

实验研究

刺络泻血对原发性肝癌大鼠血清 AFP、SF 的影响

吴云¹ 赵慧玲¹ 刘新燕¹ 魏珂² 陈子晨¹ 谭丽¹ 战慧敏¹

(1 北京中医药大学针灸推拿学院,北京,100029; 2 丰台中西医结合医院,北京,100072)

摘要 目的:观察刺络泻血对原发性肝癌(Hepatocellular Carcinoma,HCC)模型大鼠甲胎蛋白(Alpha-Fetoprotein,AFP)、铁蛋白(Serum Ferritin,SF)及肝功能相关指标的影响,探究刺络泻血对HCC的预防作用及相关机制。方法:将40只健康Wistar大鼠随机分为正常对照组(10只)、模型组(15只)、刺血预防组(15只)。除正常对照组外,其余两组均采用二乙基亚硝胺(Diethylnitrosamine,DEN)腹腔注射建立HCC模型,刺血预防组在造模开始同时取肝经浅表络脉刺血,0.5 mL/次,2次/周,至13周。第13周末,腹主动脉取血5 mL,采用ELESA法测定3组大鼠血清肝功能丙氨酸氨基转移酶(Alanine Aminotransferase,ALT)、碱性磷酸酶(Alkaline Phosphatase,ALP)、谷氨酰转肽酶(Gamma Glutamyl Transpeptidase,GGT)和肿瘤标志物AFP、SF含量。结果:与正常对照组比较,模型组大鼠血清ALT、ALP、GGT、AFP、SF含量均明显升高($P < 0.05$),差异具有统计学意义。与模型组比较,刺血预防组大鼠血清ALT、ALP、GGT、AFP、SF含量均降低($P < 0.05$),差异有统计学意义。结论:刺络泻血疗法对HCC的发展有一定程度的抑制作用,其作用机制可能与降低血清肝功能指标,保护肝脏,下调肿瘤标志物AFP、SF水平有关。

关键词 刺络泻血;原发性肝癌;甲胎蛋白;铁蛋白;大鼠

Research on the Influence of Pricking Blood on Collaterals Therapy on Serum AFP and SF in the Rat Model of Primary Liver Cancer

Wu Yun¹, Zhao Huiling¹, Liu Xinyan¹, Wei Ke², Chen Zichen¹, Tan Li¹, Zhan Huimin¹

(1 School of Acupuncture-Moxibustion and Tuina, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China;

2 Fengtai Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Hospital, Beijing 100072, China)

Abstract Objective: To observe the effect of pricking blood on collaterals therapy on AFP and SF in rats model of primary liver cancer (HCC), and explore its preventive effect and related mechanism. **Methods:** Forty healthy Wistar rats were randomly divided into control group ($n = 10$), model group ($n = 15$) and pricking blood group ($n = 15$). In addition to the control group, the other two groups were injected with DEN (Diethylnitrosamine) intraperitoneally to establish liver cancer model. Rats in pricking blood group was performed of blood letting on the superficial veins of hind leg along the liver meridian, 0.5 mL each time and 2 times per week, till the eighteenth week. At the end of the week, taking 5 mL blood from the abdominal aorta and using ELESA method to determine ALT (Alanine Amino Transferase), ALP (Alkaline Phosphatase), GGT (Gamma Glutamyl Transpeptidase), AFP and SF levels in serum. **Results:** Compared with the control group, the serum levels of ALT, ALP, GGT, AFP and SF in model group were significantly increased, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Compared with the model group, the serum levels of ALT, ALP, GGT, AFP and SF in the prevention group were lower, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion:** Blood pricking on collaterals therapy has inhibitory effect on HCC, which might due to the fact that it can decrease the liver serum levels and tumor signals AFP and SF.

Key Words Blood pricking on collaterals therapy; Primary liver cancer; AFP; SF; Rats

中图分类号:R245 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2016.06.032

原发性肝癌是指肝细胞或肝内胆管细胞发生的癌肿,该病一般起病隐匿,发展迅速,且致死率高,因此有“癌中之王”之称^[1]。目前临床上针对HCC的治疗西医主要采用手术切除或放、化疗法,价格昂贵

且不良反应较大,近年来研究显示,中医针灸在防治HCC方面有很好的疗效^[2-5]。刺络泻血作为针灸疗法的一种,系通过三棱针或其他针具刺破人体血络或腧穴,放出适量血液,以治疗或防治疾病的方法,

作者简介:吴云(1988.11—),女,硕士,北京中医药大学,研究方向:刺络泻血疗法作用机理研究,E-mail:1002375051@qq.com

通信作者:赵慧玲(1957.7—),女,主任医师,教授,北京中医药大学,研究方向:刺络泻血疗法的文献、实验及临床研究,E-mail:zhaohuil-ing3895@sohu.com

拥有上千年历史,近年来在肝病防治方面,取得了一定进展,日益受到国内外的广泛关注。

研究表明^[6],刺络泻血疗法具有祛瘀生新、清热解毒、消癥散结等作用,可以有效降低血清肝功及肝纤四样的含量,促进肝星状细胞凋亡,防治肝纤维化,而肝纤维化是肝癌癌前病变^[7],本研究拟建立 DEN 诱发大鼠肝癌模型,观察肝经浅表络脉刺血对肝功 ALT、AST、GGT,及肿瘤标志物 AFP、SF 的影响,初步探究刺络泻血对 HCC 的预防作用及相关机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组 清洁级雄性 Wistar 大鼠 40 只,体重(200±10)g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供。许可证号:SCXK(京)2012-0001。于室温 22℃,相对湿度 45% 清洁条件下适应性喂养 7 d 后,采用随机数字表将大鼠分为 3 组,即 A. 正常对照组 10 只;B. 模型组 15 只;C. 刺血预防组 15 只,实验过程符合实验动物伦理学相关规定。

1.2 主要试剂 DEN(美国 Sigma 公司,批号:Sigma-N0756);ALT、ALP、GGT 测定试剂盒(北京环宇金科生物医学技术有限公司);10% 水合氯醛(北京中医药大学实验室配制);4% 多聚甲醛溶液(北京百诺威生物科技有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 造模方法 采用改良型 DEN 诱导的原发性肝癌大鼠模型^[8],将剂量为 50 mg/kg 的 DEN 溶于 100 mg/kg 生理盐水中,配置成浓度为 50.00 mg/kg 的溶液,每次腹腔注射前进行大鼠体重测量,以确定注射量,2 次/周,每次间隔 3~4 d(约 84 h),连续 4 周后改为 1 次/周,以保证大鼠生存率,连续 13 周诱癌成功。造模成功指征:造模大鼠出现精神萎靡,毛发黄,体重减轻,鼻腔出血、贫血、尿血、肠胀气、腹水等并发症,解剖肉眼观察肝脏形态出现质地变硬,萎缩变小,表面出现大小不一的结节;肝脏组织病理切片显示肝细胞深染,细胞核多形、肿瘤灶诱导形成。

1.3.2 干预方法 刺血预防组在造模开始同时,取后肢肝经浅表络脉刺血,75% 乙醇消毒。持针法:拇、食指持针,中指抵住针尖上方,一是控制针刺方向,二是控制针刺深度;进针法:小号三棱针直刺进针,迅速出针,以出血为度;出血量:少量,两穴总计 0.5 mL,3 次/周。模型组腹腔注射 DEN,正常组同一部位注射生理盐水,3 组予相同时间相同方法抓取固定。

1.3.3 标本采集与检测 13 周后,各组大鼠禁食、

不禁水 12 h,10% 水合氯醛麻醉,腹主动脉取血 5 mL,静置离心(4℃,3 500 r/min,10 min)后取上层血清送肝功及相关肿瘤标志物指标检测,采用 ELISA 法测定。脱颈、开腹,观察记录各组肝脏的形态、颜色、质地。取肝组织用 4% 多聚甲醛缓冲液固定 24 h,常规石蜡包埋,切片,HE 染色。

1.4 统计学分析 应用 SPSS 17.0 软件进行数据统计。所有数据均以平均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。组间差异如方差齐则采用单因素方差分析(One-Way ANOVA),两两比较用 LSD-t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义, $P < 0.01$ 为差异具有显著统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠血清肝功 ALT、ALP、GGT 比较 与正常对照组相比,模型组大鼠血清 ALT、ALP、GGT 含量显著升高,差异有统计学意义($P < 0.01$)。与模型组比较,刺血预防组大鼠血清 ALT、ALP、GGT 含量均降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 各组大鼠血清肝功指标比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	ALT (U/mL)	ALP (金氏单位/100 mL)	GGT (U/mL)
正常对照组	8	22.58±7.90	1.70±0.57	14.39±5.18
模型组	8	39.87±5.75**	2.80±0.42**	32.29±13.36*
刺血预防组	8	28.59±7.95 $\Delta\Delta$	2.25±0.24 Δ	23.16±4.83 Δ

注:与正常对照组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

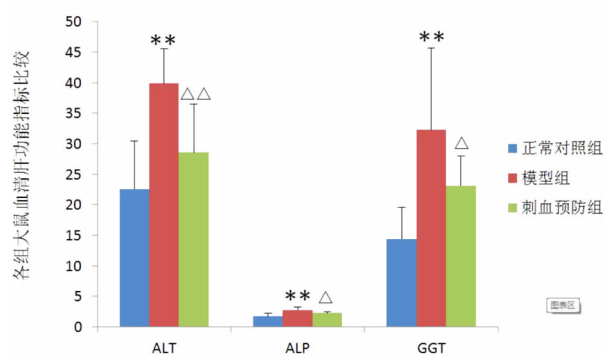


图 1 各组大鼠血清肝功指标比较

2.2 各组大鼠血清肿瘤标志物 AFP、SF 比较 与正常对照组相比,模型组大鼠血清 AFP、SF 含量显著升高,差异有统计学意义($P < 0.01$)。与模型组比较,刺血预防组大鼠血清 AFP、SF 含量均降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

3 讨论

中医以辨证论治为核心,是目前治疗 HCC 的重要方法之一,将其与手术、放、化疗有机结合,有助于

减少放、化疗的毒副反应,稳定病情,提高生存质量。此外,中医提倡未病先防,既病防变,其重在调体,在癌症的预防和抗复发方面优势亦显著。HCC 可归属于中医“胁痛、积聚、鼓胀”等范畴,其基本病理变化为正气不足,气滞、血瘀、痰结、湿聚、热毒等相互胶着,日久渐积成块。而“久病必瘀”,瘀血贯穿肝癌发病始终,本虚标实是其基本病机^[9]。张从正认为:“出血者,乃所以养血也”,泻血即为扶正,瘀血不除,新血难生,刺血疗法可以祛瘀生新,祛邪扶正,正好针对原发性肝癌的病因病机。

表2 各组大鼠血清肿瘤标志物指标比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	AFP(U/L)	SF($\mu\text{g/L}$)
正常对照组	8	23.63 $\pm$ 6.80	59.52 $\pm$ 15.48
模型组	8	42.38 $\pm$ 13.73 **	106.09 $\pm$ 29.78 **
刺血预防组	8	30.48 $\pm$ 7.37 Δ	79.55 $\pm$ 17.43 Δ

注:与正常对照组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

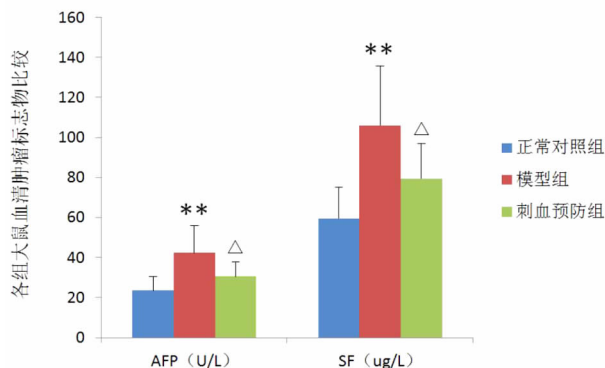


图2 各组大鼠血清肿瘤标志物指标比较

按照世界卫生组织关于疾病和有关健康问题的国际统计分类(ICD10)对疾病的分类,发现刺血疗法适宜病种共涉及18大类系统,262个病种。其中包括“癥瘕”“积聚”,而原发性肝癌属于中医学“癥瘕”“积聚”范畴,所以可以认为是刺血疗法的适应证之一。刺血治疗肿瘤病,早在《黄帝内经》年代就有记载,《灵枢·九针论》曰:“八风之客于经络之中,为瘤病者也,故为之治针,必铕其身而铕其末,令可以泻热出血而瘤病竭”。

AFP、SF等是当前HCC实验室诊断常用指标^[10-11],AFP被认为是HCC诊断和预后的首选标志物^[12]。SF为第二肝癌肿瘤标志物,特别是对AFP阴性者^[13]。SF在肝脏合成,肝病肝细胞受损,清除SF障碍,或癌细胞合成SF量增加,均可导致血清SF高浓度表达^[14-15]。本研究结果显示,相较正常对照组,模型组与预防组大鼠AFP、SF含量均有不同程度升高,说明两组大鼠肝脏都存在不同程度的恶变;

但与模型组比较,刺血预防组AFP、SF水平均显著降低,且差异有统计学意义,提示刺络泻血在一定程度上起到了有效减轻并预防肝癌发生发展的作用,其机制可能与降低AFP、SF含量,祛瘀生新,促使癌毒及代谢产物排泄有关。ALT、ALP、GGT最能反映肝细胞受损程度,是目前最常用的肝功能指标,血清GGT主要来源于肝脏,具有癌胚蛋白的性质,与AFP联合检测对HCC早期诊断具有较高的准确性^[16-17]。本实验采用几项指标联合检测方法,可有效提高诊断灵敏度,减少单一检测漏诊率。

现代医学研究表明,刺络放血可使瘀滞在局部的病理性产物得以清除,改善微循环障碍,保护肝脏,提高机体免疫力,缓解疼痛^[18]。田叶红^[19]等采用刺血拔罐治疗癌性不全性肠梗阻21例,有效率达71.4%。本研究结果也显示刺络泻血疗法可使侵入机体的毒邪随血排出,通过祛瘀生新,理血调气,调节脏腑功能,激发机体免疫力,从而抑制毒邪的扩展与再生,一定程度上降低肿瘤标志物相关指标,保护肝脏,对HCC发生发展起到预防并延缓的作用。刺络泻血疗法是一种天然针刺疗法,因其“简、便、廉、验”的特点而应用于临床各个系统百余种疾病的防治和保健^[20-22],值得进一步继承和发展,但刺络泻血疗法的操作方法缺乏统一规范,其作用机理仍待深入探讨。

参考文献

- [1] 张永琴,韦艾凌.原发性肝癌病机探讨[J].广西中医药,2014,37(3):58-59.
- [2] 贾文睿,侯中伟,睢明河.针灸防治原发性肝癌的研究进展[J].针灸临床杂志,2014,30(2):71-74.
- [3] 赖敏,王淑美,张文亮,等.电针对Walker-256模型大鼠肿瘤生长和免疫功能的影响[J].中国针灸,2008,28(8):607-609.
- [4] 敖有光,刘东霞,杨运宽,等.艾灸对HCC癌前病变大鼠细胞周期调控基因cyclinD1、cdk4影响的实验研究[J].内蒙古中医药,2007,26(1):46-49.
- [5] 刘宏.针灸联合穴位注射缓解原发性肝癌疼痛临床观察[J].河北中医,2010,32(9):1384-1385.
- [6] 田年秀,魏珂,梁宇喃,等.刺络泻血疗法对肝纤维化大鼠HA、LN影响的研究[J].北京中医药,2015,34(5):409-411.
- [7] 黄月华,曾文铤,杨华礼.肝纤维化与原发性肝癌关系的临床探讨[J].实用医学杂志,2005,21(1):53-54.
- [8] 周陈杰,宫绪萌,蔡理,等.二乙基亚硝胺诱发大鼠肝癌过程中肝脏胶原的动态观察[J].第二军医大学学报,2014,35(6):626-630.
- [9] 任凤梅,黄龙军.解毒法抗肝癌的理论探讨[J].中华中医药杂志,2014,29(4):1187-1189.
- [10] 于卉,陶华林.肝癌实验室诊断的研究进展[J].泸州医学院学报,2013,36(3):303-305.
- [11] 赵文革,李美玉,闫兆平.原发性肝癌实验室检查进展[J].中国医疗前沿(上半月),2010,5(17):17-20.
- [12] 张效本,阮秀花.4种肿瘤标志物联合检测对AFP阴性肝癌诊断

- 的互补作用[J]. 现代中西医结合杂志, 2011, 20(6): 660-662.
- [13] 许成新, 褚邦勇, 徐玖飞, 等. 甲胎蛋白、甲胎蛋白异质体、铁蛋白和肿瘤相关因子联合检测在原发性肝癌诊断中的价值[J]. 中国卫生检验杂志, 2012, 22(2): 308-311.
- [14] Lamy PJ, Durigova A. Iron homeostasis and anemia markers in early breast cancer [J]. Clin Chim Acta, 2014, 434(7): 34-40.
- [15] Armand P, Kim HT, Virtanen JM, et al. Iron overload in allogeneic hematopoietic cell transplantation outcome: a meta-analysis [J]. Biol Blood Marrow Transplant, 2014, 20(8): 1248-1251.
- [16] 鲁亮, 李杭, 张汉群, 等. 原发性肝癌中多项肿瘤标志物检测的临床意义[J]. 现代肿瘤医学, 2014, 22(3): 601-603.
- [17] 柳杨, 侯中伟, 卢峻, 等. 麦粒灸“肝俞”对原发性肝癌癌前病变

- 模型大鼠肝功能的影响[J]. 中国针灸, 2015, 35(7): 702-706.
- [18] 丛莘, 金庆文, 谢芳. 刺络放血法治疗膝关节炎症理论基础探讨[J]. 中国中医药信息杂志, 2007, 14(4): 90-91.
- [19] 田叶红, 张巧丽, 刘为易, 等. 刺血拔罐治疗癌性不全性肠梗阻 21 例[J]. 中医药导报, 2014, 20(3): 57-58.
- [20] 陈红. 近十年来刺血疗法的临床与实验研究发展状况[J]. 中国民间疗法, 2010, 18(5): 76-78.
- [21] 马庆宇, 赵慧玲. 刺血疗法作用机理的现代研究概况及展望[J]. 国际中医中药杂志, 2009, 31(2): 179-181.
- [22] 包哈申. 放血疗法治疗高血脂症的临床观察[J]. 针灸临床杂志, 2002, 18(11): 33-35.

(2015-12-05 收稿 责任编辑: 张文婷)

世界中医药学会联合会中药化学专业委员会第五届学术年会暨蒙医药论坛(2016·内蒙古通辽)会议通知

由世界中医药学会联合会主办, 内蒙古民族大学、黑龙江中医药大学承办“世界中医药学会联合会中药化学专业委员会第五届学术年会暨蒙医药论坛(2016·内蒙古通辽)”将于 2016 年 7 月 20-22 日在中国内蒙古通辽市举行, 敬请准时出席。具体事项通知如下:

一、会议主题

主题: 中药化学与传统医药的进步与发展

二、会议时间

报道日期: 2016 年 7 月 20 日; 会议日期: 2016 年 7 月 21-22 日。

三、会议地点

会议及报到地点: 内蒙古通辽市碧桂园凤凰大酒店

1、内蒙古通辽市碧桂园凤凰大酒店: 哲里木大桥以北 100 米(近建国北路、市政府), 368 元/标准间(含早餐), 18604758227(毕经理)。

2、盛世祥龙酒店(蒙满文化主题酒店-含蒙古包房间): 和平路北段非常道对面 0475-8611111, 288 元/标间, 368 元/标间(含早餐)。

3、通辽农牧人禾大酒店: 科尔沁区建国路北段 2349 号, 电话: 0475-8588888, 248 元/标间(含早餐)。

四、参会人员

1、中药化学专业委员会全体成员(因本次年会将同时举行本专业委员会理事会换届选举, 要求担任本会理事及以上的成员务必参会)

2、国内外从事中医药(民族医药)或天然药物基础研究与应用研究的科技工作者

3、部分特邀嘉宾(主办单位根据活动需要确定)

五、参会方法

拟报名参加会议的专家请于 2016 年 6 月 30 日前将报名表(附件)和参会论文(均为电子版)提交到会议承办单位指定电子邮箱。

六、征文内容与要求

征文内容: ①中药(民族药)化学在中医药(传统医药)基本理论研究方面的应用; ②中药(民族药)及天然药物药效

物质基础研究; ③中药(民族药)化学在创新药物研发中的应用; ④中药(民族药)及天然药物化学成分的生物活性研究; ⑤中药(民族药)化学与临床药学研究; ⑥中药(民族药)及天然药物化学成分生物合成研究; ⑦中药(民族药)及天然药物质量评价研究; ⑧中药(民族药)及天然药物化学成分结构修饰和改造研究; ⑨中药(民族药)及天然药物化学成分的生物合成研究; ⑩中药(民族药)及天然药物化学成分的生物转化研究。

论文要求: 论文可用中文或英文书写, 必须未公开发表, 字数不超过 3000 字, 题目、摘要中英文对照, 摘要不超过 200 字, 注明作者姓名、工作单位、通讯地址、邮编及第一作者的电子信箱和联系电话。论文格式为 word 文本, 标题黑体 3 号字, 内容宋体 5 号字。稿件直接发送至 hljzhongyaoxue@163.com。参会论文将评出优秀论文一、二、三等奖(不超过收录文章的 15%), 并颁发世界中医药学会联合会优秀论文证书, 拟推荐在《世界中医药》杂志发表。

七、参会费用

会务费: 1200 元/人(含论文集、通讯录), 在读研究生 600 元, 食宿会务组统一安排, 费用自理。特邀嘉宾的食宿及会务费由大会组委会承担。会议不设接站, 请参会老师自行前往会务酒店大堂报到。

八、联系方式

世界中医药学会联合会中药化学专业委员会第五届学术年会组委会

电话/传真: 0475-8314242; 0475-8314294

联系人: 会务、住宿、接待请联系内蒙古民族大学联络老师, 征文请联系黑龙江中医药大学联络老师。白梅荣(内蒙古民族大学), 手机: 15804758404; 包晓华(内蒙古民族大学), 手机: 15048551609; 拉喜那木吉拉(内蒙古民族大学), 手机: 13789710541; 阎雪莹(黑龙江中医药大学), 手机: 13199532680。报名邮箱: hljzhongyaoxue@163.com。

二零一六年五月十日
世界中医药学会联合会