

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.03.008

网络首发 http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.r.20190114.1043.012.html(2019-01-14)

## 基于降低 TLR9 表达的电针联合疼痛贴对骨癌痛大鼠的镇痛作用研究

覃双来<sup>1</sup>,吴永贵<sup>2</sup>,关江锋<sup>1</sup>,张秋<sup>3△</sup>

(1.湖北省武汉市第一医院肿瘤科 430022;2.湖北中医药大学中医临床学院,武汉 430065;

3.湖北省武汉市第一医院耳鼻咽喉科 430022)

**[摘要]** **目的** 研究电针联合疼痛贴对骨癌痛大鼠的镇痛作用及对脊髓 Toll 样受体 9(TLR9)表达的影响。**方法** 选用雄性 SPF 级 SD 大鼠 84 只,建立大鼠胫骨癌痛模型。将大鼠分为 7 组,每组 12 只:模型组、针刺安慰组、胶布安慰组、联合安慰组、电针组、疼痛贴组、联合组。另有空白组大鼠 12 只。造模成功后给予对应干预 12 d,进行自发性疼痛评分测定、热痛觉过敏测定、机械性痛觉超敏测定。处死动物,留取腰椎膨大部位冻存,PCR 和 Western blot 检测 TLR9 的表达。**结果** 空白组的自发性疼痛评分结果低于模型组、缩爪潜伏期(PWL)时间、机械性痛阈值高于模型组( $P < 0.01$ )。疼痛贴组、联合组的自发性疼痛评分结果低于模型组、PWL 时间高于模型组( $P < 0.05$ )。电针组、疼痛贴组、联合组的机械性痛阈值高于模型组( $P < 0.01$ )。模型组大鼠脊髓内的 TLR9 mRNA 与蛋白水平明显升高,电针组、疼痛贴组、联合组的 TLR9 mRNA 与蛋白表达水平较模型组均明显下降( $P < 0.01$ )。**结论** 疼痛贴联合电针治疗具有缓解骨癌痛大鼠疼痛的作用,其机制与降低 TLR9 表达有关。

**[关键词]** 骨癌痛;胫骨癌痛模型;电针;疼痛贴;Toll 样受体 9

**[中图分类号]** R73-35+4

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-8348(2019)03-0390-04

### Study on analgesic effect of electroacupuncture combined with Pain Sticker on rats with bone cancer pain based on reduction of TLR9 expression

QIN Shuanglai<sup>1</sup>, WU Yonggui<sup>2</sup>, GUAN Jiangfeng<sup>1</sup>, ZHANG Qiu<sup>3△</sup>

(1. Department of Oncology, Wuhan NO. 1 Hospital, Wuhan, Hubei 430022, China; 2. Clinical College of Traditional Chinese Medicine, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan, Hubei 430065, China;

3. Department of Otolaryngology, Wuhan NO. 1 Hospital, Wuhan, Hubei 430022, China)

**[Abstract]** **Objective** To observe the analgesic effect of electroacupuncture combined with Pain Sticker on the rats with bone cancer pain and its influence on the expression of spinal cord Toll-like receptor 9 (TLR9). **Methods** Eighty-four male SPF SD rats were used to establish the rat tibial cancer pain model. These rats were divided into 7 groups, 12 in each group: the model group, acupuncture placebo group, adhesive tape placebo group, combined placebo group, electroacupuncture group, Pain Sticker group and combined group. Other 12 rats served as the blank control. After successfully constructing the model, the corresponding intervention was given for 12 d. The spontaneous pain score, thermal hyperalgesia and mechanical pain hypersensitivity were measured. The animals were sacrificed and the bulge parts of the lumbar vertebra were cryopreserved; the expression of TLR9 was detected by PCR and western blot. **Results** The spontaneous pain score in the blank group was lower than that in the model group, the paw withdrawal latency (PWL) time and mechanical pain threshold value were higher than those in the model group ( $P < 0.01$ ). The spontaneous pain score in the Pain Sticker group and combined group was lower than that in the model group, while their PWL time was higher than that in the model group ( $P < 0.05$ ). The mechanical pain threshold value in the electroacupuncture group, Pain Sticker group and combined group was higher than that in the model group ( $P < 0.01$ ). The levels of TLR9 mRNA and protein in rat spinal cord of the model group increased significantly, while which in the electroacupuncture group, Pain Sticker group and combined group was decreased significantly compared with the model group ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** Electroacupuncture combined with Pain Sticker has the effect for relieving pain in the rats with bone cancer pain, and its mechanism is related to the decrease in expression of TLR9.

**[Key words]** bone cancer pain; tibial cancer pain model; electroacupuncture; Pain Sticker; Toll-like receptor 9

据 WHO 统计,约 70% 的肿瘤患者有难以缓解的癌痛<sup>[1-2]</sup>。癌症骨转移是癌性疼痛的主要原因之一,严重影响患者的生存质量<sup>[3]</sup>。目前,控制骨癌痛以“三阶梯疗法”为主,但长期使用镇痛药存在毒副作用大、成瘾依赖性强、免疫功能抑制、个体差异明显等弊端<sup>[4-5]</sup>。研究癌痛的致病机制,寻找控制癌痛有效可行的方法是当前肿瘤姑息治疗领域的热点之一。Toll 样受体家族的 Toll 样受体 9 (TLR9) 是巨噬细胞识别 CpG DNA 的模式识别受体,它可通过激活单核/吞噬细胞系统信号转导,活化多种前炎症细胞因子,引起急性炎症反应。炎症在疼痛中发挥重要作用,TLR9 在中枢神经系统内广泛存在,能调节下游炎症细胞因子,从而在痛觉敏化的过程中发挥作用。本研究建立了大鼠胫骨癌痛模型,观察模型癌痛动物用电针联合疼痛贴治疗后的镇痛效果及大鼠脊髓 TLR9 的变化情况,现将研究结果报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物** 选择雄性 SPF 级 SD 大鼠(体重 200~250 g)及幼鼠(60~80 g),动物及饲料均购于湖北省实验动物研究中心[许可证号 SCXK(鄂)2015-0018],于湖北中医药大学中医药实验中心饲养[许可证号 SYXK(鄂)2012-0067]。室温 18~20 ℃,相对湿度 50%~60%,12 h 昼夜循环灯照,动物自由进食、饮水,适应性饲养 3 d 后进行造模。所有实验动物的处置均符合科技部 2006 年颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》的规定。

**1.1.2 试剂与器材** 甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体、TLR9 抗体购自美国 Santa Cruz 公司;逆转录试剂盒、二喹啉甲酸法(BCA)试剂盒、辣根过氧化物酶(HRP)二抗、聚偏二氟乙烯(PVDF)膜、甲醇、电化学发光(ECL)液购自武汉谷歌生物公司;辐射热测痛仪购自上海软隆科技公司;平衡式测痛仪购自天津中国医学科学院生物医学工程研究所;韩氏穴位神经刺激仪购自中国 HANS 公司;电泳仪、CFX96 Touch™ 荧光定量 PCR 检测系统、多色荧光凝胶成像系统购自美国 Bio-Rad 公司。疼痛贴由川乌、草乌、延胡索、马钱子、徐长卿、乳香、没药、土鳖虫、蟾酥、冰片及薄荷脑等中药材碾粉,按照一定的比例混合基质后制成药膏,由武汉市第一医院制剂中心提供。

### 1.2 方法

**1.2.1 模型的建立及分组** Walker-256 乳腺癌细胞购自武汉大学生物中心,注射至 60~80 g 幼鼠腹腔( $4 \times 10^7$ /mL),接种 7 d 后收集癌性腹水,离心 3 min (1 300 r/min),沉淀后,用 10 mL 磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤,再次离心沉淀,然后以 PBS 重悬计数,调整至适当浓度( $4 \times 10^6$ /mL),置于冰盒内备用。对大

鼠进行适应性刺激,筛选出连续 3 d 的机械缩足阈值(MWT)  $\geq 26$  g 的大鼠,参照 MEDHURST 的方法建立胫骨癌痛模型<sup>[6-7]</sup>。腹腔注射 10% 水合氯酸(4 mL/kg 体质量)麻醉大鼠,用 7 号针头在膝关节髌韧带内侧缘沿胫骨纵轴往胫骨远端钻孔,深约 1 cm。然后换用微量进样器往胫骨骨髓腔内注入 4  $\mu$ L 肿瘤细胞,最后推入 2  $\mu$ L 凝胶海绵溶液封口。另有大鼠 12 只,注射等量 PBS 后推入 2  $\mu$ L 凝胶海绵溶液封口,作为空白组。所有注射后均留针 1 min,防止注射物渗出。术后 9~13 d MWT 持续小于或等于 8 g 的大鼠视为造模成功,成模率约为 50%。将造模成功的大鼠 84 只分为 7 组:模型组、针刺安慰组、胶布安慰组、联合安慰组、电针组、疼痛贴组、联合组,各组分笼饲养,做进一步实验。

**1.2.2 干预方法** 空白组与模型组正常饲养,无特殊干预。针刺安慰组:取大鼠双侧“足三里”(ST36)与“昆仑”(BL60)穴位,用 0.25 mm  $\times$  13.00 mm 针灸针直刺约 4.00 mm,仅刺入皮下,不予通电,每次 30 min。胶布安慰组:干预前 24 h 将大鼠背部对称两侧用脱毛剂脱毛,脱毛面积每侧为 4 cm  $\times$  2 cm,在脱毛处皮肤上贴敷医用胶布。联合安慰组:针灸针刺入大鼠穴位后,不予通电,并贴敷医用胶布。电针组:在针刺安慰组基础上连接电针,通过韩氏穴位神经刺激仪给予“疏密波”,频率为 2 Hz/100 Hz,刺激强度为 0.5~1.5 mA,每 10 分钟递增 0.5 mA,以引起大鼠后肢肌肉轻微抖动而不嘶叫为宜,每次 30 min。疼痛贴组:在大鼠背部对称两侧脱毛处皮肤上贴敷疼痛贴,6 h 后去除药物。联合组:电针治疗并贴敷疼痛贴。各组自造模成功后第 3 天起,每天干预 1 次,连续 12 d,在干预完成后 30 min 内,完成指标测定。

**1.2.3 取材方法** 完成相关测定后处死大鼠,取出脊髓腰膨大节段,液氮冻存 1 周后转入 -80 ℃ 冰箱冻存。

**1.2.4 自发性疼痛评分** 将大鼠置于 1.20 m  $\times$  1.20 m  $\times$  0.45 m 的格子内,以 0~3 级评分评价大鼠自由活动后肢的使用程度。0 分为正常行走;1 分为后肢跛行,但不是很明显,使用正常;2 分为介于 1 分和 3 分之间;3 分为后肢行走时不着地。

**1.2.5 热痛觉过敏测定** 安静环境中,室温(19  $\pm$  1)  $^{\circ}$ 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 20 min 待大鼠安静后,将强光束照射至大鼠脚掌中心皮肤,引起大鼠缩爪反应的时间为大鼠缩爪潜伏期(PWL),测 5 次,取后 3 次算平均值,两次间隔 5 min。为防止大鼠热辐射烫伤,将 PWL 的上限值(cut-off time)定为 20 s。

**1.2.6 机械性痛觉超敏测定** 安静环境中,室温(19  $\pm$  1)  $^{\circ}$ C,适应 20 min 后,根据 Dixon 的 up-and-

down 法,使用 von Frey 细丝刺激大鼠脚掌中部皮肤,观察大鼠缩足反应。每根细丝每次刺激时间不超过 2 s,上次刺激结束 5 min 后再进行下一次刺激,计算出 50% von Frey 反应阈值作为机械性痛阈值。

**1.2.7 RT-PCR 检测各组 TLR9 表达** 取  $-80^{\circ}\text{C}$  冻存的各处理组标本,Trizol 试剂法提取各组织标本中总 RNA,逆转录为 cDNA,利用特异性引物合成相应 PCR 产物后,参照试剂盒说明书操作。大鼠特异性引物由武汉谷歌生物科技公司合成,其序列及产物大小见表 1。以 GAPDH 基因作为内参,将标本的待测指标和内参进行标准化。相对定量数据处理使用  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  法,即改变的倍数为  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ ,其中,  $\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}(\text{模型组}) - \Delta\text{Ct}(\text{空白组})$ ,  $\Delta\text{Ct} = (\text{Ct}_{\text{样本}} - \text{Ct}_{\text{GAPDH}})$ 。

表 1 引物序列及产物大小

基因	引物序列(5'-3')	产物大小(bp)
TLR9	上游 TGTGCTTTACTGCAGCATCTC	148
TLR9	下游 CTCTGCGCTTATCGAACACC	
GAPDH	上游 GGCACAGTCAAGGCTGAGAATG	143
GAPDH	下游 ATGGTGGTGAAGACGCCAGTA	

**1.2.8 Western blot 检测各组 TLR9 表达** 取  $-80^{\circ}\text{C}$  冻存的各处理组大鼠脊髓标本,加入组织裂解液后在冰上以电动匀浆器匀浆。离心获得组织蛋白提取液后以二喹啉甲酸法(BCA)法定量。十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶电泳,湿转,封闭,加入特异性抗 TLR9(1:500)和 GAPDH 一抗(1:1500), $4^{\circ}\text{C}$  孵育过夜后加入 HRP 标记的二抗(1:5000)孵育 1 h,磷酸盐缓冲液吐温 20(PBST)洗涤 3 次后加入 ELC 试剂,在多色荧光凝胶成像系统下显色成像。用

Quantity-One 图像分析系统进行条带光密度分析,目的蛋白与内参条带灰度的比值作为蛋白表达的相对水平。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS19.0 统计软件对数据进行处理,计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,组内差异采用 LSD 检验和  $q$  检验,并进行单因素方差分析,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 各组自发性疼痛评分比较** 除疼痛贴组外,其余组均高于联合组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );空白组、疼痛贴组的自发性疼痛评分低于模型组( $P < 0.05$ ),见表 2。

**2.2 各组热痛觉过敏测定比较** 空白组、疼痛贴组、联合组的 PWL 时间高于模型组( $P < 0.05$ );胶布安慰组的 PWL 时间低于联合组( $P < 0.05$ ),见表 2。

**2.3 各组机械性痛觉超敏测定比较** 空白组、电针组、疼痛贴组、联合组的机械性痛阈值高于模型组( $P < 0.05$ )。空白组的机械性痛阈值高于联合组( $P < 0.05$ );针刺安慰组、胶布安慰组、联合安慰组、电针组的机械性痛阈值低于联合组( $P < 0.05$ ),见表 2。

**2.4 各组脊髓 TLR9 mRNA 表达变化比较** 空白组、电针组、疼痛贴组、联合组脊髓 TLR9 mRNA 水平低于模型组( $P < 0.05$ )。针刺安慰组、胶布安慰组、联合安慰组脊髓 TLR9 mRNA 水平高于联合组( $P < 0.05$ )。

**2.5 各组脊髓 TLR9 蛋白表达变化比较** 空白组、电针组、疼痛贴组、联合组脊髓 TLR9 蛋白水平低于模型组( $P < 0.05$ )。针刺安慰组、胶布安慰组、联合安慰组脊髓 TLR9 蛋白水平高于联合组( $P < 0.05$ )。

表 2 各组观察指标比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	自发性疼痛评分(s)	PWL 时间(s)	机械性痛阈值(s)	TLR9 mRNA	TLR9 蛋白
空白组	0 <sup>ab</sup>	13.00 $\pm$ 2.13 <sup>a</sup>	8.83 $\pm$ 1.76 <sup>ab</sup>	0.96 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup>	0.38 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>
模型组	2.67 $\pm$ 0.49	8.75 $\pm$ 7.54	1.78 $\pm$ 0.86	1.46 $\pm$ 0.26	1.08 $\pm$ 0.33
针刺安慰组	2.58 $\pm$ 0.51 <sup>b</sup>	9.42 $\pm$ 1.79	2.11 $\pm$ 0.67 <sup>b</sup>	1.29 $\pm$ 0.19 <sup>b</sup>	0.92 $\pm$ 0.23 <sup>b</sup>
胶布安慰组	2.67 $\pm$ 0.49 <sup>b</sup>	9.17 $\pm$ 1.95 <sup>b</sup>	1.98 $\pm$ 0.81 <sup>b</sup>	1.30 $\pm$ 0.21 <sup>b</sup>	0.96 $\pm$ 0.22 <sup>b</sup>
联合安慰组	2.50 $\pm$ 0.52 <sup>b</sup>	9.58 $\pm$ 1.68	2.70 $\pm$ 0.94 <sup>b</sup>	1.23 $\pm$ 0.21 <sup>b</sup>	0.87 $\pm$ 0.28 <sup>b</sup>
电针组	2.08 $\pm$ 0.79 <sup>b</sup>	10.50 $\pm$ 1.68	4.27 $\pm$ 1.25 <sup>ab</sup>	1.13 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup>	0.62 $\pm$ 0.25 <sup>a</sup>
疼痛贴组	1.75 $\pm$ 0.75 <sup>a</sup>	11.17 $\pm$ 1.85 <sup>a</sup>	4.84 $\pm$ 1.31 <sup>a</sup>	1.05 $\pm$ 0.14 <sup>a</sup>	0.49 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>
联合组	1.25 $\pm$ 0.45 <sup>a</sup>	11.58 $\pm$ 2.39 <sup>a</sup>	5.72 $\pm$ 0.68 <sup>a</sup>	0.99 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>	0.42 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup>

a:  $P < 0.05$ ,与模型组比较;b:  $P < 0.05$ ,与联合组比较

## 3 讨论

癌症骨转移属中医“骨瘤”的范畴,《内经》指出了疼痛的病因总纲,即“不通则痛”“不荣则痛”。近年来,中医学以其独特的理论体系,开展对癌性疼痛的治疗研究,取得了较为满意的进展<sup>[8-9]</sup>。针灸疗法目

前广泛应用于癌痛治疗领域<sup>[10]</sup>,有研究证明电针刺刺激双侧“足三里”和“昆仑”穴可明显减轻癌痛<sup>[11-12]</sup>。疼痛贴主要由具有调气和血、疏经通络、化淤散结的药物配制而成。

Toll 样受体是参与非特异性免疫的一类重要蛋

白质分子,激活后会分泌疼痛产生和疼痛持续的炎性细胞因子。有研究表明 TLR9 在机体内参与了无菌性炎症和中枢神经系统炎症性疾病的发病过程<sup>[13-14]</sup>。QIN 等<sup>[15]</sup>发现 TLP9 同样在人背根神经节神经元中表达,并且其配体还能增加神经元对  $Ca^{+}$  内流的调节,提示 TLR9 可能参与了疼痛的产生和维持。

本研究结果显示,空白组的自发性疼痛评分结果低于模型组,PWL 时间、机械性痛阈值高于模型组,提示本研究建立的胫骨癌痛模型制备成功,并能反映骨癌痛患者的部分症状。疼痛贴组、联合组的自发性疼痛评分结果低于模型组,PWL 时间高于模型组;电针组、疼痛贴组、联合组的机械性痛阈值高于模型组。这些结果均提示疼痛贴、电针治疗具有缓解骨癌痛大鼠疼痛的作用。

TLR9 参与了疼痛的产生和维持过程,模型组大鼠脊髓内的 TLR9 表达明显升高,其 mRNA 和蛋白水平都有走向一致的表现,提示在胫骨癌痛中 TLR9 起到了一定的作用,是骨癌痛模型中疼痛产生和维持的机制之一。而电针组、疼痛贴组、联合组的 TLR9 mRNA 与蛋白表达水平均明显下降,提示疼痛贴、电针治疗缓解骨癌痛大鼠疼痛的作用机制与降低 TLR9 表达有关。

综上,本研究验证了疼痛贴、电针治疗具有缓解骨癌痛大鼠疼痛的作用,这种作用可能与降低 TLR9 表达有关。本研究设置了多种安慰对照组,结果提示疼痛贴联合电针治疗骨癌痛大鼠疼痛的作用确切。值得注意的是单纯的针刺安慰组并未显示出有效的治疗效果,而电针治疗则显示出确切的治疗效果,提示针刺的治疗效果可能与刺激强度相关,值得进一步研究。本研究为电针联合疼痛贴治疗骨癌痛提供了实验依据,也为今后的深入研究提供了可行性。

## 参考文献

[1] CHEN W,ZHENG R,BAADE P D,et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132.

[2] KO H J,SEO S J,YOUN C H,et al. The association between pain and depression, anxiety, and cognitive function

among advanced cancer patients in the hospice ward[J]. Korean J Fam Med, 2013, 34(5): 347-356.

[3] AXELSSON C K, BALLEGAARD S, KARPATSCHOFF B, et al. Pressure pain sensitivity as a marker for stress and pressure pain sensitivity-guided stress management in women with primary breast cancer[J]. Scand J Clin Lab Invest, 2014, 74(5): 399-407.

[4] VAN DER POL C B, SCHWEITZER M E, DI PRIMIO G, et al. Breast cancer and bone metastases: the association of axial skeleton MRI findings with skeletal-related events and survival[J]. Breast Cancer Res Treat, 2014, 146(3): 583-589.

[5] MERCADANTE S. Pharmacotherapy for breakthrough cancer pain[J]. Drugs, 2012, 72(2): 181-190.

[6] 武林鑫,孙莉. 癌痛治疗不足的现状与原因[J]. 肿瘤防治研究, 2014, 41(4): 421-424.

[7] NICOTRA L, LORAM L C, WATKINS L R, et al. Toll-like receptors in chronic pain[J]. Exp Neurol, 2012, 234(2): 316-329.

[8] 张天博,张培彤. 癌痛中医外治法研究进展[J]. 长春中医药大学学报, 2016, 32(2): 430-433.

[9] 龙柳伊,吴晨荻,徐云莹,等. 中医外治法在肿瘤治疗中的应用[J]. 四川中医, 2016, 35(5): 219-221.

[10] 周杰. 癌症疼痛中医治疗的研究进展[J]. 中国卫生标准管理, 2016, 7(1): 142-143.

[11] CHIA K L. Electroacupuncture treatment of acute low back pain: unlikely to be a placebo response [J]. Acupunct Med, 2014, 32(4): 354-355.

[12] 杜俊英,房军帆,陈宜恬,等. 电针抗大鼠骨癌痛的参数优选及其对阿片受体和前体 mRNA 表达的干预[J]. 中国针灸, 2015, 35(2): 161-168.

[13] 芦殿荣,芦殿香,柏大鹏,等. 益肾骨康膏治疗肾虚血瘀型癌性躯体痛的临床研究[J]. 辽宁中医杂志, 2016, 43(7): 1402-1407.

[14] 杨长江. 脊髓 TLR9 在大鼠胫骨癌痛中的作用及电针作用观察[D]. 上海:复旦大学, 2012.

[15] QIN M, LI Y, YANG X, et al. Safety of toll-like receptor 9 agonists; a systematic review and meta-analysis[J]. Immunopharmacol Immunotoxicol, 2014, 36(4): 251-260.

(收稿日期:2018-07-20 修回日期:2018-09-15)