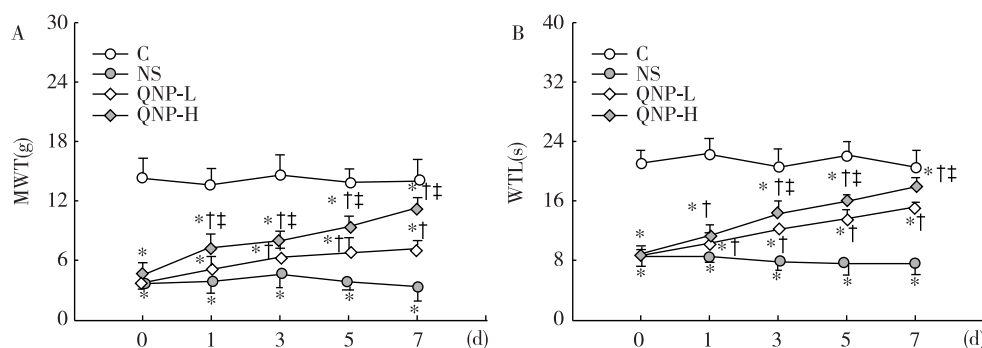
200)、TLR-4(1:100)一抗,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,次日加入二抗(1:5000)室温孵育 1h,选择 GAPDH 为内参(1:3000),ECL 化学发光法显影,采用 Image Pro Plus 6.0 软件分析各条带光密度,结果表示为目的条带与内参的光密度比值。

1.8 统计学分析 采用 SPSS 16.0 版软件处理数据。数据均以均数 \pm 标准差表示,两两比较采用 *t* 检验,多组比较采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 MWT 与 C 组比较,NS 组、QNP-H 组和 QNP-L 组各观察时间点的 MWT 均较低($P < 0.05$);QNP-L 组治疗 3~7d 及 QNP-H 组治疗 1~7d 的 MWT 均高于 NS 组($P < 0.05$),且 QNP-H 组治疗 1~7d MWT 均高于 QNP-L 组($P < 0.05$)。见图 1A。

2.2 WTL 与 C 组比较,NS 组、QNP-H 组和 QNP-L 组各观察时间点的 WTL 均较低($P < 0.05$);QNP-H 组和 QNP-L 组治疗 1~7d 的 WTL 均高于 NS 组($P < 0.05$),且 QNP-H 组治疗 3~7d 的 WTL 均高于 QNP-L 组($P < 0.05$)。见图 1B。



A: MWT; B: WTL; 与 C 组比较, * $P < 0.05$; 与 NS 组比较, † $P < 0.05$; 与 QNP-L 组比较, ‡ $P < 0.05$; § $P < 0.05$

图 1 各组不同观察时间点的 MWT 和 WTL 情况

2.3 脊髓小胶质细胞活化情况 与 C 组比较,NS 组治疗 7d 后的小胶质细胞数量及 OX-42、CB2 的 IOD 水平均升高($P < 0.05$);QNP-H 组及 QNP-L 组治疗后的上述指标均低于 NS 组,但与 C 组的差异仍有统计学意义($P < 0.05$);QNP-H 组的各指标均优于 QNP-L 组($P < 0.05$)。见表 1、图 2~图 4。

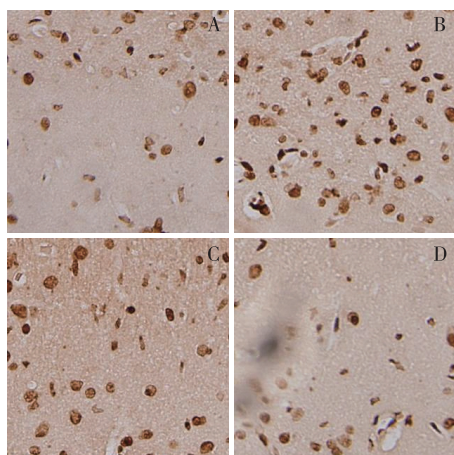
2.4 脊髓细胞炎症因子水平 与 C 组比较,NS 组治疗 7d 后的脊髓 TNF- α 和 IL-1 β 水平均升高($P < 0.05$);QNP-H 组及 QNP-L 组治疗后上述指标均低于 NS 组,但与 C 组的差异仍有统计学意义($P <$

0.05);QNP-H 组的上述指标均低于 QNP-L 组($P < 0.05$)。见表 2。

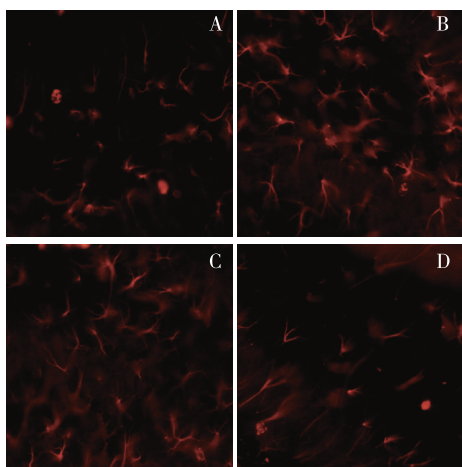
表 1 脊髓小胶质细胞数量及其活化情况($\bar{x} \pm s$)

组别	小胶质细胞数量(个/HPF)	IOD	
		OX-42	CB2
C 组	19.23 \pm 2.47	246.7 \pm 21.5	332.5 \pm 17.3
NS 组	35.60 \pm 4.65*	712.3 \pm 49.2*	847.1 \pm 52.4*
QNP-L 组	28.65 \pm 1.92*†	590.9 \pm 33.6*†	772.8 \pm 41.7*†
QNP-H 组	23.41 \pm 2.12*†‡	337.2 \pm 22.4*†‡	564.9 \pm 28.6*†‡

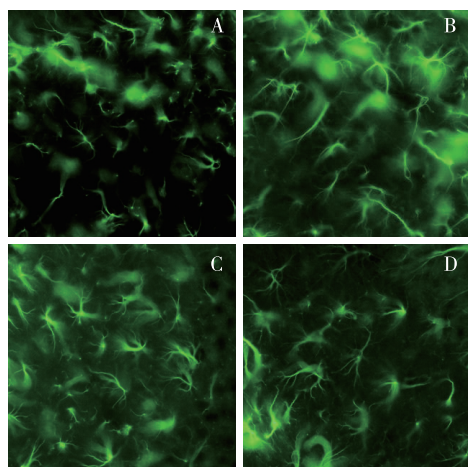
注:与 C 组比较, * $P < 0.05$; 与 NS 组比较, † $P < 0.05$; 与 QNP-L 组比较, ‡ $P < 0.05$



A: C 组; B: NS 组; C: QNP-L 组; D: QNP-H 组
图 2 治疗 7d 后脊髓的 Iba-1 染色 (SP ×400)



A: C 组; B: NS 组; C: QNP-L 组; D: QNP-H 组
图 3 治疗 7d 后脊髓的 CB2 染色情况 (荧光显微镜 ×400)



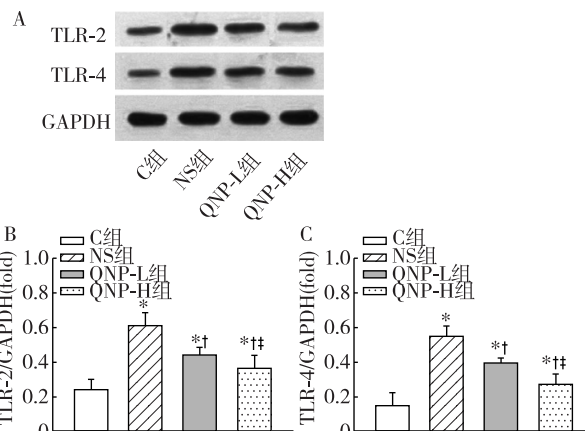
A: C 组; B: NS 组; C: QNP-L 组; D: QNP-H 组
图 4 治疗 7d 后脊髓的 OX-42 染色情况 (荧光显微镜 ×400)

表 2 脊髓细胞炎症因子水平 (pg/mg, $\bar{x} \pm s$)

组别	TNF- α	IL-1 β
C 组	33.28 \pm 5.72	52.72 \pm 21.50
NS 组	124.61 \pm 13.85*	224.39 \pm 49.26*
QNP-L 组	98.33 \pm 10.94* [†]	165.41 \pm 33.74* [†]
QNP-H 组	56.07 \pm 6.19* ^{†‡}	94.26 \pm 26.45* ^{†‡}

注:与 C 组比较, * $P < 0.05$; 与 NS 组比较, [†] $P < 0.05$; 与 QNP-L 组比较, [‡] $P < 0.05$

2.5 脊髓 TLR-4 及 TLR-2 蛋白水平 与 C 组比较, NS 组治疗 7d 后的脊髓 TLR-2 和 TLR-4 蛋白水平均升高 ($P < 0.05$); QNP-H 组及 QNP-L 组治疗后的 TLR-2、TLR-4 蛋白水平均低于 NS 组, 但与 C 组的差异仍有统计学意义 ($P < 0.05$); QNP-H 组的 TLR-2、TLR-4 蛋白水平均低于 QNP-L 组 ($P < 0.05$)。见图 5。



A: Western blotting 检测; B: TLR-2 蛋白表达; C: TLR-4 蛋白表达; 与 C 组比较, * $P < 0.05$; 与 NS 组比较, [†] $P < 0.05$; 与 QNP-L 组比较, [‡] $P < 0.05$

图 5 脊髓 TLR-2 和 TLR-4 蛋白表达水平

3 讨论

本研究选取目前公认的研究骨癌痛的动物模型, 采用于大鼠胫骨上段骨髓腔内注射 Walker 256 乳腺癌细胞制备。该模型在接种乳腺癌细胞后会出现骨皮质和骨小梁损伤, 而接种 12d 后骨髓腔内会发现大量肿瘤细胞浸润^[8]。本研究结合文献报道, 于接种 10d 后给予鞘内注射 QNP。同时, 本研究设两个剂量, 观察鞘内注射 QNP 对骨癌痛大鼠痛觉和脊髓小胶质细胞活化的影响。

目前, 疼痛研究热点已从神经元细胞转移至神经胶质细胞, 且多项研究证实神经胶质细胞在痛觉

产生中发挥了重要的作用^[9]。小胶质细胞占神经胶质细胞的 5%~10%，正常情况下，小胶质细胞处于静息状态，但外界伤害性刺激可导致该细胞的激活^[10]。本研究发现，骨癌痛模型建立后，大鼠痛觉阈值降低，骨癌痛症状显著，主要表现为 NS 组的 MWT 和 WTL 水平降低，与之相比，鞘内注射 QNP 可相对升高 MWT 和 WTL 水平，提示鞘内注射 QNP 可缓解骨癌痛模型大鼠的疼痛，具有一定镇痛效果，其机制考虑与 D₂R 参与了脊髓多巴胺能通路对痛觉的调控作用有关，而 QNP 为一种 D₂R 激动剂，故通过鞘内注射 QNP 对癌痛大鼠的疼痛起到了较好的镇痛效果。

小胶质细胞由脊髓单核细胞分化而来，是神经系统的巨噬细胞，在疼痛早期即被激活^[10]。其中 Iba-1 是单核细胞系细胞的表面标志物，是鉴定小胶质细胞数目的常用指标^[11]，而当小胶质细胞激活时，其主要表面抗原物质 OX-42 和 CB2 会大量表达^[12-13]，因此，本研究采用免疫组化法检测小胶质细胞中 Iba-1 的表达情况来评价该细胞数量，同时采用荧光免疫组化法检测 OX-42 和 CB2 表达来评价小胶质细胞的激活情况。正常大鼠在未受到疼痛刺激时小胶质细胞一般处于静息状态，而骨癌痛大鼠模型建立后可见脊髓小胶质细胞处于活化状态，表现为 NS 组中 Iba-1 阳性细胞数升高以及 OX-42 和 CB2 的 IOD 水平增强，这些变化主要与癌细胞浸润引起的疼痛有关^[14]。鞘内注射 QNP 可以降低以上指标的数值，提示鞘内注射 QNP 可抑制小胶质细胞活化，也是其达到发挥镇痛效果的主要原因。

当脊髓小胶质细胞激活时，常导致炎症因子释放增多，故本研究检测处理后各组脊髓的常见炎症因子 TNF- α 和 IL-1 β 水平的变化。当骨癌痛大鼠模型建立后，小胶质细胞激活，同时促炎症因子表达升高；通过鞘内注射 QNP，可以有效缓解脊髓的炎症反应，出现脊髓中 TNF- α 、IL-1 β 水平下降。同时，TLR-2 和 TLR-4 在炎症反应发生中也起到重要的作用^[15]。本研究通过 Western blotting 检测脊髓中 TLR-2 和 TLR-4 蛋白，发现两者表达水平均降低，与 QNP 改善痛觉过敏有关，提示 QNP 除镇痛外还有抗炎效果。

综上所述，鞘内注射 QNP 对骨癌痛大鼠有较好的镇痛作用，且高剂量的效果较优，同时可降低脊髓小胶质细胞活化及炎症反应。

参考文献

- [1] Cheng M, Liu L, Yang HS, et al. Circulating tumor cells are associated with bone metastasis of lung cancer [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15(15):6369-6374.
- [2] Taniguchi W, Nakatsuka T, Miyazaki N, et al. In vivo patch-clamp analysis of dopaminergic antinociceptive actions on substantia gelatinosa neurons in the spinal cord [J]. *Pain*, 2011, 152(1):95-105.
- [3] Lapirot O, Melin C, Modolo A, et al. Tonic and phasic descending dopaminergic controls of nociceptive transmission in the medullary dorsal horn [J]. *Pain*, 2011, 152(8):1821-1831.
- [4] 应彦璐, 许学兵, 余守章, 等. 背根神经节小胶质细胞活化在大鼠术后持续性痛形成中的作用 [J]. *中华麻醉学杂志*, 2013, 33(2):156-158.
- [5] Cobacho N, de la Calle JL, Paño CL. Dopaminergic modulation of neuropathic pain: Analgesia in rats by D₂-type receptor agonist [J]. *Brain Res Bull*, 2014, 106: 62-71.
- [6] 李晓青, 孙玉明, 黄章翔, 等. Walker 256 乳腺癌细胞构建大鼠胫骨骨癌痛模型 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2008, 15(1): 41-45.
- [7] Sluka KA, Audette KM. Activation of protein kinase C in the spinal cord produces mechanical hyperalgesia by activating glutamate receptors, but does not mediate chronic muscle-induced hyperalgesia [J]. *Mol Pain*, 2006, 2:13.
- [8] 陈勇, 杜晓红, 应俊, 等. 鞘内注射 Staurosporine 对骨癌痛大鼠脊髓小胶质细胞活化的影响 [J]. *临床麻醉学杂志*, 2013, 29(12):1214-1217.
- [9] Zhuo M, Wu G, Wu LJ. Neuronal and microglial mechanisms of neuropathic pain [J]. *Mol Brain*, 2011, 4:31.
- [10] Vallejo R, Tilley DM, Vogel L, et al. The role of glia and the immune system in the development and maintenance of neuropathic pain [J]. *Pain Pract*, 2010, 10(3):167-184.
- [11] Kohno H, Maeda T, Perusek L, et al. CCL3 production by microglial cells modulates disease severity in murine models of retinal degeneration [J]. *J Immunol*, 2014, 192(8): 3816-3827.
- [12] 申文, 陈晏, 徐幼苗, 等. 大麻素受体 2 在胫骨癌痛大鼠脊髓背角细胞中的表达 [J]. *现代肿瘤医学*, 2011, 19(11): 2147-2149.
- [13] Jun IG, Kim SH, Yoon YI, et al. Intrathecal lamotrigine attenuates antinociceptive morphine tolerance and suppresses spinal glial cell activation in morphine-tolerant rats [J]. *J Korean Med Sci*, 2013, 28(2):300-307.
- [14] 汪洋, 王家林. 趋化因子配体及其抗体对骨癌痛患者脊髓胶质细胞活化的影响及与骨癌痛的相关性 [J]. *中国老年学杂志*, 2013, 33(2):421-422.
- [15] 方静, 杜丽, 付辉, 等. 炎症反应中的 microRNAs 及其在 TLR 信号通路中的调控作用 [J]. *第二军医大学学报*, 2013, 34(7):782-786.

收稿日期:2014-07-05; 修回日期:2014-08-26