

半夏泻心汤对 MNNG 诱导大鼠前胃鳞癌的防治作用

孔祥茹 李棣华 杜潇 高望 宋清武 李慧臻

【摘要】 目的 观察半夏泻心汤对 N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍(N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, MNNG) 诱导大鼠前胃鳞癌的防治作用。**方法** 将 140 只雄性 SD 大鼠随机分为 3 组, 空白组 20 只、模型组 100 只、模型中药组 20 只, 采用 MNNG 联合多因素造模。每 4 周抽检模型组大鼠 4 只, 观察前胃黏膜组织学变化, 确定造模是否成功。造模成功后抽检各组大鼠, 并将剩余模型组 39 只大鼠随机分为 4 组, 模型对照组 9 只, 半夏泻心汤高、中、低剂量组各 10 只, 分别给予 0.9% 生理盐水、2.29、1.375、0.6875 g/mL 的半夏泻心汤灌胃, 10 mL/kg, 1 次/天, 连续 12 周。40 周末, 处死全部大鼠, 观察前胃黏膜组织学变化。**结果** 28 周末前胃鳞状上皮增生、异型增生、鳞癌发生率, 空白组为 5%、5%、0, 模型组为 100%、83.3%、50%, 模型中药组为 0、0、0。40 周末前胃鳞状上皮增生、异型增生、鳞癌发生率, 模型对照组为 100%、100%、77.8%, 高剂量组为 100%、85.7%、57.1%, 中剂量组为 100%、44.5%、22.3%, 低剂量组为 100%、77.8%、66.7%。**结论** 半夏泻心汤对 MNNG 多因素造模法诱发大鼠前胃鳞癌的发生具有一定的防治作用。

【关键词】 半夏泻心汤; 前胃; 鳞癌; N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍; 防治

【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2015.04.001

Preventive and therapeutic effects of *Banxia Xiexin* Decoction on rats with forestomach squamous carcinoma induced by MNNG KONG Xiang-ru, LI Di-hua, DU Xiao, et al. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

Corresponding author: LI Hui-zhen, E-mail: ctjenny@126.com

【Abstract】 Objective To observe the preventive and therapeutic effects of *Banxia Xiexin* Decoction on rats with forestomach squamous carcinoma induced by MNNG. **Methods** 140 SD rats were randomly divided into 3 groups: control group (20 rats), model group (100 rats), and model and traditional Chinese medicine (TCM) group (20 rats). The rat models were established with rats in all the groups except control group by using combination MNNG and multiple factors methods. 4 rats were randomly tested by observing on the histological changes of forestomach mucosa every 4 weeks, in order to determine whether the rat models establishing was successful. After rat models establishment, there were 39 rats left in model group, and the rats were randomly divided into 4 groups: model control group (9 rats, received gavage administration with normal saline), high, middle and low dosage of *Banxia Xiexin* Decoction group (with 10 rats in each group, received gavage administration with *Banxia Xiexin* Decoction with dosage of 2.29 g/mL, 1.375 g/mL, and 0.6875 g/mL). The volume of gavage administration was 10 mL/(kg · d), and the treatment lasted for 12 weeks. At the end of the 40th week, all the rats were sacrificed, in order to observe the histological changes of forestomach mucosa. **Results** At the end of

基金项目:国家自然科学基金(8123708);天津市高校“中青年骨干创新人才培养计划”

作者单位:300193 天津中医药大学研究生院[孔祥茹(硕士研究生)、杜潇];天津中医药大学第二附属医院脾胃病科(李慧臻、高望、宋清武);天津市中西医结合医院急腹症研究所(李棣华)

作者简介:孔祥茹(1989-), 2012 级在读硕士研究生。研究方向:中医内科学的临床与实验研究。E-mail:442709060@qq.com

通讯作者:李慧臻(1965-), 女, 博士, 主任医师, 副教授, 硕士生导师。研究方向:慢性萎缩性胃炎癌前病变的中医药治疗及实验研究。

E-mail: ctjenny@126.com

the 28th week, the incidence rate of squamous epithelium hyperplasia, atypical hyperplasia and squamous carcinoma in forestomach was 5%, 5% and 0 respectively of rats in control group, model group was 100%, 83.3% and 50% respectively, while model and TCM group was 0, 0 and 0 respectively. At the end of the 40th week, the incidence rate of squamous epithelium hyperplasia, atypical hyperplasia and squamous carcinoma in forestomach of rats in model control group was 100%, 100% and 77.8% respectively, and these of rats in high dosage of *Banxia Xiexin* group was 100%, 85.7% and 57.1%, middle dosage of *Banxia Xiexin* group was 100%, 44.5% and 22.3%, and low dosage of *Banxia Xiexin* group was 100%, 77.8% and 66.7%. **Conclusion** There was a certain preventive and therapeutic effects of *Banxia Xiexin* decoction on rats with forestomach squamous carcinoma induced by MNNG.

【Key words】 *Banxia Xiexin* Decoction; Forestomach; Squamous cell carcinomas; N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine; Preventive and therapeutic effect

与人类的胃组织结构不同,大鼠的胃分为前胃和后胃两部分,前胃为大鼠特有。前胃在组织形态上与人的食管相似,被覆复层鳞状上皮,缺乏黏膜肌层和固有腺体;在功能上与人的胃相似,具有贮存食物的作用,pH 值 4.5~6,更接近于食管^[1]。大鼠前胃多被用于化学物质致癌性的风险评估研究,虽然因其组织特异性而颇有争议,但仍然对胃癌、食管癌的研究具有一定意义。N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍(N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, MNNG)诱导实验性后胃腺癌已成为主流造模方法,但多项研究表明,MNNG 长期低浓度自由饮用和(或)高浓度灌胃也可诱发大鼠前胃鳞癌^[2-4]。半夏泻心汤为仲景经典方,是“和方之首”,其通过“调寒热”、“调虚实”、“调气机”的调和作用,在防治消化系统肿瘤中发挥重要作用。因此,本实验通过半夏泻心汤对 MNNG 诱发大鼠前胃鳞癌过程中的影响,观察其对大鼠前胃鳞癌的防治作用。

1 材料与仪器

1.1 实验动物

健康雄性 SD 大鼠 140 只,体质量(120 ± 10)g,购自北京军事医学科学院动物实验中心,动物合格证编号:SCXK(京)2009-0017,置于标准实验条件下饲养[室温(24 ± 2)℃,湿度(55 ± 5)%]。

1.2 药物

半夏泻心汤,由清半夏 12 g、黄芩 9 g、黄连 3 g、干姜 9 g、党参 9 g、炙甘草 9 g、大枣 4 枚组成,购自天津中医药大学第二附属医院。N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍(MNNG):购自东京化成工业株式会社(TCI),批号:J8CST-TA。无水乙醇购自天津市天新精细化工开发中心。氯化钠、羟甲基纤维素购自天

津市方得科技有限公司。雷尼替丁胶囊购自天津太平洋制药有限公司。

1.3 仪器与设备

光学显微镜(OLYMPUS);全自动真空组织脱水机(Leica ASP300 S);组织包埋机(Leica EG1160)。

2 方法

2.1 药物配制

(1)MNNG 先用无水乙醇溶解后,再用去离子水配成 1 g/L 的母液,4℃避光保存,临用时用洁净水稀释至 100 μg/mL,供大鼠自由饮用,饮水瓶用黑色喷漆涂黑以避光,每天更换;用 1%羟甲基纤维素溶液配制 0.017 mol/L 的 MNNG 溶液,4℃避光保存,供大鼠灌胃。(2)用去离子水配制 15%的 NaCl 溶液,临用时加热至 56℃。(3)半夏泻心汤于天津中医药大学第二附属医院煎药室代煎,取全部药汁,再浓缩至 22.9 g/kg、13.75 g/kg、6.875 g/kg 高、中、低浓度,相当于成人每日用量的 25、15、7.5 倍灌胃。

2.2 造模方法

参考文献^[5-7],大鼠以 100 μg/mL 的 MNNG 溶液代替饮水,自由饮用;每天上午给予 0.017 mol/L 的 MNNG 溶液灌胃,1 mL/只;大鼠喂以 0.03%雷尼替丁饲料,每进食 2 天,禁食 1 天,禁食当天下午用 56℃的 15% NaCl 溶液灌胃,10 mL/kg。

2.3 分组及给药

将 140 只大鼠随机分为 3 组,空白组 20 只,模型组 100 只,模型中药组 20 只。除空白组给予正常饮食喂养外,其它大鼠按上述方法造模。实验进行 8 周后,每隔 4 周抽检模型组大鼠 4 只,观察前胃组织学变化,至 24 周末确认模型成功。28 周末,随机抽取空白组 20 只,模型组、模型中药组 18 只大鼠进

行组织学检查。并将模型组剩余 39 只大鼠随机分为 4 组,模型对照组 9 只,半夏泻心汤高、中、低剂量组各 10 只。分别用 0.9% 生理盐水、2.29 g/mL、1.375 g/mL、0.6875 g/mL 的半夏泻心汤,以 10 mL/kg 灌胃,1 次/天,连续 12 周。

2.4 取材

取材前禁食不禁水 12 小时,股动脉放血处死,游离全胃,沿胃大弯切开,沿大、小弯方向将前胃切成 2 mm 宽的长条,10 % 中性甲醛固定,常规石蜡包埋,切片,HE 染色,光镜下观察前胃黏膜组织学变化。

2.5 病理诊断评定标准

参考文献^[3]标准作前胃黏膜主要病理诊断:鳞状上皮正常(0),增生性病变分为单纯性增生(+)、乳头状增生(++)、乳头状瘤(+++);癌前病变为鳞状上皮异型增生,分为轻(+)、中(++)、重(+++)三个级别;鳞状上皮癌根据侵犯部位分为黏膜层(+),黏膜下层(++),肌层(+++)。

2.6 统计处理

采用 SPSS 13.0 软件处理,资料进行描述性统计分析。

3 结果

3.1 一般情况

空白组、模型组、模型中药组至 28 周末时,大鼠自然死亡数分别为 0、23 和 2 只,所有死亡大鼠解剖后观察各脏器,除见胃肠明显胀气外,未见其它异常。与空白组相比,模型组大鼠体型明显瘦小,精神衰弱,唇甲发白,皮毛无光泽,进食少,大便稀,肛门口欠清洁,反应迟钝,弓背蜷缩,活动量下降,四肢肌力差,站立不稳,甚至出现恶病质等慢性消耗性疾病表现;模型中药组虽体型瘦小,但整体状态俱佳,与空白组相当。实验至 40 周末,模型对照组和半夏泻心汤高、中、低剂量组大鼠存活数分别为 9、7、9、9 只,其中模型对照组大鼠整体状态同前,而

半夏泻心汤高、中、低组大鼠整体状态较治疗前均有好转,进食渐加,体重增长,皮毛较前顺滑光泽,反应灵敏,活动量增加,其中尤以中剂量组明显。

3.2 肉眼观察

28 周末空白组和模型中药组大鼠前胃黏膜呈灰白色、光滑、湿润、菲薄、半透明。模型组前胃黏膜增厚、表面粗糙,可见灰白色针眼大小、微隆起的颗粒状结节,单发或成片状分布,甚至占据整个前胃;或见乳头状、菜花状肿物,大小不等,最大者达 2.56 cm³[按公式(长×宽²)/2 计算]。40 周末模型对照组、半夏泻心汤低、中、高剂量组大鼠前胃肿瘤平均体积分别为 3.02 cm³、2.02 cm³、1.73 cm³、2.33 cm³,模型对照组肿物平均体积进一步增长,而半夏泻心汤治疗各组均有所下降,其中以中剂量组下降最明显。

3.3 病理组织学变化

28 周末,模型组前胃鳞状上皮增生、异型增生、鳞癌发生率分别为 16.7%、33.3%、50%。空白组异型增生发生率 5%,模型中药组未见异常。模型中药组前胃鳞癌发生率明显低于模型组。40 周末前胃鳞状上皮增生、异型增生、鳞癌发生率,模型对照组为 100%、100%、77.8%;高剂量组为 100%、85.7%、57.1%;中剂量组为 100%、44.5%、22.3%;低剂量组为 100%、77.8%、66.7%。与 28 周末相比,鳞癌发生率模型对照组、高、低剂量组升高,中剂量组降低,见表 1、2。

4 讨论

半夏泻心汤出自《伤寒论》,本为少阳证误下成痞而设,方中寒热、苦辛、甘平并用,具有“调气机”、“调寒热”、“调虚实”的“调和”作用,使人整体上达到阴平阳秘的状态。随着整体观念在现代医学中地位的不断提高,半夏泻心汤的应用范围也不断扩大,近年来在肿瘤方面的运用越来越受到重视。在癌前病变、癌症和放化疗副反应中,通权达变,灵活

表 1 28 周末各组大鼠前胃黏膜组织学变化

组别	n (只)	增生				发生率 (%)	异型增生				发生率 (%)	鳞癌				发生率 (%)
		0	+	++	+++		0	+	++	+++		0	+	++	+++	
空白组	20	19	1	0	0	5	19	1	0	0	5	20	0	0	0	0
模型组	18	0	3	5	10	100	3	8	5	2	83.3	9	2	5	2	50
模型中药组	18	18	0	0	0	0	18	0	0	0	0	18	0	0	0	0

表 2 40 周末各组大鼠前胃黏膜组织学变化

组别	n (只)	增生				发生率 (%)	异型增生				发生率 (%)	鳞癌				发生率 (%)
		0	+	++	+++		0	+	++	+++		0	+	++	+++	
模型对照组	9	0	0	1	8	100	0	0	1	8	100	2	1	3	3	77.8
高剂量组	7	0	1	3	3	100	1	1	3	2	85.7	3	1	2	1	57.1
中剂量组	9	0	0	2	7	100	5	0	3	1	44.5	7	0	2	0	22.3
低剂量组	9	0	0	1	8	100	2	1	4	2	77.8	3	0	2	4	66.7

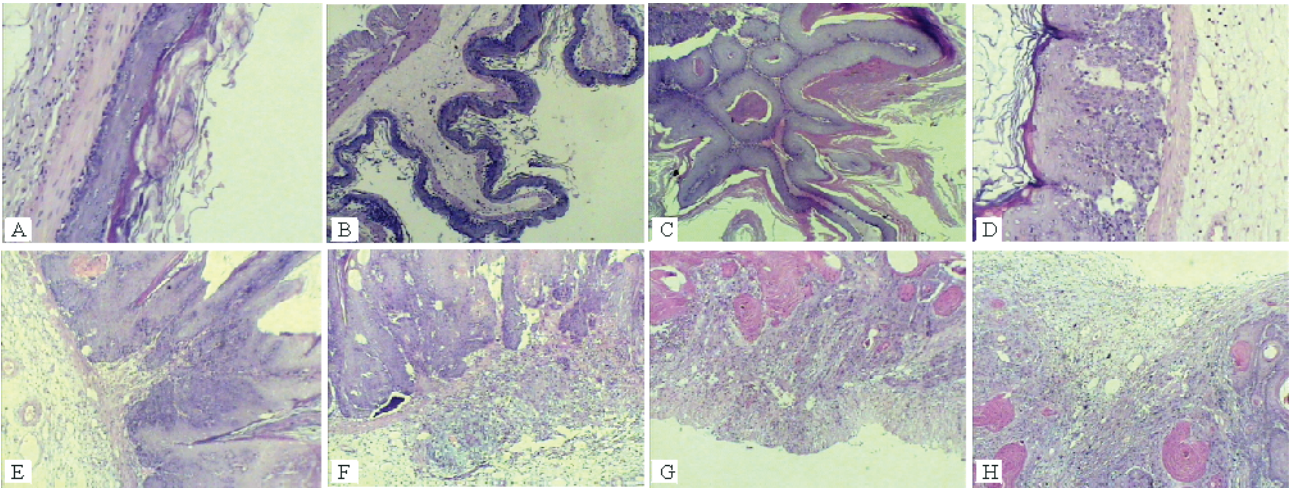


图 1 大鼠前胃黏膜组织病理(HE 染色)

运用,能改善症状,缓解病情,提高患者的生存质量^[8-9]。相关研究亦表明,半夏泻心汤能抑制某些癌前病变的发展,可不同程度上降低大鼠胃黏膜肠化生或异型增生的发生,阻断和逆转实验大鼠胃癌前病变的发展^[10],也可有效抑制 DMH/DSS 诱导的大鼠结肠炎向结肠癌转变^[11]。同时,也有研究显示半夏泻心汤还能明显的增加人胃癌细胞 SGC-7901 在 S 期和 G0-G1 期数目,促进胃癌细胞凋亡,从而抑制肿瘤细胞增殖^[12-13]。

本实验结果显示:MNNG 自由饮用联合灌胃的给药方式,配合饥饱失常、0.03% 雷尼替丁饲料、56℃ 15% NaCl 溶液灌胃的方法能有效诱导大鼠前胃鳞癌,其过程经历了前胃鳞状上皮单纯性增生,乳头状增生,乳头状瘤,异型增生和鳞癌的病变过程。在这一过程中,半夏泻心汤能有效改善大鼠整体状态,降低死亡率,降低前胃鳞癌及异型增生的发生率。表明半夏泻心汤早期干预能降低 MNNG 诱导大鼠前胃鳞癌的发生率,预防鳞癌

的发生。

使用不同浓度的半夏泻心汤对大鼠前胃鳞癌进行治疗的研究结果显示:停用造模方法后,模型对照组、半夏泻心汤高、低剂量组大鼠前胃鳞癌、异型增生的检出率均有不同程度的升高,其中模型对照组升高最明显,表明停止造模方法干预后,前胃病变更继续向前发展,程度加重,高、低剂量的半夏泻心汤可以延缓病变恶化速度,其中尤以高剂量较优。半夏泻心汤中剂量组治疗后的鳞癌、异型增生检出率较治疗前明显下降,表明用药剂量对大鼠前胃病变的影响较大,本实验中以中剂量最优。这也与中药本身就是以其偏性来纠正病证的偏颇而达到调和作用的机理是相符合的,因此不仅在临床中需要把握药物的用药剂量,动物实验中亦然。

综上,虽然了解了半夏泻心汤对 MNNG 诱发大鼠前胃鳞癌过程中的影响及其治疗作用,但其内在作用机制尚不明确,需要进一步深入研究。

参 考 文 献

[1] Deborah M. Proctor, Nicole M. Gatto, Sandra J. Hong, et al. Mode-of-Action Framework for Evaluating the Relevance of Rodent Forestomach Tumors in Cancer Risk Assessment[J]. TOXICOLOGICAL SCIENCES, 2007, 98(2):313-26.

[2] 高国林,杨原,任彩文,等. MNNG 加吐温 20 和维生素 D3 对大鼠前胃的影响[J]. 世界华人消化杂志, 1999, 7(9):763-765.

[3] 苏琦,罗招阳,贺兴娥,等. MNNG 诱发大鼠前胃鳞癌及癌前病变的病理形态学动态观察[J]. 衡阳医学院学报, 1994, 22(1):1-7.

[4] 朱晓东,林庚金,许祖德,等. 高盐饲料配合甲基硝基亚硝基胍诱发大鼠胃癌[J]. 上海实验动物科学, 2003, 23(2):85-88, 97.

[5] 南杏初,胡运莲,李秋华,等. 加味左金丸对大鼠胃癌前病变环氧化酶-2 蛋白表达的影响[J]. 湖北中医学院学报, 2007, 9(1):34-36.

[6] 谢晶日,王业莉,张扬,等. 复合造模法建立大鼠胃癌前病变模型的实验研究[J]. 新中医, 2013, 45(2):139-141.

[7] 朱萱萱,沈洪,张忠华,等. 益气和胃胶囊对 MNNG 致胃癌前

病变大鼠的实验研究[J]. 中医药学刊, 2005, 23(12):2194-2195.

[8] 花宝金,鲍艳举. 半夏泻心汤治肿瘤体悟[J]. 中医杂志, 2007, 48(1):19-21.

[9] 张晓春,彭海燕,邓旭坤,等. 半夏泻心汤在肿瘤治疗中的应用[J]. 中华中医药杂志, 2005, 20(5):298-300.

[10] 张艳,汪永锋,刘喜平,等. 半夏泻心方及其拆方配伍药组对实验性大鼠胃癌前病变胃黏膜组织病理学影响[J]. 甘肃中医, 2007, 20(6):69-71.

[11] 冯娟,刘莉,李宇华,等. 半夏泻心汤抑制 DMH/DSS 诱导的结肠炎相关性结肠癌的发生[J]. 世界华人消化杂志, 2007, 15(14):1609-1614.

[12] 周发祥,陈玉龙,庞永芳,等. 半夏泻心汤及其拆方对胃腺癌 SGC-7901 细胞周期和凋亡的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(23):203-206.

[13] 刘喜平,李沛清,席时燕,等. 半夏泻心方配伍与诱导 BGC-823 细胞凋亡关系的血清药理学研究[J]. 中医杂志, 2006, 47(2):134-137.

(收稿日期:2014-11-15)

(本文编辑:董历华)

电针“百会”、“涌泉”两穴对 APP/PS1 双转基因小鼠学习记忆行为与海马超微结构的影响

加吾拉·阿不力孜 王鑫 李芙 白杨 姚海江 莫雨平 周源 许红 毛颖秋
高誉珊 张伟 张忠 李志刚 薛卫国

【摘要】 目的 观察电针对淀粉样前蛋白/早老蛋白 1 (amyloid precursor protein/presenilin-1, APP/PS1) 双转基因鼠空间学习记忆行为及海马超微结构的影响。**方法** 将 4 月龄的 APP/PS1 双转基因小鼠按随机分配法分为模型组、电针组和药物组,以相同月龄同窝阴性小鼠作为对照组,每组 12 只。电针组取“百会”、“涌泉”两穴,每次留针时间为 15 分钟,隔日 1 次,针刺 5 周;药物组予乙酰胆碱酶抑制剂 0.92 mL/g 灌胃。Morris 水迷宫检测小鼠学习记忆能力及空间探索能力,取脑做海马 CA1 区透射电镜片并观察。**结果** Morris 水迷宫检测四天小鼠上台潜伏期结果显示:模型组与对照组比较有统计学差异 ($P < 0.05$);空间探索实验:模型组在原有平台象限(第三象限)区域活动时间明显低于对照组 ($P < 0.05$);透射电镜结果显示:在微血管、神经元突触及神经元超微结构上对

基金项目:国家自然科学基金(81273826)

作者单位:100029 北京中医药大学针灸推拿学院[加吾拉·阿不力孜(博士研究生)、王鑫(博士研究生)、李芙(硕士研究生)、白杨、姚海江(博士研究生)、莫雨平(博士研究生)、周源(硕士研究生)、李志刚、薛卫国],基础医学院[许红、高誉珊、张忠],科研实验中心(毛颖秋、张伟)

作者简介:加吾拉·阿不力孜(1986 -), 2012 级在读博士研究生。研究方向:针刺手法及针刺干预中枢神经损伤的机理研究。E-mail: jack47656@hotmail.com

通讯作者:李志刚(1965 -), 博士,教授,博士生导师。研究方向:针刺手法及针刺干预中枢神经损伤的机理研究。E-mail: lizhigang620@126.com;薛卫国(1968 -), 博士,副教授,硕士生导师。研究方向:针刺治疗阿尔茨海默病的机制研究。E-mail: snowmanxue@163.com