

## 方药研究

# 清肝化瘀方对大鼠肝癌前病变模型 Notch 信号系统的影响

杨志云<sup>1</sup> 姚树坤<sup>2</sup> 殷 飞<sup>2</sup> 修贺明<sup>3</sup>

**摘要** 目的:探讨清肝化瘀方对大鼠肝癌前病变模型 Notch 信号系统的影响。方法:用二乙基亚硝胺(DEN)建立 Solt-Farber 二步大鼠肝癌前病变的短期实验模型,应用不同浓度的清肝化瘀方进行干预,酶组织化学方法检测三磷酸腺苷酶(ATP 酶)的表达变化,免疫组织化学方法检测白蛋白(ALB)、Notch<sup>1</sup>、Notch<sup>1</sup> 配体 Jagged 的表达变化。结果:与模型组比较,清肝化瘀方等效剂量、大剂量组 ATP 酶、ALB 表达水平显著升高( $P < 0.01$ ),Notch<sup>1</sup>、Jagged 表达水平显著降低( $P < 0.01$ )。结论:清肝化瘀方可有效阻断大鼠肝癌前病变,其作用机理可能与调节 Notch 信号通路有关。

**主题词** 肝肿瘤,实验性/中医药疗法 癌前状态/中医药疗法 @ Notch 信号

**Effect of Qinggan Huayu Peroral Solution on Notch Signaling System of Hepatic Precancerous Lesion in Rats**

Yang Zhiyun<sup>1</sup>, Yao Shukun<sup>2</sup>, Yin Fei<sup>2</sup>, et al.

(1. Doctor-degree Student of Hebei Medical University, 050017; 2. The Fourth Hospital of Hebei Medical University)

**Objective:** To investigate the effect of Qinggan Huayu Peroral Solution on Notch signaling system of hepatic precancerous lesion in rats. **Methods:** A Solt-Farber two-step test model of prehepatocarcinoma in rat was established by diethylnitrosamine. Qinggan Huayu Peroral Solution in different concentration was given to investigate the expression of ATP enzyme in different groups by enzyme-histochemistry and the expression of ALB, Notch<sup>1</sup>, Jagged by immunohistochemistry. **Results:** Compared with the model group levels of ATP enzyme and ALB were significantly increased ( $P < 0.01$ ), and the levels of Notch<sup>1</sup> and Jagged were significantly decreased ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** Qinggan Huayu Peroral Solution can prevent hepatic precancerous lesion rats, which is related to the regulating effect on Notch signaling system.

**Key Words** Hepatic tumor, experimental/TCM therapy; Pre-carcinoma state/TCM therapy; @ Notch signaling

肝癌前病变是介于肝硬化与肝癌之间的一种病理状态,主要表现为肝组织非典型增生,是肝硬化发展到肝癌的必经过程。其发生是一个复杂而相对缓慢的过程,符合多靶点、多步骤癌变理论,目前这些机理尚难解释明晰<sup>[1]</sup>。本实验应用二乙基亚硝胺(DEN)建立 Solt-Farber 二步大鼠肝癌前病变模型,探讨肝癌前病变过程中 Notch 信号分子的变化以及清肝化瘀方药阻断肝癌前病变的作用机理。

## 1 材料

1.1 动物:SPF 级雄性 6 周龄 SD 大鼠 70 只,体重(120±20)g,由河北医科大学实验动物中心提供。

1.2 药物:清肝化瘀方由苦参、白花蛇舌草、半枝莲、醋郁金等 9 味中药组成,由河北医科大学第四医院制剂中心经水煎、醇沉及浓缩制成。制法如下:原方所有药物先加水浸泡 2 小时,煎 2 次,每次 1 小时,合并滤

液,浓缩约 8000ml,待凉后,加入 95%乙醇,使药液含乙醇浓度 65%左右,静置 48 小时,用 8 层纱布过滤除去沉淀,回收乙醇,浓缩 6000ml,用容器接出 1000ml 分装,剩余药浓缩至 2500ml,再用 8 层纱布过滤,装入 100ml 灭菌瓶,灭菌要求 105℃,0.03mPa,时间 30 秒,贴标签,储存。等效剂量组 1ml 相当于生药 1g,大剂量组 1ml 相当于生药 1.6g。

1.3 试剂: DEN、二乙酰氨基苄(2-AAF)购自 Sigma 公司;腺嘌呤核苷三磷酸二钠盐购自上海生物工程有 限公司;兔抗大鼠白蛋白(ALB) IgG、Notch<sup>1</sup> IgG,山羊抗大鼠 Jagged IgG 购自 Santa Cruz 公司;SP、PV-6001 免疫组化染色试剂盒、DAB 显色试剂盒均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

## 2 方法

2.1 动物分组及处理:70 只大鼠按随机区组设计分为 4 组,模型组、清肝化瘀方等效剂量组(等效剂量组)、清肝化瘀方大剂量组(大剂量组)每组 20 只,正常对照组 10 只。采用 Solt-Farber 法<sup>[2]</sup>造模。模型组、等效剂量组、大剂量组大鼠,一次性腹腔注射 200mg/kg DEN 作为启动剂,普通饲料喂养 2 周后进入选择性促

基金项目:河北省自然科学基金资助项目(C2006000852)

1 河北医科大学 2004 级博士研究生,石家庄市中山路 361 号(050017)

2 河北医科大学第四医院消化内科 Academic Journal Electronic 2006.12.033

3 白求恩国际和平医院中心实验室

收稿日期:2006-04-26;修回日期:2006-09-10

进程序,即饲以含 0.015% 2-AAF 的饲料,第 3 周末按经典术式行 2/3 肝大部分切除术,此后继续饲以含 0.015% 2-AAF 的饲料 4 周,7 周末实验结束。等效剂量组、大剂量组于造模同时开始给予清肝化瘀方灌胃,等效剂量组按提取药物 4.35g/kg 灌胃,大剂量组按提取药物 21.76g/kg 灌胃,两组均于每日上午 8 时与下午 5 时分别灌胃两次。切肝后 3 天暂停给药,此后继续给药至实验结束。正常对照组常规饲养,并以等量生理盐水灌胃。

2.2 肝组织取材及处理:分别于第 3、5、7 周末,禁食 24 小时后麻醉动物,迅速摘取残留肝脏,称重,在每只大鼠肝右前叶、右后叶、尾叶相对固定部位迅速摘取肝组织,一部分组织固定于 4% 甲醛中,准备石蜡包埋,行 HE 及免疫组化染色,另一部分组织快速置 -80℃ 冰箱中准备冰冻切片,酶组织化学染色。

2.3 检测方法:常规方法行 HE 染色。按文献[3]方法检测三磷酸腺苷酶(ATP 酶)的表达变化。采用 PV 二步法检测 ALB、Notch1 的表达变化,采用 SP 法检测 Jagged 的表达变化,均按试剂盒说明操作。

2.4 统计学方法:染色结果采取半定量分析,高倍镜下每张切片随机选择 5 个视野,应用 MPIAS-500 高清晰度彩色图文分析系统对 ALB、Notch1、Jagged 免疫组化染色平均吸光度值进行定量分析。应用 SPSS 10.0 统计软件中的 ANOVA 程序进行单因素方差分析,组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$  表示差异有显著性意义。

### 3 结果

3.1 各组大鼠肝组织 HE 染色结果:模型组 3 周内肝小叶结构基本完整,可见散在坏死灶和炎性细胞浸润。第 4~5 周有纤维组织增生和假小叶形成,有肝细胞再生结节及卵圆细胞为主的小细胞增生灶出现。第 6~7 周假小叶形成更明显,肝细胞核浆比失调,大量卵圆细胞深入肝小叶中,破坏邻近的肝板。清肝化瘀方等效剂量组、大剂量组均有不同程度的改善。

3.2 各组大鼠肝组织 ATP 酶表达变化:正常对照组大鼠肝组织呈均匀一致弥漫分布的树枝状深棕色阳性反应,模型组可见汇管区或中央静脉旁阴性反应灶,呈圆形或椭圆形,高倍镜下观察为肝细胞的分泌胆管着色,呈线状。清肝化瘀方等效剂量组、大剂量组病灶数量较少,病变范围较小,以大剂量组更为明显。

3.3 各组大鼠肝组织 ALB、Notch1、Jagged 表达:附表示,ALB 染色阳性信号为棕黄色颗粒,定位于胞浆。正常对照组为均匀一致的胞浆阳性反应,中央静脉周围呈强阳性表达,模型组可见部分汇管区内的卵圆细胞及肝小叶中的肝细胞呈阴性反应。清肝化瘀方等效

剂量组、大剂量组的阴性反应区均明显减少( $P < 0.01$ ),以大剂量组尤为明显。正常对照组大部分肝细胞胞浆内 Notch1 呈弱阳性表达,模型组汇管区、中央静脉周围部分肝细胞及不典型增生灶内的肝细胞呈强阳性表达,清肝化瘀方等效剂量组、大剂量组的阳性信号均明显减少( $P < 0.01$ ),以大剂量组尤为明显。正常对照组肝细胞中 Jagged 普遍呈弱阳性表达,模型组中央静脉周围部分肝细胞及不典型增生灶内的肝细胞呈强阳性表达,清肝化瘀方等效剂量组、大剂量组的阳性信号均明显减少( $P < 0.01$ ),以大剂量组尤为明显。

附表 各组大鼠肝组织 ALB、Notch1、Jagged

| 表达比较(OD 值, $\bar{x} \pm s$ ) |    |                 |                 |                 |
|------------------------------|----|-----------------|-----------------|-----------------|
| 组别                           | 鼠数 | ALB             | Notch1          | Jagged          |
| 模型组                          | 6  | 0.305 ± 0.062   | 0.433 ± 0.011   | 0.382 ± 0.011   |
| 等效剂量组                        | 6  | 0.446 ± 0.081 * | 0.336 ± 0.009 * | 0.304 ± 0.010 * |
| 大剂量组                         | 6  | 0.652 ± 0.117 * | 0.291 ± 0.008 * | 0.247 ± 0.006 * |
| 正常对照组                        | 6  | 0.736 ± 0.184 * | 0.254 ± 0.007 * | 0.211 ± 0.005 * |

与模型组比较, \*  $P < 0.01$

### 4 讨论

肝癌前病变是指病理上易发生癌变的肝组织,其病理形态介于肝硬化与肝癌之间,主要表现为不典型增生。肝细胞的增生一般分为两种,一种为大细胞性增生,指肝细胞胞质丰富,核大且染色质淡,有的核表现出一定的异型性,有人称其为肝细胞的再生。而另一种增生是小细胞性的,细胞核较小,大小较一致,胞质少,这种增生被认为是癌前病变<sup>[1]</sup>。本实验采用 Solt-Farber 方法建立大鼠肝癌前病变的短期实验模型,可见到大量以小肝细胞及卵圆细胞为主的不典型增生灶,由此研究了肝癌前病变中的一些细胞表型特点,以探讨清肝化瘀方阻断肝癌前病变的作用机制。

根据其发病特点研究者多将本病归于积聚、臌胀、胁痛范围。中医学认为,其病机为脾胃受损、痰湿内生、土壅木郁、肝气不畅、气血失和,此阶段为邪实正虚,虚实夹杂。清肝化瘀方以健脾行气、利湿解毒、破瘀散结为法。ATP 酶、ALB 在成熟肝细胞上表达。本实验模拟肝癌前病变中部分肝细胞 ATP 酶、ALB 表达缺失,经清肝化瘀方药干预后,ATP 酶、ALB 表达上调,说明本方可保护肝细胞,有效阻断肝癌前病变。

Notch 信号系统是一个在生物进化过程中起重要作用的信号传导机制,通过 Notch 受体-Jagged 配体的相互作用产生旁侧抑制效应,控制细胞对各种内、外源信息的反应,从而导致细胞特异性分化,是一种影响胚胎发育、器官形成的普遍机制<sup>[5]</sup>。近年来研究证明,Notch 信号系统与肿瘤的发生关系密切,多数研究结果显示 Notch 具有促癌作用,如实验表明 Notch 在人

类 T 淋巴细胞白血病及乳腺癌患者的乳腺上皮过度表达,而另有研究提示在多发性骨髓瘤细胞<sup>[6]</sup>及前列腺癌中 Notch 表达下调<sup>[7]</sup>。由此说明,Notch 信号通路在不同组织中作用不同,在同一组织的不同发展阶段作用亦各不相同。本实验采用大鼠肝癌前病变模型观察到:(1)模型组中 Notch1、Jagged 的表达部位具有高度一致性,主要集中于中央静脉周围及非典型增生灶内的肝细胞,推测肝细胞表面可能同时携带 Notch1 受体、Jagged 配体,与相邻肝细胞之间互相传递信息。(2)模型组中 Notch1、Jagged 的表达较正常对照组显著上调,说明在大鼠肝癌前病变期 Notch 信号具有促癌作用。(3)清肝化瘀方干预后,Notch1、Jagged 表达较模型组下调,说明该药阻断肝癌前病变作用机制可能与其下调 Notch 信号系统表达有关。但该药对 Notch 信号系统下游分子的作用、其中何种有效成分

影响 Notch 信号系统表达等问题目前尚不十分清楚,有待进一步深入研究。

### 参考文献

- 1 梁英锐,丁濂,朱世能.现代肝脏病理学.天津:天津科学技术出版社,1996:182.
- 2 Solt D, Farber E. New principle for the analysis of chemical carcinogenesis. *Nature*, 1976, 263: 701~702.
- 3 贾长恩,李叔庚.实用酶组织化学.长沙:湖南科学技术出版社,1994: 152~153.
- 4 韦立新,石怀银.肝癌前病变与高分化肝癌的病理诊断与鉴别. *中华病理学杂志*, 2006, 35(2): 117~118.
- 5 Hansson EM, Lendahl U, Chapman G. Notch signaling in development and disease. *Semin Cancer Biol*, 2004, 14(5): 320~328.
- 6 Iwata M, Aways N, Graf L, et al. Human marrow stromal cells activate monocytes to secrete osteopontin, which down-regulates Notch 1 gene expression in CD34<sup>+</sup> cells. *Blood*, 2004, 103(12): 4496~4502.
- 7 Bicknell R, Harris AL. Novel angiogenic signaling pathways and vascular targets. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2004, 44: 219~238.

## 旋覆代赭汤加味辨治反流性食管炎 34 例

吴 耀 嵩\*

反流性食管炎(RE)是临床常见的胃食管功能性疾病。临床症状以胸骨后或心窝部不适、烧灼感、泛酸、嗝气或吞咽时疼痛为特征。1999~2004 年我们应用旋覆代赭汤加味辨证治疗 34 例,疗效满意。现报告如下。

### 1 临床资料

本组 68 例均为我院门诊患者。临床以胸脘痞闷,嗝气泛酸等为主症。均经胃镜确诊为反流性食管炎。随机分为两组。治疗组 34 例,男 21 例,女 13 例;年龄 20~65 岁。病程 6 个月~10 年;西药对照组 34 例,男 19 例,女 15 例;年龄 20~60 岁。病程 6 个月~9 年。两组资料经统计学处理差异无显著性意义,具有可比性( $P>0.05$ )。

诊断标准:有典型的 RE 症状,如明显烧心、反酸,胸骨后灼痛等;胃镜诊断与分级符合文献关于 RE 的诊断标准。

中医辨证分型:脾胃虚弱型:伴有胃痛隐隐、身倦乏力,大便溏薄,舌淡,苔薄白,脉弱;脾胃虚寒型:兼有冷痛不适,泛吐清水,喜食热饮,脉虚弱;肝胃不和型:伴有胸闷嗝气,遇烦恼郁怒则痛作或痛甚,脉弦;脾胃湿热型:伴有纳呆嘈杂,口干口苦,身重肢倦,小便色黄,舌苔黄腻,脉滑数;胃阴不足型:伴有口干咽燥,口渴思饮,大便干结,舌红少津或光剥无苔。

### 2 治疗方法

治疗组用旋覆代赭汤加味为主辨证加减,基本方:旋覆花(包煎)10g,赭石(先煎)15g,姜半夏 9g,党参 12g,生姜 5g,甘草 3g,大枣 5 枚,柴胡 3g,海螵蛸 15g。脾胃虚弱型:加黄芪、白术、茯苓、怀山药等健脾益气,和胃降逆;脾胃虚寒型:加干姜、桂枝、吴茱萸等温胃散寒,和胃降逆;肝胃不和型:加玉蝴蝶、紫苏

梗、郁金、佛手疏肝理气,和胃降逆;脾胃湿热型:加茵陈、苍术、佩兰、茯苓、薏苡仁等清热利湿,和胃降逆;胃阴不足型:可加玉竹、麦冬、石斛等滋阴清热,和胃降逆。吐酸甚者:可加海螵蛸以制酸。对照组用雷尼替丁 150mg,每天 2 次口服;多潘立酮 10mg,每天 3 次口服,均饭前 0.5 小时。两组均以 4 周为 1 个疗程。停药 4 周后复查胃镜。半年随访 1 次。两组患者服药期间均忌烟酒油腻食物,调畅情绪。

### 3 治疗结果

3.1 疗效标准:痊愈:临床症状完全消失,胃镜检查分级积分 0 分;有效:症状基本消失或明显好转,胃镜检查分级积分 1~2 分;无效:经 2 个疗程治疗后,所有症状无明显改善或加重,胃镜检查分级积分无变化或增加 1 分。

3.2 治疗结果:(1)两组临床疗效比较:治疗组 34 例,治愈 19 例,有效 13 例,无效 2 例,总有效率为 94.12%;对照组 34 例,治愈 15 例,有效 10 例,无效 9 例,总有效率为 73.53%。治疗组临床疗效优于对照组( $P<0.05$ )。(2)治疗组不同中医证型疗效比较:其中脾胃虚弱型 6 例,痊愈 4 例,有效 2 例,无效 0 例;脾胃虚寒型 4 例,分别为 3 例、1 例、0 例;胃阴不足型 2 例,分别为 2 例、0 例、0 例;肝胃不和型 10 例,分别为 7 例、3 例、0 例;脾胃湿热型 12 例,分别为 3 例、7 例、2 例。

### 4 讨论

旋覆代赭汤具有和胃降逆,化痰消痞之功效。现代研究表明,旋覆代赭汤能明显改善食管下段黏膜 pH 值,从而促进疾病的恢复;人参、大枣、甘草等补益中气的药物,具有调整胃肠功能,增强胃肠平滑肌张力及免疫功能的作用。笔者在旋覆代赭汤的基础上辨证治疗,方中以旋覆花、赭石能镇肝和胃,降逆化痰为主药,配以半夏、生姜辛温而散,降逆化痰,党参、甘草、大枣健脾益胃。少佐柴胡疏肝理气,海螵蛸制酸和胃;诸药合用共奏健脾理气,和胃降逆之功效。

\* 福建省连江县中医院内科,连江县凤城 816 北路 21 号 (350500)

收稿日期:2006-07-11