

# G9315抗促癌和抑制促癌物诱发的脂质过氧化作用

中国医学科学院肿瘤研究所(北京 100021) 傅乃武\* 刘朝阳 张如意\*\*

**摘要** G9315是从胀果甘草中提取的含有6个黄酮体的混合物。2mg剂量明显抑制二甲基苯蒽(DMBA)合并巴豆油诱发的小鼠皮肤乳头瘤的生成,表现出较强的抗促癌作用。10 $\mu$ g/ml显著抑制巴豆油诱发的Wistar大鼠中性粒细胞化学发光(chemiluminescence, CL), 20 $\mu$ g/ml明显抑制巴豆油诱发的Balb/c新生小鼠皮肤表皮细胞和Balb/c小鼠肝线粒体的CL, 显著对抗巴豆油诱发的Balb/c小鼠肝线粒体的脂质过氧化、使丙二醛(MDA)产量明显减少。

**关键词** G9315 抗促癌 化学发光 脂质过氧化

我们曾对胀果甘草中14种主要黄酮体和3种三萜类化合物进行了抗氧化研究<sup>[1]</sup>,发现有些黄酮体具有较明显的抗氧化作用。G9315是含6个黄酮体的混合物。报道它的抗促癌和抑制促癌物诱发的脂质过氧化作用。

## 1 材料和方法

1.1 动物:昆明种小鼠、Balb/c小鼠和Wistar大鼠系我所动物室供给。雌性,小鼠体重18~22g,大鼠体重150~200g。Balb/c新生小鼠年龄2~4d。

1.2 药物和试剂:G9315是北京医科大学药学院植化室供给。巴豆油按文献<sup>[2]</sup>制备。DMBA和luminol系Sigma产品,其它试剂购自北京市化工厂。脱毛剂由3份硫化钠、1份洗衣粉和7份淀粉加水调成糊状而成。

1.3 小鼠皮肤二阶段诱癌和药物抑制试验:实验前1周用电推剪将小鼠背部皮肤(2 $\times$ 2cm<sup>2</sup>)的毛剃掉,再用脱毛剂脱去剩余毛发。观察1周,将个别于脱毛部位又长出新毛的小鼠剔出。其余小鼠随机分为3组。a)对照组:实验开始的第1天、第7天和第14天,于脱毛皮肤涂以DMBA 150 $\mu$ g/100 $\mu$ l丙酮·次,从第3周开始,每周2、5涂以巴豆油0.5mg/100 $\mu$ l丙酮·次,共12周。b)G9315+DMBA+巴豆油:DMBA和巴豆油的应用方法同对照组,只是在DMBA和巴豆油之前0.5h涂以G9315 2mg或4mg/100 $\mu$ l丙酮·次。c)抗促癌试验:DMBA和巴豆油的应用方法同对照组,从第3周开始在应用巴豆油之前0.5h涂以G9315 4mg/100 $\mu$ l丙酮·次。

1.4 Balb/c新生小鼠皮肤表皮的分离和化学发光(CL):取新生的2~4dBalb/c幼鼠,按Fischer等方法<sup>[3]</sup>分离皮肤表皮细胞。配成终浓度为2 $\times$ 10<sup>6</sup>/ml细胞悬液。取此细胞悬液0.9ml加入0.1ml luminol(终浓度2 $\times$ 10<sup>-4</sup>mol/L)放入化学发光仪暗室内(37 $^{\circ}$ C)1min测本底,再加入巴豆油20 $\mu$ l(30 $\mu$ g),立即测定。药物组测定先加入G9315,37 $^{\circ}$ C作用1min,再加入巴豆油。化学发光仪(SHG-1型,上海市计量局实验工厂),测定时的甄别电压为0.2V,每次测量时间30s,共测3次。从计算机上显示 $\bar{x}\pm s$ 。

1.5 Wistar大鼠中性粒细胞(PMN)的分离和CL:Wistar大鼠断头取血,加等量6% Dextran T500,分离PMN。取此PMN液0.9ml+luminol 0.1ml,先测本底,再加入巴豆油或G9315加巴豆油,分别测定。

1.6 Balb/c小鼠肝线粒体CL和脂质过氧化:按常规方法分离肝线粒体和用TBA法测定线粒体脂质过氧化产物丙二醛(MDA)。按Bradford法<sup>[4]</sup>测定蛋白。取1ml线粒体液放

\*Address: Fu Naiwu, Institute of Cancer, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing

\*\*北京医科大学药学院植化室

入化学发光仪暗室内 (37°C) 预温30s, 测本底, 然后加入巴豆油20 $\mu$ l (30 $\mu$ g) 混匀, 测定CL。药物组则先加入G9315液, 37°C温育20min, 再加入巴豆油20 $\mu$ l, 37°C温育30min, 按TBA法测MDA产量。

1.7 Balb/c小鼠肝微粒体CL: 按常规法分离肝微粒体。NADPH系统: 内含G-6-P 112 m mol/L, NADP 6 m mol/L, G-6-PD 0.5 Sigma unit。用0.1 mol/L Tris-HCl (pH 7.5) 配制。取0.5 ml微粒体液加入0.5 ml NADPH系统反应液, 37°C放置30s, 测本底。加入CCl<sub>4</sub> 20 $\mu$ l (终浓度5 m mol/L·ml), 混匀, 室温放置10 min, 测CL, 测定条件同上。G9315组则先加入药物, 室温温育10 min, 再加入CCl<sub>4</sub> 10 min后测定。

## 2 结果

2.1 G9315 对小鼠皮肤二阶段诱癌的抑制作用: 从图1A, 对照组小鼠第12周小鼠生瘤率为75%, G9315 2mg和4mg组分别为34.4%和28.1%。图1B, 对照组第12周每只小鼠生瘤数为1.56, G9315 2mg和4mg组分别为0.43和0.37。从图2, G9315 4mg仅在巴豆油促癌阶段应用, 也使小鼠生瘤率和生瘤数目明显减少。其抑瘤效力与在致瘤全过程都应用相同剂量的G9315。表示G9315主要影响促癌过程, 有较强的抗促癌作用。

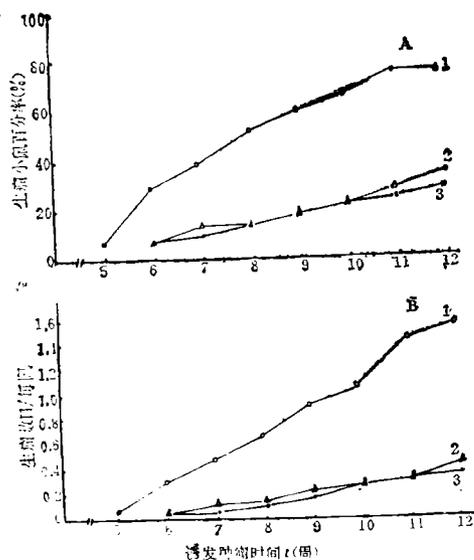


图1 G9315对DMBA和巴豆油诱发小鼠皮肤乳头瘤的抑制作用 每组鼠数32只

1-DMBA+巴豆油 2-G9315 2mg+DMBA+巴豆油 3-G9315 4mg+DMBA+巴豆油

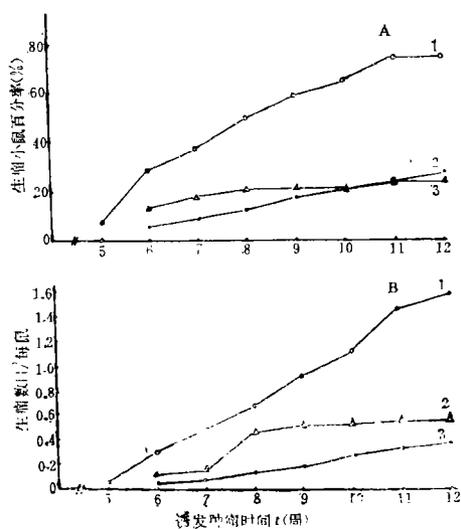


图2 G9315对抗巴豆油的促癌作用 每组鼠数32只

1-DMBA+巴豆油 2-G9315 4mg+DMBA+巴豆油 3-DMBA+G9315 4mg+巴豆油

2.2 G9315抑制巴豆油诱发的Balb/c新生小鼠皮肤表皮细胞CL: 从表1,  $2 \times 10^6$ /ml表皮细胞在静息状态下的CL为77.2, 加入巴豆油30 $\mu$ g, CL增至192.0, 净增114.8。G9315 20 $\mu$ g/ml明显抑制巴豆油刺激的表皮细胞CL。

2.3 G9315对抗巴豆油刺激的Wistar大鼠中性粒细胞(PMN)CL: 从表2, 大鼠PMN  $1 \times 10^6$ /ml在巴豆油30 $\mu$ g刺激下CL明显增加。G9315 10~20 $\mu$ g/ml, 显著对抗巴豆油诱发的PMN化学发光。

2.4 G9315抑制巴豆油诱发的Balb/c小鼠肝线粒体CL: 从表3, Balb/c小鼠肝线粒体加入巴豆油30 $\mu$ g, CL显著增加。G9315 20 $\mu$ g/ml明显对抗巴豆油刺激的CL增加。

**表1 G9315抑制巴豆油诱发的新生小鼠表皮细胞化学发光 (CL) ( $\bar{x} \pm s$ )**

组别	药物剂量 CL(计数/ $2 \times 10^6$ 细胞·30s)		增加数	P值
	( $\mu\text{g/ml}$ )	本底		
对照	—	77.2 $\pm$ 7.2(8)*	192.0 $\pm$ 15.1(8)	114.8
G9315	20	79.2 $\pm$ 7.0(7)	170.8 $\pm$ 18.8(7)	91.6 $<$ 0.05

\*实验次数=3, 括弧内数字为试验管数

2.5 G9315抑制巴豆油诱发的Balb/c小鼠肝线粒体脂质过氧化: 从表4, 巴豆油30  $\mu\text{g}$  显著增加肝线粒体脂质过氧化, MDA量明显增多。G9315 20~40 $\mu\text{g/ml}$ 明显对抗巴豆油诱发的脂质过氧化, MDA产量比巴豆油组显著减少。

2.6 G9315抑制CCl<sub>4</sub>诱发的Balb/c小鼠肝微粒体CL: 从表5, CCl<sub>4</sub> 5mmol/ml显著增加肝微粒体CL, G9315 10~20 $\mu\text{g/ml}$ 明显对抗CCl<sub>4</sub>刺激的肝微粒体CL。

### 3 讨论

小鼠皮肤二阶段诱癌试验是研究癌发生和癌变机理的经典模型, 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瘤, 观察到G9315有明显的抑制乳头瘤生成作用, 其抑瘤作用主要在促癌阶段。TPA是强促癌物, 它是巴豆油中主要活性成分。TPA对小鼠皮肤的促癌作用涉及许多形态和生化改变。现着重研究促癌剂巴豆油对不同细胞的脂质过氧化作用, 文献中多采用测定丙二醛(MDA)的产量作为脂质过氧化的指标。在完整细胞上, MDA被线粒体代谢的速度很快, 且与细胞其它一些成分发生反应, 故测得的MDA值比实际值要低。近来有人应用化学发光法测量细胞的脂质过氧化<sup>[5,6]</sup>, 观察到细胞的MDA产量和CL程度是一致的。我们应用CL法测量皮肤表皮细胞, 中性粒细胞和肝线粒体的脂质过氧化, 观察到在巴豆油作用下这些细胞的CL大大增加。同时测量了小鼠肝线粒体MDA在巴豆油刺激下显著增加。其结果与CL一致。Cl<sub>4</sub>C

**表2 G9315抑制巴豆油刺激大鼠中性粒细胞化学发光 (CL) ( $\bar{x} \pm s$ )**

组别	药物剂量 CL(计数/ $1 \times 10^6$ 细胞/30s)		增加数	P值
	( $\mu\text{g/ml}$ )	本底		
对照	—	72.8 $\pm$ 49(6)*	146.7 $\pm$ 27.3(6)	73.9
G9315	10	71.1 $\pm$ 2.3(6)	103.8 $\pm$ 4.2(6)	32.7**
G9315	20	69.8 $\pm$ 5.2(6)	94.5 $\pm$ 7.6(6)	24.7** $<$ 0.01

\* 实验次数=3, 括弧内数字为试验管数

\*\* 试验组与对照组比较

**表3 G9315抑制巴豆油诱导的小鼠肝线粒体化学发光 (CL) ( $\bar{x} \pm s$ )**

组别	药物剂量 CL(计数/1mg蛋白·30s)		增加数	P值
	( $\mu\text{g/ml}$ )	本底		
对照	—	92.5(6)*	221.1 $\pm$ 27.9(6)	128.6
G9315	20	87.4 $\pm$ 4.7(6)	169.7 $\pm$ 11.4(6)	82.3 $<$ 0.01

\*实验次数=3, 括弧内数字为试验管数

**表4 G9315对抗巴豆油诱发的小鼠肝线粒体脂质过氧化( $\bar{x} \pm s$ )<sup>\*</sup>**

组别	药物剂量 ( $\mu\text{g/ml}$ )	MDA ( $\mu\text{mol/mg}$ 蛋白)	P值
对照	—	1.33 $\pm$ 0.17*	
巴豆油	—	2.32 $\pm$ 0.11	$<$ 0.01**
G9315	20	1.47 $\pm$ 0.29	$<$ 0.01***
G9315	40	1.05 $\pm$ 0.32	$<$ 0.01***

\* 实验次数=3, 每次试验, 每个剂量平行3管

\*\* 与对照组比较 \*\*\* 与巴豆油组比较

**表5 G9315对抗CCl<sub>4</sub>诱发的小鼠肝微粒体CL ( $\bar{x} \pm s$ )**

组别	药物剂量 CL(计数/mg蛋白·30s)		增加数	P值
	( $\mu\text{g/ml}$ )	本底		
对照	—	182.0 $\pm$ 6.5*	945.4 $\pm$ 71.0	763.4
G9315	10	199.0 $\pm$ 11.1	557.4 $\pm$ 56.2	348.4 $<$ 0.01**
G9315	20	180.7 $\pm$ 10.8	449.5 $\pm$ 40.2	268.8 $<$ 0.01**

\*实验次数=3, 每次试验每个剂量平行2管

\*\* 与对照组比较

(下转第422页)

后随仿体重增加接近2kg, 身长增加接近5cm。

5.1.3 无效: 经治疗1个疗程, 临床症状无改善, 1年后随访无变化。

5.2 治疗结果: 对照组, 治愈36例, 见效12例, 无效14例, 总有效率77.42%, 1例病人服药3d, 症状有改善, 停药症状又出现, 故放在治疗无效。观察组, 治愈52例, 见效8例, 无效2例, 总有效率96.77%。治愈后均测试微量元素锌值仍在正常范围内。经统计学处理,  $P < 0.01$ , 有显著性差异。

## 6 讨论

对照组单纯用多酶片治疗, 对厌食症治疗效果不理想, 而观察组加用儿保1号后, 通过中西医结合治疗, 发挥了中草药在机体调节机制作用, 真正起到标本兼治目的, 儿保1号治疗厌食症疗效可靠, 效果满意。获得家长好评, 但其调解机制, 有待进一步研究。

汤剂喂药困难, 特别3岁以前, 长时间煎煮也麻烦, 制成冲剂简单易行, 口味酸甜, 小儿易接受, 且药性也无改变。

对大便次数多的病儿, 因儿保1号用后易使便次略增加。应注意使用, 以防引起腹泻, 减量或暂停使用。

(1995-02-23收稿)

(上接第413页)

对肝脏有严重损伤, 它的毒性机理是由于在微粒体内被细胞色素P-450系统激活, 使  $\text{CCl}_4 \rightarrow \text{CCl}_3$ , 使内质网脂质过氧化作用增加, 损伤肝脏。我们在体外条件下, 在肝微粒体中加入  $\text{CCl}_4$ , 在  $\text{NADPH-NADP}$  系统存在下,  $\text{CCl}_4$  使微粒体CL大大增加, 说明微粒体膜脂质过氧化明显增加。有许多材料支持此观点。在促癌过程中活性氧可能发挥重要作用<sup>[7]</sup>。从抗氧化剂预防促癌物对动物的促癌作用也间接地支持此观点。G9315是从胀果甘草中提取的含6个黄酮体的复合物, 在体外条件下这些黄酮体对几种活性氧 ( $\text{O}_2^-$ ,  $^1\text{O}_2$ ,  $\cdot\text{OH}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 有显著的对抗作用<sup>[1]</sup>。本文观察到G9315有效预防巴豆油对小鼠皮肤的促癌作用, 对巴豆油诱发的不同细胞的脂质过氧化有明显对抗作用, 这提示, G9315的抗促癌作用可能与抗氧化作用有一定关系。促癌过程是一个涉及许多种改变的复杂过程, 对G9315的抗促癌作用机理尚需进一步研究, 期望能够发展为一个有效的预防肿瘤的药物。

## 参 考 文 献

- 1 傅乃武, 等. 中药药理与临床, 1994, 10(5): 26
- 2 傅乃武, 等. 中国医学科学院学报, 1993, 15: 295
- 3 Fischer S M, et al. Caancer Res, 1985, 45: 3130
- 4 Bradford M. Anal Biochem, 1976, 72: 248
- 5 Smith M T, et al. Biochem Pharmacol, 1982, 31: 19
- 6 Trush M A, et al. Biochem Pharmacol, 1982, 81: 805
- 7 Troll et al. Ann Rev Pharmacol Toxicol, 1985, 15: 509

(1995-08-27收稿)

欢迎订阅

1996年《山西中医》、《中国医药学报》

## Determination of Matrine in Jieshenbao Lotion by TLC Scanning

Li Xiangyang, Tu Wanqian

TLC scanning technique was developed for the determination of matrine in Jieshenbao lotion. The method is simple, and highly sensitive, with an average recovery of 99.87% and a variation coefficient of 1.33%.

( Original article on page 405 )

## Antipromoting Tumor and Antioxidant Actions of G<sub>9315</sub>

Fu Naiwu, Liu Zhacyang, Zhang Ruyi

G<sub>9315</sub> was a complex extracted from *Glycyrrhizae inflata* Batal, and consisted of 6 flavonoids with significant antioxidant effects. At 2mg dose, it showed strong antipromoting effect on two stage carcinogenesis in mouse skin induced by DMBA plus croton oil. At 10 $\mu$ g/ml dose, it inhibited the chemiluminescence (CL) of polymorphonuclear leukocyte (PMN) of Wistar rat induced by croton oil, at 20  $\mu$ g/ml, it inhibited the CL of new born Balb/c mouse epidermis and liver mitochondria induced by croton oil. It also inhibited the CL of Balb/c mouse microsome induced by CCl<sub>4</sub>.

( Original article on page 411 )

## Effects of Dayecai (*Selaginella doedealeinii*) and Chinese Livistona (*Livistona chinensis*) on the activity of Protein Kinase C

Huang Cai, Qin Yanmei, Liang Nianci

Protein Kinase C (PKC) was partially purified from rat brain by DEAE-52 column chromatography, and the effects of ethanol extracts of *Selaginella doederleinii* and *Livistona chinensis* on PKC activity were investigated. In order to verify the reliability of the assay system, the effect of polymyxin B, a known PKC inhibitor, on the activity of PKC was also tested. Results showed that the ethanol extract of *S. doederleinii* strongly inhibited PKC activity with IC<sub>50</sub> 2.2 $\mu$ g/ml. The ethanol extract of *L. chinensis* (100 $\mu$ g/ml) inhibited PKC activity by 66.6%. Polymyxin B inhibited PKC activity with IC<sub>50</sub> 17.7 U/ml.

( Original article on page 414 )

## Effects of Big Black Ant and Its Compound Preparations on the RNA and DNA Levels in Testes of Rats

Wang Zhong, Zheng Xuexiu, Yuan Guoying, et al

80 male Wistar mice were randomly divided into 8 groups. The effects of the big black Ant preparations (alias Xuanju) obtained in different ways and their compound preparations in different dosages on the amount of RNA and DNA in the testes of mice were observed. After administration of the preparations for 21 days, the mice were decapitated and the testes were excised and weighed. The RNA and DNA in the testes were isolated and