

槲寄生总碱和多糖对黄曲霉菌毒素诱发大鼠肝癌前病变时血清同工酶含量的影响

文朝阳¹, 史争鸣², 李霞¹, 丰平¹, 刘树红¹, 王学江^{1*}

(1. 首都医科大学基础医学院, 北京 100069; 2. 北京积水潭医院外科, 北京 100035)

摘要: 目的 研究槲寄生提取物对黄曲霉毒素 B1 (AFB1) 诱发大鼠肝癌前病变时同工酶含量的影响。方法 60 只大鼠被分为正常对照组、单纯肝大部切除组、AFB1 模型组、槲寄生总碱组和槲寄生多糖组。后 3 组大鼠一次性 ip 给予 AFB1 0.75 mg·kg⁻¹, 第 3 周起饲以含 0.015% 二乙酰氨基苄饲料 5 周。后 4 组大鼠于第 3 周末施行肝大部切除术。槲寄生总碱和槲寄生多糖组于肝大部切除术后 1 周开始分别 ig 给予槲寄生总碱 8 g·kg⁻¹ 和槲寄生多糖 6 g·kg⁻¹, 每天 1 次, 连续给药 4 周。第 8 周末处死大鼠, 采用组织化学染色法检测肝组织切片中 γ -谷氨酰转肽酶 (GGT) 阳性染色面积; 免疫吸附法测定血清 GGT 同工酶 II (GGT II) 阳性表达; 酶速率法和琼脂糖电泳法测定血清乳酸脱氢酶 (LDH) 和碱性磷酸酶 (ALP) 总活性及其同工酶相对含量。结果 AFB1 引起肝脏组织中 GGT 表达明显增加; 大鼠血清 GGT II 阳性率明显升高; 血清 LDH 总活性和 LDH5 含量增高, 且 LDH5 > LDH4; 血清 ALP1 含量明显升高, 并出现异常 ALP 电泳条带。大鼠 ig 给予槲寄生总碱或槲寄生多糖治疗 4 周, 肝脏组织中 GGT 表达明显减少, 血清 GGT II 阳性率明显下降, 血清 LDH 总活力、LDH5 和 ALP1 含量均较模型组明显降低。结论 AFB1 诱发的大鼠肝癌前病变有多种同工酶的表达异常, 槲寄生总碱和多糖可能通过调节同工酶的表达干预肝癌前病变的发生和发展。**关键词:** 黄曲霉毒素 B1; 肝肿瘤; 癌前状态; 同工酶; 槲寄生; 碱类; 多糖

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 1000-3002(2009)03-0201-07

DOI: 10.3867/j.issn.1000-3002.2009.03.007

肿瘤的发生发展与酶基因异常表达密切相关。近年来, 关于酶在细胞癌变过程中的作用以及酶与癌基因的关系已引起关注^[1]。基因调控异常表现为蛋白合成的紊乱, 产生异常的酶和同工酶谱以及胚胎性酶、抗原和异位性蛋白质、激素等, 其中以同工酶的变化最为重要^[2]。在组织细胞癌变过程中, 与细胞分化有关的组织特异性酶和同工酶活性降低或消失, 而与细胞增殖有关的酶活性升高, 尤其是某些成年型同工酶活性减低或消失, 同时出现了一些胚胎型同工酶和异位酶^[3-4]。肝脏是机体内含酶最为丰富的器官, 其酶蛋白含量占肝总蛋白量的 2/3。在肝细胞发生异型增生向癌细胞转化时, 肝内酶含量可发生变化, 血液中某些酶活性也发生改变。黄曲霉毒素 (aflatoxin) 是黄曲霉菌、寄生曲霉菌等的次生代谢产物, 1993 年被世界卫生组织癌症研究机构划为 I 类致癌物, 是最强的化学致癌物之一^[5]。在一些国家和地区, 黄曲霉毒素被认为在原发性肝细胞癌形成过程中起重要作用^[6]。为探讨黄曲霉毒素诱发肝癌前病变发生发展的机制, 本研究采用黄曲霉毒素 B1 诱发大鼠肝癌前病变模型, 观察血清 γ -谷氨酰转肽酶 (γ -glutamyl transpeptidase, GGT) 同工酶、乳酸脱氢酶 (lactic dehydrogenase, LDH) 同工酶和碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 同工酶活性的变化, 并探讨槲寄生总碱及多糖对这些变化的干预作用。

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器

还原型谷胱甘肽 (reduced glutathione, GSH)、

收稿日期: 2008-07-14 接受日期: 2008-12-17

基金项目: 北京市中医药科技发展基金 (JJ2005-10); 北京市教委科技发展项目基金 (M200610025003)

作者简介: 文朝阳 (1961-), 女, 副教授, 主要从事肝癌前病变研究。

* 联系作者 E-mail: xjwang@ccmu.edu.cn Tel: (010)83911434

氧化型谷胱甘肽、黄曲霉毒素 B1 (aflatoxin B1, AFB1) 和二乙酰氨基苄 (2-acetylaminofluorene), 购自 Sigma 公司。检测血清 LDH 和 ALP 总活性的化学试剂和试剂盒分别购自武汉博士德生物工程有限公司和上海科华-东菱诊断用品有限公司, 其他试剂均为国产分析纯。岛津 LC-6A 高效液相色谱系统 [LC-6A 恒流泵、SPD-6AV 紫外检测器、Anastar 色谱工作站和 Kromasil C18 色谱柱 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm)] 均购自天津市色谱科学技术公司; LX-20 自动生化分析仪 (Beckman 公司, 美国); HRASYS 琼脂糖凝胶电泳系统、扫描仪及其配套试剂盒 (Sebia 公司, 法国); Leica 图像分析系统 (FW4000, 德国)。

1.2 槲寄生总碱和多糖的提取与分离

槲寄生 [*Viscum coloratum* (Kom.) Nakai] 购自北京永安堂药店, 产地为四川。

槲寄生生物碱的提取与分离^[7-8]: 准确称取槲寄生干品 3 kg 于容器中, 加入不同浓度的 HCl 溶液, 振荡浸提 24 h, 超声波辅助萃取一定时间, 抽滤, 滤渣以同样条件再次提取, 过滤, 合并两次滤液, 减压蒸馏回收溶剂, 得浸膏。用 2% HCl 溶解浸膏, 取上清液, 用少量氯仿去除溶液中的脂质。1% NaOH 调 pH 至 10 ~ 11, 氯仿 9 L × 3 次萃取, 合并、浓缩滤液, 得脂溶性总碱 A。将碱性水溶液 pH 调至 6.5 ~ 7.0, 用正丁醇 9 L × 3 次萃取, 合并、浓缩滤液, 得水溶性总碱 B。合计水溶性总碱 A 和 B 即为提取的总碱量, 总碱为棕色固体。提取物以碘-碘化钾试剂、碘化汞钾试剂检验呈阳性反应, 证明提取物为槲寄生生物碱。在 HCl 提取试验中, 影响结果的是 HCl 的浓度, 在回流时间为 6 h (加热回流 3 次, 每次 2 h), 2% HCl 所得到的总生物碱 43.3 g, 收率 1.62%。提取的槲寄生总碱用生理盐水配置。

槲寄生多糖的提取与分离^[9]: 取干燥粉碎后的槲寄生粉 1 kg, 在水浴温度 95℃ 下, 按料液比 1:28 (W/V) 热水提取 3 h, 获得槲寄生多糖提取液。抽滤去残渣, 上清液 5867 × g 离心除杂质后, 获得多糖水提液。将多糖水提液浓缩, 向浓缩液中加入 95% 乙醇, 直至溶液中乙醇浓度为 80%, 置 4℃ 冰箱中过夜, 次日除去乙醇, 用蒸馏水将沉淀物复溶, 向其中加入 50% 三氯乙酸溶液直至其浓度为 10%, 随后 1467 × g 离心去沉淀, 得槲寄生脱蛋白多糖水提液, 用氨水调 pH 至 7.0。再次醇沉, 1467 × g 离心取沉淀, 加入少量丙酮, 挥去沉淀物中残余的少

量水分和乙醇, 即得槲寄生粗多糖粉末。粗多糖部位用离子交换色谱进一步分离得到一个中性部位, 平均相对分子质量为 3×10^4 。通过对糖成分的定性、定量及链分析, 检测该部位的结构。结果显示, 中性多糖部位包括 12% 中性阿拉伯半乳糖, 小部分为低取代的木糖聚糖。多糖提取率为 3.98%。槲寄生多糖用生理盐水配置。

1.3 动物分组及给药

Wistar 大鼠, ♂, 体重 126 ~ 135 g, 由首都医科大学实验动物中心提供, 许可证编号: SCXK (京) 2005-0022。遵循《实验动物管理条例》饲养大鼠。大鼠单笼喂养, 水食不限。动物房温度 21 ~ 23℃, 湿度 40% ~ 60%, 光照时间 8:00 ~ 20:00。

60 只大鼠随机分为 5 组: 正常对照组、单纯肝大部切除组、AFB1 模型组、槲寄生总碱组和槲寄生多糖组。实验基本按 Solt-Farber 模式^[10]进行。AFB1 模型组、槲寄生总碱和槲寄生多糖组大鼠一次性腹腔注射 AFB1 $0.75 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 作为启动剂, 2 周后 (第 3 周起) 进行肝细胞癌前病变的选择性促进程序, 即饲以含 0.015% 二乙酰氨基苄饲料 5 周, 实验第 3 周末按经典术式施行肝大部切除术。槲寄生总碱和槲寄生多糖组于肝大部切除术后 1 周开始分别灌胃给予槲寄生总碱 $8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和槲寄生多糖 $6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 每天 1 次, 连续给药 4 周; 单纯肝大部切除组只切除肝脏的 2/3, 不进行其他处理。正常对照组常规饲养, 不作任何处理。第 8 周末, 空腹 8 h 后乌拉坦麻醉下处死大鼠, 心脏取血检测血清酶, 取前叶、右后叶及尾叶肝脏组织, 液氮速冻后 -80℃ 储存用于组织化学染色观察。

1.4 组织化学染色法检测肝脏 γ-谷氨酰转肽酶含量

采用改良的 Rutenberg 法^[11]。将冷冻的肝脏组织连续切成 6 μm 厚的冰冻切片, 置于玻片上于 4℃ 丙酮中固定 1 h。吹干丙酮, 在 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Tris-HCl 缓冲溶液中作用 10 min; 将玻片放入含有固蓝的孵育液中染色, 37℃ 孵育 20 min; 浸入 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CuSO_4 溶液中 2 min 后, 生理盐水洗, 蒸馏水洗, 甘油明胶封片。切片置于显微镜下, 将图像传至 Leica 图像分析系统扫描测定吸光度值, 经计算机分析处理, 计算出 GGT 染色阳性灶个数和阳性染色的面积。每个肝脏组织取 4 张切片, 每张切片观察 5 个区域。结果表示为 GGT 阳性面积 (mm^2) / 观察面积 (cm^2) 和每平方厘米的 GGT 阳性灶数目。

1.5 硝酸纤维素膜特异免疫吸附法检测血清 γ -谷氨酰转肽酶同工酶 II

将血清加到特异吸附免疫膜上, 37℃ 水浴 10 min 进行反应, 加 GGT 底物并显色观察, 以深紫红色者为 GGT II 强阳性, 无色者为阴性。

1.6 血清酶总活性和同工酶含量测定

血清 LDH 和 ALP 总活性测定采用酶速率法, 用 LX-20 自动生化分析仪检测, 酶活性单位表示为 $U \cdot L^{-1}$ 。琼脂糖凝胶电泳法^[12]测定 LDH 和 ALP 同工酶, 扫描仪扫描各电泳条带, 图像分析软件分析各条带的吸光度, 计算各型同工酶的百分含量。

1.7 统计学分析

结果数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析。采用方差分析和 t 检验进行组间比较。

2 结果

2.1 大鼠肝脏的大体变化

正常对照组和肝大部切除组肝脏表面光滑, 无明显肉眼可见变化; AFB1 模型组肝脏充血明显, 肝体积较大, 肝叶边缘较圆钝, 肝表面及切面可见散在的针尖至粟粒大小的灰白或灰黄圆形病灶分布, 部分突出于肝表面; 槲寄生总碱和多糖组肝脏表面结节较模型组明显减少。

2.2 槲寄生总碱和多糖对肝脏 γ -谷氨酰转肽酶含量的影响

如图 1 和图 2 所示, AFB1 引起大鼠肝脏出现大量 GGT 染色阳性灶, 说明 GGT 含量明显增加。模型组 GGT 阳性灶的数目为每平方厘米 29.5 ± 9.9 。

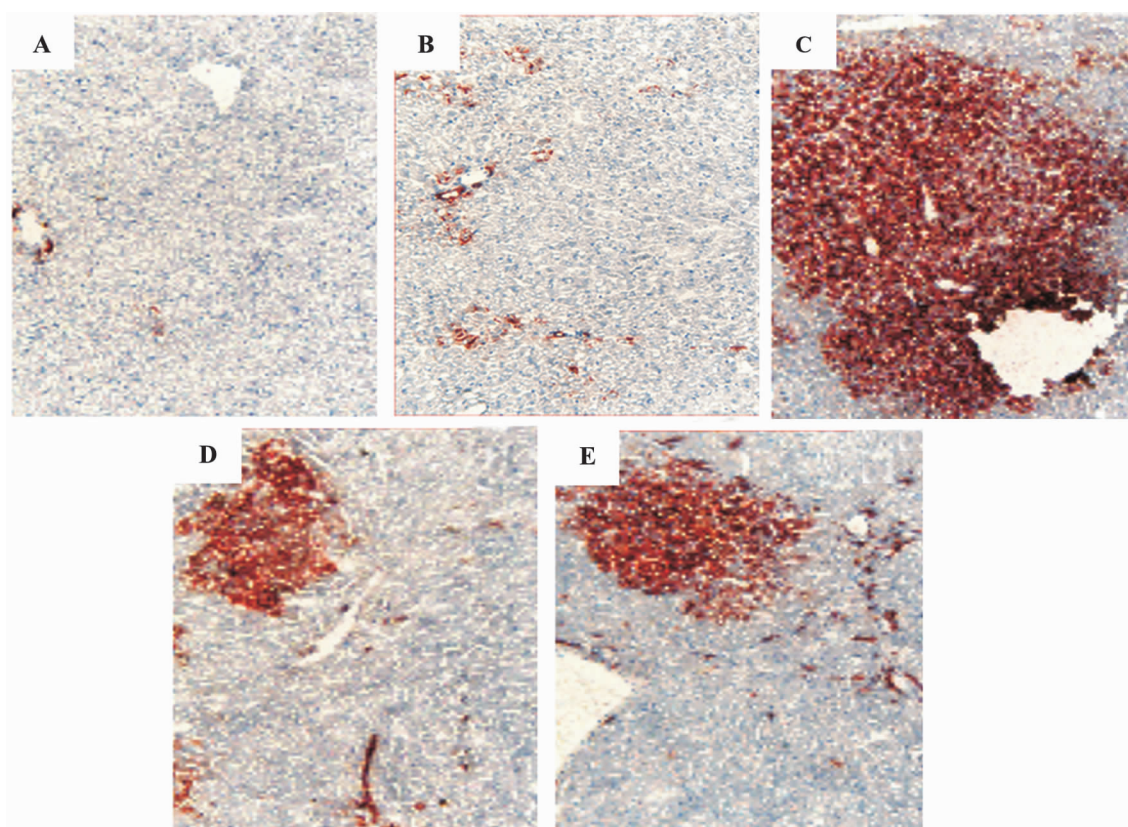


Fig 1. Photograms of γ -glutamyl transpeptidase (GGT) expression in rat livers injured by aflatoxin B1 (AFB1) ($\times 100$). A: normal control group; B: partial liver resected group. Rat liver was resected by 2/3 alone; C: AFB1 model group. Rats were given ip AFB1 $0.75 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ one time, and 2 weeks later, were fed with 0.015% 2-acetylaminofluorene for 5 weeks. At the end of third week after AFB1 given, rat liver was resected by 2/3; D and E: total alkalies of mistletoe (TAM) and polysaccharides of mistletoe (PM) groups, respectively. Rats were treated as the same as model group, and TAM $8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ and PM $6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ were given ip, respectively, from 1 week after partial liver resected for 4 weeks. The red stained areas are the GGT positive foci.

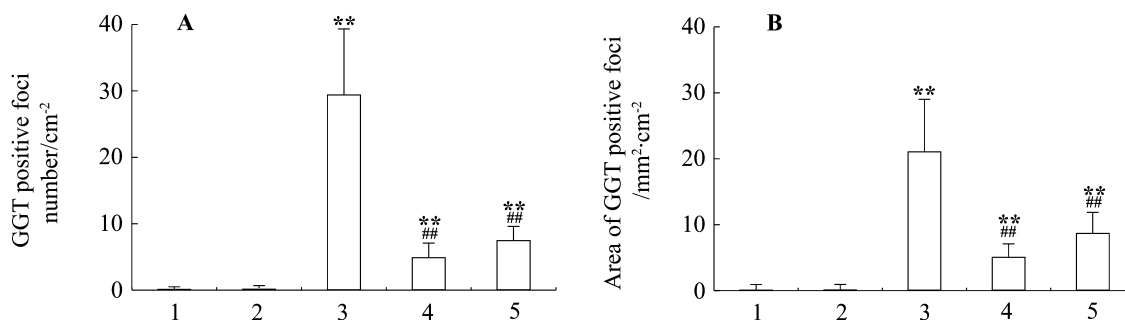


Fig 2. Effects of total alkalies of mistletoe and polysaccharides of mistletoe on GGT expression in rat livers. See legend of Fig 1 for rat treatments. A: GGT positive foci number; B: area of GGT positive foci. 1: normal control group; 2: partial liver resected group; 3: AFB1 model group; 4: TMA group; 5: PM group. $\bar{x} \pm s$, $n = 12$. ** $P < 0.01$, compared with normal group; ## $P < 0.01$, compared with model group.

槲寄生总碱 $8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 或槲寄生多糖 $6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ig 给药 4 周, 肝脏 GGT 阳性灶数量及面积较模型组明显减少。正常对照组和肝大部切除组大鼠肝脏均未见 GGT 阳性灶出现。

2.3 槲寄生总碱和多糖对血清 γ -谷氨酰转肽酶同工酶 II 表达的影响

结果显示, 正常对照组的血清 GGT II 阳性率为 1/12, 肝大部切除组阳性率为 0/12。模型组 GGT II 阳性率为 10/12, 较正常对照组明显增加。槲寄生总碱和槲寄生多糖组的阳性率分别为 3/12 和 7/12, 均较模型组明显减少。

2.4 槲寄生总碱和多糖对血清乳酸脱氢酶活性及同工酶含量的影响

如表 1 所示, 模型组血清 LDH 总活性明显升高, 同工酶分析结果, 主要为 LDH5 明显升高, 且 LDH5 > LDH4。槲寄生总碱和槲寄生多糖组 LDH

总活性均较模型组明显降低, 但尚未达到正常组水平, LDH5 明显低于模型组, 接近正常组水平。

2.5 槲寄生总碱和多糖对血清碱性磷酸酶活性及同工酶含量的影响

如表 2 所示, 各组间血清 ALP 总活性无显著差异 ($P > 0.05$)。但模型组 ALP1 含量明显升高, ALP3 明显降低, 并出现异常 ALP 电泳条带, 紧跟 ALP1 之后, 其来源不明。槲寄生总碱和槲寄生多糖组与模型组相比, ALP1 明显减少, ALP3 明显增加。

3 讨论

肿瘤发生发展过程中, 由于基因调控失常, 酶结构和含量均会发生异常改变, 酶的活性也随之发生变化, 并产生异构酶或正常细胞没有的酶。此外, 发

Tab 1. Effects of total alkalies of mistletoe and polysaccharides of mistletoe on activity of lactic dehydrogenase (LDH) and its isoenzymes in serum of rats injured by aflatoxin B1

Group	LDH /U·L ⁻¹	LDH isoenzyme/%					Number of rats with LDH5 > LDH4
		LDH1	LDH2	LDH3	LDH4	LDH5	
Normal control	3633 ± 109	18.7 ± 3.7	25.3 ± 19.0	18.9 ± 3.1	21.0 ± 1.8	14.5 ± 2.6	0
Partial liver resected	3996 ± 121	18.6 ± 2.5	25.0 ± 4.9	18.3 ± 2.2	21.1 ± 7.4	14.0 ± 4.3	0
AFB1 model	19950 ± 172 **	15.0 ± 1.8	18.5 ± 1.1	18.1 ± 0.7	17.3 ± 1.4 **	30.4 ± 3.5 **	12 **
TAM	5069 ± 93 **	18.1 ± 4.3	23.3 ± 4.9	17.0 ± 2.2	21.1 ± 8.8	18.4 ± 3.0 **##	4 ##
PM	4289 ± 183 **	17.7 ± 1.9	23.0 ± 5.1	18.0 ± 2.8	23.8 ± 8.4	15.5 ± 4.7 ##	2 ##

See legend of Fig 1 for rat treatments. $\bar{x} \pm s$, $n = 12$. ** $P < 0.01$, compared with normal group; ## $P < 0.01$, compared with AFB1 model group.

Tab 2. Effects of total alkalies of mistletoe and polysaccharides of mistletoe on activity of alkaline phosphatase (ALP) and its isoenzymes in serum of rats injured by aflatoxin B1

Group	ALP /U·L ⁻¹	ALP isoenzyme/%	
		ALP1	ALP3
Normal control	203 ± 35	52.0 ± 13.4	46.3 ± 13.1
Partial liver resected	199 ± 39	64.4 ± 9.4	25.3 ± 8.7**
AFB1 model	207 ± 29	81.2 ± 1.0**	8.8 ± 1.0**
TAM	200 ± 32	72.1 ± 8.4**#	29.9 ± 8.3**##
PM	199 ± 36	62.6 ± 16.8##	31.6 ± 10.6**##

See legend of Fig 1 for rat treatments. $\bar{x} \pm s$, $n = 12$. ** $P < 0.01$, compared with normal group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, compared with AFB1 model group.

生癌变的肝细胞增殖加快,形成增殖灶,压迫其周围组织发生反应性酶释放,血中酶活性亦可随之增高^[13]。

GGT 是肝脏的胚胎性酶,在正常成年大鼠肝脏基本无活性。在癌前病变时,肝细胞反分化而类似胚胎期的酶生成增多,将其作为特异性癌变标志物,是实验性肝癌研究中检测癌前病变和观察癌变程度的常用指标^[14]。目前认为血清 GGT II 对肝癌的早期诊断特异性和敏感性均较高^[15]。GGT II 几乎仅见于肝癌,其阳性率与血清 GGT 总活性之间无平行关系,其他肝胆胰疾病时,尽管 GGT 总活性明显升高,GGT II 却几乎全部阴性^[16-17]。

LDH 是糖酵解过程中的一种重要酶,肝癌前病变的肝细胞糖酵解速度明显高于正常组织,故血清 LDH 活性明显升高。但 LDH 在体内分布很广,肝、心、肾、肺和血液等组织的多种疾病均可导致 LDH 总活力增高,其定位和定性诊断价值不大。而 LDH 同工酶则能区别组织来源。LDH5 主要存在于肝和骨骼肌中,除外骨病,其升高(LDH5 > LDH4)主要与肝脏病变有关^[18-19]。

ALP 同工酶对原发性肝癌诊断有较高的特异性。在化学致癌剂诱发的鼠肝癌组织及血清中 100% 出现肝癌特异性 ALP 同工酶 ALP1^[20],是由于异型增生的细胞及癌细胞可产生 ALP,增生灶周围的炎症可刺激邻近肝细胞过度产生 ALP,而且异型增生的肝细胞可以压迫肝内胆管,引起这部分胆管支配区域内肝细胞 ALP 合成亢进而排泄障碍^[21]。

本实验采用 AFB1 诱发大鼠肝癌前病变模型。结果显示,AFB1 引起肝脏组织中 GGT 表达明显增加,说明肝细胞出现癌前病变。血清 GGT II 表达也

异常增加,AFB1 模型组血清 GGT II 阳性率达 10/12,提示 AFB1 所致肝癌前病变与酶基因异常表达密切相关,推测 GGT II 系由病变肝细胞所分泌。模型组血清中 LDH 总活性和 LDH5 含量增高,且 LDH5 > LDH4,提示肝细胞的异常增生^[4];血清 ALP1 明显升高,紧跟 ALP1 之后出现异常 ALP 电泳条带。另外模型组的 ALP3 明显降低。ALP3 来源于成骨或软骨细胞,其增高见于骨骼疾患,在肝癌前病变中 ALP3 的降低机制尚需进一步探讨。

大鼠灌胃给予槲寄生总碱或槲寄生多糖治疗 4 周,肝脏组织中 GGT 表达明显减少,血清 GGT II 阳性率明显下降,血清 LDH 活性和 ALP1 含量均较模型组明显降低,ALP3 明显增加,并未见异常 ALP。表明槲寄生总碱和多糖对 AFB1 诱发的大鼠癌前病变肝脏组织和血清酶活性表达异常有明显的改善。槲寄生提取物有可能通过调控肝脏酶活性的表达,干预 AFB1 引起肝癌前病变的发生和发展。

4 参考文献:

- [1] Stern R. Hyaluronidases in cancer biology [J]. *Semin Cancer Biol*, 2008, **18**(4):275-280.
- [2] Shen C, Gu M, Song C, Miao L, Hu L, Liang D, et al. The tumorigenicity diversification in human embryonic kidney 293 cell line cultured *in vitro* [J]. *Biologicals*, 2008, **36**(4):263-268.
- [3] Abdalla AM, Hamed RR. Multiple unfolding states of glutathione transferase from *Physa acuta* (Gastropoda [correction of Gastropoda]: Physidae) [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, **340**(2):625-632.
- [4] Wang W, Han S, Jin W. Determination of lactate dehydrogenase isoenzymes in single rat glioma cells by capil-

- lary electrophoresis with electrochemical detection[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2006, **831**(1-2):57-62.
- [5] Ubagai T, Tansho S, Ito T, Ono Y. Influences of aflatoxin B1 on reactive oxygen species generation and chemotaxis of human polymorphonuclear leukocytes[J]. *Toxicol In Vitro*, 2008, **22**(4):1115-1120.
- [6] Su H, Zhao J, Xiong Y, Xu T, Zhou F, Yuan Y, et al. Large-scale analysis of the genetic and epigenetic alterations in hepatocellular carcinoma from Southeast China[J]. *Mutat Res*, 2008, **641**(1-2):27-35.
- [7] Wang J, Wu FA, Wang JL, Tao SQ, Dong SN. Primary study on systematic separation and bacteriostatic activity of alkaloids extracted from *Viscum coloratum* (Kom.) Nakai[J]. *Food Sci*(食品科学), 2007, **28**(6):63-65.
- [8] Li T, Ni YN, Li L. Study on different methods for extraction of alkaloids from mistletoe[J]. *Food Sci Technol*(食品科技), 2006, **31**(10):94-97.
- [9] Wang J, Zhu YF. Extraction and content determination of polysaccharides in *Viscum coloratum*[J]. *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2007, **32**(22):2387-2390.
- [10] Solt D, Farber E. New principle for the analysis of chemical carcinogenesis[J]. *Nature*, 1976, **263**:701-703.
- [11] Lindros KO, Penttilä KE, Gaasbeek Janzen JW, Moorman AF, Speisky H, Israel Y. The gamma-glutamyltransferase/glutamine synthetase activity ratio. A powerful marker for the acinar origin of hepatocytes[J]. *J Hepatol*, 1989, **8**(3):338-443.
- [12] Roy I, Sharma S, Gupta MN. Separation of an isoenzyme of polyphenol oxidase from *Duranta plumieri* by expanded bed chromatography[J]. *Protein Expr Purif*, 2002, **24**(2):181-187.
- [13] Horn TL, Long L, Cwik MJ, Morrissey RL, Kapetanovic IM, McCormick DL. Modulation of hepatic and renal drug metabolizing enzyme activities in rats by subchronic administration of farnesol [J]. *Chem Biol Interact*, 2005, **152**(2-3):79-99.
- [14] Pettersen I, Andersen JH, Bjornland K, Mathisen Ø, Bremnes R, Wellman M, et al. Heterogeneity in gamma-glutamyltransferase mRNA expression and glycan structures. Search for tumor-specific variants in human liver metastases and colon carcinoma cells[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2003, **1648**(1-2):210-218.
- [15] Iciek M, Chwatko G, Rokita H, Bald E, Włodek L. The effects of modulation of gamma-glutamyl transpeptidase activity in HepG2 cells on thiol homeostasis and caspase-3-activity [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2007, **1773**(2):201-208.
- [16] Dubnov-Raz G, Shapiro R, Merlob P. Maternal lamotrigine treatment and elevated neonatal gamma-glutamyl transpeptidase [J]. *Pediatr Neurol*, 2006, **35**(3):220-222.
- [17] Myara A, Guéchet J, Imbert-Bismut F, Lasnier E, Piton A, Voitot H, et al. Harmonization of liver enzyme results; calibration for aminotransferases and gamma glutamyltransferase [J]. *J Hepatol*, 2004, **41**(3):501-502.
- [18] Anehus S, Bengtsson G, Andersson G, Carlsson G, Hafström L, Yngner T, et al. Urinary putrescine and plasma lactate dehydrogenase as markers of experimental adenocarcinoma growth [J]. *Eur J Cancer*, 1981, **17**(5):511-518.
- [19] Nowrouzi A, Yazdanparast R. Alkaline phosphatase retained in HepG2 hepatocarcinoma cells vs. alkaline phosphatase released to culture medium; difference of aberrant glycosylation [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, **330**(2):400-409.
- [20] Burlina A, Plebani M, Dechechchi C, Zaninotto M, Farinati F, Naccarato R. Occurrence of an atypical alkaline phosphatase fraction ("biliary") in primary liver cancer [J]. *Clin Biochem*, 1983, **16**(6):346-349.
- [21] Yang RF, Zhao YL, Liu RH, Li J, Yang RZ. The meaning of five enzyme changing in liver's cancer diagnosis [J]. *Mod Oncol*(现代肿瘤医学), 2006, **14**(12):1593-1594.

Effects of alkalies and polysaccharides of *Viscum album* on serum isoenzyme content in precancerous conditions of liver neoplasms of rats induced by aflatoxin B1

WEN Zhao-Yang¹, SHI Zheng-Ming², LI Xia¹, FENG Ping¹,
LIU Shu-Hong¹, WANG Xue-Jiang^{1*}

(1. School of Basic Medical Sciences, Capital Medical University, Beijing 100069, China;

2. Department of Surgery, Beijing Jishuitan Hospital, Beijing 100035, China)

Abstract: **AIM** To study effects of isoenzyme activity by alkalies and polysaccharides of *Viscum album* in precancerous conditions of liver neoplasms of rats induced by aflatoxin B1 (AFB1). **METHODS** Sixty rats were divided into normal control group, partial liver resected group, AFB1 model group, total alkalies of mistletoe (TAM) 8 g·kg⁻¹ group, and polysaccharides of mistletoe (PM) 6 g·kg⁻¹ group. AFB1 0.75 mg·kg⁻¹ was ip injected into the abdominal cavity of experimental rats as an initiate agent. After 2 weeks, the test entered a selective promote procedure, which raised rats with 0.015% 2-acetylaminofluorene fed for 5 weeks. According to the classical form of operation, 2/3 part liver of rats were removed in the end of the third week. Rats in TAM and PM groups were ig given TAM 8 g·kg⁻¹ and PM 6 g·kg⁻¹ from the first week after greater part liver removed, once a day, for 4 weeks. At the end of the eighth week, all rats were sacrificed under anesthesia with pentobarbital after fasting for 8 h, then the hepatic tissue was taken out at the assigned position which was the right anterior leaf, right back leaf and the caudal leaf, and at the same time blood samples from heart were also collected. γ -Glutamyl-transpeptidase (GGT) isoenzyme was determined with histochemical methods. Serum lactic dehydrogenase (LDH), alkaline phosphatase (ALP), serum γ -glutamyl transpeptidase-isoenzyme II (GGT-II) and their isoenzymes were determined with

enzyme-velocity method and agarose electrophoresis. **RESULTS** In AFB1 model group, the focal amount (numbers/cm²) of GGT obviously elevated, positive rate of GGT-II increased markedly, total activity of LDH, ALP and GGT increased obviously, and LDH5 > LDH4. Anomalous ALP in electrophoresis was found. After the rats were ig treated with TAM and PM for 4 weeks, the focal amount and areas of GGT were less than those in model group obviously; and the positive rate of GGT-II descended obviously in the serum, not only total activities of LDH decreased obviously, but also LDH5 < LDH4; TAM and PM had effects on anastate ALP1 and inhibit expression of ALP1. **CONCLUSION** Multi-isoenzyme anomal expression is found in precancerosis of liver induced by AFB1, however, TAM and PM can obviously inhibit rat hepatic precancerous conditions, which are aroused by AFB1. This effect is enforced with regulation of multi-isoenzyme by TAM and PM.

Key words: aflatoxin B1; liver neoplasms; precancerous conditions; isoenzymes; *viscum album*; alkalies; polysaccharides

Foundation item: The project supported by Chinese Medicine Technology Item of Beijing (2005-JJ10); and Beijing Municipal Commission of Education (M200610025003)

* Corresponding author.

(本文编辑 付良青)