

不同中医治法对 DEN 诱发大鼠肝癌作用的比较研究

方肇勤* 管冬元* 梁尚华* 秦红友* 李海燕*

摘要 目的:研究不同中医治法对二乙基亚硝胺(DEN)诱发大鼠肝癌作用的差异,并探讨其机理。方法:以 DEN 诱发大鼠肝癌为动物模型,观察不同治法对大鼠的一般状况及肝组织病理、甲胎蛋白(AFP)免疫组化等相关指标的变化。结果:DEN 成功诱发大鼠肝癌形成,不同中医治法优于西药化疗,其中全方组、活血组综合疗效较好,而清热组对改善肝组织病理及降低肝组织 AFP 含量最明显,健脾组疗效较差。结论:清热解毒法尽管在肝癌局部治疗方面呈现出显著的特点,但多种治法组合后,其综合疗效要优于单一治法,这可能与原发性肝癌病机的复杂性有关。

主题词 肝肿瘤/中医药疗法 中医治法/方法

原发性肝癌是我国最常见的恶性肿瘤之一,具有起病隐匿、病程短、进展快、恶性程度高、疗效差、患者生存期短等特点,严重危害我国人民的身心健康。近几十年来,我国在肝癌的病因、病理、诊断与治疗等方面的研究都取得了突出的成绩。肝癌早期治疗由单一切除模式变为切除、栓塞、放疗、化疗、免疫基因治疗等多种模式^[1,2]。虽然通常认为手术切除是最好的治疗方式,但由于原发性肝癌起病隐匿,待确诊时多数已属中晚期,丧失手术机会,各种治疗方法均有很大的局限性。因此在如何控制癌症的发展,提高患者的生存质量,延长患者的生存期等方面有着很大的现实意义。我国医务工作者运用中医药在此方面做了大量的研究与临床实践,取得了可喜的成绩,并总结了各种行之有效的治则治法^[3]。但这些研究大多停留在临床资料的观察上,缺乏对动物实验的详细观察。我们对国内中医药治疗肝癌的文献报道进行了检索分析,发现治法主要集中在清热解毒、活血化瘀、健脾理气等 3 方面,有单独运用或偏重于某一治法,也有数法合用,取得了不同的疗效^[4]。本课题采用二乙基亚硝胺(DEN)诱发大鼠肝癌模型,探讨不同治法的作用机制及差异,给临床选择不同治法提供较为详细的实验资料。

1 材料与方法

1.1 动物造模及分组:Wistar 大鼠,雄性,体重 100~120g,自由饮用 60~80ppm DEN 水溶液,直到 24 周末实验结束。将 70 只大鼠随机分为 7 组,每组 10 只,

分别为正常组、模型组、西药组、全方组、清热组、活血组、健脾组。西药组加用西药 FT-207;全方组加用清热解毒、活血健脾理气中药,全方由清热、活血、健脾方合并而成;清热组用清热解毒中药,清热方由半枝莲、白花蛇舌草等组成;活血组用活血化瘀中药,活血方由桃仁、丹参等组成;健脾组用健脾理气中药,健脾方由黄芪、白术等组成。

1.2 中药的制备与给药方法:中药水煎剂按 2:3 比例兑入乙醇,4℃静置 48h,过滤,浓缩至 1ml 含 2g 生药,4℃存放。FT-207 用双蒸水溶解,4℃存放。各组药物均于下午 19 时加入饮水中给药。剂量均为成人单位体重的 10 倍量。

1.3 观察项目:包括大鼠一般情况观察,肝脏病理形态学观察,肝组织甲胎蛋白(AFP)免疫组织化学(ABC 法)的半定量分析。

1.4 统计方法:生存率采用两时点生存率 U 检验,其他计数资料均采用 F 检验。

2 结果

2.1 各组大鼠生存率比较:除全方组、模型组、活血组分别于第 4、8 周时各由于意外原因死亡 1 只大鼠外,其余均为有效动物例数。实验结束时,各组大鼠的死亡数及生存率见表 1。模型组于第 19、21、23、24 周各因腹腔内出血死亡 1 只;西药组第 21 周因恶液质死亡 1 只,第 23、24 周时各因腹腔内出血死亡 1 只;全方组于第 23 周腹腔内出血死亡 1 只;清热组于第 23、24 周各因腹腔内出血死亡 1 只;活血组于第 24 周时因腹腔内出血死亡 1 只;健脾组于第 22、23 周分别因腹腔内出血死亡 2 只、1 只。各组生存率与模型组比较,正常组、全方组、活血组均存在显著差异($P<0.05$ 或 $P<0.01$);而各组与正常组比较,模型组、西药组、清热组、健脾组呈显著差异($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

表 1 各组大鼠死亡数及生存率比较

组别	鼠数	死亡数	生存率(%)
正常组	10	0	100.0
模型组	9	4	55.6
西药组	10	3	70.0
全方组	9	1	88.9
清热组	10	2	80.0
活血组	9	1	88.9
健脾组	10	3	70.0

基金项目:国家中医药管理局科研基金资助项目(97Z014)

* 上海中医药大学基础医学院,上海市零陵路 530 号(200032)

收稿日期:2001-06-02

表 2 不同时期正常与造模大鼠体重变化比较(体重 g, 差异率%)

组别	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24(周)
正常组	110	168	200	232	275	288	291	310	336	345	358	367	382
造模组	110	153	177	212	247	256	257	262	274	277	262	256	250
差异率	0	9.8	12.9	9.4	11.0	12.5	12.1	18.2	22.3	24.3	36.6	43.3	52.8

差异率=(正常大鼠平均体重-造模大鼠平均体重)/造模大鼠平均体重×100%

表 3 各组大鼠治疗前后体重变化比较(g, $\bar{x} \pm s$)

组别	18	19	20	21	22	23	24(周)
正常组	336±25	345±26	351±26	358±28	364±28	367±29	382±28
模型组	277±20*	268±20*	260±20*	262±23*	261±25*	256±25*	250±26*
西药组	277±21*	255±22*	236±21*	244±28*	249±28*	241±28*	239±30*
全方组	277±23*	269±23*	281±24*	285±26*	281±26*	278±27*	278±28*
清热组	277±20*	274±22*	275±21*	278±16*	270±16*	265±17*	273±16*
活血组	277±11*	286±12*	291±11*	282±15*	274±15*	275±15*	279±13*
健脾组	277±21*	277±23*	277±24*	278±26*	270±27*	270±28*	277±31*

与正常组比较, * $P < 0.01$

表 4 各组大鼠肝重及肝重/体重变化比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	体重(g)	肝重(g)	肝重/体重(%)
正常组	10	382±28.9	11.2±1.44	2.93±0.26
模型组	5	250±26.5	38.0±9.15 [△]	15.51±5.08 [△]
西药组	7	239±30.0	34.5±7.95 [△]	14.30±2.75 [△]
全方组	8	278±28.3	28.6±6.12 [△]	10.29±1.98 [△]
清热组	8	273±16.1	30.7±5.95 [△]	11.36±2.87 [△]
活血组	8	279±13.8	29.1±7.74 [△]	10.44±2.84 [△]
健脾组	7	257±31.9	33.1±12.35 [△]	12.95±4.69 [△]

与正常组比较, $\Delta P < 0.01$; 与模型组比较, * $P < 0.05$; 与西药组比较, $\Delta P < 0.05$

表 5 各组大鼠肝组织 AFP 阳性细胞数变化比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	肝组织 AFP 阳性细胞数(个, 400 倍视野)
模型组	5	112±21.6
西药组	5	93±12.8
全方组	5	80±11.7*
清热组	5	76±12.5*
活血组	5	90±13.8
健脾组	5	96±8.1

与模型组比较, * $P < 0.05$

2.2 不同时期正常与造模大鼠体重变化比较:由表 2 可见,饮用 80ppm DEN 水溶液大鼠的体重在第 2 周时与正常组出现差异,到第 4 周时差异明显,即改用 60ppm DEN 水溶液造模,6~8 周两者之间体重的差异有所缩小,但从第 8 周开始又逐渐增大,到第 18 周,两组间的差异非常明显,18~24 周两者的体重趋势呈背离状态。

2.3 各组大鼠治疗前后体重变化比较:由表 3 可见,经 DEN 造模后各组大鼠体重明显低于正常组($P < 0.01$);模型组随着造模时间的延长,体重呈现出不断下降趋势,西药组在用 FT-207 两周内下降明显,消瘦、毛耸、食量减少,因此不得不减少剂量至成人单位

千克体重的 5 倍量;而经中药治疗后全方组、清热组、活血组体重基本停止下降,相比之下,以健脾组最差。

2.4 各组大鼠肝重、肝重/体重变化比较:由表 4 可见,各饮用 DEN 水溶液大鼠肝重、肝重/体重明显高于正常组($P < 0.01$),其中全方组的肝重、肝重/体重较模型组、西药组显著降低,活血组的肝重/体重较模型组、西药组显著降低(P 均 < 0.05)。

2.5 各组大鼠肝脏病理改变比较:正常组大鼠肝脏外观正常,表面无结节。模型组肝脏肿大,表面布满大小不一的灰白结节,伴出血斑点,光镜下呈典型的柱状及腺管样癌巢结构,且周围组织肝细胞异型性明显,伴癌细胞浸润。5 个用药组肝脏外观及病理观察与模型组接近,在各组 5 个肝组织切片中,全方组有 1 例、清热组有 2 例明显优于模型组,肝脏体重明显小于模型组,表面灰白结节少而小,无出血斑点;光镜下,细胞排列有序,细胞核大小、规则一致,核浆比例基本正常,病理学有丝分裂少见,癌巢周围组织肝细胞异型性不明显,无癌细胞浸润。同时西药组 5 个切片中有 1 例明显表现大量肝细胞坏死、纤维组织增生为特征的肝萎缩病理形态。

2.6 各组大鼠肝组织 AFP 变化比较:正常组大鼠肝组织 AFP 免疫组化染色呈阴性反应,模型组大鼠肝细胞大多数呈强阳性反应。见表 5。各用药组阳性细胞数均有一定程度的减少,尤其是癌巢周围组织,与模型组比较,全方组与清热组呈显著降低($P < 0.05$),以清热组最低;各用药组间无明显差异,但全方组、清热组有下降趋势。

3 讨论

DEN 是一种很强的化学毒剂,作用的靶器官主要是肝脏,其所诱发的大鼠肝癌与人肝癌发生过程相似,

常用于肝癌动物模型的制备。我们考虑动物在不同的月龄、体重、性别、营养状况等生理条件下肿瘤发生率差异较大,选用 100~120g Wistar 雄性大鼠自由饮用 60~80ppm DEN 水溶液来诱发大鼠肝癌,此法操作简单,癌发生率高,且具有准确、均匀、快速、再现性好等特点。但可能是由于经 6~9 月高温季节,大鼠的饮水量大,致使每天摄入 DEN 量较大,引起癌变较强烈,以致难以有效呈现不同治法之间的差异。有鉴于此,当用自由饮水动物造模时,应该考虑到气温、时间等因素,制定出较为合理的 DEN 用药剂量与周期。

本实验初步表明,无论是清热解毒法、活血化瘀法,还是健脾理气法、西药化疗,在肝癌的治疗上均取得了一定的疗效,各中药治法均优于西药化疗。其中清热解毒法在肝癌局部治疗方面是最有效的,尤其体现在对肝脏病理中癌细胞的恶性程度的改变及降低肝组织中 AFP 的含量等方面,但该组大鼠肝脏局部情况的好转与大鼠生存质量及生存率下降的结果不一致,其机制可能是该治法过度强调“癌毒”的病机而忽视了苦寒致虚、致滞的病机。

从我们的实验结果来看,活血化瘀的综合疗效要优于清热解毒、健脾理气及西药化疗等治法,这说明活血化瘀在治疗原发性肝癌方面具有一定的现实意义,也印证了中医对肿瘤以瘀血为主要病机的认识。但在临床上,有些医家^[5]对活血化瘀法在肝癌治疗中的运用,颇有忌讳之感,认为有加重出血的作用。而肝癌的出血往往与瘀血阻络、热毒灼络、脾虚失统有关。在我们的实验中,选用以活血化瘀为主,活血而不破血,活血兼具清热、健脾之功的药物为主药,如丹参、桃仁等,结果表明,与模型组相比,活血组大鼠腹腔出血死亡数明显降低,大鼠肝脏表面出血斑点也明显好转。同时活血化瘀可减少邪毒的进一步积聚,恢复机体对癌肿的抗病能力,这可能是我们实验采用活血化瘀法取得较好效果的原因。

健脾理气法可提高机体的免疫功能,有使肿瘤生长减慢、瘤体缩小、症状改善、生长期延长的作用^[7]。我们的实验表明,如果不顾及肝癌形成过程中“瘀”、“毒”的病机,其效果并不理想。诚然,在任何肿瘤中都存在本虚的一面,但在肝癌的发生、发展过程中,由于癌实质生长迅速,破坏性强烈,既易阻塞气机,又易损及周边组织器官,摧毁机体免疫功能,导致局部或全身感染,因此更多地表现胀、痛、瘀血、梗阻等邪实的证候特点,其邪正对比关系的总体倾向是实多虚少。即使在正气虚极的晚期,邪实的一面也仍然突出地存在。临床也常见肝癌病人纳差、腹胀、神疲、乏力、恶心、呕吐、腹

泻、消瘦等症状,此即所谓“肝木克脾土”,这些症状并非单纯机能低下的脾虚证候,而是代谢紊乱的瘀毒伴脾虚证候,故治疗上单纯以健脾理气法很难缓解肝癌的脾虚证候而达到治疗目的,针对肝癌的病因病机还必须配伍清热解毒、活血化瘀等祛邪之法。

全方组数法并用,兼具清热解毒、活血化瘀、健脾理气之功,尽管某些局部效果没有单用清热解毒法好,但它照顾到肝癌“虚”、“瘀”、“毒”的病机特点,故其综合疗效优于清热组与活血组,这充分体现了中医的整体观,与现代许多医家^[8~10]提出的综合治疗肿瘤的观点相一致。同时本实验在一定程度上反映出中药复方整体综合效应与相对特异性的统一,几种不同中医治法组合后的作用是极其复杂的,单一治法在某些方面呈现出显著的特点,而合用后该作用却有所减弱,这可能是复方组合的优势,减轻了某单一治法可能出现的不良反应,同时也提示了肿瘤病机的复杂性。

参考文献

- 1 周国锋,胡方泰.肝癌的中西医结合介入治疗.中西医结合肝病杂志 1998,8(1):58-59.
- 2 汤钊猷.中国肝癌研究现状.中西医结合肝病杂志,1998,8(1):60-63.
- 3 齐元富.肝癌的常用治法.黑龙江中医药,1995,(2):27-30.
- 4 管冬元,方肇勤.原发性肝癌的中医药证治研究概况.南京中医药大学学报,1999,15(2):27-128.
- 5 Argus MF, Hoch - Ligeti C. Comparative study of the carcinogenic activity of nitrosamines. J Nat Cancer Inst, 1961, 27: 695.
- 6 郁仁存,姜廷良,于尔辛.肿瘤研究.上海:上海科学技术出版社,1991:106.
- 7 于尔辛.健脾理气法治疗原发性肝癌临床机理的初步研究.中医杂志 1987,(7):28-30.
- 8 周宜强,行青春.中医药治疗原发性肝癌的临床思路和方法.河南中医,1995,15(3):164-165.
- 9 宋兴.中医治癌问题反思.新中医,1997,29(1):28-30.
- 10 李致重.论中医防治肿瘤的思路与方法.湖南中医药导报,1998,4(1):4-5.

北京医海林音像书店售医学光盘

神经系统阳性体征 48 元,脊柱与四肢体格检查 48 元,心脏体格检查 48 元,骨关节疾病的影像诊断 48 元,中枢神经系统疾病的影像诊断 48 元,肝、胆、胰疾病的影像学诊断 48 元,外伤急救基本技术 48 元,老年糖尿病的诊治 48 元,老年糖尿病的防治 48 元,导尿术与灌肠术 48 元,关节炎的康复 48 元,皮肤良性肿瘤的诊治 48 元,前列腺增生的诊治 48 元,心血管活动的神经体液调节 48 元,有机磷酸酯类中毒及抢救 48 元,急性脑血管病的诊治 48 元,神经系统解剖(脑神经)48 元,神经系统解剖(中枢神经)48 元,运动系统解剖(肌肉)48 元,运动系统解剖(骨骼)48 元,淋巴系统解剖 48 元

邮购光盘 3 盘以上九折,6 盘以上八五折优惠。详细目录,函索即寄。欲购者汇款地址:北京东直门内北新仓 18 号中医杂志社北京医海林音像书店,收款人:曹阿京。邮编:100700。电话:(010)64035632。(广告编号:200207-18)