

肝积方干预 DEN 叠加肝郁脾虚因素诱导大鼠肝癌变作用及对大鼠肝 DNA 倍体的影响

王雄文¹, 殷静²

1. 广州中医药大学第一附属医院二肿瘤科, 广东 广州 510405

2. 广州中医药大学研究生院, 广东 广州 510405

[摘要] 目的: 探讨肝积方干预二乙基亚硝胺 (DEN) 叠加肝郁脾虚因素诱导大鼠肝癌变作用及对大鼠肝 DNA 倍体的影响。方法: 将 30 只大鼠随机分为 3 组, DEN 诱癌组、DEN+肝郁脾虚组及肝积方干预组, 采用 DEN 灌胃诱导大鼠肝癌变, 以不定时限制活动并束缚后肢激怒大鼠, 同时每 3 天禁食 1 天造成饮食不节模拟肝郁脾虚因素, 肝积方干预组大鼠自由饮用相当于生药 0.5 g/mL 肝积方浓缩煎煮液。记录大鼠体重、毛发及大便情况, 22 周后病理检测肝癌变及肝硬化发生率, 流式细胞仪检测 DNA 异倍体比例。结果: 第 7 周时 DEN+肝郁脾虚组大鼠稀烂便率 80%, 肝积方干预组大鼠稀烂便发生率 20%, 肝积方可减轻此症状 ($P < 0.05$); 第 22 周结束后肝积方干预组癌变率为 0 与 DEN 诱癌组 20% 有较大差异, 但差异无显著性意义 ($P > 0.05$); 22 周后检测 3 个实验组大鼠肝脏二倍体、异倍体, 与正常对照大鼠比较, 差异均有显著性意义 ($P < 0.05$), 但 3 个实验组间比较无差异 ($P > 0.05$)。结论: 叠加的肝郁脾虚因素可加重实验大鼠焦躁不安与排稀烂便, 肝积方可减轻大鼠排稀烂便症状; DEN 灌胃可成功诱导大鼠肝癌变, 肝积方可能延缓 DEN 诱导的实验大鼠肝癌变。

[关键词] 肝癌; 肝积方; 肝 DNA 倍体; 肝郁脾虚; 诱导

[中图分类号] R735.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2014) 08-0180-02

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2014.08.082

肝积方是国家名中医周岱翰教授治疗肝癌的常用组方之一, 其特色是除传统疏肝健脾、活血化瘀中药之外, 基于对肝生理特点的认识及肝癌病因病机及演变的理解, 合用旱莲草、女贞子、黄芩、半枝莲等滋阴降火中药, 本课题研究肝积方对肝郁脾虚因素协同二乙基亚硝胺 (DEN) 诱发大鼠实验性肝癌的干预效果及其可能的机制。

1 材料与方

1.1 动物与分组 清洁级雄性 Wistar 大鼠 30 只, 体重 90~120 g, 由中山大学中山医学院实验动物中心提供。正常饲养 1 周。随机分 3 组, DEN 诱癌组、DEN+肝郁脾虚组及 DEN+肝郁脾虚+肝积方干预组 (以下简称肝积方干预组), 每组 10 只。

1.2 药物与试剂 DEN: 购自 Sigma 公司, 取 DEN 0.56 mL 用 40 mL 蒸馏水稀释, 调节终浓度为 7 mg/mL 备用。肝积方 (由柴胡、白芍、党参、茯苓、白术、旱莲草、女贞子、黄芩、半枝莲、八月札、莪术等组成, 购自广州中医药大学第一附属医院中药房, 传统煎煮浓缩至相当于生药 0.5 g/mL, 分装后高温高压 (0.7 kg/cm², 110℃, 30 min) 灭菌后冷却, 4℃冷藏备用。

1.3 实验方法 DEN 诱发大鼠肝癌及叠加肝郁脾虚因素参照文献^[1]报道方法。具体实验方法为: DEN 灌胃诱癌: 3 组实验动物均予 DEN 灌胃, DEN 浓度为 7 mg/mL, 按照每周 1 mL/100 g 大鼠体重灌胃 14 周后, 因肝硬化腹水致大鼠死亡, 减少 DEN 量至每周 0.5 mL/大鼠体重灌胃, 第 18 周起再次减少 DEN 量至每周 0.25 mL/大鼠体重灌胃至第 18 周结束。

肝郁脾虚因素叠加 DEN+肝郁脾虚组及肝积方干预组以不定时方式用特制鼠笼使其处于极度狭小的空间限制大鼠活动并束缚后肢 8h/天以激怒大鼠, 同时每 3 天禁食 1 天造成饮食不节, 至 18 周结束。肝积方给药叠加肝郁脾虚因素同时, 给 DEN 诱癌组、DEN+肝郁脾虚组自由饮用蒸馏水, 而肝积方干预组饮用相当于生药 0.5 g/mL 肝积方煎煮液。造模结束后正常饲养至第 22 周检测。

1.4 一般情况 实验期间每周记录实验大鼠行为、大便质地及体重, 记录实验大鼠死亡情况, 并结合病理检测分析实验大鼠死亡原因。

1.5 病理检测 死亡大鼠及 22 周存活大鼠肝脏标本, 4%多聚甲醛缓冲液固定 24 h, 常规石蜡包埋切片, HE 染色, 光学

[收稿日期] 2014-03-12

[基金项目] 广东省科技计划项目 (编号: 2007B031404012); 广东省自然科学基金项目 (编号: K2080113)

[作者简介] 王雄文 (1968-), 男, 中西医结合主任医师, 研究方向: 中西医结合肿瘤临床及肿瘤微创治疗。

显微镜下观察大鼠肝硬化及癌变情况。

1.6 流式细胞术 DNA 含量的检测 采用 Beckman Coulter 公司 Coulter Epics Altra 流式细胞仪, 用生理盐水冲洗肝脏标本后, 加入 3 mL PBS 液于培养皿中, 在培养皿中用眼科剪将样本剪成碎末状, 200 μm 铜网过滤, 加入 PBS 液后每分钟 1 500 转离心 8 min, 取沉淀 1 mL 加入到 2 mL 70%酒精中固定, 20℃冰箱保留 18 h 后, 加入碘化丙啶(PI)DNA 荧光染料, 参照 PI 试剂说明处理。流式细胞仪用戊二醛固定的鸡红细胞调节变异系数在 3% 以下, 取同批次正常饲养的 Wistar 大鼠肝组织做正常对照, 15 mw、480 nm 波长氩离子激光激发检测 DNA 含量及分析 DNA 二倍体及异倍体比例。

1.7 统计学方法 采用 SPSS14.0 统计软件, 计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示, 各组间的均数比较采用单因素方差分析(one way ANOVA), 计数资料采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 一般状况 造模后第 7 周, 各组大鼠体重无明显差异, 部分大鼠出现腹泻稀烂便, 皮毛光泽度变差, 各组大鼠活动减少, DEN+ 肝郁脾虚组及肝积方干预组大鼠焦躁不安。肝积方干预组大鼠稀烂便发生率 20%, 与 DEN+ 肝郁脾虚组 80% 比较, 差异有显著性意义($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 第 7 周各组大鼠腹泻情况比较 例(%)

组 别	n	稀烂便
DEN 诱癌组	10	4(40)
DEN+ 肝郁脾虚组	10	8(80)
肝积方干预组	10	2(20)

与 DEN+肝郁脾虚组比较, ① $P < 0.05$

2.2 病理检测 第 8 周开始死亡实验大鼠经病理检测全部死于肝硬化, 大体标本上可见肝表面粗糙不平, 肝切面可见 2 mm 左右大小不等的白色颗粒状结节, 镜下为肝硬化结节, 大部分伴有血性或非血性腹水。第 22 周结束后病理检测发现部分癌变, 大体标本的肝表面及肝切面可见较大的结节, 大小在 3~20 mm, 镜下呈癌组织改变。图 1~3。22 周肝积方干预组癌变率为 0 与 DEN 诱癌组 20% 有较大差异, 但差异无显著性意义($P > 0.05$)。见表 2。

2.3 3 组实验大鼠与正常大鼠肝脏 DNA 倍体比较 见表 3。22 周后 3 组大鼠肝脏二倍体、异倍体与正常同批次大鼠比较, 差异均有显著性意义($P < 0.05$), 但 DEN 诱癌组、DEN+ 肝郁脾虚组、肝积方干预组比较, 差异无显著性意义($P > 0.05$)。

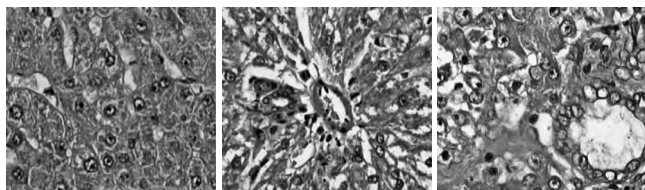


图 1 癌变 图 2 正常肝 图 3 肝硬化

表 2 22 周后各组大鼠肝硬化及肝癌变比较 例(%)

组 别	n	硬化	肝癌变
DEN 诱癌组	10	8(80)	2(20)
DEN+ 肝郁脾虚组	10	8(80)	1(10)
肝积方干预组	10	9(90)	0(10)

表 3 3 组 DNA 倍体检测与正常批次大鼠比较($\bar{x} \pm s$)

组 别	二倍体	异倍体%
正常大鼠	96.1 ± 3.7	3.60 ± 2.5
DEN 诱癌组	45.0 ± 4.3	55.0 ± 4.4
DEN+ 肝郁脾虚组	47.7 ± 5.1	52.3 ± 4.9
肝积方干预组	39.3 ± 4.2	60.7 ± 4.2

与正常大鼠比较, ① $P < 0.05$; 与 DEN 诱癌组、DEN+肝郁脾虚组比较, ② $P > 0.05$

3 讨论

DEN 对肿瘤的发生具有启动和促进的双重作用, 大鼠肝癌变过程大致经过肝细胞损伤期、肝细胞增生、硬化期和肝细胞癌变期等阶段。诱癌第 8~14 周为肝硬化期, 第 18~20 周为癌变期。肝细胞癌所占比例大, 数据显示给予结扎束缚及不定期节食可导致实验大鼠便溏、活动减少及焦躁不安类似肝郁脾虚证的表现。给予肝积方干预组第 22 周结束后肝硬化率及肝癌变率分别为 90% 与 0%, 而 DEN 诱癌组与肝积方干预组肝硬化率及肝癌变率分别为 80%、20% 与 80%、10%。尽管第 22 周结束后肝积方干预组癌变率 0% 与 DEN 诱癌组 20% 有较大差异, 提示肝积方可能有延缓 DEN 诱导大鼠癌变趋势, 但差异无显著性意义($P > 0.05$)。

DNA 是生物遗传的物质基础, 非增殖状态下细胞 DNA 含量恒定, 为二倍体, 在病理状态下, 尤其是癌变细胞, 染色体的结构与数目发生异常, 多倍体或(和)异倍体现象更为显著, 故 DNA 异倍体是肿瘤的特征之一, 同时它往往出现在组织病理学改变之前, 可作为预测癌前病变恶性倾向的指标^[2]。第 22 周实验结束后肝积方干预组癌变率及 DNA 倍体与其他 2 组数据比较无统计学差异, 这可能因为样本少, 或肝积方的保护作用与 DEN 强烈的诱癌作用比较相对弱小有关系, 需要增加样本量及增加诱癌早期不同时间点的 DNA 倍体数据进一步分析比较。

[参考文献]

[1] 王济, 顾立刚, 王庆国, 等. 肝郁脾虚因素促进 DEN 诱发大鼠实验性肝癌的研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2003, 10(1): 18-20.

[2] Furuya T, Uchiyama T, Murakami T. Relationship between chromosomal instability and intratumoral regional DNA ploidy heterogeneity in primary gastric cancers[J]. Clin Cancer Res, 2000, 6(7): 2815-2820.

(责任编辑: 马力)