

蚤莲合剂对大鼠肝癌前病变的影响

龙爱华(扬州大学医学院 扬州 225001)

苏立稳(承德医学院 承德 067000) 聂 广(湖北中医学院 武昌 430061)

摘要 采用二乙基亚硝胺(diethylnitrosamine DEN)诱癌观察蚤莲合剂对大鼠肝癌前病变的影响,结果蚤莲合剂能明显保护大鼠肝脏功能,降低大鼠血清碱性磷酸酶(alkaline phosphatase AKP)和肝组织匀浆 γ -谷氨酰转肽酶(γ -glutamyltranspeptidase γ -GT)的水平,降低血清肿瘤坏死因子(tumor necrosisfactor- α TNF- α)的水平,使甲胎蛋白(alpha-fetoprotein AFP)免疫组化阳性细胞数各组间有明显差异。

关键词 蚤莲合剂 肝癌前病变

Influence of Zhaolian Mixture on Liver Precancerous Lesion Induced by Diethylnitrosamine in Rats

Long Aihua(Medical College, Yangzhou University, Yangzhou, 225001)

Shu Liwen(Medical College, Chende, 067000)

Nie Guang(Hubei Chinese Medical College, Wuchang, 430061)

Abstract: In order to investigate the effects of Zhaolian Mixture on anti-tumor-promotion, we studied its influence on liver precancerous lesion in rats induced by DEN. Results: (1) Liver function of rats was protected; (2) The levels of serum Alkaline phosphatase (AKP) and γ -glutamyltranspeptidase (γ -GT) were decreased in liver tissue; (3) The level of tumor necrosisfactor- α (TNF- α) in serum was also lowered; (4) There was significant difference in the number of positive cells between 4 groups with immunohistochemical method.

Key words: Zhaolian mixture, liver precancerous lesion

一般认为癌的发生可分为3个阶段,始发、促癌、演进,现已公认癌的始发是一个不可逆的突变过程,经历时间很短,通常由化学致癌物、电离辐射及致病毒引起。促癌是过度增生的始发细胞克隆连续增殖的过程,通常认为这一过程是可逆的,因此它是预防癌变的理想靶点。能促进增殖的因素如某些化合物及某些条件,如炎症、慢性感染等是促癌因子,因此具有抗炎、抗增殖作用的药物皆有抗促癌作用。为了研究某些清热解毒、活血化瘀中草药在抗促癌方面的作用,采用DEN诱癌,观察蚤莲合剂对大鼠肝癌前变的影响,结果如下。

1 材料与方

1.1 动物 wistar 雄性大鼠 100 只,体重

200~250g,由同济医科大学实验动物中心提供。

1.2 主要试剂 ①DEN,美国 Sigma 公司产品。TNF 试剂盒,购自中国军事医学科学院。②免疫组化用正常羊血清,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。③蚤莲合剂由白蚤休、半枝莲、虎杖、姜黄、黄芪、白术、茯苓、玫瑰花等组成,湖北中医学院制剂室制成糖浆,每 ml 含生药约 0.5g。临床上成人用量每次 10ml,每日 2 次,1 个疗程 3 个月,一般为 3 个疗程。

2 方法

2.1 造模方法 90 只大鼠用含 100ppm DEN 饮水诱癌, DEN 摄入量每日 5mg ~

6mg,连续16周,然后正常饮水至实验结束,其中造模组第6周起,每隔2周处死1~2只作模型病理学的动态观察。

2.2 分组 随机分成正常组10只,造模组30只,造模给药组分小、中、大剂量3组,每组各20只。正常组常规饲养,模型组2ml/100g·d灌胃自来水,小、中、大剂量组给药量分别是0.5、2、4ml/100g·d,每星期给药6d,药量约为成人等效剂量的5倍,20倍和40倍。

2.3 取材 实验至18周末,禁食24h,各组随机取大鼠8只,乙醚麻醉下颈动脉放血处死,留血,剖腹检查肝脏,并在肝中叶最大剖面处取肝组织。其余大鼠饲至24周末,观察大鼠肝癌的生成情况。

2.4 观察项目与方法

2.4.1 病理学观察 ①光镜观察 在肝中叶最大剖面处取约3~5mm厚肝组织2块,用10%中性福尔马林固定24h,低温下脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,切片(厚约4 μ m)HE染色,光镜下观察肝组织的病理变化。②电镜观察 大鼠处死后速取1mm³肝组织块每只4~5块,用戊二醛4℃固定,洗涤液充分洗涤后,1%锇酸后固定,树脂包埋,超薄切片,铅铀双重染色,透射电镜下进行细胞超微结构观察。

2.4.2 AFP免疫组化观察 PAP法染色(完成于上海中医药大学肝病中心),其中切片消化使用0.05%胰蛋白酶,32℃15min,0.6%过氧化氢-甲醇30min,一抗、二抗和PAP抗体的工作浓度均是1:200。光镜下观察各组切片肝细胞AFP免疫组化的情况,正常组织呈阴性反应,变异细胞、肝癌细胞呈阳性或强阳性反应。观察每cm²阳性细胞个数。

2.4.3 血清生化、免疫学指标、肝功能检测 取18周末大鼠血清作ALT、ALB、AKP及TNF检测(ELISA法)。

2.4.4 肝组织(γ -GT)、总蛋白(TP)检测 大鼠肝组织1g置200mM Tris-HCl缓冲液

中,低温下制成匀浆,700rpm 20min后取上清,用 γ -氨基酰对硝基苯胺法测定 γ -GT活性,并测总蛋白含量,然后将酶活性换算成比活性(U/g pr)。

2.4.5 统计方法 *t* 检验。

3 结果

3.1 病理学观察

3.1.1 肉眼观察 8周大鼠肝脏无明显异常,第10周可见肝脏轻度肿胀,切面见黄色坏死灶。12周后肝脏体积逐渐增大,表面粗糙,各叶表面均可见大小不等的灰白色结节。18周末灰白色结节进一步增多、增大,但尚未见明显的癌性结节。

3.1.2 光镜观察 诱癌4~6周后见肝细胞不同程度变性、坏死。汇管区细胞轻度增生。第12周起肝内出现各种异常肝细胞构成的增生灶,其中包括:(1)嗜酸性肝细胞灶:异常细胞比正常细胞显得略大而拥挤,使肝窦轻度不整,灶内肝细胞浆嗜酸性增强,核略增大。(2)嗜碱性肝细胞灶:灶内肝细胞浆呈嗜碱性,细胞常小于或近似正常细胞,偶而细胞也可较大,细胞核相对较大。(3)透明肝细胞灶:核、胞浆着色浅而透明,体积稍增大,此类灶性变较为少见。至16周末上述增生肝细胞继续增生增大,形成增生结节,结节略圆形,多高出肝脏表面,光镜下边界清楚,周围肝组织明显受压,结节内细胞可呈嗜碱性、嗜酸性或混合存在。部分结节中可出现高度嗜碱性的肝细胞区,此时增生细胞形态基本接近癌细胞,可以认为是癌前期病变。24周末镜下可见分化程度不等的肝癌细胞组成的巢,癌细胞排列成梁状、索状或形成透明肝细胞癌,可见癌性坏死,血管,淋巴管内癌性栓塞,并可见巨瘤细胞等。

3.1.3 电镜观察 18周末,模型大鼠有大量的肝细胞出现异型性增生。细胞核增大,外形不规则,核仁较显著,异染色质轻度增多,胞浆密度低,内质网扩张,线粒体肿胀,形态不规则,糖原堆积,常有丰富的高尔基复合

体。

3.2 18周末各组大鼠肝功能结果,见表1。

表1 18周末各组大鼠肝功能结果比较($\bar{x} \pm s$)

组别	ALT(M/L)	ALB(g/L)	AKP(U/L)
正常组	21.63±5.67	41.63±5.67	169.61±15.87
模型组	81.38±17.23 ^Δ	32.64±1.90 ^Δ	437.29±32.09 ^Δ
小剂量组	77.63±16.70 ^Δ	33.04±2.90 ^Δ	448.11±40.48 ^Δ
中剂量组	33.50±6.30***	40.18±2.22***	236.95±15.01***
大剂量组	31.25±5.99***	41.21±5.09***	243.30±30.66***

与正常组比较^Δ $P < 0.01$;与小剂量组比较* $P < 0.01$;与模型组比较** $P < 0.01$, $n=8$ (下同)

3.3 血清 TNF 和肝组织匀浆 γ -GT 水平比较

表2 18周末各组大鼠血清 TNF 和肝组织匀浆 γ -GT 水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	TNF(ng/ml)	γ -GT(U/gpr)
正常组	8	0.28±0.10	1.96±0.28
模型组	8	0.58±0.11 ^Δ	189.76±19.28 ^Δ
小剂量组	8	0.53±0.12 ^Δ	181.56±20.87 ^Δ
中剂量组	8	0.25±0.04***	64.61±12.21***
大剂量组	8	0.30±0.07***	59.56±6.39***

3.4 AFP 免疫组化结果 模型组切片中各种变异肝细胞 AFP 免疫组化染色部分呈阳性反应,多见于嗜碱性增生灶中的增生细胞,呈胞浆弥漫分布,蚤莲合剂中,大剂量组 AFP 阳性细胞数较模型组少。而小剂量组与模型组比较无明显差异。AFP 阳性细胞每片看 4 个视野,每视野按 0.19625cm² 计算,换算成个/cm² 计数。见表 3。

表3 各组大鼠 AFP 免疫组化结果($\bar{x} \pm s$)

组别	n	AFP 阳性细胞数(个/cm ²)
模型组	8	69.0±12.4
小剂量组	8	64.3±10.6
中剂量组	8	53.2±7.8**
大剂量组	8	52.7±8.1**

与小剂量组比较* $P < 0.05$,与模型组比较* $P < 0.05$

4 讨论

研究表明^[1]DEN 诱发的肝癌为肝细胞癌,诱癌率极高,只要达到一定的饲毒量和饲毒时间,其癌前病变在大鼠肝癌形成前也会稳定地出现。至 18 周末可出现高度嗜碱性的肝细胞区,此类结节样增生可视为癌前病变^[2],为研究蚤莲合剂对大鼠肝癌前病变的影响提供了可能。

中、大剂量组 TNF 水平接近正常,这可能与蚤莲合剂中蚤体、半枝莲等清热解毒,抑制了大鼠肝内慢性炎症有关,从长远角度看也就抑制了肝细胞的坏死、增生,这从某种程度上延缓甚至阻止了大鼠肝脏内的变异肝细胞增生灶和增生结节的产生,TNF 水平的变化也基本反映了蚤莲合剂这一方面的作用。

临床与实验研究中, γ -GT 和 AKP 两种酶活性的增高常作为肝细胞增殖及恶变的信号^[3]。本实验中,蚤莲合剂明显地降低了大鼠肝组织和血清中的 γ -GT 和 AKP 的活性,这一结果与养阴方治疗实验肝癌的结果基本一致^[4],基本可以认为蚤莲合剂可能抑制了异常变异细胞。癌细胞、部分正常细胞的过度合成作用,这对抑制肝癌前病变减少和延缓癌的产生起着一定的作用。

参考文献

- 1 张迎春,丁濂. 二乙基亚硝胺诱发的变异肝细胞组化表型的研究. 中华病理学杂志,1998,18(1):23
- 2 丁濂,邹道韞,陈晋彦,等. 二乙基亚硝胺诱发大鼠肝癌过程中病理形态和鸟氨酸氨基甲酰转移酶组织化学变化. 中华病理学杂志,1982,11(2):91
- 3 张友会. 现代肿瘤学. 北京:北京医科大学协和医科大学联合出版社,1993. 81
- 4 王晓素,刘成,刘平,等. 养阴方对实验性肝癌过程的影响. 中西医结合肝病杂志,1995,5(1):15