

· 专论与综述 ·

原花色素的防癌抗癌作用

王修杰, 袁淑兰, 魏于全*

(四川大学华西医院 人类疾病生物治疗教育部重点实验室、肿瘤研究所、实验肿瘤研究室, 四川 成都 610041)

摘要: 原花色素是植物中广泛存在、含量丰富的一大类多酚化合物的总称。体外实验研究表明其对入乳腺癌、前列腺癌、结肠癌等肿瘤细胞具有生长抑制作用; 动物体内实验表明, 其对致癌因素诱发的皮肤癌、结肠癌、肺癌等肿瘤的发生和生长具有抑制作用。其作用机制与抗氧化作用、抑制肿瘤细胞增殖、诱导癌细胞凋亡和分化等有关, 对机体无明显不良反应, 值得进一步研究和开发。

关键词: 原花色素; 抗癌作用; 肿瘤预防

中图分类号: R 284

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2004)07-0830-04

Cancer prevention and anticancer activity of proanthocyanidins

WANG Xiu-jie, YUAN Shu-lan, WEI Yu-quan

Division of Experimental Oncology, Institute of Cancer Research, Key Laboratory of Biotherapy of Human Diseases of Ministry of Education, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

Key words: proanthocyanidins; anticancer activity; cancer prevention

原花色素是植物多酚化合物中含量最丰富的一类物质。流行病学和实验研究结果表明, 富含原花色素的食物或原花色素纯品具有预防肿瘤和心血管系统疾病等作用。近年来, 国外十分重视原花色素的防癌、抗癌作用及其机制研究, 报道较多, 国内却很少见。因此, 特将原花色素的防癌、抗癌作用及其作用机制作一简要综述, 以期引起国内同行的关注。

1 原花色素的来源和种类

原花色素(proanthocyanidins, PA) 又称原花青素(procyanidins) 或缩合鞣质(condensed tannins)^[1], 曾用英文名还有 leucoanthocyanins 和 pycnogenol。目前, 文献中多用原花色素。PA 是植物中广泛存在、含量丰富的一大类多酚化合物的总称, 为多种食品(如各种水果、豆类、巧克力)和饮料(如果汁、茶、葡萄酒、苹果酒、可可)的常见成分, 由不同数量的儿茶素或表儿茶素缩合而成。最简单的 PA 是儿茶素、表儿茶素, 或儿茶素与表儿茶素形成的二聚体, 另外还有三聚体, 一般平均多聚体数量为 3~11 不等, 多者可达 17 聚体, 由于其多聚体特性, 使 PA 与其他种类天然多酚特性不同^[1]。人体每日摄入 0.1~0.5 g PA, 具有广泛的生物学效应, 流行病学资料表明, 富含 PA 的葡萄酒和茶叶对肿瘤和心血管系统疾病等具有预防和保护作用, 用富含 PA 食品和 PA 纯品进行的细胞培养和动物实验研究, 也获得了相同的结果^[1,2]。

2 原花色素的防癌作用

近年来, 发现天然的肿瘤预防、干扰物质尤其受到重视,

其中最有可能的一类植物化学物质是来源于水果和蔬菜的多酚类抗氧化剂^[3]。

Yamagishi 等^[4]体外 Ames 突变试验研究发现, 加入 S-9 (毒理试验中常用的大鼠肝微粒体氧化酶) 时, 可液提取物 PA (CLPr) 对 2-氨基-1-甲基-6-苯咪唑 [4, 5-6] 吡啶 (PhIP) 所致鼠伤寒沙门氏菌 TA 98 突变具有很强的抑制作用, 结果提示了 PA 对肿瘤发生的预防作用。

结肠癌和乳腺癌是发达国家中两大最常见的肿瘤。为了确定几种植物食品提取物 PA 对结肠癌和乳腺癌的化学预防作用, Singletary 等^[5]用氧化偶氮甲烷 (AOM) 诱发大鼠结肠异型腺管灶 (aberrant crypt foci, ACF) 的形成, 饲料中加入 0.1%~1.0% 葡萄籽提取物 PA (GSPE) 喂养动物, 对 AOM 诱发 ACF 形成的抑制率为 72%~88%, 对远 1/3 段结肠鸟氨酸脱羧酶活性的抑制率为 20%~56%, 对细胞色素 P-450 2E1 活性无影响; Caderni 等^[6]对比研究了红葡萄酒提取物 PA 和绿茶提取物对结肠癌的预防作用, 用 7.4 mg/kg AOM 给雄性 F344 大鼠 sc 10 次, 诱发结肠癌, 实验组分别喂饲红葡萄酒提取物、绿茶提取物 50 mg/kg, 共 16 周。结果, 对照组动物腺瘤发生率为 86%, 红葡萄酒提取物组为 50%, 绿茶提取物组为 90%。实验组动物肿瘤组织细胞凋亡率高于对照组, 各组正常结肠黏膜细胞凋亡指数无差异。实验结果表明红葡萄酒提取物通过诱导肿瘤细胞凋亡对 AOM 诱发的结肠癌变具有阻断作用, 而绿茶提取物无效。喂饲 0.25% CLPr 对大鼠乳腺肿瘤发生率、多发性、肿瘤体

* 收稿日期: 2003-09-24

作者简介: 王修杰(1957—), 男, 四川资阳市人, 教授, 博士, 1998 年在日本东京大学医学部研修分子肿瘤学, 主要从事肿瘤病因学、发病机制和抗肿瘤药物药效学及作用机制等研究工作。 Tel: (028) 85423039 E-mail: xiujiwang@yahoo.com

积有下降趋势,但无显著性差异;但对 PhIP 诱发的胰腺外分泌部癌前病变嗜酸性细胞灶显著降低,具有量效关系^[4]。研究结果提示,植物食品提取物 PA 对人类消化系统肿瘤具有化学预防作用,值得进一步研究^[4-6]。

Yamagishi 等^[7]用 F344 大鼠多器官致癌模型,给雄性大鼠 ip 二乙基亚硝胺(100 mg/kg) 1 次,甲基亚硝基脲(20 mg/kg) 4 次,sc 二甲基胍(40 mg/kg) 4 次,同时饮水中加入两种亚硝胺致癌剂,实验开始 1 周后,实验组动物给予 0.025% 和 0.25% CLPr, 36 周时结束实验。服用 0.25% CLPr 组动物存活率明显高于对照组,肺部肿瘤发生率和多发性减少,甲状腺瘤减少,呈量效关系;小肠、结肠和肾等无明显改变。实验结果表明 CLPr 对肺癌和甲状腺肿瘤具有化学预防作用。

皮肤癌是紫外线照射过量地区人群多发的常见肿瘤,食用植物性药物保护皮肤免受紫外线辐射所致有害生物学作用正日益受到重视。Mittal 等^[8]研究发现,在常规饲料中加入 0.2% 和 0.5% GSPE 喂饲 SKH-1 无毛小鼠,对紫外线辐射诱发光致癌具有显著预防作用。动物喂养 30 周后,与对照组比,原花色素处理组动物的肿瘤发生率降低 20%~95%,肿瘤多发性降低 46%~95%,肿瘤大小降低 29%~94%,在完全致癌(启动+促进)、启动促进等阶段均有效。喂饲 0.5% GSP 可预防紫外线诱发乳头状瘤癌变的恶性转化,使癌变率降低 45%,癌多发性降低 61%,癌体积降低 75%。结果预示植物提取物 PA 对皮肤肿瘤的潜在预防作用。

3 原花色素对人肿瘤细胞的生长抑制作用

原花色素对人肿瘤细胞生长抑制作用研究主要是体外实验,体内抗癌作用研究很少。

Ye 等用细胞形态学和 MTT 细胞毒性试验研究了 GSPE 对 H636 人乳腺癌细胞 MCF-7、人肺癌细胞 A-427、人胃癌细胞 CRL-1739 和人白血病细胞 K562 的细胞毒作用,结果,GSPE 对人乳腺癌细胞、肺癌细胞、胃癌细胞具有剂量依赖性和时间依赖性细胞毒作用,用 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ GSPE 培养人乳腺癌细胞 MCF-7 24、48、72 h,细胞生长抑制率分别为 6.5%、30%、43%;当 GSPE 剂量为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,培养 24、48、72 h,癌细胞生长抑制率分别为 11%、35%、47%;对人肺癌细胞 A-427 和人胃癌细胞 CRL-1739 具有相同的生长抑制作用;对人白血病细胞 K562 无细胞毒作用。不同的是,GSPE 对正常人胃黏膜细胞和鼠巨噬细胞 J774A.1 具有促进生长和增强活性作用。结果表明,GSPE 对一些癌细胞具有细胞毒杀伤作用,对正常细胞具有促进生长和增强活性作用。

Agarwal 等^[13]用 25、50、75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ GSPE 处理体外培养的人乳腺癌细胞 MDA-MB468 1~3 d,癌细胞增殖抑制率达 90%~100%,具有量效关系。Huynh 等^[9]研究了松皮提取物 PA (Pyc) 对人乳腺癌细胞 MCF-7 和正常人乳腺细胞 MCF-10 的凋亡诱导作用,Pyc 处理乳腺癌细胞 MCF-7 后,凋亡细胞数显著高于对照组,但对正常人乳腺细胞 MCF-10 作用不明显。结果说明 Pyc 选择性地诱导乳腺癌细胞凋亡,对正常

乳腺细胞无作用。

前列腺癌是欧美地区男性的高发肿瘤,研究抗前列腺癌的有效药物受到高度重视。Agarwal 等研究了富含 PA 的 GSPE 对人前列腺癌细胞 DU 145 的抗增殖作用。用 10~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ GSPE 处理前列腺癌细胞 2~6 d,处理 2 d 后,50、75、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ GSPE 对癌细胞的抑制率分别为 27%、39%、76%,具有明显的剂量依赖性和时间依赖性,并诱导前列腺癌细胞凋亡^[10,11],抑制裸鼠体内前列腺癌生长^[11]。

另外,还有研究报道 CLPr 对人结肠癌细胞 Caco-2 具有明显的抑制作用,使细胞周期阻滞于 G₂M 期,生长抑制率为 70%^[12];大麦麸多酚提取物 PA 对人白血病细胞 HL-60 具有诱导分化作用^[13];笔者进行初步实验研究结果表明,Pyc 对人肝癌细胞 SMMC-7721 具有显著的抑制作用,其抑制率达 70%,并抑制其克隆形成。

可见,植物提取物 PA 对某些人癌细胞增殖抑制作用是肯定的,具有潜在的临床应用和开发价值,值得进一步深入研究。

4 作用机制

关于植物提取物 PA 防癌、抗癌作用的机制研究,大多是基于体外培养细胞的细胞生物学和分子生物学研究,部分为体内生化实验研究。主要可以概括为以下几个方面。

4.1 抗氧化作用:植物提取物 PA 具有很强的抗氧化活性,当有氧存在时,自动氧化,产生 H₂O₂。GSPE 的生物可用性高,对自由基和自由基引起的脂质过氧化物和 DNA 损伤的保护作用比维生素 C、E 和 β 胡萝卜素还要高得多^[14]。生物化学分析测定发现 GSPE 在体内外试验系统中均可抑制紫外线和 Fe³⁺ 引起的脂质过氧化,其抑制率分别为 57%~66%、41%~77%,提示 GSPE 光保护作用和抗氧化作用机制^[8]。因此,一般认为膳食中多酚类化合物具有防癌、抗癌作用,正是由于其抗氧化作用,但目前尚缺乏直接实验依据。

4.2 调控细胞周期:用 GSPE 处理体外培养的人乳腺癌细胞 MDA-MB468 后,流式细胞术(FACS)分析测定发现,细胞周期进程明显不同于非处理细胞,在各时间点和剂量组均出现 G₁ 期阻滞,S 期细胞数下降,75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ GSPE 处理癌细胞 24 h,使 G₁ 期细胞达 71%,G₂M 期细胞增加,S 期细胞减少;分子生物学研究发现 GSPE 调控 G₁ 期相关调节因子,诱导 C_{ip1}/p21 表达增强,CDK4 表达下降,从而使细胞周期受阻,抑制癌细胞增殖^[3]。GSPE 对前列腺癌细胞 DU 145 增殖抑制作用同样是影响细胞周期,25~75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ GSPE 处理癌细胞 24、48、72 h 后分别使磷酸化-细胞外信号调控蛋白激酶 1 (ERK1) 活性下降 77%~88%、65%~93% 和 38%~98%;使 ERK2 活性分别下降 78%、19%~76% 和 63%~71%。相同剂量的 GSPE 使癌细胞 C_{ip1}/p21 增高 1.9 倍,CDK4 下调约 90%,CDK2 下调 50%,cyclinE 下调 60%,使癌细胞周期阻滞于 G₁ 期,对另一前列腺癌细胞 LNCaP 也具有相同的增殖抑制和诱导凋亡作用。研究结果表明 GSPE 对人前列腺癌具有很强的抑制作用,其机制与调控细胞分裂信号、细胞周期调节因子,诱导细胞 G₁ 期阻滞,增殖抑制和

凋亡有关。可见,原花色素同时具有抑制癌细胞增殖和诱导凋亡作用^[3,12]。

4.3 诱导凋亡: 体内外实验研究表明,植物提取物 PA 具有很强的诱导凋亡作用^[3,6,9-11]。用 40、80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Pyc 处理乳腺癌细胞和正常人乳腺细胞后,细胞形态、染色质浓缩、核 DNA 片段、DNA 链断裂、凋亡小体等凋亡相关指标显著高于未处理细胞^[9];用 GSPE 处理人前列腺癌细胞 48~72 h 后, caspases 3、7、9 剪切片段及聚(ADP-核糖)多聚酶(polyADP-ribose polymerase, PARP)含量增加,先用 caspase 抑制剂处理癌细胞后,几乎全部抑制 GSPE 诱导的细胞凋亡。结果表明 GSPE 诱导癌细胞凋亡的可能机制为引起线粒体损伤,释放细胞色素 C 进入胞浆,激活 caspase 导致 PARP 剪切,致癌细胞凋亡^[14]。

4.4 诱导分化: 植物提取物 PA 对癌细胞诱导分化作用机制的研究相对较少^[3,13]。1998 年, Tamagawa 等^[13] 研究报道,大麦麸多酚提取物(BPE)具有诱导人白血病细胞 HL-60 分化标志物,增强四唑蓝(NBT)还原活性和 α -萘酚丁酸脂酶活性的作用,用大麦麸 PA 处理 HL-60 细胞后, NBT 阳性细胞率为 26%~40%, α -萘酚丁酸脂酶阳性细胞率为 22%~32%。原花色素还有增强维甲酸诱导 HL-60 粒细胞分化的作用和丁酸盐诱导 HL-60 单核细胞分化的作用。 Agarwal 等^[3] 研究发现 GSPE 对人乳腺癌细胞具有诱导分化作用,用 GSPE 处理体外培养的人乳腺癌细胞 MDA-MB468 后,细胞体积增大,变细长,呈纺锤状,其形态学特征与正常乳腺上皮细胞相似; Western Immunoblotting 检测发现上皮分化标志物角蛋白 8(cytokeratin 8)表达成倍增加,具有时间依赖和剂量效应关系。

4.5 影响血管生成: 植物提取物 PA 对血管生成的影响研究较多,机制较为复杂,结果不尽相同。 Sen^[15] 研究了 GSPE 对 TNF- α 诱导原代培养人脐静脉管内皮细胞表达细胞间黏附分子(ICAM-1)和血管内皮细胞黏附分子(VCAM-1)的影响。低剂量 GSPE (1~5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 使 VCAM-1 mRNA 表达水平降低,蛋白表达下调,对 ICAM-1 无影响;细胞共培养实验发现,GSPE 处理后使血管内皮细胞与 T 细胞之间的黏附降低。 Peng 等^[16] 研究发现用 PA 处理人脐静脉内皮细胞后,抑制 TNF- α 激活核因子 κB 和 VCAM-1、ICAM-1 表达,呈量效关系; Bagchi 等^[17] 研究表明用 GSPE 处理人脐静脉管内皮细胞后,可显著地抑制 TNF- α 诱导的内皮细胞与 T 细胞黏附表达 VCAM-1。已有研究表明 ICAM-1、VCAM-1 等细胞黏附分子过度表达与血管生成和肿瘤转移等有关^[16,18]。可见,植物提取物 PA 对细胞黏附分子表达的抑制作用可能对肿瘤血管生成和转移具有抑制作用。还有研究发现植物提取物 PA 对血管内皮生长因子(VEGF)表达和血管生成具有促进作用^[19,20]。 Khanna 等^[19] 研究了 GSPE 对体内皮肤创伤愈合的影响,用 VEGF 促进子驱动的荧光素酶报告系统,观察到 GSPE 在转录水平上增强 VEGF 表达,单用 GSPE 就能驱动 VEGF 转录。在小鼠背部作 2 个皮肤切开伤口,让其自行愈合,局部用 GSPE 处理伤口后,使伤口收缩和

闭合加快。组织病理学观察发现,局部用 GSPE 处理后,上皮区域增生明显,细胞密度增大,结缔组织沉积增多,组织结构改善,伤口边缘组织 VEGF 和黏黏素(tenascin)表达增加。研究结果提示,局部使用 GSPE 对改善皮肤创伤愈合有效^[19]。用核糖核酸酶保护试验(ribonuclease protection assay, RPA)研究了 GSPE 对氧化剂诱导角质化细胞 HaCaT 表达 VEGF 的促进作用和几种血管生成相关基因表达的影响,用 ELISA 法测定培养上清中 VEGF 蛋白量,结果用 GSPE 处理 HaCaT 细胞后,使 H_2O_2 和 TNF- α 诱导的 VEGF 表达和释放增加,提示 GSPE 对皮肤创伤愈合及其他相关皮肤疾病有益^[20]。但也有研究报道,GSPE 对 H_2O_2 和 TNF- α 诱导 HaCaT 细胞表达 VEGF 无影响。可见,植物提取物 PA 对血管生成的影响是双相的,作用机制是多方面的,但对肿瘤血管生成有无影响,目前尚无有关研究报道。

4.6 免疫调节作用: Lin 等^[21] 研究了 PA 的免疫药理活性,用人外周血单核细胞(PBMC)作靶细胞,³H 掺入法测定细胞增殖,结果原花色素 A1 抑制 PHA 刺激的 PBMC 增殖,其机制与阻断白细胞介素-2 和干扰素- γ (IFN- γ)产生有关;与此研究结果不同的是,GSPE 可以体外激活 PBMC 来源的 Th1 细胞 IFN- γ mRNA 转录,合成、分泌 IFN- γ 增加,胞浆内含 IFN- γ 的细胞数增加,而 Th1 细胞产生 IL-6 无影响,结果表明 GSPE 通过 IFN- γ 介导,具有很强的免疫刺激作用^[22],但体内是否具有免疫调节作用,尚未见研究报道。

4.7 减毒作用: 许多抗肿瘤化疗药物都有不同程度的不良反应,植物提取物 PA 对多种化疗药物都具有减毒作用^[23,24]。 Feng 等^[23] 研究了 Pyc 对抗癌药所致小鼠骨髓、心脏、免疫器官毒性的影响,结果: (1) 小鼠 ig 150 和 200 mg/kg Pyc,显著降低阿霉素所致肌氨酸磷酸激酶(CPK)活性及心率升高; (2) ig 100 和 150 mg/kg Pyc 显著拮抗 sc 环磷酰胺所致的胸腺 DNA 合成作用; (3) ig 150 和 200 mg/kg Pyc 显著地诱导红细胞和血红蛋白增加,对白细胞无影响; (4) Pyc 与抗癌药阿霉素、环磷酰胺等无拮抗作用。结果提示 Pyc 对化疗药物所致不良反应具有保护作用。 Joshi 等^[24] 用咪托蒽醌(lda)和 4-羟基过氧环磷酰胺(4-HC)处理体外培养的张氏肝细胞,用 MTT 法测定细胞增殖活性。结果,GSPE 明显降低 lda、4-HC 对张氏肝细胞的生长抑制作用;流式细胞术检测发现,GSPE 处理使化疗药物诱导的张氏肝细胞凋亡减少; Western blotting 和 RT-PCR 检测凋亡相关基因表达,GSPE 处理使张氏肝细胞 Bcl-2 表达增加, p53 和 cmyc 表达降低。结果表明 GSPE 可以降低肿瘤治疗中化疗药物所致的不良反应。GSPE 也可降低阿霉素所致小鼠的心脏毒性作用和血清肌苷激酶活性,使心脏组织病理学改变减轻^[25]。

5 问题与展望

植物提取物 PA 在体内外实验研究中具有防癌、抗癌作用是无可置疑的,但是不同来源和种类的抗氧化剂的结构-活性关系,生物可用性和疗效差别很大。葡萄籽提取物 PA 的生物可用性高,目前报道的实验研究结果,多为 GSPE 的研究,其他植物提取物 PA 是否具有相同的作用,尚无研究

报道。

关于植物性 PA 的研究, 体外实验资料很多, 体内动物实验研究极少。由于体外实验所用细胞、实验条件的不同及动物肝脏代谢的种属差异, 其结果很难预测人体效果。同时, 并非所有多酚类及每一多酚的作用都有益, 有些具有致突变作用和/或原氧化剂效应, 干扰必需的生化代谢途径, 包括拓扑酶活性、前列腺素类化合物的生物合成和信号传导。另外, 临床实验需要 iv 多酚化合物剂量达 $1\ 400\ \text{mg}/\text{m}^2$ 才能见效, 目前靠食物添加不可能达到这一血清浓度。能否通过其他途径, 改善植物性 PA 的代谢、吸收, 增加其血清浓度, 使之发挥更大的生物学作用, 值得研究。

国外对天然植物成分防癌、抗癌的研究开发相当重视, 欧盟第 5 次生命质量与生活资源框架会议“食品营养和健康—1 号行动”确定了对膳食抗氧化剂的功效研究。该项目研究的目的是对膳食抗氧化剂的功效进行必要的研究, 尤其强调细胞水平的功效研究。我国地大物博, 植物资源十分丰富, 许多水果饮料加工生产过程中的副产品都未得到很好的利用, 我们应加快对植物性 PA 的研究, 尽快与国际接轨, 将会获得巨大的社会效益和经济效益。

References

- [1] Dóñez S, Brezillon C, Rabot S, *et al.* Polymeric proanthocyanidins are catabolized by human colonic microflora into low molecular weight phenolic acids [J]. *J Nutr*, 2000, 130: 2733-2738.
- [2] Santos-Buelga C, Scalbert A. Proanthocyanidins and tannin-like compounds in human nutrition [J]. *J Food Sci Agric*, 2000, 80: 1094-1117.
- [3] Agarwal C, Shama Y, Zhao J, *et al.* A polyphenolic fraction from grape seeds causes irreversible growth inhibition of breast carcinoma MDA-MB468 cells by inhibiting mitogen-activated protein kinases activation and inducing G1 arrest and differentiation [J]. *Clin Cancer Res*, 2000, 6: 2921-2930.
- [4] Yamagishi M, Natsume M, Osakabe N, *et al.* Effects of cacao liquor proanthocyanidins on PhIP-induced mutagenesis *in vitro*, and *in vivo* mammary and pancreatic tumorigenesis in female Sprague-Dawley rats [J]. *Cancer Lett*, 2002, 185: 123-130.
- [5] Singletary K W, Meline B. Effect of grape seed proanthocyanidins on colon aberrant crypts and breast tumors in a rat dual-organ tumor model [J]. *Nutr Cancer*, 2001, 39: 252-258.
- [6] Caderni G, Filippo C D, Luceri C, *et al.* Effects of black tea, green tea and wine extracts on intestinal carcinogenesis induced by azoxymethane in F344 rats [J]. *Carcinogenesis*, 2000, 21(11): 1965-1969.
- [7] Yamagishi M, Natsume M, Osakabe N, *et al.* Chemoprevention of lung carcinogenesis by cacao liquor proanthocyanidins in a male rat multiorgan carcinogenesis model [J]. *Cancer Lett*, 2003, 191(1): 49-57.
- [8] Mittal A, Elmetts C A, Katiyar S K. Dietary feeding of proanthocyanidins from grape seeds prevents photocarcinogenesis in SKH-1 hairless mice: relationship to decreased fat and lipid peroxidation [J]. *Carcinogenesis*, 2003, 24(8): 1379-1388.
- [9] Huynh H T, Teel R W. Selective induction of apoptosis in human mammary cancer cells (MCF-7) by pycnogenol [J]. *Anticancer Res*, 2000, 20(4): 2417-2420.
- [10] Tyagi A, Agarwal R, Agarwal C. Grape seed extract inhibits EGF-induced and constitutively active mitogenic signaling but activates JNK in human prostate carcinoma DU 145 cells: possible role in antiproliferation and apoptosis [J]. *Oncogene*, 2003, 22(9): 1302-1316.
- [11] Agarwal C, Singh R P, Agarwal R. Grape seed extract induces apoptotic death of human prostate carcinoma DU 145 cells via caspases activation accompanied by dissipation of mitochondrial membrane potential and cytochrome C release [J]. *Carcinogenesis*, 2002, 23(11): 1869-1876.
- [12] Carneseccchi S, Schneider Y, Lazarus S A, *et al.* Flavonols and procyanidins of cocoa and chocolate inhibit growth and polyamine biosynthesis of human colonic cancer cells [J]. *Cancer Lett*, 2002, 175(2): 147-155.
- [13] Tamagawa K, Fukushima S, Kobori M, *et al.* Proanthocyanidins from barley bran potentiate retinoic acid-induced granulocytic and sodium butyrate-induced monocytic differentiation of HL-60 cells [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1998, 62: 1483-1487.
- [14] Bagchi D, Sen C K, Ray S D, *et al.* Molecular mechanisms of cardioprotection by a novel grape seed proanthocyanidin extract [J]. *Mutat Res*, 2003, 523-524: 87-97.
- [15] Sen C K, Bagchi D. Regulation of inducible adhesion molecule expression in human endothelial cells by grape seed proanthocyanidin extract [J]. *Mol Cell Biochem*, 2001, 216: 1-7.
- [16] Peng Q, Wei Z, Lau B H. Pycnogenol inhibits tumor necrosis factor- α induced nuclear factor kappa B activation and adhesion molecule expression in human vascular endothelial cells [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2000, 57(5): 834-841.
- [17] Bagchi D, Bagchi M, Stohs S, *et al.* Cellular protection with proanthocyanidins derived from grape seeds [J]. *Ann NY Acad Sci*, 2002, 957: 260-270.
- [18] Nakao S, Kuwano T, Ishibashi T, *et al.* Synergistic effect of TNF- α in soluble VCAM-1-induced angiogenesis through alpha(4) integrins [J]. *J Immunol*, 2003, 170(11): 5704-5711.
- [19] Khanna S, Venojarvi M, Roy S, *et al.* Dermal wound healing properties of redox-active grape seed proanthocyanidins [J]. *Free Radic Biol Med*, 2002, 33(8): 1089-1096.
- [20] Khanna S, Roy S, Bagchi D, *et al.* Upregulation of oxidant-induced VEGF expression in cultured keratinocytes by a grape seed proanthocyanidin extract [J]. *Free Radic Biol Med*, 2001, 31(1): 38-42.
- [21] Lin L C, Kuo Y C, Chou C J. Immunomodulatory proanthocyanidins from *Ecdysanthera utilis* [J]. *J Nat Prod*, 2002, 65: 505-508.
- [22] Nair N, Mahajan S, Chawda R, *et al.* Grape seed extract activates Th1 cells *in vitro* [J]. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2002, 9(2): 470-476.
- [23] Feng W H, Wei H L, Liu G T. Effect of pycnogenol on the toxicity of heart, bone marrow and immune organs as induced by antitumor drugs [J]. *Phytomedicine*, 2002, 9(5): 414-418.
- [24] Joshi S S, Kuszynski C A, Bagchi M, *et al.* Chemopreventive effects of grape seed proanthocyanidin extract on Chang liver cells [J]. *Toxicology*, 2000, 155(1-3): 83-90.
- [25] Bagchi D, Sen C K, Ray S D, *et al.* Molecular mechanisms of cardioprotection by a novel grape seed proanthocyanidin extract [J]. *Mutat Res*, 2003, 523-524: 87-97.