

·实验研究·

本文引用: 王 菲, 赖桂花, 曹建雄. 基于 TLR4/NF- κ B 信号通路探讨消肿止痛外敷散对乳腺癌骨转移大鼠的镇痛机制[J]. 湖南中医药大学学报, 2025, 45(12): 2244-2253.

基于 TLR4/NF- κ B 信号通路探讨消肿止痛外敷散 对乳腺癌骨转移大鼠的镇痛机制

王 菲¹, 赖桂花², 曹建雄^{3*}

1. 湖南中医药大学第一中医临床学院, 湖南 长沙 410007; 2. 南华大学附属第一医院, 湖南 衡阳 421001;

3. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南 长沙 410007

[摘要] **目的** 探讨消肿止痛外敷散对乳腺癌骨转移癌痛(BMCP)大鼠的镇痛作用及机制。**方法** 将 48 只雌性 SD 大鼠分为假手术组(8 只)和造模组(40 只)。造模组通过向大鼠左侧胫骨注入 MRMT-1 乳腺癌细胞悬液(3×10^4 个细胞)建立骨转移癌痛模型。模型建立后,造模组进一步随机分为模型组、消肿止痛外敷散高剂量组(16.80 g/kg)、消肿止痛外敷散中剂量组(8.40 g/kg)、消肿止痛外敷散低剂量组(4.20 g/kg)和扶他林组(0.50 g/kg),每组 8 只。每日 9:00 给药,持续 10 h,连续 21 d。采用电子压痛仪检测机械痛阈值;使用智能热板仪检测热痛阈值;X 线检查大鼠胫骨骨质破坏情况;HE 染色观察大鼠胫骨组织病理变化;ELISA 检测大鼠血清中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素(IL)-1 β 和 IL-6 含量;qPCR 检测大鼠背根神经节中 Toll 样受体 4(TLR4)、核因子- κ B(NF- κ B) p65 mRNA 表达水平;Western blot 检测大鼠背根神经节中 TLR4、髓样分化因子 88(MyD88)、p-NF- κ B p65、p-抑制性 κ B 激酶 β (IKK β)、TNF 受体相关因子 6(TRAF6)与转化生长因子激酶 1(TAK1)蛋白表达水平。**结果** 与假手术组相比,模型组、扶他林组及消肿止痛外敷散各剂量组大鼠机械痛阈值与热痛阈值均降低($P < 0.05$);X 线和 HE 染色均显示大鼠骨质严重破坏;血清 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 含量、背根神经节中 TLR4 和 NF- κ B p65 mRNA 表达水平、背根神经节中 TLR4、MyD88、TAK1、TRAF6 蛋白表达水平以及 p-IKK β /IKK β 、p-p65/p65 蛋白表达水平比值均升高($P < 0.05$)。与模型组比较,扶他林组和消肿止痛外敷散各剂量组大鼠机械痛阈值和热痛阈值均升高($P < 0.05$);X 线和 HE 染色均显示大鼠骨质破坏改善,其中消肿止痛外敷散高、中剂量组改善最明显;血清 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 含量、背根神经节中 TLR4 和 NF- κ B p65 mRNA 表达水平、背根神经节中 TLR4、MyD88、TAK1、TRAF6 蛋白表达水平以及 p-IKK β /IKK β 、p-p65/p65 蛋白表达水平比值均降低($P < 0.05$)。与扶他林组相比,消肿止痛外敷散高、中剂量组大鼠机械痛阈值和热痛阈值均升高($P < 0.05$),血清 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 含量、背根神经节中 TLR4 和 NF- κ B p65 mRNA 表达水平、背根神经节中 TLR4、MyD88、TAK1、TRAF6 蛋白表达水平以及 p-IKK β /IKK β 、p-p65/p65 蛋白表达水平比值均降低($P < 0.05$);消肿止痛外敷散低剂量组大鼠机械痛阈值和热痛阈值均降低($P < 0.05$),血清 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 含量、背根神经节中 TLR4 和 NF- κ B p65 mRNA 表达水平、背根神经节中 TLR4、MyD88、TAK1、TRAF6 蛋白表达水平以及 p-IKK β /IKK β 、p-p65/p65 蛋白表达水平比值均升高($P < 0.05$)。与消肿止痛外敷散低剂量组相比,消肿止痛外敷散高、中剂量组大鼠机械痛阈值和热痛阈值均升高($P < 0.05$);血清 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 含量、背根神经节中 TLR4 和 NF- κ B p65 mRNA 表达水平、背根神经节中 TLR4、MyD88、TAK1、TRAF6 蛋白表达水平以及 p-IKK β /IKK β 、p-p65/p65 蛋白表达水平比值均降低($P < 0.05$)。**结论** 消肿止痛外敷散可缓解骨转移癌痛,可能与抑制 TLR4/NF- κ B 信号通路激活,下调 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的表达相关。

[关键词] 骨转移癌痛;消肿止痛外敷散;外治;TLR4/NF- κ B;背根神经节;乳腺癌

[中图分类号] R273

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2025.12.002

[收稿日期] 2025-07-25

[基金项目] 湖南省中医药科研计划项目(201946)。

[通信作者] * 曹建雄,男,博士,主任医师,教授,博士研究生导师,E-mail:003998@hnuem.edu.cn。

Analgesic mechanisms of topical Xiaozhong Zhitong Powder in rats with breast cancer bone metastasis based on the TLR4/NF- κ B signaling pathway

WANG Fei¹, LAI Guihua², CAO Jianxiong^{3*}

1. The First Clinical School of Chinese Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China;

2. The First Hospital of University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China; 3. The First Hospital of Hunan

University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China

[Abstract] **Objective** To investigate the analgesic effects of topical Xiaozhong Zhitong Powder (XZZTP) and its underlying mechanisms in a rat model of bone metastatic cancer pain (BMCP) secondary to breast cancer. **Methods** Forty-eight female Sprague-Dawley (SD) rats were allocated into sham-operated group ($n=8$) and modeling group ($n=40$). The BMCP model was established in the modeling group by injecting an MRMT-1 breast cancer cell suspension (3×10^4 cells) into the left tibia of each rat. After successful modeling, the modeling group were further randomized into model group, high-dose (16.80 g/kg), medium-dose (8.40 g/kg), and low-dose (4.20 g/kg) XZZTP groups, and Voltaren group (0.50 g/kg), with eight rats in each group. Treatments were administered daily starting at 9:00 a.m., sustained for ten hours, and continued for 21 consecutive days. Mechanical pain threshold was assessed using an electronic von Frey analgesiometer, while thermal pain threshold was measured with an intelligent hot plate apparatus. Bone destruction in the left tibia was evaluated via X-ray imaging, and histopathological changes in the tibial tissue were observed using HE staining. Serum levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin (IL)-1 β , and IL-6 were measured by ELISA. The mRNA expression levels of toll-like receptor 4 (TLR4) and nuclear factor-kappa B (NF- κ B) p65 in the dorsal root ganglion (DRG) were quantified by qPCR. The protein expression levels of TLR4, myeloid differentiation primary response 88 (MyD88), phosphorylated NF- κ B p65 (p-p65), phosphorylated inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase beta (p-IKK β), TNF receptor-associated factor 6 (TRAF6), and transforming growth factor beta-activated kinase 1 (TAK1) in the DRG were determined by Western blot. **Results** Compared with the sham-operated group, the model group, the Voltaren group, and all dose groups of XZZTP showed significant decreases in both mechanical and thermal pain thresholds ($P<0.05$). Both X-ray imaging and HE staining revealed severe bone destruction. Serum levels of TNF- α , IL-1 β , and IL-6 were significantly elevated ($P<0.05$). Furthermore, the mRNA expression levels of TLR4 and NF- κ B p65 in the DRG significantly increased ($P<0.05$). The protein expression levels of TLR4, MyD88, TAK1, and TRAF6 in the DRG, as well as the ratios of p-IKK β /IKK β and p-p65/p65, were all significantly higher ($P<0.05$). Compared with the model group, both the Voltaren group and all dose groups of XZZTP exhibited significant increases in mechanical and thermal pain thresholds ($P<0.05$). X-ray imaging and HE staining showed improved bone architecture, with the most pronounced improvements observed in the high- and medium-dose XZZTP groups. Serum levels of TNF- α , IL-1 β , and IL-6 were significantly reduced ($P<0.05$). The mRNA expression levels of TLR4 and NF- κ B p65 in the DRG were significantly downregulated ($P<0.05$). Additionally, the protein expression levels of TLR4, MyD88, TAK1, and TRAF6 in the DRG, along with the p-IKK β /IKK β and p-p65/p65 ratios, all significantly decreased ($P<0.05$). In comparison to the Voltaren group, the high- and medium-dose XZZTP groups demonstrated significantly higher mechanical and thermal pain thresholds ($P<0.05$). Both groups also had significantly lower serum levels of TNF- α , IL-1 β , and IL-6 ($P<0.05$). The mRNA expression levels of TLR4 and NF- κ B p65 in the DRG, as well as the protein expression levels of TLR4, MyD88, TAK1, TRAF6 and the p-IKK β /IKK β and p-p65/p65 ratios, were all significantly reduced ($P<0.05$). In contrast, the low-dose XZZTP group exhibited decreased mechanical and thermal pain thresholds ($P<0.05$), while increased serum levels of TNF- α , IL-1 β , and IL-6, mRNA expression levels of TLR4 and NF- κ B p65, protein expression levels of TLR4, MyD88, TAK1, and TRAF6, as well as the ratios of p-IKK β /IKK β and p-p65/p65 ($P<0.05$) compared to the Voltaren group. Compared with the low-dose XZZTP group, the high- and medium-dose XZZTP groups exhibited significantly elevated mechanical and thermal pain thresholds ($P<0.05$). Serum levels of TNF- α , IL-1 β , and IL-6 were significantly lower ($P<0.05$). Additionally, both groups also showed significant downregulation of mRNA expression of TLR4 and NF- κ B p65, as well as protein expression levels

of TLR4, MyD88, TAK1, TRAF6 and the p-IKK β /IKK β and p-p65/p65 ratios in the DRG ($P < 0.05$). **Conclusion** XZZTP can alleviate BMCP, potentially mediated through the inhibition of the TLR4/NF- κ B signaling pathway activation and the subsequent downregulation of TNF- α , IL-1 β , and IL-6 expression.

[**Keywords**] bone metastatic cancer pain; topical Xiaozhong Zhitong Powder; topical application; TLR4/NF- κ B; dorsal root ganglion; breast cancer

根据2022年全球癌症统计数据,乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤,占全球癌症病例的11.6%,是导致癌症相关死亡的主因之一^[1]。随着诊断技术的进步和治疗方案的不断优化,乳腺癌患者总体生存率得到显著提高^[2]。但转移性乳腺癌的预后仍不容乐观,其中,骨转移最常见,严重影响患者的生存质量与临床结局^[3]。骨转移癌痛(bone metastatic cancer pain, BMCP)是一种复杂且独特的疼痛表现,兼具炎症性和神经病理性疼痛特征^[4]。临床研究显示,约75%的晚期癌症患者会出现慢性疼痛,其中骨转移引起的疼痛尤为突出,其临床特征包括持续性或间歇性钝痛、夜间疼痛加重以及突发性剧烈疼痛发作^[5]。BMCP不仅引起躯体痛苦,还常伴随焦虑、抑郁及功能受限,严重影响生活质量^[6]。其机制复杂,其中肿瘤诱导的炎症、神经重塑和外周神经敏化是核心机制^[7]。Toll样受体4(Toll-like receptor 4, TLR4)和核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)是介导肿瘤相关性炎症与疼痛信号传递的关键分子^[8]。在骨转移过程中,癌细胞及其微环境中的免疫细胞通过释放多种介质,激活感觉神经元表面的TLR4受体,进而引发NF- κ B抑制蛋白的磷酸化与降解,促使NF- κ B发生核转位^[9]。这一过程启动包括肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor alpha, TNF- α)、白细胞介素(interleukin, IL)-1 β 和IL-6在内的多种致痛细胞因子的转录,最终导致外周及中枢敏化,显著加剧骨转移癌痛的维持与发展^[8]。此外,研究证实,抑制TLR4/NF- κ B p65信号通路可有效缓解骨癌痛^[8],提示该通路在疼痛调控中具有关键作用,可作为潜在治疗靶点。

目前临床采用多模态镇痛策略治疗BMCP,包括三阶梯镇痛药物、双膦酸盐类抑制剂、姑息性放疗、神经阻滞等^[10]。然而,这些治疗手段并不能完全控制疼痛的发生,约45%的癌症患者疼痛并未得到有效控制,其中31%的患者疼痛达到中重度^[11]。中医药在癌痛治疗中具有独特价值,尤其在协同镇痛、减毒增效方面优势明显,中医外治法安全性高,已成为癌痛管理的重要补充手段^[12]。中医学认为“久病必

瘀”,而骨转移癌痛常见于晚期肿瘤患者,符合“久病”特点,骨转移癌痛常表现为疼痛部位固定,以刺痛为主,夜间加剧,这些特征与《血证论·瘀血》所述瘀血疼痛“痛有定处、如针刺、夜甚”的临床表现高度吻合^[13]。因此,活血化瘀是治疗骨转移癌痛的核心治法。消肿止痛外敷散主要由大黄、栀子、香附、乳香、没药等10余味中药组成,具有活血化瘀、温经止痛的功效,作为湖南中医药大学第一附属医院肿瘤科协定处方,在临床应用10余年,疗效显著^[14]。前期临床观察表明,消肿止痛外敷散联合奥施康定可有效缓解骨转移疼痛,且不良反应较少^[14],但其具体作用机制尚不明确。本研究通过乳腺癌细胞系建立骨转移癌痛模型,选取TLR4/NF- κ B信号通路作为媒介,从炎症的角度来阐述消肿止痛外敷散治疗骨转移癌痛的可能机制。

1 材料

1.1 动物与细胞

选用48只雌性SPF级SD大鼠,体重180~200g。动物由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供(动物生产许可证号:SYXK2019-0017,合格证号:430727221102693387)。实验动物饲养于该公司实验动物中心,条件标准化:提供自由摄食的专用啮齿动物饲料和饮用水,环境温度保持在20~24℃,相对湿度为50%~70%,并采用12h的明暗交替光照。实验所用的MRMT-1大鼠乳腺癌细胞系源自广州吉妮欧生物科技有限公司(批号:2022101760901)。本研究方案已通过湖南斯莱克景达实验动物有限公司实验动物伦理委员会审批(伦理批号:SJA2022156-2)。

1.2 试验药物

消肿止痛外敷散(湖南中医药大学第一附属医院,规格80g/包,1包/袋,批号:20200518)。扶他林(双氯芬酸二乙胺乳胶剂,葛兰素史克生物医药公司,规格0.2g/支,1支/盒,批号:7E6F)。实验用糊精(广东康达生物科技有限公司,批号:20210309)。

1.3 主要试剂与仪器

异氟烷(河北金达福药业有限公司,批号:20220101);注射用青霉素(哈药集团公司,批号:H23021439);p-NF- κ B p65 一抗(美国 CST 公司,批号:#3031);TLR4 一抗(北京博奥森生物技术有限公司,批号:bs-20594R);p-抑制性 κ B 激酶 β (inhibitory κ B kinase β , IKK β)一抗[艾博抗(上海)贸易有限公司,批号:ab59195];肿瘤坏死因子受体相关因子 6(TNF receptor associated factor 6, TRAF6)一抗[维百奥(北京)生物科技有限公司,批号:sc-8409];转化生长因子激酶 1(transforming growth factor β -activated kinase 1, TAK1)一抗、髓样分化因子 88(myeloid differentiation primary response 88, MyD88)一抗、 β -actin 一抗(武汉三鹰生物技术有限公司,批号:12330-2-AP、67969-1-Ig、66009-1-Ig),山羊抗鼠 IgG H&L 辣根过氧化物酶二抗、山羊抗兔 IgG H&L 辣根过氧化物酶二抗(长沙艾碧维生物科技有限公司,批号:AWS0001、AWS0002);mRNA 逆转录试剂盒[宝日医生物技术(北京)有限公司,批号:RR037Q];HE 染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号:G1120);IL-6、TNF- α 、IL-1 β ELISA 试剂盒(江苏晶美生物科技有限公司,批号:JM-11524M1、JM-00312F2、JM-01454R2)。

电子压痛仪、智能热板仪(济南益延科技发展有限公司,型号:YLS-3E、YLS-6B);荧光定量 PCR 仪(美国 Thermo 公司,型号:PIKOREAL96);化学发光成像系统(上海勤翔科学仪器有限公司,型号:ChemiScope6100);台式冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司,型号:H1650R);医用 X 光机[佳能医疗系统(中国)有限公司,型号:KXO-32R];荧光倒置显微镜(日本 Olympus 公司,型号:CKX53SF)。

2 方法

2.1 骨转移癌痛模型建立

采用 MEDHURST 等^[15]的方法建立大鼠骨转移癌痛模型。具体操作如下:实验动物经 2%异氟烷混合氧气(500 mL/min)吸入麻醉后,取仰卧位固定;无菌条件下于左下肢胫骨棘处作 0.5~1 cm 纵行切口,暴露胫骨后,使用微型骨钻在胫骨结节下方以 30°~45°角钻孔至骨髓腔,模型组及各给药组经骨孔缓慢注入 3 μ L MRMT-1 乳腺癌细胞悬液(3×10^4 个细胞),假手术组则注入等量 PBS 溶液,留针 1 min 后拔针,骨蜡封闭钻孔。术后均予以青霉素 20 万 U

腹腔注射预防感染。当有显著的诱发痛(机械痛与热痛觉超敏),同时 X 线检查显示骨溶解性病灶及 HE 染色证实肿瘤细胞在骨髓腔内生长,表明骨转移癌痛模型建立成功^[16]。

2.2 分组与给药

2.2.1 实验分组 48 只雌性 SD 大鼠随机分为:假手术组($n=8$,注射 PBS)和造模组($n=40$,注射 MRMT-1 乳腺癌细胞)。造模成功后,将 40 只造模大鼠随机分为 5 组,每组 8 只,分别为:模型组、消肿止痛外敷散高剂量组、消肿止痛外敷散中剂量组、消肿止痛外敷散低剂量组、扶他林组。

2.2.2 给药方案 给药剂量:消肿止痛外敷散临床给药剂量为 80 g/d,人标准体质量按 60 kg 计算,临床每日用量 1.33 g/kg^[14]。剂量依据《药理实验方法学》^[17]中人与大鼠等效剂量进行换算,消肿止痛外敷散低、中、高剂量组的实验用量分别为临床等效剂量的 0.5 倍(4.20 g/kg)、1 倍(8.40 g/kg)、2 倍(16.80 g/kg)。扶他林为外用制剂,临床每日用量参照侯等^[18]研究为 0.08 g/kg,按照人与大鼠等效剂量换算,大鼠扶他林给药剂量为 0.50 g/kg,按人与大鼠体表面积换算,大鼠外用剂量为 3.44×10^{-4} g/cm²。假手术组与模型组予以糊精外敷。给药时间:每日 9:00 开始外敷给药,持续 10 h,连续 21 d。

2.3 标本采集和保存

2.3.1 血样本处理 大鼠使用 3%戊巴比妥钠(0.2 mL/100 g)注射麻醉后,把大鼠仰卧固定在手术台上,背部放置一粗试管以充分暴露腹主动脉,常规消毒后用手术剪沿腹部正中中线剪开腹腔,用小镊子轻轻扒开血管周围脂肪,找到腹主动脉取血 2~3 mL,置于离心管;并于 4 $^{\circ}$ C 下静置 3~4 h,可见血块析出;4 $^{\circ}$ C 离心 10 min,可见淡黄色血清,取出上清后可再 4 $^{\circ}$ C 离心 10 min,以最大程度保证血清质量;将血清冻存于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱内备用。

2.3.2 背根神经节样本处理 将大鼠俯卧位固定于平板上,背部消毒,行背部正中切开,分离皮肤、皮下组织,暴露脊柱,先定位第一腰椎(银白色腱膜第一个相交处),再定位第 6 腰椎(平髂前上棘),用注射器吸取 PBS 液,取掉针头,将脊髓冲出,然后沿腰段脊椎中间剪开,可以看到白色结节状物即为背根神经节,择取左侧 L4~6 节段的背根神经节(取材前必须要先标记左侧),PBS 液洗涤,迅速置于液氮内冻实,然后将其转移至冻存管,速冻后放入 -80 $^{\circ}$ C 冰箱保存。

2.3.3 胫骨组织样本处理 首先使用咬骨钳取得左侧胫骨组织块,将骨组织块投入 4%的多聚甲醛中,固定 24 h 后取出骨组织块,放入 10%的 EDTA 中并置于 pH 7.2 和 4 °C 环境下进行脱钙,每 4~5 日换一次 EDTA,每日观察骨骼,以大头针试探,若可轻松刺入即为脱钙成功;脱钙完成后用流水冲洗骨组织中的 EDTA,将经过脱钙的骨组织依次放入 75%乙醇 30 min、85%乙醇 20 min、90%乙醇 20 min、95%乙醇 10 min、无水乙醇 I 30 min、无水乙醇 II 30 min 进行脱水,将经过脱水的骨组织分别用二甲苯 I 和二甲苯 II 各浸泡 30 min 进行透明处理,然后将骨组织置于融化的石蜡中进行浸蜡,接着用包埋机将骨组织进行包埋;将包埋好的组织块置于切片机上修整,调节切片厚度至 4 μm ,连续切片,用细毛刷轻挑完整切片,置于 40~45 °C 温水中展平,随后用防脱载玻片捞取,使组织切片平整贴附;将载玻片置于 37 °C 恒温箱中烘干。

2.4 观察指标

2.4.1 疼痛行为学评估 机械痛阈值测定:将大鼠置于操作台适应 5 min,然后使用 YLS-3E 电子压痛仪测定,最后固定大鼠左下肢,使压头对准大鼠左下肢胫骨处,启动电子压痛仪;判定标准:缩腿或嘶叫反应,记录此时的压力数值(单位:g);上述操作重复 3 次(间隔 10 min),取平均值^[9]。

热痛阈值测定:将大鼠置于操作台适应 5 min,然后将智能热板仪温度设为 53 °C,待仪器升温至设定值后,将大鼠置于热板仪上,立即按下计时开关;判定标准:舔/抬左后足,记录此时热板仪时间(单位:s);上述操作重复 3 次(间隔 10 min),取平均值^[9]。

2.4.2 X 线检查观察大鼠胫骨骨质破坏情况 从各组中随机抽取 3 只大鼠进行以下处理:腹腔注射 10%水合氯醛溶液(剂量 300 mg/kg)实施麻醉,将麻醉后的大鼠取仰卧位固定于 X 线摄影平台;采用 50 kV 电压和 2 ms 曝光时间进行影像采集,评估各组大鼠胫骨骨质损伤程度。

2.4.3 HE 染色观察大鼠胫骨组织病理情况 从温箱中取出烘干的切片,于 60 °C 烤箱内烤片 40 min;将切片分别置于二甲苯 I 和二甲苯 II 脱蜡 15 min,然后依次置于无水乙醇、95%、85%和 75%乙醇中浸洗 5 min 以洗去二甲苯,再用蒸馏水浸洗 5 min 以去掉乙醇;用苏木素染 5~10 min,蒸馏水冲洗;PBS 缓冲液返蓝;用伊红染 3~5 min,蒸馏水冲洗;梯度乙醇脱水,每级 5 min,洗完后将片子烤干;取出后分

别置于二甲苯 I 和二甲苯 II 10 min;晾干后用中性树脂胶加盖玻片封片;显微镜下观察骨组织形态学变化。

2.4.4 ELISA 检测大鼠血清中炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 与 IL-6 含量 先将冻存的血清进行解冻,检测前 20 min,将 ELISA 试剂盒从 -20 °C 冰箱取出,室温平衡;然后配制洗涤液、标准品、生物素化抗体工作液、SABC 复合物工作液、TMB 显色液;最后通过加样、洗板、加抗体、洗板、加 SABC、洗板、加显色液与加终止液,测定血清中 TNF- α 、IL-1 β 与 IL-6 的含量。

2.4.5 qPCR 检测大鼠背根神经节中 TLR4 和 NF- κB p65 mRNA 表达水平 从 -80 °C 冰箱中取出背根神经节,在液氮预冷的研钵中迅速将背根神经节研磨成细粉,放入无 RNA 酶的离心管中,加入适量 Trizol,用电动匀浆器在冰上充分匀浆;RNA 提取严格按照 Trizol 试剂说明书操作步骤进行,流程为:匀浆 \rightarrow 氯仿分层 \rightarrow 异丙醇沉淀 RNA \rightarrow 75%乙醇洗涤 \rightarrow 溶解于无 RNA 酶的水中;使用 DNase I 对提取的总 RNA 进行处理,以彻底去除残留的基因组 DNA;以总 mRNA 为模板,使用逆转录试剂盒合成 cDNA;由生工生物工程(上海)股份有限公司合成引物,相应引物进行 qPCR 反应,以 β -actin 作为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 计算 TLR4 和 NF- κB p65 mRNA 的相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因名称	引物序列	引物长度/bp
TLR4	正向:TATCGGTGCTCACTGTGCTT	167
	反向:CTCGTTTCTCACCCAGTCCT	
NF- κB p65	正向:ACGCAAAAGGACCTACGAGA	171
	反向:ATGGTGCTGAGGGATGTTGA	
β -actin	正向:TAAAGACCTCTATGCCAACACACT	241
	反向:CACGATGGAGGGCCGACTCATC	

2.4.6 Western blot 检测大鼠背根神经节中 TLR4、MyD88、TRAF6、TAK1、p-NF- κB p65、p-IKK β 蛋白表达水平 取大鼠背根神经节组织,加入预冷的 RIPA 裂解液,于冰上静置 30 min 后,4 °C 离心 15 min,收集上清液;BCA 法测定蛋白浓度,调整样品至同一浓度,按 4:1 比例加入 5 \times SDS-PAGE 上样缓冲液,沸水浴变性 5 min,分装保存于 -80 °C;随后进行 SDS-PAGE 电泳(浓缩胶 80 V,分离胶 120 V);电泳结束后,采用湿转法将蛋白转移至 PVDF 膜上(恒流 200 mA,转膜时间根据蛋白分子量调整);转膜完成后,用 5%脱脂牛奶(溶于 PBST)室温封闭

90 min;随后分别加入以下一抗(用PBST稀释):TLR4(1:1 000)、MyD88(1:2 000)、NF- κ B p65(1:500)、p-NF- κ B p65(1:1 000)、IKK β (1:1 000)、p-IKK β (1:500)、TRAF6(1:200)、TAK1(1:500)和 β -actin(1:5 000),4℃孵育过夜;次日室温复温30 min后,用TBST洗涤3次,每次5 min;加入相应HRP标记的二抗(1:5 000),室温孵育90 min;再次TBST洗涤3次,每次5 min;洗涤完毕后,将ECL化学发光工作液均匀覆盖膜表面,避光反应1 min,用滤纸吸去多余液体后,置于凝胶成像系统中曝光并采集图像;使用ImageJ软件分析目的条带的灰度值,并以 β -actin作为内参进行标准化处理。

2.5 统计学分析

本研究所有数据均使用SPSS 26.0统计学软件进行分析,GraphPad Prism 9进行数据可视化。计量资料以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示;多组间比较采用One-Way ANOVA;若方差齐,两组间比较采用LSD- t 检验,方差不齐时采用Games-Howell法。以 $P<0.05$ 视为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠疼痛行为学比较

3.1.1 各组大鼠机械痛阈值比较 与假手术组相比,模型组、扶他林组及消肿止痛外敷散各剂量组的机械痛阈值均降低($P<0.05$);与模型组相比,扶他林组及消肿止痛外敷散各剂量组的机械痛阈值均升高($P<0.05$);与扶他林组相比,消肿止痛外敷散高、中剂量组的机械痛阈值均升高($P<0.05$),消肿止痛外敷散低剂量组的机械痛阈值降低($P<0.05$);与消肿止痛外敷散低剂量组相比,消肿止痛外敷散高、中剂量组的机械痛阈值均升高($P<0.05$)。详见表2。

表2 各组大鼠机械痛阈值比较($\bar{x}\pm s, n=8, g$)

Table 2 Comparison of the mechanical pain threshold among different groups of rats ($\bar{x}\pm s, n=8, g$)

组别	机械痛阈值
假手术组	231.15 \pm 5.57
模型组	61.59 \pm 3.79 [#]
扶他林组	164.49 \pm 1.90 ^{**}
消肿止痛外敷散低剂量组	149.21 \pm 4.23 ^{**Δ*}
消肿止痛外敷散中剂量组	181.80 \pm 2.06 ^{**Δ*}
消肿止痛外敷散高剂量组	192.86 \pm 4.61 ^{**Δ*}

注:与假手术组相比,[#] $P<0.05$;与模型组相比,^{*} $P<0.05$;与扶他林组相比,^{*} $P<0.05$;与消肿止痛外敷散低剂量组相比, ^{Δ} $P<0.05$ 。

3.1.2 各组大鼠热痛阈值比较 与假手术组相比,模型组、扶他林组及消肿止痛外敷散各剂量组热痛阈值降低($P<0.05$);与模型组相比,扶他林组及消肿止痛外敷散各剂量组热痛阈值升高($P<0.05$);与扶他林组相比,消肿止痛外敷散高、中剂量组热痛阈值升高($P<0.05$),消肿止痛外敷散低剂量组热痛阈值降低($P<0.05$);与消肿止痛外敷散低剂量组相比,消肿止痛外敷散高、中剂量组热痛阈值升高($P<0.05$)。详见表3。

表3 各组大鼠热痛阈值比较($\bar{x}\pm s, n=8, s$)

Table 3 Comparison of the thermal pain threshold among different groups of rats ($\bar{x}\pm s, n=8, s$)

组别	热痛阈值
假手术组	231.15 \pm 5.57
模型组	61.59 \pm 3.79 [#]
扶他林组	164.49 \pm 1.90 ^{**}
消肿止痛外敷散低剂量组	149.21 \pm 4.23 ^{**Δ*}
消肿止痛外敷散中剂量组	181.80 \pm 2.06 ^{**Δ*}
消肿止痛外敷散高剂量组	192.86 \pm 4.61 ^{**Δ*}

注:与假手术组相比,[#] $P<0.05$;与模型组相比,^{*} $P<0.05$;与扶他林组相比,^{*} $P<0.05$;与消肿止痛外敷散低剂量组相比, ^{Δ} $P<0.05$ 。

3.2 各组大鼠胫骨组织X线检查比较

假手术组骨组织结构正常,无肿瘤侵蚀征象;模型组骨质破坏严重,可见广泛的骨质溶解破坏区,部分区域出现肿瘤突破骨膜征象,伴周围软组织明显肿胀;与模型组相比,扶他林组与消肿止痛外敷散各剂量组胫骨的骨质破坏均有不同程度的减轻,其中消肿止痛外敷散高、中剂量组改善最明显。详见图1。

3.3 各组大鼠胫骨组织HE病理检测结果

假手术组骨组织结构完整,骨髓腔内骨细胞分布正常,骨小梁排列规则有序;模型组骨质显著破坏,肿瘤细胞广泛浸润,骨小梁结构紊乱或消失;扶他林组及消肿止痛外敷散各剂量组骨质破坏明显减轻,肿瘤细胞浸润减少,骨小梁结构部分恢复,其中消肿止痛外敷散高、中剂量组改善最明显。详见图2。

3.4 各组大鼠血清IL-1 β 、IL-6和TNF- α 含量比较

与假手术组相比,模型组、扶他林组及消肿止痛外敷散各剂量组大鼠血清IL-1 β 、IL-6和TNF- α 含量均升高($P<0.05$);与模型组相比,扶他林组及消肿止痛外敷散各剂量组大鼠血清IL-1 β 、IL-6和TNF- α 含量均降低($P<0.05$);与扶他林组相比,消肿

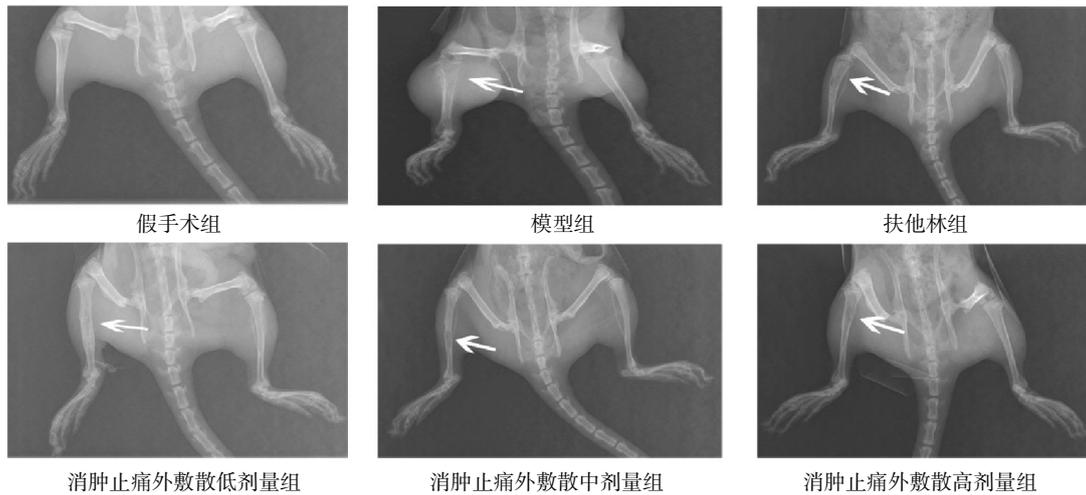


图 1 各组大鼠胫骨组织 X 线检查比较

Fig.1 Comparison of radiographic examination of tibial tissue among different groups of rats

注:图中箭头所指部位为骨破坏区域。

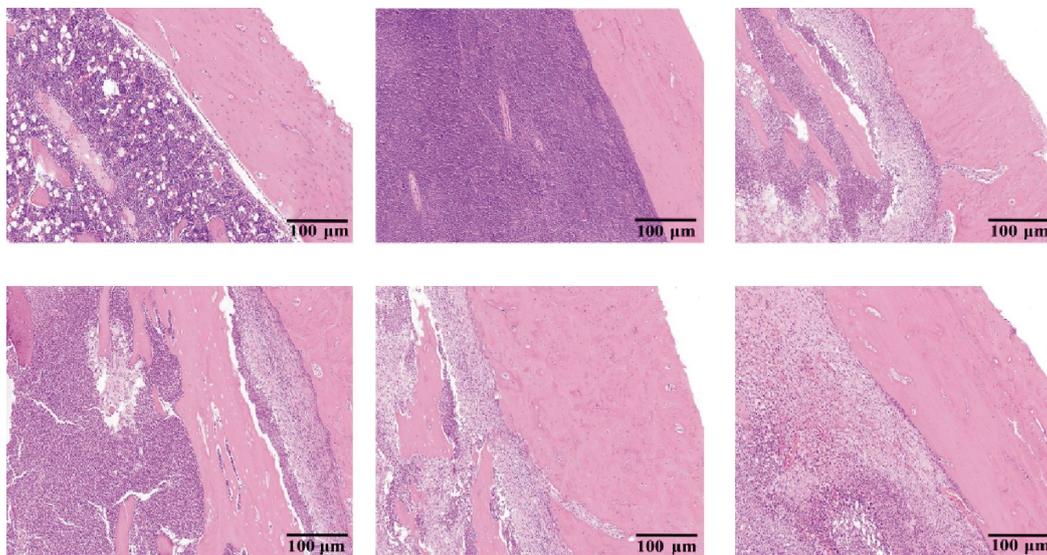


图 2 各组大鼠胫骨组织 HE 染色结果(x200)

Fig.2 HE staining results of rat tibial tissue in each group (x200)

止痛外敷散高、中剂量组大鼠血清 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 含量均降低(P<0.05),消肿止痛外敷散低剂量组大鼠血清 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 含量均升高

(P<0.05);与消肿止痛外敷散低剂量组相比,消肿止痛外敷散高、中剂量组大鼠血清 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 含量均降低(P<0.05)。详见表 4。

表 4 各组大鼠血清 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 含量比较(̄x±s, n=8, pg/mL)

Table 4 Comparison of rat serum levels of IL-1β, IL-6, and TNF-α among different groups of rats (̄x±s, n=8, pg/mL)

组别	IL-1β	IL-6	TNF-α
假手术组	245.70±13.64	391.92±19.77	391.45±26.12
模型组	627.21±31.52 [#]	1 073.25±39.01 [#]	964.85±27.03 [#]
扶他林组	449.33±30.27 ^{**}	656.99±24.08 ^{**}	620.30±31.76 ^{**}
消肿止痛外敷散低剂量组	528.76±17.02 ^{**△}	752.73±22.46 ^{**△}	770.23±12.21 ^{**△}
消肿止痛外敷散中剂量组	357.45±23.69 ^{**△}	562.63±36.20 ^{**△}	531.26±36.95 ^{**△}
消肿止痛外敷散高剂量组	350.52±25.35 ^{**△}	544.02±41.12 ^{**△}	516.73±33.13 ^{**△}

注:与假手术组相比,[#]P<0.05;与模型组相比,^{*}P<0.05;与扶他林组相比,[△]P<0.05;与消肿止痛外敷散低剂量组相比,[△]P<0.05。

3.5 各组大鼠背根神经节 TLR4 和 NF-κB p65 mRNA 表达水平比较

与假手术组相比,模型组、扶他林组及消肿止痛外敷散各剂量组 TLR4 和 NF-κB p65 mRNA 表达水平均升高($P<0.05$);与模型组相比,扶他林组及消肿止痛外敷散各剂量组 TLR4 和 NF-κB p65 mRNA 表达水平均降低($P<0.05$);与扶他林组相比,消肿止痛外敷散高、中剂量组 TLR4 和 NF-κB p65 mRNA 表达水平均降低($P<0.05$),消肿止痛外敷散低剂量组 TLR4 和 NF-κB p65 mRNA 表达水平均升高($P<0.05$);与消肿止痛外敷散低剂量组相比,消肿止痛外敷散高、中剂量组 TLR4 和 NF-κB p65 mRNA 表达水平均降低($P<0.05$)。详见表 5。

表 5 各组大鼠背根神经节 TLR4、NF-κB p65 mRNA 表达水平比较

Table 5 Comparison of the mRNA expression levels of TLR4 and NF-κB p65 in the DRG among different groups of rats

组别	TLR4	NF-κB p65
假手术组	0.57±0.09	0.75±0.02
模型组	1.49±0.15 [#]	2.05±0.11 [#]
扶他林组	0.97±0.09 ^{*#}	1.34±0.20 ^{*#}
消肿止痛外敷散低剂量组	1.14±0.09 ^{**△}	1.71±0.06 ^{**△}
消肿止痛外敷散中剂量组	0.82±0.01 ^{**△}	1.11±0.15 ^{**△}
消肿止痛外敷散高剂量组	0.71±0.13 ^{**△}	1.08±0.20 ^{**△}

注:与假手术组相比,[#] $P<0.05$;与模型组相比,^{*} $P<0.05$;与扶他林组相比,^{*} $P<0.05$;与消肿止痛外敷散低剂量组相比,[△] $P<0.05$ 。

3.6 各组大鼠背根神经节 TLR4、MyD88、TRAF6、TAK1、p-NF-κB p65、p-IKKβ 蛋白表达水平比较

与假手术组相比,模型组、扶他林组及消肿止痛外敷散各剂量组大鼠背根神经节 TLR4、MyD88、TAK1、TRAF6 蛋白表达水平以及 p-IKKβ/IKKβ、p-p65/p65 蛋白表达水平比值均升高($P<0.05$);与模型

组相比,扶他林组及消肿止痛外敷散各剂量组大鼠背根神经节 TLR4、MyD88、TAK1、TRAF6 蛋白表达水平以及 p-IKKβ/IKKβ、p-p65/p65 蛋白表达水平比值均下降($P<0.05$);与扶他林组相比,消肿止痛外敷散高、中剂量组大鼠背根神经节 TLR4、MyD88、TAK1、TRAF6 蛋白表达水平以及 p-IKKβ/IKKβ、p-p65/p65 蛋白表达水平比值均下降($P<0.05$),消肿止痛外敷散低剂量组大鼠背根神经节 TLR4、MyD88、TAK1、TRAF6 蛋白表达水平以及 p-IKKβ/IKKβ、p-p65/p65 蛋白表达水平比值均升高($P<0.05$);与消肿止痛外敷散低剂量组相比,消肿止痛外敷散高、中剂量组大鼠背根神经节 TLR4、MyD88、TAK1、TRAF6 蛋白表达水平以及 p-IKKβ/IKKβ、p-p65/p65 蛋白表达水平比值均下降($P<0.05$)。详见图 3、表 6。

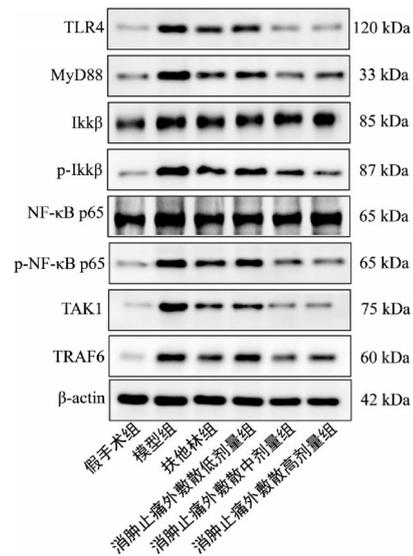


图 3 各组大鼠背根神经节 TLR4、MyD88、TAK1、TRAF6、p-IKKβ、p-NF-κB p65 蛋白条带图

Fig.3 Protein band images of TLR4, MyD88, TAK1, TRAF6, p-IKKβ, and p-NF-κB p65 in the DRG of each group of rats

表 6 各组大鼠背根神经节 TLR4、MyD88、TAK1、TRAF6、p-IKKβ、p-NF-κB p65 蛋白表达水平比较

Table 6 Comparison of the protein expression levels of TLR4, MyD88, TAK1, TRAF6, p-IKKβ, and p-NF-κB p65 in the DRG among different groups of rats

组别	TLR4	MyD88	TAK1	TRAF6	p-IKKβ/IKKβ	p-p65/p65
假手术组	0.23±0.05	0.35±0.05	0.25±0.07	0.15±0.03	0.18±0.06	0.23±0.02
模型组	0.90±0.05 [#]	0.99±0.04 [#]	1.23±0.10 [#]	1.10±0.05 [#]	0.95±0.09 [#]	1.02±0.06 [#]
扶他林组	0.61±0.05 ^{*#}	0.61±0.09 ^{*#}	0.75±0.03 ^{*#}	0.66±0.05 ^{*#}	0.52±0.08 ^{*#}	0.67±0.02 ^{*#}
消肿止痛外敷散低剂量组	0.72±0.07 ^{**△}	0.74±0.09 ^{**△}	0.96±0.08 ^{**△}	0.81±0.05 ^{**△}	0.69±0.06 ^{**△}	0.82±0.02 ^{**△}
消肿止痛外敷散中剂量组	0.37±0.05 ^{**△}	0.54±0.08 ^{**△}	0.43±0.09 ^{**△}	0.36±0.03 ^{**△}	0.44±0.06 ^{**△}	0.58±0.02 ^{**△}
消肿止痛外敷散高剂量组	0.37±0.04 ^{**△}	0.52±0.04 ^{**△}	0.40±0.07 ^{**△}	0.46±0.03 ^{**△}	0.35±0.06 ^{**△}	0.58±0.05 ^{**△}

注:与假手术组相比,[#] $P<0.05$;与模型组相比,^{*} $P<0.05$;与扶他林组相比,^{*} $P<0.05$;与消肿止痛外敷散低剂量组相比,[△] $P<0.05$ 。

4 讨论

中医学将骨转移癌痛归属于“骨瘤”“骨蚀”“骨痹”或“骨疽”等范畴^[20],其核心病机“瘀血阻滞骨骼,经络不通”与现代病理学认知存在深刻关联^[21]。所谓“瘀血阻滞”,在微观层面可阐释为局部微循环障碍与血液流变学异常,并由此引发组织缺氧及酸性代谢产物堆积^[22]。此病理微环境会进一步激活巨噬细胞等免疫细胞,促使 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 等促炎性细胞因子大量释放,这些因子直接刺激或敏化感觉神经末梢,放大疼痛信号,形成“瘀血 \rightarrow 缺氧/代谢产物堆积 \rightarrow 免疫激活 \rightarrow 炎症因子释放 \rightarrow 神经刺激 \rightarrow 疼痛”的恶性循环^[23]。因此,以“通络散结”为原则的活血化瘀法,其现代医学机制正是通过改善微循环、阻断上述炎症级联反应实现的。消肿止痛外敷散主要由活血化瘀、理气止痛、温经通络类药物组成,具有良好的止痛效果,由大黄、栀子、香附、南天仙子、乳香、没药等药物组成^[14]。药理学研究显示,消肿止痛外敷散所含活性成分如栀子苷、岩白菜素、大黄素具有明确的抗炎和镇痛作用^[24-26]。前期临床研究显示,该方联用盐酸羟考酮缓释片可有效缓解骨转移癌痛,并减少阿片类药物不良反应^[14]。

为深入验证其疗效并阐明机制,本研究通过行为学实验发现,消肿止痛外敷散能提高骨转移癌痛模型大鼠的热痛阈值与机械痛阈值,且高、中剂量组优于低剂量组,表明其镇痛作用明确并呈一定剂量依赖性。这不仅再次验证了其“治标”(提高痛阈)之效,更将研究推向“探本”层面,即揭示其作用的细胞内信号转导通路。

在骨转移癌痛机制中,促炎性细胞因子 IL-1 β 、TNF- α 与 IL-6 发挥关键作用。IL-1 β 可通过致敏痛觉感受器或促进神经元-胶质细胞间通信,诱导外周或中枢敏化^[27]。在骨癌模型大鼠中,脊髓中 IL-1 β 浓度显著上升,伴随热痛觉过敏(缩爪潜伏期缩短),提示其参与癌痛发生^[28]。TNF- α 作为 NF- κ B 通路的重要调控因子,在癌痛的发生发展中亦发挥关键作用^[29]。易丹等^[30]研究显示骨癌痛模型中 TNF- α 表达显著升高。临床研究进一步发现,中重度癌痛及远处转移患者血清中 TNF- α 水平升高,且在疼痛控制后该指标下降,提示其与癌痛程度相关^[31]。IL-6 作为常见炎症因子,在骨转移癌痛模型大鼠血清中的水平亦显著高于正常组^[19]。另一项研究报道,非小细胞肺癌患者血清 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平不仅高于健康对照组,且与疼痛程度呈正相关,提示炎症因子在癌痛发生与加重中具有重要作用^[32]。本研究

进一步发现,消肿止痛外敷散可降低骨转移癌痛大鼠血清中 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的含量,减轻炎症对外周伤害感受器的刺激,抑制外周敏化,从而发挥抗炎镇痛作用。与侯公瑾等^[19]报道蟾龙镇痛膏可降低骨癌痛大鼠 TNF- α 与 IL-6 的结果一致,本研究在此基础上进一步深入信号通路层面,证实该复方可显著下调背根神经节中 TLR4、MyD88、p-IKK β 、p-p65 等关键信号蛋白的表达。这表明其作用不仅限于拮抗下游炎症因子,更涉及上游信号通路的调控,机制研究更为系统。

骨转移癌痛是晚期肿瘤患者常见的难治性疼痛,其机制复杂,涉及炎症、神经病理性重塑及骨基质微环境破坏等多因素交互作用^[5]。研究表明,TLR4/NF- κ B 信号通路在此过程中扮演着核心角色,该通路的核心机制在于:骨转移灶微环境中的损伤相关分子模式(如高迁移率族蛋白 B1、热休克蛋白等)可激活模式识别受体 TLR4;被激活的 TLR4 通过下游的 MyD88 依赖途径,启动 NF- κ B 信号级联反应^[33]。活化的 NF- κ B 继而转位入核,驱动 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 等促炎性细胞因子的转录与释放,显著加剧局部炎症反应^[34]。此外,该通路的激活还直接参与痛觉敏化:一方面,上述炎症因子可直接作用于背根神经节神经元;另一方面,神经元自身的 TLR4 被激活后,能上调痛觉相关离子通道表达,共同导致外周敏化,从而放大并维持疼痛信号^[35]。本研究中,骨转移癌痛大鼠背根神经节中 TLR4/NF- κ B 通路被激活,而消肿止痛外敷散的干预有效抑制了该通路的活化,这与 PAN 等^[36]通过鞘内基因沉默 TLR4 来缓解骨癌痛的研究结论相互印证,揭示了该中药外治方能够通过非侵入性的外周干预,产生与靶向基因干预相似的下流抑制效应。

综上所述,本研究从“表”(行为痛阈)至“里”(分子通路)系统阐述了消肿止痛外敷散的镇痛机制。其疗效源于“活血”改善微循环与“抗炎”抑制 TLR4/NF- κ B 信号通路的双重作用,从而打破了“瘀血-炎症-疼痛”的恶性循环。后续研究拟采用 TLR4 抑制剂进行反向验证、分离活性单体并推进剂型改良,为该方的临床转化与中西医结合治疗癌痛提供更坚实的理论支持与实验支持。

参考文献

- [1] BRAY F, LAVERSANNE M, SUNG H, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA, 2024, 74(3): 229-263.
- [2] 左婷婷, 陈万青. 中国乳腺癌全人群生存率分析研究进展[J]. 中

- 国肿瘤临床, 2016, 43(14): 639-642.
- [3] MIAO L, ZHU Y D, CHANG H, et al. Nanotheranostics in breast cancer bone metastasis: Advanced research progress and future perspectives[J]. *Pharmaceutics*, 2024, 16(12): 1491.
- [4] MANTYH P W. Bone cancer pain: From mechanism to therapy[J]. *Current Opinion in Supportive and Palliative Care*, 2014, 8(2): 83-90.
- [5] KAPOOR R, SAXENA A K, VASUDEV P, et al. Cancer induced bone pain: Current management and future perspectives[J]. *Medical Oncology*, 2021, 38(11): 134.
- [6] POÇO GONÇALVES J, VEIGA D, ARAÚJO A. Chronic pain, functionality and quality of life in cancer survivors[J]. *British Journal of Pain*, 2021, 15(4): 401-410.
- [7] RUIVO J, TAVARES I, POZZA D H. Molecular targets in bone cancer pain: A systematic review of inflammatory cytokines[J]. *Journal of Molecular Medicine*, 2024, 102(9): 1063-1088.
- [8] 高哲健, 谢开宇, 徐义勇, 等. 蛇床子素对骨癌痛大鼠的镇痛作用及对TLR4/NF- κ B信号通路的影响[J]. *中医药导报*, 2022, 28(1): 25-30.
- [9] 张斌, 孙松娴, 陈轶尘, 等. 中药芷辛方对骨癌痛大鼠胶质细胞蛋白表达以及TLRs和NF- κ B的影响[J]. *中国中西医结合杂志*, 2015, 35(6): 704-711.
- [10] COLOSIA A, NJUE A, BAJWA Z, et al. The burden of metastatic cancer-induced bone pain: A narrative review[J]. *Journal of Pain Research*, 2022, 15: 3399-3412.
- [11] SNIJDERS R A H, BROM L, THEUNISSEN M, et al. Update on prevalence of pain in patients with cancer 2022: A systematic literature review and meta-analysis[J]. *Cancers*, 2023, 15(3): 591.
- [12] 刘树山, 劳正胤, 黄松松, 等. 癌理通膏外敷配合强阿片类止痛药对癌性骨痛的临床疗效观察[J]. *中国肿瘤临床与康复*, 2022, 29(6): 717-720.
- [13] 唐宗海. 血证论[M]. 魏武英, 李隽, 整理. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 86.
- [14] 王菲, 赖桂花, 聂多锐, 等. 消肿止痛外敷散局部外敷联合奥施康定口服治疗中重度骨转移癌痛42例临床观察[J]. *山东医药*, 2023, 63(21): 71-74.
- [15] MEDHURST S J, WALKER K, BOWES M, et al. A rat model of bone cancer pain[J]. *Pain*, 2002, 96(1/2): 129-140.
- [16] WU P, WU X Q, ZHOU G H, et al. P2X7 receptor-induced bone cancer pain by regulating microglial activity via NLRP3/IL-1 β signaling[J]. *Pain Physician*, 2022, 25(8): E1199-E1210.
- [17] 魏伟. 《药理实验方法学》[M]. 4版. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 17.
- [18] 侯公瑾, 柏正平, 曾普华, 等. 蟾龙镇痛膏对骨癌痛大鼠脊髓MAPK信号通路的影响[J]. *中国中医急症*, 2019, 28(9): 1567-1570.
- [19] 侯公瑾, 柏正平, 曾普华, 等. 蟾龙镇痛膏对骨转移性癌痛模型大鼠疼痛阈值及血清PGE2、TNF- α 、IL-6、 β -EP的影响[J]. *中药新药与临床药理*, 2019, 30(10): 1222-1227.
- [20] 李要远, 鲍艳举, 花宝金. 花宝金治疗骨癌痛经验探析[J]. *中华中医药杂志*, 2022, 37(10): 5779-5782.
- [21] 李要远, 郑红刚, 鲍艳举, 等. 以瘀为核心辨治癌痛[J]. *中医学报*, 2021, 36(11): 2281-2284.
- [22] 刘大凯, 王罡, 赵钢, 等. 血府逐瘀血清对大鼠背根神经元缺氧损伤的保护作用的研究[J]. *中国现代药物应用*, 2017, 11(20): 189-191.
- [23] JIN Q H, CHEN M R, KONG J, et al. Clinical and animal studies of waist and knee scraping therapy for knee osteoarthritis[J]. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 2024, 27(15): 2278-2294.
- [24] 赵燕, 杨扶德. 栀子苷药理作用及其作用机制研究进展[J]. *甘肃中医药大学学报*, 2021, 38(4): 89-92.
- [25] 朱琳, 罗倩, 刘华倩, 等. 岩白菜素及其衍生物抗肿瘤作用及机制研究进展[J]. *中国药理学杂志*, 2023, 58(22): 2028-2032.
- [26] 付时琛, 吴娜, 谭洁, 等. 鞘内注射大黄素纳米乳对骨癌痛大鼠的影响[J]. *湖北科技学院学报(医学版)*, 2023, 37(2): 99-103.
- [27] HELYES Z, TékUS V, SZENTES N, et al. Transfer of complex regional pain syndrome to mice via human autoantibodies is mediated by interleukin-1-induced mechanisms[J]. *PNAS*, 2019, 116(26): 13067-13076.
- [28] YU J C, LUO Y Y, JIN H D, et al. Scorpion alleviates bone cancer pain through inhibition of bone destruction and Glia activation[J]. *Molecular Pain*, 2020, 16: 1744806920909993.
- [29] 孙民朋, 施艾每, 徐方园, 等. 通络三生饮酊剂缓解癌性疼痛的作用及对IL-1 β 、TNF- α 和PGE2的影响[J]. *时珍国医国药*, 2025, 36(6): 1045-1049.
- [30] 易丹, 杜梦楠, 张欣, 等. 软坚止痛膏对于骨癌痛大鼠的镇痛作用及机制研究[J]. *辽宁中医杂志*, 2025, 52(2): 190-193.
- [31] 黄先达, 石围, 龚泉, 等. 癌痛控制前后致痛物质的表达及免疫功能改变的临床意义[J]. *中华全科医学*, 2022, 20(2): 212-215.
- [32] LIU Y M, GAO Y, LIN T. Expression of interleukin-1 (IL-1), IL-6, and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in non-small cell lung cancer and its relationship with the occurrence and prognosis of cancer pain[J]. *Annals of Palliative Medicine*, 2021, 10(12): 12759-12766.
- [33] BELLAVIA D, COSTA V, DE LUCA A, et al. The binomial "inflammation-epigenetics" in breast cancer progression and bone metastasis: IL-1 β actions are influenced by TET inhibitor in MCF-7 cell line[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(23): 15422.
- [34] 马成龙, 陈建平, 李航, 等. 氧化苦参碱对骨癌痛大鼠的镇痛作用及对TLR4/NF- κ B信号通路的影响[J]. *山西医科大学学报*, 2020, 51(4): 313-319.
- [35] SANA S R G L, LV C B, YU S S, et al. Epidural injection of varying doses of capsaicin alleviates inflammatory pain in rats via the TLR4/AKT/NF- κ B pathway[J]. *Inflammopharmacology*, 2025, 33(1): 257-267.
- [36] PAN R R, DI H T, ZHANG J M, et al. Inducible lentivirus-mediated siRNA against TLR4 reduces nociception in a rat model of bone cancer pain[J]. *Mediators of Inflammation*, 2015, 2015: 523896.