

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2016.20.017

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

何佩珊¹, 冯兴中¹, 潘国凤¹, 杨萌², 齐慧², 杨公博^{*}

(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匠路 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 评价芳香中药外敷缓解癌痛的疗效。方法 将 30 只裸鼠通过股骨内注射表达绿色荧光蛋白的人肺腺癌 A549 细胞建立肺癌骨转移癌痛模型。造模成功后随机分为中药外敷组、扶他林组、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 g/(kg·d) 外敷, 扶他林组给予扶他林 0.1 g/(kg·d) 局部涂抹, 模型组和假手术组给予涂擦生理盐水 0.5 ml/只, 各组外敷至少持续 6 h, 每日 1 次。治疗前后观察各组大鼠机械痛觉超敏实验的缩足反应百分率和热刺激痛阈值。结果 治疗前后模型组缩足反应百分率均较假手术组升高, 而热刺激痛阈值明显降低 ($P < 0.01$)。治疗后与扶他林组和模型组比较, 中药外敷组缩足反应百分率明显降低, 而热刺激痛阈值明显升高 ($P < 0.01$)。结论 芳香外敷方能缓解肺癌骨转移小鼠癌痛行为, 且疗效优于扶他林。

关键词 肺癌骨转移; 芳香外敷方; 癌痛; 机械性痛觉; 热刺激痛觉

癌性疼痛是晚期肿瘤患者最常见的症状之一, 严重影响患者生活质量^[1]。我们通过长期临床观察发现, 芳香类中药外敷不仅促进药物透皮吸收, 还能缓解患者骨转移癌痛^[2], 减少止痛药物的用量。因此, 本研究以“毒损络脉”为理论基础, 应用活体荧光成像肺癌骨转移癌痛模型, 初步评价芳香类中药外敷治疗骨转移癌痛的疗效, 进一步探讨其可能的作用机理, 现报告如下。

1 材料与方法

1.1 动物及细胞株

SPF 级雌性 BALB/c-u 小鼠共 40 只, 4 周龄, 体质量 (18 ± 2) 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, 加入透皮吸收剂, 由首都医科大学附属北京世纪坛医院药剂室制作。扶他林乳膏剂, 国药准字 H19990291, 北京诺华制药有限公司。

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。注射器(批号: 329461), 美国 BD 公司; FluorVivo-Model-400 荧光成像仪, 美国 INDEC 公司; 奥豪斯电子精密天平, 美国 OHAUS 公司; 医学图像采集系统, 日本奥林巴斯株式会社; 倒置显微镜, 日本 Nikon 株式会社; Von Frey 细纤维, 美国 Stoelting 公司; 热板测痛仪, 宁海白日电子医药仪器厂。

1.4 小鼠骨转移癌痛活体荧光成像模型建立

参考文献[3]方法, 裸鼠麻醉(戊巴比妥钠麻醉)后, 仰卧, 腹部朝上, 用 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 一次性无菌注射器针头在髌骨沿股骨长轴方向穿刺打孔, 然后换上 30 μ l 注射器进入股骨髓腔, 缓慢注入 50 μ l 表达绿色荧光蛋白的人肺腺癌 A549 细胞 (1×10^6 /ml) 至股骨, 注射完毕后用骨蜡封住

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

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

针孔。无菌棉签蘸生理盐水清洗创口，皮肤缝合。建模后第 3 天，以 FluorVivo-Model-100 荧光成像仪对所有小鼠进行全身成像。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

30 只造模成功小鼠采用随机数字表法分为中药外敷组、扶他林组、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 g/(kg · d)，于造模后 7 ~ 21 天相同时间(9:00 时)外敷。扶他林组给予扶他林 0.1 g/(kg · d)，于相同时间进行局部涂抹。模型组和假手术组于相同时间给予涂擦生理盐水 0.5 ml/只。各组每次外敷至少持续 6 h，每日 1 次。

1.6 观察指标及方法

1.6.1 机械性痛觉超敏^[4] 分别于治疗前后用 2 g Von Frey 细纤维刺激小鼠左侧足底中部，5 ~ 6 s 观察小鼠缩足反应。每只动物纤维试验 5 次，两次试验之间至少间隔 2 min。动物对 Von Frey 纤维刺激的缩足反应百分率 = 缩足次数 / 5 × 100%。

1.6.2 热刺激痛觉过敏 分别于治疗前后评估小鼠对热刺激的反应，先调节热板仪温度恒定在 (50 ± 1) °C，然后将小鼠放置在热板上，待出现舔后足时所需要的时间值 (s) 即为该动物的痛阈值，操作时每只小鼠测 3 次，间隔 > 5 min，取 3 次均值作为该动物的热刺激痛阈值。在实验前均先测定足底基础痛阈值。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析，计量资料用 ($\bar{x} \pm s$) 表示，采用 *t* 检验，以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠不同时间缩足反应百分率比较

表 1 示，治疗前中药外敷组、扶他林组、模型组缩足反应百分率均较假手术组升高 (*P* < 0.01)。治疗后扶他林组、模型组缩足反应百分率亦明显高于假手术组，中药外敷组缩足反应百分率明显低于扶他林组和模型组 (*P* < 0.05)。

表 1 各组小鼠不同时间缩足反应百分率比较 (%， $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	治疗前	治疗后
假手术组	10	23.86 ± 3.88	16.81 ± 3.39
模型组	10	32.42 ± 3.89*	52.27 ± 5.61*
扶他林组	10	30.35 ± 5.49*	32.75 ± 4.45*
中药外敷组	10	30.41 ± 4.60*	23.16 ± 3.38 ^{△▲}

注：与假手术组比较，* *P* < 0.01；与模型组比较，[△]*P* < 0.01；与扶他林组比较，[▲]*P* < 0.01

2.2 各组小鼠热刺激痛阈值比较

表 2 示，各组小鼠造模前热刺激基础痛阈值差异无统计学意义 (*P* > 0.05)。治疗前模型组扶他林组、中药外敷组、热刺激痛阈值较假手术组明显下降 (*P* < 0.01)，提示痛觉过敏产生。治疗后模型组和扶他林组热刺激痛阈值较假手术组明显降低 (*P* < 0.01)，而中药外敷组热刺激痛阈值较扶他林组和模型组升高 (*P* < 0.01)。

表 2 各组小鼠不同时间热刺激痛阈值比较 (s， $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	基础痛阈值	治疗前	治疗后
假手术组	10	16.26 ± 3.12	16.14 ± 3.41	16.13 ± 3.32
模型组	10	16.17 ± 3.26	7.22 ± 2.62*	6.96 ± 2.64*
扶他林组	10	16.09 ± 3.17	7.46 ± 2.79*	10.77 ± 3.23*
中药外敷组	10	16.27 ± 3.35	7.28 ± 3.22*	14.12 ± 3.68 ^{△▲}

注：与假手术组比较，* *P* < 0.01；与模型组比较，[△]*P* < 0.01；与扶他林组比较，[▲]*P* < 0.01

3 讨论

中医外治法历史悠久，《理渝骈文》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，止痛迅速有效，且可避免药物内服带来的某些副作用等，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。《景岳全书·杂证谟·积聚》云“凡坚硬之积，必在肠胃之外，募原之间，原非药力所能卒至。宜用阿魏膏、琥珀膏，或水红花膏、三圣膏之类，以攻其外。再用长桑君针法，以攻其内。”对于癌性疼痛的病因，我们认为，首先表现为局部的占位，阻滞经络气血的实性疼痛，因实致痛。络脉是气血运行的通道，也是病邪传变的通道。当机体正气不足，病邪侵袭络脉伤及络气，使络气郁滞导致津血互换障碍，津凝为痰、血滞为瘀，痰瘀作为病理产物形成痰瘀阻络的病理状态，产生痰浊、瘀血等“癌毒”^[5]。毒阻络脉，周围之络亦为牵累成“病络”。病络已成，壅塞不通，痰阻血瘀，癌毒内郁，失其内联脏腑、外络肢节的生理功能，滞气碍血或癌毒直接侵犯，耗伤正气，皆可导致剧烈、持久之癌痛^[6]。

本研究初步评价了芳香外敷方在缓解癌痛方面的作用，芳香类中药具有走窜定痛的作用，同时其挥发油能促进其他药物透皮吸收，因此，在疾病外治中应用广泛。文献报道，丁香(油)可明显提高小鼠机械性压痛痛阈值^[7]，其有效成分丁香酚对小鼠热板试验、醋酸扭体试验有一定镇痛作

用^[8]；细辛对抗炎、镇痛具有明确作用^[9]；扭体试验、热板试验、温浴试验、电尾试验结果提示，细辛对多种疼痛动物模型具有良好的镇痛作用，与吗啡比较，其镇痛作用起效慢，但作用时间长^[10]。

本研究经一侧股骨骨髓腔接种肿瘤细胞制备的小鼠骨癌痛模型，是目前最常使用的癌痛模型的制备方法，与人类癌性疼痛疾病有许多共同特征，而且此模型稳定、重复性好，与人类骨癌痛高度相似^[11]。机械性痛觉超敏和热刺激痛觉过敏是生理性疼痛的重要特征，本研究结果显示，造模第 7 天，小鼠出现明显痛觉过敏，并在 2 周内持续增强，延续至整个观察期。第 21 天，中药外敷组小鼠缩足反应百分率比扶他林组和模型组少 ($P < 0.01$)，同时中药外敷组热刺激痛阈值亦比扶他林组和模型组升高 ($P < 0.01$)，提示芳香外敷方能抑制肺癌骨转移小鼠触诱发痛和热刺激痛觉过敏，说明芳香外敷方具有缓解骨转移癌痛有作用。另外，通过应用荧光蛋白裸鼠模型，可以在活体上实时、连续、重复、无创地观察造模是否成功，肿瘤的生长、浸润、转移，可以对肿瘤治疗的疗效进行直观的评价，而不需将动物处死进行肿瘤大小的测量，为肿瘤进展的监测提供了一种方便低创的手段。

参考文献

[1] THURLIMANN B, DE STOUTZ ND. Causes and treat-

ment of bone pain of malignant origin [J]. Drugs, 1996, 51(3): 383-398.

[2] 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.

[3] 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(24): 10886-10897.

[4] CHAPLAN SR, BACH FW, POGREL JW, et al. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw [J]. J Neurosci Meth, 1994, 53(1): 55-63.

[5] 雷燕. 络病理论探微 [J]. 北京中医药大学学报, 1998, 21(2): 18-23.

[6] 吴以岭. 络病学 [M]. 北京: 科学技术出版社, 2004: 209-221.

[7] 翟华强,王双艳,张硕峰,等. 黄连、丁香外用药理作用研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(11): 192-195.

[8] 宋媛媛,李媛,张洪泉. 丁香苷抗炎镇痛作用及部分机制研究 [J]. 中国野生植物资源, 2010, 29(4): 27-30, 41.

[9] 胡竟一,邱春燕,雷玲,等. 细辛的镇痛和抗炎作用 [J]. 中药药理与临床, 2011, 27(2): 67-69.

[10] 杨浩,王磊,魏景莉,等. 细辛替代吗啡镇痛可行性实验研究 [J]. 中国临床研究, 2010, 23(7): 568-570.

[11] 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.

Effect of Fangxiang Waifu Decotion (芳香外敷方) on Mechanical Pain and Heat Stimulated Pain in Mice suffering from Bone Metastatic Pain

HE Peishan¹, FENG Xingzhong¹, PAN Guofeng¹, YANG Meng², QI Hui², YANG Gongbo³

(1. Beijing Shijitan Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing, 100038; 2. AntiCancer Biotech (Beijing) Co., Ltd.; 3. Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences)

ABSTRACT Objective To evaluate the efficacy of aromatic herbs in cancer pain control. **Methods** Lung cancer bone metastatic pain model was built by injecting human lung adenocarcinoma A549 cells expressing green fluorescent proteins into the femurs of 30 nude mice. After successful modeling, the mice were divided randomly into an external application of Chinese herb group, a Votalin group and a model group, with 10 in each group. Sham operation group was also established with another 10 mice. The external application of Chinese herb group was given Fangxiang Waifu Decotion externally applied, 0.5 g/(kg·d); the Votalin group was locally applied with Votalin, with 0.5 g/(kg·d); the model group and sham operation group were embrocated with normal saline (0.5 ml each). The external application in each group was kept for at least 6 hours, once a day. For each group, the paw withdrawal response percentage and thermal threshold of pain in mechanical pain hypersensitivity experiment were observed before and after the treatment. **Results** Before and after treatment, the paw withdrawal response percentages in the model group were both higher, but the thermal thresholds of pain were obviously lower than that in the sham operation group, ($P < 0.01$). After treatment, compared with the Votalin and model groups, the paw withdrawal response percentage in the external application in Chinese herb group was evidently lower, while the thermal threshold of pain appeared higher ($P < 0.01$). **Conclusion** Fangxiang Waifu Decotion could relieve the lung cancer bone metastatic pain in mice, and the efficacy seems better than Votalin.

Keywords lung cancer bone metastasis; Fangxiang Waifu Decotion; cancer pain; mechanical pain; heat stimulated pain

(收稿日期: 2015-12-28; 修回日期: 2016-04-26)

编辑: 邓 媛