

复方当归柴胡提取液对二乙基亚硝胺 诱发大鼠肝癌前病变的抑制作用^①

严瑞琪^② 周昕熙 李俊丽 冯启胜

(中山医科大学肿瘤研究所; 广州, 510060)

摘要 为探索肝癌的化学预防,应用抑制二乙基亚硝胺(DEN)致大鼠肝癌前病变肝细胞增生酶异常灶(GGT灶)发生的短期实验模型,研究对肝炎有一定疗效的逍遥散加减为基础组成的复方当归、柴胡提取液(954合剂)对DEN致肝癌作用的影响,并与已知抑制物甘草甜素(GL)相比较。结果显示954合剂和GL对DEN诱发肝癌前病变GGT灶的数量及大小均有明显抑制作用,与单给DEN的对照组相比,差异非常显著($P < 0.05$ ~ $P < 0.005$),提示对启动和促进阶段均有抑制效果。对肝癌预防,尤其对暴露于肝炎病毒和化学致癌物的高危人群,有应用价值。

关键词 癌,肝细胞 预防和控制;二乙基亚硝胺;当归 治疗应用;柴胡 治疗应用

中图分类号 R 735.7; R 730.1

肝癌高发与乙型肝炎病毒和化学致癌物多因素协同作用有关^[1,2]。针对乙肝病毒感染,虽开展了新生儿免疫预防,但其降低肝癌发病率的效果须经数十年随访,且为数众多的已感染的带病毒者和慢性肝患者对致癌物较敏感,而环境致癌物难以完全清除。因此研究筛选出对多种因素有拮抗作用的化学预防剂十分重要。我们过去研究发现甘草及其主要成份甘草甜素以及当归、丹参、柴胡等对黄曲霉毒素 β_1 (AFB₁)和(或)二乙基亚硝胺(DEN)致肝癌作用有显著抑制效果^[3-5]。鉴于中药方剂逍遥散治疗肝炎有效,丹参有防治肝纤维化的作用并验证了其AFB₁致肝癌前病变的阻断^[6],本实验进一步研究了以逍遥散加减为基础组成的复方当归、柴胡提取液(下称954合剂)对DEN致大鼠肝癌前病变发生的影响,并与甘草甜素(GL)的抑制作用^[4,5,7]相比,发现954合剂也有显著的抑制效果。

1 材料与方法

1.1 试剂

二乙基亚硝胺(DEN),二乙酰氨基芴(2-AAF),美国Sigma公司产品。DEN加蒸馏水配成40 mg/mL避光保存备用。二甲基亚砷(DMSO)为广州化学试剂厂产品,批号890701-37。

1.2 被试物

954合剂由中山医科大学肿瘤医院中药房提供中药饮片,按合剂配方混合后,用单蒸水煮沸抽提3次,水浴浓缩(终浓度含生药2.143 g/mL),高压消毒,冰箱保存备用。甘草甜素(GL)由长沙九芝堂药业集团公司提供纯结晶,纯度92%,批号930314。被试物分别按表1含量充分混匀于基础饲料中,制成实验饲料。全部过程无菌操作。

表1 被试物在饲料中的含量及注毒总量

组别	动物数(只)		被试物在饲料中的含量(g/kg)	注入DEN量(mg/只) ¹⁾
	实验开始	实验结束		
对照组	13	12		26.5 ± 2.0
954合剂组	14	14	150 ²⁾	26.7 ± 2.9
GL组	13	13	3.2	26.2 ± 2.9

1)各实验组DEN注射总量与对照组比较, $P > 0.05$; 2)指生药含量

① 卫生部科研基金资助课题; ② 第一作者, 1932年出生,男,教授

1.3 基础饲料

由中山医科大学实验动物中心提供的粉状饲料,蛋白质含量为 24 g/100 g,高压消毒。

1.4 动物

雄性 SD大鼠,6周龄,40只,体重(140.0±17.4)g,二级动物,由中山医科大学实验动物中心提供,每鼠1笼,在清洁级动物实验室进行实验。

1.5 实验基本程序

大鼠随机分成3组:对照组13只,954合剂组14只,GL组13只。各鼠于8周龄时腹腔注射DEN1次,剂量112 mg/kg于注射前10d至注射后7d共18d,实验组给以含被试物的实验饲料,对照组饲以基础饲料。注DEN2周后,进入选择性促进程序,即:各鼠均饲以含0.015% 2-AAF饲料,于第7天作肝大部份(2/3)切除手术(pH),继续饲以2-AAF饲料7d后,换喂基础饲料2d,禁食24h后断颈椎处死。在每鼠肝右前叶、右后叶和尾叶规定部位取2 mm厚的肝组织各1块,在4℃的酒精:丙酮(1:1, V/V)中固定过夜,低温石蜡包埋切片,用Rutenberg法进行γ-谷氨酰转肽酶(GGT)染色,显示GGT阳性灶。用电脑化图形扫描分析系统算出每平方厘米肝切面GGT灶的数量(个/cm²)和面积(mm²/cm²)以及每个灶的平均面积(mm²/个)。实验结果用Student t检验进行统计学分析。抑制率按如下公式计算:

$$\text{抑制率}(\%) = (1 - \frac{\text{实验组}}{\text{对照组}}) \times 100\%$$

2 结果

2.1 一般情况

整个实验过程中,各组动物体重变化倾向一致。处死时体重差异无显著意义($P > 0.05$),肝重体重比(g/100 g),各实验组均大于对照组,差异显著($P < 0.005$),见表2。

2.2 GGT灶发生情况

各实验组GGT灶的数量及面积指标,包括个/cm²、mm²/cm²和mm²/个,均明显低于对照组,差别非常显著($P < 0.05 \sim P < 0.005$),而在实验组之间则无明显差别($P > 0.05$),见表3,表明954合剂和GL对DEN致肝癌前病变的发生均有明显抑制作用。当对GGT灶以不同大小为截断值,分别统计面积大于0.01 mm²、0.05 mm²、0.1 mm²和0.5 mm²的结果时发现,对GGT灶数(个/cm²)的抑制率逐渐增加:954合剂依次为35.43%、46.76%、56.60%和80.52%,GL依次为33.67%、48.66%、64.51%和91.67%;对灶面积(mm²/cm²)的抑制率也逐渐增加:954合剂依次为63.28%、64.90%、68.17%和88.80%,GL依次为68.32%、70.74%、75.33%和94.19%。大于0.5 mm²的GGT灶占全部灶数的百分比,954合剂(1.56%)和GL(0.65%)非常显著地低于对照组(7.8%)。这些结果表明,954合剂和GL不但能阻断GGT灶的发生,而且能抑制它增大。

表2 各组动物体重变化及肝重体重比 (g)

组别	开始时体重	各阶段增重情况			处死时体重	处死时肝重/体重(g/100g)
		开始时至注DEN当日	注DEN时至给AAF时	开始至结束		
对照组	156.9±19.5	79.8±16.0	70.7±19.8	96.9±37.3	255.4±33.5	2.16±0.34
954合剂组	159.6±18.6	77.2±13.0	66.0±14.2	104.8±20.8	269.4±36.0	2.56±0.29 ¹⁾
GL组	158.0±19.0	76.2±9.8	58.4±20.9	110.1±28.4	263.0±24.0	2.57±0.32 ¹⁾

1)与对照组比较 $P < 0.005$

表3 GGT灶的发生情况

组别	动物(只)	个/cm ²		mm ² /cm ²		mm ² /个
		$\bar{x} \pm s$	抑制率(%)	$\bar{x} \pm s$	抑制率(%)	$\bar{x} \pm s$
对照组	12	45.17±20.53	-	11.11±5.51	-	0.25±0.10
954合剂组	14	24.05±12.48 ^{1),3)}	46.76	3.90±2.61 ^{2),3)}	64.90	0.15±0.05 ^{1),3)}
GL组	13	23.19±12.05 ^{1),3)}	48.66	3.25±2.15 ^{2),3)}	70.74	0.14±0.05 ^{1),3)}

与对照组比较 1) $P < 0.005$ 2) $P < 0.05$; 954合剂与GL比较 3) $P > 0.05$

3 讨论

本研究用被公认的 GGT 灶为观察终点的 DEN 致大鼠肝癌前病变短期实验模型,对 GL 进行了重复实验。过去和本次实验结果表明, GL 抑制 DEN 致肝癌作用显著,重复性好。在剂量相当条件下,对 GGT 灶发生数的抑制率在 48%~59% 之间^[4,7],证明了本实验方法的可靠性。在同一实验条件下,与 GL 相比,954 合剂也有显著抑制 DEN 的致肝癌作用,二者效果无明显差别。

作者过去从 30 多种天然物包括食用和药用植物筛选出的抑制物中,当归、丹参、柴胡、甘草和 GL 对 AFB₁ 致肝癌作用有明显抑制效果,它们对 GGT 灶数的抑制率依次为 93.65%、84.21%、52.86%、55.36% 和 46.74%^[3-5,7]。本次实验又发现以当归、柴胡等主药提制的复方 954 合剂和 GL 可显著抑制 DEN 的致肝癌作用。本实验模型以 DEN 为启动剂,再经选择性促进程序(2-AAF 加 2/3 肝切除术),使被启动的肝细胞迅速增生形成癌前病变 GGT 灶。954 合剂和 GL 不但能阻断致癌物诱发的 GGT 灶数,而且能抑制灶的增长,提示对启动和促进均有阻断或抑制效果。

我国肝癌 80% 以上有慢性肝病背景,90% 以上检出 HBV DNA^[8]。肝炎病毒感染与化学致癌物在肝癌发生中有协同作用。世界卫生组织已确定 AFB₁ 对人有致癌性, DEN 对人有高度可能的致癌作用^[9]。本实验以治疗慢肝有效的逍遥散加减为基础组成的 954 合剂和 GL 比较,二药既可抑制两种主要的致肝癌物 AFB₁ 和 DEN 的致肝癌作用,又有治疗慢肝之效,可成为具有针对多种肝癌危险因素的多效性天然物化学预防剂,对预防肝癌,尤其对暴露于肝炎病毒和致癌物的肝癌高发区高危人群,将有重要应用价值,为临床和肝癌高发现场的肝癌化学

预防提供了实验依据。

(本研究的中药方剂组成曾获中山医科大学中医学教研室杨守玉教授指导帮助,谨此致谢)

参 考 文 献

- 1 Harris CC, Sun JT. Interactive effects of chemical carcinogens and hepatitis B virus in the pathogenesis of hepatocellular carcinoma. *Cancer Surv*, 1986, 5: 765
- 2 Yan RQ, Su JJ, Huang DR, *et al*. Human hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma II. Experimental induction of hepatocellular carcinoma in tree shrews exposed to hepatitis B virus and aflatoxin B₁. *J Cancer Res Clin Oncol*, 1996, 122(5): 289
- 3 Yan RQ, Chen ZY, Qin GZ, *et al*. Inhibitory effects of Chinese traditional herbs on aflatoxin B₁-induced hepatocarcinogenesis in rats. *Hepatology Rap Lit Rev*, 1987, 18(5): 9
- 4 李俊丽,严瑞琪,王辉云,等.甘草甜素对黄曲霉毒素 B₁ 致大鼠肝癌作用的影响. *癌症*, 1993, 12(2): 104
- 5 李俊丽,严瑞琪,王辉云,等.甘草甜素预防二乙基亚硝胺致大鼠肝癌作用的剂量-效应关系. *中山医科大学学报*, 1994, 15(2): 108
- 6 于洁,王宝恩,丁濂,等.复方丹参提取液对实验性大鼠肝癌前病变的阻断作用. *中华肝脏病杂志*, 1995, 3(4): 199
- 7 王辉云,严瑞琪,李俊丽,等.甘草甜素抑制肝癌前病变的时间-效应关系的研究. *中华肝脏病杂志*, 1994, 2(4): 231
- 8 周元平,彭文伟,姚集鲁.肝癌组织中丙型和乙型肝炎病毒基因状况研究. *中华肝脏病杂志*, 1995, 3(4): 202
- 9 IARC/WHO. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to man. Lyon: WHO IARC, 1993. 56

(1996-03-28收稿 1996-08-31修回)

INHIBITORY EFFECT OF COMPOSITE AQUOUS EXTRACT OF RADIX ANGELICAE SINENSIS AND RADIX BUPLEURUM ON DIETHYLNITROSAMINE-INDUCED HEPATOCARCINOGENESIS IN RATS

Yan Ruiqi Zhou Xinxi Li Junli Feng Qisheng

(Cancer Institute, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510060)

For investigating the chemoprophylaxis of liver cancer, the liquid extract composed mainly of Radix angelicae sinensis and Radix bupleurum (Complex 954) was tested. The animal model of diethylnitrosamine (DEN)-induced precancerous lesion of liver with hyperplastic hepatocyte foci positive for gamma-glutamyl-transpeptidase (GGT) in male Sprague Dawley rats was used. Its effect was compared with that of Glycyrrhizin which had been confirmed as an inhibitor against the occurrence of GGT foci induced by aflatoxin B (AFB₁) and DEN in rats. The results revealed that this extract exerts remarkable inhibition on the number and size of DEN-induced GGT foci as compared with controls ($P < 0.05 \sim P < 0.005$) and the effect is nearly the same as that of Glycyrrhizin, suggesting that this extract possesses the inhibitory effect both on the initiation and promotion stages during hepatocarcinogenesis. This inhibitor may be useful for the chemoprophylaxis of liver cancer, especially for the high risk population exposed to the hepatitis virus and chemical carcinogens.

Subject headings hepatoma, hepatocellular/prevention & control; diethylnitrosamine chemoprophylaxis; angelicae sinensis/therapeutic use; bupleurum/therapeutic use

· 简 讯 ·

中山医科大学肾脏病临床研究所 移植免疫耐受研究获新进展

器官移植必须预防免疫排斥反应的发生,目前在器官移植中采取的对策是终生使用免疫抑制剂,但该方案存在着严重的问题,如:感染、继发性肿瘤、药物毒副作用、经费昂贵,几年以后会产生慢性排斥反应等。因而,诱导机体对供体器官产生特异性免疫耐受成为国内外移植学界长期追求的目标。

中山医科大学肾脏病临床研究所博士研究生史伟等在导师张仕光教授的指导下,根据自身免疫耐受的形成机制,采用逆转录病毒载体介导的基因转移技术,将供鼠主要组织相容性抗原复合类抗原基因,在体外转移到不同品系的受体鼠 T 淋巴细胞内表达,然后将此基因修饰的受体 T 淋巴细胞回输受体鼠胸腺内,以皮肤移植作为器官移植的观察模型,成功地诱导了受体对供体移植物的特异性免疫耐受,对防止移植物发生免疫排斥反应具有重要意义。此研究为今后的器官移植研究建立了一种符合生理状态的诱导免疫耐受的观察模型。这对于诱导同种异体器官移植免疫耐受的实验研究具有实际意义。

(冯世容)