

基于网络药理学和实验验证研究壮骨镇痛胶囊 治疗骨转移癌痛的活性成分和作用机制

赖桂花^{1,2,3,4}, 曹建雄¹, 周君^{3,4},
王菲^{1,2}, 聂多锐^{1,2}, 文玲¹, 马漪^{1*}

¹湖南中医药大学第一附属医院, 长沙 410007; ²湖南中医药大学, 长沙 410208;

³南华大学衡阳医学院附属第一医院康复医学中心; ⁴南华大学衡阳医学院附属第一医院康复医学科, 衡阳 421001

摘要:利用网络药理学和实验验证揭示壮骨镇痛胶囊治疗骨转移癌痛的活性成分及作用机制。首先,运用中药系统药理学数据库平台(TCMSP)和中药分子机制的生物信息学分析工具(BATMAN-TCM)获取壮骨镇痛胶囊的化学成分及靶点, GeneCards 数据库获得骨转移癌痛的疾病靶点, 然后通过 Venn、Cytoscape、String 及 DAVID 数据库分析壮骨镇痛胶囊治疗骨转移癌痛的潜在活性成分、核心靶点及作用通路之间的关系, 使用 Auto Dock 进行分子对接分析, 最后通过建立骨转移癌痛大鼠模型进行实验验证。网络药理学结果显示壮骨镇痛胶囊治疗骨转移癌痛的活性成分可能为槲皮素、木犀草素、异补骨脂素, 关键靶点可能为蛋白激酶 B (protein kinase B, AKT1)、肿瘤蛋白 53 (tumor protein 53, TP53)、表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 等, 主要富集于丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK)、磷脂酰肌醇激酶 (phosphatidylinositol 3 kinase, PI3K)-AKT、核因子 κ B 受体 (nuclear factor kappa B, NF- κ B) 等通路。实验结果表明壮骨镇痛胶囊及其活性成分能有效改善骨转移癌痛大鼠的疼痛行为和骨质破坏, 降低 PI3K、p-AKT1/AKT1、p-P38/P38、磷酸化-胞外信号调节激酶 1/2 (phosphorylation-extracellular signal regulated kinase, p-ERK1/2)/ERK1/2、p-c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK)/JNK、p-P65/P65 及 p-人核因子 κ B 抑制蛋白 α (inhibitor of nuclear factor- κ B α , p-IKB α)/IKB α 的蛋白表达水平 ($P < 0.05$)。因此, 壮骨镇痛胶囊及其活性成分槲皮素、木犀草素和异补骨脂素能有效改善骨转移癌痛, 其作用机制可能与抑制 MAPK、PI3K-AKT 及 NF- κ B 通路有关。

关键词: 壮骨镇痛胶囊; 骨转移癌痛; 网络药理学; 分子对接; 作用机制

中图分类号: R273

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2024)12-2145-14

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2024.12.015

Active ingredient and mechanism of Zhuanggu Zhentong capsule in the treatment of cancer-induced bone pain based on network pharmacology and experimental verification

LAI Gui-hua^{1,2,3,4}, CAO Jian-xiong¹,
ZHOU Jun^{3,4}, WANG Fei^{1,2}, NIE Duo-ru^{1,2}, WEN Ling¹, MA Yi^{1*}

¹The First Affiliated Hospital of Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410007, China;

²Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208, China;

³Rehabilitation Medicine Center, the First Affiliated Hospital, Hengyang Medical School, University of South China;

⁴Department of Rehabilitation, the First Affiliated Hospital, Hengyang Medical School, University of South China, Hengyang 421001, China

Abstract: This study aims to reveal the active ingredients and mechanism of action of Zhuanggu Zhentong capsule in the treatment of cancer-induced bone pain by using network pharmacology and experimental verification. Firstly, the Traditional Chi-

收稿日期: 2024-04-12 接受日期: 2024-09-26

基金项目: 湖南省重点研发计划(2018SK2127); 湖南省自然科学基金青年项目(2023JJ40595); 南华大学临床医学 4310 项目; 中国博士后科学基金第 75 批面上项目(1353)

* 通信作者 E-mail: 310303@hnuucm.edu.cn

nese Medicine Systems Pharmacology Platform (TCMSP) and the bioinformatics analysis tool for molecular mechanics of traditional Chinese medicine (BATMAN-TCM) were used to obtain the chemical composition and targets of the Zhuanggu Zhentong capsule. The GeneCards database was used to obtain the disease targets of cancer-induced bone pain. Then, the relationship between the potential active ingredients, core targets, and action pathways of Zhuanggu Zhentong capsule in treating cancer-induced bone pain were analyzed using Venn, Cytoscape, String, and DAVID databases. Perform molecular docking analysis using Auto Dock, and finally validate the experimental results by establishing a rat model of cancer-induced bone pain. The results of network pharmacology show that the active ingredients of Zhuanggu Zhentong capsule for treating cancer-induced bone pain may be quercetin, luteolin, and angelicin, and the key targets may be protein kinase B (AKT1), tumor protein 53 (TP53), epidermal growth factor receptor (EGFR), which mainly enriched in mitogen-activated protein kinase (MAPK), phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K)-AKT, nuclear factor kappa B receptor (NF- κ B) and other pathways. The *in vivo* experimental results showed that Zhuanggu Zhentong capsule and their active ingredients can effectively improve the pain behavior and bone destruction of rats with cancer-induced bone pain, reduce the protein expression levels of PI3K, p-AKT1/AKT1, p-P38/P38, phosphorylation extracellular signal regulated kinase 1/2 (p-ERK1/2)/ERK1/2, p-c-Jun N-terminal kinase (JNK)/JNK, p-P65/P65, and p-inhibitor of nuclear factor kappa B α (p-IKB α)/IKB α ($P < 0.05$). Therefore, Zhuanggu Zhentong capsule and their active ingredients quercetin, luteolin, and angelicin can effectively improve the pain of cancer-induced bone pain, and their mechanism of action may be related to the inhibition of MAPK, PI3K-AKT, and NF- κ B pathways.

Key words: Zhuanggu Zhentong capsule; cancer-induced bone pain; network pharmacology; molecular docking; mechanism of action

骨转移癌痛(cancer-induced bone pain, CIBP)是肿瘤转移至骨引起的疼痛,性质顽固,痛势剧烈,难以缓解,常见于乳腺癌、前列腺癌、肺癌等,严重影响患者生活质量及心理状态,同时也给患者家庭和社会带来沉重的医疗负担^[1]。现代医学治疗骨转移癌痛以三阶梯止痛药物为主,临床上发现三阶梯止痛药物虽然止痛效果明显,但是长期服用后易产生耐药、成瘾及恶心、呕吐、便秘、疲劳、嗜睡、呼吸抑制等毒副反应^[2],同样姑息放疗、双膦酸盐类药物等治疗措施也未能取得理想的长期疗效,仍有约45%的骨转移癌痛患者没有得到有效的镇痛^[3]。因此,如何对骨转移癌痛进行有效、安全、合理的治疗,是当今临床亟需解决的问题。

本项目组自2004年起致力于“骨转移癌痛”的中医治疗研究,通过对大量骨转移癌痛的中医临床证候分析发现骨转移癌痛的病理本质为本虚标实,本虚以“肾虚”为主,肿瘤患者多因癌毒侵犯机体,使得五脏气血阴阳失调,其中肾为人体阴阳之根本,肾主骨生髓,肾精充足则骨髓生化有源,癌病日久耗伤肾精,肾精亏虚,则不能充骨生髓,骨骼失养,骨络空虚则易形成疼痛。同时,癌症日久,骨失营养,易受寒湿之邪侵袭,导致气血运行不畅,日久湿凝成痰,血结为瘀,痰瘀蕴结骨内,经络不通而痛。因此,骨转移癌痛的治疗应以补肾壮骨为核心,并辅以化痰通络、活血化瘀。壮骨镇痛胶囊(Zhuanggu zhent-

ong capsule, ZGZTC)是本课题组治疗骨转移癌痛的经验方,临床上经过多年反复验证取得了一定的临床疗效,且获得了患者较好的反馈,但壮骨镇痛胶囊治疗骨转移癌痛的活性成分及作用机制尚未完全阐明。网络药理学通过挖掘公共数据库中的药物和疾病数据,分析药物的有效成分和相关疾病的靶基因,研究药物治疗疾病可能的作用机制,这与中医治病的“整体观”理论及中药多成分、多靶点、多途径的特点具有一致性,对于揭示中药及复方治疗疾病的作用机制研究具有重要意义^[4]。因此,本研究通过网络药理学初步明确壮骨镇痛胶囊治疗骨转移癌痛的活性成分、靶点及作用通路,利用分子对接技术预测壮骨镇痛胶囊活性成分和核心靶点之间的结合力,然后通过体内实验对网络药理学结果进行初步验证,为揭示壮骨镇痛胶囊治疗骨转移癌痛的机制提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料与仪器

1.1.1 数据库与软件

TCMSP 数据库 (<https://tcmospw.com/tcmosp.php>)、PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)、GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org/>)、Venn 在线软件 (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>)、UniProt 数据库 (<https://www.uniprot.org/>)、String 数据库 (

db.org/)、DAVID 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov>)、微生信在线平台 (<http://www.bioinformatics.com.cn>)、Cytoscape3. 7. 2、OpenBabel2. 4. 2、Auto Dock4. 2. 6、PyMOL 软件。

1. 1. 2 实验试剂与仪器

1. 1. 2. 1 试剂

壮骨镇痛胶囊:湖南中医药大学第一附属医院制剂科(批号:20181016,规格:0.45 g×24 粒/瓶);槲皮素、异补骨脂素、木犀草素(上海源叶生物科技有限公司,货号分别为 B20527-1 g、B21515-200 mg、B20887-1 g);唑来膦酸注射剂(扬子江药业集团,批号 22071101,国药准字 H20123153,规格:每支 5 mL:4 mg);注射用青霉素钠(哈药集团,批号:H23021439);ERK1/2、p-ERK1/2、JNK、p-JNK、P38、p-P38、P65、p-P65、PI3K、AKT1、p-AKT1、 β -actin(CST 公司,批号分别为 4695S、4370S、9252S、4668S、8690S、4511S、8242S、3033S、4249S、44691S、4060S、3700S);山羊抗兔/抗鼠二抗(CST 公司,批号分别为 7074P2、7076P2);HE 染色试剂盒(Solarbio 公司,批号:G1120)。

1. 1. 2. 2 仪器

BA410T 荧光显微镜(德国 Motic 公司);YLS-3E 电子压痛仪和 YLS-6B 智能热板仪(济南益延科技发展有限公司);ELx800 酶标仪(美国 BioTek);H1650R 台式冷冻离心机(湖南湘仪);GBOX-H12-E-M 全自动凝胶成像分析系统(Syngene)。

1. 1. 3 实验细胞和动物

细胞:MRMT-1 大鼠乳腺癌细胞(广州吉妮欧生物科技有限公司)。

动物:SD 雌性 SPF 级大鼠 64 只,180~200 g,购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司,动物生产许可证号:SYXK2019-0017,动物合格证号:430727221102693387。动物饲养在湖南中医药大学实验动物中心 SPF 级动物房,3~4 只/笼,在室温 23 ± 0.5 °C、湿度 50%~60% 左右、12 h/12 h 昼夜交替的环境中喂养,实验期间动物均按要求喂以相应颗粒饲料,自由进食饮水。本实验通过湖南斯莱克景达实验动物有限公司实验动物福利伦理委员会批准(批号:SJA2022156-1)。

1. 2 实验方法

1. 2. 1 壮骨镇痛胶囊治疗骨转移癌痛的网络药理学研究

1. 2. 1. 1 壮骨镇痛胶囊化学成分和相关靶点筛选

本研究以 TCMSp 为主要数据库下载壮骨镇痛胶囊(骨碎补、补骨脂、淫羊藿、桑寄生、三七、天南星、延胡索)的化学成分及其相关参数,根据参考文献设置 ADME 参数口服生物利用度(oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$,药物相似性(drug likeness, DL) ≥ 0.18 为标准筛选化学成分进行下一步分析。为尽可能地全面收集数据,同时应用 BATMAN-TCM 数据库联合收集壮骨镇痛胶囊的化学成分,设置 Score Cut off ≥ 20 , $P < 0.05$ 为有效靶点预测置信区间获取药物的化学成分及作用靶点。在 TCMSp 和 ETCM 数据库中检索化学成分对应的靶点,在 UniProt 数据库中规范靶点名称,最终获得壮骨镇痛胶囊化学成分及相关靶点。

1. 2. 1. 2 壮骨镇痛胶囊治疗骨转移癌痛的潜在靶点

在 GeneCards 疾病数据库中以“cancer-induced bone pain”或“bone cancer pain”为关键词进行检索,收集与骨转移癌痛相关的靶点并全部纳入分析,然后与壮骨镇痛胶囊药物靶点基因映射筛选出共同靶点,从而获得壮骨镇痛胶囊治疗骨转移癌痛的关键作用靶点,利用网络在线绘图软件 Venn 绘制壮骨镇痛胶囊-骨转移癌痛映射靶点韦恩图。

1. 2. 1. 3 构建“壮骨镇痛胶囊-化学成分-靶点-骨转移癌痛”网络

将壮骨镇痛胶囊的药物、化学成分及其靶点、骨转移癌痛靶点都导入 Cytoscape 软件中,根据中药、化学成分和相应靶标之间的关系,构建“壮骨镇痛胶囊-化学成分-靶点-骨转移癌痛”网络并进行可视化分析。

1. 2. 1. 4 构建“蛋白-蛋白相互作用”网络

为了探索壮骨镇痛胶囊中成分与骨转移癌痛映射靶点的蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI),将药物与疾病的映射靶点输入 STRING 数据库中,物种限定为“Homo sapiens”,以 Interaction Score > 0.7 为筛选条件,构建核心靶点的 PPI 网络。在复杂 PPI 网络中存在一些节点对整个网络的结构和功能的影响程度比其他节点更大,称为关键节点,可能是壮骨镇痛胶囊治疗骨转移癌痛的核心靶点。为了进一步筛选出关键节点,运用 Cytoscape 插件中 CytoNCA 及其网络拓扑属性对 PPI 网络中的靶点进行分析,并通过 degree 值、介度中心性(betweenness centrality, BC)、紧密中心(closeness centrality, CC)等参数筛选出 PPI 网络中具有拓扑重要性的节点,即为核心靶点。

1.2.1.5 GO、KEGG 通路富集分析

为了探索核心靶点蛋白的基因功能及可能的作用通路,使用 DAVID 生物信息学资源数据库中的功能注释工具对壮骨镇痛胶囊治疗骨转移癌痛的核心靶点进行基因本体论(Gene Ontology, GO)功能富集分析和京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)通路富集分析。其中 GO 功能富集分析包括生物过程(biological process, BP)、细胞成分(cellular component, CC)和分子功能(molecular function, MF)相关的条目,KEGG 是根据富集因子值分析核心靶点的作用通路,根据 $P < 0.05$ 和错误发现率(false discovery rate, FDR) < 0.01 筛选出重要的生物功能和作用通路,然后用 OmicShare 平台对结果进行可视化。

1.2.1.6 分子对接

为了进一步分析壮骨镇痛胶囊潜在活性成分与核心靶点对应蛋白结合亲和力的强弱,选取 Cytoscape 软件中筛选出来潜在活性成分作为小分子配体,KEGG 筛选出的关键通路中核心靶点作为蛋白受体。从 PubChem 数据库下载活性成分的 2D 结构,利用 ChemOffice 软件将 2D 结构转换为 3D 结构。从 UniProt 数据库确定核心靶点蛋白受体的 ID 名称,在 RCSB PDB 数据库下载核心靶点的三维晶体结构,选择分辨率高的晶体结构为研究受体,用 PyMOL 软件对蛋白晶体结构进行去水、去磷酸根、去除对称链等操作以 PDB 格式保存,随后在 Auto Dock 将蛋白晶体设置为大分子导出为“pdbqt”文件,最后使用 Auto Vina 进行分子对接。

1.2.2 壮骨镇痛胶囊治疗骨转移癌痛的实验验证

1.2.2.1 模型建立与分组

SD 大鼠适应性饲养 7 d 后,先将 64 只大鼠通过随机数字表法分为假手术组(Sham)8 只和模型组 56 只。乳腺癌骨转移癌痛大鼠模型建立方法:对大鼠采用氧气(500 mL/min)混合异氟烷(浓度 2%)吸入麻醉,大鼠麻醉后取仰卧位,沿右下肢胫骨棘纵向皮肤切长约 1 cm 的切口,待胫骨暴露后,于胫骨结节下方用 9 号针头呈 30~45°角向胫骨内侧穿刺打孔。模型组大鼠向胫骨髓腔内缓慢注入 3 μL MRMT-1 细胞悬液(约含 3×10^4 个细胞),假手术组大鼠注射等量不含肿瘤细胞的 PBS,留针 1 min 后用无菌骨蜡快速封口,切口使用生理盐水彻底冲洗后逐层缝合,肌肉注射青霉素(20 万单位)预防感染。造模后 14 d 进行评价,若大鼠一般状态较差、

肿瘤细胞诱导大鼠产生了机械痛觉过敏和热痛觉过敏,影像学显示大鼠胫骨骨质破坏明显,则表示骨转移癌痛大鼠造模成功。造模成功后将模型组大鼠随机分为溶剂对照组(solvent control, SC)、壮骨镇痛胶囊常规剂量组(normal dose group of ZGZTC, ZGZTC-N)、壮骨镇痛胶囊高剂量组(high dose group of ZGZTC, ZGZTC-H)、阳性对照组(positive control, PC)、槲皮素组(querctetin, Que)、木犀草素组(luteolin, Lut)、异补骨脂素组(angelicin, Ang),每组 8 只。

1.2.2.2 给药

造模成功后各组大鼠开始相应给药,给药剂量按照人与动物体表面积药物剂量换算公式计算,壮骨镇痛胶囊临床成人每日服用剂量为 $0.45 \times 6 \times 2 / 60 = 0.09 \text{ g/kg}$ (6 粒/次, Bid),换算为大鼠剂量为 $0.09 \text{ g/kg} \times 6.3 = 0.567 \text{ g/kg}$,因此大鼠壮骨镇痛胶囊常规剂量组为 0.567 g/kg (灌胃给药 1 mL/100 g),壮骨镇痛胶囊高剂量为常规剂量组的 2 倍 = 1.134 g/kg (灌胃给药 1 mL/100 g);唑来膦酸注射液及单体根据文献给予常规剂量,其中唑来膦酸大鼠常规注射剂量为 0.1 mg/kg (用 0.9% 氯化钠注射液配制唑来膦酸,尾静脉注射)、槲皮素大鼠常规灌胃剂量为 50 mg/kg ,木犀草素大鼠常规灌胃剂量为 50 mg/kg ,异补骨脂素大鼠常规灌胃剂量为 25 mg/kg ,假手术组和溶剂对照组灌胃等体积无菌蒸馏水,1 次/日,连续给药 4 周。

1.2.2.3 疼痛行为学检测

于造模前和造模后第 3、7、14、21、28、35、42 d 使用 YSL-3E 电子压痛仪测定大鼠的机械缩足反应阈值(paw withdrawal mechanical threshold, PWT),结果用压力值(g)表示;与 PWT 测定错开,于造模前、造模后第 4、8、15、22、29、36 及 43 d 采用 ZH YLS-6BS 智能热板仪测定大鼠的热缩足潜伏期(paw withdrawal thermal latency, PWL),结果用时间(s)表示。

1.2.2.4 HE 染色

实验结束后,大鼠经腹腔注射戊巴比妥钠 50 mg/kg 麻醉后处死,骨科钳截取大鼠造模侧胫骨,取材后固定于 4% 多聚甲醛液体中,24 h 后用 10% 乙二胺四乙酸二钠,PH 7.2 及 4 $^{\circ}\text{C}$ 脱钙处理,经脱水透明、包埋制成石蜡包埋标本,用石蜡切片机将标本切成 4 μm 薄片,按照 HE 染色试剂盒说明书对骨组织切片进行染色,中性树胶封片后于显微镜下观察骨组织病理情况。

1.2.2.5 Western blot 检测

取大鼠骨组织加入 RIPA 裂解液,提取蛋白,二喹啉甲酸法(bicinchoninic acid assay,BCA)法测定蛋白浓度,蛋白定量后上样电泳转膜,转膜后使用 5% 脱脂奶粉封闭处理 1 h,分别加入对应的一抗,4℃ 孵育过夜,HRP 山羊抗兔 IgG 二抗(1:10 000)室温孵育 1 h,洗涤后用 Ecl 发光液避光显影,使用 ImageJ 图像分析软件计算条带的灰度值。

1.3 统计学分析

使用 SPSS 28.0 软件对数据进行统计学分析,用 GraphPad Prism 8 进行数据可视化,计量资料采用平均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,若多组均数比较符合正态分布,则采用单因素方差分析,其中两两比较采用 LSD 法(方差齐)和 Games Howell 法(方差不齐),若多组均数比较不符合正态分布则采用多样本秩和检验, $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 壮骨镇痛胶囊的化学成分和对应靶点

在 TCMSMP 数据库中通过 ADME 条件筛选后获

得骨碎补化学成分 18 个,桑寄生化学成分 2 个,淫羊藿化学成分 24 个,天南星化学成分 8 个,三七化学成分 8 个,延胡索化学成分 49 个。由于 TCMSMP 中未收集补骨脂相关信息,在 BATMAN-TCM 数据库中以“Bu Gu Zhi”为检索词,“Herb”为输入格式,Score Cut-of 设置为 20,以 $P < 0.05$ 为有效靶点预测置信区间,检索获得补骨脂的化学成分 14 个。在 TCMSMP 和 ETCM 数据库中检索所有活性成分相应的靶点,其中骨碎补 105 个靶点、补骨脂 268 个靶点、桑寄生 93 个靶点、淫羊藿 133 个靶点、三七 144 个靶点、天南星 65 个靶点、延胡索 125 个靶点,整合剔除重复值共获得壮骨镇痛胶囊化学成分 425 个靶点。

2.2 壮骨镇痛胶囊治疗骨转移癌痛的潜在靶点

在 GeneCards 中查找到 8 935 个骨转移癌痛相关靶基因,删除没有对应 UniProt 号的靶点后共得到 8 795 个,通过 Venny 在线软件将壮骨镇痛胶囊活性成分靶点与骨转移癌痛的靶点取交集共获得 224 个共同靶点,可能为壮骨镇痛胶囊治疗骨转移癌痛的潜在靶点(见图 1)。

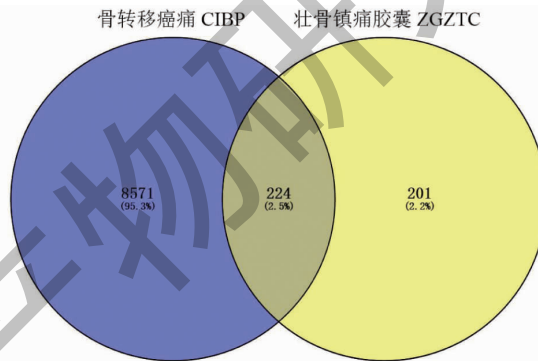


图 1 壮骨镇痛胶囊-骨转移癌痛共同靶点图

Fig. 1 Common target of ZGZTC-CIBP

2.3 “壮骨镇痛胶囊-化学成分-靶点-骨转移癌痛”网络分析

在 Cytoscape 软件构建“壮骨镇痛胶囊-活性成分-靶点-骨转移癌痛”的可视化网络图(见图 2)。该网络中包括 336 个节点,1 643 条边,其中代表骨转移癌痛的节点 1 个,代表壮骨镇痛胶囊药物的节点 7 个,代表化学成分的节点 104 个,代表壮骨镇痛胶囊治疗骨转移癌痛的靶点 224 个。从图中可知不同靶点可对应同一活性成分,同一靶点也可与不同的化学成分相对应,且每个成分都至少与 2 个靶点相互作用,可见壮骨镇痛胶囊治疗骨转移癌痛具有

多成分、多靶点的特点。该网络中 Degree 排在前 10 的成分为槲皮素、豆甾醇、 β -谷甾醇、木犀草素、山柰酚、异补骨脂素、补骨脂酚、异延胡索单酚碱、狮足草碱、氯化小檗碱,提示这些成分可能是壮骨镇痛胶囊治疗骨转移癌痛的潜在活性成分(见表 1)。

2.4 PPI 网络分析

将药物与疾病的映射靶点导入 String 在线数据库中建立核心靶点 PPI 网络,将 PPI 网络数据导入到 Cytoscape 软件中,使用 CytoNCA 工具包计算出 PPI 网络的 Degree、BC 及 CC 值的中位数分别为 37.5、0.005、0.611。首先根据 Degree 值中位数筛

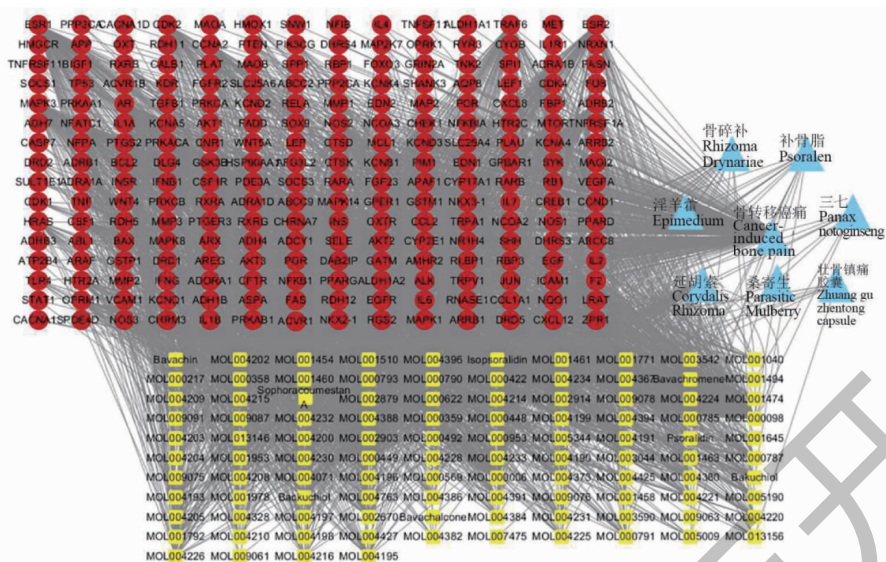


图2 “壮骨镇痛胶囊-活性成分-靶点-骨转移癌痛”网络

Fig. 2 The network of "ZGZTC-active ingredients-target-CIBP"

注:图中红色圆形代表共同靶点;黄色长方形代表活性成分;天蓝色三角形代表中药和疾病。Note: In the figure, the red circle represents the common target, the yellow rectangle represents the active ingredient, and the sky blue triangle represents traditional Chinese medicine and diseases.

表1 壮骨镇痛胶囊治疗骨转移癌痛的潜在活性成分

Table 1 Potential active ingredients of Zhuanggu Zhentong capsule in the treatment of cancer-induced bone pain

化合物 Compound	Mol ID	度值 Degree	来源 Source
槲皮素 Quercetin	MOL000098	265	桑寄生、淫羊藿、三七、延胡索
豆甾醇 Stigmasterol	MOL000449	203	骨碎补、补骨脂、三七、天南星、延胡索
β -谷甾醇 β -Sitosterol	MOL000358	114	三七、天南星
木犀草素 Luteolin	MOL000006	84	骨碎补、淫羊藿
山柰酚 Kaempferol	MOL000422	79	骨碎补、桑寄生、淫羊藿
补骨脂酚 Bakuchiol	-	51	补骨脂
异补骨脂素 Angelicin	MOL003590	51	补骨脂
异延胡索单酚碱 Isocorypalmine	MOL000790	41	延胡索
狮足草碱 Leonticine	MOL004215	38	延胡索
氢化小檗碱 (<i>R</i>)-Canadine	MOL002903	38	延胡索

选出图 3A,再根据 Degree 倍数值 70 筛选出图 3B,然后根据 BC 和 CC 的中位数获得 PPI 网络的核心靶点 15 个,包括 AKT1、TP53、EGFR、JUN 等(见图 3C),提示以上靶点可能为壮骨镇痛胶囊可治疗骨转移癌痛的核心靶点。

2.5 GO 功能和 KEGG 分析

DAVID 数据库中 GO 富集分析表明,壮骨镇痛胶囊治疗骨转移癌痛的靶点共涉及 BP 338 条,CC 63 条,MF 83 条($P < 0.01$, $FDR < 0.01$),分别取 BP、CC 和 MF 前 10 条富集结果根据 P 值从小到大

排序绘制条形图进行可视化分析(见图 4),说明壮骨镇痛胶囊可以通过多个生物学过程、细胞组分和分子功能发挥治疗骨转移癌痛的作用。KEGG 富集分析结果显示壮骨镇痛胶囊治疗骨转移癌痛的潜在靶点富集了 172 条通路($P < 0.01$, $FDR < 0.01$),根据 P 值从小到大排序取前 10 的通路用条形图展示(见图 5)。根据富集结果显示,除了 Pathways in cancer 等癌症相关通路,排名靠前的包括 MAPK 信号通路、PI3K-AKT 信号通路、NF- κ B 信号通路等。从相关文献上看,MAPK、PI3K-AKT 及 NF- κ B 信号

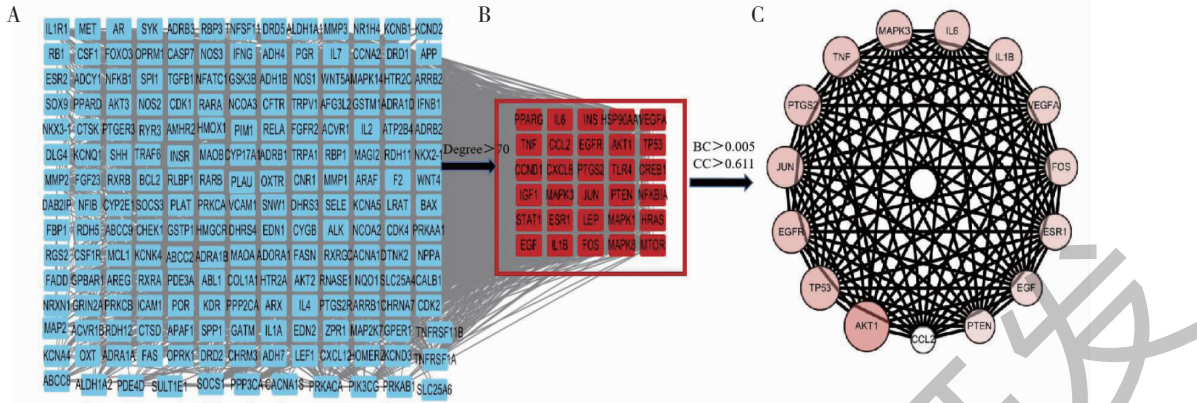


图 3 核心靶点蛋白 PPI 网络图

Fig. 3 PPI network of core target protein

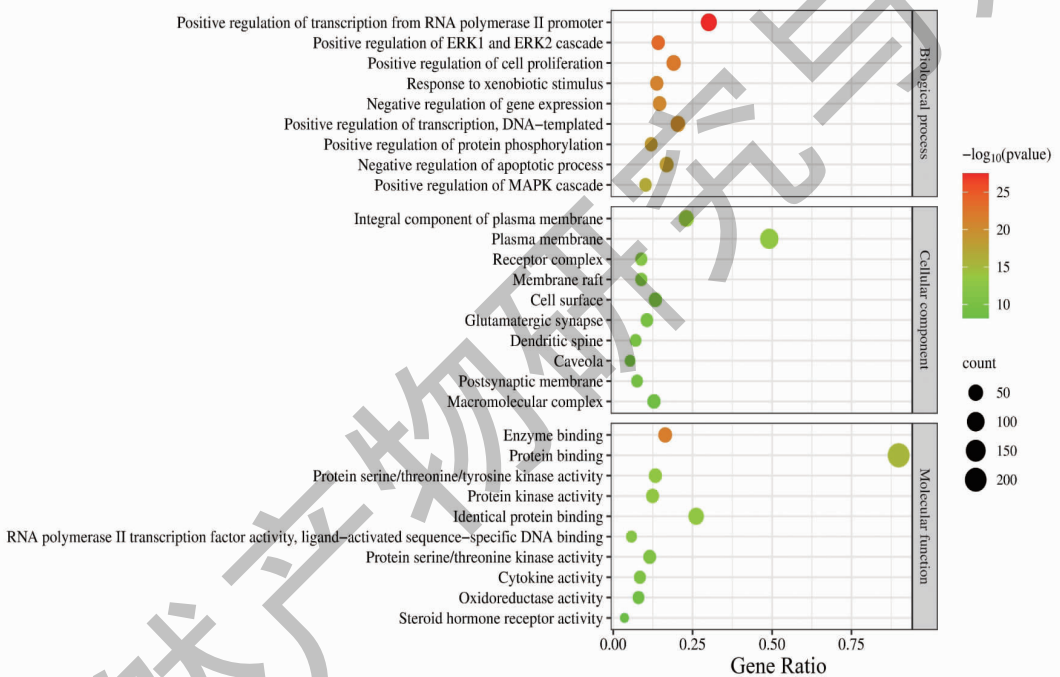


图 4 GO 功能富集分析气泡图

Fig. 4 Bubble chart of GO functional enrichment analysis

通路与骨转移癌痛的发生发展均具有密切的关系, 壮骨镇痛胶囊可能通过以上通路发挥治疗骨转移癌痛的作用。

2.6 分子对接结果

选取壮骨镇痛胶囊治疗转移癌痛的潜在活性成分 (Degree 值排名前 10) 作为小分子配体, 选取壮骨镇痛胶囊抗转移癌痛的关键作用通路 (MAPK、PI3K-AKT 和 NF- κ B) 的关键蛋白作为受体进行分子对接验证。一般认为分子对接结合能 < -5.0 kcal/mol, 表明受体与配体之间具有一定的亲和力,

< -7.0 kcal/mol 有较好的结合活性, 小于 -9.0 kcal/mol 则表明受体与配体之间有强烈的结合活性^[16]。本研究分子对接结果显示壮骨镇痛胶囊潜在活性成分与靶点蛋白的结合能均 < -5.0 kcal/mol, 提示其均具有较好的结合力, 其中槲皮素、木犀草素、异补骨脂素的结合能大部分 < -9.0 kcal/mol (见表 2), 提示壮骨镇痛胶囊药物处方中的活性成分可能为槲皮素、木犀草素、异补骨脂素, 作用靶点主要为 PI3K、AKT、JNK、ERK, 利用 PyMOL 对部分结果进行可视化 (见图 6)。

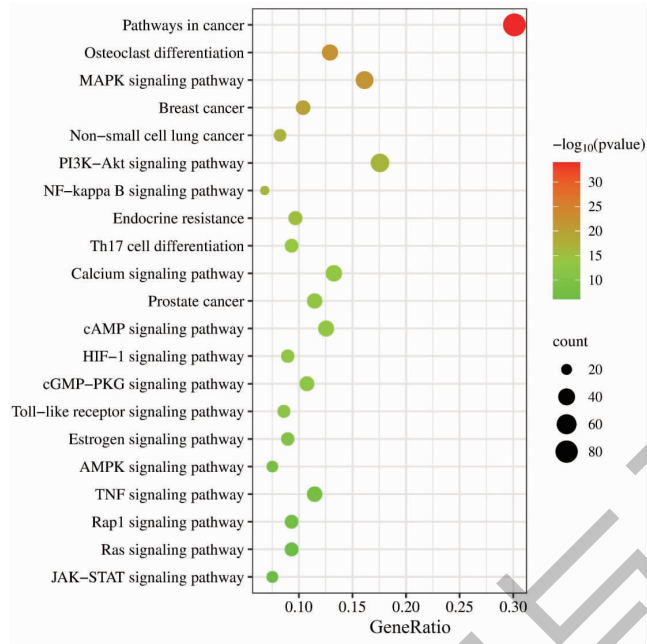


图5 KEGG 富集分析气泡图

Fig. 5 Bubble chart of KEGG enrichment analysis

表2 分子对接结果

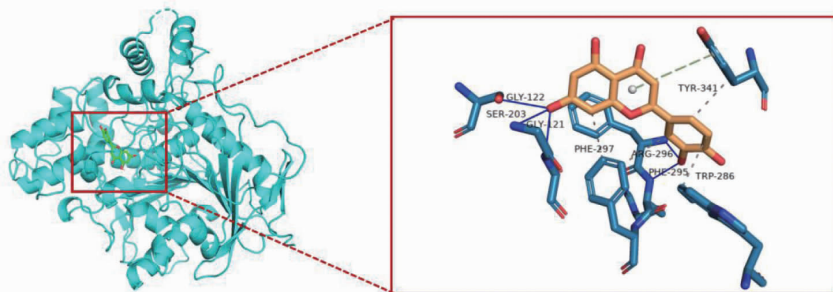
Table 2 Molecular docking results

靶点名称 (PDB 号) Target name (PDB number)	结合能 Binding energy (kcal/mol)		
	槲皮素 Quercetin	木犀草素 Luteolin	异补骨脂素 Angelicin
P65 (1BFT)	-8.9	-8.5	-8.7
IKB α (6Y1J)	-8.1	-9.3	-8.4
P38 (3K31)	-8.1	-8.3	-8.1
JNK (5AWM)	-8.0	-9.7	-8.5
ERK (1B4F)	-9.2	-7.6	-7.6
PI3K (2X6H)	-10.4	-9.2	-10.3
AKT1 (3MVH)	-8.6	-10.5	-8.7

2.7 壮骨镇痛胶囊及其活性成分可改善骨转移癌痛大鼠的疼痛行为学

通过测量大鼠的 PWT 和 PWL 来观察骨转移癌

痛的机械和热痛觉过敏 (见图 7), 造模前各组大鼠 PWT 和 PWL 基线值无明显差异 ($P > 0.05$); 造模后第 3 d 各组大鼠的 PWT 和 PWL 均略有小幅度下

木犀草素-AKT1
Luteolin-AKT1

续图 6 (Continued Fig.6)

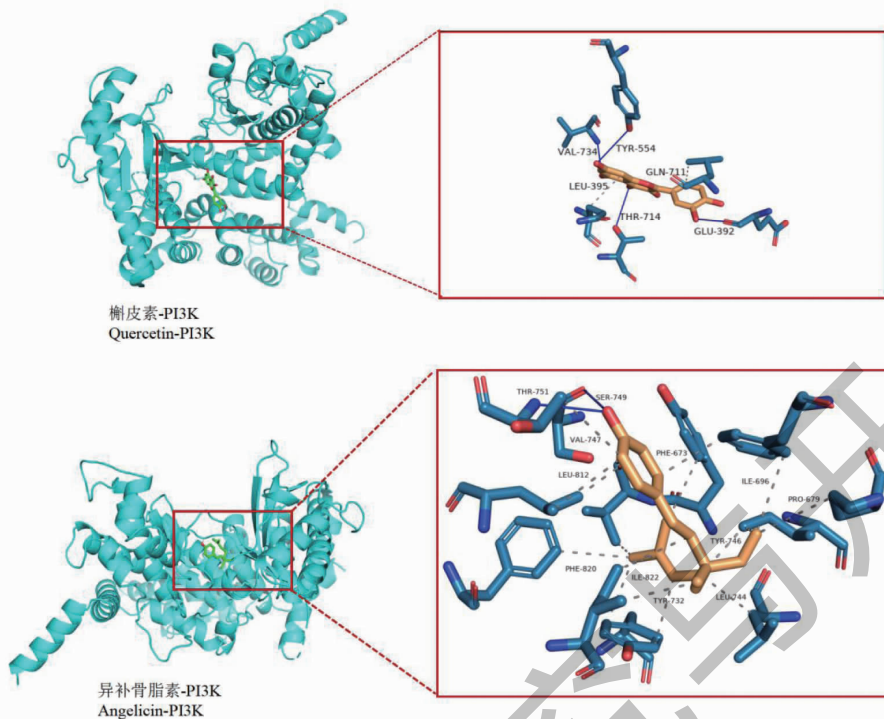


图6 分子对接结果可视化

Fig. 6 Visualization of molecular docking results

降,但与术前无明显差异($P > 0.05$),考虑为造模手术影响;造模后第7 d,假手术组 PWT 值和 PWL 恢复至正常,与假手术相比,各模型组大鼠 PWT 和 PWL 值持续下降($P < 0.05$);造模后第14 d,假手术组 PWT 和 PWL 值较造模前比无明显差异($P > 0.05$),与假手术相比,各模型组 PWT 和 PWL 值明

显降低($P < 0.01$),说明胫骨注射肿瘤细胞诱导大鼠产生了机械痛觉过敏;造模后第21 d,与溶剂对照组比,各用药组的 PWT 和 PWL 值开始回升($P < 0.05$);造模后第28、35、42 d,各用药组的 PWT 和 PWL 值均明显高于溶剂对照组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

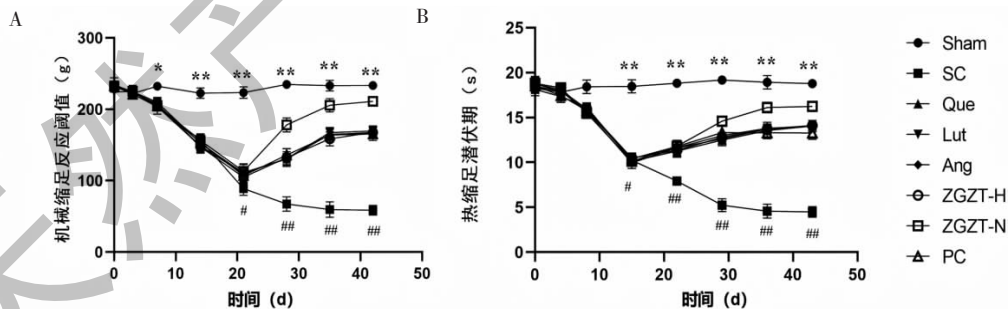


图7 各组大鼠疼痛行为学变化

Fig. 7 Changes in pain behavior of rats in each group

注:与 Sham 比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与 SC 比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$,下同。Note: Compared with Sham, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; Compared with SC, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, the same below.

2.8 壮骨镇痛胶囊及其活性成分可改善骨转移癌痛的骨质破坏

实验结束后,取胫骨组织进行 HE 染色,观察骨质变化情况,结果显示:假手术组骨组织结构正常,

由密质骨(骨皮质)、松质骨(骨小梁)、骨膜、骨髓构成,骨髓髓腔内充满正常骨细胞,骨小梁排列整齐,结构完整;溶剂对照组骨质破坏严重,肿瘤细胞侵犯骨皮质、骨小梁及骨髓,骨小梁结构异常紊乱甚至消

失,提示骨转移癌痛模型成功;与溶剂对照组比,壮骨镇痛胶囊常规剂量组骨质破坏程度最轻,肿瘤细胞没有侵犯骨皮质,骨髓腔内部分区域有纤维组织增生的治疗后改变,提示治疗效果最佳。壮骨镇痛

胶囊高剂量组、槲皮素组、木犀草素组、异补骨脂素组骨质破坏明显减轻,骨髓腔内可见少量肿瘤细胞浸润,侵犯骨皮质减少,骨小梁部分结构正常,治疗效果弱于壮骨镇痛胶囊常规剂量组(见图8)。

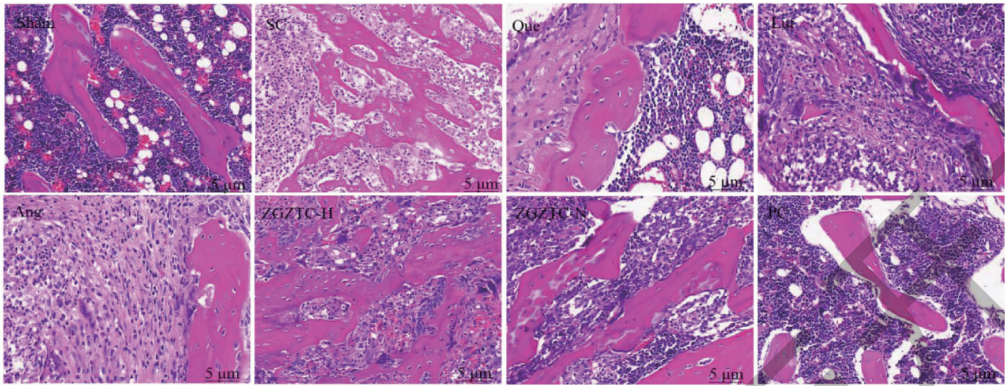


图8 各组大鼠胫骨组织病理变化

Fig. 8 Pathological changes in tibia tissue of rats in each group

2.9 壮骨镇痛胶囊及其活性成分抑制 MAPK 信号通路的激活

与假手术组比,溶剂对照组 p-P38/P38、p-ERK1/2/ERK1/2 和 p-JNK/JNK 的表达呈上调趋势,差异均具有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P <$

0.001);经药物干预后,与溶剂对照组比,各药组均降低了 P38、ERK1/2 和 JNK 的磷酸化水平,差异具有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),提示壮骨镇痛胶囊及其活性成分可抑制 MAPK 通路激活(见图9)。

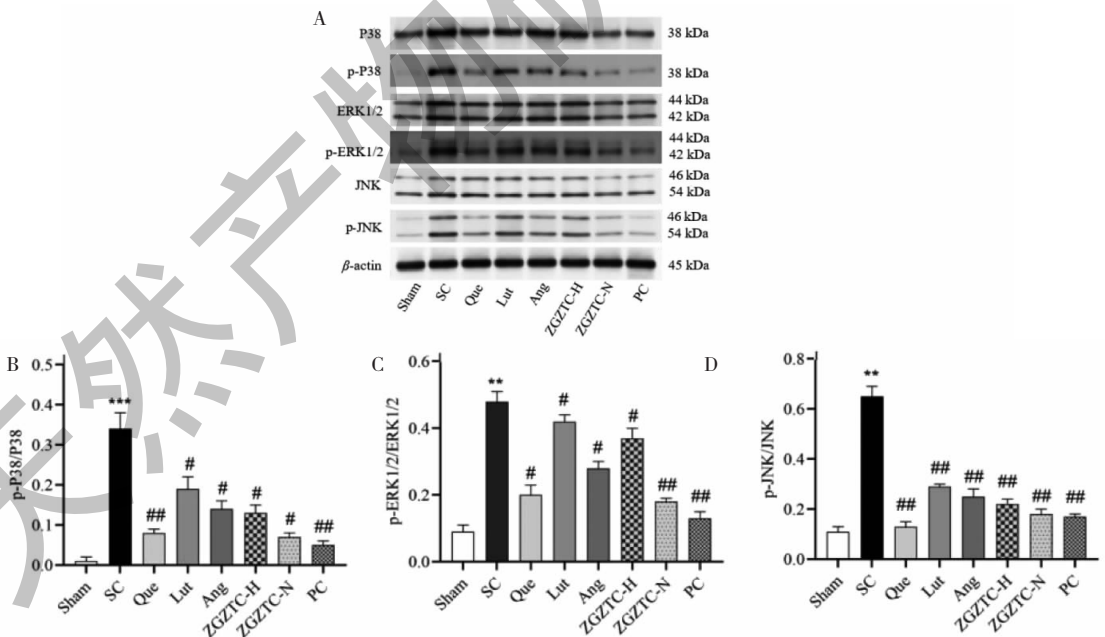


图9 MAPK 信号通路关键蛋白的表达

Fig. 9 Expression of key proteins in the MAPK signaling pathway

2.10 壮骨镇痛胶囊及其活性成分抑制 PI3K-AKT 信号通路的激活

与假手术组比,溶剂对照组 PI3K、p-AKT1/

AKT1 的表达升高,差异具有统计学意义($P < 0.01$);与溶剂对照组比,各药组抑制了 PI3K 和 P-AKT/AKT1 的上调,差异具有统计学意义($P <$

0.05 或 $P < 0.01$) (见图 10)。

2.11 壮骨镇痛胶囊及其活性成分抑制 NF- κ B 信号通路的激活

与假手术组比,溶剂对照组 p-P65/P65 和 p-

IKB α /IKB α 的表达上升,差异具有统计学意义 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$);经药物干预后,与溶剂对照组比,各用药组明显降低了 P65 和 IKB α 的磷酸化水平,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),见图 11。

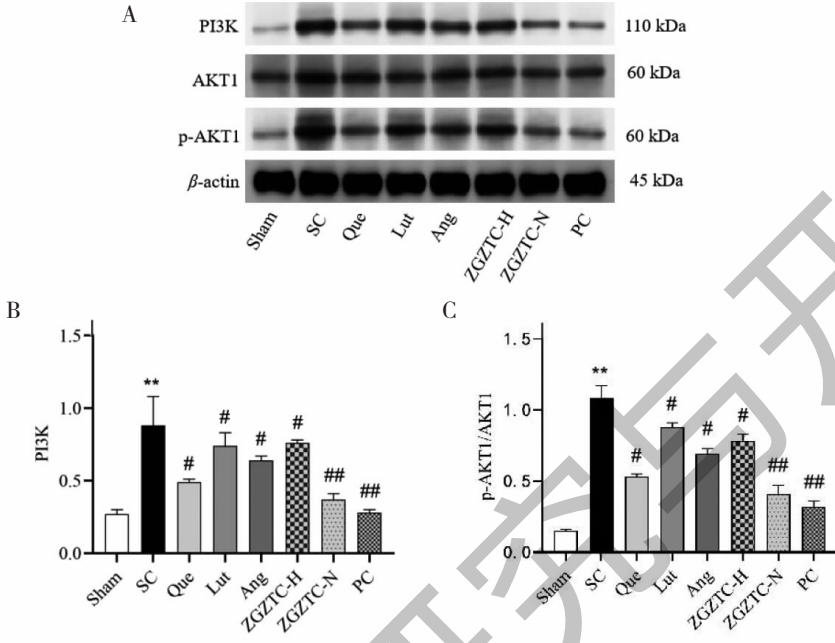


图 10 PI3K-AKT 信号通路关键蛋白的表达

Fig. 10 Expression of key proteins in the PI3K-AKT signaling pathway

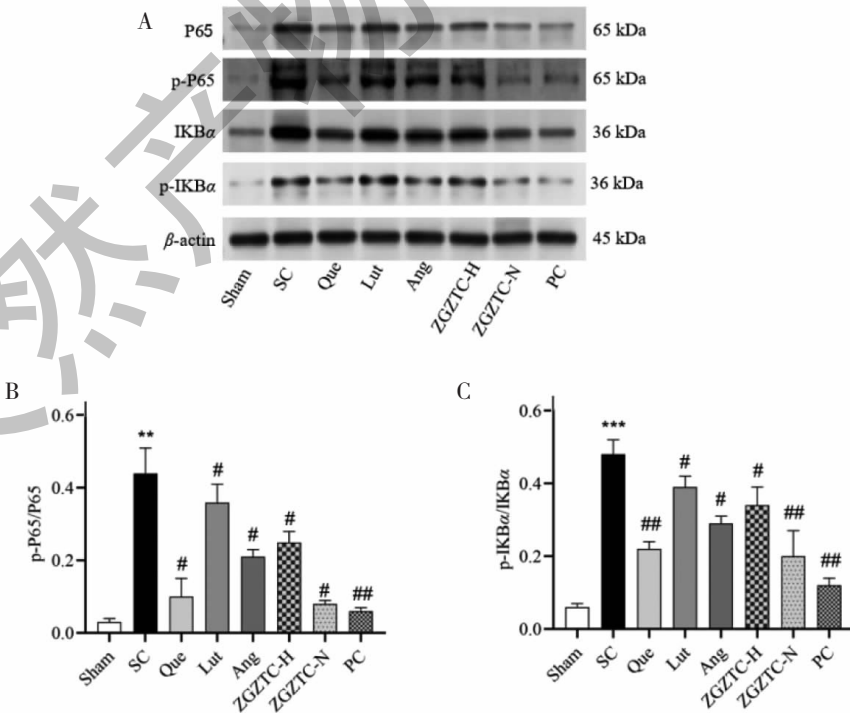


图 11 NF- κ B 信号通路关键蛋白的表达

Fig. 11 Expression of key proteins in the NF- κ B signaling pathway

3 讨论与结论

中医治疗是我国的特色医疗,临床上多将骨转移癌痛归属于“骨瘤”“骨痹”“骨蚀”及“骨疽”等范畴。近年来中医治疗骨转移癌痛积累了一定的临床经验,多项研究表明中医能够有效缓解骨转移癌痛,改善患者生活质量,且协同西医治疗具有增效减毒的作用^[5]。同时实验研究表明中医药可以通过多成分、多靶点和多通路治疗骨转移癌痛^[6]。本项目组骨转移癌痛壮骨镇痛胶囊治疗骨转移癌痛具有一定的临床疗效,但其活性成分和作用机制尚未完全明确。本研究采用网络药理学和体内验证实验初步揭示壮骨镇痛胶囊治疗骨转移癌痛的活性成分和作用机制。

首先,我们分析了壮骨镇痛胶囊治疗骨转移癌痛的潜在活性成分,通过 TCMSp 数据库和 BATMAN-TCM 两个中药靶点数据库查询,经 $OB \geq 30\%$ 和 $DL \geq 0.18$ 、Score Cut off ≥ 20 , $P < 0.05$ 等参数筛选得到壮骨镇痛胶囊 104 个化学成分,通过 Cytoscape 拓扑网络分析,得到槲皮素、豆甾醇、 β -谷甾醇、木犀草素、山柰酚、补骨脂酚、异补骨脂素、异延胡索单酚碱、狮足草碱、氢化小檗碱等壮骨镇痛胶囊治疗骨转移癌痛的潜在活性成分,分子对接结果显示潜在活性成分与通路中关键蛋白的结合力均小于 -5.0 kcal/mol ,说明壮骨镇痛胶囊的潜在活性成分与核心靶点蛋白具有较好的结合性,其中槲皮素、木犀草素、异补骨脂素的结合能大部分 $< -9.0 \text{ kcal/mol}$,说明有强烈的结合活性,提示壮骨镇痛胶囊的活性成分可能为槲皮素、木犀草素、异补骨脂素。槲皮素是广泛存在于多种药物中的黄酮类成分,现代药理研究表明槲皮素具有抗肿瘤、抗氧化、抗炎、镇痛、调节骨代谢等多种作用^[7]。多项动物实验表明槲皮素在多种动物模型如炎性疼痛、神经病理性疼痛及癌性疼痛等中具有有良好的抗伤害感受作用,可改善模型大鼠的痛觉过敏和行为学异常,降低疼痛相关指标,在慢性疼痛的治疗中具有较大的临床应用价值^[8]。相关研究表明槲皮素具有调控骨吸收和骨形成的药理作用,表明其对于骨转移癌痛模型大鼠中骨质的破坏可能具有修复的作用。如刘军等^[9]通过临床研究观察槲皮素联合双膦酸盐类治疗老年性骨质疏松患者骨代谢指标的影响,结果表明补充槲皮素辅助双膦酸盐治疗老年性骨质疏松患者,可显著改善患者骨密度指标、疼痛症状、功能障碍情况及骨代谢指标的异常表达。木犀草素作为常

见的黄酮类化合物,可通过影响上皮间质转化、抑制血管生成、诱导细胞凋亡等多种机制抑制肿瘤的发生发展,同时对于肿瘤细胞引起的骨痛也具有一定的治疗作用^[10]。动物实验显示木犀草素能以剂量依赖性方式改善肺癌细胞诱导的小鼠骨痛,其机制可能是通过调节脊髓背角中的 P38 MAPK 活性来阻断神经胶质细胞和 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 炎症小体活化,从而抑制神经炎症引起的疼痛^[11]。异补骨脂素是补骨脂的主要有效活性成分之一,近年来被视为一种植物雌激素广泛应用于骨科疾病的治疗,可通过调节骨代谢信号通路促进成骨细胞分化、抑制破骨细胞的活化、抗炎、抗氧化应激等途径改善骨代谢紊乱,这对于骨转移癌痛中骨组织的破坏有重要的保护和修复作用^[12]。综上所述,本研究从一定程度上揭示了壮骨镇痛胶囊治疗骨转移癌痛的活性成分,

然后,通过对壮骨镇痛胶囊治疗骨转移癌痛的靶点进行 PPI 网络分析,提示 AKT1、TP53、EGFR、JUN、前列腺素内过氧化物合成酶 2 (prostaglandin-endoperoxide synthase 2, PTGS2)、肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF)、MAPK3 等为网络中的关键节点,且这些靶点对应的重要活性成分为槲皮素、豆甾醇、山柰酚、木犀草素、异补骨脂素、补骨脂酚等,提示这些靶点蛋白在 PPI 网络中发挥着关键作用,可能是壮骨镇痛胶囊治疗骨转移癌痛的核心靶点。为了研究这些核心靶点的生物学功能和作用机制,对其进行 GO 和 KEGG 富集分析,构建富集靶点和通路之间的关系网络图,GO 分析结果显示核心靶点共涉及 BP 338 条、CC 63 条及 MF 83 条,说明壮骨镇痛胶囊可以通过多个生物学过程、细胞组分和分子功能发挥治疗骨转移癌痛的作用。KEGG 结果显示壮骨镇痛胶囊治疗骨转移癌痛的作用通路主要富集在 Pathways in cancer、Breast cancer 等肿瘤相关通路及 MAPK、PI3K-AKT 和 NF- κ B 等通路,说明壮骨镇痛胶囊可能通过以上通路直接或者间接起到抗骨转移癌痛的作用。肿瘤自身是引起骨转移癌痛的主要病因,因此抗肿瘤是骨转移癌痛的主要治疗方法之一,除了广泛癌症通路,乳腺癌是富集最靠前的通路,说明壮骨镇痛胶囊可能对乳腺癌引起的骨转移癌痛具有更好的抑制作用,前期课题组实验结果表明壮骨镇痛胶囊对乳腺癌细胞体外增殖、迁移、黏附及骨转移等相关指标具有明显的抑制效应,与本结果相符。MAPK 信号通路主要包括 p38、

JNK、ERK1/2 信号通路,这些信号通路通过相互协同或相互抑制的作用共同参与调节细胞生物学功能,如细胞增殖、分化、周期调节、凋亡等,与肿瘤的发生发展密切相关^[13]。有研究表明,在骨转移癌痛模型中,脊髓背角处 MAPK 信号通路存在不同程度的激活,说明 MAPK 可能参与骨转移癌痛的发生发展^[14]。Ni 等^[15]发现鞘内注射 JNK 抑制剂可明显提高骨转移癌痛大鼠的机械痛阈值,并降低模型大鼠中神经胶质纤维酸性蛋白的表达,说明抑制 JNK/MAPK 信号通路是缓解骨转移癌痛的治疗方法。有研究报道从传统单味中药中提取的单体化合物和中药复方能够通过 MAPK 通路缓解骨转移癌痛,如焦美等^[16]发现丹皮酚可能通过抑制炎症因子释放缓解骨转移癌痛,其作用机制可能与抑制 MAPK 信号通路的活化有关。益肾骨康方可通过抑制 P38 MAPK 蛋白及下游炎症因子的表达发挥抑制骨转移癌痛的作用^[17]。研究表明 PI3K-AKT 信号通路在多种慢性疼痛的发展和维持中具有重要的作用,如 Sun 等^[18]在辣椒素炎性痛模型发现 PI3K-AKT 通路同时参与了外周敏化和中枢敏化,抑制该通路的活化可以降低疼痛模型大鼠的机械痛阈值。Zhang 等^[19]通过实验证实骨转移癌痛大鼠模型中 PI3K-AKT 磷酸化蛋白的水平明显增加,可能诱发了骨转移癌痛的发生发展。研究表明 NF- κ B 通路可通过调节脊髓中促炎细胞因子、粘附分子和趋化因子的基因表达水平参与多种疼痛疾病^[20]。如在骨转移癌痛大鼠模型中,NF- κ B 磷酸化后可介导胶质细胞的活化导致模型大鼠的痛觉敏化,机械疼痛阈值异常增加^[21]。综上,抑制 MAPK、PI3K-AKT 和 NF- κ B 通路的激活可能是壮骨镇痛胶囊治疗骨转移癌痛的潜在作用机制。

最后,采用体内实验对网络药理学结果进行验证。可靠的骨转移癌痛动物模型是实验研究的重要载体,建立骨转移癌痛动物模型的方法包括血流播散、癌细胞原位接种、癌细胞局部注射等方法。癌细胞局部注射建立骨转移癌痛模型的方法是将癌细胞直接注射于骨的部位,此方法操作简单,在一定实验周期内的生长只破坏接种骨组织,不易形成多脏器转移,动物死亡率较低,造模成功率高,是目前比较理想的骨转移癌痛动物模型。1999 年 Schiwei 等^[22]用 NCTC2472 纤维肉瘤细胞注射于小鼠股骨骨髓腔首次成功建立了骨转移癌痛模型。2002 年 Medhurst 等^[23]将 MRMT-1 细胞接种到 SD 大鼠胫骨

骨髓腔内,成功建立了大鼠胫骨转移癌痛模型。因此,本研究采用胫骨局部注射 MRMT-1 细胞制作骨转移癌痛模型对壮骨镇痛胶囊及其活性成分槲皮素、木犀草素和异补骨脂素治疗骨转移癌痛的疗效进行评价,实验结果显示壮骨镇痛胶囊及其活性成分可有效改善骨转移癌痛大鼠模型的疼痛行为学,减少肿瘤细胞对骨质的破坏,但是该结果表明壮骨镇痛胶囊的活性成分治疗骨转移癌痛虽有一定的效果,但整体效果弱于壮骨镇痛胶囊,这说明了壮骨镇痛胶囊是通过药物的配伍和叠加治疗骨转移癌痛,符合中医整体论治的特点。与文献结果相符,本研究结果显示在骨转移癌痛大鼠模型中 MAPK、PI3K-AKT 和 NF- κ B 通路激活,而壮骨镇痛胶囊及其活性成分则明显抑制了以上通路中关键蛋白的上调和磷酸化,说明壮骨镇痛胶囊及其活性成分可能通过抑制 MAPK、PI3K-AKT 和 NF- κ B 通路的激活发挥治疗骨转移癌痛的作用。

综上所述,本研究采用网络药理学和分子对接,初步阐述了壮骨镇痛胶囊治疗骨转移癌痛的活性成分,以及预测了壮骨镇痛胶囊治疗骨转移癌痛的可能作用机制,体现了中医药“多靶点、多通路、多成分”的治疗特点。同时体内实验初步验证了壮骨镇痛胶囊及其活性成分可有效缓解骨转移癌痛,其机制可能与抑制 MAPK、PI3K-AKT 和 NF- κ B 通路有关,但其具体调控机制还有待进一步实验研究。

参考文献

- 1 Kapoor R, Saxena AK, Vasudev P, et al. Cancer induced bone pain: current management and future perspectives [J]. *Med Oncol*, 2021, 38: 134.
- 2 Nafziger AN, Barkin RL. Opioid therapy in acute and chronic pain [J]. *J Clin Pharmacol*, 2018, 58: 1111-1122.
- 3 Ellingson HM, Vanderah TW. Potential therapeutic treatments of cancer-induced bone pain [J]. *Curr Opin Support Palliat Care*, 2020, 14: 107-111.
- 4 Peng WP, Wang D, Wu Q, et al. Potential mechanism of Bufe Huoxue capsule in treating pulmonary fibrosis based on network pharmacology [J]. *Nat prod Res Dev (天然产物研究与开发)*, 2024, 36: 1056-1063.
- 5 Gong X, Wang JS, Yu XD, et al. Assessment of the efficacy of Chinese patent medicine on treating pain caused by prostate cancer: a protocol for systematic review and meta analysis [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2019, 98: e17820.
- 6 Lai GH, Wang F, Nie DR, et al. Research progress on the

- pathogenesis and traditional Chinese medicine prevention and treatment of bone metastasis cancer pain [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2023, 29: 231-239.
- 7 Reyes-Farias M, Carrasco-Pozo C. The anti-cancer effect of quercetin: molecular implications in cancer metabolism [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20: 3177.
- 8 Liu C, Liu DQ, Tian YK, et al. The emerging role of quercetin in the treatment of chronic pain [J]. *Curr Neuropharmacol*, 2022, 20: 2346-2353.
- 9 Liu J, Liu F, Yan CQ, et al. Analysis of the improvement effect of quercetin on bone metabolism indicators in elderly patients with osteoporosis treated with bisphosphonates [J]. *Chin J Osteoporos* (中国骨质疏松杂志), 2020, 26: 1044-1048.
- 10 Rocchetti MT, Bellanti F, Zadorozhna M, et al. Multi-faceted role of luteolin in cancer metastasis; EMT, angiogenesis, ECM degradation and apoptosis [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24: 8824.
- 11 Zhou YS, Cui Y, Zheng JX, et al. Luteolin relieves lung cancer-induced bone pain by inhibiting NLRP3 inflammasomes and glial activation in the spinal dorsal horn in mice [J]. *Phytomedicine*, 2022, 96: 153910.
- 12 Liu YX, Meng MX, Zhou Q, et al. Research progress on the regulation of bone metabolism by isopsoralen [J]. *Chin J Osteoporos* (中国骨质疏松杂志), 2022, 28: 1674-1677.
- 13 Najafi M, Ahmadi A, Mortezaee K. Extracellular-signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase signaling as a target for cancer therapy: an updated review [J]. *Cell Biol Int*, 2019, 43: 1206-1222.
- 14 Zhou KX, He XT, Hu XF, et al. XPro1595 ameliorates bone cancer pain in rats via inhibiting p38-mediated glial cell activation and neuroinflammation in the spinal dorsal horn [J]. *Brain Res Bull*, 2019, 149: 137-147.
- 15 Ni HD, Xu LS, Wang Y, et al. Astrocyte activation in the periaqueductal gray promotes descending facilitation to cancer-induced bone pain through the JNK MAPK signaling pathway [J]. *Mol Pain*, 2019, 15: 1744806919831909.
- 16 Jiao M, Lei JJ, Zhang ZC, et al. Danpi phenol regulates the analgesic effect of miR-21 on bone cancer pain rats and its effect on the MAPK signaling pathway [J]. *Prog Anatom Sci* (解剖科学进展), 2021, 27: 453-457.
- 17 Song HL. Study on the mechanism of Yishen Gukang decoction in inhibiting bone cancer induced bone pain and druggability research [D]. Beijing: China Academy of Chinese Medical Sciences (中国中医科学院), 2019.
- 18 Sun R, Yan J, Willis WD. Activation of protein kinase B/Akt in the periphery contributes to pain behavior induced by capsaicin in rats [J]. *Neuroscience*, 2007, 144: 286-294.
- 19 Zhang J, Wang L, Wang H, et al. Neuroinflammation and central PI3K/Akt/mTOR signal pathway contribute to bone cancer pain [J]. *Mol Pain*, 2019, 15: 1744806919830240.
- 20 Hong JQ, Shi JX, Ao H, et al. Paeoniflorin alleviates inflammatory pain by inhibiting the Akt NF κ B signaling pathway in the spinal cord and activating microglia [J]. *Chin J Biochem Mol Biol* (中国生物化学与分子生物学报), 2018, 34: 325-333.
- 21 Xu M, Fei Y, He Q, et al. Electroacupuncture attenuates cancer-induced bone pain via NF- κ B/CXCL12 signaling in midbrain periaqueductal gray [J]. *ACS Chem Neurosci*, 2021, 12: 3323-3334.
- 22 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: 10886-10897.
- 23 Medhurst SJ, Walker K, Bowes M, et al. A rat model of bone cancer pain [J]. *Pain*, 2002, 96: 129-140.