

短肽 P10581 对前列腺癌骨转移的镇痛效果及对吗啡镇痛耐受的影响

周思慧¹, 唐 瑞¹, 罗 静¹, 阮思蓓¹, 凌 凤¹, 唐 红¹, 柴 利¹, 刘 俊¹, 唐琼瑶⁴, 唐明希^{1,2,3}

1. 西南医科大学附属医院 病理科(泸州 646000); 2. 雅安市人民医院(四川大学华西医院雅安医院) 病理科(雅安 625000); 3. 重大疾病精准病理诊断泸州市重点实验室(泸州 646000); 4. 徐州医科大学江苏省麻醉学重点实验室(徐州 221004)

【摘要】目的 探讨短肽 P10581 对前列腺癌骨转移的镇痛效果及对吗啡镇痛耐受的影响。**方法** 首先, 将前列腺癌 PC3 细胞注入大鼠胫骨建立前列腺癌骨转移模型, 分组 ($n = 4$) 检测大鼠机械性缩足阈值 (paw withdrawal threshold, PWT), 筛选短肽 P10581 的最佳镇痛浓度, 并取大鼠背根神经节 DRG 神经元, Western blot 法检测压电蛋白 Piezo2 蛋白。其次, 大鼠模型随机分为吗啡组 ($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、P10581 A 组 ($6.4 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)、P10581 B 组 ($12.8 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 和生理盐水组 ($n = 10$), 皮下注射相应药物后, 每小时测量大鼠 PWT。另外, 大鼠模型随机分为吗啡组 ($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、复合用药 I 组 ($0.2 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ P10581 + $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 吗啡)、复合用药 II 组 ($0.4 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ P10581 + $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 吗啡)、生理盐水组 ($n = 10$), 记录皮下注射后 7 d 内大鼠 PWT。**结果** 短肽 P10581 对前列腺癌骨转移模型的最佳镇痛浓度为 $51.2 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 在此浓度下, 大鼠 DRG 神经元中 Piezo2 表达降低, 差异有统计学意义 ($t = 3.569, P < 0.05$)。在镇痛效果研究中, 给药后 3 h 内三组均有明显镇痛效果, 且吗啡组镇痛效果强于 P10581 A 组和 P10581 B 组; 第 4 h 时, 三组的镇痛效果无差异 ($P > 0.05$); 7 h 后, 与吗啡组相比, P10581 A 组 ($t = 11.60, P < 0.001$) 和 P10581 B 组 ($t = 28.84, P < 0.001$) 镇痛效果显著。在短肽 P10581 对吗啡耐受性影响的研究中, 单独使用吗啡时, 自第 2 d 起镇痛效果随时间减弱, 出现吗啡耐受; 微量短肽 P10581 与吗啡联合使用时, 相比吗啡组, 第 7 d 复合用药 I 组 ($t = 38.41, P < 0.001$) 和复合用药 II 组 ($t = 34.92, P < 0.001$) 的镇痛率分别提高了 61.31% 和 69.78%, 仍保持明显的镇痛效果。**结论** 相较于吗啡, 短肽 P10581 对前列腺癌骨转移的镇痛作用更具有时间优势, 并且微量短肽 P10581 可明显降低吗啡耐受性。

【关键词】 短肽 P10581; 骨癌痛; 吗啡; 前列腺癌; 镇痛

【中图分类号】 R965.1

文献标志码 A

DOI: 10.3969/j.issn.2096-3351.2024.06.011

Analgesic effect of short peptide P10581 on metastatic bone cancer pain and its effect on morphine analgesic tolerance

ZHOU Sihui¹, TANG Rui¹, LUO Jing¹, RUAN Sibei¹, LING Feng¹, TANG Hong¹, CHAI Li¹, LIU Jun¹,
TANG Qiongyao⁴, TANG Mingxi^{1,2,3}

1. Department of Pathology, The Affiliated Hospital, Southwest Medical University, Luzhou 646000, China; 2. Department of Pathology, Yaan People's Hospital (Yaan Hospital of West China Hospital of Sichuan University), Yaan 625000, China; 3. Precision Pathology Diagnosis for Serious Diseases Key Laboratory of Luzhou, Luzhou 646000, China; 4. Jiangsu Key Laboratory of anesthesiology, Xuzhou Medical University, Xuzhou 221004, China.

【Abstract】Objective To investigate the analgesic effect of short peptide P10581 on prostate cancer bone metastasis and its effect on morphine analgesic tolerance. **Methods** First, prostate cancer PC3 cells were injected into the tibia of rats to establish a bone metastasis model of prostate cancer, and the paw withdrawal threshold (PWT) was detected in groups ($n = 4$) to screen the optimal analgesic concentration of the short peptide P10581. Rat dorsal root ganglion DRG neurons were taken and the piezoelectric protein Piezo2 protein was detected by Western blot assay. Secondly, the rat models were randomly divided into the morphine group ($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), the P10581 A group ($6.4 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$), the P10581 B group ($12.8 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$), and the normal saline group ($n = 10$), and the PWT of rats was measured hourly after subcutaneous injection of the corresponding drug. In addition, the rat models were randomly divided into the morphine group ($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), the compound drug I group ($0.2 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ P10581 + $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ morphine), the compound drug II group ($0.4 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ P10581 + $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ morphine), and the normal saline group ($n = 10$), and the rat PWT was recorded within 7 days after subcutaneous injection. **Results** The optimal analgesic concentration of the short peptide P10581 in the bone metastasis model of prostate cancer was $51.2 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$, at which Piezo2 expression was reduced in rat DRG neurons, and the difference was statistically significant ($t = 3.569, P < 0.05$). In the analgesic effect study, the analgesic effect was obvious in the three groups within 3 h after administration,

基金项目: 国家自然科学基金(82371233); 四川省泸州市社会发展重点研发项目(2021-SYF-28); 江苏省特聘教授启动基金(53051117); 西南医科大学应用基础上项目(2021ZKMS031)

通信作者: 唐明希, E-mail: mxtang69@163.com; 唐琼瑶, E-mail: qiongyaotang@xzhmu.edu.cn

引用本文: 周思慧, 唐瑞, 罗静, 等. 短肽 P10581 对前列腺癌骨转移的镇痛效果及对吗啡镇痛耐受的影响[J]. 西南医科大学学报, 2024, 47(2): 521-526. DOI: 10.3969/j.issn.2096-3351.2024.06.011.

and the analgesic effect in the morphine group was stronger than that in the P10581 A group and the P10581 B group. At the 4th hour, there was no difference in analgesic effect between the three groups ($P > 0.05$). After 7 h, the analgesic effect was significant in the P10581 group A ($t = 11.60, P < 0.001$) and the P10581 group B ($t = 28.84, P < 0.001$), compared with the morphine group. In the study of the effect of short peptide P10581 on morphine tolerance, when morphine was used alone, the analgesic effect decreased with time from the 2nd day onwards, and morphine tolerance appeared. When the trace short peptide P10581 was combined with morphine, the analgesic rates of the compound drug I group ($t = 38.41, P < 0.001$) and the compound drug group II ($t = 34.92, P < 0.001$) increased by 61.31% and 69.78%, respectively, on the 7th day, with obvious maintained analgesic effects. **Conclusion** Compared with morphine, the analgesic effect of short peptide P10581 on bone metastasis of prostate cancer had a time advantage, and trace short peptide P10581 could significantly reduce morphine tolerance.

【Key words】 Peptide P10581, Bone cancer pain, Morphine, Prostate cancer, Analgesia

近年来,男性生殖系统中前列腺癌发病率逐年上升,79%的患者出现骨转移,其中近半数患者为初诊后骨转移^[1-2]。前列腺癌骨转移多位于盆骨、脊椎、股骨头及四肢骨骼中,伴随难以承受的骨癌疼痛^[3]。临床上,吗啡等阿片类镇痛药仍作为缓解骨转移患者疼痛的一线药物,但长期使用该类药物易诱发耐药性,主要为镇痛作用减弱,需增加药物用量才能实现同样的镇痛效果^[4]。同时,吗啡等阿片类镇痛药还会引起一系列的副作用,如成瘾、便秘、呼吸抑制等,从而造成临床上用药困难^[5]。因此,迫切需要研发可以替换吗啡或减低吗啡镇痛耐受的新药。短肽类药物具备镇痛效果显著、毒副作用小等优势,成为了各国学者研发镇痛药物的重点方向^[6]。本研究短肽 P10581 对前列腺癌骨转移癌痛大鼠的镇痛作用,并与吗啡联合应用,探索其对吗啡镇痛耐受的影响,为短肽 P10581 对前列腺癌骨转移疼痛的镇痛作用及减低吗啡镇痛耐受的药物临床试验奠定基础。

1 实验与方法

1.1 实验动物

雄性成年 SD 大鼠 40 只,180 g ~ 220 g,由西南医科大学动物实验中心供应(SCXK 川 2018-17)。饲养于 SPF 动物房,温度 18 ~ 22℃,空气相对湿度 40% ~ 60%,每天循环光照 12 h,具备良好通风和空气过滤器,自由饮水和进食。所有实验技术及实验方法均由西南医科大学伦理委员会审定,并按规定严格执行(伦理审批号:20210819-87)。

1.2 主要药品及仪器

短肽 P10581 由上海生工生物工程股份有限公司合成,纯度达到 98%;盐酸吗啡购自沈阳第一制药厂(批号:120909);PC3 前列腺癌细胞购自上海生物科技有限公司;氯化钠注射液购自四川科伦药业有效公司(批号:B20113109)。仪器包括 38500 - PAM 压力应用测量系统(Ugo Basile Biological Research Apparatus, Comerio - Varese, Italy)和光学显微镜(日本奥林巴斯)等。

1.2 前列腺癌骨转移模型的构建

大鼠经过 1w 适应性饲养后,参照 MEDHURST SJ 等^[7]报道的实验步骤进行肿瘤细胞植入手术。具体步骤为:首先将 SD 大鼠用 10% 水合氯醛麻醉,切开右侧胫骨上半部分的皮肤,使其裸露在外,以免造成肌肉和血管的损伤。用 4 # 针在距骨骺生长板远端 5 mm 处穿刺插入骨髓腔,然后将 10mL 微型注射器的针头插入骨髓腔,确认针在骨髓腔中,将 5 mL (1×10^5 /mL)的肿瘤细胞注入骨髓腔,注意观察有无细胞或血液从针口漏出。为使细胞充分扩散,针头停留 1 min 后退出骨髓腔,棉签压迫针眼 1 min,使用骨水泥封闭该部位。随后用针线分层缝合手术伤口,并用青霉素粉末处理创口后入笼饲养。

1.3 影像学和组织学

模型构建 20 d 后,先将戊巴比妥钠($45 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)注到 SD 大鼠腹腔中,将其固定于检测平板上,后肢充分伸直,进行 X 线检查。整个试验步骤完成后,将 SD 大鼠断颈处死,解剖大鼠的心、脑、肾、肝、肺、脾并剪下术侧后肢,仔细分离出胫骨肿瘤后放置在中性福尔马林溶液中固定 2 d(胫骨肿瘤放置于脱钙液中脱钙)。石蜡包埋,常规切片,HE 染色并在光镜下观察分析并照片记录。

1.4 机械缩足实验

大鼠适应环境 20 min 处于安静状态时,采用 38500 - PAM 压力应用测量系统测定癌痛大鼠的机械性缩足阈值(paw withdrawal threshold, PWT)。将圆锥尖端对准大鼠的右后足掌底部中央,用 30 gf/s 的恒定力量速率进行测定,最大测量时间设定为 15 s(当测量值大于 450 gf 时,会对大鼠造成损伤)。若受试大鼠 15 s 后仍未出现缩足反射,停止测量。每只 SD 大鼠间隔 5 ~ 10 min 测量 1 次,同样操作 3 次,最后取平均值。

1.5 实验分组及给药

1.5.1 短肽 P10581 镇痛浓度的筛选 参考甲状腺癌骨转移模型中短肽 P10581 多个药物浓度的测试方法^[8]。将造模成功的大鼠随机分为 11 组($n = 4$),皮下注射等量的生理盐水、P10581(0.2、0.4、0.8、1.6、3.2、6.4、12.8、

25.6、51.2 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)、吗啡(5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)。每种药物浓度注射1次,并分别在皮下注射前、后1 h测量每只SD大鼠的PWT。

1.5.2 检测镇痛后大鼠DRG神经元上Piezo2的表达 将注射生理盐水和短肽P10581(51.2 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)大鼠进行麻醉,背部朝上固定四肢,背部备皮后沿脊柱剪开皮肤,剔除周边肌肉组织,完全暴露柱骨,找到L4-S1位置,剪开椎板暴露出脊髓。将脊髓轻轻拨出,暴露出背根神经节,剪去横突,用尖镊轻轻夹出背根神经节DRG放入预冷的PBS中漂洗。剪碎DRG放置于研磨管,添加一定配比的RIPA裂解液和蛋白酶抑制剂PMSF以及1-2颗研磨珠,置于研磨机内震荡,随后冰上裂解约20 min。低温高速离心后,取上清溶液,用BCA法测蛋白质浓度。然后加入上清液1/4体积5×loading buffer,混匀后95°C金属浴10 min。用提取出来的蛋白进行western blot检测Piezo2蛋白含量。

1.5.3 短肽P10581的镇痛作用 40只造模成功的大鼠随机分为4组($n = 10$):生理盐水组、P10581 A组(6.4 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)、P10581 B组(12.8 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)和吗啡组(5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)。皮下局部注射后,记录每小时SD大鼠的PWT。

1.5.4 短肽P10581与吗啡联用对吗啡镇痛耐受的影响 造模后3 w左右,将大鼠随机分成生理盐水组、吗啡组(5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)、复合用药 I 组(0.2 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ P10581 + 5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 吗啡)、复合用药 II 组(0.4 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ P10581 + 5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 吗啡)4个组别($n = 10$)。每日早晚(8:00、16:00)一次皮下注射,并于给药后1 h测量每只SD大鼠PWT。镇痛百分率(%)=(给药后PWT - 给药前PWT)/给药前PWT×100%。

1.6 统计分析

SPSS26.0用于统计学分析,GraphPad Prism 8.0用来绘制图像。统计描述法采用($\bar{x} \pm s$)的结果表明,组内使用药物前后的比较采取配对 t 检验,各组对比采取单因素方差ANOVA分析,组间两两对比采取LSD- t 检验方法, $P < 0.05$ 代表差异存在统计学意义。

2 结果

2.1 前列腺癌骨转移大鼠模型构建成功

造模20 d后,X射线结果显示,与对侧胫骨相比,大鼠术侧骨质改变,其中术侧骨质缺损严重,骨密度明

显降低,骨边缘处呈弥散状,模糊不清;对侧骨质均匀,边界范围清晰可见,没有任何缺损,见图1A。组织病理切片HE染色显示,大鼠术侧骨髓腔内前列腺癌细胞呈巢状陈列,具有明显异型性,见图1B。另外,造模后定期双侧机械缩足测试结果表明,大鼠术侧PWT值随时间显著下降,到20 d左右疼痛阈值达到最低点,见图2。

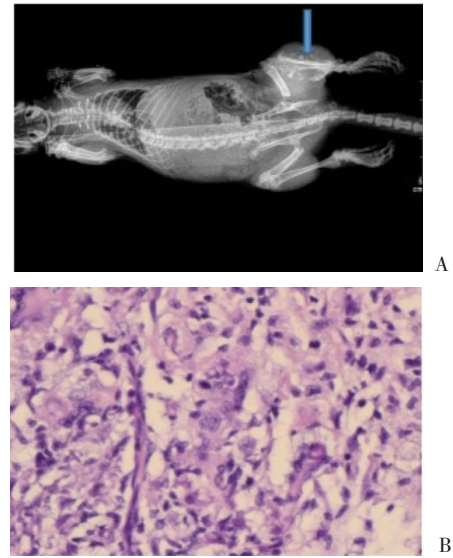


图1 前列腺癌骨转移大鼠模型构建

Figure 1 Construction of rat model of prostate cancer bone metastasis
注:A.X射线照射结果,蓝色箭头所指为接种PC3前列腺癌细胞的右侧胫骨;B.术侧胫骨HE染色病理切片(×400)。

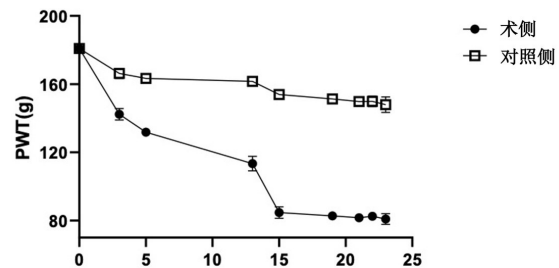


图2 大鼠术侧和对照侧机械性缩足阈值结果

Figure 2 Paw withdrawal threshold on the operated and control sides of rats
注:造模后第3、5、13、15、19、21、22、23 d同一时间大鼠术侧和对照侧机械性缩足阈值。

2.2 短肽P10581对骨癌痛模型大鼠镇痛浓度的筛选

在药物浓度为0.8 ~ 51.2 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的情况下,短肽P10581对骨转移癌痛大鼠具有明显的镇痛作用。在药物浓度为51.2 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时,PWT达到了(40.70 ± 0.67)g,差异最大,见表1。

表1 各浓度短肽P10581下骨转移癌痛模型大鼠PWT变化($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 1 PWT changes in model rats of bone metastasis cancer pain under the effect of various concentration of peptide P10581 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

阈值(g)	P10581($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)										吗啡
	生理盐水	0.2	0.4	0.8	1.6	3.2	6.4	12.8	25.6	51.2	
用药前	81.54 ± 1.48	82.80 ± 1.08	82.34 ± 1.02	82.65 ± 1.34	82.26 ± 1.48	81.81 ± 1.22	82.94 ± 1.00	81.14 ± 2.91	82.03 ± 1.39	81.98 ± 1.86	81.25 ± 4.50
用药后	82.65 ± 2.38	83.77 ± 1.39	85.11 ± 1.04	89.77 ± 1.30*	106.79 ± 1.62***	113.92 ± 0.87***	115.18 ± 1.94***	119.48 ± 1.76***	121.09 ± 1.73***	122.67 ± 1.75***	154.09 ± 3.80***
镇痛效果	1.08 ± 2.95	0.97 ± 2.08	2.77 ± 0.20	7.11 ± 1.08	24.53 ± 1.34	32.11 ± 1.32	32.23 ± 2.23	38.36 ± 6.77	39.06 ± 0.69	40.70 ± 0.67	72.84 ± 2.98

注:镇痛效果(g)=用药后PWT(g)-用药前PWT(g);与用药前相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$ 。

2.3 DRG 神经元中 Piezo2 的表达

通过 western blot 方法检测大鼠背根神经节神经元中 Piezo2 蛋白的表达量。相较于生理盐水组大鼠,使用最佳镇痛浓度的短肽 P10581 ($51.2 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) 的大鼠在机械刺激后 DRG 神经元中 Piezo2 表达降低,差异有统计学意义 ($t = 3.569, P < 0.05$),如图 3 所示。此结果证明短肽 P10581 降低大鼠机械刺激痛可能是通过抑制压电离子通道传导,从而提高骨转移癌痛大鼠对机械刺激的痛觉感受。

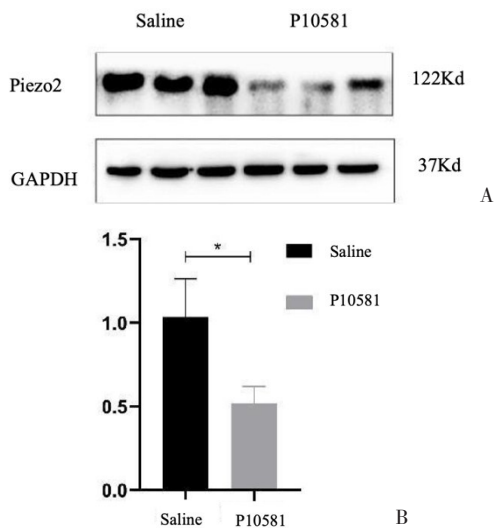


图3 大鼠背根神经节 Piezo2 蛋白表达

Figure 3 Piezo2 protein expression in dorsal root ganglion of rats
注:A: Piezo2 蛋白 WB 检测条带; B: Piezo2 蛋白量统计学分析。

2.4 短肽 P10581 对前列腺癌骨转移疼痛大鼠的镇痛作用

为比较多肽与吗啡的镇痛效果,我们选用了非最佳镇痛浓度的短肽 P10581 ($6.4 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) 和 P10581 ($12.8 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) 以及吗啡 ($5 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 用于疼痛大鼠的腹腔注射,并在给药后 7 h 观察并测试 PWT 值。吗啡组在腹腔注射后 2 h 镇痛作用最大 ($t = 84.24, P < 0.001$), 随时间慢慢减弱,到第 7 h 时 PWT 值接近生理盐水组,镇痛效力近乎消失,如图 4 所示。P10581 ($6.4 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) A 组和 P10581 ($12.8 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) B 组起始时镇痛效果没有吗啡强烈,但镇痛效果稳定持续,4 h 后镇痛效果甚至高于吗啡 (P10581 A 组: $t = 11.60, P < 0.001$; P10581 B 组: $t = 28.84, P < 0.001$), 反映出短肽 P10581 具有长效镇痛作用。

2.5 短肽 P10581 对吗啡镇痛耐受性的影响

通过比较多浓度梯度短肽 P10581 对癌痛大鼠镇痛效果的试验中,发现 $0.2 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 和 $0.4 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ P10581 对大鼠的镇痛效果微弱,见图 5A。为进一步探究短肽是否能够影响吗啡耐受性,选择上述两浓度分别与 $5 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 吗啡共同应用。研究结果显示,与生理盐水组相比,吗啡组第 1 d 起镇痛效果最强,差异有统计学意义 ($t = 62.19, P < 0.001$), 随后镇痛效果随时间持续减退,至第 7 d 吗啡完全耐受,其 PWT 值与生理盐

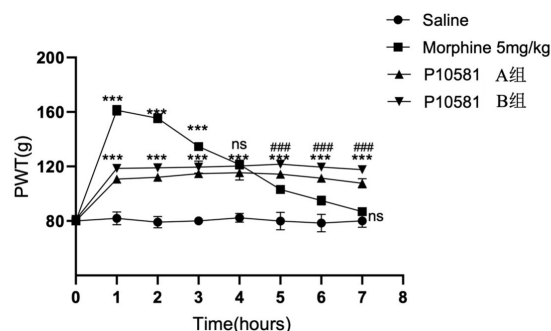


图4 大鼠皮下给药后不同时间点 PWT 比较

Figure 4 Comparison of PWT at different time points after subcutaneous administration in rats

注: *与生理盐水组相比, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; #与吗啡组相比, ## $P < 0.01$ 。

水组重叠,无显著性差异 ($P > 0.05$); 与生理盐水组相比,复合用药 I 组和复合用药 II 组具有显著镇痛效果,见图 5B ($t_I = 38.41, P_I < 0.001$; $t_{II} = 34.92, P_{II} < 0.001$)。与吗啡组比较,复合用药 I 组和复合用药 II 组镇痛作用比较平稳,第 7 d 时其 PWT 值分别提高了约 50.11 g 和 57.03 g,镇痛率分别增加 61.31% 和 69.78%,见图 5B、图 5C。这一结果表明, $0.2 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 和 $0.4 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ P10581 与吗啡结合能显著降低吗啡的镇痛耐受性,增强吗啡的镇痛效应,且 $0.4 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ P10581 与吗啡结合的镇痛效应更强。

2.6 镜下观察短肽 P10581 对大鼠的病理毒性

在实验后,我们对注射了 P10581 大鼠的心、脑、肾、肝、肺、脾等重要脏器进行了病理检查,没有发现明显的病理学变化,见图 6。

3 讨论

近年来阿片类药物滥用现象成为了棘手的公共卫生问题,使得止痛药物面临严峻挑战^[9-10]。基于对疼痛机理的认识,医学界学者从阿片受体、离子通道、激酶受体等多个方面探寻相应的镇痛药物^[6]。研究表明生物膜离子通道的构象变化和疼痛感受密切相关,包括了钠离子通道、钾离子通道、钙离子通道、酸性敏感离子通道以及机械力敏感离子通道等^[11]。镇痛效果佳、副作用小的天然肽逐渐获得青睐,例如 2004 年经 FDA 批准上市的齐考诺肽 (Ziconotide), 即一种阻断神经中的 N 型钙通道达到镇痛目的的芋螺毒素合成肽^[12-13]。另外,最近的实验结果也证实,针对 NMDaR 离子通道的天然肽 CTX-ac1 和 CTX-ac1-o6P 在热板法和甩尾法实验上均显示出了良好的镇痛作用,并呈现出剂量依赖性。但即使是最高剂量的天然肽 CTX-ac1 和 CTX-ac1-o6P 仍然低于阳性对照组吗啡 ($1 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 的镇痛效果^[14]。

在前期研究中,我们从智利蔷薇蜘蛛毒液中分离得到多肽 GsMTx4,它是机械反射和运动加压反射相关

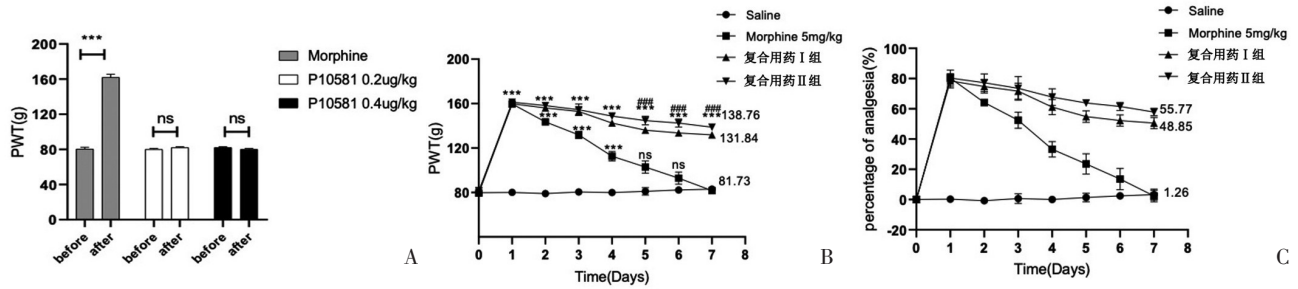


图5 短肽P10581对吗啡镇痛耐受性的影响

Figure 5 Effect of short peptide P10581 on the analgesic tolerance of morphine

注:A:吗啡和微剂量短肽P10581用药前后对比,*** $P < 0.001$; B:吗啡组与复合用药组对癌痛大鼠PWT的影响(与生理盐水组相比,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$;与吗啡组相比,### $P < 0.001$); C:吗啡组与复合用药组对骨癌痛模型大鼠PWT提高率的比较。

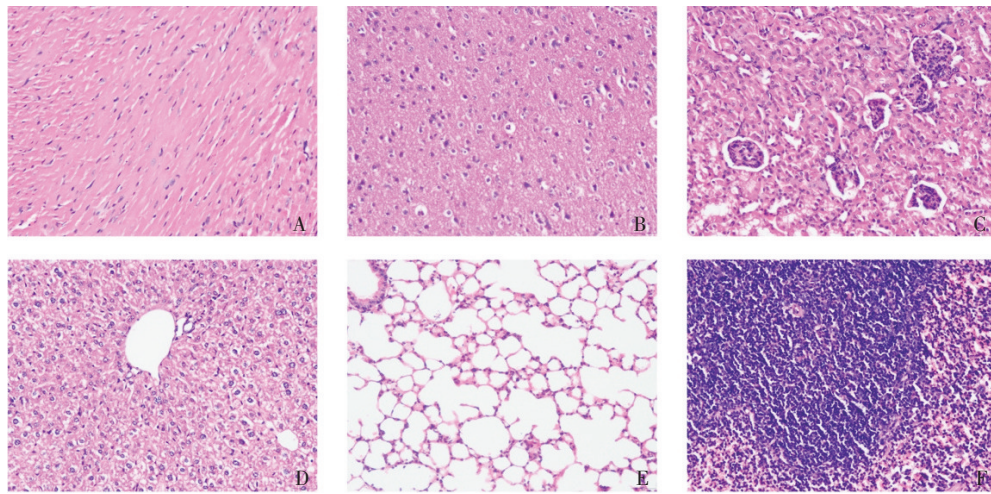


图6 短肽P10581大鼠的心、脑、肾、肝、肺、脾HE染色

Figure 6 HE staining of heart, brain, kidney, liver, lung, and spleen of short peptide P10581 rats

注:A:心; B:脑; C:肾; D:肝; E:肺; F:脾。

的机械激活通道的选择性抑制剂^[15-16]。GsMTx4通过表面环绕的疏水残基(belt)插入到细胞膜的双脂分子层,以改变通道蛋白与相邻脂质间的交互作用,进而调节离子通道的结构和功能^[17]。基于GsMTx4的特性,我们设计了一种含有loop2和loop3的短肽,并在保持loop1中Trp-7和Lys-8的基础上,将其命名为P10581(专利号:US 11,612,634 B2美国、ZL201611128087.6及CN202110341838.7)^[18-20],它是由34个氨基酸组成的两个互连环(4个loop)组成,包含6个半胱氨酸,并用二硫键结合形成3个胱氨酸结,这是天然毒液萃取短肽的共同特征,以提高肽的稳定性。

本实验探讨了P10581对前列腺癌骨转移疼痛的镇痛作用。结果显示,在远低于吗啡($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)给药剂量的情况下,短肽P10581($6.4 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 及 $12.8 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)对前列腺癌骨转移癌痛模型大鼠镇痛作用显著,且更稳定和持久。同时,本试验还选取了对骨转移癌痛无镇痛作用的超微剂量短肽P10581($0.2 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和 $0.4 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)与吗啡联合用药,探讨其对吗啡镇痛耐受性的影响。结果表明,与吗啡单用相比,复合用药能更稳定、持久、有效。这表明微量短肽P10581与吗啡的联合应用,能有效地减少吗啡的耐受,并能与吗啡协同

镇痛。此结果与李丽等的研究结果相同^[8],但具体作用机制尚不清楚,今后将继续对其作用机制以及成瘾性等副作用进一步研究。

机械敏感性离子通道是将机械力转化为生物电学信号进行机械传导的重要分子,其中包括Piezo通道、瞬时感受器电位(TRP)通道、双孔钾离子(TREK/TRaK)通道、毛细胞机械转导通道(TMC1/2)通道等^[21-22]。Piezo通道能够接受机械刺激,将机械信号转化为细胞内的生物电活动,引起特定的生物学效应。涉及多种细胞类型、生理过程、相关离子通道、疾病和药理^[23]。Piezo2是一种机械转换器,主要分布于背根神经节细胞、Merkel细胞、体神经元细胞等,它可以通过感觉神经元在机械性异位疼痛、神经病理性疼痛和触觉痛中发挥重要作用。在机械刺激下,Piezo2能够将机械信号转化为电信号,介导痛觉的产生。Merkel细胞-神经轴突复合体通过机械敏感的Piezo2通道介导触觉传导,间接证明了Piezo2通道介导机械性疼痛^[21,23-24]。基于此我们认为Piezo通道,特别是Piezo2通道,有可能在机械反射中起到一定的作用。

短肽P10581是根据GsMTx-4设计而来,GsMTx-4是Piezo通道的非特异性拮抗剂^[25-26],由此我们推测短

肽P10581会抑制Piezo通道从而实现镇痛。我们观察了Piezo2蛋白在注射后受到机械刺激后的背根神经节细胞中的表达,发现相对生理盐水组,注射短肽P10581的大鼠背根神经节细胞中Piezo2蛋白表达降低,提示短肽P10581减少机械力所致的疼痛可能与Piezo2相关。我们将在以后的研究中深入探讨它的具体作用机理。

在实验最后,我们对实验大鼠的主要脏器,如心、脑、肾、肝、肺、脾等,进行了组织病理学检查,并没有发现任何病理改变。

4 结论

短肽P10581对前列腺癌骨转移大鼠顽固性疼痛具有较好的镇痛效果,与吗啡复合用药能够显著降低吗啡耐受性,且大鼠的重要脏器没有发生明显的病理变化。今后,我们将深入探讨P10581的镇痛机理,与机械敏感性离子通道的关系,以及探讨联合用药减少吗啡耐受性原理。

5 参考文献

[1] 邓宇琳,王菊勇,蔡婷婷. OPG-RANKL-RANK系统与骨癌痛的研究进展[J]. 现代肿瘤医学,2017,25(24): 4079-4081.
[2] SIEGELI RL, MILLER KD, JEMAL A. Cancer statistics, 2019[J]. *Ca Cancer J Clin*, 2019, 69(1): 7-34.
[3] 陆海健,周勇,林红萍,等. ^{99m}Tc-MDP SPECT/CT显像定量分析对前列腺癌骨转移的诊断价值以及SUV的一致性研究[J]. 浙江医学,2023,45(11): 1152-1156.
[4] 赵诗雯,田学復. 吗啡耐受的形成机制及治疗进展[J]. 中国疼痛医学杂志,2017,23(3): 210-214.
[5] SCHAEFER CP, TOME ME, DAVIS TP. The opioid epidemic: a central role for the blood brain barrier in opioid analgesia and abuse[J]. *Fluids Barriers CNS*, 2017, 14(1): 32.
[6] 方泉,李宁,许彪,等. 多靶点肽类镇痛药物的研究进展[J]. 药学进展,2019,43(10): 726-737.
[7] MEDHURST SJ, WALKER K, BOWES M, et al. A rat model of bone cancer pain[J]. *Pain*, 2002, 96(1-2): 129-140.
[8] 李丽,唐琼瑶,阮思蓓,等. 短肽P10581对大鼠甲状腺癌转移性骨癌痛的镇痛作用及对吗啡耐受的影响[J]. 现代肿瘤医学, 2022, 30(21): 3868-3873.
[9] SOELBERG CD, BROWN RE Jr, DU VIVIER D, et al. The US opioid crisis: current federal and state legal issues[J]. *Anesth Analg*, 2017, 125(5): 1675-1681.
[10] LYDEN J, BINSWANGER IA. The United States opioid epidemic[J]. *Semin Perinatol*, 2019, 43(3): 123-131.

[11] 吴鹏翔,谢健豪,郭雅茹,等. 镇痛短肽类分子研究进展[J]. 药学进展,2017,41(12):934-942.
[12] SCHEINGART CD, LAU JL. From natural peptides to market [M]//Annual Reports in Medicinal Chemistry. Amsterdam: Elsevier, 2017: 543-586.
[13] SAFAVI-HEMAMI H, BROGAN SE, OLIVERA BM. Pain therapeutics from cone snail venoms: from Ziconotide to novel non-opioid pathways[J]. *J Proteomics*, 2019, 190: 12-20.
[14] LIU XJ, YAO G, WANG K, et al. Structural and functional characterization of conotoxins from *Conus achatinus* targeting NMDAR[J]. *Mar Drugs*, 2020, 18(3): 135.
[15] COPP SW, KIM JS, RUIZ-VELASCO V, et al. The mechanogated channel inhibitor GsMTx4 reduces the exercise pressor reflex in decerebrate rats[J]. *J Physiol*, 2016, 594(3): 641-655.
[16] COPP SW, KIM JS, RUIZ-VELASCO V, et al. The mechanogated channel inhibitor GsMTx4 reduces the exercise pressor reflex in rats with ligated femoral arteries[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2016, 310(9): H1233-H1241.
[17] NISHIZAWA K, NISHIZAWA M, GNANASAMBANDAM R, et al. Effects of Lys to Glu mutations in GsMTx4 on membrane binding, peptide orientation, and self-association propensity, as analyzed by molecular dynamics simulations[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1848(11 Pt A): 2767-2778.
[18] TANG QY, ZHANG Z, CHEN C, et al. Pharmaceutical composition and method for relieving/eliminating morphine-induced analgesic tolerance [P]. USA, US 11,612,634 B2.
[19] 唐琼瑶,张赅,唐明希,等. 一种具有缓解吗啡在神经病理性疼痛中的镇痛耐受性的短肽及其应用 [P]. 中国, CN202110327612.1, 2021-05-28.
[20] 唐琼瑶,张赅,陈晨,等. 一种短肽在制备具有消除吗啡耐受性作用的产品中的应用 [P]. 中国, CN202011458379.2, 2021-03-19.
[21] 赵钟涵,杜玉香,张玲莉. 机械敏感性离子通道蛋白Piezo1响应力学刺激的研究进展[J]. 生命的化学, 2021, 41(4): 804-811.
[22] GUO J, GU DM, ZHAO TT, et al. Trends in piezo channel research over the past decade: a bibliometric analysis[J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 668714.
[23] 徐曼秋,费素娟. 机械敏感性离子通道Piezo2的研究进展[J]. 安徽医药, 2019, 23(2): 217-221.
[24] SZCZOT M, NICKOLLS AR, LAM RM, et al. The form and function of PIEZO2[J]. *Annu Rev Biochem*, 2021, 90: 507-534.
[25] BAE C, SACHS F, GOTTLIEB PA. The mechanosensitive ion channel Piezo1 is inhibited by the peptide GsMTx4[J]. *Biochemistry*, 2011, 50(29): 6295-6300.
[26] COSTE B, MATHUR J, SCHMIDT M, et al. Piezo1 and Piezo2 are essential components of distinct mechanically activated cation channels[J]. *Science*, 2010, 330(6000): 55-60.

(利益冲突:无)

(收稿日期:2023-03-12;修回日期:2024-09-23)