



• 论 著 •

GPR160 介导骨癌痛大鼠脊髓中枢敏化的机制研究 *

徐成飞¹ 倪华栋² 徐 森² 陈寅生¹ 伏 杰² 赵宝霞² 徐龙生² 姚 明² 林学武^{1△}
(¹ 蚌埠医学院第一附属医院疼痛科, 蚌埠 233000; ² 嘉兴学院附属医院麻醉与疼痛医学中心, 嘉兴 314000)

摘 要 **目的:** 检测骨癌痛 (bone cancer pain, BCP) 大鼠脊髓 (spinal cord, SC) 中 GPR160 的表达, 探讨 GPR160 受体在骨癌痛发生发展过程中的作用。**方法:** 雌性 SD 大鼠 92 只, 随机分为 5 组: 正常组 (Naïve 组, $n=12$)、假手术组 (Sham 组, $n=28$)、骨癌痛组 (BCP 组, $n=36$)、BCP + GPR160-siRNA 组 (BCP + siGpr160 组, $n=8$)、BCP + control siRNA 组 (BCP + sicGfp 组, $n=8$)。采用 von Frey 测定机械刺激缩足反射阈值 (mechanical withdrawal threshold, MWT), 检测大鼠机械痛阈的变化; CatWalk 步态分析系统分析大鼠步态数据; Western Blot 和免疫荧光检测脊髓 GPR160 受体蛋白的表达分布; Real-time PCR 检测 mRNA 表达; ELISA 和 Western Blot 检测 TNF- α 、IL-1 β 及 IL-6 蛋白表达。**结果:** BCP 大鼠造模后第 6 天, 左足 MWT 出现明显降低, 并持续至术后 18 天 ($P < 0.001$)。在 BCP 造模后第 18 天, 出现了明显的癌细胞浸润和骨质破坏。与 Sham 组相比, BCP 组大鼠脊髓中 GPR160 的蛋白和 mRNA 均明显地增加。与 BCP + sicGfp 组相比, 鞘内注射 GPR160-siRNA, 能明显逆转 BCP 大鼠 WMT 下降的趋势; 与 BCP + sicGfp 组相比, BCP + siGpr160 组大鼠脊髓 GPR160 蛋白表达明显下降 ($P < 0.001$)。BCP 组大鼠脊髓中促炎因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的表达明显升高, 而鞘内注射 GPR160-siRNA 可以逆转这一作用。**结论:** GPR160 受体参与骨癌痛大鼠脊髓中枢敏化, 其机制可能与增加促炎因子表达有关。

关键词 GPR160 受体; 骨癌痛; 脊髓; 中枢敏化; 促炎因子

Mechanisms of GPR160 underlying central sensitization in the spinal cord of rats with bone cancer pain *

XU Chengfei¹, NI Huadong², XU Miao², CHEN Yinsheng¹, FU Jie², ZHAO Baoxia², XU Longsheng², YAO Ming², LIN Xuewu^{1△}

(¹ Department of Pain, The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu 233000, China;

²Anesthesia and Pain Medicine Center, Affiliated Hospital of Jiaxing College, Jiaxing 314000, China)

Abstract **Objective:** To detect the expression of GPR160 in the spinal cord of rats with bone cancer pain, and to investigate the role of GPR160 in the development of bone cancer pain (BCP). **Methods:** Ninety-two female SD rats were randomly divided into five groups: Naïve group ($n=12$), Sham group ($n=28$), BCP group ($n=36$), BCP + GPR160-siRNA group (BCP + siGpr160, $n=8$), BCP + control siRNA group (BCP + sicGfp, $n=8$). Mechanical withdrawal threshold (MWT) was assessed with von Frey filaments. Rats' gaits were evaluated with CatWalk gait analysis. Western Blot and immunofluorescence were used to detect the expression and distribution of GPR160 protein in the spinal cord. Real-time PCR was used to detect the mRNA of GPR160 in the spinal cord. The protein of TNF- α , IL-1 β , and IL-6 was detected with ELISA and Western Blot. **Results:** MWT was significantly decreased 6 days after BCP and lasted for 18 days ($P < 0.001$). Obvious infiltration of cancer cells and bone destruction were observed 18 days after BCP. Compared with control group,

* 基金项目: 国家自然科学基金 (81901124); 嘉兴市公益性研究计划基金 (2021AY30023); 浙江省省市共建医学重点学科 (2019-ss-ttyx)

△ 通信作者 林学武 pain2009@126.com



the expression of GPR160 and pro-inflammatory cytokines TNF- α , IL-1 β , and IL-6 in BCP group were increased significantly. However, intrathecal injection of GPR160-siRNA remarkably attenuated their expression compared with BCP + sieGfp group ($P < 0.001$). **Conclusion:** These results suggest that GPR160 is involved in central sensitization, and the mechanism may be related to the increased expression of pro-inflammatory cytokines.

Keywords GPR160; bone cancer pain; spinal cord; central sensitization; pro-inflammatory cytokines

骨癌痛 (bone cancer pain, BCP) 常发生在癌症晚期的骨转移病人中, 如乳腺癌、肺癌和前列腺癌^[1], 引起剧烈的疼痛反应。2020 年全世界约有 1000 万人死于癌症^[2], 约 75% 的癌症晚期病人经历中度或重度疼痛, 至少一半的病人使用现有的药物无法有效的缓解^[3]。阿片类药物作为癌痛三阶梯用药, 发挥着重要的作用, 但也存在明显的呼吸抑制、药物依赖等不良反应^[4,5], 全世界超过 1500 万人经历着阿片类药物使用障碍 (opioid use disorder, OUD), 急需寻找新的药物和作用靶点。目前 BCP 发病机制不清, 最新的研究专注于 BCP 的细胞和分子机制, 以开发新的靶向治疗^[6]。

G 蛋白耦联受体 (G protein-coupled receptors, GPCRs) 是人类最大的膜蛋白受体家族, 已经发现超过 1000 个人类 GPCRs^[7]。GPCRs 作为药理学靶点一直备受关注, 靶向 GPCRs 的药物占全球治疗药物市场份额约 27%^[8]。GPCRs 广泛分布于外周和中枢神经系统, 是疼痛治疗最重要的靶点之一, 针对每一种 GPCRs 亚型特异性的药物开发, 都可能会提高镇痛药的疗效, 并最大限度地减少不良反应^[6]。

GPR160 (G protein-coupled receptors 160) 受体在物种间高度保守, 广泛存在于人类和啮齿动物中枢神经系统中^[9]。研究表明, GPR160 受体参与了神经病理性疼痛的产生和维持, 鞘内注射 GPR160-siRNA 能有效缓解痛觉过敏现象^[9]。目前尚未发现 GPR160 受体在 BCP 中的相关报道, GPR160 受体是否参与 BCP 的发病机制, 以及如何影响 BCP 的发生发展, 将是本研究探讨的内容。本研究首次发现 GPR160 受体参与 BCP 大鼠脊髓中枢敏化的作用, 为开发以 GPR160 受体为靶点的药物提供实验依据。

方 法

1. 主要试剂和仪器

主要试剂: GPR160 抗体 (美国 Invitrogen)、GPR160-siRNA (上海吉玛)、BCA 蛋白浓度试剂盒 (碧云天)、逆转录酶和 SYBRTM Green (Thermo Scientific)、ELISA 试剂盒 (联科生物)。

实验所用主要仪器: 实时荧光定量 PCR 仪

(Applied Biosystems)、电泳仪 (Bio-Rad)、多功能酶标仪 (Bio Tek)、微量分光光度计 (Thermo Scientific)、超声波细胞粉碎机 (新芝)、共聚焦显微镜 (Zeiss, Germany)、动物步态分析系统 (CatWalkXT)、化学发光成像系统 (GeneGnome)、von Frey 电子式机械测痛仪 (BME-404)。

2. 实验动物与分组

雌性 SD 大鼠, 体重 180~200 g, 由浙江省医学科学院实验中心提供 (伦理审批号: 2021-JUM 097), 动物饲养于 22 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C 室温下, 维持大鼠 12 h/12 h 昼夜节律, 自由摄食饮水。本实验严格按照国际疼痛学会 (International Association for the Study of Pain, IASP) 关于应用动物进行疼痛研究的伦理纲要进行操作, 整个过程尽量减少动物的不适和使用量。

雌性 SD 大鼠 92 只, 第一部分分组: 正常组 (Naïve 组, $n = 8$)、假手术组 (Sham 组, $n = 8$) 和骨癌痛组 (BCP 组, $n = 8$) 进行 von Frey 机械痛阈测定, 其中 Sham 组和 BCP 组在第 18 天取材用于 CT ($n = 3$)、HE ($n = 3$) 和免疫荧光 ($n = 2$)。第二部分分组: Sham 组和 BCP 组, Sham ($n = 8$) 组和 BCP 组 ($n = 8$) 用于 RT-PCR 检测 GPR160 的 mRNA 表达; Sham 组、BCP 6 天、BCP 12 天和 BCP 18 天用于 Western Blot 检测 GPR160 蛋白。第三部分分组: Sham 组 ($n = 8$)、BCP 组 ($n = 8$)、BCP + sieGfp 组 ($n = 8$) 和 BCP + siGpr160 组 ($n = 8$) 用于 von Frey 机械痛阈测定和步态分析, 另 Naïve 组 ($n = 4$) 作为正常组对比; 其中 Naïve 组 ($n = 4$)、Sham 组 ($n = 4$)、BCP 组 ($n = 4$) 和 BCP + siGpr160 组 ($n = 4$) 用于 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的 Western Blot 和 ELISA 检测。

3. 实验流程

第一部分: 实验动物适应环境 3 天后, 于 BCP 造模前、造模后 6 天、12 天和 18 天进行 von Frey 机械痛阈测定, 其中于造模后 12 天取材进行免疫荧光实验, 第 18 天取材进行 HE 和 CT 检测。第二部分: 实验动物适应环境 3 天后, 进行 BCP 造模 (Sham 组注射灭活癌细胞), 于造模后 6 天、12 天和 18 天取材 Western Blot 实验; 于造模后第 12 天取材 (Sham 组和 BCP 组, $n = 8$) 进行 RT-PCR



实验。第三部分：实验动物适应环境 3 天后，进行 von Frey 机械痛阈测定，然后 BCP 造模（Sham 组注射灭活癌细胞），于造模后第 3 天进行鞘内置管并验证成功后，于造模后第 7 天、8 天、9 天、10 天、11 天和 12 天鞘内给药，并于造模后第 6 天、7 天、8 天、9 天、10 天、11 天和 12 天鞘内给药 1 h 后进行 von Frey 机械痛阈测定，第 12 天鞘内给药 1 h 后进行步态分析，然后取材进行 Western Blot 和 ELISA 实验。

4. BCP 模型的建立

参照我们之前的方法^[10]建立大鼠 BCP 模型。将保存于液氮中的 Walker 256 乳腺癌细胞株取出，37℃ 水浴复苏，取 0.5 ml (2×10^7) Walker 256 细胞种植于 SD 大鼠腹腔，3~4 天后出现腹水。抽出腹水，用 Hank's 液洗涤 3 次，细胞计数。采用戊巴比妥钠麻醉 (50 mg/kg)，在左胫骨中下 1/3 处纵向切开皮肤暴露胫骨，用微量注射器抽取 10 μ l Walker 256 乳腺癌细胞 (1×10^6)，从骨面向干骺端穿刺缓慢注入骨髓腔，Sham 组注入 10 μ l 灭活癌细胞，停留 1 min 后拔出，立即用医用胶封堵针孔。

5. 鞘内置管给药

将大鼠戊巴比妥钠 (50 mg/kg) 麻醉后，在 L₃₋₄ 棘突处做一纵向切口，分离 L₄ 棘突旁肌肉和椎板，切除 L₄ 棘突，暴露 L₃₋₄ 椎间隙，用 26 G 针刺破黄韧带和硬脊膜，经破口处置入 PE-10 导管 2 cm，18 G 硬膜外穿刺针在皮下穿一条隧道至颈背部，外露 2 cm 固定，外口封闭，防止脑脊液外漏。术后第 2 天经 PE-10 管注入 2% 利多卡因 15 μ l 测试，30 s 内出现下肢麻痹，30 min 左右恢复，表明置管成功。置管后单笼饲养，观察 2 天，出现肢体感觉或运动障碍、导管脱出的剔除，于 BCP 造模后第 7 天、8 天、9 天、10 天、11 天、12 天开始鞘内注射 GPR160-siRNA 或者对照药物 (GPR160-sieGfp)，在 BCP 造模后第 12 天取材进行实验。

6. 机械痛阈的测定

采用 von Frey 检测 BCP 大鼠机械刺激缩足反射阈值 (mechanical withdrawal threshold, MWT)^[11-13]，安静环境下，将大鼠置于底部为 0.5 cm×0.5 cm 铁丝网格有机玻璃箱 (20 cm×20 cm×25 cm) 中，适应环境 30 min。采用 von Frey 电子式机械测痛仪测定 MWT，对准大鼠左侧足底中间部位，逐渐加压，当大鼠出现缩足、舔足、甩足时记录压力值，测定 3 次，每次间隔 10 s，取其平均值为 MWT (g)。在 BCP 术前、术后第 6 天、12 天、18 天测定大鼠左足 MWT (g)。BCP + siGpr160 组大鼠在 BCP 术后

7~12 天连续鞘内注入 GPR160-siRNA，对照组鞘内注入 GPR160-sieGfp，于 BCP 术前、术后 6 天、8 天、10 天、12 天鞘内给药 1 h 后进行测痛。

7. 步态分析

使用 CatWalk 步态分析系统对运动中的大鼠进行步态分析，步态分析已被证明是测量疼痛相关行为的有效方法。光线从通道底部荧光管中发出，穿过玻璃板，大鼠脚印与玻璃板接触时，光线向下反射，下方的高速摄像机捕捉到大鼠的脚印图像，全程采集大鼠脚印的参数。采集前进行训练，以匀速、无停顿地通过通道为准。CatWalk 系统常采用脚印的接触面积和强度作为衡量指标^[14]，因此，本研究采用以下三个指标来评估骨癌痛前后的相关行为：

①最大触地面积 (max contact area)：足部接触最多时的面积；②最大触地面积时最大强度 (max contact max intensity)：足部接触玻璃板时最大压强；③平均强度 (mean intensity)：足部触地面积最大时的平均强度。为了减小差异，本研究采用左后肢/右后肢比值来消除其他因素影响，数据采用左后肢/右后肢百分比形式。

8. CT 三维重建

建立骨癌痛模型后 18 天，腹腔注射戊巴比妥钠 (100 mg/kg) 深麻醉后取材（造模侧下肢），对大鼠胫骨进行 CT 三维重建，观察骨质破坏情况，根据之前的研究^[15]，CT 扫描参数如下：螺旋扫描，管电压为 120 kVp，层厚 1 mm，层间距 1 mm，核：U30u 中等光滑，SD 大鼠胫骨的 CT 成像为高分辨率（视野为 100 mm）。所有图像通过西门子 PACS 系统软件处理和分析。

9. HE 染色

建立骨癌痛模型后 18 天，腹腔注射戊巴比妥钠 (100 mg/kg) 取材，大鼠左侧胫骨经 4% 多聚甲醛固定、脱钙、石蜡包埋、切片后进行 HE 染色。使用显微镜（日本 Olympus）采集分析图像，观察肿瘤生长及骨质破坏情况。

10. Western Blot

大鼠腹腔注射戊巴比妥钠 (100 mg/Kg) 深麻醉后，在冰上快速取出大鼠脊髓腰段膨大处 (L₃-L₅) 脊髓背角，液氮储存。组织 40 mg 加入 RIPA 裂解液（含 PMSF 和磷酸酶抑制剂）300 μ l，超声破碎匀浆，冰上裂解 30 min，4℃ 14,000 r/min 离心 20 min，吸取上清。BCA 法测定蛋白浓度，上样缓冲液 1:4 配比，每孔加入 40 μ g 蛋白样 SDS-PAGE 胶电泳，湿法转膜，5% BSA 室温封闭 2 h，一抗 4℃ 孵育过夜，二抗室温 2 h，ECL 显影。使用 Image J 软



件对图片进行灰度分析, GPR160 蛋白相对表达量以 GPR160 蛋白条带灰度值与 GAPDH 条带灰度值比值表示。

11. Real-time PCR

大鼠脊髓背角取材(同 Western Blot 步骤), Trizol 法提取总 RNA, 测定浓度后使用逆转录试剂盒 (Thermoscientific RevertAid cDNA synthesis Kit, USA) 将 1000 ng RNA 逆转录为 cDNA, 使用 PowerUp SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) 在实时荧光定量 PCR 仪中进行 Real-time PCR 反应, 引物由上海生工设计合成。GPR160 Forward: 5'-TTCCTTCGCTTACGGCTTCTTGC-3', Reverse: 5'-GC-TTGGCTCTGGACAGATTAC-3'; β -actin Forward: 5'-ATCACTATCGGCAATGAGCGGTTC-3', Reverse: 5'-TGTTGGCATAGAGGTCTTTACGGATG-3'。PCR 扩增条件为: (50℃, 120 s; 95℃, 120 s); 扩增循环 40 次 (95℃, 15 s; 60℃, 60 s); 溶解 (95℃, 15 s; 60℃, 60 s; 95℃, 15 s)。荧光实时定量 PCR 采用 $2^{-\Delta\Delta ct}$ 法分析, 相对表达量采用与 β -actin 的比值; Δct 、 $\Delta\Delta ct$ 计算公式: $\Delta ct = \text{目的基因 CT 值} - \text{内参基因 CT 值}$; $\Delta\Delta ct = \Delta ct (\text{处理组}) - \Delta ct (\text{对照组})$ 。

12. 免疫荧光

大鼠 BCP 造模后 12 天, 戊巴比妥钠 (50 mg/kg) 深度麻醉, 经心尖穿入静脉针至升主动脉, 快速灌注 PBS 500 ml 后, 再用 4% 多聚甲醛 250 ml 灌注固定, 将脊髓取出放入 4% 多聚甲醛固定 6 h, 然后在 15% 和 30% 蔗糖溶液中梯度脱水 48 h, 擦干水分后使用 OCT (Sakura) 在 -20℃ 包埋, 切成 16 μ m 厚的切片置于载玻片上, 放入 -80℃ 保存。切片使用 PBS 洗涤, 5% BSA 封闭室温 1 h, 然后在 4℃ 冰箱孵育一抗 GPR160 (orb215127, Biorbyt, Cambridge, UK) 过夜, 第 2 天室温复温 30 min, PBS 洗涤后, 在室温下二抗 [Abcam, donkey anti-rabbit IgG H&L (Alexa Fluor® 488), ab150073] 孵育 50 min, PBS 洗涤后滴加 DAPI (Vectashield-DAPI mounting medium) 封片, 使用荧光共聚焦显微镜 (Zeiss, Germany) 采集图像。

13. ELISA

大鼠 BCP 造模后 12 天取材(同 Western Blot 步骤), 裂解液提取组织蛋白, 10 倍稀释蛋白上清, 参照文献^[16]方法, 并依据试剂盒说明书进行操作, 加样、富集孵育、洗板、加酶标抗体、再次洗板、底物显色和终止反应, 然后酶标仪读取 450 nm 下样本的 OD 值。拟合标准曲线, 将样本 OD 值代入方程, 计算样品浓度。

14. 统计学分析

使用 Image J 软件统计 Western Blot 条带灰度值, 用目的蛋白与内参的灰度比值表示蛋白的相对表达量。所有计量资料统计数据使用 GraphPad 软件分析, 采用均数 $\pm$ 标准误 ($\bar{x} \pm SEM$) 表示。行为学结果采用两因素重复测量方差分析 (two-way repeated measures ANOVA); 实时荧光定量 PCR 和 Western Blot 结果采用 t 检验 (student's t -test) 分析和单因素方差分析 (one-way ANOVA); $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 骨癌痛模型的建立

痛阈结果显示, 与 Naïve 组或 Sham 组相比, BCP 组大鼠在 6 天 ($P < 0.05$)、12 天 ($P < 0.001$)、18 天 ($P < 0.001$) 的 MWT 显著降低 (见图 1A)。CT 成像显示, 与 Sham 组相比, BCP 组大鼠在术后 18 天左侧胫骨出现明显的骨质破坏 (见图 1B)。胫骨组织病理学结果显示, Sham 组骨髓腔可见正常的骨小梁结构 (见图 1C), 而 BCP 组骨髓腔内可见被侵蚀的骨小梁结构, 骨髓腔充满核大深染的肿瘤细胞 (见图 1D)。

2. GPR160 在 BCP 大鼠脊髓中的表达

免疫荧光结果显示, 与 Sham 组相比, BCP 术后 12 天 GPR160 的表达增强 (见图 2A 和图 2C); 在 BCP 术后 12 天脊髓背角上, 与对侧 (Contra) 相比, 造模侧 (Ipsi) 的 GPR160 表达增强 (见图 2B)。Western Blot 结果显示, 与 Sham 组相比, GPR160 蛋白在 BCP 术后 6 天 ($P < 0.05$)、12 天 ($P < 0.01$)、18 天 ($P < 0.001$) 明显增高 (见图 2D)。Real-time PCR 结果显示, 与 Sham 组相比, BCP 组 GPR160 mRNA 表达显著增加 ($P < 0.001$, 见图 2E)。

3. 鞘内注射 GPR160-siRNA 对 BCP 大鼠 MWT 及 GPR160 蛋白的影响

CatWalk 步态分析系统作为研究机械性疼痛的方法^[17], 本研究采用触地面积和压强作为参考指标, 数据分析结果显示, 与 Sham 组相比, BCP 组大鼠在最大触地面积 ($P < 0.001$)、最大触地面积时最大压强 ($P < 0.05$)、平均压强 ($P < 0.01$) 均显著降低 (见图 3A-F)。

CatWalk 步态分析结果显示, 与 BCP 组大鼠相比, siGpr160 组大鼠在最大触地面积 ($P < 0.001$)、最大触地面积时最大压强 ($P < 0.05$)、平均压强 ($P < 0.001$) 显著增加 (见图 3D-F)。MWT 结果提示, 鞘内给药后, siGpr160 组 MWT 在 BCP 术后第 10 天

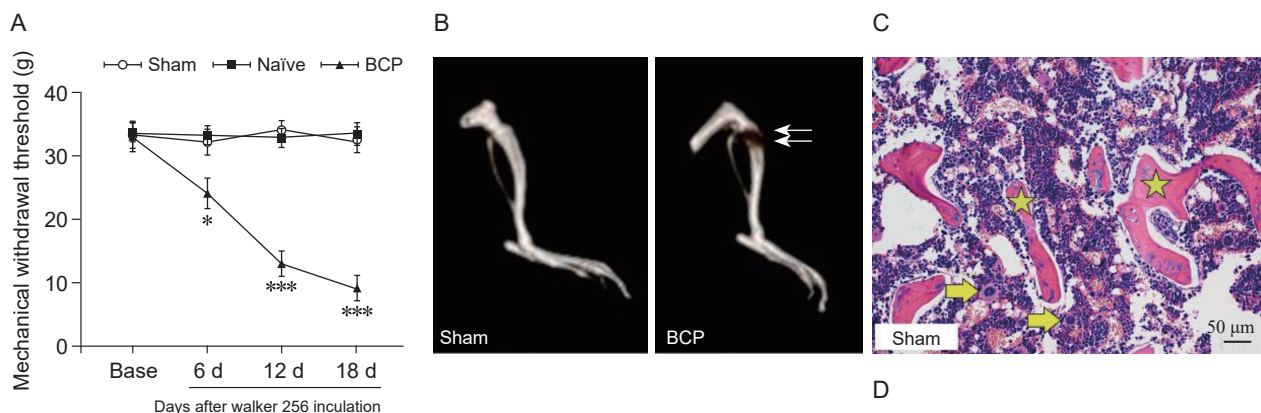


图 1 建立大鼠骨癌痛模型 ($\bar{x} \pm SEM$)

(A) BCP 大鼠机械缩足刺激反射阈值 ($n = 8$, $F_{2,21} = 60.08$, two-way repeated-measures ANOVA), $*P < 0.05$, $***P < 0.001$, 与 Naïve 或 Sham 组相比; (B) 大鼠左下肢 CT 三维重建影像; (C, D) 大鼠胫骨 HE 染色, 骨小梁 (五角星)、巨噬细胞 (箭头)、骨吸收坑 (三角形) 和癌细胞 (虚线)。

Fig. 1 The establishment of bone cancer pain model in rats ($\bar{x} \pm SEM$)

(A) MWT of BCP rat ($n = 8$, $F_{2,21} = 60.08$, two-way repeated-measures ANOVA), $*P < 0.05$, $***P < 0.001$, compared with group Naïve or Sham; (B) Three-dimensional CT reconstruction of a rat's left leg; (C, D) Hematoxylin-eosin staining of rat, bone trabecular (asterisks), macrophages (arrows), bone resorption pits (triangle) and cancer cells (within the dotted lines).

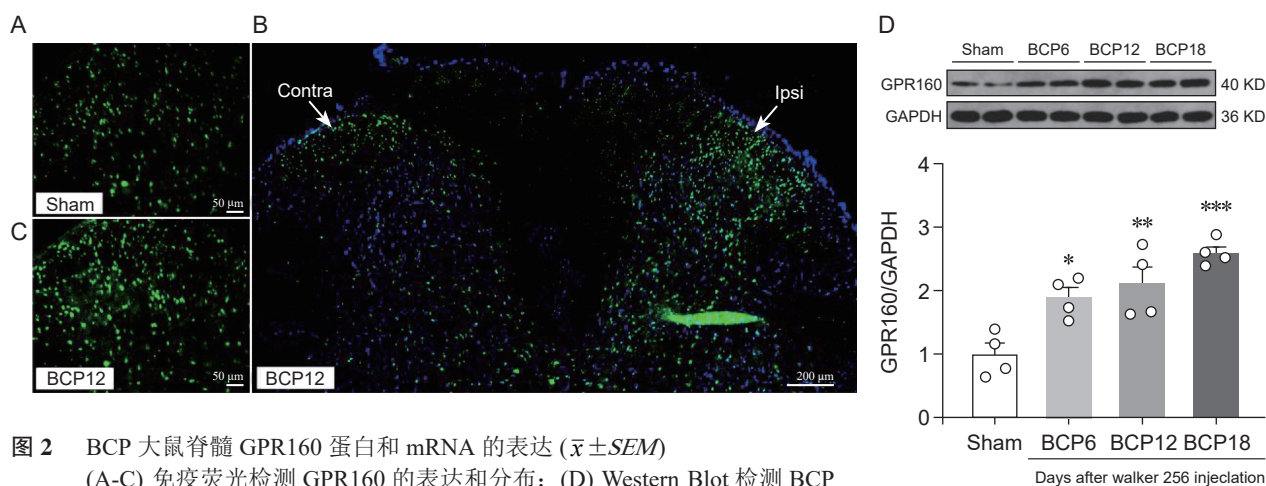


图 2 BCP 大鼠脊髓 GPR160 蛋白和 mRNA 的表达 ($\bar{x} \pm SEM$)

(A-C) 免疫荧光检测 GPR160 的表达和分布; (D) Western Blot 检测 BCP 大鼠脊髓 GPR160 蛋白的表达 ($n = 4$, $F_{3,12} = 12.68$, one-way ANOVA), $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$, 与 Sham 组相比; (E) BCP 大鼠脊髓 GPR160 mRNA 的表达 ($n = 7$ 或 8 , Student's t -test), $***P < 0.001$, 与 Sham 组相比

Fig. 2 The expression of GPR160 protein and mRNA in the spinal cord of rats with bone cancer pain ($\bar{x} \pm SEM$)

(A-C) Immunofluorescence was performed to detect the expression and distribution of GPR160; (D) Western Blot shows increased GPR160 protein levels in the spinal cord of rats with BCP ($n = 4$, $F_{3,12} = 12.68$, one-way ANOVA). $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$, compared with group Sham; (E) The expression of GPR160 mRNA in the spinal cord of rats with BCP ($n = 7$ or 8 , Student's t -test). $***P < 0.001$, compared with group Sham.

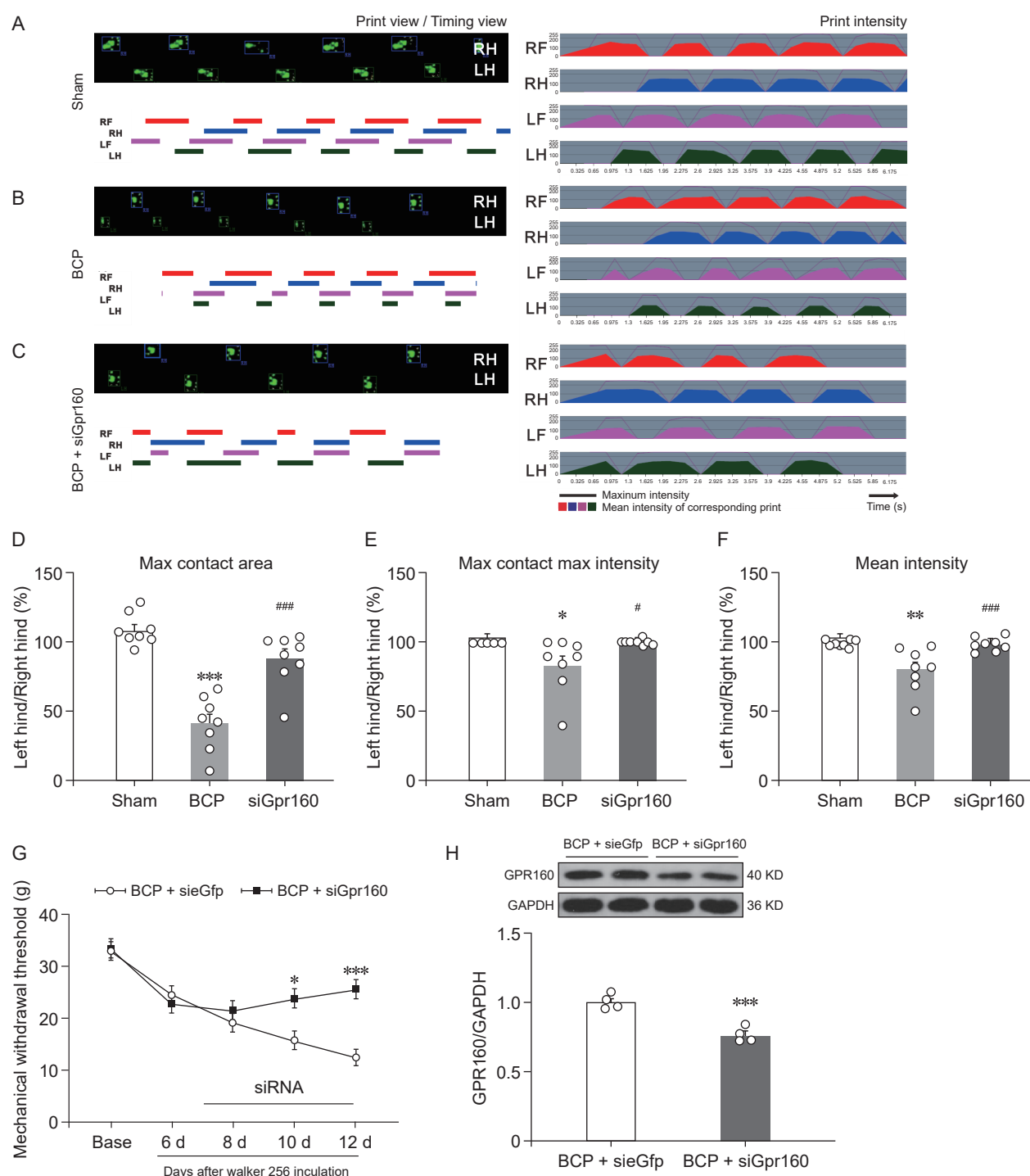


图3 鞘内注射 GPR160-siRNA 对骨癌痛大鼠行为学及 GPR160 蛋白的影响 ($\bar{x} \pm SEM$)

(A-F) 大鼠步态数据 ($n = 8$, one-way ANOVA), RH: 右后足; LH: 左后足。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 与 Sham 组相比; # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$, 与 BCP 组比较; (G) 大鼠鞘内注射 GPR160-siRNA 后 MWT ($n = 8$, $F_{1,14} = 12.78$, two-way repeated-measures ANOVA), * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, 与 BCP + sieGfp 组相比; (H) 大鼠鞘内注射 GPR160-siRNA 后 GPR160 蛋白表达 ($n = 4$, Student's t -test), *** $P < 0.001$, 与 BCP + sieGfp 组相比

Fig. 3 The effect of intrathecal injection of GPR160-siRNA on behavior and GPR160 protein in the rat model of BCP ($\bar{x} \pm SEM$) (A-F) Gait data of rats ($n = 8$, one-way ANOVA). RH: right hind; LH: left hind. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, compared with group Sham; # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$, compared with group BCP; (G) MWT of rats after intrathecal injection of GPR160-siRNA ($n = 8$, $F_{1,14} = 12.78$, two-way repeated-measures ANOVA). * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, compared with group BCP + sieGfp; (H) The expression of GPR160 protein after intrathecal injection of GPR160-siRNA ($n = 4$, Student's t -test). *** $P < 0.001$, compared with group BCP + sieGfp.

($P < 0.05$)、12 天 ($P < 0.001$) 显著升高 (见图 3G)。Western Blot 结果显示, 与 BCP + sicGfp 组相比, BCP + siGpr160 组 GPR160 蛋白显著下降 ($P < 0.001$, 见图 3H)。

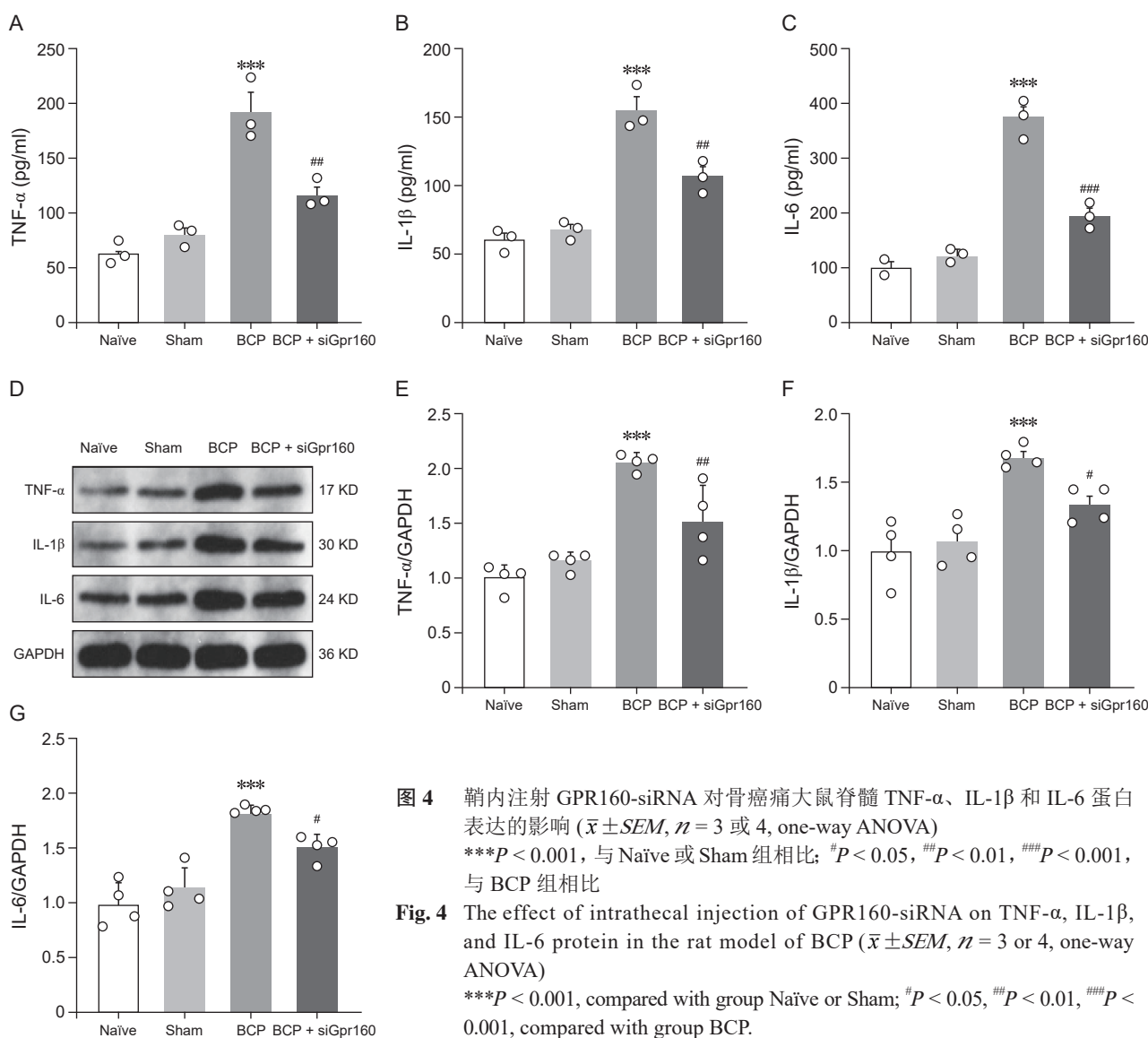
4. 鞘内注射 GPR160-siRNA 对骨癌痛大鼠脊髓 TNF- α 、IL-1 β 及 IL-6 蛋白表达的影响

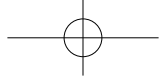
ELISA 检测结果显示, 与 Naïve 或 Sham 组相比, BCP 组 TNF- α ($P < 0.001$)、IL-1 β ($P < 0.001$) 和 IL-6 ($P < 0.001$) 显著增高; 与 BCP 组相比, siGpr160 组 TNF- α ($P < 0.01$)、IL-1 β ($P < 0.01$)、IL-6 ($P < 0.001$) 显著下降 (见图 4A-C)。Western Blot 结果显示, 与 Naïve 或 Sham 组相比, BCP 组 TNF- α ($P < 0.001$)、IL-1 β ($P < 0.001$) 和 IL-6 ($P < 0.001$) 显著增高; 与 BCP 组相比, siGpr160 组 TNF- α ($P < 0.01$)、IL-1 β ($P < 0.05$)、IL-6 ($P < 0.05$) 显著下降 (见图 4D-G)。

讨 论

骨癌痛 (BCP) 是一种复杂的慢性疼痛, 国际上有多种研究骨癌痛的动物模型^[18], 这些模型在一定程度上可以产生与临床骨癌痛病人相似的疼痛状态, 以便观察骨癌痛的发生发展、骨质破坏、中枢及外周组织中的分子生物学改变。

本研究采用姚明等^[10]建立的骨癌痛模型, 在造模后第 6 天左足开始出现明显的痛阈下降, 且疼痛的程度和时间与行为学表现一致; HE 染色可见骨髓腔内大量癌细胞和遭到破坏的骨小梁, CT 三维重建再次验证了 BCP 组存在明显的骨质破坏; 行为学 CatWalk 步态分析结果显示, BCP 组大鼠左足在最大触地面积、最大触地面积时最大压强、平均压强出现显著下降, 这与相关的研究结果一致^[14],





验证模型成功。

随着 GPR160 受体的配体 CARTp 的确定^[9], CARTp/GPR160 信号通路也被认为与奖赏、成瘾、厌食和抑郁等有关^[19-21], 其在疼痛中的作用也受到重视。Yosten 等^[9]在坐骨神经慢性压迫模型 (chronic constriction injury, CCI) 上发现 GPR160 受体参与痛觉过敏的发生。

为了探究 GPR160 受体在骨癌痛中的表达, 本研究发现, 与 Naïve 或 Sham 组相比, BCP 组大鼠脊髓中 GPR160 蛋白和 mRNA 表达量均显著增加, 提示 BCP 上调脊髓中 GPR160 受体的蛋白和 mRNA 的表达, 这与之之前在神经病理性疼痛中的研究结果一致^[9]。为了进一步明确 GPR160 受体在 BCP 中的作用, 本研究鞘内注射了 GPR160-siRNA, 结果显示, 与 BCP + sicGfp 组相比, BCP + siGpr160 组大鼠 MWT 显著降低, GPR160 蛋白也显著下降, 提示抑制 GPR160 受体有助于减轻骨癌痛; CatWalk 步态分析结果提示, 与 BCP 组相比, BCP + siGpr160 组大鼠在最大触地面积、最大触地面积时最大压强、平均压强出现显著的上升, 提示疼痛程度减轻。但同时也观察到, 鞘内注射 GPR160-siRNA 并没有完全逆转 BCP 模型大鼠的痛阈下降程度 (MWT 曲线并未达到基线水平), 提示 GPR160 受体途径可能是参与大鼠骨癌痛发生和维持的重要机制之一。

炎症因子 (TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6) 在疼痛信号转导过程中起着重要的作用^[22]。本研究采用 ELISA 和 Western Blot 检测了骨癌痛大鼠脊髓中的炎症因子, 结果发现, 与 Naïve 或 Sham 组相比, BCP 组大鼠脊髓中的炎症因子显著升高, 而在鞘内注射 GPR160-siRNA 后, 炎症因子水平出现显著下降; 与 BCP + sicGfp 组相比, BCP + siGpr160 组的 MWT 明显的上升, 提示抑制 GPR160 受体后, 减少了炎症因子的释放, 减轻痛觉过敏反应。

虽然 BCP 的发病机制不清, 但目前的普遍观点归纳为: ①周围神经损伤和炎症介质引起的伤害感受器的外周敏化^[23]; ②脊髓中广泛的神经化学变化导致的中枢敏化^[24]; ③下行抑制系统的丧失和异化系统的激活^[25]。神经元和胶质细胞在 BCP 发生发展过程中起着重要的作用, 在肿瘤细胞置入大鼠骨髓腔后, 小胶质细胞和星形胶质细胞活化, 释放大量的炎症因子 (如 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6), 上调细胞表面的受体 (如 P2X3R、TLR4 和 CX3CR1), 并激活胞内信号通路 (如 PI3K/Akt、NF- κ B 和 ERK 通路)^[26,27]。研究发现抑制 TNFR1 和 IL-6R 可减轻 BCP 大鼠机械痛和热痛过敏^[28]; 同样, IL-1 β 也可通

过增加 NMDA 受体 NR1 亚基的磷酸化促进 BCP^[29]。GPR160 受体在脊髓中的神经元、星形胶质细胞和小胶质细胞上表达^[9], 参与神经元和胶质细胞的信号传递。在鞘内注射 GPR160-siRNA 后, 炎症因子水平下降、MWT 上升, 提示 BCP 大鼠胶质细胞的活化和/或神经元-胶质细胞的交互作用可能受到了抑制。关于 GPR160 受体在神经元-胶质细胞中如何影响 BCP 的发展, 我们将进一步深入研究。

本研究未进行 GPR160 的过表达处理, 没有进一步探究 GPR160 在兴奋性神经元或抑制性神经元中的分布, 接下来还将继续 GPR160 参与疼痛调节直接机制的研究。综上所述, 在本研究条件下, 首次证明了 GPR160 受体参与了脊髓水平大鼠骨癌痛的发生和维持, 其机制可能与促进炎症因子释放有关, 这为临床治疗提供了新的思路。

利益冲突声明: 作者声明本文无利益冲突。

参 考 文 献

- [1] Mantyh PW. Bone cancer pain: from mechanism to therapy[J]. *Curr Opin Support Palliat Care*, 2014, 8(2):83-90.
- [2] World Health Organization. Fact sheet detail. Cancer. www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer (accessed February 2021).
- [3] Falk S, Dickenson AH. Pain and nociception: mechanisms of cancer-induced bone pain[J]. *J Clin Oncol*, 2014, 32(16):1647-1654.
- [4] Liu S, Kim DI, Oh TG, *et al*. Neural basis of opioid-induced respiratory depression and its rescue[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2021, 118(23):e2022134118.
- [5] Darceq E, Kieffer BL. Opioid receptors: drivers to addiction?[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2018, 19(8):499-514.
- [6] Gadepalli A, Akhilesh, Uniyal A, *et al*. Multifarious targets and recent developments in the therapeutics for the management of bone cancer pain[J]. *ACS Chem Neurosci*, 2021, 12(22):4195-4208.
- [7] Sommer ME, Selent J, Carlsson J, *et al*. The european research Network on signal transduction (ERNES): toward a multidimensional holistic understanding of G protein-coupled receptor signaling[J]. *ACS Pharmacol Transl Sci*, 2020, 3(2):361-370.
- [8] Hauser AS, Attwood MM, Rask-Andersen M, *et al*. Trends in GPCR drug discovery: new agents, targets and indications[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2017, 16(12): 829-842.
- [9] Yosten GL, Harada CM, Haddock C, *et al*. GPR160 de-orphanization reveals critical roles in neuropathic pain in rodents[J]. *J Clin Invest*, 2020, 130(5):2587-2592.
- [10] 姚明, 杨建平, 王丽娜, 等. 腹水传代与体外培养

- Walker 256 癌细胞系建立大鼠骨癌痛模型的可行性 [J]. 中华医学杂志, 2008, 88(13):880-884.
- [11] Medhurst SJ, Walker K, Bowes M, *et al.* A rat model of bone cancer pain[J]. Pain, 2002, 96(1-2):129-140.
- [12] Apryani E, Ali U, Wang ZY, *et al.* The spinal microglial IL-10/beta-endorphin pathway accounts for cinobufagin-induced mechanical antiallodynia in bone cancer pain following activation of alpha7-nicotinic acetylcholine receptors[J]. J Neuroinflammation, 2020, 17(1):75.
- [13] Fu J, Ni C, Ni HD, *et al.* Spinal Nrf2 translocation may inhibit neuronal NF- κ B activation and alleviate allodynia in a rat model of bone cancer pain[J]. J Neurochem, 2021, 158(5):1110-1130.
- [14] Hu XM, Yang W, Du LX, *et al.* Vascular endothelial growth factor a signaling promotes spinal central sensitization and pain-related behaviors in female rats with bone cancer[J]. Anesthesiology, 2019, 131(5): 1125-1147.
- [15] Xu M, Ni H, Xu L, *et al.* B14 ameliorates bone cancer pain through downregulating spinal interleukin-1beta via suppressing neuron JAK2/STAT3 pathway[J]. Mol Pain, 2019, 15:1744806919886498.
- [16] 邓雨涛, 程祝强, 高永静, 等. 趋化因子 CXCL10 作为神经病理性疼痛生物标记物的研究 [J]. 中国疼痛医学杂志, 2021, 27(1):31-40.
- [17] Vrinten DH, Hamers FFT. 'CatWalk' automated quantitative gait analysis as a novel method to assess mechanical allodynia in the rat; a comparison with von Frey testing[J]. Pain, 2003, 102(1):203-209.
- [18] 张春鹏, 周庆辉. 骨癌痛模型研究进展 [J]. 中国疼痛医学杂志, 2018, 24(10):774-777.
- [19] Haddock CJ, Almeida-Pereira G, Stein LM, *et al.* Signaling in rat brainstem via Gpr160 is required for the anorexigenic and antidipsogenic actions of cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide[J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2021, 320(3): R236-R249.
- [20] Somalwar AR, Choudhary AG, Sharma PR, *et al.* Cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide (CART) induced reward behavior is mediated via $G_{i/o}$ dependent phosphorylation of PKA/ERK/CREB pathway[J]. Behav Brain Res, 2018, 348:9-21.
- [21] SamsonWK, SalveminiD, Yosten GLC. Overcoming stress, hunger, and pain: cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide's promise[J]. Endocrinology, 2021, 162(8):bqab108.
- [22] Hui J, Zhang ZJ, Zhang X, *et al.* Repetitive hyperbaric oxygen treatment attenuates complete Freund's adjuvant-induced pain and reduces glia-mediated neuroinflammation in the spinal cord[J]. J Pain, 2013, 14(7):747-758.
- [23] Mantyh PW, Clohisy DR, Koltzenburg M, *et al.* Molecular mechanisms of cancer pain[J]. Nat Rev Cancer, 2002, 2(3):201-209.
- [24] Schwei MJ, Honore P, Rogers SD, *et al.* Neurochemical and cellular reorganization of the spinal cord in a murine model of bone cancer pain[J]. J Neurosci, 1999, 19(24):10886-10897.
- [25] Sabino MA, Mantyh PW. Pathophysiology of bone cancer pain[J]. J Support Oncol, 2005, 3(1):15-24.
- [26] Zhai M, Yang S, Lin S, *et al.* distinct gene expression patterns of ion channels and cytokines in rat primary sensory neurons during development of bone cancer and cancer pain[J]. Front Mol Neurosci, 2021, 14: 665085.
- [27] Zhou YQ, Liu Z, Liu HQ, *et al.* Targeting glia for bone cancer pain[J]. Expert Opin Ther Targets, 2016, 20(11): 1365-1374.
- [28] Zhao D, Han DF, Wang SS, *et al.* Roles of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 in regulating bone cancer pain via TRPA1 signal pathway and beneficial effects of inhibition of neuro-inflammation and TRPA1[J]. Mol Pain, 2019, 15:1744806919857981.
- [29] Zhang RX, Liu B, Li A, *et al.* Interleukin 1beta facilitates bone cancer pain in rats by enhancing NMDA receptor NR-1 subunit phosphorylation[J]. Neuroscience, 2008, 154(4):1533-1538.

《中国疼痛医学杂志》编辑部

地址: 北京市海淀区学院路 38 号, 北京大学医学部

联系电话: 010-82801712; 010-82801705

电子邮箱: pain1712@126.com

杂志官网: <http://casp.ijournals.cn> 在线投稿

微信公众平台号: 中国疼痛医学杂志 (cjpm1712)

