

抗纤抑癌方干预大鼠肝癌前病变疗效观察

刘蕊洁 杨先照 张 鹏 焦云涛 叶永安

(北京中医药大学东直门医院,北京,100700)

摘要 目的:通过对肝癌前病变大鼠予抗纤抑癌方灌胃给药,结合肝脏病理及相关指标的免疫组化检测,观察抗纤抑癌方对肝癌前病变的治疗作用。方法:将 55 只 Wistar 雄性大鼠随机分为正常组 10 只、模型组 15 只、扶正化瘀组 15 只与抗纤抑癌组 15 只,除正常组外,其余各组以二乙基亚硝胺腹腔注射诱导肝癌前病变形成,每周 1 次,持续 14 周,同时每天分别以等计量生理盐水、扶正化瘀胶囊及抗纤抑癌颗粒的水溶剂灌胃给药,在第 14 周末给药后取材,进行大鼠肝脏 HE、Masson 病理染色及 FN、GST-Pi 及 PCNA 指标的免疫组化检测。结果:通过肝脏 HE 及 Masson 染色发现抗纤抑癌方较扶正化瘀组可明显改善肝癌前病变大鼠肝脏纤维堆积及肝细胞异常增生情况,免疫组化结果显示抗纤抑癌方可明显减少肝癌前病变时 FN、GST-Pi 及 PCNA 表达(均为 $P < 0.01$),较扶正化瘀组也有较明显的改善作用(分别为 $P < 0.01$ 、 $P < 0.01$ 及 $P < 0.05$)。结论:抗纤抑癌方具有改善肝癌前病变大鼠肝脏纤维堆积及肝细胞异常增生等作用,其作用机制有待进一步深入研究。

关键词 肝癌前病变;抗纤抑癌方;二乙基亚硝胺;疗效观察

Efficacy Observation on Kangxian Yi'ai Formula in Rats with Liver Precancerous Lesions

Liu Ruijie, Yang Xianzhao, Zhang Peng, Jiao Yuntao, Ye Yong'an

(Dongzhimen Hospital Affiliated to Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China)

Abstract Objective: To observe the efficacy of Kangxian Yi'ai formula on liver precancerous lesions through immunohistochemistry test by gastric administration in rats. **Methods:** To randomly divide 55 male Wistar rats into four groups: 10 in the normal group, 10 in the model group, 15 in the Fuzheng Huayu capsule group and 15 in the Kangxian Yi'ai formula group respectively. Diethylnitrosamine had been given to induce liver precancerous lesions in all groups except the normal group for 14 weeks, once a week. Meanwhile, besides the normal group, saline, Fuzheng Huayu capsule and Kangxian Yi'ai formula were also given the same dosage at each time in respective groups. At the end of the 14th week, tissues were taken to test the pathology of the liver, together with the IHC index included GST-Pi, PCNA and FN. **Results:** The liver HE and Masson staining showed that Kangxian Yi'ai formula could reduce the cirrhosis degree and the size of lesions much obviously than Fuzheng Huayu capsule did. In addition, the Kangxian Yi'ai formula could reduced the FN, GST-Pi and PCNA much greatly than the control group ($P < 0.05$) and the Fuzheng Huayu group ($P < 0.01$, $P < 0.01$ and $P < 0.05$). **Conclusion:** Kangxian Yi'ai formula could constrain cirrhosis and the liver precancerous lesions induced by diethylnitrosamine in rats, but its mechanism is yet to be found.

Key Words Liver precancerous lesions; Kangxian Yi'ai formula; Diethylnitrosamine; Efficacy observation

中图分类号:R229 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2015.09.004

肝细胞癌(简称“肝癌”)起病隐匿,预后极差,是全球致死性最高死亡肿瘤之一^[1]。目前已公认肝癌的发生多经历“慢性肝炎→肝硬化→肝癌前病变→肝癌”的病情进展,其中肝硬化是肝癌发生的独立危险因素之一^[2]。肝癌前病变以异型增生结节为形态学特征,是肝硬化结节进一步发展的结果,也是肝细胞癌进展中启动、促进和演变过程的中间阶段,是阻断癌变的理想时机,对肝癌前病变病理与治疗方案的探索、研究,将有助于指导临床治疗。

经过长期理论探索与临床实践,我们发现肝癌前病变以肝郁脾虚,痰瘀互结为主要病机,据此创立

了治疗肝癌前病变的有效方剂——抗纤抑癌方。该方主要由柴胡、黄芪、山药等组成,具有疏肝健脾、活血化痰等功效,本实验研究将对抗纤抑癌方干预大鼠肝癌前病变进行初步疗效观察。

1 材料与方法

1.1 实验动物 SPF 级雄性 Wistar 大鼠 55 只,体重约(180.5 ± 6.8)g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司。给予大、小鼠维持饲料喂养,饲养于北京中医药大学东直门医院屏障环境动物实验室,以上实验方案报经北京中医药大学东直门医院实验动物伦理委员会许可。

1.2 主要药品及试剂 抗纤抑癌方:主要由柴胡、黄芪、山药等组成,药物免煎颗粒由培力(南宁)药业有限公司生产,批号:A1401138;扶正化瘀胶囊:上海黄海制药有限责任公司生产,批号:130943;GST-Pi 单克隆抗体:Abcom 公司生产,货号:ab138491;4%多聚甲醛:索莱宝公司生产,货号:P1110;PCNA 单克隆抗体:Abcom 公司生产,货号:ab92552;免疫组化试剂盒:博奥森公司生产,货号:SP-0023;HE 染色试剂盒:索莱宝公司生产,货号:G1120;Masson 三色试剂盒:索莱宝公司生产,货号:G1340;DAB 显色剂:中杉金桥公司生产,货号:ZLI-9018。

1.3 主要仪器 自动病理脱水机:莱卡公司生产,型号:HI1210;包埋机:莱卡公司生产,型号:ASP200S;病理组织切片机:莱卡公司生产,型号:RM2235;光学显微镜:奥林巴斯公司生产,型号:CX31。

1.4 动物分组、造模、给药及取材方法

1.4.1 分组及造模方法 55 只 Wistar 雄性大鼠按照 Excel 随机数字表法随机分为正常组 10 只、模型组 15 只、扶正化瘀组 15 只与抗纤抑癌组 15 只,饲养于室温 20~23℃,相对湿度 55%~70%,12 h 光照、12 h 黑暗交替环境,各组大鼠自由摄食饮水。除正常组以外,其余各组适应性饲养 1 周后,以二乙基亚硝胺 (DEN) 50 mg/kg 剂量腹腔注射,正常组予 0.4 mL/100 g 0.9% 氯化钠注射液腹腔注射,每周 1 次,持续 14 周。

1.4.2 给药方法 造模开始即予灌胃给药,正常组与模型组给予 0.9% 生理盐水,按照 1 mL/100 g 剂量灌胃,1 次/d;其余两组按照临床用量的 6.25 倍,按临床 60 kg 成人用量进行计算,具体药量如下:1) 扶正化瘀胶囊:去掉扶正化瘀外胶囊,将粉末溶解于 0.9% 生理盐水中,每毫升含药量为 0.028,按 1 mL/100 g 的剂量灌胃,1 次/d;2) 抗纤抑癌方:将中药免煎颗粒溶解于 0.9% 生理盐水中,每毫升含颗粒药量为 0.448 g,按 1 mL/100 g 的剂量灌胃,1 次/d。以上 4 组连续给药 14 周。

1.4.3 取材方法 于给药后第 14 周末取材。配置 10% 水合氯醛溶液按照 0.33 mL/100 g 腹腔注射麻醉,腹主动脉取血,迅速摘取肝脏,取肝脏最大叶、距边缘约 1 cm 的部位切取大小约 1 cm × 1 cm × 0.3 cm 组织块,置于 4% 多聚甲醛溶液中固定 48 h 后进行石蜡包埋、以 4 μm 厚度切片,按照相应试剂盒说明书进行 HE、Masson 染色及 GST-Pi、PCNA 及 FN 免疫组化检测。

1.5 统计学方法 对免疫组化图片进行光镜下观察,视野中呈棕黄色的细胞为阳性灶,每张切片随机拍摄 5 个视野(×400),应用图像分析软件 Image-Pro-plus6.0 测各组目的蛋白积分光密度(IOD);数据以($\bar{x} \pm s$)表示,应用 SPSS 16.0 统计软件进行计算分析,对符合正态分布的计量资料应用 ANOVA 方差分析,不符合正态分布者采用非参数检验,以 $P < 0.05$ 有统计学意义, $P < 0.01$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠肝脏 HE 染色(见图 1) 正常组大鼠肝细胞索放射状排列,细胞质均质红染,核圆形居中,汇管区无炎性细胞浸润及无胆汁淤积。模型组可见广泛纤维间隔分割与假小叶形成,肝细胞变质与增生病变并存,变质主要为肝细胞的小滴脂变、细胞水肿,肝细胞坏死,增生病变表现为大量肝细胞异型增生灶及异型增生结节,肝细胞大小不等,细胞核增大,核/浆增高,核具有多形性,双核、多核多见。扶正化瘀组也可见纤维间隔与假小叶形成,但假小叶不如模型组密集,细胞变质与增生病变并存。抗纤抑癌组纤维增生与假小叶形成程度轻于扶正化瘀组,肝细胞异常增生与细胞变质少于模型组及扶正化瘀组。

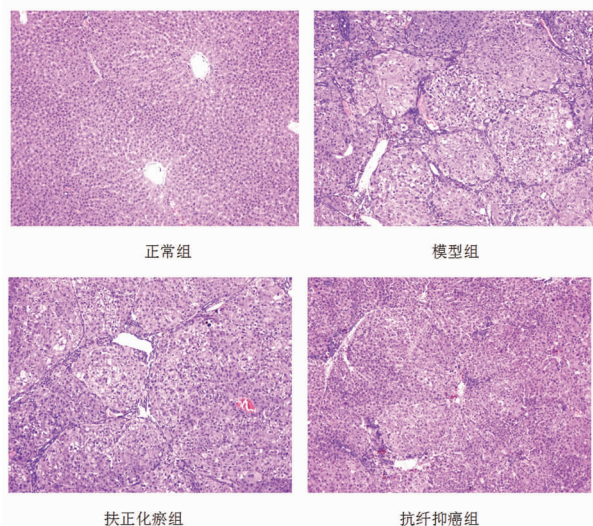


图 1 各组大鼠肝脏 HE 染色(×100)

2.2 各组大鼠肝脏 Masson 染色(见图 2) Masson 特染可更好的反映纤维增生情况。正常组大鼠肝细胞间可见少量纤维组织。模型组明显可见纤维条索分割肝小叶成更密集、体积更小的假小叶。扶正化瘀组中纤维间隔明显,被纤维分割形成的假小叶面积大于模型组。抗纤抑癌组可见汇管区周围纤维间隔形成,但纤维条索分割假小叶形成不明显。

2.3 免疫组化检测结果

2.3.1 各组 FN 比较(见图 3) 不可溶的纤维粘连蛋白(FN)阳性灶为棕黄色,在肝脏,主要存在于肝窦、基底膜与肝细胞之间、汇管区及纤维条索分割假小叶处。正常组可见少量 FN 存在,与模型组及扶正化瘀组均有统计学意义($P<0.01$),与抗纤抑癌组无统计学意义($P=0.145$);模型组与扶正化瘀组 FN 表达无统计学意义($P=0.199$),抗纤抑癌组 FN 较模型组及扶正化瘀组表达明显减少,均存在统计学意义($P<0.01$)。

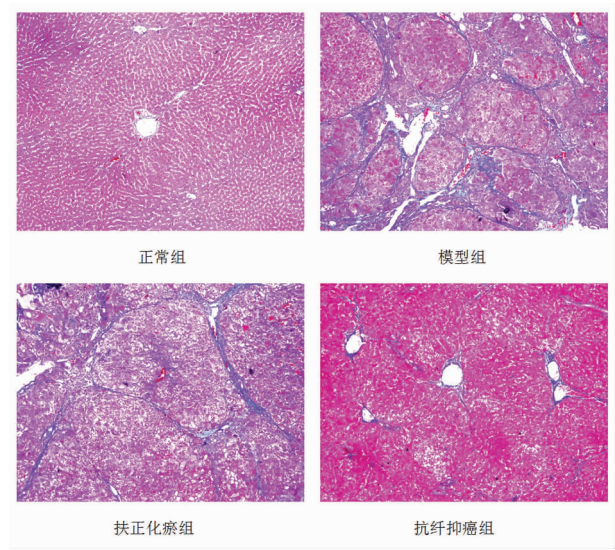


图 2 各组大鼠肝脏 Masson 染色(×100)

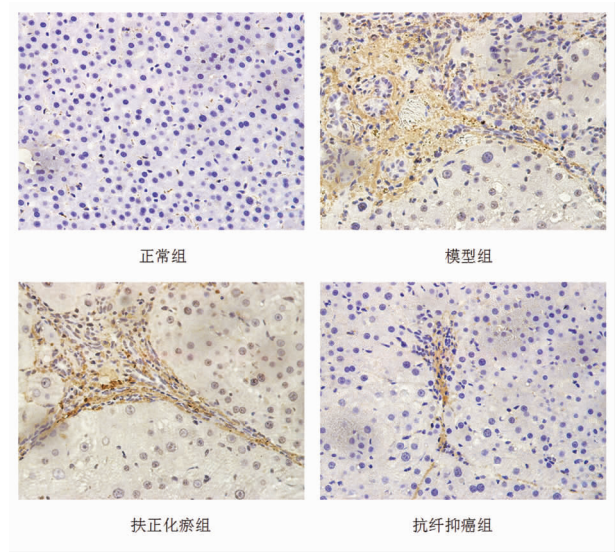


图 3 各组 FN 比较(×400)

表 1 各组大鼠肝脏 FN IOD

组别	IOD($\bar{x} \pm s$)
正常组	468.43 ± 276.53 **/△△
模型组	15319.70 ± 3320.98
扶正化瘀组	12498.20 ± 1764.00
抗纤抑癌组	3883.33 ± 2093 **/△△

注:**与模型组相比, $P<0.01$;△△与扶正化瘀组相比, $P<0.01$ 。

2.3.2 各组 GST-Pi 比较(见图 4) 谷胱甘肽 S-转移酶(GST-Pi)免疫组化阳性灶表现为不规则形棕黄色团块,主要分布在肝细胞胞浆中。正常组表达较少,与其余 3 组间均存在统计学意义($P<0.01$),模型组及扶正化瘀组间无统计学意义($P>0.05$),抗纤抑癌组 GST-Pi 表达量低于模型组与扶正化瘀组,均有统计学意义($P<0.01$)。

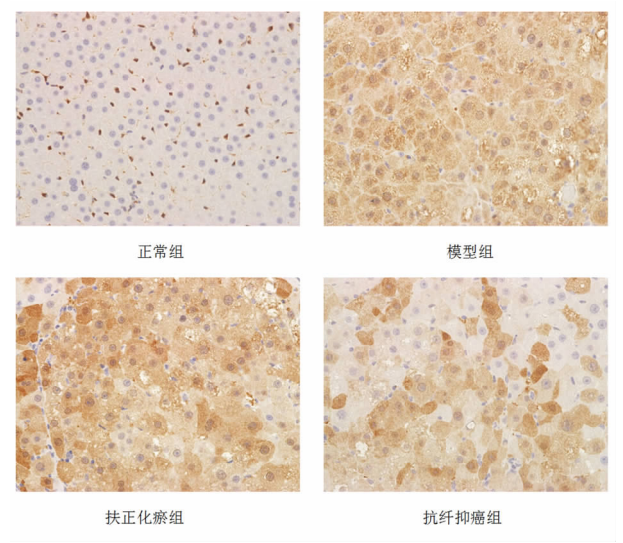


图 4 各组 GST-Pi 比较(×400)

表 2 各组大鼠肝脏 GST-Pi IOD 比较

组别	IOD($\bar{x} \pm s$)
正常组	2260.93 ± 1217.09 **
模型组	113469.90 ± 15338.24
扶正化瘀组	114315.50 ± 20328.30
抗纤抑癌组	69219.34 ± 30831.62 **/△△

注:**与模型组相比, $P<0.01$;△△与扶正化瘀组相比, $P<0.01$ 。

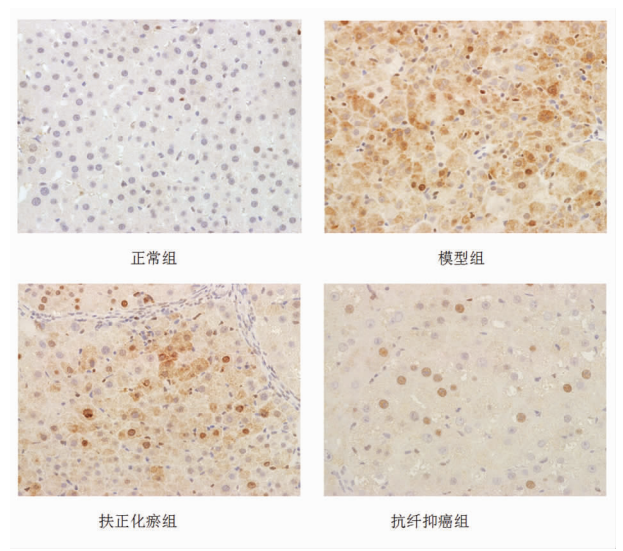


图 5 各组 PCNA 比较(×400)

2.3.3 各组 PCNA 比较(见图 5) 增殖细胞核抗原(PCNA)在细胞核内合成,主要分布在肝细胞细胞

核中,在正常肝脏细胞表达明显少于其余3组($P < 0.01$),模型组中PCNA表达显著高于扶正化瘀组与抗纤抑癌组($P < 0.01$),抗纤抑癌组PCNA表达量低于扶正化瘀组,有统计学意义($P < 0.05$)。

表3 各组大鼠肝脏PCNA IOD

组别	IOD($\bar{x} \pm s$)
正常组	555.97 $\pm$ 714.29 **
模型组	32613.18 $\pm$ 23069.22
扶正化瘀组	6225.94 $\pm$ 6590.63 **
抗纤抑癌组	2233.90 $\pm$ 1279.64 **/ $\Delta\Delta$

注:**与模型组相比, $P < 0.01$; $\Delta\Delta$ 与扶正化瘀组相比, $P < 0.05$ 。

3 讨论

肝癌前病变多数情况下是发生在肝脏慢性病变如肝纤维化、肝硬化基础上的肝细胞异常增生,是HCC发生的前奏与防治的重要阶段。对于肝癌前病变发病机制的研究逐渐增多,研究内容已进入细胞和分子水平,越来越多的证据表明肿瘤的发生和进展是肿瘤细胞自身与其所处的环境共同作用的结果。肝癌前病变的发生既是肝细胞的变异,又与其所处的肝硬化微环境密切相关,是一个较为独特的病理阶段。

抗纤抑癌方以中医理论为指导,经过长期临床实践创立,是治疗肝癌前病变的有效方剂,通过本实验证实,抗纤抑癌方可从抑制肝癌前病变细胞异常增生、调整细胞微环境这两个相对独立又相互关联的方面着手,有效抑制肝癌前病变的发生、发展。

肝癌前病变的病理以肉眼可见较大增生结节,HE染色下见到肝硬化基础上的小细胞增生伴高级别异型增生结节为特征^[3]。模型组大鼠肝脏HE染色可见肝细胞多处变性、坏死,在肝硬化基础上形成以细胞核增大、核/浆增高及细胞核具有多形性为特点的异型增生灶,扶正化瘀组及抗纤抑癌组肝细胞变质与增生病变轻于模型组,其中尤以抗纤抑癌组为轻。Masson染色显示各组纤维化情况与HE类似。由以上研究可见,抗纤抑癌方能有效减轻大鼠肝癌前病变肝硬化纤维堆积程度、减轻大鼠肝细胞变性、坏死,以及减少肝细胞异形性及异型增生结节。

胎盘型谷胱甘肽转移酶GST-Pi在多种恶性肿瘤中均有表达,在癌前状态及分化较好的肿瘤中表达升高,被认为是检测“癌症启动细胞”最准确、最早的标志酶,其阳性灶数目与癌细胞增殖多少正相关^[4]。增殖细胞核抗原PCNA与DNA合成关系密

切,是反应细胞增殖的良好指标,在具有旺盛增殖活性的肿瘤细胞中表达较高,与肿瘤的发生、发展及分级呈正相关^[5]。本实验免疫组化结果显示,抗纤抑癌方可显著减轻肝癌前病变大鼠肝脏GST-Pi与PCNA阳性灶含量,其中抗纤抑癌组GST-Pi与模型组、扶正化瘀组相比均有显著的统计学意义($P < 0.01$),抗纤抑癌组PCNA与模型组、扶正化瘀组相比均有统计学意义(分别为 $P < 0.01$ 、 $P < 0.05$),提示抗纤抑癌方对减缓肝癌前病变细胞异常增殖有一定功效。

FN主要在肝血窦内皮细胞生成,是构成细胞外基质的主要成分之一,具有促进肝星状细胞的活化、细胞外基质合成,以及抑制细胞外基质降解的作用,在肝纤维化早期即有明显升高,是较肝星状细胞(HSC)活化、I型胶原沉积更为早期的病理表现之一^[6]。FN在正常细胞、组织中也有表达,本实验结果显示抗纤抑癌组大鼠肝脏免疫组化FN均显著低于模型组与扶正化瘀组($P < 0.01$),结合我们前期研究显示该方对于HSC、 α -SMA的抑制作用,提示抗纤抑癌方可通过抑制FN合成发挥抗纤维化、改善肝癌前病变微环境等作用。

综上,通过本研究发现,抗纤抑癌方具有明显的改善肝癌前病变大鼠肝脏纤维堆积及肝细胞异常增生等作用,而该方剂抑制肝癌前病变发生的机制,值得进一步深入研究。

参考文献

[1] Anna-Maria T, Traian D, Simona D, et al. Influence of hepatitis viruses on clinic opathological profiles and long-term outcome in patients undergoing surgery for hepatocellular carcinoma [J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2014, 13 (2) :162-172.

[2] Silvana C. Faria, Janio Szklaruk, Ahmed O. Kaseb, et al. TNM/Okuda/Barcelona/UNOS/CLIP International Multidisciplinary Classification of Hepatocellular Carcinoma: concepts, perspectives, and radiologic implications [J]. Abdom Imaging, 2014, 39 (5) :1070-1087.

[3] Yujin H, Bryan C. F, Kenneth K. T. Prevention of hepatocellular carcinoma: potential targets, experimental models, and clinical challenges [J]. Curr Cancer Drug Targets, 2012, 12 (9) :1129-1159.

[4] Khabaz MN. Polymorphism of the glutathione S-transferase Pi gene (GST-pi) in breast carcinoma [J]. Pol J Pathol, 2014, 65 (2) :141-146.

[5] 丁印鲁, 赵荣宇, 由翠珍, 等. PCNA在肝细胞癌中的表达及其临床意义[J]. 大连医科大学学报, 2002, 24 (1) , 25-27.

[6] 宣红萍, 孙保木, 陶艳艳, 等. 肝纤维化过程中整合素 $\alpha 5\beta 1$ 动态变化与扶正化瘀方干预作用[J]. 肝脏, 2004, 9 (3) :163-166.