

柠檬桉叶挥发油的抑瘤作用及毒性试验

药理学教研室

徐学儒 耿宝琴

陶 湘*

李国梁* 熊维政**

柠檬桉叶挥发油为桃金娘科(Myrtaceae)植物柠檬桉树(*Eucalyptus citrodora* Hook.f.)叶的挥发油。据药典及文献记载,柠檬桉对结核菌、金黄色葡萄球菌、肺炎双球菌、乙型链球菌、变形杆菌、伤寒杆菌、大肠杆菌等均显示抑菌作用^(1~3);其提取物对大鼠、小鼠、兔、猫具有降压作用⁽⁴⁾;临床曾将本品用于结核、痢疾、烧伤、化脓性疾病的治疗,取得一定疗效^(5,6);已有报道认为本品对二甲胍(DMH)诱发的小鼠大肠癌有抑制作用⁽⁸⁾。1978~1980年本室与海宁肿瘤防治研究室协作,进

行了该药的抑瘤试验及毒性研究。

供试品系湖南洞庭制药厂采集鲜嫩枝叶,行水蒸汽蒸馏,从馏液中分取油层;得挥发油粗制品,经精馏后得无色透明挥发油液。

抑 瘤 试 验

一、方法:实验用健康非纯系昆明小鼠,雌雄兼有,以小鼠肉瘤(S₁₈₀)及艾氏腹水癌(EC),另以非纯系Wistar小鼠进行瓦克氏肉瘤(Walker256、W₂₅₆)等移植性瘤株的筛选试验。操作按1978年常州“全国抗癌药物研究协作会议”推荐的《抗癌

表 1 柠檬桉叶挥发油的抑瘤作用

瘤 株	药物剂量Δ mg/kg/次(天)×次数	给药途径	实验动物数		平均瘤重(g) 或腹水量(ml) $\bar{x} \pm SD$	抑 瘤 率 (%)
			开始	结束		
ECΔΔ (腹水型)	对照组		11	11	7.52±1.78	
	给药组0.625×7	口 服	9	9	2.43±1.74	68.7**
	对照组		12	10	4.7±0.5	
	给药组0.25×6	腹腔注射	10	10	0.05±0.17	98.9**
	对照组		11	11	5.70±2.75	
	给药组0.25×7	腹腔注射	10	10	1.80±1.21	68.4**
S ₁₈₀	对照组		15	15	3.15±1.07	
	给药组0.15×7	腹腔注射	10	8	1.53±0.47	51.4**
	对照组		11	11	3.15±1.07	
	给药组0.625	口 服	9	9	2.01±0.92	36.2*
	对照组		10	9	2.18±1.20	
	给药组0.625×4 (隔日一次)	瘤局部注射	10	9	0.81±0.63	62.6**
W ₂₅₆	对照组		10	10	11.97±1.63	
	给药组0.125×4 (每日2次)	腹腔注射	10	9	8.06±2.30	32.7**
	对照组		8	7	11.40±3.04	
	给药组0.125×7	腹腔注射	8	6	4.40±1.61	61.4**
	对照组		8	8	14.24±2.66	
	给药组0.625×7	皮下注射	8	6	8.55±2.41	40.0*

Δ药物剂量均按原油计算;对照组以等量生理盐水 ΔΔ腹水癌(EC)观察指标系腹水量 *P<0.05; **P<0.01

#海宁肿瘤防治研究室药物组

**湖南洞庭制药厂技术室

药物体内筛选规程(草案)》进行。

二、抑瘤作用: 柠檬桉叶挥发油在动物耐受剂量下, 以不同剂量, 不同途径给药(表1), 均显示对 S_{180} 、EC、 W_{256} 有一定抑瘤作用, 实验经多次重复, 对小鼠EC的抑瘤率为67.5~98.9%, 对 S_{180} 的抑瘤率为36.2~62.8%; 对大鼠 W_{256} 的抑瘤率为32.7~61.4%。按成组比较的 t 测验分析结果的显著性见表1。但在仅有一次小鼠白血病(L_{615})实验中, 未显示本品有延长生命的作用。

抑制癌细胞合成的试验

采用放射自显影方法进行。取接种艾氏腹水癌的小鼠6只, 分为对照及给药两组。给药组小鼠在接种后2、4、6天分别腹腔注射1%柠檬桉叶挥发油0.2ml一次。对照组以等量的生理盐水腹腔注射。末次给药(或生理盐水)后1小时各鼠腹腔注射 3H -TdR(上海原子能所生产, 比活性13.4ci/mM) $20\mu ci$ 注射0.5、1、3、5、7小时后分别取腹水涂片, 甲醇固定, 用核-4乳胶涂片感光, 曝光8天后显影、定影、Giemsa染色, 计算标记指数LI(LI=标记细胞数/总细胞数 $\times 100$)。结果3次注射本品后, 明显抑制艾氏腹水癌细胞的DNA合成(表2)。经成组比较的 t 测验处理, 结果 $P < 0.001$, 表明两者差别极显著。

表2 柠檬桉叶挥发油对EC腹水癌细胞LI的影响

组别	LI (%)				
	注射 3H -TdR后时间(hr)				
	0.5	1	3	5	7
对照组	15.1	13.0	9.4	10.9	10.5
给药组	5.7	5.9	4.0	2.8	4.4

毒性试验

一、小鼠急性毒性试验: 按常规操作,

用寇氏法计算半数致死量。

1. 口服给药 $LD_{50} = 1.49ml/kg$ (按原油计, 下同), 95%可信限为1.36~1.62ml/kg。

2. 静注给药 $LD_{50} = 0.19ml/kg$, 其95%可信限为0.18~0.20ml/kg。

二、亚急性毒性试验

1. 方法: 选体重1.5~2.5kg, 雌雄兼有, 随机均分。给药组分低、中、高3个剂量组, 各组45天给予柠檬桉叶挥发油总量分别为23.9、48.4、72.3ml/kg。

观察一般情况, 体重变化, 并按常规检验法测定白细胞总数及分类百分比、血红蛋白、谷-丙转氨酶、血清尿素氮、心电图等指标。

2. 结果:

(一) 一般情况: 中、高剂量组实验兔以10%柠檬桉叶挥发油糖浆灌胃后, 由于对口腔、咽喉粘膜有刺激性, 兔出现拒服反应。改7%柠檬桉叶挥发油糖浆以鼻饲给药后, 直至45天实验结束, 实验兔一般均能耐受。低、中、高剂量组各有一兔于鼻饲时药物误入气管, 经解剖证实系窒息致死, 高剂量组37号兔于给药第8天死亡, 原因不明, 病理诊断为局灶性肺炎; 40号兔于给药第14天死亡, 病检发现肾小管上皮细胞轻度混浊肿胀, 腔内有红染分泌物, 肾小球包氏腔缩小, 狭小或消失, 同时伴有支气管肺炎的病理改变及小脓肿形成。

(二) 各观察指标分别于给药20、45天(实验结束)重复两次。第45天处死动物检取心、肺、肝、肾、脾、胃、十二指肠、食道, 个别兔增取输尿管、胆囊、胰等脏器组织进行病理检验。

(三) 各项实验结果分别见表3、4。

表3资料表明, 各组实验前后体重、血红蛋白、白细胞总数及分类百分比(后者数据从略), 经 t 测验处理实验前后对照或组间比较, 部分数据虽显示差异, 但其变化数值仍属正常值范围内波动, 故无实际意义。

表3 各组实验前后体重、血红蛋白、白细胞总数变化

组 别	给药时间(天)	实验动物数	体重* (kg) $\bar{X} \pm SD$	血红蛋白(g) $\bar{X} \pm SD$	白细胞总数(个/mm ³) $\bar{X} \pm SD$
对 照 组	给 药 前	10	1.84±0.37	8.98±1.97	7890±2560
	20	10	2.05±0.21	11.32±1.02**	10155±2469
	45	10	2.04±0.03	12.16±1.30**	10328±1866**
低 剂 量 组 (23.9ml/kg)	给 药 前	10	1.88±0.26	9.27±1.57	7845±1764
	20	10	2.03±0.20	10.87±0.97	9050±1688
	45	10	2.02±0.19	10.89±2.22	9356±2900
中 剂 量 组 (48.4ml/kg)	给 药 前	10	1.89±0.19	10.32±1.45	8315±2245
	20	9	2.01±0.18	10.99±1.07	10190±2642**
	45	8	1.88±0.05	11.60±1.86	8650±3297
高 剂 量 组 (72.3ml/kg)	给 药 前	10	1.83±0.16	10.03±1.18	7770±2633
	20	9	1.89±0.16	10.03±1.15	9138±2050
	45	9	1.86±0.44	9.05±0.77	5621±1575

*实验前后与组间比较, 体重均无显著差异 ($P>0.05$)**实验前后血红蛋白、白细胞总数经 t 测验有显著变化者 ($P<0.05$)

表4 各组谷—丙转氨酶、尿素氮的变化

组 别	给 药 时 间 (天)	谷—丙转氨酶(μ /100ml) $\bar{X} \pm SD$	尿素氮 (mg/dl) $\bar{X} \pm SD$
对 照 组	给 药 前	19.0±5.9	11.6±2.1
	20	41.0±11.9*	9.6±1.3*
	45	37.9±14.8	15.7±2.8
低 剂 量 组 (23.9ml/kg)	给 药 前	27.9±7.9	9.5±3.0
	20	34.0±6.2	11.1±2.6
	45	32.4±10.3*	17.1±2.5*
中 剂 量 组 (48.4ml/kg)	给 药 前	19.3±9.7	13.4±2.7
	20	34.9±12.6	13.8±2.3
	45	29.6±10.2	25.1±7.6*
高 剂 量 组 (72.3ml/kg)	给 药 前	18.9±9.0	12.9±2.5
	20	35.5±13.9*	10.4±1.5
	45	18.6±10.0	20.4±9.5

*给药前后比较, 差别显著 ($P<0.05$)

表4 资料提示, 对照实验中, 后期血清谷—丙转氨酶虽有升高, 但其波动仍在正常值范围之内; 高剂量组给药20天后谷—丙转氨酶略有升高, 但与对照组相比, 无统计学上差异。

表4 资料还表明, 各组尿素氮实验结束时均有增高, 低、中剂量组经 t 测验统计处理虽有显著性, 但各增高值仍在兔正常范围⁽⁹⁾, 且对照组于实验结束时亦有增高。

(四) 心电图变化: 各组实验前、中、

后的心率无显著变化, 心律未见异常。P—R 间期、QRS 时限, Q—T 间期和 S—T 段均无异常变化。

(五) 病理检查: 各组均有四分之一实验兔见肺实质、食道、胃、十二指肠粘膜出现不同程度充血、水肿及炎症细胞浸润。但给药组与对照组相比, 在数量和程度上无显著差别。肾组织仅高剂量组 40 号兔肾小管上皮细胞轻度混浊、肿胀, 腔内有红染分泌物, 肾小球包氏腔缩小、狭窄或消失, 肾小球减少等病理改变。中剂量 1 例肾曲小管上皮细胞轻度混浊、肿胀, 其余无特殊病理变化。

讨 论

一、文献对桉叶油的抗菌及临床应用曾有较多报道, 但迄今未见有关柠檬桉叶挥发油抑瘤作用的系统研究。本实验证明本品对多种移植性肿瘤均有一定抑制作用, 其抑瘤率分别为: EC 67.5~98.9%; S₁₈₀ 36.2~62.8%; W₂₅₈ 32.7~61.4%; 在 DMH 诱发小鼠大肠癌的实验中, 也证明本品对肿瘤的抑制作用⁽⁸⁾。实验经多种给药途径, 如口服、腹腔注射、肿瘤局部注射均显示出抑瘤作用, 提示本品可能有直接细胞毒作用, 或经体内转化后仍可产生抑瘤效应。采用放射自显影方法观察到本品能明显地抑制

肿瘤细胞的繁殖而发挥抗瘤作用。

二、亚急性毒性试验低、中、高剂量组给药剂量分别为小鼠口服 LD₅₀ 的 16.0、32.5、48.5 倍。高剂量组虽有两兔分别于用药后第 8 天、第 14 天死亡, 但其余动物于实验结束时均能耐受。各观察指标无论前后对照或与对照组比较, 均未见明显异常, 表明上述剂量未引起实验兔中毒。

文献报道, 病人用药后呼气中有桉叶油特殊的辛辣味。我们实验中亦发现家兔在嗅到此气味时即挣扎、拒服。灌胃时也发现本品对皮肤、口腔粘膜有一定刺激作用, 因此, 有关本品过渡临床使用制剂、剂型等问题, 有待进一步研究。

参 考 文 献

1. 江苏医学院, 中药大辞典, 第 1 版 上海: 上海人民出版社, 1977: 1793.
2. 包幼迪, 福建中医药 1963; 3: 31.
3. 李 荣 刘三秀, 中华内科杂志 1966; 8: 356.
4. Read George W, et al. C.A. 1971, 75, 126342d
5. 姜 非, 哈尔滨中医 1962; 8: 37.
6. 陈廷和, 等, 江西医药 1962; 1: 22.
7. 李桂章 霍书智, 药学通报 1960: 6: 329.
8. 耿宝琴 朱永廉, 浙江医科大学学报 1983; 2 (12): 59.
9. 丁正梁 上海畜牧兽医通讯 实验动物专辑 1982; 2 (1): 19.

(上接第 63 页)

参 考 文 献

1. Rugh R, A J Roentgenology 1964; 91: 192.
2. 金放兴, 等, 安徽医学院学报 1979; 6: 24.
3. 杨家宽, 等, 中华放射医学与防护杂志 1981; 1(4): 25.
4. 黄祥寿, 等, 浙江医科大学学报 1985; 14 (2): 58.

5. 王天宇 杨丽君, 南京医学院学报 1982; 2 (2): 18.
6. Bettga D, et al. Int J Radiat Biol 1980; 37(1): 1.
7. Heddle J A, Mutat Res 1973; 18: 187.
8. Countryman P I and Heddle J A, Mutat Res 1976; 41(2—3): 321.
9. 黄祥寿, 等, 浙江医科大学学报 1983; 12 (5): 233.
10. 王天宇, 等, 中华放射医学与防护杂志 1983; 3 (2): 64.

铜宫内节育器

王宸熙, 等. 铜IUD对兔子宫内膜mRNA体外翻译的影响. 浙江医科大学学报 1985; 14(2): 55.

本文报道了测定正常和放置铜丝(取自宫内节育器)子宫内膜的铜含量, 二者有显著性差别. 提取了上述二种内膜的总mRNA并比较了它们在麦胚无细胞体系中蛋白质翻译产物的差别, 发现放铜内膜的mRNA的翻译产物分子量相当于64K, 32K, 21K及18K的蛋白质明显减少, 而分子量为23K的蛋白质明显增加. 讨论了这种增加或减少的蛋白质可能是引起宫内铜丝节育器的避孕机理.

^{60}Co γ 线

黄祥寿, 等. ^{60}Co γ 线照射离体人血诱发的淋巴细胞染色体畸变. 染色体畸变 1985; 14(2): 58.

本文报道用不同剂量 ^{60}Co γ 线照射离体血液后淋巴细胞染色体畸变的结果. 染色体断片、双着、着环、易位、四倍体细胞和总畸变率均随照射剂量增加而升高. 用电子计算机处理数据表明, 四倍体细胞与剂量呈线性回归($R=0.965492$), 其余均为幂函数关系($R>0.990373$). 在观察到的1103个双着丝点体中, 有194个无伴随的断片, 占总数17.59%. 比较不同供血者的血样, 双核淋巴细胞率、四倍体细胞率和D/D+F比率越高者, 其总畸变细胞率就越低, 这种情况往往发生在淋巴细胞转化率低的供血者. 资料表明人体的免疫反应程度可影响到畸变细胞数目.

月经血量

刘子贻. 还原性物质对月经血量测定的干扰及其纠正. 浙江医科大学学报 1985; 14(2): 53.

通常应用5%NaOH提取中性高铁血色原(棕色)来测定月经血量, 但在抽提液中往往出现另一种色泽, 红色. 为了阐明这种红色造成多大的测定误差和如何消除这种误差, 就必须研究这种色泽的实质. 将葡萄糖(10mg/ml)作为一种还原剂加于抽提液中, 其色泽就逐渐地自棕色转变为红色, 红色抽提液的吸收曲线与棕色者很不相同. 已发现除性条件下葡萄糖、抗坏血酸等还原剂的存在可使棕黄色高铁血色原还原为亚铁血色原, 使546nm(Hallberg法)和568nm(Shaw法)处吸光度增大, 成为主要的误差来源. 检查溶液在495与545nm处的读数, 当 A_{495}/A_{545} 时可判定亚铁血色原的存在, 以水稀释并充分振荡可使亚铁血色原分解氧化为高铁血色原, 从而完全避免由此造成的误差.

肿瘤

徐学儒, 等. 柠檬桉叶挥发油的抑瘤作用及毒性试验. 浙江医科大学学报 1985; 14(2): 49.

本文研究了柠檬桉叶挥发油的抑瘤作用及毒性, 发现本品对小鼠EC的抑瘤率为67.5~33.9%; S_{180} 为36.2~32.8%; 大鼠W256为32.7~31.4%. 放射自显影实验证明本品能明显抑制EC腹水瘤细胞的DNA合成.

急性毒性试验: 口服 $LD_{50}=1.49\text{ml/kg}$ (按原油计, 下同); 静注 $LD_{50}=0.19\text{ml/kg}$.

亚急性毒性试验表明, 除发现本品对口腔、咽喉粘膜有刺激反应外, 其余项目, 如血液、肝、肾功能、EKG、24心、肺、肝、肾、脾、胃、肠、淋巴结等脏器病检中, 均未见明显异常.

CHROMOSOME

⁶⁰Co Gamma Ray

ABERRATION

Wang Xiangshou, et al. Studies on Relationship between Radiation Dosage and Chromosome Aberration Rate Induced by ⁶⁰Co Gamma Ray in Human Lymphocytes in Vitro. *J Zhejiang Med Univ* 1985; 14(2): 58.

Chromosome aberration of human lymphocytes following different doses of ⁶⁰Co Gamma ray (25~500 rad) was studied in vitro. The yields of fragments, dicentric, centric rings, reciprocal translocations and the percentage of quadripleid cells and total aberrant cells all increased with the enhancement of radiation dosage. By means of a computer, a linear regression relationship between radiation dosage and quadripleid cells ($R=0.986492$) was revealed; the others that fitted well to the power function equation were even higher ($R>0.980373$). 194 dicentric without appropriate fragments were observed among 1103 dicentric, the percentage being 17.59. In comparison with various samples, it was found the higher the rate of double nuclear lymphocytes, quadripleid cells and the ratio of D/D+F, the lower the percentage of total aberration. Such results usually occurred in donors with higher lymphoblastoid transformation. The data indicated that the immunological reaction of each individual might alter the number of cells with chromosome aberration.

TUMOR

VOLATILE OIL FROM

EUCALYPTUS CITRIODORA

Xu Xuern, et al. Antitumor Activity and Toxicity of Volatile Oil from *Eucalyptus Citriodora*. *J Zhejiang Med Univ* 1985; 14(2): 49.

This paper reports a study on the antitumor activity and toxicity of the volatile oil from *eucalyptus citriodora*. The results demonstrated that the tumor inhibitory rate was 67.5~98.9% in Ehrlich ascites carcinoma, 36.2~62.8% in Sarcoma 180, 32.7~61.4% in Walker 256 respectively. It was shown in autoradiography that this substance could strongly inhibit the DNA synthesis of tumor cells of Ehrlich ascites carcinoma.

In acute toxicity test, the LD₅₀ was 1.49ml/kg by intragastric administration and 0.19ml/kg by intravenous administration.

In subacute toxicity test, no obvious abnormality, with the exception of stimulation of the mucosa of oralcavity and throat, was observed during the examination of blood, EKG, function of the liver and kidney and in the pathological examination of the heart, liver, kidney, spleen, stomach, ureter, gall bladder and pancreas.

COPPER INTRAUTERINE ENDOMETRIAL mRNA DEVICES

Wang Zhengxi, et al. Effect of Copper IUD on in-Vitro Translation of Rabbit Endometrial mRNA. *J Zhejiang Med Univ* 1985; 14(2): 55.

This paper reports the significantly different copper levels of the rabbit endometrium measured in copper wire wearers and non-wearers (the copper wire taken from copper-IUD). The two kinds of endometrial mRNA described above were extracted and their difference of translation production in the wheat-germ cell free system compared. A remarkable reduction in the translation production of molecular weight of 64K, 23K, 21K and 18K protein was revealed. But the molecular weight of 28K protein showed a significant increase. The authors discussed the possible antifertility effects of Cu-IUD by the decrease or increase of these proteins.

REDUCING AGENTS MENSTRUAL BLOOD LOSS HEMOCHROMOGEN

Liu Ziyi. Interference of Reducing Agents in Determination of Menstrual Blood Loss and Correction. *J Zhejiang Med Univ* 1985; 14(2): 53.

In determining menstrual blood loss, 5% NaOH is usually used to extract ferrihemochromogen (brown color), but another distinctly different color, a red one, is often found in the extract. The study of the nature of this red color is key to clarifying the degree of the error it brings about and to the way for its correction. It has been found that in alkaline condition, the presence of reducing agents, e. g. glucose, ascorbic acid etc, might reduce the brown ferrihemochromogen to red ferrohemochromogen, the absorbance of which at 548nm (Hallberg's method) and 550 (Shaw's Method) is higher than that of the extract in brown color and thus constitutes the main source of error in the determination of menstrual blood loss. According to the absorbance of the extract at 495 and 515nm, it is easy to decide whether the ferrochromogen is present or not: A_{495}/A_{515} would undoubtedly indicate its presence. When diluted with water and shaken thoroughly, the ferrohemochromogen might be oxidized to ferrihemochromogen.