

计量分析甘草甜素和绞股蓝总苷等对大鼠肝癌前病变的影响

王辉云* 严瑞琪 李俊丽 黄小延 冯启胜 黄玫玲

(中山医科大学肿瘤研究所肝癌室,广州,510060)

提 要 采用被公认的以 γ -谷氨酰转肽酶阳性灶(GGT+)为观察终点的二乙基亚硝胺(DEN)致大鼠肝癌前病变的模型,对甘草甜素(GL)、绞股蓝总苷(绞股蓝总甙,GP)、茶多酚和柴胡水提取液等进行了筛选,并用体视学方法进行计量分析。结果显示,GL组的GGT+的面数密度(Na)为 $24.17 \pm 1.83/\text{cm}^2$ ($\bar{x} \pm S_x$,下同),体密度(Vv)为 $4.74 \pm 0.51\%$,数密度(Nv)为 $394.9 \pm 45.2/\text{cm}^3$;GP组的Na为 $25.35 \pm 2.64/\text{cm}^2$,Vv为 $5.93 \pm 0.75\%$,Nv为 $379.2 \pm 48.4/\text{cm}^3$,这两组的3个估计值与对照组的3个估计值(Na为 $37.21 \pm 2.56/\text{cm}^2$,Vv为 $8.12 \pm 0.70\%$,Nv为 $576.1 \pm 58.0/\text{cm}^3$)分别比较时均有显著性差异,说明这两种药物对DEN致肝癌发生有抑制作用,而茶多酚和柴胡水提取液则未显示抑制作用。

关键词 甘草甜素; 绞股蓝总甙(绞股蓝总甙); 致肝癌作用; 二乙基亚硝胺; 体视学

中图分类号 R735.7; 965.1

原发性肝癌为我国常见的恶性肿瘤之一,目前的5年治愈率仍很低。因此,多年来国内外许多学者致力于对肝癌的病因预防,然而,肝癌的发生与多种因素有关,能同时阻断多种致癌因素的药物尚少,加上有的药物毒副作用大,故能实用的预防药物甚少,仅国内启东县在缺硒的肝癌高发区人群中补硒以预防肝癌,并发现肝癌发病率已有降低^[1]。但是,在非缺硒的肝癌高发区尚无有效的预防药物。为此,重点对一些有抗病毒作用的中药进行了筛选,以前实验显示甘草甜素能抑制黄曲霉素B₁致大鼠肝癌作用^[2],本次实验采用二乙基亚硝胺致大鼠肝癌前病变模型对甘草甜素和绞股蓝总苷等4种中药进行筛选,以便为肝癌的化学预防提供实验依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 实验动物 雄性SD大鼠60只,体重 154 ± 12 克($\bar{x} \pm s$),由本校动物中心提供。动物房由空气净化器送入空气,温度为 $26 \pm 1^\circ\text{C}$,湿度为 $75 \pm 5\%$,每笼一鼠,饲以粉状基础饲料,蛋白含量约为24%。

1.1.2 诱癌物 ①二乙基亚硝胺(DEN),Sigma产品,配成浓度为392mmol/L溶液;②2-乙酰氨基芴(2-AAF),Sigma产品,配成含量为0.15g/kg饲料。

1.1.3 被试物 ①绞股蓝总苷(gypenosides,GP),安康中药厂出品,批号910823,20mg/片,粉碎后配成0.48g/kg饲料;②甘草甜素(GL),长沙市中药一厂出品,批号870954,75mg/片,粉碎后配成1.5g/kg饲料;③茶多酚(tea-polyphenols),购自杭州茶多酚厂,粉剂,配成5g/kg饲料;④柴胡(bupleurem alcatum L),市售干燥植物切片405g,水煮沸抽提3次,合并浓缩,均匀拌混于饲料,配成相当于含生药96g/kg饲料。

* 第一作者,35岁,男,助理研究员,博士生

1.2 方 法

1.2.1 分 组 按随机区组设计分成5个组,每组12只大鼠:①对照组;②甘草甜素组;③绞股蓝总苷组;④茶多酚组;⑤柴胡组。

1.2.2 实验程序 基本按 Solt 模式进行,即实验第1~14天,对照组饲以基础饲料,各实验组饲以含被试物的饲料,在第11天给所有大鼠腹腔注射 DEN1次,按100mg/kg 体重给药。第15~25天各实验组改饲基础饲料。第26~39天所有大鼠饲以2-AAF 饲料,第33天行肝2/3切术,禁食18h 后于第43天处死。

1.2.3 肝脏处理 迅速摘取残留肝脏,称重,每鼠在右侧叶和乳头叶各取2块、尾叶取1块共5块各为2mm 厚的肝组织,4℃酒精:丙酮(1:1)固定24h,丙酮脱水,石蜡包埋,每个蜡块切一张5 μ m 厚切片, γ -谷氨酰转肽酶组化染色^[3]。

1.2.4 体视学测量 在10 \times 10倍的显微镜下,用显微测试格对 γ -谷氨酰转肽酶阳性灶(GGT 阳性灶)进行计量。测试格为 B₁₀₀,粗线间距 L=117 μ m,帧宽 d=10L,总点数 Pt=400,以点计数法计量。用方格测量纸测量肝组织切片面积。计量项目有:①面数密度(Na),即肝切片单位面积上灶的平均数目;②灶的平均截面积(\bar{A});③体密度(Vv),即灶的体积与肝体积之比;④灶的平均体积(\bar{V});⑤数密度(Nv),即单位肝体积中灶的数目。计算公式参照文献报道^[4]。

1.2.5 统计学处理 数据用 IBM-PC 电脑进行处理。各组肝 GGT 阳性灶的各计量指标、各组 DEN 注射量、肝重及肝重与体重之比用单因素 F 检验,实验组与对照组之间的比较用 Dunnett 检验;各组不同肝叶 GGT 阳性灶的发生数目(Na)的比较用两因素 F 检验,不同肝叶 GGT 阳性灶 Na 均数的两两比较用 Newman Keuls 检验;各组不同肝叶 GGT 阳性灶发生数目的比例的比较用 χ^2 检验;绞股蓝总苷组大鼠体重与对照组比较用 t 检验。

2 结 果

2.1 一般结果

在实验期间,各实验组大鼠生长曲线与对照组相似,除绞股蓝总苷组外,其余实验组大鼠体重与对照组无显著性差异。从生长曲线看,GP 组和对照组的体重在实验的第1~14天内均直线上升,说明被试物对生长没有影响;在注 DEN 和饲 AAF 后两者曲线均变平坦,说明它们对生长有一定的影响;肝大部切除术后,体重迅速降低,但 GP 组体重下降幅度小,在饲基础饲料后体重又恢复快,因而在实验结束时其体重在肝切后总的下降幅度明显少于对照组($t=2.28, P<0.05$)。此外,对各组 DEN 注射量,肝重及肝重与体重之比等作了比较,结果均无显著性差异。

2.2 GGT 阳性灶发生结果

对 GGT 阳性灶用体视学方法进行了计量分析,结果如表1。从二维角度看(即 Na),GL 和 GP 对 GGT 阳性灶的发生均有非常显著的抑制作用;从三维角度看,GL 和 GP 对 GGT 阳性灶的发生也均有显著的抑制作用,但两者的表现有所不同,GL 组 GGT 阳性灶体密度(Vv)值较 GP 组低,说明 GL 对单位肝体积中 GGT 阳性灶的发生和发展均有较强的抑制作用;GP 组数密度(Nv)值比 GL 组稍低,说明在单位肝体积中 GP 对 GGT 阳性灶的发生的抑制作用较 GL 稍强。在表1中,可见各实验组 GGT 阳性灶平均截面积和平均体积与对照组均无显著性差异,这是因为本实验的设计主要用于检测被试物对 DEN 致癌启动期的影响而非促进期之故。在本实验中,茶多酚和柴胡水提取液对 GGT 阳性灶的发生均未显示明显的抑制作用。另外,我们还比较了各组不同肝叶 GGT 阳性灶的发生数目(Na),发现右侧叶比尾叶或乳头叶明显高($P<0.01$),而后两者无差异;各实验组的各肝叶 GGT 阳性灶发生数目的比例与对照组无差异,说明被试物对各

肝叶 GGT 阳性灶的发生没有选择性抑制作用。

附表 各组大鼠肝 GGT 阳性灶计量指标估计值比较($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数	面数密度(Na) 灶/cm ²	平均截面积(A) mm ² /灶×100	体密度(Vv)%	平均体积(V) mm ³ /灶×100	数密度(Nv) 灶/cm ³
对照组	12	37.21±5.56	21.83±0.91	8.21±0.70	14.10±0.89	576.1±58.02
甘草甜素组	9	24.17±1.88**	19.61±1.02	4.74±0.51**	12.00±0.94	394.9±45.16*
绞股蓝总苷组	10	25.35±2.64**	23.40±0.90	5.93±0.75*	15.64±0.90	379.2±48.44**
茶多酚组	9	34.62±2.51	21.60±1.02	7.29±0.68	13.36±0.97	546.1±61.02
柴胡组	12	39.12±3.05	21.44±1.26	8.39±1.01	13.72±1.21	611.3±71.38
F 值		6.688196	0.337647	4.300006	0.294957	5.479756
P 值		<0.01	>0.05	<0.01	>0.05	<0.01

* 与对照组比较 $P<0.05$; ** $P<0.01$

3 讨 论

GL 是甘草中的一种主要有效成分,具有多种药理作用,如中药大辞典记载其有解毒护肝、抗癌作用等,近年报道其有抗病毒活性和增强免疫作用等^[5]。目前,国内外在临床上主要将 GL 用于慢性病毒性肝炎的治疗^[5],有关报道也不少。至于 GL 抑瘤作用方面的报道尚不多。日本学者曾报道 GL 能完全预防 3-Me-DAB 诱发的小鼠肝癌^[6]和抑制黑色素瘤细胞的生长^[7]。然而,有关 GL 的水解产物甘草次酸的抗癌作用的报道却不少^[7,8]。美国国立癌症研究所已将其作为有开发潜能的化学预防药正在进行 I 期临床试验^[9]。从本资料看,GL 不仅对 AFB₁ 致肝癌有明显的抑制作用^[2],而且在本次实验中也显示其对 DEN 引起的肝癌发生有显著的抑制作用,但其作用机理尚有待进一步的研究。

GP 是近 10 余年才从绞股蓝中提取的有效成分,至今已分离出 80 余种皂苷,其中有的结构与人参皂苷相同,具有人参皂苷样作用,因而倍受关注。目前,GP 临床应用报道尚不多。在实验研究方面,宋为民报道 GP 有抗诱变

剂诱发 SCE 的作用^[10];金梅则报道绞股蓝提取液对人直肠腺癌细胞有抑制和毒性作用^[11];另有人报道 GP 能提高机体免疫力^[12]和肝脑超氧化物歧化酶活性^[13]。本次实验结果显示 GP 对 DEN 致大鼠肝癌发生有明显的抑制作用。综上所述,GP 的抑制肿瘤的机理可能是多方面的。

现有的流行病学资料显示,肝癌的发生与多种因素有关,如慢性病毒性肝炎,AFB₁ 和污染的饮水等。在肝癌的病因预防上,目前尚未见报道可同时阻断多种致癌因素的药物。我们的研究显示,在临床上对慢性病毒性肝炎有疗效的 GL 不仅能抑制 AFB₁ 致肝癌作用^[2]而且对 DEN 致肝癌也有显著的抑制作用;绞股蓝在临床上对慢性肝炎有一定效果,GP 也能抑制 DEN 致肝癌作用。因此,这两种药物、特别是 GL 在肝癌高发区对多病因肝癌的化学预防有潜在的应用前景。

参 考 文 献

- 1 顾公望. 启东肝癌病因和预防战略研究现状. 中国肿瘤情报, 1989, (3):1
- 2 李俊丽, 严瑞琪, 王辉云, 等. 甘草甜素等对黄曲

霉毒素 B₁ 致大鼠肝癌作用的影响. 癌症, 1993, 12 (2): 104

3 Ogawa K, Solt DB, Farber E. Phenotypic diversity as an early property of putative preneoplastic hepatocyte populations in liver carcinogenesis. *Cancer Res*, 1980, 40: 725

4 郑富盛. 细胞形态立体计量学. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1990. 19~90

5 张清波. 甘草甜素的药理作用与临床应用. *上海医学*, 1989, 12(10): 613

6 田明华译. 甘草甜素对致癌物致肝癌的保护作用. *国外医学 中医中药分册*, 1981, 3(5): 35

7 Abe H, Chya 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

8 Nishino H, Kitagawa, Iwashima A. Antitumor-promoting activity of glycyrrhetic acid in mouse

skin tumor formation induced by 7,12-dimethylbenz(a)anthracene plus teleocidin. *Carcinogenesis*, 1984, 5(11): 1529

9 Malone WF, Kelloff GJ, Boome CW, et al. Chemoprevention clinical trials. *Proc Am Assoc Cancer Res*, 1991, 32: 478

10 宋为民, 法京, 人参、绞股蓝的抗变作用. *中草药*, 1992, 23(3): 136

11 金梅. 绞股蓝提取液对人直肠腺癌细胞系的影响. *现代应用药学*, 1992, 9(2): 49

12 李林, 邢善田. 绞股蓝总苷对小鼠脾淋巴细胞增殖反应及白细胞介素2产生的作用. *中药药理与临床*, 1992, 8(1): 26

13 李锐, 黄伟红, 苏子仁, 等. 绞股蓝总苷、青春宝、有机锗等药物抗氧化延缓衰老实验研究. *新中医*, 1990, 22(5): 52

(1992-09-23收稿 1993-10-12修回)

QUANTITATIVE EVALUATION OF THE EFFECTS OF GLYCYRRHIZIN AND GYPENOSIDES ON PRENEOPLASTIC LESION OF RAT LIVER

Wang Huiyun Yan Ruiqi Li Junli Huang Xiaoyan Feng Qisheng Huang Meiling
(Liver Cancer Laboratory, Cancer Center Sun Yat-Sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510080)

In this study, screening glycyrrhizin (GL), gypenosides (GP), teapolyphenols and bupleurum alcatum L was done by the short term model of hepatocarcinogenesis by diethylnitrosamine in rat. The gammaglutamyltranspeptidase-positive (GGT+) foci of liver as a marker of preneoplastic lesion were analyzed by stereology at the end of experiment. The results revealed that numerical density on area (Na), volume density (Vv) and numerical density (Nv) of GGT+ foci in GL group were $24.17 \pm 1.83/cm^2$, $4.74 \pm 0.51\%$ and $394.9 \pm 45.2/cm^3$, respectively, and that Na, Vv and Nv in GP group were $25.35 \pm 2.64/cm^2$, $5.93 \pm 0.75\%$ and $379.2 \pm 48.4/cm^3$, respectively. The three parameters of both GL and GP groups were significantly lower than those of the control group (Na, $37.21 \pm 2.56/cm^2$; Vv, $8.12 \pm 0.70\%$; Nv, $576.1 \pm 58.3/cm^3$). This showed that GL and GP could inhibit the hepatocarcinogenesis induced by Diethylnitrosamine in rat.

Key words glycyrrhizin; gypenosides; hepatocarcinogenesis; diethylnitrosamine; stereology