

● 中西药苑 ●

咖啡酸锗对小鼠肝癌 H22 抑制作用的研究*

周志愉¹ 姜鹏君² 乔玉丹¹ 张晓春¹ 肖纯¹

(1 江西中医学院 南昌 330006; 2 江西医学院上饶分院 上饶 334000)

摘要:目的:探讨一种新的有机锗化合物(咖啡酸锗)对小鼠肝癌 H22 的抑制作用。方法:通过体内抗肿瘤实验,观察咖啡酸锗对小鼠肝癌 H22 的影响(抑瘤率),并采用 HE 染色和迈-格-姬(MGG)染色在光镜下观察肿瘤细胞的病理形态变化。结果:咖啡酸锗能有效地抑制小鼠肝癌 H22 的生长,咖啡酸锗低、中、高剂量组的抑瘤率分别为 46.48%、50.00%、52.11%,光镜下见咖啡酸锗各剂量组肿瘤细胞生长受抑,浸润程度、核分裂数、血管数目明显减少,而且坏死程度较严重。结论:咖啡酸锗对小鼠肝癌 H22 具有显著的抑制作用。

关键词:咖啡酸锗;肝癌 H22;抗肿瘤作用;形态学

中图分类号:R 965.2

文献标识码:B

文献编号:1671-4040(2008)06-0087-02

肿瘤是严重危害人类身体健康的常见、多发疾病,也是世界医学的一大难题。全世界每年有 800 多万人死于恶性肿瘤,占各种死亡原因的第二位。原发性肝癌是我国最常见的恶性肿瘤之一,其发病率呈逐年上升趋势。应用化学药物治疗肿瘤是目前临床上采用的重要手段之一。研究新的化学药物,预防和治疗恶性肿瘤是 21 世纪化学和医学领域重要的研究课题之一。有机锗类化合物^[1]独特的抗肿瘤作用^[2]已越来越受到人们的重视。本实验研究一种新的有机锗化合物-咖啡酸锗(专利号:03118635.1)对小鼠肝癌 H22 的作用,发现咖啡酸锗对 H22 有较好的抑制作用。现将结果报道如下:

1 材料

1.1 实验动物 昆明杂交小白鼠,雌性 50 只,体重 18~20g,由江西中医学院实验动物中心提供。

1.2 H22 瘤株 小鼠肝癌 H22 细胞株,购自浙江省医学科学院肿瘤研究所,本实验室常规传代保存。

1.3 药物 咖啡酸锗由咖啡酸经一系列化学反应制得,白色结晶状,由江西中医学院有机化学教研室提供,以双蒸馏水配制成所需浓度的溶液。

1.4 实验仪器 手提压力式蒸汽灭菌器、AB104-N 型电子分析天平、2T-12P 生物组织自动脱水机、YB-6D 生物组织石蜡包埋机、LEICA RM2235 型切片机、YT-6C 型生物组织摊烤片机、OLYMPUS-BX-41 型显微镜、Q550CW 图像信息采集与分析系统等。

2 方法

2.1 小鼠肝癌 H22 动物模型的制备 取传代接种后 7~10d、肿瘤生长良好、腹部隆起明显的瘤源小鼠腹水,用无菌生理盐水稀释,调整细胞数约 $2.1 \times 10^7/\text{mL}$,在每只小鼠右前肢皮下注射 0.2mL 瘤液,制成实体型荷瘤小鼠模型。

2.2 动物分组 将接种了肝癌 H22 细胞的小鼠随机分为五组:生理盐水阴性对照组[NS,90mg/(kg·d)],环磷酸胺阳性对照组 [CTX,25 mg/(kg·d)]、咖啡酸锗低、中、高剂量组 [Caffeic-acid Ge, 1 mg/(kg·d)、2mg/(kg·d)、4mg/(kg·d)],每组 10 只。

2.3 体内抑瘤实验 各组小鼠于接种次日进行灌胃给药,给药量均为 0.2mL/20g,每日给药一次,连续 10d。停药后次日断椎处死小鼠,称体重,解剖剥离皮下瘤体,观察瘤体形态及出血坏死情况,并各制一张肿瘤压片(立即染色或置 4℃冰箱过夜)。同时剖取胸腺、脾、肝、心、肺及肾等,称瘤重,计算抑瘤率。抑瘤率 = (对照组平均瘤重 - 给药组平均瘤重) /

对照组平均瘤重 $\times 100\%$ 。

2.4 病理形态观察 待肿瘤压片自然干燥后,作迈-格-姬(MGG)染色,观察瘤细胞形态变化;瘤组织以 10%福尔马林溶液固定,脱水,透明石蜡包埋,切片,HE 染色,光镜观察瘤组织结构改变,分别观察以下指标:(1)生长情况:分四级,瘤细胞量少,稀疏为 +;瘤细胞成片,较密集为 ++;瘤细胞成片密集 +++;瘤细胞大片密集,坏死少,为 ++++。分别计 1~4 分。(2)组织浸润程度:分四级,皮下结节,无浸润为 +;侵及脂肪为 ++;侵及脂肪、肌肉为 +++;侵及脂肪、肌肉、神经,穿入胸腔为 ++++。分别计 1~4 分。(3)核分裂数:每张切片观察 5 个高倍(40 \times 10)视野,记录核分裂数/5。(4)血管数目:每张切片观察 5 个中倍(20 \times 10)视野,记录瘤实质中血管总数/5。(5)坏死程度:分四级,少量坏死为 +,小灶状坏死为 ++,片状坏死为 +++,坏死并出血为 ++++,分别计 1~4 分。

2.5 统计方法 数据均以 $(\bar{X} \pm S)$ 表示,组间差别采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为有显著差异。

3 结果

3.1 咖啡酸锗对荷瘤 H22 小鼠的抑瘤作用 表 1 中数据显示用药前后的小鼠体重各组之间无显著性差异 ($P > 0.05$)。咖啡酸锗各剂量组的瘤重比生理盐水组明显降低 ($P < 0.01$),环磷酸胺组的瘤重与生理盐水组比较也有显著性下降 ($P < 0.01$)。咖啡酸锗低、中、高剂量组的抑瘤率分别为 46.48%、50.00%、52.11%,均大于 30%,且有一定的剂量依赖关系。

表 1 咖啡酸锗对荷瘤 H22 小鼠的抑瘤作用 ($\bar{X} \pm S$)

组别	剂量 (mg/kg)	n	体重(g)		瘤重 (g)	抑瘤率 (%)
			实验前	实验后		
生理盐水组		10	20.13 \pm 1.79	24.26 \pm 0.92	1.42 \pm 0.28	—
环磷酸胺组	25	10	19.58 \pm 1.50	23.94 \pm 2.27	0.47 \pm 0.12*	66.90
低剂量组	1	10	19.85 \pm 1.68	23.96 \pm 2.20	0.76 \pm 0.17*	46.48
中剂量组	2	10	20.02 \pm 1.53	23.74 \pm 1.75	0.71 \pm 0.13*	50.00
高剂量组	4	10	19.53 \pm 1.35	22.82 \pm 1.84	0.68 \pm 0.11*	52.11

注:与生理盐水组比较, * $P < 0.01$ 。

3.2 肿瘤压片 MGG 染色观察结果 生理盐水组肿瘤细胞生长旺盛,细胞密集,核分裂多,胞浆丰富,裸核细胞不易见。环磷酸胺组瘤细胞生长受抑,细胞较稀疏,细胞结构破坏,裸核细胞多见,部分肿瘤细胞体积膨大,胞浆疏松淡蓝,胞质空泡变,胞核崩解,核仁及核膜均消失,呈坏死态。咖啡酸锗各剂量组瘤细胞平均体积较生理盐水组小,细胞多小、圆,胞浆浓缩深蓝色,呈固缩态,细胞较稀疏,细胞结构破坏,裸核细胞多见,部分细胞胞浆内含空泡,胞核内亦可见空泡。

3.3 HE 染色观察及镜检积分结果 生理盐水组瘤细胞生长

* 江西省教育厅科技项目[赣教技字(2007)252号]

消癖合剂的制备及临床应用

王春华

(辽宁省沈阳市第五人民医院 沈阳 110023)

关键词: 消癖合剂; 制备; 临床应用

中图分类号: R 655.8

文献标识码: B

文献编号: 1671-4040(2008)06-0088-02

消癖合剂是我院制剂室的自制制剂,由漏芦、玄参、牡蛎、夏枯草等十几味中药组成,具有开郁散结、止痛消癖作用,临床主要用于乳腺增生,副作用少,病人易于接受。现将我院乳腺科门诊 68 例乳腺增生患者应用消癖合剂治疗情况报道如下:

1 仪器与试药

KQ-50B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。漏芦对照药材(批号:1036-9601,中国药品生物制品检定所提供)。玄参对照药材(批号:1008-200003,中国药品生物制品检定所提供)。硅胶 G 为青岛海洋化工有限公司生产,试剂均为分析纯。样品消癖合剂(批号:20070628,20071015,20071212)由本院制剂室提供。

2 药物制备

2.1 处方 柴胡、青皮、郁金、昆布、王不留行、穿山甲、漏芦、玄参、鹿角、牡蛎、夏枯草等。

2.2 制备方法 以上 15 味药拣选、漂洗,鹿角加水置高压容器内单煎 3 次,每次煎煮 1h,其余 14 味药,加水浸泡 30min 后进行煎煮,煎煮 2 次,每次煎煮 1h,合并所有煎液,过滤,浓缩滤液至相对密度不低于 1.02,取羟苯乙酯适量用乙醇溶解,苯甲酸钠适量用水溶解后,一起加入药液中,混匀,静置,得上清液,分装,即得。

3 质量标准

3.1 性状 本品为棕褐色液体。

旺盛,呈弥漫或片状生长,排列紧密,瘤细胞浸润较深,至脂肪、肌层、胸骨以及食管等处,肿瘤组织血管较丰富,坏死范围较小。咖啡酸锆低、中、高剂量组及环磷酰胺组的肿瘤细胞生长不及生理盐水组旺盛,排列较稀疏,密度降低,核分裂较少,变性坏死较严重,核固缩碎裂,脂肪、肌层、胸骨以及食管等部位的浸润情况亦少见,肿瘤组织中可见大量淋巴细胞和巨噬细胞浸润,血管数较少。

咖啡酸锆各剂量组及环磷酰胺组肿瘤细胞的生长情况、浸润程度、核分裂数镜检积分与生理盐水组比较,均显著降低,具有统计学意义($P < 0.01$),而坏死程度的镜检积分比生理盐水组显著增高($P < 0.01$)。咖啡酸锆各剂量组及环磷酰胺组小鼠肿瘤组织中的血管数镜检积分均比生理盐水组明显减少($P < 0.05$),尤其是咖啡酸锆各剂量组差异性更显著($P < 0.01$)。见表 2。

表 2 HE 染色观察镜检积分结果 ($\bar{X} \pm S$) 分

组别	瘤细胞生长	浸润程度	核分裂	血管数目	坏死程度
生理盐水组	3.10± 0.87	3.30± 0.67	4.60± 1.17	4.70± 1.06	1.90± 0.57
环磷酰胺组	1.70± 0.48**	2.30± 0.48**	2.80± 0.79**	3.10± 0.74*	3.30± 0.67**
低剂量组	1.90± 0.87**	2.50± 0.71**	2.70± 0.48**	2.90± 0.99**	2.90± 0.57**
中剂量组	1.80± 0.63**	2.40± 0.52**	2.90± 0.99**	2.70± 0.67**	3.20± 0.63**
高剂量组	1.70± 0.67**	2.20± 0.42**	2.60± 0.70**	2.50± 0.71**	3.40± 0.52**

注:与生理盐水组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

4 讨论

近年来,有机锆类化合物的抗癌活性在国内外普遍得到重视,大量研究表明^[3-5],有机锆类化合物具有显著的抗癌活性,且抗癌谱广。咖啡酸锆是一种新型的有机锆类化合物,在

3.2 鉴别

3.2.1 漏芦的薄层色谱 取本品 40mL,置分液漏斗中,用乙醚提取两次,每次 20mL,弃去乙醚提取液,再用水饱和正丁醇提取两次,每次 20mL,合并正丁醇液,加等体积氨试液,摇匀,放置分层,分取上层液,回收正丁醇至干,残渣加甲醇 1mL 使溶解,作为供试品溶液。另取漏芦对照药材 1g,加甲醇 20mL,超声提取 20min,滤过,滤液置水浴上蒸至约 1mL,作为对照药材溶液。照薄层色谱法试验,取供试品溶液 15 μ L、对照药材溶液 10 μ L,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以环己烷-丁酮(4:1)为展开剂展开,取出,晾干,置紫外光灯(365nm)下检视。供试品色谱中,在与对照药材色谱中相应的位置上,应显相同颜色的荧光斑点。

3.2.2 玄参的薄层色谱 取本品 50mL,用乙醚提取两次,每次 20mL,分取水层,用水饱和正丁醇提取两次,每次 20mL,合并正丁醇层,蒸干,残渣加甲醇 1mL 使溶解,作为供试品溶液。另取玄参对照药材 1g,加水饱和正丁醇超声提取 30min,滤过,滤液蒸干,残渣加甲醇 1mL 使溶解,作为对照药材溶液。照薄层色谱法试验,取供试品溶液 15 μ L、对照药材溶液 10 μ L,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以氯仿-甲醇(5:1)为展开剂展开,取出,晾干,喷以 1%香草醛硫酸溶液,105 $^{\circ}$ C 加热至斑点显色清晰。供试品色谱中,在与对照药材色谱相应位置上,显相同颜色的主斑点。

3.3 检查 相对密度应不低于 1.02,pH 值应为 4.2~6.2,其本次体内抑瘤实验中,我们发现咖啡酸锆用药组小鼠的瘤重比生理盐水组明显降低,且有一定的剂量依赖关系,咖啡酸锆低、中、高剂量组的抑瘤率分别为 46.48%、50.00%、52.11%,均大于 30%,符合《现代肿瘤治疗药物学》关于抗肿瘤药物有效性的标准(抑瘤率 >30%),表明咖啡酸锆具有明显的抗肿瘤作用,可抑制小鼠体内肝癌 H22 的生长。此外,我们应用 MGG 染色和 HE 染色法观察肿瘤细胞形态,发现咖啡酸锆用药组的肿瘤细胞生长受抑,排列较稀疏,细胞结构破坏,变性坏死较严重,脂肪、肌层及胸骨等部位的浸润情况亦少见,血管数较少,提示咖啡酸锆对肿瘤细胞的生长浸润及血管生成有明显的抑制作用,在直接杀伤肿瘤细胞的同时,影响肿瘤的血管生成,使其供血减少而导致瘤细胞坏死。因而我们认为咖啡酸锆的抗肿瘤作用有可能是从多方面作用协同完成的,其详细机理有待于进一步深入研究。

参考文献

- [1]颜雪明,陈水生,张华,等.具有生物活性的有机锆化合物研究[J].广东微量元素科学,2005,12(3):1-4
- [2]李凯,朱消非,叶勇,等.有机锆化合物抗肿瘤作用的研究进展[J].精细石油化工,2003(2):54-57
- [3]陈义朗,李新生,欧阳萌,等.一种新型含硒有机锆化合物的合成及其抗癌活性[J].合成化学,2004,12(3):300-302
- [4]陈静宏,杨占田,张健,等.有机锆 GEM10 对黑色素瘤细胞增殖及其与内皮细胞粘连的影响[J].陕西医学杂志,2005,34(2):131-134
- [5]黄桂林,陈晓东,肖纯,等.肉桂酸锆对小鼠宫颈癌 14 号抑制作用的研究[J].药物研究,2002,11(4):42-43

(收稿日期:2008-08-14)