

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2018.03.014

芳香外敷方对肺癌骨转移模型小鼠转移瘤体生长的影响

何佩珊¹, 冯兴中¹, 杨萌², 齐慧², 杨公博^{3*}

(1. 首都医科大学附属北京世纪坛医院, 北京市海淀区羊坊店铁医路 10 号, 100038; 2. 安泰康生物技术(北京)有限公司; 3. 中国中医科学院西苑医院)

摘要 目的 观察中药芳香外敷方对肺癌骨转移瘤的作用。方法 通过股骨内注射转染绿色荧光蛋白的人肺腺癌 A549 细胞建立肺癌骨转移瘤小鼠模型, 造模成功后随机分为中药外敷组 [芳香外敷方 0.5 g/(kg·d) 局部外敷, 造模后 7~21 天每日 1 次]、唑来膦酸组 [造模后 7、10、14、19 天腹腔注射唑来膦酸注射液 30 μg/(kg·d)]、模型组 (生理盐水局部外涂, 0.5 ml/只, 每日 1 次), 每组 10 只, 另设假手术组 (生理盐水局部外涂, 0.5 ml/只, 每日 1 次) 10 只。于造模当日及造模后第 3、7、11、14、17、21 天分别测量各组小鼠体质量, 并采用 FluorVivo 成像系统观察小鼠肿瘤面积及转移情况。于造模 21 天称量瘤体重量。结果 各组小鼠不同时间体质量比较差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。各组小鼠未出现其他部位和器官的转移。第 21 天中药外敷组小鼠肿瘤面积为 $(12.32 \pm 6.94) \text{ mm}^2$, 小于模型组的 $(23.91 \pm 9.86) \text{ mm}^2$ 及唑来膦酸组的 $(17.16 \pm 7.37) \text{ mm}^2$ ($P<0.05$), 且瘤体重量亦小于模型组 ($P<0.01$)。唑来膦酸组与模型组比较, 肿瘤面积与瘤体重量差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。结论 芳香外敷方可抑制肺癌骨转移瘤体增长。

关键词 肺癌; 骨转移瘤; 芳香外敷方; 荧光成像; 转移瘤

国外研究发现 60%~80% 的恶性肿瘤患者会发生骨转移, 肿瘤的骨转移常常引起骨痛、病理性骨折等多种骨相关事件, 抑制骨转移的发生发展不仅能提高患者生活质量, 还能延长生存期, 具有十分重要的意义^[1]。本研究应用活体荧光成像肺癌骨转移瘤小鼠模型, 初步评价芳香类中药外敷抗骨转移瘤的作用, 报告如下。

1 材料与方法

1.1 动物及细胞株

SPF 级雌性 BALB/c-nu 小鼠共 40 只, 4 周龄, 体质量 $(18 \pm 2) \text{ g}$, 由北京华阜康生物科技股份有限公司提供, 实验动物许可证号: SCXK(京)2014-0004。转染绿色荧光蛋白的人肺腺癌 A549 细胞株, 由安泰康生物技术(北京)有限公司提供。

1.2 药物

芳香外敷方: 以丁香、细辛 (1:2) 研磨成

粉调匀, 由首都医科大学附属北京世纪坛医院药剂室制作。唑来膦酸注射液, 国药准字 H20113138, 江苏正大天晴药业股份有限公司。

1.3 主要试剂及仪器

75% 乙醇 (批号: 11151107), 山东利尔康医疗科技股份有限公司; 戊巴比妥钠 (批号: p3761), Sigma 公司。荧光成像仪, 美国 INDEC BioSystems 公司 (型号: FluorVivo-Model-400); 电子精密天平, 美国 OHAUS 公司 (型号: CP323C); 倒置显微镜, 日本 Nikon 株式会社 (型号: MA100)。

1.4 模型建立

参考文献 [2] 方法, 小鼠 1% 戊巴比妥钠 50 mg/kg 麻醉后, 仰卧, 75% 乙醇消毒股骨处皮肤, 膝关节处与股骨垂直方向切一长 0.3~0.5 cm 的皮肤切口, 小心暴露髌骨, 先用 1 ml 的一次性无菌注射器针头在髌骨沿股骨长轴方向穿刺打孔, 然后换注射器进入股骨髓腔, 缓慢注入 50 μl 转染绿色荧光蛋白的人肺腺癌 A549 细胞 ($1 \times 10^6/\text{ml}$) 至股骨, 注射完毕后用骨蜡封住针孔。无菌棉签蘸

基金项目: 北京市中医药科技发展资金面上课题专项 (QN2014-06); 北京市中西医结合肿瘤诊疗中心建设项目; 首都医科大学附属北京世纪坛医院青年基金 (2014-Q16)

* 通讯作者: dr_yanggb@163.com, (010) 62835147

生理盐水清洗创口，皮肤缝合。假手术组在股骨注入等体积的生理盐水，其余操作同上。

1.5 分组与给药

建模后第 3 天，以 FluorVivo-Model-400 荧光成像仪对所有小鼠进行全身成像，以发现肺癌骨转移灶为建模成功。30 只建模成功小鼠采用随机数字表法分为中药外敷组、唑来膦酸组、模型组，每组 10 只，另设假手术组 10 只。中药外敷组给予芳香外敷方 $0.5 \text{ g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ ，于术后 7~21 天每天 9:00 避开伤口于手术切口旁开约 0.2 cm 局部贴敷，持续保留 6 h，每日 1 次。唑来膦酸组分别于术后 7、11、15、19 天给予唑来膦酸注射液腹腔注射，每次 $30 \mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 。模型组和假手术组避开伤口于手术切口旁开约 0.2 cm 给予涂擦生理盐水 $0.5 \text{ ml}/\text{只}$ ，每日 1 次。

1.6 观察指标及方法

1.6.1 体质量 于造模当日及造模后 3、7、11、14、17、21 天分别测量各组小鼠体质量，并观察小鼠一般情况。

1.6.2 肿瘤面积 于造模当日及造模后 3、7、11、14、17、21 天通过 FluorVivo 成像系统监测骨转移小鼠的肿瘤负荷情况^[4]，按照固定位置，保持小鼠腿外侧与底板平行记录肿瘤面积，并观察有无其他部位、器官出现转移灶。

1.6.3 瘤体重量 第 21 天给药结束后 6 h，将小鼠麻醉，在 FluorVivo 成像系统引导下取材，剪下同长度的胫骨，除去无荧光的肌肉，剩余称重。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析，计量资料均符合正态分布且方差齐，采用单因素方差分析；计数资料采用 χ^2 检验，以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠不同时间体质量比较

表 1 示，各组小鼠不同时间体质量比较，差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.2 各组小鼠肿瘤面积比较

实验期间通过 FluorVivo 成像系统实时观察肿

瘤生长情况，各组小鼠均未出现其他部位和器官的转移灶。造模 21 天各组小鼠骨转移瘤面积为模型组 (23.91 ± 9.86) mm^2 ，唑来膦酸组为 (17.16 ± 7.37) mm^2 ，中药外敷组为 (12.32 ± 6.94) mm^2 ，中药外敷组肿瘤面积较模型组和唑来膦酸组减小 ($P < 0.05$)，唑来膦酸组和模型组比较，差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。图 1 为模型组、中药外敷组、唑来膦酸组不同时间肿瘤面积平均值变化曲线图。

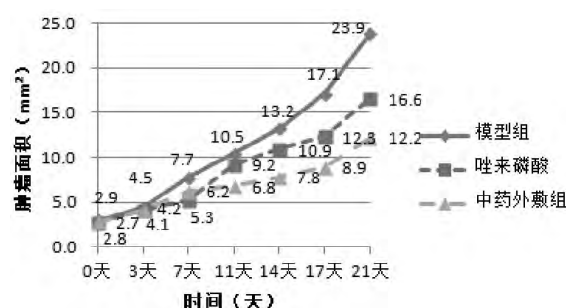


图 1 各组小鼠不同时间肿瘤面积平均值变化曲线图

2.3 各组小鼠瘤体重量比较

表 2 示，造模 21 天中药外敷组瘤体重量较模型组减小，差异具有统计学意义 ($P = 0.006$)。唑来膦酸组和模型组比较，差异无统计学意义 ($P = 0.112$)。

表 2 造模 21 天后各组小鼠瘤体重量比较 (mg, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	瘤体重量
假手术组	10	—
模型组	10	357.12 ± 97.39
唑来膦酸组	10	291.10 ± 77.91
中药外敷组	10	$242.84 \pm 52.84^*$

注：与模型组比较， $P < 0.01$

3 讨论

骨转移癌是晚期肿瘤患者常见的并发症之一，常引起骨质破坏、骨痛、病理性骨折、脊髓压迫、高钙血症等多种骨相关事件。目前对于骨转移癌模型建立的研究比较多的集中于乳腺癌^[5]及前列腺癌^[6]。腺癌作为肺癌中骨转移率最高的一种病理类型，对其骨转移机制的探索越来越引起人们的重视。左心室注射法由于易导致脑、肺、肾上腺皮质

表 1 各组小鼠不同时间体质量比较 (g, $\bar{x} \pm s$)

分组	鼠数	造模当日	造模 3 天	造模 7 天	造模 11 天	造模 14 天	造模 17 天	造模 21 天
假手术组	10	17.96 ± 0.56	18.12 ± 0.64	18.91 ± 0.72	19.07 ± 0.77	18.51 ± 0.63	18.45 ± 0.62	18.78 ± 0.68
模型组	10	17.6 ± 0.46	17.43 ± 0.49	17.96 ± 0.54	18.22 ± 0.58	17.82 ± 0.55	17.98 ± 0.64	18.11 ± 0.53
唑来膦酸组	10	18.25 ± 0.66	18.36 ± 0.68	18.82 ± 0.72	19.08 ± 0.78	18.54 ± 0.67	18.28 ± 0.64	18.71 ± 0.72
中药外敷组	10	17.35 ± 0.53	17.86 ± 0.71	18.56 ± 0.53	18.70 ± 0.61	18.83 ± 0.66	18.56 ± 0.55	18.67 ± 0.62

等其他部位和器官多发性转移的缺点,以致骨转移灶尚未形成,实验动物已死于其他部位转移^[7-8]。本研究经一侧股骨骨髓腔接种肿瘤细胞制备小鼠肺癌骨转移模型,是目前最常使用的制备方法^[9]。本研究全部小鼠均造模成功,未出现其他器官组织的转移,再次证实此模型稳定,重复性好。唑来膦酸注射液是治疗骨转移癌的常用药,通过吸收附着于骨骼中的羟基磷灰石结晶,抵制骨溶解并可抑制破骨细胞的骨吸收作用,起到延缓骨破坏预防新的骨转移发生和镇痛作用^[10],故作为本研究的对照干预方法。

中医学认为骨为肾之体。肾藏精,主骨生髓,骨骼的生长发育和维持全都依靠肾精的滋养,肾精充足则骨髓充盈,骨骼健壮;肾精不足则生髓无源,骨失所养,体内癌毒邪气乘虚而入,羁留骨髓之间,聚而成瘤,腐骨蚀络。骨转移癌属中医学“骨瘤”“骨蚀”“骨疽”“骨痹”等范畴,《清代外科证治全书》有“贴骨瘤,贴骨而生,极疼痛”记载。因此目前中医治疗多以补肾、活血为主^[11]。中医外治法历史悠久,《理瀹骈文》云“外治之理,即内治之理,外治之药,即内治之药,所异者法耳。医理药性无二,而法则神奇变化”。中药外治为体表直接给药,药力直达病所,且可避免药物内服带来的副作用等。特别是晚期癌症患者正气已虚,不耐攻伐,脾胃吸收功能减弱,单靠内服药效果不佳,中药外治更具优势。

前期研究显示,芳香类中药外敷可促进药物透皮吸收,缓解患者骨转移癌痛^[12],还能降低骨转移模型小鼠机械性痛觉和热刺激痛觉^[13],但芳香类中药外敷是否具有抑制骨转移癌的作用尚未明确。本研究通过 FluorVivo 成像系统,实时观察肿瘤生长情况,发现各组小鼠肿瘤面积随时间逐渐增大,造模 21 天时,中药外敷组肿瘤面积和瘤体重量均较模型组显著减小,提示芳香外敷方对骨转移瘤体生长有一定的抑制作用。由于本研究时间较短,且芳香外敷方抗骨转移癌的机制尚未明确,下一步将对其远期效应及相关机制进行探讨。

参考文献

- [1] CLOHISY DR, MANTYH PW. Bone cancer pain [J]. Cancer, 2003, 97(3 Suppl) : 866-873.
- [2] SCHWEI MJ, HONORE P, ROGERS SD, et al. Neuro-

chemical and cellular reorganization of the spinal cord in a murine model of bone cancer pain [J]. J Neurosci, 1999, 19(24) : 10886-10897.

- [3] WALKER K, MEDHURST SJ, KIDD BL, et al. Disease modifying and anti-nociceptive effects of the bisphosphonate, zoledronic acid in a model of bone cancer pain [J]. Pain, 2002, 100(3) : 219-229.
- [4] LUO Z, YU GY, LEE HW, et al. The Nedd8-activating enzyme inhibitor MLN4924 induces autophagy and apoptosis to suppress liver cancer cell growth [J]. Cancer Res, 2012, 72(13) : 3360-3371.
- [5] YONEDA T, SASAKI A, DUNSTAN C, et al. Inhibition of osteolytic bone metastasis of breast cancer by combined treatment with the bisphosphonate ibandronate and tissue inhibitor of the matrix metalloproteinase-2 [J]. J Clin Invest, 1997, 99(10) : 2509-2517.
- [6] KOBAYASHI D, KAWAI N, SATO S, et al. Thermotherapy using magnetic cationic liposomes powerfully suppresses prostate cancer bone metastasis in a novel rat model [J]. Prostate, 2013, 73(9) : 913-922.
- [7] KJONNIKEN I, BREISTOL K, FODSTAD O. Site-dependent differences in sensitivity of LOX human melanoma tumors in nude rats to dacarbazine and mitozolomide, but not to doxorubicin and cisplatin [J]. Cancer Res, 1992, 52(5) : 1347-1351.
- [8] ARGUELLO F, BAGGS RB, ESKENAZI AE, et al. Vascular anatomy and organspecific tumor growth as critical factors in the development of metastases and their distribution among organs [J]. Int J Cancer, 1991, 48(4) : 583-590.
- [9] HONORE P, SCHWEI J, ROGERS SD, et al. Cellular and neuro-chemical remodeling of the spinal cord in bone cancer pain [J]. Prog Brain Res, 2000, 129: 389-397.
- [10] 孙燕,石远凯. 临床肿瘤内科手册 [M]. 5 版. 北京: 人民卫生出版社, 2007: 258-259.
- [11] 姚暄,贾立群,谭煌英,等. 补肾壮骨中药对大鼠乳腺癌骨转移模型骨痛及骨质破坏的影响 [J]. 中医药学报, 2012, 40(2) : 14-16.
- [12] 何佩珊,李泉旺,安超,等. 超声电导结合中药镇痛方外治阴证癌性疼痛的临床研究 [J]. 世界中医药, 2013, 8(10) : 1199-1201.
- [13] 何佩珊,冯兴中,潘国凤,等. 芳香外敷方对骨转移癌痛小鼠机械性痛觉和热刺激痛觉的影响 [J]. 中医杂志, 2016, 57(20) : 1782-1784.

Impact of Fangxiang Waifu Fang (芳香外敷方) on growth of Metastatic Tumor of Model Mice with Bone Metastasis of Lung Cancer

HE Peishan¹, FENG Xingzhong¹, YANG Meng², QI Hui², YANG Gongbo³

(1. Beijing Shijitan Hospital, Capital Medical University, Beijing, 100038; 2. AntiCancer Biotechnology (Beijing) Limited Company; 3. Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences)

ABSTRACT Objective To observe the effect of Chinese medicine Fangxiang Waifu Fang (芳香外敷方) on bone metastasis of lung cancer. **Methods** Established lung cancer with bone metastatic mice models by intra-femur injection human lung adenocarcinoma A549 cells transfected with green fluorescent protein. After successful modeling, mice were randomized into two groups with 10 in each group. Chinese medicine external application group was given Fangxiang Waifu Fang 0.5 g/(kg·d) local external application, once every day from 7th day to 21st day after modeling, while the zoledronic acid group was given zoledronic acid injection 30 μg/(kg·d) by intraperitoneal injection on the 7th, 10th, 14th and 19th day after modeling, and the model group (normal saline local external application, 0.5 ml/mouse, once every day), n = 10. The sham operation group was given normal saline local external application, 0.5 ml/mouse, once every day. Body weight was measured in each group on the modeling day, on the 3rd, 7th, 11th, 14th, 17th and 21st day after modeling. Tumor area and metastasis were examined by FluorVivo image-forming system. Tumor weight was measured on the 21st day of modeling. **Results** The difference of mice body weight in each group at different time was not significant ($P > 0.05$). No metastasis of other parts and organs was observed in mice in each group. On the 21st day, mice tumor area was (12.32 ± 6.94) mm² in the Chinese medicine external application group, which was smaller than (23.91 ± 9.86) mm² in the model group and (17.16 ± 7.37) mm² in the zoledronic acid group ($P < 0.05$). Moreover, tumor weight was also less than that in the model group ($P < 0.01$). Compared with the zoledronic acid group and the model group, the difference of tumor area and tumor weight was not significant ($P > 0.05$). **Conclusion** The Fangxiang Waifu Fang could inhibit the tumor growth of lung cancer bone metastasis.

Keywords lung cancer; metastatic carcinoma of bone; Fangxiang Waifu Fang; fluorescence imaging; metastatic tumor

(收稿日期: 2016-10-26; 修回日期: 2017-02-03)

编辑: 焦爽

读者·作者·编者

中医药学术论文中药名称及名词术语的使用

中医药学术论文中正确使用中药名称及术语对于提高论文的科学性具有重要意义。中药学名词术语应使用全国科学技术名词审定委员会公布的《中医药学名词》和相关学科的名词。中药名称应以最新版《中华人民共和国药典》为主要依据。暂未公布者及《中华人民共和国药典》未收载的品种可参考团体标准 ZGZYXH/T 1-2015《中药学基本术语》、《中药大辞典》以及新版全国高等中医院校统编教材《中药学》。地方及少数民族药物可遵照地方相关标准或药物的习称。

中药名称的使用应根据其概念范畴使用相应的名称。中药材使用药材名称,必要时需注明拉丁学名;临床处方应使用饮片名称,若其无法定名称,论述时可使用药材名称。由特定种质、产区,以及特定的生产加工技术生产的道地药材加工炮制而成的饮片,可在药材名前加产地名称作为特殊的饮片名称,如“岷当归”“川厚朴”等。处方中饮片为生品者,有法定名称的遵法定名称,无法定名称且毒性较强的,用生品时,应在其药材名称前加注“生”字,以免误用,如生大黄。无法定名称的炮制品,可在其药材名称之前或之后加炮制术语炒、焦、煨、炙、盐、炭、曲等作为饮片名称,如姜炭、半夏曲等。无法定饮片名称的鲜品入药时,应在药材名前加“鲜”字,如鲜薄荷。使用特定药用部位入药的饮片,如无法定饮片名称,表述时可在其药材名称前或后加药用部位名称,如当归尾。有特殊煎煮要求的中药,应在饮片名称后加圆括号注明煎服法,如薄荷(后下)、生石膏(先煎)、三七粉(冲服)等。中成药名称以国家药典委员会《中成药通用名称》为准,暂未公布者可依次参照国家食品药品监督管理总局批准的中成药通用名、新版全国高等中医院校统编教材《方剂学》。

(本刊编辑部)