

- 2 Huang X, Ren P, Wen A D, *et al.* World Journal of Gastroenterology, 1999, 5 (11):1
- 3 黄 熙, 夏 天, 任 平, 等. 中国中西医结合杂志, 1994, 14 (5):288
- 4 寺泽捷年. 国外医学-中医中药分册, 1988, 10(3):59
- 5 Huang X, Jiang Y P, Wen A D. CJIM, 1995, 1(4):297
- 6 黄 熙, 陈可冀, 任 平, 等. 中国中药杂志, 1997, 22(4):250
- 7 Fujiwara S, Noumi K, Sugimoto I, *et al.* Chem Pharm Bull. 1982, 30(3):973
- 8 Fujiwara S, Hamadea T, Sugimoto I, *et al.* Chem Pharm Bull. 1983, 31(3):1079
- 9 Lennernas H, Regardh C G. Pharm Res. 1993, 10(6):879
- 10 Mummaneni V, Dressman J B. Pharm Res. 1994, 11(11):1599

(2000-05-08 收稿)

葡萄籽原花青素抗促癌作用的实验研究[△]

南京中医药大学中药学院(210029) 赵万洲* 陆 茵** 闫新琦 阮君山 张世玮
江苏省中医院消化内科 孙志广

摘 要 以二甲基苯蒽(DMBA)作为启动剂,以巴豆油作为促癌剂诱发小鼠皮肤乳头状瘤,原花青素(PV2000)能显著性对抗巴豆油对皮肤乳头状瘤形成的促进作用,使小鼠生瘤百分率降低,平均每鼠生瘤个数显著减少,但对DMBA启动阶段的抑制不强。并发现NO与小鼠皮肤乳头状瘤的形成呈正相关,原花青素对巴豆油促癌过程的抑制作用与降低皮肤组织中NO含量有一定关系。此外,原花青素尚能显著性抑制促癌物巴豆油所致的小鼠耳廓肿胀。葡萄籽原花青素小鼠ip给药的LD₅₀为144.7 mg/kg,ig给药的LD₅₀为3 535 mg/kg。

关键词 原花青素 葡萄 乳头状瘤 抗促癌作用

Inhibitory Effect of Grape Seed Procyanidins on Tumor Promotion

College of Traditional Chinese Materia Medica, Nanjing University of TCM (Nanjing 210029) Zhao Wanzhou, Lu Yin, Yan Xinqi, Ruan Junshan and Zhang Shiwei

Department of Internal Medicine of Digestion, Jiangsu Hospital of TCM Sun Zhiguang

Abstract To study the effect of procyanidins obtained from the seed of *Vitis vinifera* L. in preventing tumor initiation and promotion induced by dimethyl benz [α] anthracene (DMBA) and croton oil. Two stage mouse skin papilloma was initiated by DMBA and promoted by croton oil, and procyanidin (PV2000) was used to assess its inhibitory effect on the initiation and promotion of the tumor. It was found that PV2000 could obviously decrease the incidence of papilloma during the croton oil promotion stage, but without effect on the DMBA initiation stage. It was found for the first time that nitric oxide (NO) is positively related to the promotion of mice papilloma, and procyanidins were found to be able to decrease the level of NO in the infected skin during croton oil promotion stage, as shown by its inhibitory effect on mice ear edema induced by croton oil. Acute toxicity tests on procyanidins showed that its LD₅₀, ig mice was 3 535 mg/kg and ip mice 144.7 mg/kg. Procyanidins from grape seed proved to be safe and worth for further development.

Key words procyanidins *Vitis vinifera* L. papilloma inhibitory effect on tumor promotion

原花青素(procyanidins)是植物王国中广泛存在的一大类多酚化合物的总和,是由不同数量的儿茶素或表儿茶素缩合而成。最简单的原花青素是儿茶素或表儿茶素形成的二聚体。按聚合度的大小,通常将二~四聚体称为低聚物(Procyanidlic oligomers),将五聚体以上的称为高聚体(Pro-

cyanidolic polymers)。50年代以来,人们从葡萄果实、叶和其它部位分离、鉴定的成分达100多种。在众多成分之中,人们最感兴趣的是原花青素^[2]。到目前为止,已从葡萄籽和皮中分离、鉴定了16种原花青素,其中有8个二聚体、4个三聚体、其它为四聚体、五聚体和六聚体。葡萄(籽和皮)作为原花青素的

* Address: Zhao Wanzhou, College of Chinese Materia Medica, Nanjing University of TCM, Nanjing

赵万洲 男,27岁,博士研究生,原为南京中医药大学中药药理学硕士,现在中国协和医科大学中国医学科学院药物研究所药理学第一研究室攻读博士学位,方向为肿瘤药理学。

**现在江苏省海洋药物研究中心

△中国博士后基金资助项目

重要资源,日益受到人们的关注。

小鼠皮肤乳头状瘤是目前应用最广泛的研究癌化学预防药的长期动物化学致癌实验模型。这不仅是因为对其癌变机制有较多的认识,更重要的是诱癌操作的方便性和观察指标的肉眼可见性。小鼠耳廓肿胀实验最早由 Hecker^[1]用于研究巴豆油的促癌作用,由于 TPA 等促癌物引起的早期反应为炎症和增生反应,故小鼠耳部肿胀抑制实验已成为目前筛选抗癌物的常用方法^[2]。我们以二甲基苯蒽(DMBA)作为小鼠皮肤乳头状瘤形成的启动剂,以巴豆油作为促癌剂,诱发小鼠皮肤乳头状瘤模型,观察了原花青素对小鼠皮肤乳头状瘤形成的抑制作用,研究了 NO 在皮肤乳头状瘤形成过程中的作用,并观察了原花青素对促癌物巴豆油刺激的小鼠耳廓肿胀的影响,对其毒性进行了初步研究。

1 材料

1.1 动物:昆明种小鼠,18~22 g,雌雄兼用,由南京中医药大学实验动物中心提供。

1.2 药品及试剂:原花青素,纯度>95%,棕褐色粉末,溶于 DMSO,平均分子量为 2 000;DMBA(7,12-dimethyl-benz[α]anthracen),Fluka 公司,批号 260355387;巴豆,武进市医药公司中药饮片厂,批号 960301;巴豆油的制备:巴豆去壳后,称取 100 g,研钵碾碎,用 500 mL 乙醚索氏提取器回流 8 h,回收乙醚,得巴豆油。脱毛剂配制:3 份硫化钠,1 份洗衣粉和 7 份淀粉加水调成糊状即可。含药饲料由江苏省实验动物中心加工制备。原花青素低剂量组每公斤饲料原花青素 500 mg,高剂量组每公斤饲料中含原花青素 1 500 mg。

2 实验方法

2.1 DMBA 和巴豆油诱发小鼠二阶段乳头状瘤模型^[3]:昆明种小鼠,于试验开始前 1 周用脱毛剂脱去小鼠背部毛发(约 2 cm×2 cm)。

造模组:于试验开始的第 1,7 和 14 天,于脱毛皮肤处涂以 DMBA 150 μ g/100 μ L 丙酮液,从第 3 周开始,每周 2,5 分别每次涂以 0.25%巴豆油丙酮液 200 μ L,共 12 周,每天喂以正常饲料。

抗启动组:DMBA 和巴豆油的应用方法同造模组,只是在用 DMBA 启动过程中,给小鼠喂以含药饲料,当用巴豆油促癌时则停止饲喂含药饲料,仅给予正常饲料。

抗促癌组:DMBA 和巴豆油的应用方法同造模组,只是在用 DMBA 启动过程中,给小鼠喂以正常饲料,当用巴豆油促癌时则饲喂含药饲料。

于每周六记录乳头状瘤数目和生瘤小鼠数目,计算小鼠生瘤百分率及每鼠平均生瘤数,第 12 周时将给药组生瘤小鼠数与模型组进行 χ^2 检验。12 周后剪取小鼠背部皮肤,将同组小鼠皮肤收集在一起,制成 10%组织匀浆,3 000 r/min 离心 15 min,取上清液放置在玻璃管中,于 65 C 水浴 3 min 后,采用硝酸还原酶法测定组织匀浆中 NO 浓度。NO 浓度测定试剂盒由南京建成生物工程有限公司提供。

2.2 小鼠耳廓肿胀模型:参考 Gschwendt 等^[2]的方法。选体重 20~25 g 雄性小鼠 5 只,随机分为 5 组,每组 10 只。分别给原花青素 100,200,400 mg/kg,维甲酸 100 mg/kg,模型组小鼠给予等量生理盐水,均按体重 0.2 mL/10 g ig 给药。给药 1 h 后,于每只小鼠右耳两面涂巴豆油混合致炎剂(内含 5%巴豆油、20%无水乙醇、5%蒸馏水和 70%乙醚)0.1 mL,左耳不涂为正常耳。4 h 后将小鼠脱颈处死,每鼠剪下左右两耳,用 9 mm 直径打孔器分别在同一部位打下圆耳片,分析天平称重。按下式计算各组小鼠耳廓肿胀率及肿胀抑制率。

$$\text{肿胀率}(\%) = \frac{\text{致炎耳重} - \text{未致炎耳重}}{\text{未致炎耳重}} \times 100\%$$

$$\text{肿胀抑制率}(\%) = \frac{\text{对照组平均肿胀率} - \text{给药组平均肿胀率}}{\text{对照组平均肿胀率}} \times 100\%$$

2.3 原花青素小鼠急性毒性试验

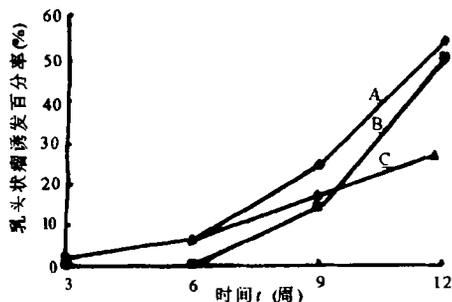
2.3.1 小鼠 ig 给药的急性毒性试验:取体重 20~22 g 的小鼠 60 只,雌雄各半,随机分成 6 组。通过预试找出合适的最大剂量为 6 600 mg/kg,然后用生理盐水(按组间比 1:0.8)依次稀释 5 个浓度,分别给 6 组小鼠一次性 ig 给药,给药容量为 0.2 mL/10 g,然后连续观察 7 d,记录逐日的小鼠毒性反应及死亡数。

2.3.2 小鼠 ip 给药的急性毒性试验:取体重 20~22 g 的小鼠 60 只,雌雄各半,随机分成 6 组。通过预试找出合适的最大剂量为 306.25 mg/kg,然后用生理盐水(按组间比 1:0.7)依次稀释 5 个浓度,分别给 6 组小鼠一次性 ip,给药容量为 0.2 mL/10 g,然后连续观察 7 d,记录逐日的小鼠毒性反应及死亡数。

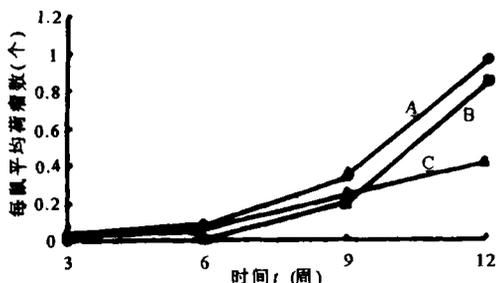
3 结果

3.1 原花青素对小鼠皮肤乳头状瘤形成的抑制作用:模型组小鼠从实验第 3 周起,开始生成乳头状瘤,以后每鼠荷瘤数和小鼠肿瘤诱发率逐渐增加。第 12 周时模型组平均荷瘤数为每鼠 0.96 个,肿瘤诱发率为 54%。在用 DMBA 启动乳头状瘤生成的阶段,给小鼠正常饲喂原花青素有降低肿瘤诱发率(低

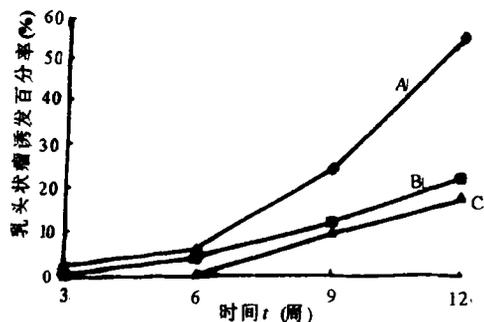
剂量组 50%，高剂量组 28%)、减少小鼠平均荷瘤数的趋势(低剂量组 0.84, 高剂量组 0.44), 但与模型组比较, 生瘤小鼠数未见显著性差异。在巴豆油促癌阶段, 给小鼠饲喂原花青素, 则可显著性降低肿瘤诱发率(低剂量组 22%, 高剂量组 18%), 减少小鼠平均荷瘤数(低剂量组 0.44, 高剂量组 0.26), 与模型组比较, 生瘤小鼠数显著性减少(图 1~4)。以上结果表明, 原花青素的抑瘤作用可能主要是通过影响促癌过程, 有较强的抗促癌作用, 而对肿瘤的启动阶段作用则较弱。



A-模型组; B-原花青素 100 mg/kg; C-原花青素 300 mg/kg
图 1 原花青素对小鼠皮肤二阶段乳头状瘤形成启动阶段的影响 (n=50)

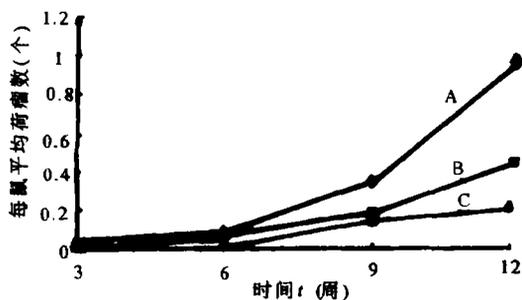


A-模型组; B-原花青素 100 mg/kg; C-原花青素 300 mg/kg
图 2 原花青素对小鼠皮肤二阶段乳头状瘤形成启动阶段的影响 (n=50)



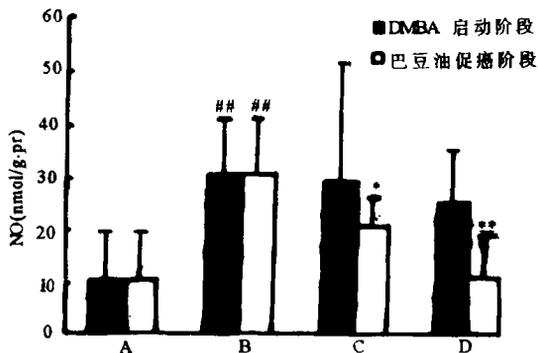
A-模型组; B-原花青素 100 mg/kg; C-原花青素 300 mg/kg
图 3 原花青素对小鼠皮肤二阶段乳头状瘤形成促癌阶段的影响 (n=50)

3.2 原花青素对二阶段诱癌试验小鼠皮肤 NO 水平的影响: 模型组小鼠皮肤 NO 含量显著性增高, 表



A-模型组; B-原花青素 100 mg/kg; C-原花青素 300 mg/kg
图 4 原花青素对小鼠皮肤二阶段乳头状瘤形成促癌阶段的影响 (n=50)

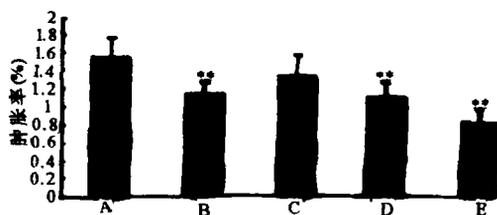
明 NO 在皮肤乳头状瘤的形成过程中可能发挥一定作用。原花青素能显著性降低促癌阶段小鼠皮肤中 NO 的含量, 而对启动阶段小鼠皮肤中 NO 的含量未见显著性影响(图 5)。



A-正常组; B-模型组; C-原花青素 100 mg/kg; D-原花青素 300 mg/kg
与正常组比较: ^{##}P<0.01;
与模型组比较: ^{*}P<0.05 ^{**}P<0.01

图 5 原花青素对二阶段诱癌试验小鼠皮肤 NO 水平的影响 (n=50)

3.3 原花青素对巴豆油刺激小鼠耳廓肿胀的抑制作用: 原花青素能显著抑制巴豆油刺激小鼠耳廓的肿胀, 并显示出一定的剂量依赖关系, 对小鼠耳廓肿胀的抑制率可达 46.7%(图 6)。



A-模型组; B-维甲酸 100 mg/kg; C-原花青素 100 mg/kg; D-原花青素 200 mg/kg; E-原花青素 400 mg/kg
与模型组比较: ^{**}P<0.01

图 6 原花青素对巴豆油刺激小鼠耳廓肿胀的抑制作用 (n=10)

3.4 小鼠急性毒性实验

3.4.1 ig 给药后,部分小鼠先后出现伏下少动,呼吸加深加快,精神萎靡,食欲下降,粪便深褐色,对死亡小鼠尸检,无肉眼可见的病变器官。结果经改良寇氏统计,LD₅₀ = 3 535 mg/kg, 95%的可信限为: 3 089~4 046 mg/kg。

3.4.2 ip 给药后,部分小鼠先后出现扭体,伏下少动,精神萎靡,食欲下降。对死亡小鼠尸检,小鼠腹腔中有原花青素细小颗粒,无其它肉眼可见的器官病变。结果经改良寇氏法统计,LD₅₀ = 144.7 mg/kg, 95%的可信限为: 122.3~171.2 mg/kg。

4 讨论

小鼠皮肤二阶段诱癌试验是研究癌发生和癌变机制的经典模型,它包括启动和促癌阶段。常用此模型来研究致癌物和促癌物,也用于研究抗致癌物和抗促癌物。本实验用昆明种小鼠,以DMBA和巴豆油分别作为启动剂和促癌剂,诱发出小鼠皮肤乳头状瘤,观察到原花青素有明显的抑制乳头状瘤生成作用,其抑瘤作用主要在促癌阶段。

80年代末发现,内皮细胞舒张因子(EDRF)就是NO后,有关NO的研究蓬勃兴起。作为一种介质,在形成有致癌作用的亚硝酸盐、DNA损伤和与慢性感染及炎症有关的基因突变方面具有重要作用。若NO持续高浓度地存在于细胞中,则可损伤DNA并导致基因突变,最终形成肿瘤^[4]。本研究结果显示小鼠皮肤乳头状瘤NO含量显著增高,提示

NO可能在乳头状瘤的形成过程中起一定作用。原花青素能显著性降低促癌阶段小鼠皮肤中NO的含量,而对启动阶段小鼠皮肤中NO的含量未见显著性影响,这也与原花青素能对抗促癌阶段小鼠皮肤乳头状瘤的形成实验结果一致,进一步表明NO可能参与小鼠皮肤乳头状瘤的形成。

皮肤组织受巴豆油或佛波酯类促癌剂处理后,引起的最明显的反应之一是炎症反应^[5]。佛波酯类促癌剂引起细胞产生和释放一些炎性物质(包括前列腺素、花生四烯酸等),并使吞噬细胞渗出,产生大量活性氧自由基,它们在促癌过程中起着重要作用。由于几乎所有的佛波酯诱发小鼠耳廓肿胀的抑制剂均极可能是有效的抗促癌剂,因此这一体内实验已成为目前抗促癌剂的常用筛选模型之一^[2]。小鼠耳廓肿胀实验证实,原花青素对巴豆油引起的炎症反应有明显的抑制作用,提示原花青素具有较强的抗促癌效果。

参考文献

- 1 Clarke E, Hecker E. *Naturwissenschaften*, 1965, 52(15):446
- 2 Gschwendt M, Kittstein W, Frstenberger G, *et al.* *Cancer Lett.* 1984, 25 (2):177
- 3 Nishno H, Yoshioka K, Iwashima A, *et al.* *Jpn J Cancer Res*, 1986, 77 (1):33
- 4 Ohshima H, Bartsch H. *Mutat Res*, 1994, 305 (2):253
- 5 Marks F. Tumor Promotion in Skin; Are Active Oxygen Species Involved? In: Sies H, ed. *Oxidative Stress*. Academic Press Inc (London) Ltd., 1985:43

(2000-05-22 收稿)

蟾蜍灵对人胃癌细胞系 MGc-803 的细胞毒作用

中国人民武装警察部队医学院(天津 300162) 陈小义* 徐瑞成 陈 莉
天津药物研究院 钱 进

摘 要 蟾蜍灵(bufofin)是我国传统中药蟾酥中蟾毒的主要成分之一,研究其抑癌作用及机制具有重要意义。采用台盼蓝染色法、噻唑蓝还原法和光镜观察 bufofin 对人低分化胃腺癌细胞系 MGc-803 的生长抑制作用。结果显示,0.01 μmol/L 及以上浓度 bufofin 对 MGc-803 细胞具有显著的抑制作用,IC₅₀值约为 0.1 μmol/L。bufofin 抑制 MGc-803 生长的机制是致使细胞核染色质凝缩、碎裂, DNA 损伤,胞浆 RNA 含量下降,导致细胞死亡。

关键词 蟾蜍灵 细胞毒作用 胃癌细胞系

Studies on the Cytotoxicity of Bufalin on Human Gastric Cancer Cell MGc-803 *in vitro*

Medical College of Chinese People's Armed Police Forces (Tianjin 300162) Chen Xiaoyi, Xu Ruicheng, Chen Li
Tianjin Institute of Pharmaceutical Research Qian Jin

Abstract To study the cytotoxic activity of bufofin, one of the components of bufadienolides in the

* Address: Chen Xiaoyi, Medical College of CPAPF, Tianjin

陈小义 37岁,副教授,第三军医大学分子生物学研究生毕业,主要从事细胞与分子遗传学的教学与科研,曾于 American Journal of Medical Genetics 等国内外期刊上发表论文 10 余篇。获得军队科技进步二等奖等 4 项。