

## • 论 著 •

## 骨痛灵方通过抑制整合素 $\alpha\text{v}\beta 3$ 通路缓解肺癌骨转移癌性疼痛 \*

孟唤男<sup>1</sup> 郭晓冬<sup>1△</sup> 周小翠<sup>1△</sup> 陈 聆<sup>1</sup> 王立玉<sup>1</sup> 吕 英<sup>2</sup> 徐振晔<sup>3</sup>( <sup>1</sup>上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院肿瘤科, 上海 200437; <sup>2</sup>上海市黄浦区打浦桥街道社区卫生服务中心, 上海 200020; <sup>3</sup>上海中医药大学附属龙华医院肿瘤科, 上海 200032)

**摘 要** 目的: 探讨骨痛灵 (Gutongling, GTL) 方治疗肺癌骨转移疼痛的潜在作用机制。方法: 将 50 只 C57BL/6 雄性小鼠随机分为 5 组 ( $n = 10$ ): 假手术组 (Sham 组)、模型组 (Model 组)、唑来膦酸组 (ZA 组)、骨痛灵组 (GTL 组)、骨痛灵+唑来膦酸组 (GTL+ZA 组)。除 Sham 组给予接种 PBS 溶液外, 其余各组均予鼠源肺腺癌细胞 Lewis-LUC 悬液造模。采用 von Frey 纤维丝测痛仪检测小鼠足底的机械痛阈值, 共聚焦显微镜观察破骨细胞伪足小体 F-actin 环, 实时荧光定量 PCR 法与免疫组化法检测各组小鼠左后肢胫骨骨组织中整合素  $\alpha\text{v}\beta 3$ 、富含脯氨酸的酪氨酸激酶 2 (PyK2)、酪氨酸激酶 Src、Casitas B 细胞淋巴瘤家族蛋白 (Cbl) mRNA 及蛋白表达水平。结果: 与 Sham 组比较, Model 组小鼠造模后机械痛阈值下降 ( $P < 0.05$ )。造模后第 14 天: 各给药干预组机械痛阈值较 Model 组升高 ( $P < 0.05$ ); ZA 组与 GTL 组机械痛阈值相当; 造模后第 21 天: GTL+ZA 组机械痛阈值较各给药组明显升高 ( $P < 0.05$ )。与 Sham 组比较, Model 组 F-actin 环结构完整、 $\alpha\text{v}\beta 3$ 、PyK2、Src、Cbl mRNA 表达及蛋白染色强度升高 ( $P < 0.05$ ); GTL+ZA 组 F-actin 环较各给药组破坏程度明显、 $\alpha\text{v}\beta 3$ 、PyK2、Src、Cbl mRNA 表达及蛋白染色强度明显下降 ( $P < 0.05$ )。结论: 骨痛灵方可能通过调控骨组织中  $\alpha\text{v}\beta 3$ /PyK2/Src/Cbl 通路抑制 F-actin 环形成起到骨保护作用, 从而治疗肺癌骨转移疼痛。

**关键词** 肺癌骨转移; 癌痛; 骨痛灵方; 唑来膦酸;  $\alpha\text{v}\beta 3$  通路; F-actin 环

### Gutongling prescription alleviates cancer pain induced by bone metastasis from lung cancer through inhibiting $\alpha\text{v}\beta 3$ integrin pathway \*

MENG Huannan<sup>1</sup>, GUO Xiaodong<sup>1△</sup>, ZHOU Xiaocui<sup>1△</sup>, CHEN Ling<sup>1</sup>, WANG Liyu<sup>1</sup>, LYU Ying<sup>2</sup>, XU Zhenye<sup>3</sup>( <sup>1</sup> Department of Oncology, Yueyang Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200437, China; <sup>2</sup> Community Health Service Center, Dapugiao Street, Huangpu District, Shanghai 200020, China; <sup>3</sup> Department of Oncology, Longhua Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China)

**Abstract Objective:** To explore the potential mechanism of Gutongling (GTL) prescription in the treatment of pain with bone metastases from lung cancer. **Methods:** Fifty male C57BL/6 mice were randomly divided into 5 groups ( $n = 10$ ): Sham group, Model group, zoledronic acid (ZA) group, GTL group, and GTL + ZA group. Except for Sham group, which was inoculated with PBS solution, the other groups were inoculated with Lewis-LUC suspension of mouse-derived lung adenocarcinoma cells. The mechanical pain threshold of mouse plantar was detected by von Frey filament pain meter. The morphology of F-actin rings of osteoclast pseudopodia were observed under confocal microscope. The mRNA and protein expression levels of  $\alpha\text{v}\beta 3$ , proline-rich tyrosine kinase 2 (PyK2), Tyrosine kinase Src, Casitas B-cell lymphoma family protein (Cbl) in the tibia bone tissue of the left hindlimb of mice in each group were detected by real-time fluorescence quantitative PCR and immuno-

\* 基金项目: 国家自然科学基金 (81704042)

△ 通信作者 郭晓冬 gxd\_1996@hotmail.com; 周小翠 zhouxiaocui@163.com



histochemistry. **Results:** Compared with Sham operation group, mechanical pain threshold of mice in the Model group was decreased after modeling ( $P < 0.05$ ). On the 14th day after modeling, the mechanical pain threshold of each intervention group was increased as against the Model group ( $P < 0.05$ ). On the 21st day after modeling, the mechanical pain threshold in the GTL + ZA group was significantly higher than that in the GTL group and ZA group ( $P < 0.05$ ). In contrast with Sham group, Model group had a complete F-actin ring structure,  $\alpha\text{v}\beta 3$ , PyK2, Scr, and Cbl mRNA expression and protein staining intensity were increased ( $P < 0.05$ ). The F-actin ring in GTL + ZA group was significantly damaged, and the mRNA expression and protein staining intensity of  $\alpha\text{v}\beta 3$ , PyK2, Scr, Cbl were significantly decreased as compared with those in each administration group. **Conclusion:** Gutongling prescription may play a role in bone protection by regulating the  $\alpha\text{v}\beta 3$ /PyK2/Scr/Cbl pathway in bone tissue and inhibiting the formation of F-actin ring, thereby alleviating the pain of bone metastases from lung cancer.

**Keywords** bone metastasis of lung cancer; cancer pain; Gutongling prescription; zoledronic acid;  $\alpha\text{v}\beta 3$  integrin pathway; F-actin ring

肺癌是最常见和最致命的恶性肿瘤之一，其中非小细胞肺癌所占比例近 85%，并且经常扩散到骨骼 (30%~40%)，远处骨转移已成为肺癌终末期病人死亡的主要原因<sup>[1]</sup>。肺癌骨转移病人长期遭受着骨癌痛折磨，生活质量和生存期显著降低<sup>[2]</sup>。目前针对肺癌骨转移治疗方案，最新《肺癌骨转移诊疗专家共识》推荐<sup>[3]</sup>首选骨改良药物第三代双磷酸药物唑来膦酸为基础用药，通过抑制破骨细胞的活性，诱导其凋亡，有效抑制破骨细胞的骨吸收等机制治疗骨转移、控制疼痛<sup>[4]</sup>。但长期使用唑来膦酸易产生发热等流感样症状、疲劳、腹泻、便秘等不良反应，使癌痛治疗被迫终止，影响镇痛效果。骨转移癌痛是目前肿瘤治疗领域的一个难点问题，因此寻求更加有效的镇痛药物具有重要意义。

恶性肿瘤发生骨转移疼痛主要机制为“肿瘤细胞-破骨细胞-肿瘤微环境”变化诱发癌痛：肿瘤细胞在骨骼着床，引起破骨细胞大量增殖，骨吸收活性增强，导致骨质破坏，同时引起骨髓微环境呈酸性， $\text{H}^+$  激活初级感觉神经元上的酸敏感性离子通道，从而引起痛觉过敏<sup>[5,6]</sup>。近年来的研究显示，在破骨细胞表面呈现高表达  $\alpha\text{v}\beta 3$  整合素，可以介导由肌动蛋白构成的微丝结构通过聚合作用形成伪足小体，紧密附着于骨表面，并在附着区形成封闭腔，破骨细胞在该腔内释放氢离子和各种酶类进行骨质溶解<sup>[7]</sup>。破骨细胞的黏附和伪足小体形成是破骨细胞进行骨溶解的前提和关键。在此过程中， $\alpha\text{v}\beta 3$  整合素的连接和信号转导作用以及足突小体的形成起着关键性的作用。而且研究表明，使用  $\alpha\text{v}\beta 3$  整合素抑制剂可以抑制破骨细胞的活跃<sup>[7]</sup>。

骨痛灵方以中医补肾强骨为理论指导，以补肾养精，破瘀通络为治疗原则，是我科根据上海市名

中医肿瘤专家徐振晔教授治疗肺癌骨转移疼痛的经验制订的协定方。在我们前期的临床对照研究中发现，骨痛灵联合唑来膦酸治疗恶性肿瘤骨转移疼痛的疗效确切<sup>[8,9]</sup>。此外，课题组还发现骨痛灵方可通过抑制 RANKL/RANK/OPG 通路对破骨细胞生成的干预作用，从而发挥镇痛疗效<sup>[10]</sup>。破骨细胞骨吸收直接反映了骨溶解的状态，骨溶解所带来的炎症反应和神经损伤，是造成骨转移疼痛的关键。目前骨痛灵方对破骨细胞骨吸收机制尚不清楚。本研究为进一步分析骨痛灵治疗肺癌骨转移疼痛的具体机制，拟在前期研究基础上，采用 Lewis 肺癌细胞建立 C57BL/6 小鼠肺癌骨转移癌痛模型，用骨痛灵方进行治疗，以破骨细胞的骨吸收关键分子  $\alpha\text{v}\beta 3$  整合素作为切入点，为其更广泛的临床应用提供理论依据。

## 方 法

### 1. 动物及细胞株

C57BL/6 雄性小鼠，周龄 4~6 周，50 只，重量 (20±2) g，Specific pathogen-free (SPF) 级，购自上海灵畅生物科技有限公司，实验动物生产许可证号：SCXK (沪) 2018-0003。饲养于上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院动物房，实验动物使用许可证号：SYXK (沪) 2018-0040。饲养条件：SPF 级屏障环境中，每日 10 h 人工照明，室内温度为 25℃，湿度为 70%。本研究经上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院实验动物伦理委员会的批准 (YYLAC-2019-002)。

荧光素酶标记小鼠肺癌 Lewis 细胞系 (2LL-LUC)，批号为 GF401，购自上海歌凡生物科技有限公司。

细胞培养方法：2LL-LUC 细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养，并于 37℃，5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养传代。

## 2. 药物制备

骨痛灵方由淫羊藿 (8030721097) 15 g，骨碎补 (8010861097) 15 g，煅自然铜 (8090321157) 9 g，炙蜈蚣 (8080981017) 2 g，制川乌 (8010671037) 9 g，制草乌 (8010681037) 9 g 组成，由上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院中药房提供，按照国中医药发〔2009〕3 号《医疗机构中药煎药室管理规范》要求煎煮中药，保证中药煎药质量。称取 3 剂中药处方量加入 10 倍冷水浸泡 30 min，武火煮开后 5 min，改文火煎 45 min，冷却，纱布过滤；将药渣再次加入 5 倍水量，重复第 1 次煎煮方法；取 2 次滤液混匀后置于旋转蒸发仪浓缩至 148 ml，配成含生药 1.2 g/ml 的中药液，4℃ 备用。注射用唑来膦酸钠（规格 4 mg，H20041953）溶于 0.9% NaCl 溶液中，配置浓度为 0.01 g/L，现配现用。

## 3. 主要试剂及仪器

αvβ3 抗体 (MAB1976, 1:1000, 美国 Sigma-Aldrich 公司)；PyK2 抗体 (sc-1514, 1:600, 美国 Santa Cruz Biotechnology 公司)；Scr 抗体 (ab230914, 1:100), Cbl 抗体 (ab32446, 1:200, 美国 Abcam 公司)；TRIzol RNA 分离试剂 (批号 T9424, 美国 Sigma-Aldrich 公司)；反转录试剂盒 (R232-01, 南京诺唯赞生物科技有限公司)；RT-PCR 试剂盒 (11203ES03, 上海翊圣生物科技有限公司)；Actin-Tracker Green-488 试剂盒 (C2201S), DAPI 染色液 (C1006), 上海碧云天生物技术有限公司；增强型 DAB 显色试剂盒 (DA1016), Harris 苏木素染色液 (G1150), 北京索莱宝科技有限公司；D-荧光素钾盐 (40902ES03, 上海翊圣生物科技有限公司)。

CellXpert C170i 细胞培养箱，德国 Eppendorf 公司；TCS SP8 共聚焦显微镜，德国 Leica 公司；QuantStudio 3 实时荧光定量 PCR 仪，美国 Thermo Fisher 公司；von Frey 纤维丝测痛仪，美国 Stoelting 公司；IVISLuminaL T Series III 小动物活体成像仪，美国 PerkinElmer 公司；Pannoramic 250 全景切片扫描仪，CaseViewer 2.4 扫描浏览软件，匈牙利 3DHI-ESTECH 公司。

## 4. 分组及造模

50 只小鼠采用随机数字表法随机分为假手术组 (Sham 组)、模型组 (Model 组)、骨痛灵组 (GTL 组)、唑来膦酸组 (ZA 组)、骨痛灵 + 唑来膦酸组 (GTL + ZA 组)，每组 10 只。除 Sham 组给予接种 PBS 溶

液外，其余各组均予鼠源肺腺癌细胞 2LL-LUC 悬液造模。参照肺癌骨转移模型建立方法造模<sup>[11]</sup>：鼠源肺腺癌细胞 2LL-LUC 进行大量扩增培养，收集细胞悬液，37℃，1000 rpm 离心 5 min（离心半径为 12.8 cm），重悬，PBS 多次清洗，最后稀释至细胞密度为  $2 \times 10^8$  个/ml；小鼠吸入异氟烷麻醉后，用 1 ml 注射器针头经小鼠左后肢胫骨平台刺入胫骨髓腔，然后换用吸有肿瘤细胞的 25 μl 微量进样器（注入前，微量进样器内依次吸入 1 μl 明胶海绵水溶液，1 μl 空气和 10 μl 肿瘤细胞悬液），注射完稍留针后缓慢拔出。Sham 组给予等量的 PBS 溶液代替造模。1 周后小鼠腹腔注射 D 荧光素钾盐溶液 (150 mg/kg)，15 min 后行小动物荧光活体成像，可观察到肺癌骨转移模型鼠内有荧光显像（见图 1），即可判断为造模成功。

## 5. 给药方法

造模后第 2 日各组开始给药干预，根据实验动物用药剂量换算<sup>[12]</sup>，小鼠用药剂量为成人用药剂量的 12.33 倍，即为临床等效剂量。GTL 组给予骨痛灵 12 g/(kg·d) 灌胃，每日 1 次，共 21 天；ZA 组给予唑来膦酸 50 μg/(kg·d) 腹腔注射，每 3 日 1 次，共 7 次；GTL + ZA 组给予骨痛灵灌胃和唑来膦酸腹腔注射，剂量和次数同上；Model 组和 Sham 组给予同体积的生理盐水灌胃或腹腔注射。

## 6. 观察指标与方法

给药结束后第 2 天，使用颈椎脱臼法将小鼠处死，立即分组迅速取出左后肢胫骨骨组织标本，每

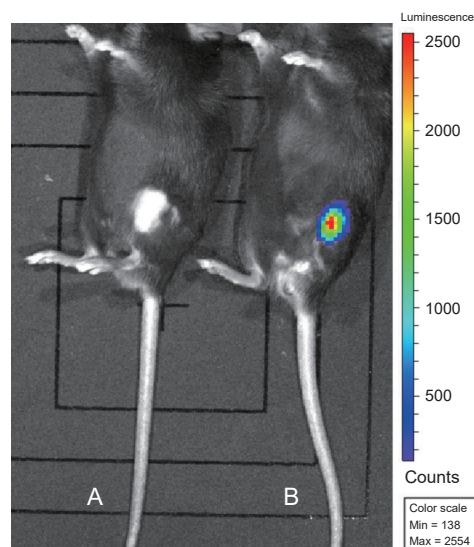


图 1 小鼠荧光活体成像图  
(A) Sham 组；(B) Model 组

Fig. 1 Fluorescence in vivo imaging of mice  
(A) The Sham operation group; (B) The Model group.

组随机选取 6 只骨组织标本放入 -80℃ 冰箱中保存备用；其余 4 只骨组织标本，清洗后放入 4% 多聚甲醛溶液固定。

(1) von Frey 纤维丝测痛仪评价小鼠足底机械痛阈值

将小鼠置于具有铁丝网格的特殊架上，取 5 cm×8 cm×11 cm 的无底透明玻璃盒将小鼠罩住，在室温安静的环境下适应 30 min 后，采用不同规格的 von Frey 细丝 (0.16 g, 0.4 g, 0.6 g, 1 g, 1.4 g, 2 g) 按照从轻到重的顺序用相同力度垂直方向刺激小鼠左后肢脚掌中部皮肤，每根需刺激 5 次，刺激停留时间为 1~2 s，同一细丝 2 次不同刺激间隔 5 s，不同纤维丝刺激间隔 5 min，观察小鼠缩足反应。小鼠机械痛阈值计分规则：若 5 次刺激有 3 次以上 (含 3 次) 小鼠有缩足动作，该规格的 von Frey 细丝为疼痛阈值，若刺激至最大规格 2 g 仍无缩足反应，则 2 g 记为小鼠机械痛阈值。分别于造模前 1 天，造模后第 7 天、14 天、21 天进行检测。

(2) 激光共聚焦观察破骨细胞伪足小体 F-actin 环形态

取石蜡固定的各组小鼠左后肢胫骨骨组织连续切片，常规二甲苯脱蜡，微波抗原修复后用 10% 山羊血清室温封闭孵育 2 h；弃去血清，PBS 清洗 3 次后加入 Actin-Tracker Green-488 (5 μg/ml) 染色 1 h；洗涤 2 次后，加入 DAPI (5 mg/ml) 进行细胞核染色，室温避光孵育 10 min；洗涤后用 50% 甘油封片，打开共聚焦显微镜，设置波长参数，观察荧光图像及时拍照并将图像存储后进行分析。

(3) 实时荧光定量 PCR 实验

运用 NCBI 网站及在 Primer Bank 软件获取目的基因引物，由上海生物工程有限公司合成。本研究中用于检测目的基因 mRNA 的实时荧光定量 PCR 引物序列见表 1 所示。采用 Trizol 法提取各组小鼠

左后肢胫骨骨组织总 RNA，并及时反转录成稳定的 cDNA；设置 qPCR 反应条件：预变性—95℃ 5 min；变性—95℃ 10 s；退火延伸—60℃ 30 s；扩增—40 个循环；将 GAPDH 设置为对照内参基因，数据分析使用 2-ΔΔCt 法，统计分析目的基因相对表达水平。

(4) 免疫组化法检测骨组织中 αvβ3、PyK2、Scr、Cbl 蛋白表达

将各组小鼠左后肢胫骨骨组织石蜡切片脱蜡至水后置于微波炉内进行抗原修复，待切片在室温下冷却后，PBS 清洗 3 次 (每次 5 min) 后，加入阻断内源性过氧化物酶溶液常温避光孵育 25 min，PBS 清洗 3 次 (每次 5 min)；向切片加入 3% BSA PBS 溶液，室温封闭 30 min；弃封闭液后，加入适当比例的一抗，4℃ 摇床孵育过夜。次日，回收一抗后，加入相应二抗，室温摇床孵育 50 min；弃二抗后加入 DAB 显色液，显微镜下控制显色时间，自来水终止显色；用 Harris 苏木素复染细胞核 3 min 左右，自来水洗，氨水返蓝，脱水封片，倒置显微镜下观察，Pannoramic 250 全景切片扫描仪图像采集，并用 V1.8.0.112 版 Image J 软件半定量分析蛋白 (棕色点) 累计光密度 (integrated optical density, IOD)。

7. 统计学分析

采用 Graphpad Prism 7 软件分析数据，符合正态分布的计量资料采用均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm SD$ ) 表示，两组间比较采用两独立样本 *t* 检验；多组间比较采用双因素方差分析，组间两两比较采用 Dunnett *t* 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1. 各组小鼠机械痛阈值比较

四组造模小鼠于第 10 天左右出现自发痛行为，表现为左后肢跛行、舔足、自发抬足时间延长，出

表 1 qPCR 引物序列  
Table 1 qPCR primer sequences

| 基因 Gene | 正向序列 (5' → 3')<br>Forward sequence (5' → 3') | 反向序列 (5' → 3')<br>Reverse sequence (5' → 3') | 产物长度<br>Product length |
|---------|----------------------------------------------|----------------------------------------------|------------------------|
| GAPDH   | GGCAAATTCAACGGCACAGT                         | ACGACATACTCAGCACCGGC                         | 128 bp                 |
| αvβ3    | CGAGTGCCTCTGTGGTCAAT                         | AGAAGTCGTCACACTCGCAG                         | 83 bp                  |
| PyK2    | AGATTCCCACGAAACCC                            | CACGGCGAACATCCAGAC                           | 350 bp                 |
| Scr     | CATCCAAGCCTCAGACCCA                          | TGACACCACGGCATAACAGC                         | 251 bp                 |
| Cbl     | GGACCAAGTGTGGGAGTTATTACT                     | GGCAAGACTTCACTGTGAAGTCA                      | 81 bp                  |

αvβ3: 整合素 αvβ3; PyK2: 富含脯氨酸的酪氨酸激酶 2; Scr: 酪氨酸激酶 Src; Cbl: Casitas B 细胞淋巴瘤家族蛋白  
αvβ3: integrin αvβ3; PyK2: proline-rich tyrosine kinase 2; Scr: tyrosine kinase Src; Cbl: Casitas B cell lymphoma family protein.

现轻微触诱发痛。各组小鼠左后肢足底的机械痛阈值比较发现（见图2），Sham组小鼠机械痛阈值走势平稳，波动不明显；其余4组从第7日开始均呈现下降趋势，Model组波动尤为明显。经统计分析，

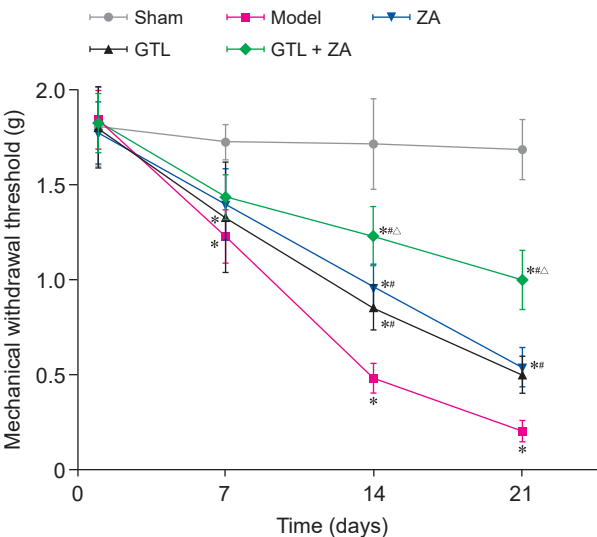


图2 各组小鼠机械痛阈值变化曲线图 ( $\bar{x} \pm SD$ )  
\* $P < 0.05$ , 与 Sham 组相比; # $P < 0.05$ , 与 Model 组相比;  $\Delta P < 0.05$ , 与 ZA 组相比  
Fig. 2 Changes in mechanical pain threshold of mice in each group ( $\bar{x} \pm SD$ )  
\* $P < 0.05$ , compared with group Sham; # $P < 0.05$ , compared with group Model;  $\Delta P < 0.05$ , compared with group ZA.

与 Sham 组比较，Model 组小鼠造模后机械痛阈值下降 ( $P < 0.05$ )。造模后第 14、21 天：与 Model 组比较，各给药干预组机械痛阈值升高 ( $P < 0.05$ )；ZA 组与 GTL 组机械痛阈值相当 ( $P > 0.05$ )。造模后第 21 天：GTL + ZA 组机械痛阈值较 GTL 组、ZA 组明显升高 ( $P < 0.05$ )。

2. 各组小鼠胫骨组织中破骨细胞伪足小体 F-actin 环比较

各组小鼠左后胫骨组织经罗丹明标记的绿色荧光鬼笔环肽染色 F-actin 与蓝色荧光染料 DAPI 染色液染细胞核共同孵育后，共聚焦荧光显微镜下观察发现（见图3），胞浆内可见大量绿色荧光肌动蛋白 F-actin 与细胞纵轴平行排列，呈细丝状或网状表达。与 Sham 组比较，Model 组中 F-actin 环分布于细胞周边，微丝分布较有序，破骨细胞伪足 F-actin 环完整，周围有大量应力纤维形成；与 Model 组比较，各给药组可见胞内 F-actin 环数量减少，环形态不完整，断裂、周围伴有少量应力纤维形成；与 ZA 组比较，GTL 组 F-actin 环破坏程度类似，GTL + ZA 组 F-actin 环破坏程度较明显。与 GTL 组比较，GTL + ZA 组 F-actin 环明显破坏。

3. 各组小鼠胫骨组织中  $\alpha v\beta 3$ 、PyK2、Scr、Cbl mRNA 表达比较

各组小鼠左后胫骨组织 RT-PCR 结果经统计发现（见图4），与 Sham 组比较，Model 组  $\alpha v\beta 3$ 、

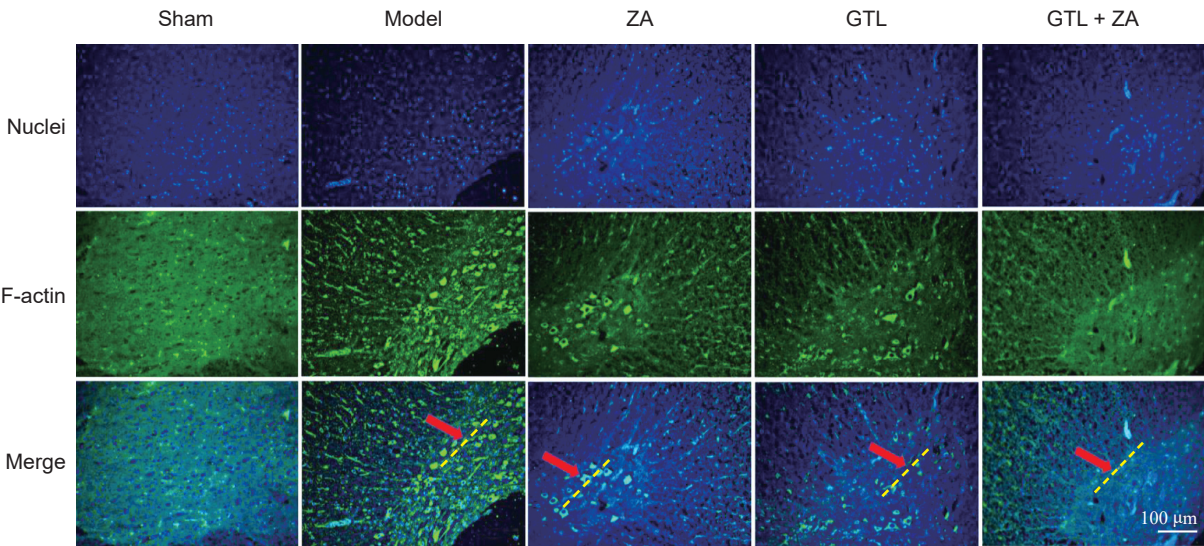


图3 各组小鼠胫骨组织中破骨细胞伪足小体 F-actin 环（标尺 = 100  $\mu m$ ）  
Nuclei 为破骨细胞细胞核；F-actin 为 F-actin 骨架蛋白；Merge 为两者融合后图像；红色箭头所指为 F-actin 环；黄色虚线为破骨细胞纵轴  
Fig. 3 F-actin ring of osteoclast pseudopodosomes in the tibial tissue of mice in each group (Scale bar = 100  $\mu m$ )  
Nuclei refer to the nucleus of osteoclast; The F-actin is a F-actin skeletal protein; Merge refers to the merged image of the Nuclei and F-actin rings; The red arrows refer to the F-actin ring; The yellow dash lines are the longitudinal axis of the osteoclast.

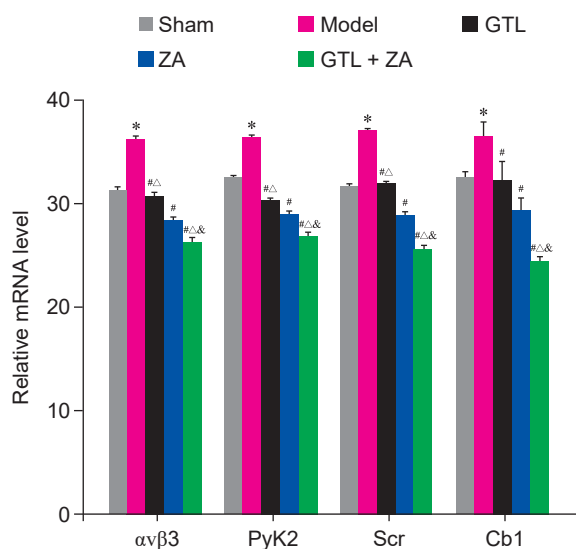


图4 各组小鼠胫骨组织中  $\alpha v \beta 3$ 、PyK2、Scr、Cb1 mRNA 表达比较 ( $\bar{x} \pm SD$ )

\* $P < 0.05$ , 与 Sham 组相比; # $P < 0.05$ , 与 Model 组相比;  $\Delta P < 0.05$ , 与 ZA 组相比; & $P < 0.05$ , 与 GTL 组相比

Fig. 4 Comparison of  $\alpha v \beta 3$ , PyK2, Scr, and Cb1 mRNA expressions in the tibial tissue of mice in each group ( $\bar{x} \pm SD$ )

\* $P < 0.05$ , compared with group Sham; # $P < 0.05$ , compared with group Model;  $\Delta P < 0.05$ , compared with group ZA; & $P < 0.05$ , compared with group GTL.

PyK2、Scr、Cbl mRNA 表达上调 ( $P < 0.05$ ); 与 Model 组比较, 各给药组  $\alpha v \beta 3$ 、PyK2、Scr、Cbl mRNA 表达下调 ( $P < 0.05$ ); 与 ZA 组比较, GTL 组  $\alpha v \beta 3$ 、PyK2、Scr mRNA 表达升高, GTL + ZA 组  $\alpha v \beta 3$ 、PyK2、Scr、Cbl mRNA 表达下降 ( $P < 0.05$ ); 与 GTL 组比较, GTL + ZA 组  $\alpha v \beta 3$ 、PyK2、Scr、Cbl mRNA 表达下降明显 ( $P < 0.05$ )。

#### 4. 各组小鼠胫骨组织中 $\alpha v \beta 3$ 、PyK2、Scr、Cbl 蛋白表达比较

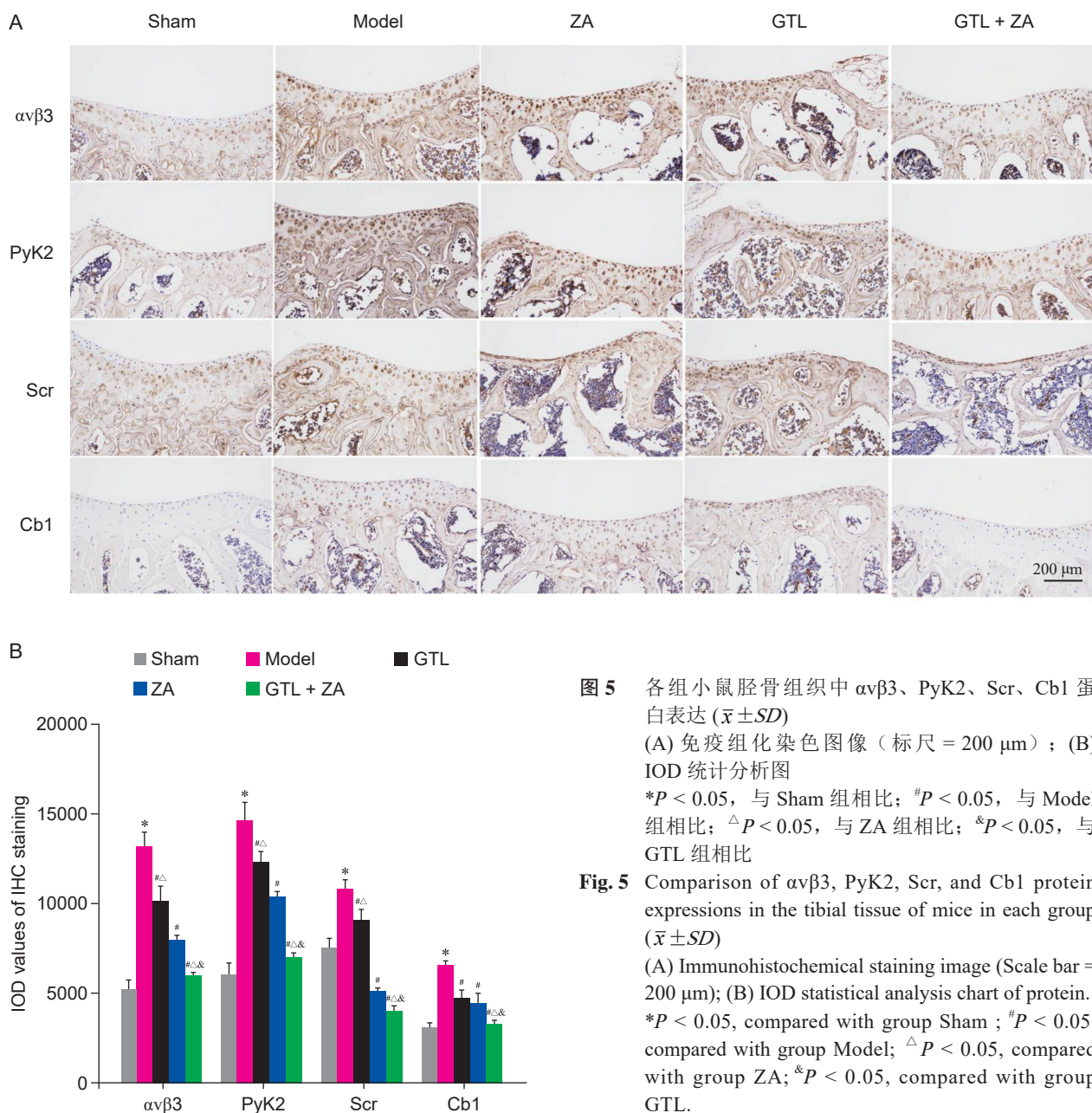
免疫组化分析各组小鼠左后胫骨组织中  $\alpha v \beta 3$  信号通路相关蛋白,  $\alpha v \beta 3$ 、PyK2、Scr、Cbl 蛋白主要定位在破骨细胞膜上, 胞质中呈阳性表达 (见图 5A)。进一步对蛋白染色面积进行半定量统计分析 (见图 5B), 与 Sham 组比较, Model 组  $\alpha v \beta 3$ 、PyK2、Scr、Cbl 蛋白染色强度明显升高 ( $P < 0.05$ ); 与 Model 组比较, 各给药组  $\alpha v \beta 3$ 、PyK2、Scr、Cbl 蛋白染色强度减弱 ( $P < 0.05$ ); 与 ZA 组比较, GTL 组  $\alpha v \beta 3$ 、PyK2、Scr 蛋白染色强度增强, GTL + ZA 组  $\alpha v \beta 3$ 、PyK2、Scr、Cbl 染色面积降低 ( $P < 0.05$ ); 与 GTL 组比较, GTL + ZA 组  $\alpha v \beta 3$ 、PyK2、Scr、染色面积明显降低 ( $P < 0.05$ )。

## 讨论

中医药在治疗骨癌痛方面发挥着重要作用, 具有安全性高、毒副作用小、无成瘾性等独特的优势。上海市名中医徐振晔教授根据临床多年抗肿瘤治疗经验, 认为肺癌骨转移疼痛属于中医“骨痹”范畴, 该病以肾虚为本, 寒凝、瘀血、痰湿为标, 脉络阻滞<sup>[13]</sup>, 则“不通则痛”和“不荣则痛”。以补肾养精, 破瘀通络为治则, 创立经验复方骨痛灵方。本研究结果显示, 骨痛灵方、唑来膦酸及联合用药均能提高肺癌骨转移模型小鼠机械痛阈值, 破坏伪足小体结构, 且联合用药优于单药干预效果, 骨痛灵方与唑来膦酸结果类似, 提示各给药组均能破坏破骨细胞结构发挥镇痛作用, 两药联合具有协同作用。与前期的临床研究结果一致<sup>[14]</sup>, 骨痛灵联合唑来膦酸治疗恶性肿瘤骨转移疼痛的镇痛效果显著。骨痛灵方主要成分有蜈蚣、骨碎补、川草乌、淫羊藿等组成。现代药理学研究证实, 蜈蚣水提物可增加小鼠微血管的开放数目及增大其口径, 具有显著的镇痛抗炎作用<sup>[15]</sup>; 川乌能抑制巴豆油所致的大鼠炎性肉芽肿增生, 明显提高小鼠热板痛阈值<sup>[16]</sup>。因此, 骨痛灵方抗骨癌痛作用可能与其方中的蜈蚣及川草乌有关。

骨吸收直接反映了骨溶解的状态, 骨溶解所带来的炎症反应和神经损伤, 是造成骨转移疼痛的关键。成熟的破骨细胞行使骨吸收功能时, 必须形成一个特殊的肌动蛋白结构——伪足小体。伪足小体紧密附着于骨表面, 并在附着区形成封闭腔, 破骨细胞在该腔释放氢离子和各种酶类进行骨质溶解<sup>[17]</sup>。本研究结果发现, 骨痛灵组、唑来膦酸组以及联合用药组可见胞内 F-actin 环形态不完整, 断裂, 且联合用药组 F-actin 环破坏程度较明显; 骨痛灵组与唑来膦酸组 F-actin 环形态相似。提示骨痛灵、唑来膦酸及联合用药均能抑制破骨细胞伪足小体结构形成, 进而影响破骨细胞骨吸收功能, 且联合用药效果更好。既往基础研究发现骨碎补总黄酮对成骨细胞分化和增殖均有促进作用, 具有抑制破骨母细胞向多核破骨细胞转化的作用<sup>[18]</sup>, 本研究结果推测骨痛灵方抑制破骨细胞骨吸收功能可能与其方中的骨碎补相关。

破骨细胞伪足小体形成过程中  $\alpha v \beta 3$  整合素尤为重要, 它可以介导由肌动蛋白构成的微丝结构通过聚合作用形成该结构。 $\alpha v \beta 3$  整合素在破骨细胞呈高表达, 被认为是破骨细胞骨吸收过程中的核心分子, 阻断  $\alpha v \beta 3$  可影响伪足小体的形成、破骨细胞



**图 5** 各组小鼠胫骨组织中  $\alpha v\beta 3$ 、PyK2、Scr、Cb1 蛋白表达 ( $\bar{x} \pm SD$ )

(A) 免疫组化染色图像 (标尺 = 200  $\mu m$ ) ; (B) IOD 统计分析图

\* $P < 0.05$ , 与 Sham 组相比; # $P < 0.05$ , 与 Model 组相比;  $\Delta P < 0.05$ , 与 ZA 组相比; & $P < 0.05$ , 与 GTL 组相比

**Fig. 5** Comparison of  $\alpha v\beta 3$ , PyK2, Scr, and Cb1 protein expressions in the tibial tissue of mice in each group ( $\bar{x} \pm SD$ )

(A) Immunohistochemical staining image (Scale bar = 200  $\mu m$ ); (B) IOD statistical analysis chart of protein.

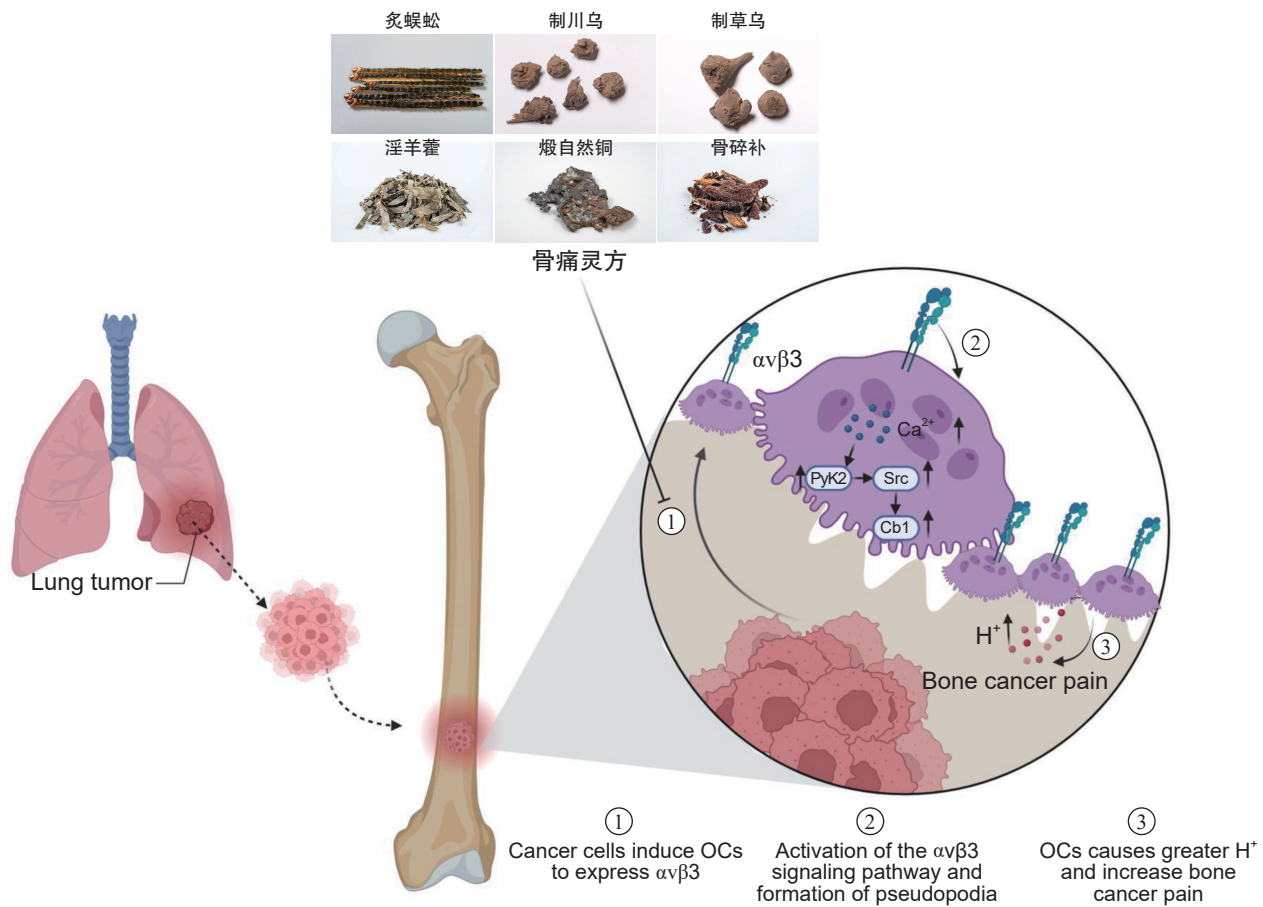
\* $P < 0.05$ , compared with group Sham; # $P < 0.05$ , compared with group Model;  $\Delta P < 0.05$ , compared with group ZA; & $P < 0.05$ , compared with group GTL.

的运动和骨吸收<sup>[19]</sup>。研究表明<sup>[20,21]</sup>, 整合素  $\alpha v\beta 3$  的胞内信号可以通过诱导细胞内  $Ca^{2+}$  的升高, 而激活作为钙调节蛋白的 Pyk2, Pyk2 的活化可以诱导 c-Src 的募集和 Cbl 的磷酸化, 即在  $\alpha v\beta 3$  的作用下形成 PyK2/Src/Cbl 分子复合物, 启动骨架蛋白的改变, 最终形成伪足小体。与上述研究结果一致, 本研究肺癌骨转移小鼠造模成功后, 胫骨组织中  $\alpha v\beta 3$ 、PyK2、Src 及 Cbl mRNA 表达及蛋白染色强度升高, 伪足小体形态完整且数量多。各给药组干预后,  $\alpha v\beta 3$ 、PyK2、Src 及 Cbl mRNA 表达及蛋白染色强度均降低, 且联合用药后降低明显, 提示骨痛灵、唑来膦酸及联合用药均能抑制  $\alpha v\beta 3$ /PyK2/

Src/Cbl 通路。

综上所述, 骨痛灵方及其联合唑来膦酸可提高骨转移癌痛机械痛阈值, 破坏骨组织中 F-actin 环结构, 且两药联用具有增效作用, 其机制可能通过调控骨组织中  $\alpha v\beta 3$ /PyK2/Src/Cbl 通路抑制破骨细胞伪足小体形成起到骨保护作用, 从而治疗肺癌骨转移疼痛 (见图 6)。

本研究尚存在一定局限性, 未用  $\alpha v\beta 3$  抑制剂或建立稳敲  $\alpha v\beta 3$  肺癌骨转移动物模型, 后续将进一步完善相关实验: 明确骨痛灵方抗肺癌骨转移疼痛的具体机制, 借助现代分子生物学手段成功建立  $\alpha v\beta 3$  靶标肺癌细胞模型, 验证骨痛灵方对  $\alpha v\beta 3$  分



**图 6** 骨痛灵方通过抑制  $\alpha v \beta 3$  通路介导破骨细胞伪足小体形成治疗肺癌骨转移疼痛的示意图  
肺癌骨转移疼痛的发生有 3 个过程：①肺癌肿瘤细胞在骨骼肌着床后引起破骨细胞高表达整合素  $\alpha v \beta 3$ ；②整合素  $\alpha v \beta 3$  胞内信号诱导细胞内  $Ca^{2+}$  的升高，激活钙调节蛋白 PyK2，诱导 c-Src 的募集和 Cb1 的磷酸化，形成  $\alpha v \beta 3$ /PyK2/Src/Cb1 分子复合物，启动骨架蛋白的改变，最终形成足突小体；③破骨细胞释放更多氢离子而产生痛觉过敏。骨痛灵方通过降低破骨细胞  $\alpha v \beta 3$  表达，抑制  $\alpha v \beta 3$ /PyK2/Src/Cb1 通路，破坏伪足小体形成发挥镇痛作用。

**Fig. 6** Schematic diagram of Gutongling Decoction alleviates pain induced by bone metastasis of lung cancer through inhibiting  $\alpha v \beta 3$  signaling pathway-mediated formation of osteoclast pseudopods

There are three processes for the occurrence of pain in bone metastasis of lung cancer: ① Lung cancer tumor cells cause osteoclasts to express high integrin  $\alpha v \beta 3$  after skeletal muscle implantation; ② The intracellular signal of integrin  $\alpha v \beta 3$  induces the increase of intracellular  $Ca^{2+}$ , activates the calcium regulatory protein PyK2, induces the recruitment of c-Src and phosphorylation of Cb1, forms a molecular complex of  $\alpha v \beta 3$ /PyK2/Src/Cb1, and initiates the changes of skeletal proteins, finally forming podocytes; ③ Osteoclasts release more hydrogen ions to produce hyperalgesia. Gutongling Decoction exerts analgesic effect by reducing the expression of  $\alpha v \beta 3$  in osteoclasts, inhibiting the  $\alpha v \beta 3$ /PyK2/Src/Cb1 pathway, and destroying the formation of pseudopods.

子依赖功能，阐明  $\alpha v \beta 3$ /PyK2/Src/Cb1 这条信号通路调控伪足小体形成影响骨吸收癌痛的具体作用机制。

利益冲突声明：作者声明本文无利益冲突。

### 参 考 文 献

- [1] Altorki NK, Markowitz GJ, Gao D, *et al.* The lung microenvironment: an important regulator of tumour growth and metastasis[J]. *Nat Rev Cancer*, 2019, 19(1):9-31.
- [2] 李小梅, 袁文茜, 曹伯旭, 等. 慢性癌症相关性疼痛[J]. *中国疼痛医学杂志*, 2021, 27(3):161-165.
- [3] 董智, 赵军, 柳晨, 等. 肺癌骨转移诊疗专家共识(2019 版)[J]. *中国肺癌杂志*, 2019, 22(4):187-207.
- [4] Isla D, Afonso R, Bosch-Barrera J, *et al.* Zoledronic acid in lung cancer with bone metastases: a review[J]. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2013, 13(4):421-426.
- [5] 杨梦霞, 毛昀, 朱世杰, 等. 骨转移癌痛发生机制的研究进展[J]. *癌变·畸变·突变*, 2022, 34(4):324-326.
- [6] 王稳, 樊碧发. 癌痛发生机制的研究进展[J]. *中国疼痛医学杂志*, 2021, 27(8):616-618.



- [7] Nemeth JA, Cher ML, Zhou Z, *et al.* Inhibition of alpha(v)beta3 integrin reduces angiogenesis, bone turnover, and tumor cell proliferation in experimental prostate cancer bone metastases[J]. Clin Exp Metastasis, 2003, 20(5):413-420.
- [8] 罗琴琴, 徐振晔, 薛莎. 骨痛灵方联合唑来膦酸治疗支气管肺癌骨转移伴中重度疼痛 37 例临床观察 [J]. 中医杂志, 2018, 59(21):1853-1857.
- [9] 王立芳, 吕英, 鲁叶云, 等. 骨痛灵方对肺癌骨转移疼痛影响的临床观察 [J]. 上海中医药杂志, 2016, 50(5):35-38.
- [10] 罗琴琴, 徐振晔, 邓海滨. 骨痛灵方对肺癌骨转移疼痛模型小鼠 RANKL/OPG 的影响 [J]. 世界中西医结合杂志, 2020, 15(6):1067-1071.
- [11] 孟越, 李春雨, 郝松, 等. 肺癌骨转移小鼠模型的建立 [J]. 南方医科大学学报, 2014, 34(5):664-668.
- [12] 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9(9):1069-1072.
- [13] 郑展. 徐振晔治疗肺癌骨转移经验 [J]. 中医杂志, 2007, 48(1):24-25.
- [14] 鲁叶云, 徐振晔, 王中奇, 等. 骨痛灵方联合西药治疗恶性肿瘤骨转移疼痛 34 例临床观察 [J]. 中医杂志, 2015, 56(5):405-408.
- [15] 毛小平, 陈子珺, 毛晓健, 等. 蜈蚣的部分药理研究 [J]. 云南中医学院学报, 1999, 22(3):1-3.
- [16] 张宏, 彭成. 川乌煎煮时间、剂量与药效的相关性研究 [J]. 中药药理与临床, 2006, 22(5):30-32.
- [17] 云帆, 王瑞, 赵建宁. 破骨细胞的骨吸收机制 [J]. 中国骨伤, 2014, 27(6):529-532.
- [18] 刘金文, 黄永明, 许少健, 等. 中药骨碎补对大鼠骨髓破骨细胞体外培养的影响 [J]. 中医研究, 2005, 18(7):5-7.
- [19] Chellaiah M, Kizer N, Silva M, *et al.* Gelsolin deficiency blocks podosome assembly and produces increased bone mass and strength[J]. J Cell Biol, 2000, 148(4):665-678.
- [20] Faccio R, Novack DV, Zallone A, *et al.* Dynamic changes in the osteoclast cytoskeleton in response to growth factors and cell attachment are controlled by beta3 integrin[J]. J Cell Biol, 2003, 162(3):499-509.
- [21] Bonnette PC, Robinson BS, Silva JC, *et al.* Phosphoproteomic characterization of PYK2 signaling pathways involved in osteogenesis[J]. J Proteomics, 2010, 73(7):1306-1320.

## • 消 息 •

### 2023 年《中国疼痛医学杂志》征稿与征订

《中国疼痛医学杂志》是由中华人民共和国教育部主管，北京大学和中华医学会疼痛学分会共同主办的专业性学术期刊。报道有关疼痛基础研究和临床诊疗的综合性学术刊物。现已被中文核心期刊（北京大学图书馆），中国科技论文统计源期刊、中国科技核心期刊、中国科学引文数据库（CSCD）来源期刊、世界期刊影响力指数（WJCI）报告（2022 科技版）等国内权威的文献检索系统收录。《中国疼痛医学杂志》诚邀您投稿、订阅。

**投稿：**来稿可在杂志官网在线投稿 <http://casp.ijournals.cn>，请署真实姓名、工作单位、职称，附单位介绍信（信中须注明未“一稿两投”、署名无争议、对文章内容的真实性负责、无泄密内容）。投稿时请注明通信作者、提供伦理审查批号及证明、基金资助信息，以及详细的通信地址、邮编、联系电话、E-mail 等。衷心希望《中国疼痛医学杂志》成为您了解疼痛医学发展和发表科研成果的平台之一。

**订购：**邮发代号：82-832，本刊为月刊，大 16 开本，80 页，每册定价 32.00 元，全年 12 期，共 384.00 元。欢迎在当地邮局订阅或直接联系编辑部订阅。

编辑部地址：北京市海淀区学院路 38 号，北京大学医学部《中国疼痛医学杂志》编辑部

杂志官网：<http://casp.ijournals.cn>

联系电话：010-82801712；010-82801705

电子邮箱：[pain1712@126.com](mailto:pain1712@126.com)

联系人：赵磊

