

研究论文

P2X7受体敲除对小鼠骨癌痛的影响

赵欣, 刘慧珠, 张玉秋*

复旦大学脑科学研究院, 上海 200032

摘要: 癌痛是临床晚期恶性肿瘤患者常见的临床表现之一。其中, 以肺癌、乳腺癌和前列腺癌等骨转移引起疼痛尤为严重。P2X7受体是ATP门控离子通道型嘌呤能受体的一个亚型, 在脊髓背角主要表达在胶质细胞。P2X7受体激活可以促进胶质细胞释放多种炎症介质, 介导脊髓中枢敏化。该受体在炎症痛及神经病理性疼痛中的作用已多有报道, 但在癌痛中的作用尚有争议。本研究采用C57BL/6J小鼠股骨骨髓腔内接种Lewis肺癌细胞所诱导的骨癌痛小鼠模型, 分析对比了野生型小鼠和P2X7受体基因敲除($P2rx7^{-/-}$)小鼠骨癌痛的发生、发展。野生型C57BL/6J小鼠股骨骨髓腔内接种Lewis肺癌细胞后, 患侧后肢分别在第7和14天开始出现明显的触诱发痛和热痛过敏, 并呈进行性加重; CatWalk步态分析显示骨癌第21和28天, 小鼠患侧脚印面积明显减小, 站立时相持续时间缩短, 举步时相持续时间显著延长; 组织病理学结果显示受累骨髓腔有大量肿瘤细胞浸润, 骨髓质正常结构消失, 伴有髓质骨和皮质骨的破坏。与研究设计时的预期相反, $P2rx7^{-/-}$ 小鼠接种瘤细胞后, 患肢痛行为检测结果与野生型小鼠相似, 甚至在CatWalk步态分析检测值变化发生的时间上较野生小鼠有所提前。这与本研究组前期在大鼠骨癌痛模型观察到的阻断P2X7受体明显对抗骨癌痛的结果完全不同, 提示P2X7受体在大、小鼠骨癌痛中可能发挥不同的作用, 并再次提示疾病动物模型上的研究结果与人类疾病机理之间还存在巨大差异。

关键词: 骨癌痛; 小鼠; P2X7受体; 基因敲除; 小胶质细胞

中图分类号: Q42

Effect of P2X7 receptor knock-out on bone cancer pain in mice

ZHAO Xin, LIU Hui-Zhu, ZHANG Yu-Qiu*

Institutes of Brain Science, Fudan University, Shanghai 200032, China

Abstract: Cancer pain is one of the most common symptoms in patients with late stage cancer. Lung, breast and prostate carcinoma are the most common causes of pain from osseous metastasis. P2X7 receptor (P2X7R) is one of the subtypes of ATP-gated purinergic ion channel family, predominately distributed in microglia in the spinal cord. Activation of P2X7Rs in the spinal dorsal horn has been associated with release of proinflammatory cytokines from glial cells, causing increased neuronal excitability and exaggerated nociception. Mounting evidence implies a critical role of P2X7R in inflammatory and neuropathic pain. However, whether P2X7R is involved in cancer pain remains controversial. Here we established a bone cancer pain model by injecting the Lewis lung carcinoma cells into the femur bone marrow cavity of C57BL/6J wild-type mice (C57 WT mice) and P2X7R knockout mice ($P2rx7^{-/-}$ mice) to explore the role of P2X7R in bone cancer pain. Following intrafemur carcinoma inoculation, robust mechanical allodynia and thermal hyperalgesia in C57 WT mice were developed on day 7 and 14, respectively, and persisted for at least 28 days in the ipsilateral hind-paw of the affected limb. CatWalk gait analysis showed significant decreases in the print area and stand phase, and a significant increase in swing phase in the ipsilateral hindpaw on day 21 and 28 after carcinoma cells inoculation. Histopathological sections (hematoxylin and eosin stain) showed that the bone marrow of the affected femur was largely replaced by invading tumor cells, and the femur displayed medullary bone loss and bone destruction on day 28 after inoculation. Unexpectedly, no significant changes in bone cancer-induced hypersensitivity of pain behaviors were found in $P2rx7^{-/-}$ mice, and the changes of pain-related values in CatWalk gait analysis even occurred earlier in $P2rx7^{-/-}$ mice, as compared with C57 WT mice. Together with our previous study in rats

Received 2016-03-29 Accepted 2016-05-16

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81471130, 31271183, 81571064).

*Corresponding author. Tel: +86-21-54237635; Fax: +86-21-54237647; E-mail: yuqiuzhang@fudan.edu.cn

that blockade of P2X7R significantly alleviated bone cancer pain, it is implied that P2X7R may play different roles in bone cancer pain in different species (e.g. rat vs mouse). These results implicated a huge difference between the pathophysiology discovered in the experimental animal models and that of human disease.

Key words: bone cancer pain; mice; P2X7 receptor; gene knockout; microglia

癌痛即恶性肿瘤所引起的疼痛,是慢性痛中最严重也最难以控制的疼痛之一。许多常见的肿瘤如乳腺癌、肺癌、前列腺癌等容易发生骨转移,约有75%~95%的转移性骨癌患者伴有严重疼痛^[1],极大降低了患者的生活质量,也给临床治疗带来很多困扰。在目前常用的“三阶梯”癌痛管理治疗手段下,仍有45%的患者疼痛得不到有效控制^[2,3]。因此,揭示癌痛发生机理,寻求更有效的缓解癌痛方法成为迫切需要解决的问题。

随着多种模拟临床骨转移瘤动物模型的建立,对骨癌痛的机理研究成为可能^[4]。ATP作为重要的神经递质^[5]和胶质递质^[6],在脊髓伤害性信息传递中起关键性作用^[7,8]。嘌呤能离子通道型受体7(purinergic ligand-gated ion channel 7 receptor, P2X7受体)是ATP门控的离子通道受体家族成员,在脊髓优势地表达在小胶质细胞^[9,10]。本研究组以往的研究显示,神经损伤或吗啡镇痛耐受显著上调大鼠脊髓P2X7受体表达,活化脊髓小胶质细胞;阻断P2X7受体可抑制神经病理性痛和吗啡耐受行为,提示其参与神经病理性疼痛和吗啡镇痛耐受的发生^[10-12]。来自其它实验室的研究也一致性揭示,脊髓小胶质细胞表达的P2X7受体广泛参与炎症痛和神经病理性痛的发生^[13-15]。最近,本研究组在Walker256乳腺癌细胞诱导的大鼠骨癌痛模型上观察到,P2X7受体介导的脊髓小胶质细胞激活对进展期骨癌痛的维持(而不是发生)起重要作用,提示了P2X7受体在骨癌痛中的作用与炎症痛和神经病理性痛的差异^[16]。更为有趣的是,在4T1乳腺癌细胞诱导的小鼠骨癌痛模型,Hansen等发现P2X7受体缺陷的C57BL/6-BALB/cJ杂交小鼠表现出对骨癌痛的易感^[17],提示该受体在不同种属骨癌痛模型中的作用可能相反。考虑到Hansen等使用的4T1乳腺癌细胞只能在BALB/cJ小鼠成瘤,而P2X7受体基因敲除(*P2rx7*^{-/-})小鼠是C57BL/6背景的,通过两种品系小鼠杂交获得的*P2rx7*^{-/-}小鼠可能存在P2X7受体的剪切突变体[P2X7(k)]^[17-19],该突变体在脊髓中有大量表达,可能代偿P2X7受体的功能。为进一步明确P2X7受体在小鼠骨癌痛中

的作用,本研究采用Lewis肺癌细胞在C57BL/6J背景的*P2rx7*^{-/-}小鼠诱导骨癌痛,一方面不存在P2X7(k)的代偿作用,另一方面也避免了乳腺癌细胞更适合接种到雌鼠的性别局限性。我们通过建立C57BL/6J小鼠骨癌痛模型,检测*P2rx7*^{-/-}小鼠在骨癌痛发生、发展过程中的行为学变化,以期为揭示P2X7受体在骨癌痛中的作用提供新的实验证据。

1 材料与方法

1.1 实验动物 6~8周龄C57BL/6J小鼠(雌雄不拘),购自中国科学院上海实验动物中心,许可证号SCXF(沪)2007-2005。*P2rx7*^{-/-}小鼠购自The Jackson Lab(B6.129P2-P2rx7tm1Gab/J,编号:005576)。饲养环境保持12 h/12 h明暗间隔的人工昼夜节律,自由摄食和饮水。对实验动物进行的所有研究行为均严格遵照国际疼痛研究学会(International Association for the Study of Pain, IASP)的相关动物保护及使用规定,并获得复旦大学实验动物中心动物伦理委员会批准。

1.2 主要仪器 von Frey 纤毛(Stolting公司,美国),336型辐射热测试仪(IITC Life Science公司,美国),CatWalk步态分析系统(CatWalk XT version 10.0, Noldus公司,荷兰)。

1.3 小鼠股骨癌痛模型制备

1.3.1 Lewis肺癌细胞的培养 Lewis肺癌细胞购自中国科学院上海细胞库。将细胞贴壁培养于含10%胎牛血清的DMEM高糖培养基(Gibco公司,美国)中,置于含5% CO₂的37℃恒温培养箱(Thermo公司,美国)中培育,每1~2天进行1:2传代。收集细胞时,舍弃培养基,用0.125%胰蛋白酶消化贴壁细胞。1 min后用含血清的培养基终止酶反应,1 000 r/min离心5 min,沉淀溶于PBS制成细胞悬液。取5~10 μL细胞悬液计数,密度达到2×10⁸个/mL方可使用。操作时将细胞置于冰上,2 h内完成细胞接种,以保持癌细胞活性。

1.3.2 细胞接种 小鼠腹腔注射4%戊巴比妥钠(100 mg/kg)麻醉。小鼠仰卧位,左侧后肢剃毛,用络合碘和酒精消毒皮肤。弯曲小鼠膝关节,可见白

色髌韧带。用 4 号针头绕过髌韧带, 从近髌窝位置进针, 按股骨长轴方向钻孔进入股骨髓腔后, 换用微量进样器 (依次吸取 1 μL 空气 + 2 μL 明胶海绵溶液 + 1 μL 空气 + 5 μL 肿瘤细胞) 向骨髓腔内接种肿瘤细胞 (1×10^6 个), 明胶封口, 留针片刻后退出针头, 无菌棉签沾生理盐水清洗伤口, 酒精棉球擦拭伤口处进行消毒。对照组用 PBS 代替肿瘤细胞, 其余操作均相同。

1.4 行为学测试

1.4.1 von Frey 测试 用 von Frey 法测定小鼠对机械刺激诱发的缩爪反应阈值 (paw withdrawal threshold, PWT), 其原理是利用不同克数的纤毛压力作用于小鼠脚掌中心, 以引起小鼠缩爪反应的最小克数作为小鼠 PWT。将小鼠置于 $8.8 \text{ cm} \times 8.8 \text{ cm} \times 4.4 \text{ cm}$ 的有机玻璃盒内, 放在间距 2 mm 的金属网格之上, 室温控制在 $(23 \pm 2) ^\circ\text{C}$, 保持环境安静。测试前 3 天将小鼠放置于测试环境适应, 每天至少 2 h。测试时, 提前将小鼠放入测试环境 0.5 h, 按照压力递增顺序依次使用从 0.16 g 到 4 g 的 von Frey 纤毛, 对小鼠后爪掌中心后方位置进行刺激, 以纤毛适度弯曲作为受力标准。每种强度的纤毛刺激 5 次, 每次刺激持续 3 s, 刺激间隔 30 s 以上, 以引起快速反射性缩爪反应作为有效反应。至少 3 次能够引起有效反应的 von Frey 纤毛强度作为小鼠 PWT。

1.4.2 Hargreaves 测试 采用 Hargreaves 法测定小鼠对辐射热刺激诱发的缩爪反应潜伏期 (paw withdrawal latency, PWL), 其原理是利用卤钨丝灯发出的辐射热刺激小鼠脚掌中心, 引起小鼠缩爪反应, 从热刺激开始到小鼠产生缩爪反应的时间定义为 PWL。测试使用 $8.8 \text{ cm} \times 8.8 \text{ cm} \times 4.4 \text{ cm}$ 的有机玻璃盒, 置于距离桌面 30 cm 高的透明双层玻璃平台上, 玻璃平台夹层中有电热金属丝对平台进行加热, 维持实验动物足底温度恒定。室温控制在 $(23 \pm 2) ^\circ\text{C}$, 保持环境安静。测试前 3 天将小鼠放置于测试环境适应, 每天至少 2 h。正式测试时, 提前将小鼠放入测试环境 0.5 h, 用辐射热刺激小鼠脚掌中心, 刺激器自动记录从刺激开始至动物反射性缩爪的时间。为了防止测试对实验动物造成实质性的损伤, 设定每次刺激时间上限为 15 s, 同一只后爪每两次测试之间的间隔不少于 10 min, 以三次测量的平均值作为该动物的 PWL。

1.4.3 CatWalk 步态分析 使用 CatWalk 步态分

析系统对运动中的小鼠进行步态测定分析。该装置主要由内置荧光灯的上盖、玻璃底板通道和高频摄像头组成。测试前, 小鼠预先置于测试环境下 30 min。室温控制在 $(23 \pm 2) ^\circ\text{C}$, 室内开红色光照, 保持环境安静。测试时, 将小鼠轻轻放在 CatWalk 通道的起始端, 通道宽度设置为小鼠宽度的 1.5 倍, 由小鼠自行穿过走廊, 选取 20 cm 的距离进行记录, 通过时长约 1~2 s。当小鼠的脚掌与玻璃平板的表面接触时, 光线向下反射, 使得下方的高速摄像头捕捉到清晰的脚印图像传送到计算机, 通过相应程序进行分析 (CatWalk XT version 10.0, Noldus), 获得小鼠双侧脚掌接触底板的脚印面积 (print area, cm^2)、站立时相持续时间 (stand phase, 小鼠脚掌每次接触底板的时间) 和举步时相持续时间 (swing phase, 小鼠脚掌两次接触底板的间隔)。在一次测试中, 将站立和举步时相持续时间分别求平均值, 即为该次测试中小鼠某侧脚的站立和举步时相持续时间, 每只小鼠在一次测试中至少重复 3 次。脚印面积在一定程度上反映行走过程中肢体的承重状态; 站立时相持续时间和举步时相持续时间与受累侧肢体的疼痛和动物的保护性行为相关^[20]。合格的测试需满足: 脚印数 ≥ 10 个, 动物走动时间在 0.5~5 s, 速度方差小于 $40 (\text{cm/s})^2$ 。

1.5 组织学检测 骨癌第 28 天, 行为检测结束后, 随机选取部分骨癌痛小鼠过量麻醉处死, 取双侧后肢股骨, 放入 4% 多聚甲醛固定, 经脱钙 (4 天)、脱水 (2 天)、透明、石蜡包埋、切片 (5 μm 厚)、贴片、脱蜡、HE 染色、脱水透明和封片等步骤后, 于显微镜下观察股骨骨质破坏和肿瘤细胞生长情况, 并用 CCD 采集图像。

1.6 统计分析 实验数据以 $\text{mean} \pm \text{SEM}$ 表示。由于存在处理方法和时间点双重因素, 均值间差异的显著性检验采用双因素方差分析和 Holm-Sidak 两两比较 (two-way ANOVA with Holm-Sidak multiple comparison tests), 并定义 $P < 0.05$ 为显著性界值。

2 结果

2.1 小鼠骨癌诱发痛觉敏化的时间过程

瘤细胞接种后 14~28 天, 小鼠术侧后肢出现明显的热痛过敏, 与假手术组相比差异显著 (two-way ANOVA, treatment: $F_{1,16} = 23.639$, $P < 0.001$; time: $F_{4,16} = 6.901$, $P < 0.001$; treatment $\times$ time: $F_{4,64} = 3.264$, $P = 0.016$; 图 1A)。与热痛过敏相比, 机械刺激引

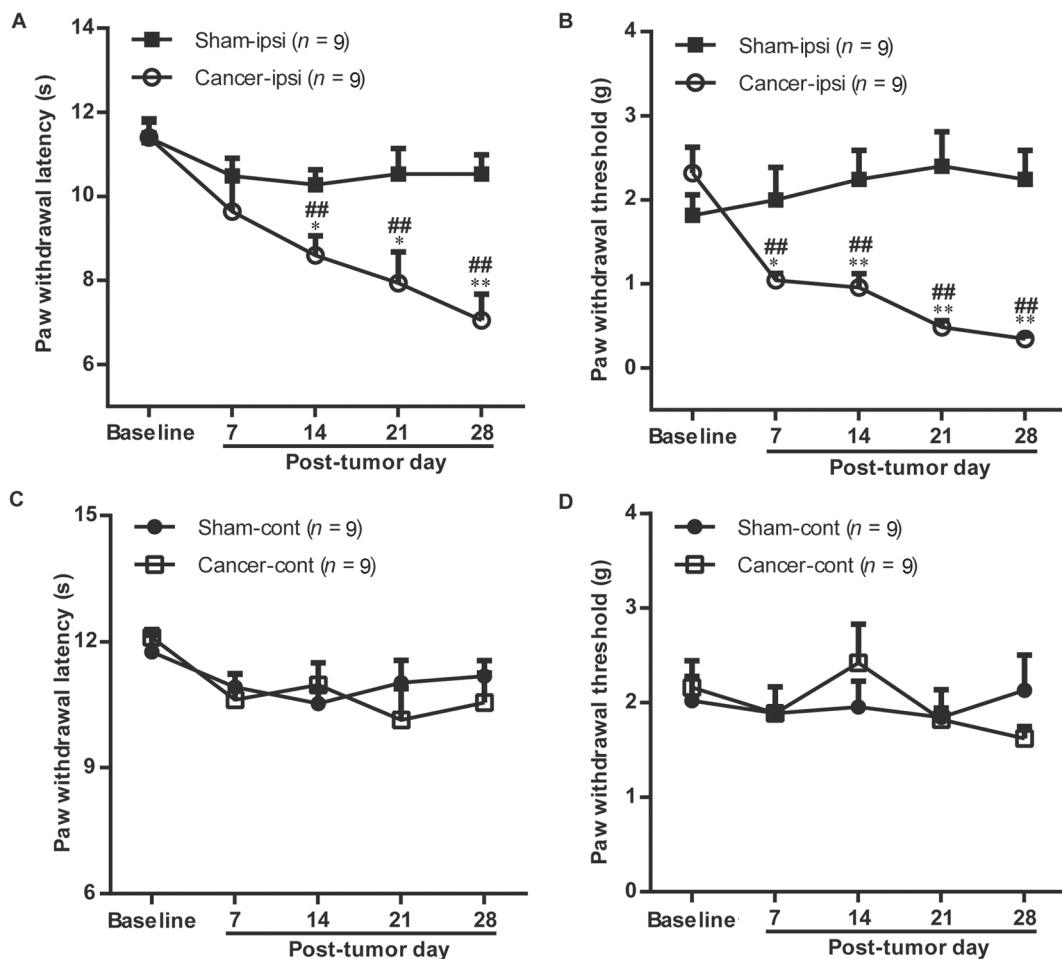


图 1. C57BL/6J 小鼠骨癌导致术侧后肢热痛过敏和触诱发痛的时程

Fig. 1. Time course of bone cancer-induced thermal hyperalgesia (A) and mechanical allodynia (B) in tumor-bearing limb in C57BL/6J mice. C, D: Paw withdrawal latency and threshold in contralateral limb. Mean $\pm$ SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs sham group; ### $P < 0.01$ vs baseline. ipsi, ipsilateral; cont, contralateral.

起的触诱发痛在肿瘤小鼠出现较早, 瘤细胞接种后 7 天即出现明显的触诱发痛, 持续至 28 天 (two-way ANOVA, treatment: $F_{1,16} = 41.173$, $P < 0.001$; time: $F_{4,16} = 2.271$, $P = 0.069$; treatment $\times$ time: $F_{4,64} = 4.421$, $P < 0.001$; 图 1B)。肿瘤小鼠对侧后肢对热刺激和机械刺激的反应阈值在各检测时间点之间无显著变化 (two-way ANOVA, $P > 0.05$, $n = 9$) (图 1C, D)。

进一步, 我们通过 CatWalk 步态分析对骨癌小鼠行走时患侧脚印面积、站立和举步时相持续时间等进行了检测。如图 2 显示, 在骨癌第 21 和 28 天, 与对侧相比, 患侧脚印面积和站立时相持续时间显著缩短, 举步时相持续时间明显延长。双因素方差分析显示明显的同、对侧差异 (print area: $F_{1,14} = 38.733$, $P < 0.001$; stand phase: $F_{1,14} = 28.348$, $P < 0.001$; swing phase: $F_{1,14} = 33.808$, $P < 0.001$)。

小鼠骨癌第 28 天, 行为检测结束后, 取术侧股骨病理学切片检测肿瘤细胞浸润和骨质破坏情况。HE 染色结果显示, 术侧股骨远端肿瘤细胞大量浸润, 骨髓质破坏, 正常的骨小梁结构丢失 (图 3)。

2.2 P2X7受体基因敲除对小鼠骨癌痛发展的影响

如前所述, P2X7 受体在炎症痛和神经病理性痛发生中扮演重要角色, 但在癌痛条件下, 依接种的瘤细胞系和动物种属不同, P2X7 受体的作用显示出相互矛盾的结果。本研究在 $P2rx7^{-/-}$ 小鼠进一步观察股骨骨髓腔接种 Lewis 肺癌细胞诱导骨癌痛觉敏化行为发生、发展的时间过程。与我们的预期相反, $P2rx7^{-/-}$ 小鼠在肿瘤接种后, 术侧后肢出现与野生型小鼠类似的热痛过敏和触诱发痛 (two-way ANOVA, PWL: genotype, $F_{1,16} = 0.1015$, $P = 0.7509$; genotype $\times$ time, $F_{4,64} = 1.248$, $P = 0.2975$; PWT:

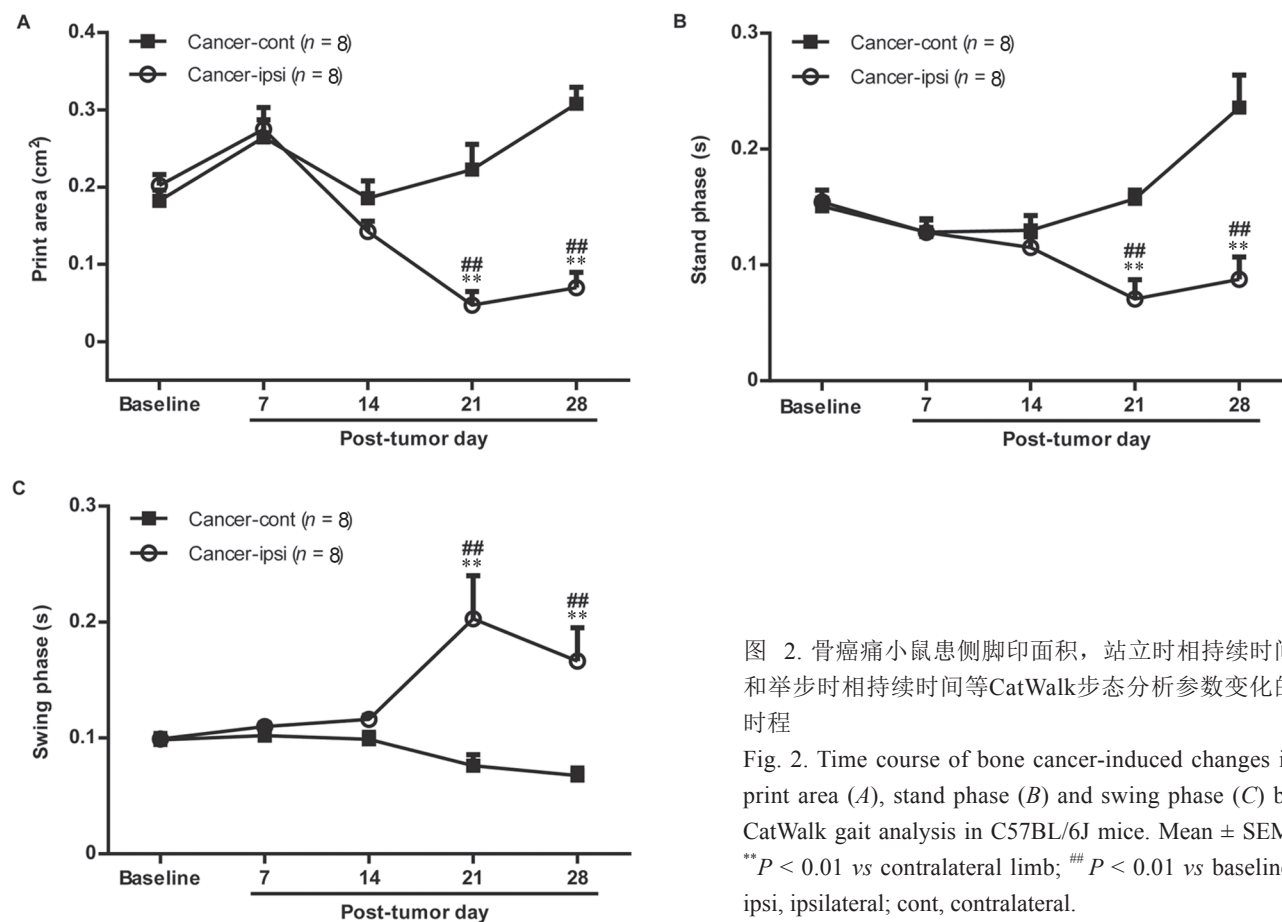


图 2. 骨癌痛小鼠患侧脚印面积, 站立时相持续时间
和举步时相持续时间等CatWalk步态分析参数变化的
时程

Fig. 2. Time course of bone cancer-induced changes in
print area (A), stand phase (B) and swing phase (C) by
CatWalk gait analysis in C57BL/6J mice. Mean $\pm$ SEM.
** $P < 0.01$ vs contralateral limb; ^{##} $P < 0.01$ vs baseline.
ipsi, ipsilateral; cont, contralateral.

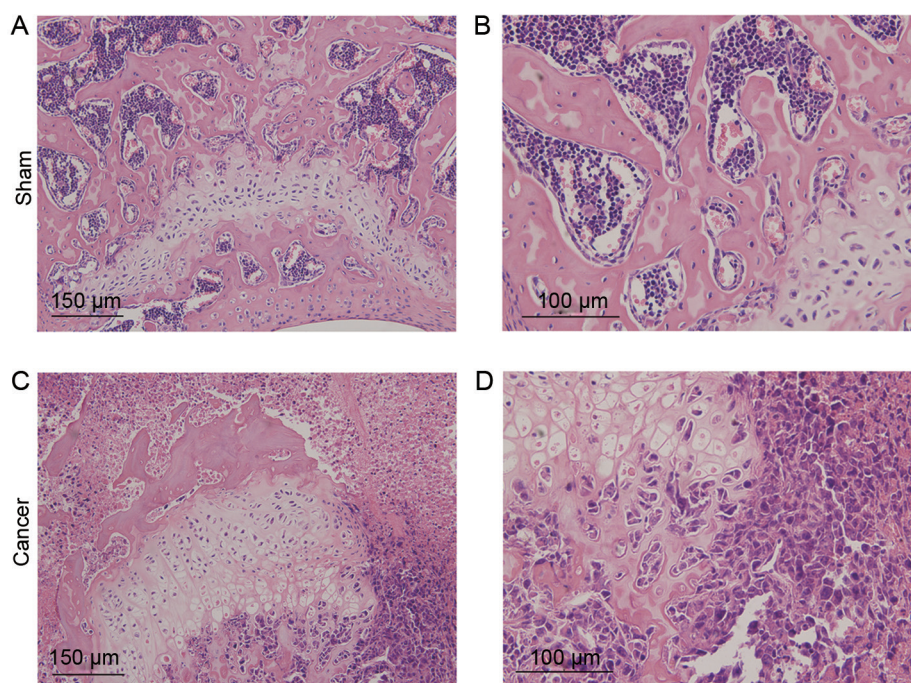


图 3. 瘤细胞接种和假手术后28天, 小鼠术侧股骨远端组织苏木精-伊红(HE)染色切片

Fig. 3. Histopathological sections (hematoxylin and eosin stain) of ipsilateral distal femur on day 28 after inoculation. A, B: Sections of ipsilateral distal femur from a sham mouse. C, D: Sections of ipsilateral distal femur from a cancer mouse. A, C: Scale bar, 150 μ m. B, D: Scale bar, 100 μ m.

genotype, $F_{1,16} = 3.172$, $P = 0.0787$; genotype $\times$ time, $F_{4,64} = 2.038$, $P = 0.0970$; 图 4A, B), 与假手术小鼠相比具有显著差异 (two-way ANOVA, PWL: treatment, $F_{2,24} = 22.862$, $P < 0.001$; treatment $\times$ time, $F_{8,96} = 4.86$, $P < 0.001$; PWT: treatment, $F_{2,24} = 29.924$, $P < 0.001$; treatment $\times$ time, $F_{8,96} = 3.681$, $P < 0.001$, 图 4A, B), 提示缺乏 P2X7 受体并不影响骨癌小鼠痛觉敏化行为的发展。进一步, CatWalk 步态分析结果显示, 骨癌 $P2rx7^{-/-}$ 小鼠术

侧脚印面积、站立时相持续时间与对侧相比显著减小 (图 4C, D), 举步时相持续时间明显延长 (图 4E)。双因素方差分析显示明显的同、对侧差异 (print area: $F_{1,16} = 72.338$, $P < 0.001$; stand phase: $F_{1,14} = 43.737$, $P < 0.001$; swing phase: $F_{1,14} = 85.559$, $P < 0.001$)。与相同背景的野生型小鼠相比, CatWalk 步态分析参数的变化发生得更早 (two-way ANOVA, print area: genotype, $F_{1,15} = 12.326$, $P < 0.01$; genotype $\times$ time, $F_{4,60} = 6.559$, $P < 0.01$; stand phase:

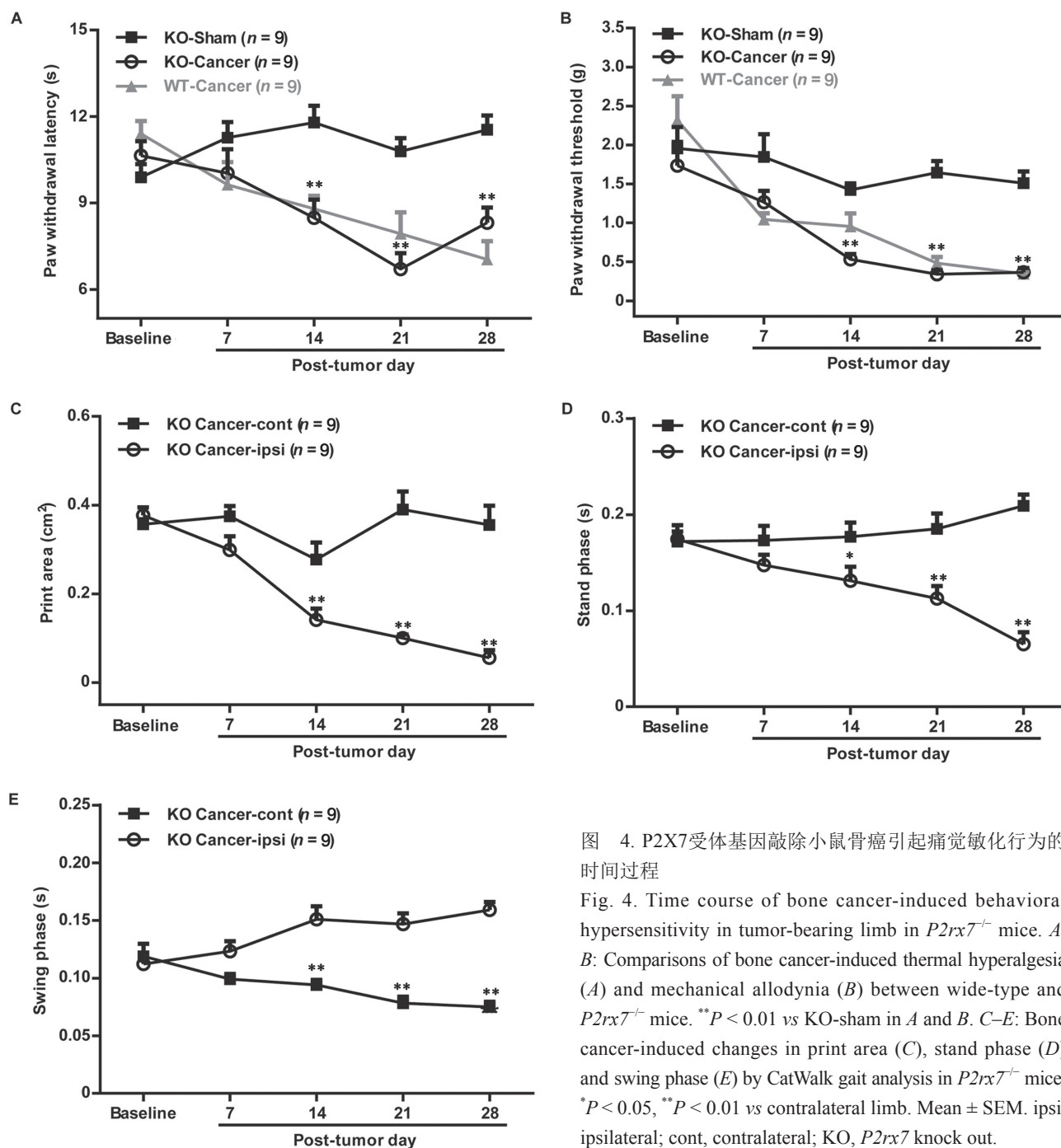


图 4. P2X7受体基因敲除小鼠骨癌引起痛觉敏化行为的时间过程

Fig. 4. Time course of bone cancer-induced behavioral hypersensitivity in tumor-bearing limb in $P2rx7^{-/-}$ mice. A, B: Comparisons of bone cancer-induced thermal hyperalgesia (A) and mechanical allodynia (B) between wide-type and $P2rx7^{-/-}$ mice. ** $P < 0.01$ vs KO-sham in A and B. C-E: Bone cancer-induced changes in print area (C), stand phase (D) and swing phase (E) by CatWalk gait analysis in $P2rx7^{-/-}$ mice. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs contralateral limb. Mean $\pm$ SEM. ipsi, ipsilateral; cont, contralateral; KO, $P2rx7$ knock out.

genotype, $F_{1,15} = 3.047$, $P = 0.085$; genotype $\times$ time, $F_{4,60} = 1.333$, $P = 0.266$; swing phase: genotype, $F_{1,15} = 0.002$, $P = 0.963$; genotype $\times$ time, $F_{4,60} = 2.883$, $P = 0.029$; 图 4C~E, 图 2A~C), 提示 P2X7 受体敲除可能加速癌痛的进程。

3 讨论

P2X7 受体已被广泛证明参与慢性痛的中枢敏化过程^[12,21]。2005 年, Chessell 等研究者发现在炎症痛和神经病理性痛动物模型中, $P2rx7^{-/-}$ 小鼠的痛觉敏化行为明显减弱^[22]。本实验室前期的工作也显示, 大鼠鞘内给予 P2X7 受体抑制剂或 siRNA 敲减脊髓背角 P2X7 受体明显对抗吗啡镇痛耐受^[10,11]和高频刺激坐骨神经引起的痛觉敏化行为^[12]。然而, 骨癌痛作为一种机制复杂而独特的慢性痛, P2X7 受体在其中的作用尚有争议^[16,17]。本研究采用 C57BL/6J 背景的野生型和 $P2rx7^{-/-}$ 小鼠, 在股骨骨髓腔内接种 Lewis 肺癌细胞建立小鼠骨癌痛模型, 观察和比较其痛相关行为的改变。临床上, 肺癌、乳腺癌和前列腺癌骨转移引起的骨癌痛是恶性肿瘤诱发的慢性痛中最为严重的一种, 难以有效控制, 严重影响了肿瘤患者的生活质量。为了深入研究骨癌痛的发生机理, 发展更为有效的治疗手段, 目前已建立多种骨癌痛动物模型。这些模型依动物品系、性别、肿瘤细胞系和接种部位的不同而有所差异, 特别是不同肿瘤细胞系的在体成瘤环境不同, 适宜接种的动物种属、品系和性别也各不相同^[4]。例如, Walker256 乳腺癌细胞株多选用雌性大鼠胫骨骨髓腔接种^[16], 4T1 乳腺癌细胞株多选用 BALB/cJ 和 C3H/SCID 小鼠股骨骨髓腔接种^[17]。然而, 目前多种基因工程小鼠选用 C57BL/6J 品系, 该品系具有自发性肿瘤低、应激反应均一等优势, 但用于骨癌痛模型动物研究很少。本研究尝试选用来源广泛、易于获得、致癌作用极强的 Lewis 肺癌细胞接种 C57BL/6J 小鼠股骨骨髓腔, 建立了稳定、重复性好、无性别选择性的小鼠骨癌痛模型。随肿瘤生长, 受累肢体出现进行性加重的热痛过敏和触诱发痛(图 1)以及移动肢体诱发的疼痛(步态异常, 图 2); 组织病理切片 HE 染色结果显示, 肿瘤受累骨骨质破坏明显, 正常骨髓质结构丢失, 骨髓腔内有大量癌细胞浸润(图 3)。这些结果提示, 该模型较好地模拟了临床上肿瘤骨转移的特征, 包括骨质破坏、患者随病程发展出现轻触或移动引发剧烈疼痛等现象^[23]。

值得一提的是, 我们在本实验中采用了一种更为客观的小鼠行为检测方法——CatWalk 步态分析。通过计算机的实时分析, 该方法可以检测运动中小鼠四只脚掌的各项参数, 包括位置、压力强度、接触面积、运动速度等。与 von Frey 测试相比, 该方法能更客观精确地检测小鼠的触诱发痛和步态适应过程^[24], 也在一定程度上反映出小鼠的自发痛行为^[25]。该方法在急性痛^[20]、炎症痛^[26]和神经病理性痛^[27,28]大鼠行为检测中有所应用, 在小鼠骨癌痛行为检测中尚无报道。本研究证明, 小鼠骨癌发展至 21 天, 患侧脚印面积显著减小, 站立时相持续时间缩短, 举步时相持续时间明显延长, 这些参数反映出小鼠运动时将重心转移至非肿瘤侧的保护性行为。该方法能较大程度地避免检测者主观影响等其它行为测试中常见的问题, 同时由于检测快速, 也方便了大样本的行为学测量。

P2X7 受体是一种嘌呤能离子通道受体, 其配体 ATP 可作为神经递质/调质或胶质递质在神经细胞和胶质细胞之间介导信息传递, 广泛参与多种慢性痛的发生、发展过程。我们及其他实验室以往的研究证明, 阻断 P2X7 受体的功能可以减轻多种类型的慢性痛, 包括炎症痛、神经病理性痛和大鼠骨癌痛^[13–16]。相反, Hansen 等在 4T1 乳腺癌细胞诱导的 BALB/cJ 小鼠骨癌痛模型发现, P2X7 受体基因敲除增加小鼠对骨癌痛的易感^[17]。由于 4T1 乳腺癌细胞并不能在 C57BL/6J 背景的 $P2rx7^{-/-}$ 小鼠成瘤, Hansen 等通过杂交 BALB/cJ 野生小鼠和 C57BL/6J 背景的 $P2rx7^{-/-}$ 小鼠获得 P2X7 受体基因敲除的 BALB/cJ 小鼠。该过程可能使 P2X7 受体基因敲除存在某些不确定性, 如可能存在 P2X7 受体的剪切突变体 [(P2X7(k))]^[17]代偿 P2X7 受体的作用^[18,19]。为进一步确认 P2X7 受体在小鼠骨癌痛中的作用, 我们选用 Pfizer 开发的 C57BL/6J 背景的 $P2rx7^{-/-}$ 小鼠, 在 Lewis 肺癌细胞诱导的 C57BL/6J 小鼠骨癌痛模型上进行该项研究。与 Hansen 等在不同肿瘤细胞系和不同品系小鼠上的结果相类似, $P2rx7^{-/-}$ 小鼠接种 Lewis 肺癌细胞后, 癌痛的行为表现与野生型小鼠相比并无显著差异, 甚至其 CatWalk 步态分析参数变化发生的时间点较野生小鼠有所提前。该结果进一步证实, 在小鼠骨癌痛模型, P2X7 受体不参与骨癌诱发痛觉敏化的发生和发展。结合我们前期关于 P2X7 受体在大鼠骨癌痛中的作用研究^[16], 本工作结果提示 P2X7 受体在大、

小鼠骨癌痛中可能发挥完全不同的作用。这种差异可能与大、小鼠骨癌痛条件下胶质细胞不同的激活情况有关,如在多个大鼠骨癌痛模型可观察到脊髓背角小胶质细胞的大量活化,但在小鼠骨癌模型,脊髓小胶质细胞活化少有报道^[29,30]。已知P2X7受体主要表达在脊髓背角小胶质细胞,P2X7受体与脊髓小胶质细胞活化之间的关系在不同种属骨癌痛发生中的作用还有待进一步研究。另外,用于大、小鼠骨转移瘤模型的瘤细胞系是不同的,而不同品系的瘤细胞破坏骨质时形成不同微环境所造成的影响可能也对这种品系差异有所贡献^[31]。这些结果再次提示,在疾病动物模型上所得的研究结果与人类疾病机理之间还存在着巨大差异。

参考文献

- Sabino MA, Mantyh PW. Pathophysiology of bone cancer pain. *J Support Oncol* 2004; 3(1): 15–24.
- Mantyh PW, Clohisy DR, Koltzenburg M, Hunt SP. Molecular mechanisms of cancer pain. *Nat Rev Cancer* 2002; 2(3): 201–209.
- Mercadante S. Recent progress in the pharmacotherapy of cancer pain. *Expert Rev Anticancer Ther* 2001; 1(3): 487–494.
- Currie GL, Delaney A, Bennett MI, Dickenson AH, Egan KJ, Vesterinen HM, Sena ES, Macleod MR, Colvin LA, Fallon MT. Animal models of bone cancer pain: systematic review and meta-analyses. *Pain* 2013; 154(6): 917–926.
- Burnstock G, Satchell DG, Smythe A. A comparison of the excitatory and inhibitory effects of non-adrenergic, non-cholinergic nerve stimulation and exogenously applied ATP on a variety of smooth muscle preparations from different vertebrate species. *Br J Pharmacol* 1972; 46(2): 234–242.
- Huang C, Han X, Li X, Lam E, Peng W, Lou N, Torres A, Yang M, Garre JM, Tian GF, Bennett MV, Nedergaard M, Takano T. Critical role of connexin 43 in secondary expansion of traumatic spinal cord injury. *J Neurosci* 2012; 32(10): 3333–3338.
- Brederson JD, Jarvis MF. Homomeric and heteromeric P2X3 receptors in peripheral sensory neurons. *Curr Opin Investig Drugs* 2008; 9(7): 716–725.
- Gu JG, MacDermott AB. Activation of ATP P2X receptors elicits glutamate release from sensory neuron synapses. *Nature* 1997; 389(6652): 749–753.
- Sperlágh B, Vizi ES, Wirkner K, Illes P. P2X7 receptors in the nervous system. *Prog Neurobiol* 2006; 78(6): 327–346.
- Zhou D, Chen ML, Zhang YQ, Zhao ZQ. Involvement of spinal microglial P2X7 receptor in generation of tolerance to morphine analgesia in rats. *J Neurosci* 2010; 30(23): 8042–8047.
- Chen ML, Cao H, Chu YX, Cheng LZ, Liang LL, Zhang YQ, Zhao ZQ. Role of P2X7 receptor-mediated IL-18/IL-18R signaling in morphine tolerance: multiple glial-neuronal dialogues in the rat spinal cord. *J Pain* 2012; 13(10): 945–958.
- Chu YX, Zhang Y, Zhang YQ, Zhao ZQ. Involvement of microglial P2X7 receptors and downstream signaling pathways in long-term potentiation of spinal nociceptive responses. *Brain Behav Immun* 2010; 24(7): 1176–1189.
- Dell'Antonio G, Quattrini A, Cin ED, Fulgenzi A, Ferrero ME. Relief of inflammatory pain in rats by local use of the selective P2X7 ATP receptor inhibitor, oxidized ATP. *Arthritis Rheum* 2002; 46(12): 3378–3385.
- Kobayashi K, Takahashi E, Miyagawa Y, Yamanaka H, Noguchi K. Induction of the P2X7 receptor in spinal microglia in a neuropathic pain model. *Neurosci Lett* 2011; 504(1): 57–61.
- Teixeira JM, Oliveira MC, Parada CA, Tambeli CH. Peripheral mechanisms underlying the essential role of P2X7 receptors in the development of inflammatory hyperalgesia. *Eur J Pharmacol* 2010; 644(1): 55–60.
- Yang Y, Li H, Li TT, Luo H, Gu XY, Lü N, Ji RR, Zhang YQ. Delayed activation of spinal microglia contributes to the maintenance of bone cancer pain in female Wistar rats via P2X7 receptor and IL-18. *J Neurosci* 2015; 35(20): 7950–7963.
- Hansen RR, Nielsen CK, Nasser A, Thomsen SI, Eghorn LF, Pham Y, Schulenburg C, Syberg S, Ding M, Stojilkovic SS, Jorgensen NR, Heegaard AM. P2X7 receptor-deficient mice are susceptible to bone cancer pain. *Pain* 2011; 152(8): 1766–1776.
- Nicke A, Kuan YH, Masin M, Rettinger J, Marquez-Klaka B, Bender O, Górecki DC, Murrell-Lagnado RD, Soto F. A functional P2X7 splice variant with an alternative transmembrane domain 1 escapes gene inactivation in P2X7 knockout mice. *J Biol Chem* 2009; 284(38): 25813–25822.
- Xu XJ, Boumechache M, Robinson LE, Marschall V, Górecki DC, Masin M, Murrell-Lagnado RD. Splice variants of the P2X7 receptor reveal differential agonist dependence and functional coupling with pannexin-1. *J Cell Sci* 2012; 125(16): 3776–3789.
- Wu YL (吴廷丽), Lei HY, Wang LL, Fan FF, Xu SY. Catwalk gait analysis in incisional pain model in rats. *Chin J Pain Med (中国疼痛医学杂志)* 2012; 18(8): 483–488 (in Chinese with English abstract).
- Sorge RE, Trang T, Dorfman R, Smith SB, Beggs S, Ritchie J, Austin JS, Zaykin DV, Vander Meulen H, Costigan M, Her-

- bert TA, Yarkoni-Abitbul M, Tichauer D, Livneh J, Gershon E, Zheng M, Tan K, John SL, Slade GD, Jordan J, Woolf CJ, Peltz G, Maixner W, Diatchenko L, Seltzer Z, Salter MW, Mogil JS. Genetically determined P2X7 receptor pore formation regulates variability in chronic pain sensitivity. *Nat Med* 2012; 18(4): 595–599.
- 22 Chessell IP, Hatcher JP, Bountra C, Michel AD, Hughes JP, Green P, Egerton J, Murfin M, Richardson J, Peck WL, Grahames CB, Casula MA, Yiangou Y, Birch R, Anand P, Buell GN. Disruption of the P2X7 purinoceptor gene abolishes chronic inflammatory and neuropathic pain. *Pain* 2005; 114(3): 386–396.
 - 23 Schwei MJ, Honore P, Rogers SD, Salak-Johnson JL, Finke MP, Ramnaraine ML, Clohisey DR, Mantyh PW. Neurochemical and cellular reorganization of the spinal cord in a murine model of bone cancer pain. *J Neurosci* 1999; 19(24): 10886–10897.
 - 24 Vrinten DH, Hamers FF. ‘CatWalk’ automated quantitative gait analysis as a novel method to assess mechanical allodynia in the rat; a comparison with von Frey testing. *Pain* 2003; 102(1): 203–209.
 - 25 Mogil JS, Graham AC, Ritchie J, Hughes SF, Austin JS, Schorscher-Petcu A, Langford DJ, Bennett GJ. Hypolocomotion, asymmetrically directed behaviors (licking, lifting, flinching, and shaking) and dynamic weight bearing (gait) changes are not measures of neuropathic pain in mice. *Mol Pain* 2010; 6(1): 1.
 - 26 Gabriel AF, Marcus MA, Honig WM, Walenkamp GH, Joosten EA. The CatWalk method: a detailed analysis of behavioral changes after acute inflammatory pain in the rat. *J Neurosci Methods* 2007; 163(1): 9–16.
 - 27 Bozkurt A, Deumens R, Scheffel J, O’Dey DM, Weis J, Joosten EA, Führmann T, Brook GA, Pallua N. CatWalk gait analysis in assessment of functional recovery after sciatic nerve injury. *J Neurosci Methods* 2008; 173(1): 91–98.
 - 28 Deumens R, Jaken RJ, Marcus MA, O’Dey DM, Weis J, Joosten EA, Führmann T, Brook GA, Pallua N. The CatWalk gait analysis in assessment of both dynamic and static gait changes after adult rat sciatic nerve resection. *J Neurosci Methods* 2007; 164(1): 120–130.
 - 29 Ducourneau VR, Dolique T, Hachem-Delaunay S, Mirau-court LS, Amadio A, Blaszczyk L, Jacquot F, Ly J, Devoize L, Olier SH, Dallel R, Mothet JP, Nagy F, Fénelon VS, Voisin DL. Cancer pain is not necessarily correlated with spinal overexpression of reactive glia markers. *Pain* 2014; 155(2): 275–291.
 - 30 Hald A, Nedergaard S, Hansen RR, Ding M, Heegaard AM. Differential activation of spinal cord glial cells in murine models of neuropathic and cancer pain. *Eur J Pain* 2009; 13(2): 138–145.
 - 31 Sabino MA, Luger NM, Mach DB, Rogers SD, Schwei MJ, Mantyh PW. Different tumors in bone each give rise to a distinct pattern of skeletal destruction, bone cancer-related pain behaviors and neurochemical changes in the central nervous system. *Int J Cancer* 2003; 104(5): 550–558.