

扶正化癥方与养阴柔肝方预防大鼠实验性肝癌的研究

刘 平 刘 成 王晓素 徐列明 胡义扬

(上海中医药大学 上海 200032)

摘要 扶正化癥方与养阴柔肝方对 DEN 诱发大鼠肝癌的作用结果表明,大鼠癌前期(14 周)肝细胞增生灶明显减少。肝组织 GGT、GST 及血清 ALP 活性显著下降。动物诱癌 24 周后,对照组的肝癌发生率为 100%,扶正化癥方组与养阴柔肝方组分别为 92.9%与 85.7%。用药组的癌变程度较轻,AFP 阳性区及 GGT 阳性灶均降低或减少,肝组织 GGT、GST 与血清 ALP 活性降低;其中以养阴柔肝方的作用为优。

关键词 扶正化癥方 养阴柔肝方 二乙基亚硝胺 大鼠肝癌

Fuzheng Huayu Recipe and Yangyin Rougan Recipe in preventing Hepatocarcinoma of Rats

Liu Ping, Liu Cheng, Wang Xiaosu, Xu Lieming, Hu Yiyang

(Shanghai University of TCM, Shanghai, 200032)

Abstract: As compared with non-dosed controls, the liver of the rats treated with Fuzheng Huayu recipe or Yangyin Rougan recipe was observed to display obvious decrease in the number of hyperplastic zones in the hepatocytes during the precarcinoma period. Also, activities of GGT and GST in the liver and serum ALP were markedly reduced. In the 24th week after the rats was treated by diethylnitrosamine (DEN) for induction of hepatocarcinoma, the incidence of hepatocarcinoma was 100% in the control, while 92.9% and 85.7%, respectively, in the groups treated with the two recipes. And the lower activities of GGT and GST in the live and serum ALP were also found.

Yangyin Rougan recipe appeared to be more potent than the other one in preventing the cancer. The findings from hepatocyte cycle kinetics suggested that the two Chinese recipes were able to inhibit synthesis of hepatocyte DNA, leading to interruption of the cell division and proliferation.

Key words: Fuzheng Huayu Recipe, Yangyin Rougan Recipe, Diethylnitrosamine (DEN), Hepatocarcinoma

我们曾报道扶正化癥方对治疗肝炎后肝硬化具有良好的治疗效果^[1]。而肝癌是肝炎后肝硬化最常见的并发症^[2]。本文则就扶正化癥方和养阴柔肝方对二乙基亚硝胺诱发大鼠肝癌的作用进行了观察,结果表明两方对此实验性肝癌的病变确具有一定的阻抑效果。

1 材料与方法

1.1 材料 Wistar 雄性大鼠 100 只,体重 100~120g,由中科院上海实验动物中心提供。二乙基亚硝胺(Diethylnitrosamine, DEN)由中科院南京土壤研究所提供;1-氯 2,4-二硝基苯(1-chloro-2,4-dinitrobenzene, CDNB)和重氮色盐紫酱 GBC 盐(Fast garnet GBC salt)购自 sigma 公司;3,3'-二氨基联苯胺(3,3'-diaminobenzidine, DAB)为瑞士产品。兔抗大鼠 AFP、羊抗兔 IgG、兔 PAP 抗体由上海医科大学病理教研室提供。

1.2 方法

1.2.1 模型制备 86 只大鼠以含 80ppmDEN(5mg/kg 体重/日)的饮水诱癌,连续 20 周,然后改为正常饮水至 24 周末。

1.2.2 药物 扶正化癥方(虫草菌丝、松黄、桃仁、丹参等)和养阴柔肝方(北沙参、麦冬、当归、白芍等),由上海中华制药厂中心实验室协助制成流浸膏。

1.2.3 分组 随机分成正常组(14 只)、模型对照组(25 只)、扶正化癥组(25 只,简称 F 组)和养阴柔肝组(25 只,简称 Y 组)。正常组常规喂养,F 组和 Y 组在造模开始即以 1ml 药液(分别相当于生药 0.42g 及 2.4g)/100g 鼠重/日灌胃,模型组灌等量自来水,至实验结束。另 11 只自造模之日起,隔 2 周处死 1

只,进行肝脏病理学动态观察。

实验至 14 周末,随机取正常组 7 只,其它每组各 11 只,在禁食 16 小时后,乙醚麻醉下断头取血,剖腹检查肝脏,并在肝中叶最大剖面处取肝组织。其余大鼠均在 24 周末取材。

1.2.4 观测项目与方法

(1)动物死亡率与肝癌发生率。

(2)肝大体与光镜下组织学观察。

(3)肝组织 γ -谷氨酰转肽酶(γ -Glutamyltranspeptidase, GGT)活性及组化检测。生化检测用 γ -氨基酰对硝基苯胺法;组化按 Rutenburg 改良法作 GGT 染色^[3],光镜观察的 GGT 阳性灶依照 Scherer 的立体学方法,将二维数据换算成三维数据^[4]。其主要观察参数有:GGT 灶平均直径(mm)、平均面积($\text{mm}^2/\text{个}$)、平均体积($\text{mm}^3/\text{个}$)、面积密度(mm^2/cm^2 肝切面积)及体积密度(mm^3/cm^3 肝组织)。

(4)甲胎蛋白(AFP)的免疫组化:按 PAP 法显色^[5],光镜下观察,AFP 阳性细胞定量分析用 VIDAS 图像分析系统(德国 ZEISS 公司)分析阳性区域面积密度(mm^2/cm^2 肝切面积)。

(5)肝组织谷胱甘肽-硫转移酶(Glutathion-Stransferase, GST)活性测定:低温下制备均浆,离心后取上清液以 Adchi 改良法测定^[6]。

(6)血清碱性磷酸酶(Alkline phosphatase, ALP)活性测定采用改良金氏法。

(7)肝细胞周期动力学观察:按 Vindelov 氏法制备细胞 DNA 样品^[7],美国 B-D 公司

生产的 FACS tar plus 流式细胞仪测定。

2 结果

2.1 各组大鼠死亡率、体重变化及肝癌发生率
模型对照组于 20 周时 1 只因肝癌破裂出血而死亡,23 周时死亡 2 只,死因为癌破裂出血和恶液质;两用药组动物的死亡均发生在 23 周,死因为癌肿破裂出血。24 周时模型对照组动物全部发生肝癌,F 组和 Y 组分别有 1 只及 2 只未发生肝癌。见表 1,图 1。

表 1 24 周时各组大鼠死亡率与肝癌发生率			
组 别(只)	死亡率(%)	肝癌发生率(%)	
正 常 组(7)	0(0.00)	0(0)	
模型对照组(14)	3(21.43)	14(100.0)	
扶正化瘀组(14)	1(7.14)	13(92.9)	
养阴柔肝组(14)	2(14.28)	12(85.7)	

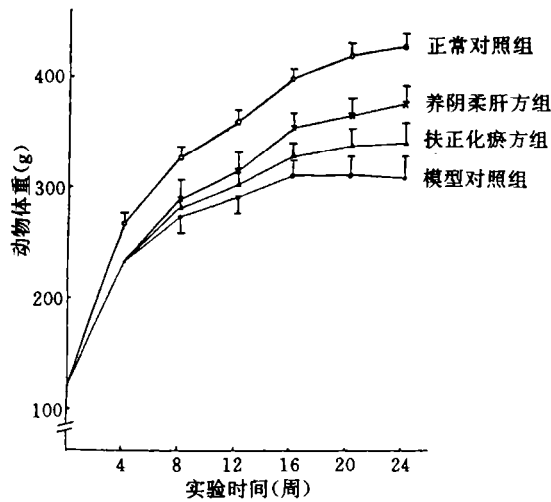


图 1 各组动物体重变化

2.2 各组肝脏表面观及病理组织学变化

2.2.1 肉眼下观察 模型对照组 14 周时肝表面粗糙,多数(7/11)可见灰白色或淡黄色结节;两组中药组病变均明显较模型组轻,仅个别大鼠有结节可见,大多数表面较光滑,组织较柔软。24 周的模型对照组动物均发生肝癌,癌结节数量多而体积大,直径可达 3.5cm,满布肝脏各叶;F 组与 Y 组的肝癌结节较模型组小,直径多在 0.5~1.0cm,而且

数量少,多为单个或数个。两中药组间的变化相似。

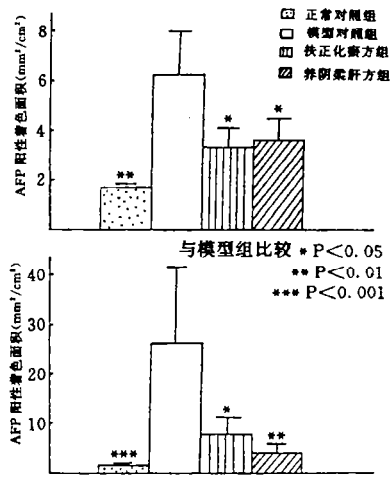


图 2 各组大鼠肝组织切片 AFP 免疫组化阳性着色面积的变化
(上图为 14 周实验,下图为 24 周时实验结果)

2.2.2 光镜观察 模型对照组自 10 周起肝实质出现各种异常肝细胞构成的增生灶(结节)。至 14 周增生灶更多见,增生的细胞排列成团块或条索状,结节周围的肝组织有受到挤压或浸润的现象。这些肝细胞异型性增生包括:①嗜碱性细胞增生灶。细胞无明显增大,核大,染色质粗糙,核仁明显,胞浆早期略呈嗜碱性,继后成高度嗜碱性。②嗜酸性肝细胞增生灶。细胞及胞核增大,核仁明显增大增多,红染,染色质粗糙如凝块状,胞浆丰富红染。③透明细胞灶。细胞核被挤向一侧,核仁明显,胞浆透明呈空泡化。此外,尚可见到小胆管增生,构成腺瘤状或纤维囊腺瘤状。20 周后镜下可见分化程度中等的肝癌细胞组成的癌巢。数层癌细胞或排列成柱状,或围成大小不一的腺管。胞核较正常肝细胞大,核仁增大,染色质粗糙,分裂相多见;胞浆丰富,呈嗜碱性或嗜酸性。可见瘤巨细胞。癌巢常推挤或浸润周围组织。14 周时两组用药组与模型对照组比较,结构较清晰,增生灶明显较少,增生细胞异型性不明显,两中药组间的变化

基本相似。24 周时两用药组与模型组比较,形成的癌结节小而少,结节内细胞多数处于早期间变阶段,异型性较小,核分裂相少见。仅少数细胞恶性较高。瘤巨细胞更少见。两中药组光镜下形态变化基本一致。

2.3 肝组织的 AFP 免疫组化的变化 14 周模型对照组肝组织中 AFP 免疫组化染色呈显著阳性,尤见于嗜碱性增生灶,多呈胞浆弥漫性分布;24 周时其阳性灶增加更显著,见于癌细胞(呈强阳性)及变异的肝细胞。两用药组均较同期模型对照组显著降低;两用药组间无显著性差异,但 24 周时 Y 组较 F

组为低。见图 2。

2.4 肝组织 GGT 免疫组化的变化 14 周模型对照组动物肝组织 GGT 活性的均值为正常组的 75 倍,组织切片中 GGT 阳性灶大量出现,与 HE 染色所见的肝细胞增生灶一致。24 周时的 GGT 活性及组化阳性灶(直径、面积、体积,面积或体积密度)均较 14 周时显著增加。两用药组均较同期模型对照组显著降低或减少。两用药组 14 周时的检测结果基本相等,而 24 周时则以 Y 组的降低或减少更为显著。结果见表 2、3。

表 2 14 周及 24 周时各组大鼠肝组织中 GGT 阳性灶的变化($\bar{x}\pm s$)

组别	(n)	平均直径(mm)	平均面积(mm ² /个)	平均体积(mm ³ /个)	面积密度(mm ² /cm ²)	体积密度(mm ³ /cm ³)
模型对照组	14 周(11)	0.358±0.081	0.140±0.072	0.007±0.006	19.628±18.708	24.141±28.511
	24 周(11)	1.104±0.584	2.483±3.089	0.352±0.340	83.244±17.560	417.752±320.601
扶正化瘀组	14 周(11)	0.257±0.037**	0.069±0.021**	0.002±0.001*	3.475±1.878**	2.518±1.736*
	24 周(13)	0.369±0.109***	0.320±0.429*	0.014±0.008*	22.481±13.280***	61.485±100.095**
养阴柔肝组	14 周(11)	0.237±0.092**	0.061±0.034**	0.002±0.002*	3.617±2.907*	2.405±2.647*
	24 周(12)	0.287±0.050***	0.126±0.065*	0.011±0.011*	14.852±6.061***	22.197±16.252***

与同期模型组比较 *P<0.05 **P<0.01 ***P<0.001

表 3 各组大鼠肝组织、血清生化检测结果比较($\bar{x}\pm s$)

组别	(n)	肝 GGT(U/gP1)	肝 GST(U/gP1)	血清 ALP(U/L)
正常组	14 周(7)	2.382±1.982***	10.883±0.780*	229.740±69.473**
	24 周(7)	2.205±2.699***	10.057±1.474***	167.895±21.209***
模型对照组	14 周(11)	180.490±130.773	12.730±1.137	625.583±244.312
	24 周(11)	237.027±92.803	14.089±1.923	504.473±127.332
扶正化瘀组	14 周(11)	68.827±37.989*	11.458±1.144*	333.251±127.654**
	24 周(11)	105.559±15.440***	11.763±1.221**	351.864±79.322**
养阴柔肝组	14 周(11)	85.775±57.558*	11.758±0.786*	341.326±73.977**
	24 周(11)	69.189±16.188***##	11.325±1.524**	298.402±67.240***

与同期模型组比较 *P<0.05 **P<0.01 ***P<0.001

与同期扶正化瘀组比较 ##P<0.01

2.5 肝组织 GST 活性及血清 ALP 活性的变化 模型对照组 14 周时的肝组织 GST 活性及血清 ALP 活性均显著增高;24 周时的肝组织 GGT 活性较 14 周时有所增高,血清 ALP 活性与 14 周时相比无显著变化。两用

药组与同期模型对照组相比均显著下降;用药组之间除 24 周时 Y 组的血清 ALP 活性较 F 组为低(无显著性差异)外,余者均基本相近。结果见表 3。

2.6 细胞周期动力学变化 正常大鼠肝细

胞 DNA 含量直方图呈双峰型,峰高而窄,位于二倍体(2c)和四倍体(4c)位置,很少有五倍体(5c)及 5c 以上的细胞。14 周时的肝细胞增生结节,其细胞 DNA 直方图亦呈双峰,但第二峰(4c 位置)变得低而宽,且 5c 以上的细胞增多,出现 6c 或 8c 的小峰。24 周时的肝癌细胞 DNA 直方图变化更明显,呈多峰型,峰低而宽,5c 以上细胞明显较多。正常大鼠肝细胞 28.3%处于静止期(G_0)和 DNA 合成前期(G_1),71.45%为 G_2 和 M 期,处于 DNA 合成期(S)的细胞极少(0.25%),DEN

诱癌后,各时相细胞的组成发生变化,14 周出现的变异肝细胞,其 G_1 细胞增至 74.2%, G_2 +M 期细胞降至 19.6%,尤其引人注目的是 S 细胞百分比增高至 6.2%。24 周形成肝癌细胞后,S 细胞进一步增高至 10.3%。两用药组对动物诱癌后此种细胞周期的变化呈现一定的抑制作用,表现为 G_1 细胞、S 细胞比例升高幅度明显较小,甚至无明显升高, G_2 +M 细胞比例下降幅度小或无明显下降。结果见表 4。

表 4 各组大鼠诱癌过程中不同时相肝细胞比率的变化($\bar{x}\pm s$)

组别(n)	$G_0+G_1(\%)$	S(%)	$G_2+M(\%)$
正常组(3)	28.30±6.08**	0.25±0.07**	71.45±6.15**
模型对照组 14 周(5)	46.90±3.71	1.06±0.30	52.04±3.59
24 周(5)	67.18±14.31	4.70±2.90	28.14±15.69
扶正化瘀组 14 周(5)	32.44±6.98**	0.66±0.16*	66.90±7.18**
24 周(5)	38.04±8.87**	1.48±0.13*	61.48±10.74**
养阴柔肝组 14 周(5)	28.26±4.78**	0.80±0.54	70.94±4.78**
24 周(5)	37.06±10.86**	1.48±0.13*	61.48±10.74**

与同期模型组相比 * $P<0.05$ ** $P<0.01$

3 讨论

肝癌为肝硬化、尤其是肝炎后肝硬化的最常见并发症^[2],我们曾报道应用扶正化瘀方治疗肝炎后肝硬化具有良好的临床效果。此次以临床较常用的养阴柔肝方作为对照,试图通过动物实验观察扶正化瘀方对肝癌的预防作用。

DEN 对大鼠肝癌的诱发率高,是目前国内外常用的肝癌动物模型。模型的病理过程可分为非特异性变化期,增生性病变期与肝癌形成期三个阶段。增生性病变期(异型性增生)又称癌前期,其主要的病理学特点是多种异型性肝细胞增生灶(结节)的形成,这些增生灶(结节)与肝癌的发生密切相关。

模型动物 14 周时肝脏的 GGT 组化观察可见多量阳性病灶,AFP 免疫组化在变异肝细胞部分呈阳性反应,肝组织 GGT、GST

比活性与血清 ALP 活性异常增高。延至 24 周,模型对照组动物于 100%出现肝癌的同时,上述异常变化更为显著。表明这些实验指标量的动态变化,在一定程度上可以反映细胞的癌变情况,对判断药物抑制细胞癌变的作用也同样具有一定的实际意义。

与模型对照组相比,投于扶正化瘀方与养阴柔肝方的两组大鼠其癌前期(14 周)肝细胞增生灶明显减少,异型性不明显。GGT 组化阳性灶、AFP 免疫组化阳性区均明显降低或减少,肝组织 GGT、GST 比活性及血清 ALP 活性均显著降低,表明药物对 DEN 所致大鼠癌前期病变有明显的抑制作用。而且扶正化瘀方和养阴柔肝方的作用基本是平行的。

DEN 造模 24 周后,模型对照组动物 100%(14/14)发生肝癌,扶正化瘀方与养阴

柔肝方组分别为 92.9%(13/14)与 85.7%(12/14),病理形态与生化学观察,显示中药组癌变程度较模型组轻,表现为癌结节小而少,其中细胞多数处于早期间变阶段,AFP 阳性区及 GGT 阳性灶均较模型对照组降低或减少,肝组织 GGT、GST 与血清 ALP 活性降低,提示扶正化癥方和养阴柔肝方能延缓 DEN 诱发动物肝癌癌前期病变的发展与其对肝癌的形成也有一定的阻抑作用。从两用药组的肝癌发生率、肝组织 GGT 组化阳性灶、AFP 免疫组化阳性区、肝组织 GGT 及血清 ALP 活性的观测结果来看,以养阴柔肝方的作用为优。

细胞周期动力学的观察结果提示,扶正化癥方与养阴柔肝方延缓 DEN 诱发动物肝癌癌前期病变的发展与其对肝癌的形成的阻抑作用可能是通过抑制肝细胞 DNA 合成,

阻止肝细胞分裂及增殖而实现的。

本文观察结果值得提出的是,对于预防肝癌的形成养阴柔肝方比扶正化癥方可能更具实际意义,有进一步深入研究的价值。

参 考 文 献

- [1]刘平,刘成,胡义杨等. 肝脏病杂志 1994;2:75
- [2]王宝恩. 肝脏病学进展. 90. 上海:上海科学技术文献出版社,1991:293
- [3]胡文. 中华病理学杂志 1986;15:145
- [4]Scherer E, Hoffmann M, Emmeiot P, et al. J Nat Cancer Inst. 1972;49:93
- [5]张昭成,张月娥. 中华病理学杂志 1988;17:263
- [6]Adchi Y, Horii # R, Takahashi Y, et al. Clin Chim Acta. 1980;106:243
- [7]宋平根,李素文. 流式细胞术的原理和应用. 北京:北京师范大学出版社,1992:100