

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^①

李俊丽^② 严瑞琪 王辉云 黄小延 黄玫玲 冯启胜

(中山医科大学附属肿瘤中心肝癌研究室, 广州, 510060)

提 要 应用二乙基亚硝胺(DEN)致大鼠肝癌作用短期体内实验模型,对甘草甜素的抑癌作用进行了量效关系研究。结果发现最低有效剂量为216.2mg/kg,最佳效应剂量为432.4mg/kg,而剂量为864.8mg/kg时,虽有预防作用,效果较432.4mg/kg弱($P < 0.1$);108.1mg/kg,216.2mg/kg和432.4mg/kg显示了量效关系。

关键词 甘草甜素;致癌物;二乙基亚硝胺;实验性肝细胞癌;癌前状态;化学预防

中图分类号 R285.5; R735.7

甘草甜素是传统中药甘草的主要成分之一,具有众多的生物活性如抗溃疡、抗炎症、抗变态反应、抗病毒、诱导干扰素产生、调节免疫功能^[1,2]、抗氧化抗自由基产生、抗细胞毒和保护肝细胞^[3]等作用。近来,由临床应用甘草甜素治疗病毒性肝炎,特别是慢性活动性肝炎取得了显著的效果,甘草甜素对肝脏的作用在临床和实验研究上均受到了广泛的重视。

我们先前的研究发现,甘草甜素有预防黄曲霉毒素B₁和二乙基亚硝胺(DEN)致大鼠肝癌作用^[4]。本实验就甘草甜素抑制DEN诱发大鼠肝癌前病变,进一步作了量效关系的研究。

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;甘草甜素:片剂,为甘草提取物甘草酸经半合成所得甘草酸单钾盐,75mg/片。长沙市中药一厂生产批号:920507。

1.2 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%。高压消毒。

1.3 实验饲料

将甘草甜素称量、研磨成粉后,分别与基础饲料混匀即成。甘草甜素用量见表1

表1 各组用药量注毒量及肝重/体重比情况

组 别	动物数	甘草甜素用量 ¹⁾	DEN量(mg/鼠) ²⁾	肝重/体重(g/100g)
对照组	11	0	21.20±1.26	2.5±0.4
20mg组	12	108.1mg/kg(20mg/鼠)	21.05±1.92	2.4±0.4
40mg组	12	216.2mg/kg(40mg/鼠)	20.58±1.36	2.2±0.4
80mg组	11	432.4mg/kg(80mg/鼠)	21.28±1.40	2.1±0.3 ³⁾
160mg/组	12	864.8mg/kg(160mg/鼠)	21.52±1.53	2.3±0.3

1)每日剂量,连用14d; 2) $\bar{x} \pm s$; 3)与对照组比较, $P < 0.05$

① 本课题由广东省卫生厅科研基金资助;

② 第一作者 27岁,女,实习研究员

1.4 动物

6周龄雄性SD大鼠,体重 139 ± 12 g,二级动物,动物合格证号:粤卫动字9001号,由中山医科大学实验动物中心提供。每鼠1笼,室温控制在 $20 \sim 25^\circ\text{C}$,饲料任食,自来水经净化过滤器后由动物任饮。

1.5 实验基本程序

6周龄大鼠60只随机分成5组,每组12只,饲以实验饲料共2周,在给实验饲料的第11天腹腔注射DEN,100mg/kg体重。于停用实验饲料2周后,进入选择性促癌程序:饲以含0.015%的2-AAF饲料共2周,在第7天作肝中叶及左外侧叶切除手术。换喂基础饲料2d后,禁食24h,断颈椎处死动物。在每鼠肝右前叶规定部位取2块组织,在右后叶、尾叶及乳头状叶规定部位各取一块组织,于 4°C 丙酮:酒精(1:1,V/V)固定,低温石蜡包埋切片,参考改良Rutenberg法进行 γ -谷氨酰转肽酶(GGT)染色,用网形目镜测微尺在显微镜下测量面积大于 0.034mm^2 的GGT阳性灶面积,然后算出每平方厘米肝切面上GGT阳性灶数(个/ cm^2)、面积(mm^2/cm^2)及灶的平均面积($\text{m}^2/\text{个}$)。结果用 t 检验法进行统计

学处理,抑制率用下面公式计算:

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

2 结果

2.1 一般情况

整个实验期间,各组动物体重变化倾向基本一致。处死时,动物肝重、体重差异无显著意义($P > 0.05$),肝重/体重(g/1000g)各实验组均小于对照组,其中80mg组最小,差异有显著意义($P < 0.05$)(表1)。

2.2 GGT阳性灶发生情况

各组动物肝脏GGT阳性灶发生情况见表2。反映灶数量的指标个/ cm^2 ,各实验组均较对照组小,其中40mg组和80mg组差异有显著意义($P < 0.05$)和极显著意义($P < 0.01$),160mg组因标准差较大,差异无统计学意义($P < 0.1$),20mg组差异无显著意义($P > 0.1$)。与80mg组比较,20mg组灶数较多,差异有极显著意义($P < 0.01$),40mg组和160mg组亦稍多,但差异无显著统计学意义($P < 0.1$)。

表2 各组动物GGT阳性灶发生情况($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	个/ cm^2	mm^2/cm^2	$\text{mm}^2/\text{个}$
对照组	11	19.53 ± 12.54	3.12 ± 2.66	0.165 ± 0.142
20mg组	12	$15.81 \pm 7.20^{1)}$	$2.19 \pm 0.87^{1)}$	$0.137 \pm 0.104^{5)}$
40mg组	12	$11.07 \pm 8.74^{2),4)}$	$1.85 \pm 1.55^{2),3)}$	$0.165 \pm 0.145^{1)}$
80mg组	11	$7.89 \pm 4.44^{3)}$	$1.04 \pm 0.80^{4)}$	$0.131 \pm 0.087^{3)}$
160mg组	12	$12.69 \pm 9.42^{2),3)}$	$1.90 \pm 1.61^{2),3)}$	$0.129 \pm 0.116^{5)}$

1)与80mg组比较, $P < 0.001$; 2)与80mg组比较, $P < 0.1$; 3)与对照组比较, $P < 0.1$;

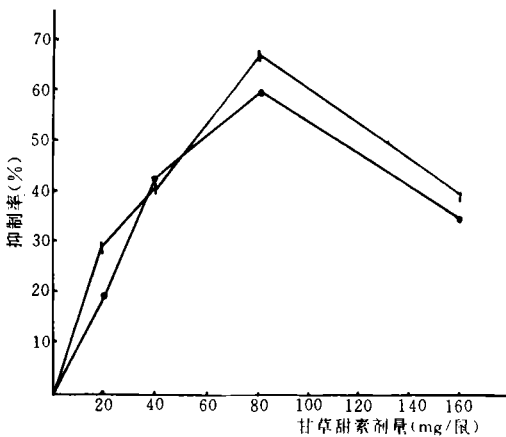
4)与对照组比较, $P < 0.05$; 5)与对照比较, $P < 0.01$

反映灶总面积的指标 mm^2/cm^2 ,与对照组比较,各实验组均较小,唯80mg组差异有显著意义($P < 0.05$),20mg组($P > 0.1$),40mg组($P < 0.1$),160mg组($P < 0.1$),差

异均无显著统计学意义。与80mg组相比,20mg组明显较大,差异有极显著意义($P < 0.01$),40mg组和160mg组亦稍大,差异无显著统计学意义($P < 0.1$)。

反映灶大小的指标 $\text{mm}^2/\text{个}$,除40mg 组未显示差别外,其余各实验组均较对照组小,差异有极显著意义($P < 0.01$)。与80mg 组相比,40 mg 组灶较大,差异有极显著意义($P < 0.01$)。与80mg 组相比,40mg 组灶较大,差异有极显著意义($P < 0.01$),20mg 组灶稍大,160mg 组灶稍小,差异均无显著意义($P > 0.1$)。

以上结果表明,甘草甜素预防 DEN (100mg/kg, ip) 诱发大鼠肝癌前病变,以80mg 组 (432.4mg/kg) 效果最好,40mg 组 (216.2mg/kg) 为最低有效剂量组,而高剂量的160mg 组 (864.8mg/kg) 虽有抑制作用,效果却弱于80mg 组,较低剂量的20mg 组 (108.1mg/kg) 抑制作用很弱,效果显著差于80mg 组。在抑制肝癌前病变 GGT 阳性灶的个数 (个/ cm^2) 和面积 (mm^2/cm^2) 上,20mg 组、40mg 组和80mg 组均显示了量效关系 (附图)。



附图 甘草甜素抑制 GGT 阳性灶剂量效应曲线

- 抑制 GGT 阳性灶的个/ cm^2 曲线
- 抑制 GGT 阳性灶的 mm^2/cm^2 曲线

3 讨论

本实验进一步证实了甘草甜素有预防 DEN 诱致肝癌前病变的作用,在一定剂量范围内,其预防作用有明显的剂量效应关系。作

者以前的研究还发现甘草甜素可预防黄曲霉素 B_1 致大鼠肝癌作用^[4],其它研究也发现甘草甜素不但有预防多氧化联苯和3'-甲基-4-二甲基-氨基偶氮苯致小鼠的肝损害和肝癌作用^[2],尚可抑制 N-乙基-N'-硝基-N-亚硝基胍致小鼠十二指肠腺癌作用^[5]。这说明甘草甜素可抑制多种化学物质的致癌作用。另外,实验表明甘草甜素可抑制小鼠吉田肉瘤及艾氏腹水癌的生长^[2]、促进肿瘤细胞分化成熟^[6]、抑制肝癌细胞生长和 DNA 合成^[7]。加之临床上甘草甜素有保护肝细胞、退黄降转氨酶、促进 HBeAg 转阴和 HBeAb 产生、提高人体免疫功能、恢复肝功能^[8]等作用。因而我们认为,作为一种价格低廉、毒副作用小,集治疗与预防于一体的药物,甘草甜素在希望在肝癌高发区高危人群中作化学预防肝癌之用。

本实验甘草甜素对 DEN 致大鼠肝癌作用的预防作用符合免疫调节剂的作用特点——仅在一定范围有剂量效应关系。有趣的是,本实验的最低有效剂量 (216.2mg/kg),恰好与森泽成司所报告的甘草甜素令小鼠抗体显著增强的剂量30mg/kg (相当于大鼠等效剂量210mg/kg) 相吻合。Tanaka^[5]亦证明在化学致癌过程中,甘草甜素可诱导干扰素产生,激活肿瘤动物免疫功能,显著提高 NK 细胞活性和巨噬细胞吞噬率。结合临床和实验所报道的甘草甜素诸如增加小鼠脾脏重量、增加外周血白细胞数目^[9],稳定细胞膜和核糖体膜结构^[4]、显著提高人体巨噬细胞吞噬指数,增加 NK 细胞活性和诱导干扰素产生^[8]等免疫调节作用与本实验结果分析,甘草甜素的免疫调节作用在其预防化学致癌过程中可能起重要作用。但尚需实验进一步证实。

目前,临床治疗肝炎的甘草甜素的口服剂量为300mg/d (180mg/ m^2),相当于本实验大鼠口服最低有效剂量40mg/d (2.250mg/ m^2) 的2/25,最佳效应剂量80mg/d 的1/25 即为 4.500mg/ m^2 。然而,由实验剂量推至人

类用量时,不但应认识到药物的体内代谢作用随种属和个体的不同而有差异,而且还应考虑到本实验所用致癌物 DEN 的量100mg/kg,远远大于人类暴露于 DEN 及其他致癌物的量。因而在用甘草甜素对肝癌高危人群的化学预防时,应慎重相应减少用量。同时,本实验甘草甜素抑制 DEN 致肝癌作用所表现的在一定范围有效的特点,提示临床治疗肝炎、预防肝癌选择适当剂量是非常重要的。

参 考 文 献

- 1 Shinada M, Azuma M, Kawai H, et al. Enhancement of interferon- γ production in glycyrrhizin-treated human peripheral lymphocytes in response to concanavalin A and to surface antigen of hepatitis B virus (42241). *Proc Soc Exp Biol Med*, 1986, 181:205
- 2 张罗修,庄庆琪,李晓玉,等.免疫药理学.上海:上海医科大学出版社,1990. 205
- 3 Shibayama Y. Prevention of hepatotoxic responses to chemicals by glycyrrhizin in rats. *Exp Mol Path*, 1989, 51:48
- 4 李俊丽,严瑞琪,王辉云,等.甘草甜素对黄曲霉素 B₁致大鼠肝癌作用的影响. *癌症*, 1993, 12(2):104
- 5 Tanaka M. The effect on glycyrrhizin on carcinogenesis in the duodenum of mice N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *Kyoto-furitsu Ika Daigaku Zasshi*, 1991, 100(2):1139
- 6 Abe H, Ohya N, Yamamoto KF, et al. Effects of glycyrrhizin and glycyrrhetic acid on growth and melanogenesis in cultured B₁₆ melanoma cells. *Eur J Cancer Clin Oncol*, 1987, 23(10):1549
- 7 邓 纯,彭兰莎,苏先狮.甘草甜素的实验研究. *中西医结合肝病杂志*, 1992, 2(2):25
- 8 赫晓彦,杨永彰,刘厚玉,等.甘草甜素对慢性活动性肝炎患者的巨噬细胞吞噬功能的研究. *中华消化杂志*, 1990, 10(6):328
- 9 章 韧,程锦轩,王振纲,等.甘草酸单铵免疫药理作用初探. *中国药理学通报*, 1987, 3(6):336
(1993-02-26收稿 1993-10-05修回)

THE DOSE-EFFECT RELATIONSHIP OF GLYCYRRHIZIN ON THE PREVENTION OF DEN-INDUCED HEPATOCARCINOGENESIS IN RATS

Li Junli Yan Ruiqi Wang Huiyun Huang Xiaoyan Huang Meiling Feng Qisheng
(Liver Cancer Lab, Cancer Center, Sun Yat-Sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510060)

Glycyrrhizin was studied for the dose-effect relationship on the prevention of DEN-induced precancerous G-glutamyltranspeptidase (GGT) positive hepatocellular foci in rats by the short term in vivo test model of DEN-induced hepatocarcinogenesis. The lowest effective prevention dose was 216. 2mg/kg, and the most effective prevention dose was 432. 4mg/kg while a dose as high as 864. 8mg/kg had less effective than 432. 4mg/kg. There was a dose-effect relationship among 108. 1mg/kg, 216. 2mg/kg and 432. 4mg/kg.

Key words glycyrrhizin; carcinogens; diethylnitrosamine (DEN); experimental hepatoma precancerous conditions; chemoprevention