

二甲双胍抑制 JNK 改善缝隙连接功能缓解骨癌痛的实验研究

谷宇峰, 潘秀秀, 宋玲, 杨星, 胡亮, 刘文涛*

(南京医科大学江苏省神经退行性疾病重点实验室, 南京 210029)

摘要 探究星形胶质细胞中 c-Jun 氨基末端激酶(JNK)-缝隙连接功能在骨癌痛形成中的作用,并考察 5'-腺嘌呤核苷酸(AMP)依赖的蛋白激酶(AMPK)激动剂二甲双胍能否通过调节该功能缓解骨癌痛。制备肿瘤细胞植入(TCI)引起的大鼠骨癌痛模型,鞘内注射二甲双胍(50、100 μg)、JNK 抑制剂 SP600125 (10 μg)、缝隙连接抑制剂(carbenoxolone, CBX) (10 μg)、AMPK 抑制剂 Compound C(CC) (10 μg) 各 20 μL。利用 Von Frey 丝检测大鼠机械痛阈值;用免疫荧光方法检测大鼠脊髓水平胶质纤维酸性蛋白(GFAP),钙离子结合衔接分子 1(IBA-1)和缝隙连接蛋白(Cx43)的变化;Western blot 法检测大鼠脊髓水平 p-JNK 的变化情况。本研究发现,JNK 抑制剂能显著缓解 TCI 引起的骨癌痛,而 CBX 则能抑制该效果。二甲双胍处理抑制脊髓水平 p-JNK 水平的升高。鞘内注射不同浓度的二甲双胍(50、100 μg),能够显著改善 TCI 引起的机械性痛觉异常,同样该作用也被 CBX 抑制。本研究表明,二甲双胍可通过激活 AMPK,抑制 JNK 来调节缝隙连接功能,进而改善骨癌痛。

关键词 二甲双胍;星形胶质细胞;骨癌痛;JNK;缝隙连接

中图分类号 R965 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2019)03-0337-07

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20190310

引用本文 谷宇峰,潘秀秀,宋玲,等.二甲双胍抑制 JNK 改善缝隙连接功能缓解骨癌痛的实验研究[J].中国药科大学学报,2019,50(3):337-343.

Cite this article as: GU Yufeng, PAN Xiuxiu, SONG Ling, *et al.* Experimental study of metformin in relieving bone cancer pain by inhibiting JNK and improving gap junction function[J]. *J China Pharm Univ*, 2019, 50(3):337-343.

Experimental study of metformin in relieving bone cancer pain by inhibiting JNK and improving gap junction function

GU Yufeng, PAN Xiuxiu, SONG Ling, YANG Xing, HU Liang, LIU Wentao*

Jiangsu Provincial Key Laboratory for Neurodegenerative Diseases, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

Abstract This study aims to explore the involvement of c-Jun N-terminal kinase (JNK)-Gap junction regulation in the rat model of bone cancer pain and figure out whether adenosine 5'-monophosphate (AMP)-activated protein kinase (AMPK) activator metformin could attenuate bone cancer pain through this mechanism. Tumor cell implantation (TCI) induced bone cancer pain model in rats was established. The rats were administered, respectively, with 20 μL of metformin (50, 100 μg), JNK inhibitor SP600125 (10 μg), gap junction inhibitor (carbenoxolone, CBX) (10 μg) and AMPK inhibitor Compound C (CC) (10 μg). The Von Frey Assay was applied to test the mechanical pain threshold. The activity of Glial fibrillary acidic protein (GFAP), ionized calcium-binding adaptor molecule 1 (IBA-1) and Connexin 43 (Cx43) in spinal cord was evaluated by immunohistochemistry. Changes of p-JNK expression were detected by Western blot. JNK inhibitor SP600125 relieved TCI-induced bone cancer pain significantly in rats, while this analgesic effect was almost canceled by the blocker of gap junction carbenoxolone (CBX). Various concentration of metformin (50, 100 μg, i. t.) significantly inhibited TCI-in-

收稿日期 2019-03-13 * **通信作者** Tel:025-86862127 E-mail:painresearch@njmu.edu.cn

基金项目 南京医科大学“科技创新基金”重大项目资助项目(No. 2017NJMUCX004);江苏省自然科学基金资助项目(No. BK20161033)

duced mechanical allodynia and the changes of p-JNK and p-Cx43 expression were also reversed in spinal cord in rats. Together, these data suggested that activation of AMPK with metformin attenuated TCI-induced bone cancer pain via regulating the function of JNK-Gap junction in rats.

Key words metformin; astrocytes; bone cancer pain; JNK; gap junction

This work was supported by the Major Project of Science and Technology Innovation Fund of Nanjing Medical University (No. 2017NJMUCX004) and the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (No. BK20161033)

临床上大约 64% 以上的肿瘤晚期或者转移癌患者都会面临疼痛问题^[1]。肿瘤细胞转移到骨组织,通过释放致痛物质引起骨内部神经纤维的敏化和激活,从而产生疼痛,称为骨癌痛 (bone cancer pain, BCP)^[2]。转移性乳腺、结肠或肺癌的患者中都容易出现骨癌痛,这种疼痛严重影响患者的生活质量,当前并没有令人满意的临床解决方案。

有文献指出^[3-4],癌痛过程中胶质细胞包括小胶质和星形胶质细胞都会出现明显的活化。但与神经病理性疼痛有所差异:癌痛中,星形胶质细胞的活化相比于小胶质细胞更加强烈而持久。近来有报道^[4-6]证明,抑制星形胶质细胞的活化能够有效地改善慢性痛和骨癌痛。星形胶质细胞的激活在肿瘤细胞植入 (tumor cell implantation, TCI) 引起的骨癌痛的维持中发挥了重要作用^[7]。但是,要合理高效地抑制癌痛中星形胶质细胞的功能紊乱,目前并没有很好的治疗手段。

星形胶质细胞与小胶质细胞不同,除了促进炎症以外,另一个很重要的功能在于为周围的神经元提供营养和支持。而这一功能主要由缝隙连接 (gap junction),即将相邻细胞的细胞质进行连接的细胞内通道所介导。许多报道都证明了缝隙连接在慢性疼痛中发挥重要作用,就此展开的研究不在少数^[8-9]。然而,在癌痛尤其是骨癌痛模型中,星形胶质细胞缝隙连接的影响,迄今没有得到很好的研究和阐述。由此,本课题组提出设想,是否可以通过特定的手段来调控星形胶质细胞的缝隙连接即支持营养功能,并由此改善骨癌痛。

本课题组前期研究^[10]发现,在 TCI 的骨癌痛模型中,激活 AMP 依赖的蛋白激酶 [adenosine 5'-monophosphate (AMP)-activated protein kinase, AMPK] 能抑制胶质细胞活化缓解神经炎症从而改善疼痛。本研究中,通过鞘内注射 (i. t.) AMPK 激动剂二甲双胍,评估对大鼠 TCI 引起的骨癌痛是否

有良好镇痛作用,开发老药的新用途,并初步探索其中的相关作用机制。

1 材料

1.1 药品与试剂

盐酸二甲双胍、缝隙连接抑制剂 carbenoxolone (CBX)、AMPK 抑制剂 Compound C (CC)、Tris (德国 Sigma 公司);甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体 (美国 Sigma 公司);缝隙连接蛋白 Connexin 43 (Cx43) 抗体 (美国 Santa Cruz 公司);c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK) 抗体、胶质纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP) 抗体 (美国 CST 公司);钙离子绑定衔接分子 1 (ionized calcium-binding adaptor molecule 1, IBA-1) 抗体 (美国 Abcam 公司);JNK 抑制剂 SP600125 (美国 MCE 公司);AMPK 激动剂 acadesine (5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranoside, AICAR)、细胞裂解液 (上海碧云天生物技术有限公司);30% Acrylamide/Bis (美国 Bio Rad 公司);十二烷基硫酸钠 (sodium dodecyl sulfate, SDS) (南京生兴生物技术有限公司);磷酸缓冲盐溶液 (PBS)、TBST 缓冲液、甲醇 (江苏汉邦科技有限公司);驴血清 (美国 Millipore 公司);驴抗兔荧光二抗、驴抗鼠荧光二抗 (美国 Jackson 实验室)。

1.2 仪器

Kontes 组织匀浆器 (德国 IKA 公司);TE 124s 电子分析天平 (德国 Sartorius 公司);Multiskan FC 酶标仪、Microcll7R 冷冻离心机 (美国 Thermo 公司);Mini Protean4 电泳仪、Mini Protean4 转膜仪、Quantity One 4.6.5 分析软件 (美国 Bio Rad 公司)。

1.3 动物

雄性 SD 大鼠,清洁级,体重 180 ~ 220 g [上海西普尔-必凯实验动物有限公司,合格证编号: 20130016009092,使用许可证号: SCXK (苏) 2013-

0016]。实验动物饲养于 12 h 昼夜交替的独立环境中,室温维持在 25 ± 1 °C,自由饮水和摄食,在适应环境 1 周后开始实验。对动物的所有处理均遵循国际疼痛研究协会伦理委员会的要求。

2 方法

2.1 骨癌痛模型建立

将 Walker256 腹水肿瘤细胞悬液(每毫升 5×10^6 个细胞)0.5 mL 腹腔注射到大鼠体内,接种 7 d 后,从动物腹腔中抽取单细胞悬液。参照文献[11]的方法建立骨癌痛模型。将实验动物随机分为以下几组:正常对照组;TCI 组;TCI + SP600 125 (10 μg , i. t.);TCI + SP600125 (10 μg , i. t.) + CBX (10 μg , i. t.);TCI + 二甲双胍治疗组(50, 100 μg , i. t.);TCI + 二甲双胍(100 μg , i. t.) + CBX (10 μg , i. t.) 组。给药方式:造模 14 d 后,提前 30 min 给予抑制剂(SP600125 或 CBX)再鞘内注射二甲双胍溶液。用戊巴比妥(50 mg/kg)腹腔注射麻醉大鼠,固定,消毒,大鼠的左膝关节用手术刀切开,将含肿瘤细胞(每毫升 1×10^5 个细胞)的 PBS 溶液 5 μL 直接注射到股骨远端的髓腔中。注射产生的小孔用银汞合金封住,防止肿瘤细胞从骨头中流出。

2.2 检测骨癌痛模型诱导的机械痛阈

采用足底测试仪来观测大鼠机械痛阈,具体如下:在温度为 20 ~ 25 °C 的安静环境中,将大鼠置于透明的金属网格笼内,测量前使之预适应 20 min,当探觅行为停止则开始测量。用足底测试仪的平钝针尖刺激大鼠足底,从无压力逐渐缓慢加压,直至动物产生缩足反应,每次测量间隔 3 min,大鼠足爪抬起时对应的最小压力为其机械性刺激缩足反射阈值。每只大鼠至少平行测量 3 次。

2.3 Western blot 法检测蛋白表达水平

取大鼠脊髓 L4-L6 节段,按一定比例加入细胞裂解液,处理样品,采用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度。经聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白,并转移至 PDVF 膜上,10% 牛奶封闭室温封闭 2 h,加入 p-JNK 一抗(1:1 000),4 °C 摇晃过夜, TBST 洗 3 次,每次 10 min,加入二抗,室温孵育 2 h, TBST 洗 3 次,每次 10 min,显色。以 GAPDH (1:5 000)为内参。采用 Quantity One 软件进行数据分析。

2.4 免疫荧光法检测蛋白表达水平

动物深度麻醉后,先用 PBS 随后换成 4% 多聚甲醛心脏灌注,之后分离腰椎 L4 ~ L5 节段,浸泡在 4% 多聚甲醛中固定 4 d,40% 蔗糖脱水 7 d。冷冻切片时每片厚度设定为 20 μm 。每组的脊髓切片在 4 °C 条件下孵育 GFAP, IBA-1, p-Cx43 对应一抗(均为 1:100)过夜, PBS 清洗切片后,室温下避光孵育二抗 2 h,再用 PBS 清洗 3 次,在荧光显微镜下观察。

2.5 数据统计

采用 SPSS12.0 统计学软件对研究数据进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验;计数资料以百分率(%)表示,采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠 TCI 骨癌痛模型脊髓星形胶质细胞活化且缝隙连接功能降低

TCI 造模 14 d 后, Von Frey 机械痛检测结果显示:大鼠的机械痛阈值明显下降,癌痛造模成功(图 1-A)。大鼠脊髓 L4-L6 节段的免疫荧光结果显示,骨癌痛大鼠脊髓的星形胶质细胞(用 GFAP 标记)有明显激活,研究表明, CX43 的磷酸化水平与缝隙连接功能呈负相关,免疫荧光结果(图 1-C)提示, TCI 造模后大鼠脊髓 CX43 的磷酸化水平明显增加(绿色荧光强度明显增加),提示缝隙连接功能降低。

3.2 JNK-缝隙连接功能在骨癌痛模型中的作用

Western blot 检测发现骨癌痛大鼠脊髓中 p-JNK 水平显著上升(图 2-A); JNK 抑制剂 SP600125 (10 μg , i. t.) 能缓解 TCI 大鼠的骨癌痛,且该作用能被缝隙连接阻断剂 CBX (10 μg , i. t.) 所取消(图 2-B)。由此说明, JNK-缝隙连接功能在骨癌痛的形成中发挥重要作用,阻断其功能发挥能有效地缓解 TCI 引起的大鼠骨癌痛。

3.3 二甲双胍鞘内注射能够缓解 TCI 引起的骨癌痛

TCI 造模 14 d 后,给予大鼠二甲双胍(50, 100 μg , i. t.), 有良好的镇痛效果,尤其 100 μg 剂量下镇痛作用明显(图 3-A)。同时,大鼠脊髓切片免疫荧光检测显示,二甲双胍 100 μg 能够显著地抑制 TCI 造模后 GFAP 和 IBA-1 的活化(图 3-B)。

3.4 二甲双胍对骨癌痛的镇痛作用依赖于缝隙连接功能

在 TCI 引起的骨癌痛模型上,二甲双胍(100 μg , i. t.) 的镇痛效果被缝隙连接抑制剂 CBX (10 μg , i. t.) 和 AMPK 抑制剂 CC(10 μg , i. t.) 提

前 30 min 预处理所抑制(图 4-A)。大鼠脊髓样品 Western blot 检测表明,二甲双胍降低了脊髓 p-JNK 的表达水平,而 AMPK 抑制剂 CC 则减弱了二甲双胍对 p-JNK 的影响(图 4-B)。

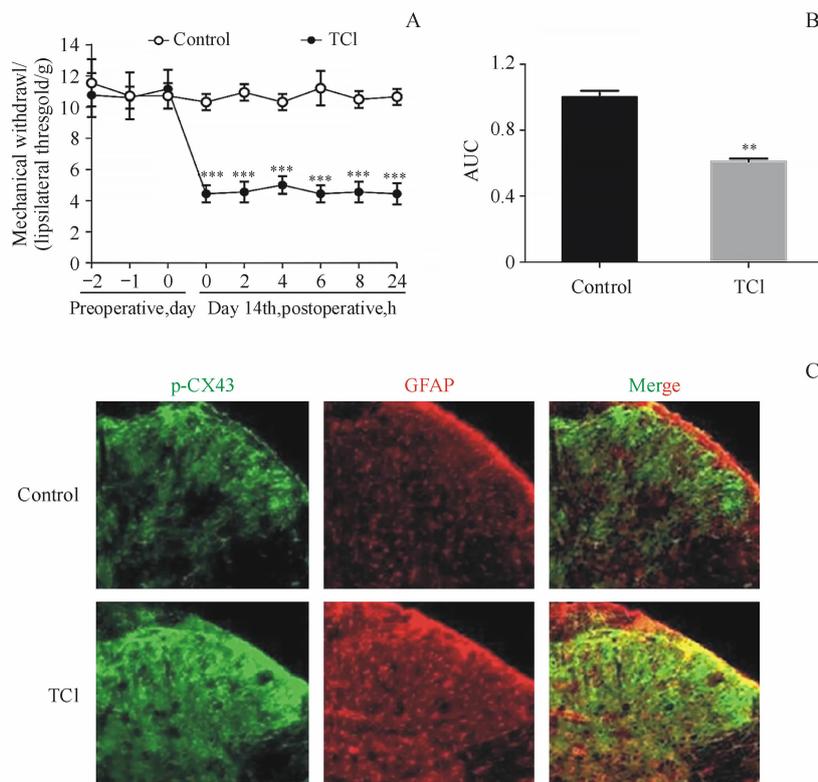


Figure 1 Tumor cell implantation (TCI) bone cancer pain activated astrocytes and inhibited gap junction in the spine of rat A:TCI significantly decreased the threshold of the mechanical withdrawal at Day 14 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$, $*** P < 0.001$ vs control group); B: Area under curve of the mechanical thresholds of control group and TCI group ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$, $** P < 0.01$ vs control group); C: TCI significantly increased the expression of GFAP and p-CX43 in the spine of rat

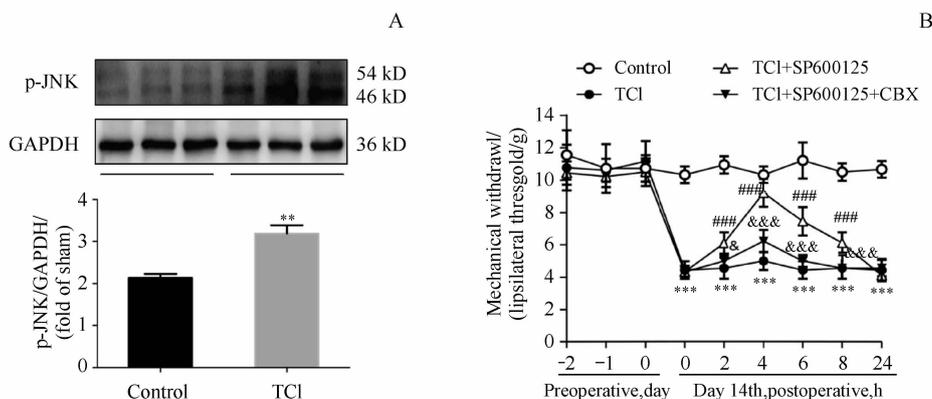


Figure 2 Important role of JNK-gap junction pathway in TCI-induced bone cancer pain

A:TCI significantly increased the expression of p-JNK in the spine of TCI rat;B:JNK inhibition attenuated TCI-induced bone cancer pain,which was abolished by gap junction inhibitor in rats

$*** P < 0.001$ vs control group; $### P < 0.001$ vs TCI group; $& P < 0.05$, $&&& P < 0.001$ vs TCI + SP600125 group

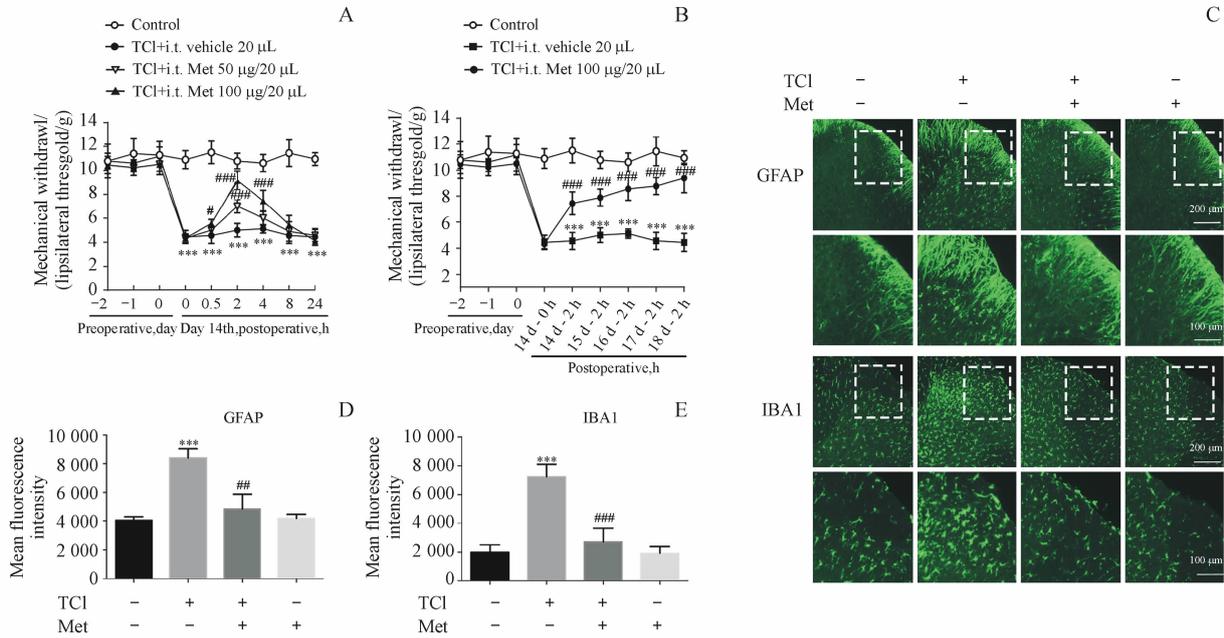


Figure 3 Metformin alleviated bone cancer pain caused by TCI in rats
 A: Single-dose of metformin significantly attenuated TCI-induced bone cancer pain ($\bar{x} \pm s, n = 6$); B: Repeated administration of metformin attenuated TCI-induced bone cancer pain ($\bar{x} \pm s, n = 6$); C-E: Metformin decreased the expression of GFAP and IBA-1 in the spine of TCI rats ($\bar{x} \pm s, n = 4$)
 *** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs TCI group

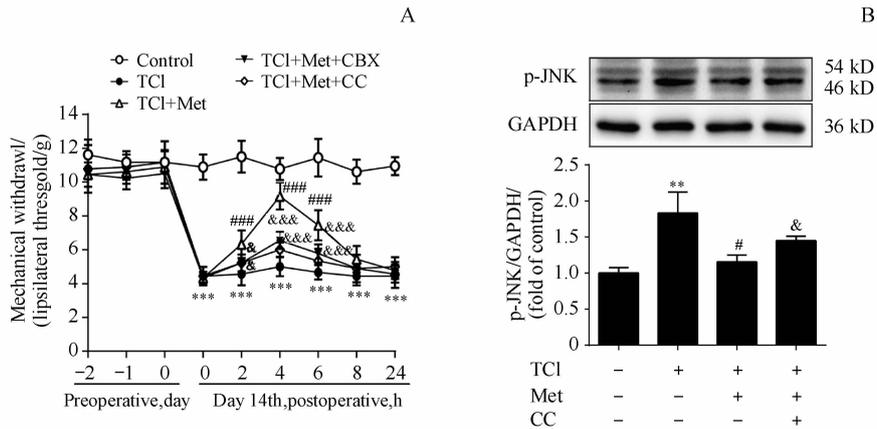


Figure 4 Analgesic effect of metformin on the bone cancer pain model is dependent on the AMPK-JNK-gap junction pathway
 A: Gap junction inhibitor CBX and AMPK inhibitor CC abolished the analgesic effect of metformin ($\bar{x} \pm s, n = 6$); B: AMPK inhibitor CC abolished the effect of metformin on p-JNK expression ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
 ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$ vs TCI group; & $P < 0.05$, && $P < 0.001$ vs TCI + Met group

4 讨论

目前,疼痛已经成为继体温、脉搏、呼吸、血压之后的第 5 大生命体征^[11], 日益受到重视。骨癌痛是肿瘤患者较为常见且十分剧烈的一种伤害性疼痛。遗憾的是,临床上常用的药物都无法取得令人满意的治疗效果。因此,寻找新的潜在治疗靶点和药物对于提高骨癌痛患者的生活质量而言,是非

常有必要的。

骨癌痛的形成机制较为复杂,目前,经过相关学者们的研究^[12-13], 中枢敏化被认为是重要机制之一。在中枢敏化机制中,许多报道都证明了脊髓星形胶质细胞在骨癌痛的产生和维持中发挥着重要的作用^[14-15]。星形胶质细胞可通过缝隙链接为其他神经细胞提供营养并开展细胞间通讯。所谓缝隙连接,是指将相邻细胞的细胞质进行连接的细胞

内通道,由相邻细胞膜上的两个连接子(connexon)互相锚定而构成,连接子则是由六个亚单位-连接蛋白(connexin/Cx)组成。大量研究^[16-17]表明,星形胶质细胞的缝隙连接在慢性神经病理性疼痛中扮演着至关重要的角色。本研究发现,TCI引起的骨癌痛大鼠脊髓中,星形胶质细胞大量激活而缝隙连接功能(与p-Cx43水平成反比)却明显减弱,且缝隙连接阻断剂CBX对骨癌痛大鼠的机械痛觉的行为学表现有重要影响。本研究首次证明星形胶质细胞上的缝隙连接也参与了骨癌痛的形成,骨癌痛模型下缝隙连接功能明显受阻。

c-Jun氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)是哺乳类细胞MAPK(mitogen-activated protein kinase,丝裂原活化蛋白激酶)信号通路的一个亚类。在慢性疼痛中,通常伴随着JNK信号通路的激活^[18]。抑制JNK通路能缓解骨癌痛也在不少报道中被证明^[19-20]。根据文献报道,在多种肿瘤模型中都发现JNK通路和缝隙连接存在着密切的相关关系^[16]。因此,在本研究考察了骨癌痛模型下JNK通路和缝隙连接的相互关系。结果显示,骨癌痛造模成功的大鼠脊髓中p-JNK和p-Cx43的蛋白水平都明显升高;JNK抑制剂SP600125能够显著抑制TCI造成的骨癌痛,而这种镇痛效果几乎完全被缝隙连接阻断剂CBX所抑制。本研究结果说明,JNK-缝隙连接功能在骨癌痛中有重要作用,可能成为解决骨癌痛这一难题的新治疗靶标。

AMPK即AMP依赖的蛋白激酶,与胆固醇的生物合成密切相关,是重要的代谢调节蛋白^[21]。本课题组之前的研究^[22]证明,在脊髓胶质细胞中激活AMPK能够有效缓解TCI造成的骨癌痛。因此,本研究试图探索AMPK对于骨癌痛的治疗效果是否与上述的JNK-缝隙连接功能有关。实验结果表明,给予AMPK激动剂二甲双胍能有效缓解大鼠TCI引起的骨癌痛,这种明显的镇痛效果能被AMPK阻断剂CC以及缝隙连接阻断剂CBX所抑制。且Western blot和免疫荧光结果显示,二甲双胍给药后,大鼠脊髓JNK的激活则被抑制,这种抑制可被AMPK抑制剂CC所阻断。本研究首次发现,AMPK-JNK-缝隙连接功能在骨癌痛生成中具有重要作用,通过给予二甲双胍能有效地缓解骨癌痛,为临床攻克骨癌痛提供了重要的线索。

综上所述,二甲双胍通过抑制星形胶质细胞中

JNK改善缝隙连接功能,显著缓解肿瘤细胞移植诱导的大鼠骨癌痛。本研究首次在骨癌痛模型下,发现星形胶质细胞中AMPK-JNK-缝隙连接功能的重要作用。本研究为临床骨癌痛的治疗提供了一种潜在的安全有效的药物,并提出了通过抑制脊髓星形胶质细胞JNK改善缝隙连接,进而改善骨癌痛的潜在治疗策略。

参考文献

- [1] Borregaard N, Cowland JB. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte [J]. *Blood*, 1997, **89**(10): 3503-3521.
- [2] Shaw RJ. Metformin trims fats to restore insulin sensitivity [J]. *Nat Med*, 2013, **19**(12): 1570-1572.
- [3] Deandrea S, Montanari M, Moja L, et al. Prevalence of undertreatment in cancer pain. A review of published literature [J]. *Ann Oncol*, 2008, **19**(12): 1985-1991.
- [4] Joyce JA, Pollard JW. Microenvironmental regulation of metastasis [J]. *Nat Rev Cancer*, 2009, **9**(4): 239-252.
- [5] Yang Y, Li H, Li TT, et al. Delayed activation of spinal microglia contributes to the maintenance of bone cancer pain in female Wistar rats via P2X7 receptor and IL-18 [J]. *J Neurosci*, 2015, **35**(20): 7950-7963.
- [6] Shen W, Hu XM, Liu YN, et al. CXCL12 in astrocytes contributes to bone cancer pain through CXCR4-mediated neuronal sensitization and glial activation in rat spinal cord [J]. *J Neuroinflammation*, 2014, **11**(1): 75.
- [7] Gao YJ, Ji RR. Targeting astrocyte signaling for chronic pain [J]. *Neurotherapeutics*, 2010, **7**(4): 482-493.
- [8] Ren BX, Gu XP, Zheng YG, et al. Intrathecal injection of metabotropic glutamate receptor subtype 3 and 5 agonist/antagonist attenuates bone cancer pain by inhibition of spinal astrocyte activation in a mouse model [J]. *Anesthesiology*, 2012, **116**(1): 122-132.
- [9] Xu J, Zhu MD, Zhang X, et al. NFκB-mediated CXCL1 production in spinal cord astrocytes contributes to the maintenance of bone cancer pain in mice [J]. *J Neuroinflammation*, 2014, **11**(1): 38.
- [10] Chen MJ, Kress B, Han X, et al. Astrocytic CX43 hemichannels and gap junctions play a crucial role in development of chronic neuropathic pain following spinal cord injury [J]. *Glia*, 2012, **60**(11): 1660-1670.
- [11] Medhurst SJ, Walker K, Bowes M, et al. A rat model of bone cancer pain [J]. *Pain*, 2002, **96**(1): 129-140.
- [12] Robinson CR, Dougherty PM. Spinal astrocyte gap junction and glutamate transporter expression contributes to a rat model of bortezomib-induced peripheral neuropathy [J]. *Neuroscience*, 2015, **285**(285C): 1-10.

- [13] Xiong F, Yan B, Dai W, *et al.* Analgesic effect of levo-corydalmine on neuropathic pain in rats and its mechanism [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2017, **48**(1): 70-75.
- [14] Wang XW, Hu S, Mao-Ying QL, *et al.* Activation of c-jun N-terminal kinase in spinal cord contributes to breast cancer induced bone pain in rats [J]. *Mol Brain*, 2012, **5**(1): 1-7.
- [15] Goblirsch MJ, Zwolak PP, Clohisy DR. Biology of bone cancer pain [J]. *Clin Cancer Res*, 2006, **12**(20): 6231s-6235s.
- [16] Mantyh PW, Clohisy DR, Koltzenburg M, *et al.* Molecular mechanisms of cancer pain [J]. *Nat Rev Cancer*, 2002, **2**(3): 201-209.
- [17] Lehre KP, Danbolt NC. The number of glutamate transporter subtype molecules at glutamatergic synapses: chemical and stereological quantification in young adult rat brain [J]. *J Neurosci*, 1998, **18**(21): 8751-8757.
- [18] Shima, David T, Deutsch, *et al.* Hypoxic induction of vascular endothelial growth factor (VEGF) in human epithelial cells is mediated by increases in mRNA stability [J]. *FEBS Lett*, 1995, **370**(3): 203-208.
- [19] Guo CH, Bai L, Wu HH, *et al.* The analgesic effect of rolipram is associated with the inhibition of the activation of the spinal astrocytic JNK/CCL2 pathway in bone cancer pain [J]. *Int J Mol Med*, 2016, **38**(5): 1433-1442.
- [20] Abascal F, Zardoya R. Evolutionary analyses of gap junction protein families [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, **1828**(1): 4-14.
- [21] Wei Q, Duan W, Zhou J, *et al.* Recent research progress in small molecule AMPK direct activators [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2015, **46**(4): 406-415.
- [22] Song H, Han Y, Pan C, *et al.* Activation of adenosine monophosphate-activated protein kinase suppresses neuroinflammation and ameliorates bone cancer pain; involvement of inhibition on mitogen-activated protein kinase [J]. *Anesthesiology*, 2015, **123**(5): 1170-1185.



中国药科大学学报

中国精品科技期刊 中国高校精品科技期刊
中国中文核心期刊 中国科学引文数据库核心期刊

传播医药科技创新研究成果的优秀媒体

药学前沿

提供药学领域的前沿信息 反映最新的药学研究进展

创新成果

展示医药科技最新成果 构建学术交流的平台

研究论文

科学研究原创论文 国家重大药学研究基金产出论文

邮发代号: 28-115, 欢迎订阅, 欢迎投稿!