

柠檬桉叶挥发油抑制 小鼠大肠癌的初步实验观察

药理学教研室 耿宝琴 朱永康

本实验用对称二甲胂(DMH)诱发的小鼠大肠癌模型,观察柠檬桉叶挥发油的抗肿瘤作用。

据国外文献报告,DMH诱发的小鼠大肠癌模型已广泛用于生化、药理等基础医学的研究^(1,2)。我们的实验表明,用DMH在昆明种小鼠上可获得较高的诱癌率(81%),所诱发大肠癌的组织学特性及生物学行为与人类大肠癌较为相似⁽³⁾。

据药典记载,柠檬桉叶对结核菌、金黄色葡萄球菌等有抑制作用⁽⁴⁾。柠檬桉叶挥发油在体外抗肿瘤试验,及动物移植性肿瘤抑制试验中均显示了抑瘤作用。在艾氏腹水癌小鼠,腹腔注射给药的抑瘤率达67.5~98.4%;在S180小鼠及Walker256大鼠肿瘤模型,亦有30%以上的抑瘤率⁽⁵⁾。本实验目的在于观察柠檬桉叶挥发油对小鼠大肠癌的抑制作用,及较长期给药对动物重要脏器的影响,为过渡临床积累资料。

材 料 和 方 法

一、致癌

动物:本校动物室培育的昆明种小鼠,雌性,体重18~22g,共60只。

致癌剂:DMH,白色粉状结晶,熔点165℃。自行合成。临用前以灭菌生理盐水配成0.4%溶液,用碳酸氢钠将溶液的pH值调至6.5~7.0。

方法:每周按20mg/kg剂量给小鼠背部皮下注射0.4%DMH溶液,连续20周。

二、治 疗

动物:上述小鼠经20周注射DMH后尚存活38只,供治疗试验用。

药物:柠檬桉叶挥发油。药液配制:量取2.5ml原油置研钵内,边磨边加入吐温80乳化剂3~4滴,磨匀后逐滴加入少量蒸馏水,研磨成乳状液。再用蒸馏水逐步稀释成2.5%乳剂。

方法:完成20周致癌的38只小鼠随机分为治疗、对照两组,各19只。治疗组每鼠每日用2.5%柠檬桉叶挥发油乳剂0.75ml灌胃,连续给药7日为1疗程,每隔7日重复1疗程。共治疗近7周,累积给药26次,给药总量每鼠为柠檬桉叶挥发油0.49ml。对照组同法给予等量生理盐水。

实验结束时将两组存留小鼠断头处死,取血作白细胞计数,测定血红蛋白及血清谷丙转氨酶值。尸检需肉眼观察胸、腹腔有否病变。自肛门向上剖开直肠、结肠,计数肛管及肠壁肿瘤,并以游标卡尺测量肿瘤的纵、横径。自肛门向上截取8cm长肠段置10%甲醛内固定。石蜡包埋、切片、H.E.染色,作病理学检查。

以小鼠带瘤数为指标,用方差分析法作统计处理。

治疗期间死亡小鼠均作尸检,观察肿瘤形成情况,但不列入疗效统计。

结 果

随机分组时,治疗及对照组小鼠平均体重分别为 29.2 ± 3.1 g及 29.7 ± 3.3 g。治疗结束时分别为 28.8 ± 5.9 g及 30.7 ± 6.9 g。治疗

前后无明显差别。

给药期间治疗组小鼠一般情况与对照组无明显差异。治疗组共死亡 5 只，平均带大肠肿瘤数为 3.6 个（18 个/5 只），平均肛门肿

瘤数为 1 个（5 个/5 只）。对照组死亡 7 只，平均大肠肿瘤数 14.1 个（99 个/7 只），肛门肿瘤数 1 个（7 个/7 只）。上述死鼠大多有肛门肿瘤继发感染（见表 1）。

表 1 两组小鼠治疗期间死亡记录

对 照 组			治 疗 组		
死亡时间* (天)	大肠肿瘤数	肛门肿瘤数	死亡时间* (天)	大肠肿瘤数	肛门肿瘤数
2	8	0	9	9	1
13	24	1	10	3	0
30	0	1	18	6	1
34	17	1	32	0	2
34	28	1	36	0	1
46	3	2			
46	19	1			
	$\bar{X}=14.1 \pm 10.7$	$\bar{X}=1.0 \pm 0.6$		$\bar{X}=3.6 \pm 3.9$	$\bar{X}=1.0 \pm 0.7$

* 死亡时间从治疗开始日起算

实验结束时治疗组尚存 14 只小鼠，其中 10 只小鼠有大肠肿瘤，共带瘤 116 个，平均每鼠带瘤 8.3 个。所有大肠肿瘤均分布在肛门上 4 cm 范围肠段内，呈息肉状突向肠腔。最大肿瘤的纵、横径为 6 mm × 5 mm，最小为 1 mm × 1 mm。镜检大多为中度分化的原

位腺癌和浸润型腺癌，浸润深度多为粘膜下层。其中 4 只肉眼未见大肠肿瘤。镜检其中 3 只属正常肠粘膜，1 只为中度非典型增生。该组有 8 只小鼠带肛门肿瘤，镜检属鳞状细胞癌（见表 2，图 1）。

表 2 两组小鼠带瘤情况比较

柠 檬 桉 叶 油 治 疗 组					对 照 组				
鼠号	大 肠 肿 瘤		肛 门 肿 瘤		鼠号	大 肠 肿 瘤		肛 门 肿 瘤	
	带瘤数 (肉眼)	镜 检	带瘤数 (肉眼)	镜 检		带瘤数 (肉眼)	镜 检	带瘤数 (肉眼)	镜 检
1	20	腺癌	1	鳞癌*	1	7	腺癌	2	鳞癌*
2	0	正常肠粘膜	1	鳞癌*	2	3	腺癌	1	鳞癌*
3	19	腺癌	1	鳞癌	3	29	腺癌	0	
4	18	腺癌	1	鳞癌	4	17	腺癌	2	鳞癌*
5	3	腺癌	0		5	40	腺癌	0	
6	1	腺癌	1	鳞癌	6	6	腺癌	0	
7	0	正常肠粘膜	1	鳞癌	7	7	腺癌	1	鳞癌*
8	1	腺癌	0		8	0	腺癌 [△]	1	鳞癌*
9	19	腺癌	1	鳞癌	9	35	腺癌	1	鳞癌
10	2	腺癌	0		10	39	腺癌	0	
11	0	正常肠粘膜	0		11	17	腺癌	0	
12	3	腺癌	0		12	25	腺癌	1	鳞癌*
13	0	非典型增生	1	鳞癌	X	18.8		0.75	
14	30	腺癌	0						
X	8.3		0.57						

* 表示有继发感染

△ 肉眼仅见肠壁增厚，镜检属腺癌

对照12只小鼠全部有大肠肿瘤，共带瘤225个，平均每鼠带瘤18.8个。该组小鼠的大肠壁均显著增厚，肿瘤大多呈密集排列，分布在肛门以上7cm范围肠段内，呈息肉状突向肠腔。最大肿瘤的纵、横径为8mm×7mm，最小为1mm×0.5mm。镜检大多属中度分化的腺癌，浸润深度大多达粘膜下层，部分已侵入肌层乃至浆膜层。该组有1只肉眼仅见肠壁增厚，镜检证实为腺癌（见图2、3）。该组7只小鼠带肛门肿瘤，镜检为鳞癌（见表2，图1）。

用方差分析法比较两组资料。治疗组平均带大肠肿瘤8.3个/鼠，对照组为18.8个/鼠，差异显著（ $F = 4.56, P < 0.05$ ）。治疗组小鼠平均大肠肿瘤数显著低于对照。抑瘤率为55.9%（ $\frac{18.8 - 8.3}{18.8} \times 100\% = 55.9\%$ ）。

本实验分别抽样镜检了对照组小鼠的92只大肠肿瘤及治疗组的66只大肠肿瘤，结果见表3。对照组有28.3%的大肠肿瘤已侵入粘膜下层、15.2%已侵犯肌层、2.2%侵犯浆膜层。治疗组则大多局限于粘膜内（占83.3%），侵入粘膜下层及肌层的分别为13.7%及3.0%，未见有侵犯浆膜者。

表3 两组小鼠大肠肿瘤浸润深度比较

镜检 瘤数 (个)	浸 润 深 度			
	粘膜内	粘膜下层	肌 层	浆 膜 层
对照组 92	50 (54.3%)*	26 (28.3%)	14 (15.2%)	2 (2.2%)
治疗组 66	55 (83.3%)	9 (13.7%)	2 (3.0%)	0

* 表示占总瘤数的百分比

治疗组平均带肛门肿瘤0.57个/鼠，对照组为0.75个/鼠。无显著差异（ $F = 0.50, P > 0.05$ ）。

治疗组平均白细胞数为6,043/mm³，显著低于对照，可能与该组肛门肿瘤继发感染较少有关。治疗组8只肛门肿瘤中仅2只继发感染，对照组7只中6只有继发感染，且凡有继发感染者白细胞数大多显著增高（见

表4）。

两组小鼠血红蛋白及血清谷丙转氨酶均值无显著差异。但两组血清谷丙转氨酶值都高于正常均值⁽⁶⁾（表4）。

表4 两组小鼠白细胞数等的比较

	对 照 组	治 疗 组	P 值
白 细 胞 数	16,175±13,205	6,043±1,940	<0.05
血 红 蛋 白	9.3±2.8	11.0±1.2	>0.05
血清转氨酶	95.2±34.6	62.9±21.5	>0.05

其它脏器的切片镜检均未见肿瘤，除对照组有1只镜检为肺炎外，余皆未见异常。

讨 论

本实验选用DMH作致癌剂，因为该物质易于合成、使用方便，在一些种系的小鼠诱癌率较高^(7,8)。

实验表明，无论是用直接致癌剂MNU、MNNG⁽⁹⁾灌肠，还是用间接致癌剂DMH皮下注射诱癌，动物大多在4个月时已出现大肠粘膜细胞癌变。因此，采用注射DMH20周的小鼠作为柠檬桉叶挥发油的实验治疗模型是较适宜的。估计此时绝大多数小鼠已出现大肠肿瘤。

柠檬桉叶挥发油对S180、Walker256及艾氏腹水癌均显示了抑制作用。但这些移植肿瘤模型的组织学特性及生物学行为均与人体大肠癌相差甚远。而用DMH诱发的小鼠大肠癌，其组织学特性及生物学行为均与人体大肠癌较为相似⁽¹⁰⁾。用该模型来观察柠檬桉叶挥发油对大肠腺癌的特异性对抗作用具有一定的价值。本实验结果表明，治疗组小鼠的大肠肿瘤数显著低于对照组，镜检治疗组小鼠肿瘤的浸润程度亦低于对照组，提示柠檬桉叶挥发油具有抑制小鼠大肠癌的作用。

据药典记载柠檬桉叶具有抗菌作用。本实验中用柠檬桉叶挥发油治疗的小鼠，其肛门肿瘤继发感染率低于对（下转第55页）

轮状病毒

潘存梅等：杭州地区秋冬季婴幼儿腹泻病原——轮状病毒的初步研究。浙江医科大学学报 12(2)：53, 1983

本文报道1981年秋冬季杭州地区的一次婴幼儿急性胃肠炎流行的病原学研究。从33例胃肠炎患儿的粪便中，用电镜方法检出轮状病毒者17例，11例双份血清用ELISA检测抗轮状病毒抗体 ≥ 4 倍升高者7例。根据检出病毒颗粒的形态特点和在感染过程中特异性抗体呈4倍以上升高，表明了轮状病毒是杭州地区秋冬季婴幼儿腹泻的主要病原。

大肠癌

周佩珩等：大肠癌的生化标志研究：I. 血清结合珠蛋白与免疫球蛋白G的比值(Hp/IgG)。浙江医科大学学报 12(2)：56, 1983

作者等于1978~1981年测定了若干例大肠癌、胃癌、肝癌、直肠癌、直肠息肉及正常人的血清结合珠蛋白(Hp)及免疫球蛋白G(IgG)的含量。50例正常人Hp的平均值(M+KS)为100mg Hb%，以 $>100\text{mg Hb}\%$ 者为阳性，则上述肿瘤病人血清Hp的阳性率分别为28/35(80%)，15/23(65%)，3/11(27%)，2/20(10%)。

单独以Hp或IgG来区别消化道肿瘤并不明显，以血清结合珠蛋白与免疫球蛋白G含量的比值(Hp/IgG)为指标，则大肠癌与消化道其他癌肿的差异非常显著。

柠檬桉叶油

耿宝琴 朱永廉：柠檬桉叶挥发油抑制小鼠大肠癌的初步实验观察。浙江医科大学学报 12(2)：59, 1983

本实验采用由二甲胂诱发的小鼠大肠癌模型观察柠檬桉叶挥发油的抗肿瘤作用。二甲胂诱发的小鼠大肠癌的组织学特点与人体大肠癌相似。

昆明种小鼠60只，雌性，体重18~22g，每周皮下注射DMH 20mg/kg，连续20周。第20周末将存活的38只小鼠随机分为两组。治疗组每鼠每日灌胃给予2.5%柠檬桉叶挥发油悬液0.75ml，连给7天，间隔7天后重复，共给药26次。对照组给予等体积生理盐水。第26周末处死全部小鼠，治疗组小鼠大肠肿瘤数显著低于对照(P <0.05)。病理检查证实所有肿瘤均为分化良好的腺癌。治疗组肿瘤比对照的小，浸润深度较对照组浅。

肠炎

叶瑞云等：杭州地区的轮状病毒性肠炎。浙江医科大学学报 12(2)：71, 1983

作者等于1980年及1981年婴幼儿秋冬季腹泻高峰季节收住80例患儿作进一步研究。除吐泻外，77.6%患儿有上感，60.8%X线胸片示不同程度的肺部病变，87.6%具等张性脱水，94.6%CO₂结合力降低。大便还原糖测定，60.6% $>600\text{mg}\%$ 。33例大便电镜检查，17例检出轮状病毒，11例双份血清以ELISA测抗体，7例恢复期血清有4倍以上升高。临床、电镜及ELISA均证明病原为轮状病毒。鉴于患儿早期多有上感以及多个脏器皆有病变，且这些病变在未应用抗生素情况下均自愈，认为轮状病毒可能通过呼吸道感染途径，经过病毒血症过程。

轮状病毒

LARGE BOWEL CANCER

Zhou Baiyun, et al: Studies of the Biochemical Markers in Colonic Cancer. II. the Ratio of Serum Hepatoglobulin and Immunoglobulin G(Hp/IgG). *J Zhejiang Med Univ* 12(2) : 56, 1983

Serum hepatoglobulin(Hp) and immunoglobulin G(IgG) in a certain number of cases with large bowel cancer, hepatoma, stomach cancer, rectum polypsis and normal adults were measured from 1978 to 1981. The average value (M+KS) of 50 normal adults was 100mg Hb%. The level of over 100mgHb% was taken as positive, and the positive rates of Hb in sera samples of the cancer patients came to 80% (28/35), 65%(5/23), 27%(3/11) and 10%(2/20) respectively.

The upper limit of IgG in 50 normal adults was 1946.9mg%. Let 1548mg% be the positive and the positive rates of IgG in patients with hepatoma, stomach cancer and rectum polypsis were 8.5% (3/35), 47.8%(11/23), 100% (11/11), and 0% (0/20) respectively.

It is difficult to differentiate large bowel cancer from other digestive tract carcinoma by Hp or IgG alone. But if Hp/IgG is used as a diagnostic marker, large bowel cancer, when compared with those at the rest part of the digestive tract, is significantly distinguishable.

ROTA-VIRUS

Pen Cunmei, et al: A Preliminary Study on Rotavirus-An Etiological Agent of Acute Infantile Diarrhea. *J Zhejiang Med Univ* 12(2) : 53, 1983

The etiology of autumn-winter infantile gastroenteritis prevailing in Hangzhou in 1981 was investigated. Under electronmicroscope, typical rotaviruses were found in 17 stool samples from 39 patients. Eleven duplicated sera samples were studied with ELISA method; in 7 cases antibodies against the rotavirus were found to have a 4-time rise. Both the morphological characteristics of the virus particles detected and the a 4-fold rise of the specific antibody titre indicated that rotavirus was the chief etiological agent which caused acute infantile gastroenteritis in autumn-winter in Hangzhou.

ENTERITIS

ROTA-VIRUS

Ye Ruiyun, et al: Rotaviral Enteritis in Hangzhou District. *J Zhejiang Med Univ* 12(2) : 71, 1983

Eighty suspected cases of rotavirus gastroenteritis admitted during the time of peak incidence of infantile autumnal diarrhea in 1980 and 1981 were further studied. Besides vomiting and diarrhea, 77.6% of the patients had upper respiratory infections (U R I); 60.8% had various pathological findings in the X-ray films of lung; 87.6% revealed a state of isotonic dehydration and 94.6% showed a down-lowering of CO₂ combining power, with the help of clixatest tablets, an increase of more than 500mmg% of reducing sugar was found in the stool of 60.6% of the patients. Under electron microscope, rota-viruses were identified in 17 out of 33 stool samples and a four-fold rise of neutralizing antibodies was detected in 7 out of 11 paired sera. The clinical manifestations, electronmicroscopic examinations and ELISA proved rota-virus to be the pathogen. In view of the fact that most of the cases suffered from U R I at the early stage of the disease and several internal organs which showed some pathological changes could recover spontaneously without treatment, it was considered that the rota virus probably entered by the respiratory tract with a transient presence of viremia during the course of the illness.

VOLATILE OIL OF EUCALYPTUS CITRIODORA

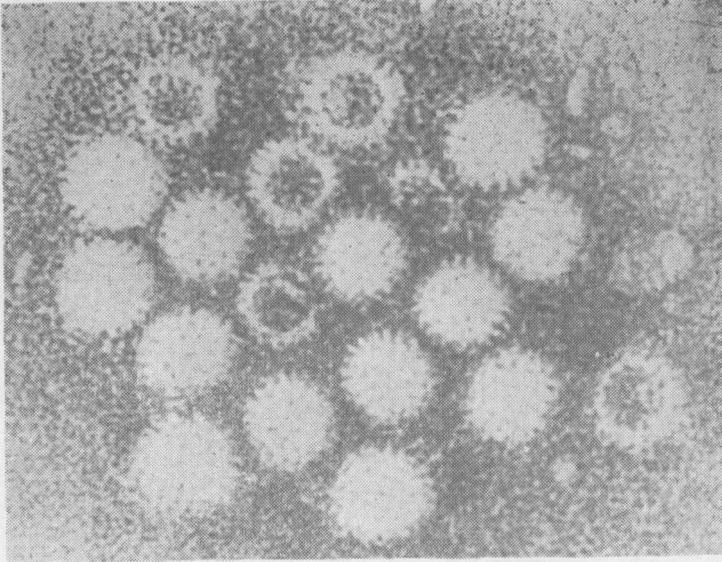
Genq Baoqin and Zhu Yonglian: A Preliminary Observation on the Antineoplastic Action of the Volatile Oil from Eucalyptus Citriodora on Experimental Colonic Cancer in Mice. *J Zhejiang Med Univ* 12(2) : 59, 1983

The antitumor action of the volatile oil of eucalyptus citriodora on mouse colorectal tumors induced by dimethylhydrazine (DMH) was reported in this paper. The histological characteristics of colon cancer in mice were similar to those of colon cancer in human.

Sixty female mice were injected subcutaneously with DMH 20mg/kg once a week for 20 weeks. By the end of the 20th week, the 38 mice survived were randomly divided into two groups. Each mouse of the treated group was given orally 0.75ml of 2.5% suspension of volatile oil of Eucalyptus citriodora daily for seven days and it was repeated at an interval of 7 days until 26 doses were given. The mice in the control group were given the same volume of normal saline. By the end of the 26th week, all the mice were killed; the average number of the colon tumors in each mouse of the treated group was significantly lower than that of the control group ($P < 0.05$). Pathologically all tumors were proved to be well-differentiated adenocarcinomas. The size of the tumors in the treated group was smaller and less invasive than that of the control group.

杭州地区秋冬季婴幼儿腹泻病原—轮状病毒的初步研究

(正文见第53页)



附图 电镜所见轮状病毒颗粒。×220,000

柠檬桉叶挥发油抑制小鼠大肠癌的实验观察

(正文见第59页)

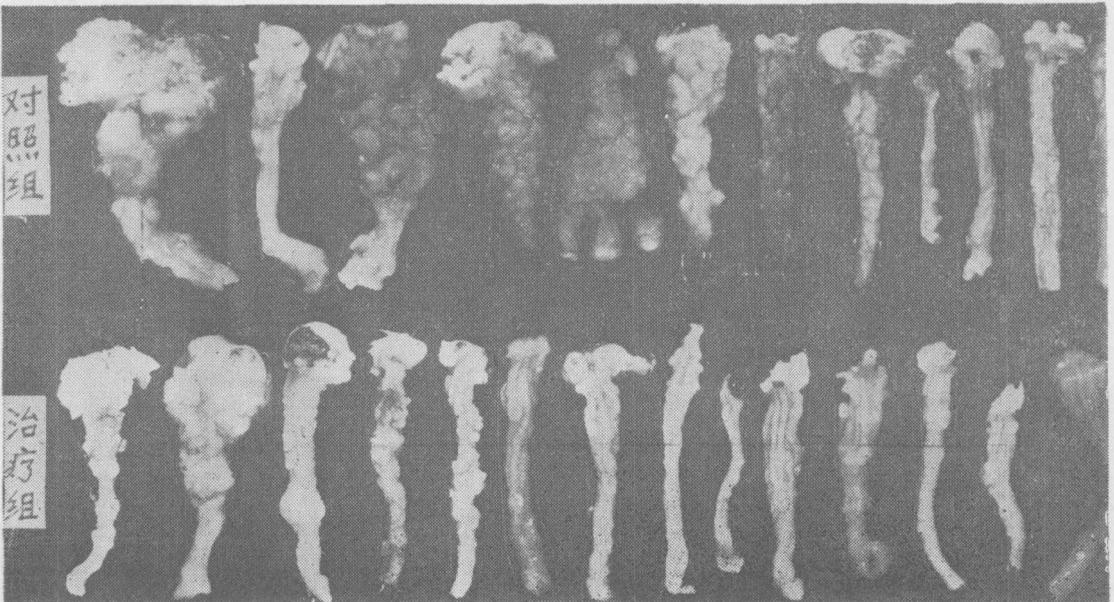


图1 两组小鼠大肠肿瘤的比较

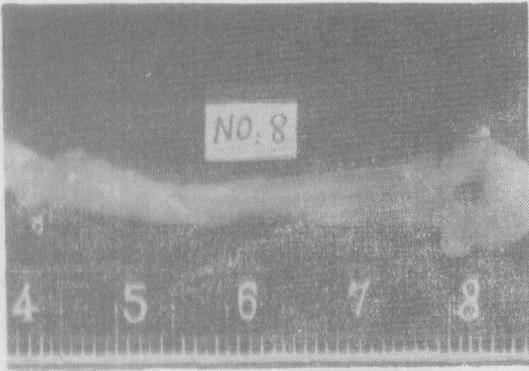


图2 对照组中一例仅见大肠壁增厚，未见息肉状肿瘤

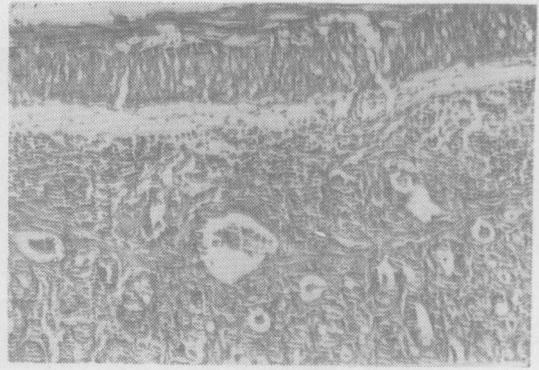
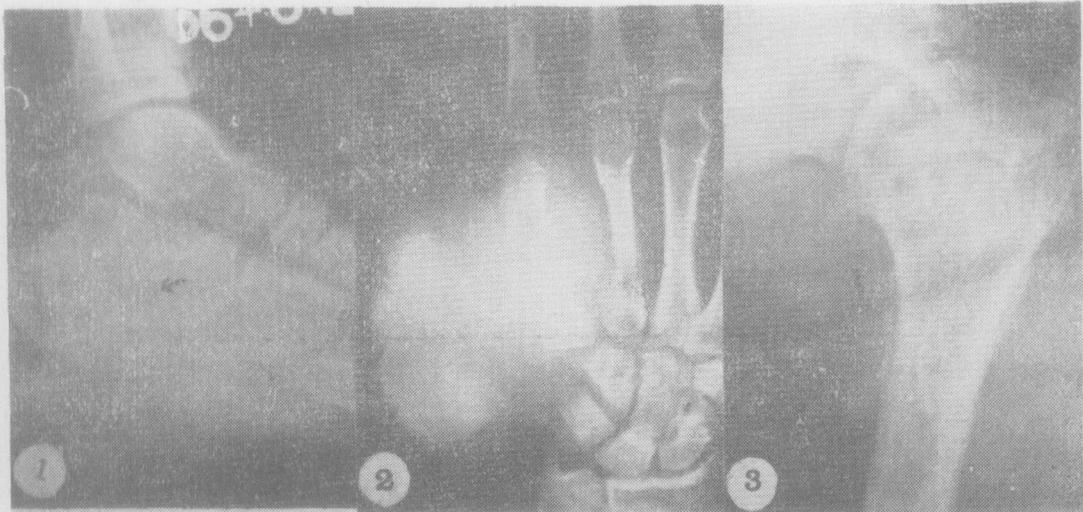


图3 系图2所示标本之镜下观(×100倍)，可见腺癌已侵入粘膜下层

滑膜肉瘤 50 例分析

(正文见第83页)



- 图1 左足底可见较大软组织肿块，其内有较多不规则的钙化阴影，跟骨内可见小囊样骨质缺损“↑”
- 图2 右手可见明显分叶状软组织肿块，第4、5掌骨稍分离，并见不同程度的骨质改变，显示溶骨性骨质破坏，局限性骨质硬化，骨膜增生
- 图3 左肱骨上段髓腔内可见较广泛斑点状溶骨性骨质破坏及较长范围的骨膜增生，骨膜增生为不规则状与放射状“↑”

取的轮状病毒可被患儿恢复期血清的抗体特异地结合,在双份血清标本中抗体滴度有4倍以上增高。根据电镜和ELISA结果表明,轮状病毒是杭州地区1981年秋冬季婴幼儿腹泻的主要病原。

用电镜直接确认病毒的存在,是现时寻找轮状病毒典型病例的可靠依据,但对粪便离心处理有不同的要求。本实验低速离心和超速离心两组,阳性率相仿。有报告患儿的排毒粒时间,以起病后第3~4天的粪便中最多⁽⁶⁾,本组实验结果与之相符,电镜检查以发病第4天阳性率最高,第3、5天次之。我们认为只要抓准取材时间,一般取于发病第3~5天,是可以提高电镜检出的,而对离心的要求是较次要的。

Ellens⁽⁷⁾等用电镜和ELISA对5例腹泻患者粪便标本进行检测,两种方法所得结果相同。本组实验以电镜为依据,以超离处理粪便标本作为抗原,对11例腹泻患儿双份血清进行ELISA检测,两种方法所得结果

相符,且ELISA的阳性率更高,说明ELISA对电镜未发现病毒颗粒者,从血清中还可以查得其抗体。同时,ELISA定量试验血清需要量少,仅用血清0.05~0.1ml,加之目测结果有一定的准确性,无需贵重仪器。因此,ELISA应用于轮状病毒性肠炎的检查,是一种特异性强,敏感度高,经济简便的检测方法。

(附图见插页第5页)

(本文电镜和超离技术由浙江省电镜室和本校中心实验室协助完成,特此致谢。)

参 考 文 献

1. Bishop R F, et al: Lancet 1: 149, 1974
2. 庞其方等: 中华医学杂志 59: 589, 1979
3. 方鹤松: 国外医学参考资料儿科分册 5: 301, 1978
4. 叶瑞云等: 杭州地区的轮状病毒性肠炎. 浙江医科大学学报 12(2): 71, 1983
5. Palmer E L, et al: J Gen Virol 35: 403, 1977
6. Davidson G P, et al: Lancet 1: 242, 1975
7. Ellens D J: Lancet 1: 1, 363, 1977



(紧接第61页) 照组,可能与该药的抗菌作用有关。对照组白细胞均值高于正常均值,此可能与继发感染有关。治疗组白细胞均值在正常范围内,提示该药无显著抑制造血系统作用。

小 结

一、连续20周注射DMH诱发小鼠大肠癌。第21周将38只小鼠随机分为两组。治疗组每日灌胃,给予2.5%柠檬桉叶挥发油乳剂0.75ml,7日1疗程,7周累积给药26次,给药总量每鼠为柠檬桉叶挥发油原油0.49ml。对照组同法给予等体积生理盐水。

二、治疗结束处死全部存留小鼠。治疗组平均带大肠肿瘤8.3个/鼠,对照组为18.8个/鼠,差异显著,抑瘤率为55.9%。提示柠檬桉叶挥发油有抑制小鼠大肠肿瘤的作用。

三、两组小鼠肛门肿瘤均数无显著差异。

柠檬桉叶挥发油对肛门部鳞癌无抑制作用。

四、柠檬桉叶挥发油对小鼠重要脏器无明显毒性。

(图见插页第5、6页)

参 考 文 献

1. Boffa L C, et al: Cancer Res 40: 1774, 1980
2. Corbett T H, et al: Cancer 40: 2660, 1977
3. 耿宝琴等: 浙江医科大学学报 11(6): 269, 1982
4. 江苏新医学院编: 中药大辞典, 下册, 第1532页, 上海人民出版社, 1977
5. 浙江医科大学药理教研组等: 浙江省大肠癌科研资料汇编, 第126页, 1980
6. 施新猷主编: 医学动物实验方法, 第443页, 人民卫生出版社, 1977
7. Ball C R, et al: Cancer 36: 2437, 1975
8. Toth B, et al: Am J Pathol 84: 69, 1976
9. 耿宝琴等: 浙江医科大学学报 9(2): 61, 1980
10. Thuhnberr N, et al: Cancer Res 33: 940, 1973