

珍珠梅提取物对 DEN 所致大鼠肝癌前病变抑制作用的研究

张学武, 张学斌²

(1 延边大学医学院生物化学与分子生物学教研室, 吉林 延吉 133000;

2 吉林大学中日联谊医院, 吉林 长春 130031)

摘要:目的: 研究珍珠梅提取物对二乙基亚硝胺(diethylnitrosamine, DEN)致大鼠肝脏癌前病变的抑制作用。方法: 给动物 ig 给药, 用 DEN 制备大鼠肝脏癌前病变模型; 用免疫组织化学 S-P 法检测大鼠肝脏谷胱甘肽 S-转移酶(GST-P)的表达水平, 用比色分析法检测血清、肝匀浆、线粒体 SOD、GSH-Px 的活性及 MDA 含量的变化。结果: 珍珠梅提取物能显著降低 DEN 致癌前病变大鼠肝脏 GST-P 的表达, 升高血清、肝匀浆、肝线粒体 SOD、GSH-Px 的活性, 降低 MDA 的含量。结论: 珍珠梅提取物对 DEN 致大鼠肝脏癌变有抑制作用。

关键词: 珍珠梅; 肝肿瘤/化学诱导; 二乙基亚硝胺/毒性

中图分类号: R285.5 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2004)04-0033-03

Inhibitory Effect of *Sorbaria Sorbifolia* Extract on DEN-induced Precancerous Hepatic in Rats

ZHANG Xue-wu, ZHANG Xue-bin²

(1 Department of Biochemistry & Molecular Biology, Yanbian University College of Medicine, Yanji 133000, China;

2 China-Japan Union Hospital, Jilin University, Changchun 130031, China)

Abstract: Objective: To investigate the inhibitory effect of *Sorbaria Sorbifolia* extract on diethylnitrosamine (DEN) induced precancerous hepatic in rats. Methods: *Sorbaria Sorbifolia* was administrated ig. to rats with DEN-induced precarcinogenesis. Then using the immunohistochemical S-P method, the p53 and bcl-2 proteins were detected. The activities of superoxide dismutase(SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px), and the concentrations of malondialdehyde (MDA) were investigated by colorimetric method. Results: *Sorbaria Sorbifolia* significantly decreased the expression of GST-P, and increased the SOD, GSH-Px and decreased MDA level in serum, liver cell homogenate and liver cell mitochondria. Conclusion: *Sorbaria Sorbifolia* extract has inhibitory effect on DEN-induced precancerous hepatic in rats.

Key words: *Sorbaria Sorbifolia*; liver neoplasm/chemically induced; diethylnitrosamine/toxicity

珍珠梅(*Sorbaria Sorbifolia*)属蔷薇科植物, 又称“山高梁”、“八木条”, 广泛分布于云南、贵州、四川、湖北、甘肃、宁夏及东北, 有活血化瘀, 消肿止痛, 治骨折及跌打损伤的作用。从中分离出胡萝卜苷、甲基黄酮类化合物、大黄素、原儿茶酸等化学成分^[1], 其乙酸乙酯提取物能使四氯化碳肝损伤大鼠血清丙氨酸转氨酶(ALT)活性降低、肝线粒体琥珀酸脱氢酶活性升高, 抑制肝匀浆脂质过氧化物的生成^[2,3], 对小鼠 S₁₈₀ 肉瘤生长有抑制作用^[4]。本实验研究珍珠梅乙酸乙酯提取物对 DEN 致癌前病变大鼠肝脏

GST-P 表达的影响, 以及 SOD、GSH-Px 活性及 MDA 含量的变化, 旨在阐明珍珠梅的抗肿瘤作用及可能机理。

1 材料与方 法

1.1 珍珠梅生物活性成分的制备 珍珠梅茎、叶、花, 采集于吉林省延吉市市郊, 经延边大学药学院刘永镇教授鉴定为正品。乙酸乙酯提取物: 乙酸乙酯分 3 次浸泡珍珠梅, 温度为 40℃, 每次 12h, 合并三次滤液, 用旋转蒸发器减压浓缩, 获珍珠梅乙酸乙酯提取物浸膏(1g 珍珠梅有效成分相当于 33.3g 生药)。

1.2 试剂 DEN、乙酰氨基芴(2-acetylaminofluorene, AAF)系 Sigma 公司产品; GST-P 及 S-P 试剂盒均为福建迈新生物技术开发公司产品; SOD、MDA、GSH-Px

收稿日期: 2003-08-21

基金项目: 吉林省延边朝鲜族科技发展计划项目(YBKJ027)

试剂盒为南京建成生物工程研究所产品;其他试剂均为国产分析纯。

1.3 动物 Wistar 雄性大鼠,体重为 180~200g,由延边大学医学院动物科提供。

1.4 造模、给药方法及检测指标 取 36 只 Wistar 雄性大鼠随机分为正常组、模型组、治疗组 3 个组。按改良的 Solt-Farber^[5] 氏方法制作大鼠肝脏癌前病变模型。正常组腹腔注射生理盐水,模型组和给药组腹腔注射 DEN,剂量为 200mg/kg,2w 后,模型组和给药组在饲料中添加 0.008% AAF,同时给药组按 6.6g/kg 剂量每天连续灌胃。注射 DEN 3w 后进行脏脏部分切除术。3 个组的大鼠共饲养 8w 后全部处死,采取血液并分离血清,进行生化指标的测定。立即称取 1.0g 新鲜肝组织放入置冰冷的匀浆介质(pH = 7.5, 0.25mol/L 蔗糖, 0.005mol/L Tris-HCl, 0.001mol/L EDTA)的玻璃匀浆器中,在冰浴中制成 100g/L 匀浆,在 2000r/min 离心 10min,取上清液,为肝匀浆,用低温超速离心机以 16000r/min 离心 20min,取其沉淀部分,即为线粒体。再加入匀浆介质(pH = 7.5, 0.25mol/L 蔗糖, 0.005mol/L Tris-HCl, 0.001mol/L EDTA) 2ml,用超声波打碎线粒体膜性结构,制成线粒体悬浮液,进行生化指标的测定。剩余肝脏标本用中性福尔马林固定,石蜡包埋,5 μ m 连续切片。用免疫组织化学染色方法,按 S-P 试剂盒说明书检测 GST-P 表达水平。

1.5 GST-P 免疫组织化学检测 按 S-P 法进行。GST-P 阳性灶的定量分析用 CAMIS 图像分析仪(日本产)测量直径在 0.1mm 以上的 GST-P 阳性灶数量(个/cm²)和面积(mm²/cm²)。

1.6 统计学处理 应用 SPSS-10.0 统计软件进行方差分析、卡方检验。

2 结果

2.1 珍珠梅对大鼠肝脏癌前病变 GST-P 表达水平的定量分析 与模型组比较,正常组、治疗组的 GST-P 阳性灶数量、面积显著低于模型组($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 珍珠梅对肝脏癌前病变大鼠 GST-P 表达的影响

分 组	n	GST-P 阳性 (%)	阳性灶数量 (个/cm ²)	阳性灶面积 (mm ² /cm ²)
正常组	21	阴性	0	0
模型组	15	13(86.7%)	18 \pm 4.3	2.61 \pm 1.60
治疗组	21	6(28.6%)*	4 \pm 2.7*	0.87 \pm 0.42*

注:与模型组比较,* $P < 0.05$

2.2 珍珠梅对大鼠肝癌前病变血清、肝匀浆、肝线粒体 SOD、MDA、GSH-Px 的影响 珍珠梅提取物能显著升高 DEN 所致肝脏癌前病变大鼠血清、肝匀浆、肝线粒体 SOD、GSH-Px 的活性,降低 MDA 的含量($P < 0.05$)。见表 2 3 4。

表 2 珍珠梅对肝脏癌前病变大鼠 SOD 的影响($\bar{x} \pm s$)

分 组	n	血清 (NU/ml)	肝匀浆 (NU/mgpro/ml)	肝线粒体 (NU/mgpro/ml)
正常组	21	131.4 \pm 38.9*	72.9 \pm 39.8*	153.4 \pm 56.1*
模型组	15	92.6 \pm 42.7	49.8 \pm 14.0	115.3 \pm 31.9
治疗组	21	126.7 \pm 27.3*	61.3 \pm 6.7*	144.1 \pm 45.4*

表 3 珍珠梅对肝脏癌前病变大鼠 MDA 的影响($\bar{x} \pm s$)

分 组	n	血清 (nmol/L)	肝匀浆 (nmol/mgpro)	肝线粒体 (nmol/mgpro)
正常组	21	0.8 \pm 0.1*	1.0 \pm 0.2*	1.2 \pm 0.3*
模型组	15	1.1 \pm 0.1	1.5 \pm 0.1	1.6 \pm 0.2
治疗组	21	0.8 \pm 0.1*	0.7 \pm 0.3*	0.9 \pm 0.4*

表 4 珍珠梅对肝脏癌前病变大鼠 GSH-Px 的影响($\bar{x} \pm s$)

分 组	n	血清 (mg/L)	肝匀浆 (U/mg)	肝线粒体 (U/mg)
正常组	21	28.6 \pm 5.69*	35.7 \pm 9.15*	35.1 \pm 10.7*
模型组	15	16.2 \pm 3.69	16.2 \pm 5.69	15.4 \pm 1.9
治疗组	21	26.8 \pm 6.17*	31.4 \pm 6.55*	36.2 \pm 16.4*

3 讨论

大鼠胎盘型谷胱甘肽 S-转移酶(GST-P)可以作为大鼠肝脏癌前病变和肝癌的极为敏感的标志^[6],GST-P 阳性灶的检测,目前已经成为检测环境致癌物的敏感的体内实验法。本实验结果表明,大鼠给予致癌剂 DEN 和 AAF,并进行部分肝脏切除术,形成再生肝,以促进致癌过程的模型组中 15 例中的 13 例大鼠肝脏呈 GST-P 阳性。然而,在同时给予珍珠梅提取物的治疗组 21 例中仅有 6 例 GST-P 呈阳性,且阳性灶的平均数量和面积均显著小于模型组。

现已证明,在癌变的诱发和促发阶段均有自由基参与。各种诱癌因素和促癌因素通过各自的转化途径,终使自由基水平增加,从而参与癌变过程。SOD、GSH-Px 是属于体内消除自由基和脂质过氧化物的酶类,与体内其他酶类及抗氧化剂组成一个自由基的防御系统,以清除过多的自由基,MDA 是自由基代谢的产物。本实验中对照组 SOD、GSH-Px 活性均显著低于实验组,而 MDA 含量显著高于实验组。说明珍珠梅可以通过清除自由基抑制肿瘤的生长,这可能是珍珠梅抑制肿瘤生长的一个重要机制。

参考文献:

- [1] 李孝栋, 吴立军, 臧晓燕, 等. 东北珍珠梅化学成分的研究[J]. 中国中药杂志, 2002, 27(11): 841.
- [2] 金海玲, 张学武, 赵红, 等. 珍珠梅对四氯化碳所致急性肝损伤的保护作用[J]. 世界华人消化杂志, 2001, 10(3): 783.
- [3] 张学武, 金海玲, 赵红, 等. 珍珠梅对四氯化碳致肝损伤大鼠自由基的影响[J]. 中国中医药科技, 2001, (6): 373.
- [4] 金海玲, 张学武, 朴春梅, 等. 珍珠梅提取物对小鼠 S180 肉瘤的抑制作用[J]. 延边大学学报, 2002, 11(1): 14.
- [5] Yin Z, Sato K, Tsuda H, et al. Change in activities of uridine diphosphate-glucuronyl transferases during chemical hepatocarcinogenesis[J]. Gann (Jpn J Cancer Res), 1982, 73: 239.
- [6] Sato K. Glutathione transferases as markers of preneoplasia and neoplasia[J]. Advances in Cancer Res, 1989, 52: 205.
- [7] 沈明花, 尹宗柱. 草苈蓉提取物对二乙基亚硝胺诱发的肝癌前病变大鼠抗氧化活力的影响[J]. 中国中药杂志, 1999, 24(12): 746.