

温郁金提取液对化学致癌剂致大鼠胃癌的预防作用

徐磊, 吕宾, 俞林峰

徐磊, 吕宾, 俞林峰, 浙江中医药大学附属第一医院消化科
浙江省杭州市 310006

徐磊, 浙江中医药大学消化内科硕士, 主要从事消化系统疾病的研究。

通讯作者: 吕宾, 310006, 浙江省杭州市邮电路54号, 浙江中医药大学附属第一医院消化科。lvbin@medmail.com.cn

电话: 0571-87032028 传真: 0571-87077785

收稿日期: 2007-03-19 修回日期: 2007-08-07

Chemoprevention of gastric cancer in rats by a wet-distillation extract of *radix curcumae*

Lei Xu, Bin Lv, Lin-Feng Yu

Lei Xu, Bin Lv, Lin-Feng Yu, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310006, Zhejiang Province, China

Correspondence to: Bin Lv, the First Affiliated Hospital of Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine, 54 Youdian Road, Hangzhou 310006, Zhejiang Province, China. lvbin@medmail.com.cn

Received: 2007-03-19 Revised: 2007-08-07

Abstract

AIM: To study the chemopreventive effects of a wet-distillation extract of *radix curcumae* in a wistar rat model of stomach carcinogenesis induced by *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (MNNG).

METHODS: Eighty 6-week-old male wistar rats were randomly divided into 5 groups of 16 animals each. Rats were given water and 5 mL normal saline daily (group A); MNNG and 5 mL normal saline daily (group B); 10 mg/kg celecoxib daily (group C); 1 kg/L wet-distillation extract of *radix curcumae*, 5 mL daily (group D); and 2 kg/L wet-distillation extract of *radix curcumae*, 5 mL daily (group E). Animals in groups B-E drank water containing MNNG (100 mg/L) and were given 100 g/L NaCl in the initial 6 wk. All animals received treatment for 40 weeks and were then sacrificed at week 41. Gastric tumors were evaluated histologically.

RESULTS: Thirty-two rats died during the experiment and 48 completed the experiment.

Incidence of gastric cancer was 0.0% in Group A, 44.4% in Group B, and 12.5% in Groups C-E. We found that there was a statistically significant difference in the incidence of tumor formation ($P < 0.05$), and volume ($4.4 \pm 0.8 \text{ cm}^3$, $6.6 \pm 0.6 \text{ cm}^3$, $3.4 \pm 0.6 \text{ cm}^3$ vs $11.5 \pm 1.7 \text{ cm}^3$; all $P < 0.01$) in Groups C-E compared with Group B.

CONCLUSION: The wet-distillation extract of *radix curcumae* can reduce the incidence of gastric cancer and tumor growth in rats.

Key Words: *Radix curcumae*; Gastric cancer; Chemoprevention

Xu L, Lv B, Yu LF. Chemoprevention of gastric cancer in rats by a wet-distillation extract of *radix curcumae*. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(24): 2589-2592

摘要

目的: 探讨温郁金蒸馏提取液对化学致癌剂 *N*-甲基-*N'*-硝基-亚硝基胍(MNNG)诱导Wistar大鼠胃癌的作用。

方法: ♂ Wistar大鼠80只随机分为A, B, C, D, E 5组, 每组16只, A组为对照组, B组为模型组, 分别自由饮用净化水和100 mg/L MNNG液同时予生理盐水5 mL ig 1次/d; C组为塞来昔布组, 饮用MNNG同B组, 同时予10 mg/kg塞来昔布5 mL ig 1次/d; D为低剂量郁金组, E组为高剂量郁金组, 饮用MNNG同B组, 同时分别予1和2 kg/L温郁金水蒸气蒸馏提取液5 mL ig 1次/d, 持续40 wk。41 wk后处死动物, 分组拍照片并行组织病理切片比较大体和组织学变化。

结果: 实验期间大鼠死亡32只, 余48只完成实验。A, B, C, D, E组胃癌发生率分别为0.0% (0/16), 44.4%(7/16), 12.5%(2/16), 12.5%(2/16), 12.5%(2/16); 与B组相比, C, D, E组胃癌发生率($P < 0.05$)和肿瘤体积($4.4 \pm 0.8 \text{ cm}^3$, $6.6 \pm 0.6 \text{ cm}^3$, $3.4 \pm 0.6 \text{ cm}^3$ vs $11.5 \pm 1.7 \text{ cm}^3$; $P < 0.01$)显著降低; C, D, E组相互比较差异无显著性($P = 1.000$)。

结论: 温郁金水蒸气蒸馏提取液对MNNG诱

■背景资料

目前, 针对天然药物对胃癌化学预防的研究甚少。现代研究发现郁金提取物对体内外肿瘤细胞的增殖均有抑制作用, 但对原发胃癌模型的研究少有报道。因此本文探讨温郁金水蒸气蒸馏提取液对化学致癌剂诱导大鼠胃癌的预防作用。

■创新盘点

国内外多单独研究郁金的水溶或醇溶成分,采用水蒸气蒸馏法制备提取液,既可以保留其挥发油成分,又保留水溶性成分,而且符合传统水煎服药方法,可以最大程度利用其有效活性成分,而且郁金提取物对原发胃癌模型的研究报道很少。

导的大鼠胃癌有预防作用。

关键词: 温郁金; 胃癌; 化学预防

徐磊, 吕宾, 俞林峰. 温郁金提取液对化学致癌剂致大鼠胃癌的预防作用. 世界华人消化杂志 2007;15(24):2589-2592
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2589.asp>

0 引言

目前, 针对胃癌化学预防的研究大多集中在抗 *H. pylori* 的感染、非甾体类消炎药及抗氧化剂等, 对天然药物的研究甚少. 温郁金是临床上常用的抗肿瘤中药, 具有活血化淤, 利胆退黄、抗炎、抗肿瘤的功效. 现代研究发现郁金提取物对体外肿瘤细胞的增殖均有抑制作用, 但对原发胃癌模型的研究少有报道. 我们探讨温郁金水蒸气蒸馏提取液对化学致癌剂 *N*-甲基-*N'*-硝基-亚硝基胍(MNNG)诱导大鼠胃癌的预防作用。

1 材料和方法

1.1 材料 ♂ Wistar大鼠6 wk 80只, 体质量180-200 g, 购自中科院上海动物研究所, 饲养温度24±2℃, 湿度55%±5%, 噪音<50 db, 每12 h一次亮暗循环, 用全价营养颗粒饲料饲养, 专人管理. MNNG购自Adrich公司, 温郁金产自浙江温州, 温郁金水蒸气提取液由本院制剂中心制备, 塞来昔布购自Searle公司。

1.2 方法 Wistar大鼠随机分为A, B, C, D, E 5组, 每组16只, A组为对照组, 自由饮用净化水同时予生理盐水5 mL ig每天1次; B组为模型组, 自由饮用100 mg/L的MNNG液同时予生理盐水5 mL ig每天1次; C组为塞来昔布组, 饮用MNNG同B组, 同时予10 mg/kg塞来昔布5 mL ig每天1次; D组为低剂量郁金组, E组为高剂量郁金组, 饮用MNNG同B组, 同时分别予1和2 kg/L的温郁金水蒸气蒸馏提取液5 mL, 每天ig 1次, 持续40 wk. MNNG纯度>97%, NaCl为普通食盐, MNNG溶液新鲜配制, 每天用分析天平称取0.288 g MNNG, 加入净化水2880 mL中, 避光用磁性搅拌机搅拌4 h, 使之完全溶解后分装于16只外涂黑油漆的饮水瓶中, 由动物自由饮用, B-E组实验前6 wk予100 g/L NaCl 1 mL每周ig 1次^[1]. 每周1次测动物体质量, 分组记录, 如发现在实验期间死亡的动物均进行解剖, 大体观察并留取组织学标本. 实验结束时大鼠禁食不禁水24 h, 25 g/L戊巴比妥钠ip麻醉后处死, 在距贲门和幽门1.5 cm处结扎、离断, 取出全胃, 沿胃大弯剪开,

冰生理盐水冲洗, 滤纸吸干后铺开, 以大头针固定在泡沫上后行大体观察, 做记录, 拍照片, 随后沿纵轴将腺胃分成5等分, 若发现肿瘤则取下称质量, 测量长和宽(cm), 按照公式(长×宽²)/2计算出肿瘤的近似体积(cm³). 组织固定于40 g/L甲醛中, 石蜡包埋, 病理连续切片为3 μm厚, HE染色。

采用水蒸气蒸馏法制备温郁金水蒸气蒸馏液. 把干燥粉碎的温郁金饮片粉500 g放入容积为2000 mL的长颈烧瓶中, 加水1500 mL, 密封, 开始加热蒸馏, 由冷凝管收集温郁金的挥发油成份, 2 h左右, 冷凝管不再收集到挥发成份, 蒸馏完毕. 拆开冷凝装置, 把温郁金水煎部分稀释到5000 mL, 过滤, 离心, 浓缩为250 mL(浓度相当于0.002 g/L), 与收集到的挥发油成份相混和, 乳化, 分装于5 mL的小安瓿瓶中, 密封, 4℃避光冷藏备用。

统计学处理 应用SPSS11.0医学软件包, 分别相互比较各组动物的体质量、肿瘤体积、肿瘤发生率(患肿瘤动物占实验动物的百分比)、癌前病变发生率. 动物体质量、肿瘤体积采用 *t* 检验, 肿瘤发生率、癌前病变发生率采用 χ^2 检验, 以 *P*<0.05为差异有显著性。

2 结果

2.1 大体观察和平均体质量 在实验过程中大鼠死亡32只, 其中A组7只, B组6只, C组4只, D组7只, E组8只, 实验前20 wk死亡24只, 解剖发现肺淤血或者见两肺多个陈旧性出血点, 胃大体未见明显异常, 肠内无血便、溃疡、新生物等, 肝脏色红柔软, 腹腔内未见肿大淋巴结. 死亡原因可能与ig时药物误吸入呼吸道有关, 胃组织病理示黏膜慢性炎症, 未见癌前病变和肿瘤. 24 wk死亡4只, 均死于肺淤血, 2只有溃疡产生(B组和E组), 36 wk死亡4只, 其中1只病理示胃癌(B组), D组1只E组2只死于肺淤血, 属D组者病理示有上皮内瘤变. 实验期间死亡动物无论有无发生肿瘤, 均作为有效动物, 列入实验结果统计. 40 wk实验结束时, 共存活48只大鼠, A组(对照组)的体质量(477.9±42.5 g)明显大于B, C, D, E组 (*vs* 380.4±39.3 g, 393.4±54.6 g, 388.9±67.9 g, 408.3±22.6 g, *P*<0.01), B组的体质量和C, D, E组相比无显著性差异(*P*>0.05); D, E组之间, C组和D, E组之间亦无显著性差异(*P*>0.05)。

2.2 总体肿瘤发生率 经组织学证实, A组无胃癌发生, B组胃癌发生率为44.4% (*vs* A组, *P*<0.01);

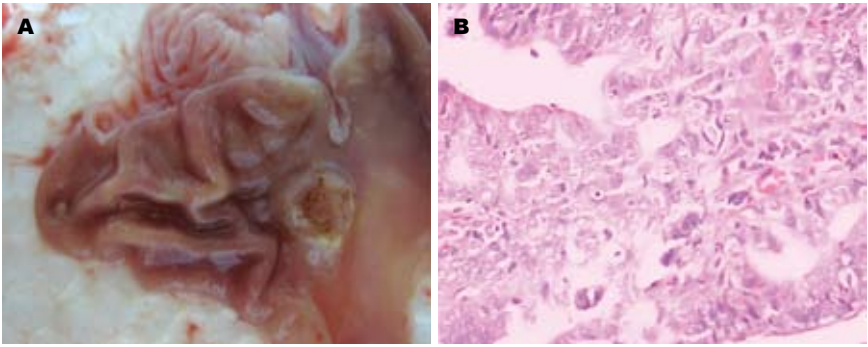


图 1 胃肿瘤. A: 大体观MMNG诱导大鼠胃肿瘤; B: 中分化腺癌(HE染色×200).

■应用要点
温郁金不仅是发现新药的重要来源,而且可以为设计更理想的新药提供新的独特的化学结构,这些化学结构可被用做创制新药的先导化合物,本文研究发现温郁金对胃癌有化学预防作用,为后续有效成分分析、新药的开 发,打下了理论基础.

表 1 大鼠胃黏膜病变类型及发生率n(%)

分组	n	炎症	萎缩	肠化	上皮内瘤变	溃疡	胃癌
A	16	15(93.8)	0(0.0) ^a	0(0.0) ^a	0(0.0) ^a	0(0.0)	0(0.0) ^b
B	16	3(18.8)	2(12.5)	2(12.5)	1(6.3)	4(25.0)	7(44.4)
C	16	11(68.8)	2(12.5)	0(0.0)	1(6.3)	1(6.3)	2(12.5) ^a
D	16	9(56.3)	2(12.5)	1(6.3)	2(12.5)	0(0.0)	2(12.5) ^a
E	16	9(56.3)	3(18.8)	1(6.3)	1(6.3)	1(6.3)	2(12.5) ^a

^a*P*<0.05, ^b*P*<0.01 vs B组.

表 2 完成实验大鼠胃黏膜病变类型及发生率n(%)

分组	n	炎症	萎缩	肠化	上皮内瘤变	溃疡	胃癌
A	9	8(93.8)	0(0.0) ^a	0(0.0) ^a	0(0.0) ^a	0(0.0)	0(0.0) ^b
B	10	0(0.0)	2(0.0)	2(20.0)	1(10.0)	3(30.0)	6(60.0)
C	12	7(58.3)	0(16.7)	0(0.0)	1(8.4)	1(8.4)	2(16.7) ^a
D	9	2(22.2)	1(22.2)	1(11.1)	1(11.1)	0(0.0)	2(22.2) ^a
E	8	3(37.5)	1(6.3)	1(6.3)	1(6.3)	0(0.0)	2(25.0)

^a*P*<0.05, ^b*P* = 0.01 vs B组.

C, D, E组胃癌发生率均为12.5%, 均显著低于B组. 肉眼观察, 肿瘤多发生在胃窦部小弯侧, 与人类胃癌好发部位一致, 组织学诊断为腺癌(图1). 癌旁伴有萎缩、肠化和上皮内瘤变(表1).

2.3 完成实验大鼠肿瘤发生率 胃癌发生率A组0%, B组60%(6/10), C组16.7%(2/12), D组22.2%(2/9), E组25%(2/8); C, D组与B组比较差异均有统计学意义(*P*<0.05), E组胃癌发生率也较低(25% vs 70%, *P* = 0.058), 其他组织学变化如萎缩、肠上皮化生和上皮内瘤变等也均有发现(表2).

2.4 肿瘤体积 用游标卡尺测量肿瘤的长度和宽度, 按照公式(长×宽²)/2计算出肿瘤的近似体积, B组发生肿瘤的7只大鼠的平均肿瘤体积为(11.5±1.7)cm³; C, D, E组的平均肿瘤体积分别为(4.4±0.8)cm³, (6.6±0.6)cm³, (3.4±0.6)cm³, B组的平均肿瘤体积显著大于C, D, E组(*P*<0.01).

3 讨论

尽管在很多国家胃癌的发生率一直呈下降趋势, 但是最近的世界范围评估显示, 胃癌在所有癌症的发生中占第4位, 在癌症的死亡率排在第2位, 现有对进展期胃癌的治疗手段疗效均不尽如人意. 胃癌的发生可分为起动、促进和进展3个步骤, 是一个多步骤、多基因变化的过程. 从肿瘤的始发切断肿瘤发生的任一环节, 对肿瘤的预防及治疗具有重要意义. 天然药物不仅是发现新药的重要来源, 而且可以为设计更理想的新药提供新的独特的化学结构, 这些化学结构可被用做创制新药的先导化合物, 因此近年来备受重视. 目前国内外许多研究表明, 郁金的活性成分(姜黄色素类及挥发油)可抑制多种肿瘤细胞生长, 热点多集中在肿瘤发生、发展阶段, 而对肿瘤化学预防的研究鲜有报道, 而且这

■同行评价

本文采用动物实验的方法研究了温郁金提取液对MNNG诱导的大鼠胃癌发生的抑制作用。研究目的明确,思路清晰,方法可行,结果分析合理,并对在实验过程中死亡的动物进行了分析,可读性较强。

两种成分均存在吸收率低的问题,采用水蒸气蒸馏法制备提取液,既可以保留其挥发油成分,又符合传统水煎服药方法,可以最大程度利用其有效活性成分。

我们的研究表明,温郁金水蒸气蒸馏提取液能显著降低MNNG诱导的大鼠胃癌的发生率,肿瘤体积和瘤重也显著低于模型组,炎症、萎缩、肠化、上皮内瘤变的发生率未见显著降低。完成实验的大鼠未见消化道出血和其他器官明显损害,证明长期服用温郁金水蒸气蒸馏法提取液具有较高的安全性。本研究前6 wk采用100 g/L NaCl ig,全程予100 mg/L的MNNG自由饮用双重因素造模,40 wk时模型组的诱癌率为44.4%,显著高于对照组,说明这是一个成功的动物模型;实验结束时,采用选择性COX-2抑制剂塞来昔布干预的动物胃癌发生率显著低于模型组,且发生溃疡的比例和郁金组相比没有差异,证明塞来昔布具有预防胃癌的作用。

当前对温郁金抗癌机制的认识主要集中在抑制COX-2和脂氧合酶的表达、抑制血管生成作用、抗氧化、抑制癌基因表达,诱导凋亡;抑制端粒酶活性、调节细胞周期拮抗肿瘤相关细胞因子,抑制肿瘤细胞生长、侵袭和转移等方面^[2-7]。我们在前期工作中发现温郁金能抑制胃癌细胞IGF- I, IGF- II的分泌,从而拮抗其促有丝分裂、抗细胞凋亡、促进肿瘤细胞增生和分化作用^[8],下调瘤灶中VEGF的表达,减少瘤灶内的MVD,抑制肿瘤生长^[9],并提高鼠胃组织生长抑素水平^[10]。因此,我们认为,温郁金水蒸气蒸馏提取液可能通过上调胃肠道生长抑素的分泌,抑制IGF- I, IGF- II的分泌,并下调VEGF, COX-2的表达,干预胃癌的发生、发展。

胃癌化学预防的研究主要集中在选择性COX-2抑制剂、根除*H pylori*、抗氧化剂(类胡萝卜素、维生素C、维生素E和硒)上,根除*H pylori*可以降低高危人群发生胃癌的危险,但对胃黏膜萎缩、肠化的影响方面,结论还不一致。多项研究显示,长期服用NSAID的患者食管癌和胃癌发病危险性相应降低,然而传统NSAID因能引起严重的胃肠道副作用、肾功能损害而使其应用受到限制,高选择性COX-2抑制剂有望成为防治胃肠道肿瘤的新药。1999年, FDA批准celecoxib可用于遗传性家族性腺瘤性息肉病(FDP)的预防,这标志着COX-2抑制剂正式用于肿瘤预防。COX-2抑制剂可能通过抑制微

血管的生成,促进血管内皮细胞的凋亡,减少前列腺素的合成预防肿瘤,并能预防胃癌的淋巴转移。甲基硝基亚硝基胍(MNNG)诱发的Wistar大鼠胃癌模型与人类腺癌类似,是目前评价抗癌制剂的理想模型,被广泛应用于胃癌防治的研究。唐保东^{et al}^[1]研究表明, celecoxib可显著降低MNNG诱导的大鼠胃癌发生率和多发数,与模型组相比,胃癌发生率降低56%,肿瘤多发数降低80%,肿瘤体积减少近1000倍。张丽^{et al}^[11]发现,选择性COX-2抑制剂尼美舒利能显著降低ENNG诱导的大鼠胃癌率,缩小肿瘤体积,显著降低干预组大鼠胃腺部黏膜萎缩、肠化及上皮内瘤变发生率。

总之,温郁金水蒸气蒸馏提取液对胃癌有预防作用,为温郁金成为潜在的化学预防药物提供了证据。

4 参考文献

- 1 唐保东, 胡品津, 曾志荣, 林汉良, 何瑶. 特异性环氧化酶-2抑制剂预防胃癌的实验研究. 中华消化杂志 2004; 24: 158-161
- 2 Goel A, Boland CR, Chauhan DP. Specific inhibition of cyclooxygenase-2 (COX-2) expression by dietary curcumin in HT-29 human colon cancer cells. *Cancer Lett* 2001; 172: 111-118
- 3 Arbiser JL, Klauber N, Rohan R, van Leeuwen R, Huang MT, Fisher C, Flynn E, Byers HR. Curcumin is an in vivo inhibitor of angiogenesis. *Mol Med* 1998; 4: 376-383
- 4 Holy JM. Curcumin disrupts mitotic spindle structure and induces micronucleation in MCF-7 breast cancer cells. *Mutat Res* 2002; 518: 71-84
- 5 Squires MS, Hudson EA, Howells L, Sale S, Houghton CE, Jones JL, Fox LH, Dickens M, Prigent SA, Manson MM. Relevance of mitogen activated protein kinase (MAPK) and phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B (PI3K/PKB) pathways to induction of apoptosis by curcumin in breast cells. *Biochem Pharmacol* 2003; 65: 361-376
- 6 Chen A, Xu J. Activation of PPAR{gamma} by curcumin inhibits Moser cell growth and mediates suppression of gene expression of cyclin D1 and EGFR. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 288: G447-456
- 7 Lin JK, Lin-Shiau SY. Mechanisms of cancer chemoprevention by curcumin. *Proc Natl Sci Coun Repub China B* 2001; 25: 59-66
- 8 何必立, 吕宾, 徐毅, 苗青, 范一宏. 温郁金对胃癌细胞的抑制作用及其对IGF- I、IGF- II表达的影响. 世界华人消化杂志 2004; 12: 2761-2763
- 9 王佳林, 吕宾, 倪桂宝, 麻林爱, 徐毅. 温郁金对VEGF和MVD在人胃癌裸小鼠移植瘤中表达的研究. 肿瘤 2005; 25: 55-57
- 10 徐毅, 吕宾, 项柏康, 丁志山. 温郁金对鼠血浆和胃组织生长抑素水平的影响. 中国中西医结合消化杂志 2004; 12: 222-224
- 11 张丽, 陆红, 刘文忠, 陈晓宇, 施尧, 萧树东. 尼美舒利对乙基硝基亚硝基胍诱导大鼠胃癌的化学预防作用. 中华消化杂志 2003; 23: 391-394