

维生素C阻断亚硝胺在体内合成的实验观察

中国医学科学院肿瘤防治研究所
林县食管癌防治研究队

一些亚硝胺类化合物有致癌作用，其中有的主要是引起动物发生食管癌^(1、2)。这类化合物存在于环境中，某些食物也含有一定量的亚硝胺。我们曾初步分析河南省林县和范县的主要食物样品，在林县124个样品中，有29个的薄层色谱分析含有亚硝胺，范县的86个样品中，仅一个为阳性，一些提取物经气相色谱的证实，但还要作质谱仪的分析来肯定⁽³⁾。此外，在具备二级胺或其他胺和硝酸盐或亚硝酸盐，以及适当的酸碱度和催化剂的情况下，亚硝胺能在体内合成，特别是在胃内，这可能是人体亚硝胺化合物的一个主要来源^(4—6)。

在亚硝胺化合物的体外合成中，Mirvish等(1972)的试管内实验证明，某些二级胺及氨基酸经加氮作用能合成相应的亚硝胺，并可用维生素C、尿素和氨基磺酸铵抑制或阻断其合成⁽⁷⁾。

为研究食管癌的病因与预防措施，我们结合林县的现场工作，进行抗氧化剂维生素C、菸酰胺等阻断亚硝胺在体内合成的实验，以能引起大鼠发生食管鳞癌的甲基苄基亚硝胺为代表，观察抗氧化剂对前身物甲基苄胺与亚硝酸钠的影响。主要内容有三项：(一)维生素C阻断甲基苄胺与亚硝酸钠在大鼠体内合成甲基苄基亚硝胺的实验，(二)大鼠胃内合成亚硝胺的薄层色谱分析与维生素C的阻断作用，(三)维生素C对27例林县妇女尿中亚硝酸盐含量的影响。

实验观察

一、维生素C阻断甲基苄胺与亚硝酸钠在大鼠体内合成甲基苄基亚硝胺的实验。

实验用Wistar种大鼠，开始时体重50—70克，全部动物喂此相同的饲料块，不加限制，每周称体重一次。设下列五组(表1)：

表1 维生素C对亚硝胺诱发食管癌的阻断作用

组别	大鼠数	平均天数	平均给药总剂量					食头管乳癌
			甲基苄基亚硝胺(毫克)	甲基苄胺(毫克)	亚硝酸钠(毫克)	维生素C(克)	菸酰胺(克)	
1.甲基苄基亚硝胺	8	135	17.8	—	—	—	—	8
2.甲基苄基亚硝胺+维生素C，菸酰胺	24	154	39.8	—	—	30.5	6.5	22*
3.甲基苄胺+亚硝酸钠	27	170	—	887.6	887.6	—	—	20
4.甲基苄胺+亚硝酸钠+维生素C，菸酰胺	20	168	—	806.3	806.3	33.0	6.6	0
5.甲基苄胺+亚硝酸钠+维生素C	17	166	—	819.9	819.9	33.0	—	0

*有一例为食管鳞癌

1. 甲基苄基亚硝胺组

10只雌性大鼠，每周用喂管从口腔注入甲基苄基亚硝胺（0.2毫克）三次，剂量按体重每公斤每天一毫克计算。存活100—154天共8只，平均实验135天，给药的平均总剂量17.8毫克。结果全部动物发生食管乳头瘤，通常是多发的，散布于食管各段。

2. 甲基苄基亚硝胺加维生素C及菸酰胺组

30只雄性大鼠，每周给甲基苄基亚硝胺的方法和剂量同第1组。于实验开始前5天起即在饮水中加维生素C，以后继续每周给6天，平均每天每只大鼠口服200毫克维生素C，另外于喂甲基苄基亚硝胺后，每次立即再喂维生素C100毫克，菸酰胺100毫克，这些抗氧化剂的剂量不随体重而增减。

存活时间100—161天共24只，平均进行实验154天。喂甲基苄基亚硝胺的平均总剂量为39.8毫克，维生素C及菸酰胺分别为30.5克及6.5克。结果有22只动物的食管发生乳头瘤，其中有一例发展为鳞状细胞癌。

3. 甲基苄胺与亚硝酸钠组

30只雄性大鼠，每周喂甲基苄胺及亚硝酸钠各4毫克三次，剂量按体重每公斤每天20毫克计算。存活129—172天共27只，平均进行实验170天，喂服甲基苄胺及亚硝酸钠的平均总剂量各887.6毫克。结果有20只动物的食管发生乳头瘤。

4. 甲基苄胺与亚硝酸钠加维生素C及菸酰胺组

25只雄性大鼠，每周喂甲基苄胺与亚硝酸钠的方法和剂量同第3组。于实验开始前5天起即在饮水中加维生素C，给维生素C及菸酰胺的剂量和方法均与第2组相同。存活167—169天共20只，平均实验168天，喂甲基苄胺及亚硝酸钠的平均总剂量各806.3毫克，维生素C及菸酰胺分别为33.0及6.6克。结果全部动物的食管粘膜上皮光滑，组

织切片未发现有乳头瘤的发生。

5. 甲基苄胺与亚硝酸钠加维生素C组

20只雄性大鼠，每周喂甲基苄胺与亚硝酸钠，以及维生素C的方法和剂量均与第4组相同，不给菸酰胺。存活166天共17只，喂甲基苄胺及亚硝酸钠的平均总剂量各为819.9毫克，维生素C为33克。结果全部动物的食管粘膜未见异常，组织学检查未发现有上皮增生或乳头瘤。

以上实验结果表明，在5—6个月内，甲基苄基亚硝胺能引起大鼠发生食管肿瘤，病变仅见于食管及舌的后根部位，同时给维生素C及菸酰胺不能抑制食管肿瘤的发生。给大鼠喂甲基苄胺及亚硝酸钠，能在体内合成亚硝胺，并产生食管乳头瘤，同时喂维生素C能完全阻断肿瘤的产生。

二、大鼠胃内合成亚硝胺的薄层色谱分析与维生素C的阻断作用。

为进一步了解胃内合成亚硝胺与抗氧化剂的作用情况，我们用三种能引起大鼠发生食管癌的亚硝胺（甲基苄基亚硝胺、哌嗪亚硝胺、肌氨酸乙酯亚硝胺）的前身物作短时间实验，观察适当量的甲基苄胺与亚硝酸钠，哌嗪（驱蛔灵）与亚硝酸钠，肌氨酸乙酯与亚硝酸钠在胃内的作用，以及于喂甲基苄胺和亚硝酸钠之前（第一次）与喂后（第二次）随即给维生素C的效果（表2、3）。

表2 甲基苄基亚硝胺在大鼠
胃内的合成实验

甲基苄胺 (毫克)	亚硝酸钠 (毫克)	作用时间 (分)	胃内容物 (PH)	甲基苄基亚 硝胺的生成
24	14	60	4.0	+
24	14	80	4.5	+
24	0	80	4.0	-
12	7	80	4.0	+

表 3 维生素C对甲基苄基亚硝胺
体内合成的阻断作用

维生素C (毫克)	甲基苄胺	亚硝酸钠	作用时间 (分)	胃内容物 (PH)	甲基苄基 亚硝胺的生 成
第一次	第二次	(毫克)	(毫克)		
0	100	24	14	90	4.5 +
0	200	24	14	90	3.5 +
0	400	12	7	80	2.5 +
100	100	12	7	80	3.0 ±
100	100	12	7	80	3.0 -
200	200	12	7	80	2.5 -
200	200	12	7	80	2.5 -

大鼠经15小时的禁食，于喂药后40—90分钟处死，结扎胃的幽门和贲门，取出胃。先用蒸馏水冲洗胃的外壁，剪开胃壁并测定内容物的PH值，再用大约50毫升蒸馏水将胃冲洗干净，滤去洗下液的食物残渣。将滤出液置于500毫升蒸馏瓶中，加氢氧化钠溶液20毫升，再加蒸馏水使最终体积为100毫升。对喂肌氨酸乙酯与亚硝酸钠的胃内容物加1M脲50毫升，活性炭1克与1.04M的硫酸锌0.5毫升，搅拌5分钟后过滤。用二氯甲烷提取的方法，参照Sen与Dalpe(1972)的A法进行⁽⁸⁾。每次薄层色谱分析取10微升或100微升样品溶液。薄板层用硅胶(Kieselgel G)制成，用微量注射器将标准的亚硝胺样品先点在薄板右侧，然后再点提取的样品浓缩液，经展开剂处理后，作光解与喷Griess试剂或茚三酮试剂显色。

薄层色谱分析的结果：1.适量的甲基苄胺、哌嗪或肌氨酸乙酯和亚硝酸钠在大鼠胃内能迅速合成相应的亚硝胺。2.在胃内合成甲基苄基亚硝胺的过程中，先加入适量的维生素C，可以阻断这种亚硝胺的生成；而在合成亚硝胺之后，维生素C就失去阻断的作用。此外，实验未能显示菸酰胺的抑制加氮作用。

三、维生素C对27例林县妇女尿中亚硝酸盐含量的影响。

我们收集林县27名家庭妇女(35—75

岁)的24小时尿，加甲苯10毫升防腐，将蛋白沉淀后，加入活性炭脱去尿的颜色。取5毫升尿滤液，加对氨基苯磺酸溶液2毫升，α-萘胺溶液2毫升混匀，静置半小时后，用72型分光光度计530mμ比色，并以一定量亚硝酸盐的标准液作对照，计算尿中亚硝酸盐的含量。

每一例测定尿中亚硝酸盐5次。在服维生素C前测定2次，含量为2.14—12.40毫克/24小时尿，平均5.05毫克/24小时尿。连续服维生素C(每天3次，每次300毫克)6天后，每人尿中亚硝酸盐的含量均明显减少，降为0—4.28毫克/24小时尿，两次测定的平均为2.07毫克/24小时尿。停服维生素C后3天，尿中亚硝酸盐的含量又上升为0.48—7.37毫克/24小时尿，平均3.62毫克/24小时尿。这些数据经统计学处理，均有明显差异(表4)。

表 4 维生素C对27例林县妇女
尿中亚硝酸盐的影响

服维生素C	尿中亚硝酸盐平均含量 (毫克/24小时)	P 值
服前	5.05±2.0	< 0.001
服六天后 (300毫克T.i.d.)	2.07±1.0	
停服后三天	3.62±2.0	< 0.005

讨 论 和 总 结

甲基苄胺与亚硝酸钠能在大鼠胃内迅速合成甲基苄基亚硝胺，引起食管肿瘤的发生。同样，哌嗪及肌氨酸乙酯和亚硝酸钠在胃内也能合成相应的哌嗪亚硝胺与肌氨酸乙酯亚硝胺。胃内的酸性环境条件有利于亚硝胺的合成，在另一实验里，我们用林县谷糠提取的二级胺和亚硝酸钠喂大鼠，胃内容物的薄层色谱与气层色谱的分析都表明有亚硝胺的生成。

维生素C能阻断甲基苄胺的加氮作用，抑制甲基苄基亚硝胺的合成，因此在喂甲基苄胺与亚硝酸钠的同时加给维生素C，就能预防大鼠发生食管肿瘤。最近见到类似的工作，Ivankovic等(1973)报告大鼠于妊娠10—11天时，维生素C能阻断乙基尿素与亚硝酸钠合成乙基尿素亚硝胺，子代出生4—6周时不发生脑水肿，预期以后不会发生脑及神经系统的肿瘤⁽⁹⁾。Greenblatt(1973)报告三级胺——二甲基安基比林与亚硝酸钠在小鼠体内能合成二甲基亚硝胺，于48小时内发生急性肝坏死，维生素C能阻止肝脏的病变⁽¹⁰⁾。在大鼠的安基比林与亚硝酸钠胃内合成实验中，Kamm等(1973)用抗坏血酸钠也得到预防肝病变的效果⁽¹¹⁾。我们的实验未能显示菸酰胺的抑制性影响。

维生素C的阻断亚硝胺合成作用，仅限于其前身物的合成过程中，如在二级胺和亚硝酸盐合成亚硝胺之前先给适量维生素C，其阻断的效果最大。维生素C对亚硝酸钠有强结合能力，较二级胺迅速，使亚硝酸盐还原，因此阻碍二级胺的加氮作用，阻断亚硝胺的合成。我们的实验证明，在甲基苄胺与亚硝酸钠起作用之后，再喂维生素C未能阻断甲基苄基亚硝胺的合成。维生素C不能抑制已合成的亚硝胺的致癌作用，在喂甲基苄基亚硝胺及维生素C与菸酰胺组，22例发生食管肿瘤中，有一例大鼠的食管为鳞癌至于维生素C是否还有其他特性涉及抗癌作用，需要作进一步的研究。

我们曾测定林县蔬菜和粮食中的二级胺，亚硝酸盐和硝酸盐，初步结果表明二级胺和亚硝酸盐的含量均较范县为高⁽¹²⁾。河南省肿瘤防治研究队(1973)报告林县60名成年人尿中硝酸盐的排出量较郑州40名居民为高，其中有9人尿中含有亚硝酸盐，而在后者没有测出⁽¹³⁾。本文的测定结果表明，在林县成年妇女24小时排出的尿中，含有亚

硝酸盐，口服维生素C能减少亚硝酸盐的排出量，停服后又逐渐回升。因此在食管癌高发地区，饮食营养中应注意维生素C的供应，适量增加维生素C可能对预防肿瘤的发生上有重要的意义。

(附图见117页图1~4)

参 考 文 献

1. Druckrey, H., Preussmann, R., Ivankovic, S., und Schmahl, D. Organotrope carcinogene Wirkungen bei 65 verschiedenen N-Nitrosoverbindungen an BD-Ratten. *Z. Krebsforsch.*, 69: 103—201, 1967.
2. Magee, P. N., and Barnes, J. M. Carcinogenic nitroso-compounds. *Adv. Cancer Res.*, 10: 176—181, 1967.
3. 中国医学科学院林县食管癌防治研究队。食管癌亚硝胺病因的研究一、林县与范县食品中亚硝胺类化合物的分析。抗癌简讯(林县), 1: 5—15, 1974.
4. Sen, N. P., Smith, D. C., and Schwinghamer, L. Formation of N-nitrosamines from secondary amines and nitrite in human and animal gastric juice. *Fd. Cosmet. Toxicol.*, 7: 301—307, 1969.
5. Lijinsky, W., and Epstein, S. S. Nitrosamines as environmental carcinogens. *Nature*, 225: 21—23, 1970.
6. Sander, J., Burkhardt, G., and Schweinsberg, F. Induction of tumors by nitrite and secondary amines or amides. in *Topics in Chemical Carcinogenesis Tokyo Univ. Press*, 297—312, 1972.
7. Mirvish, S. S., Wallcave, L. E., and Shubik, P. Ascorbate-nitrite reaction: Possible means of blocking the formation of carcinogenic N-nitroso compounds. *Science*, 177: 65—68, 1972.
8. Sen, N. P., and Dalpe, C. A simple Thinlayer chromatographic technique for the semi-quantitative determination of volatile nitrosamines in alcoholic beverages. *Analyst* 1972, 97: 216—220.
9. Ivankovic, S., Preussmann, R., Schmahl, D., und Zeller, J. Verhütung von Nitrosamidbedingtem Hydrocephalus durch Ascorbinsäure nach pränataler Gabe von Aethylharnstoff und Nitrit an Ratten. *Z. Krebsforsch.*, 79: 145—147, 1973.
10. Greenblatt, M. Ascorbic acid blocking of aminopyrine nitrosation in NZO/Bl mice. *J. Natl. Cancer Inst.*, 50: 1055—1056, 1973.
11. Kamm, J. J., Dashman, T., Conney, A. H., and Burns, J. J. Protective effect of ascorbic acid on hepatotoxicity caused by sodium nitrite plus aminopyrine. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 70: 747—749, 1973.

12. 中国医学科学院林县食管癌防治研究队。食管癌亚硝胺病因的研究二、林县与范县食品中二级胺、亚硝酸盐和硝酸盐的测定。抗癌简讯(林县), 1:16—21, 1974。

13. 河南省肿瘤防治研究队。林县城关公社付水凹大队60名成年社员尿中亚硝酸盐及硝酸盐排出量测定。抗癌简讯(林县)2:22—24, 1973。

带瘤小鼠脾脏细胞及其RNA的免疫性

上海实验生物研究所肿瘤研究室

叶庆炜 王球达 章国成 刘海湖

在机体对抗肿瘤的免疫反应中，免疫淋巴细胞起着重要作用。大量的研究证明，经肿瘤抗原致敏的免疫淋巴细胞能在体内或体外特异性地抑制肿瘤的生长^(1—8)。甚至，当肿瘤在机体内进行性生长的时候，机体对肿瘤的免疫作用依然存在，患瘤机体的淋巴细胞仍具有抗瘤免疫性。Rosenau和Morton⁽⁹⁾报告，带瘤小鼠的淋巴细胞在体外能够抑制瘤细胞的生长；Gershon等⁽¹⁰⁾指出，带有进行性生长肿瘤的大鼠能排斥这种肿瘤的再移植；Yoshida和Southam⁽¹¹⁾将带瘤小鼠的脾脏细胞与瘤细胞混合后接种于未处理的小鼠时，瘤细胞在宿主中的生长受到抑制。在人体肿瘤中，Hellström⁽¹²⁾和Jagrla moody⁽¹³⁾等也发现肿瘤患者的淋巴细胞对肿瘤细胞有抑制和杀灭作用。Cheema⁽¹⁴⁾和Frenster⁽¹⁵⁾等已经在临幊上应用患者的淋巴细胞进行免疫治疗，收到了一些效果。最近，Deckers等⁽¹⁶⁾⁽¹⁷⁾又进一步以实验证明，带瘤动物的这种抗瘤免疫性可以通过转输脾脏细胞继承传递给其他未经处理的正常动物。

在我们采用小鼠S-180肉瘤为材料的实验中，不仅长瘤小鼠的脾脏细胞与瘤细胞混

合后接种于动物时能抑制瘤细胞在宿主体内的生长；而且，实验还指出，从带瘤小鼠脾脏中抽提的RNA也同样具有这种抗瘤的免疫性。

材料和方法

一、实验动物：体重18—20克“津白”纯种小白鼠。

二、肿瘤模型：小鼠移植型S-180实体肉瘤。

三、实验方法：

1. 带瘤小鼠脾脏细胞悬液的制备：实验小鼠每三天腹腔注射一次S-180瘤细胞悬液，每次注射量为 2×10^6 瘤细胞/0.2毫升，(瘤细胞悬液制备方法见引文⁽⁸⁾)，第四次注射后间隔三天杀鼠剖腹，见腹腔内长有直径0.5—1.5cm大小不等的实体瘤块，取这些小鼠的脾脏用生理盐水洗涤二次后按引文⁽⁸⁾方法制备脾脏细胞悬液。

2. 带瘤小鼠脾脏RNA的提取：按Mach⁽¹⁸⁾所叙述的方法略加改进。带瘤小鼠断颈髓处死，取出脾脏称重后，立刻于乾冰中冰冻，每克脾脏加10毫升0.1M, pH 5.0的Tris缓冲液(内含0.5% 硫酸十二烷基钠和

维生素C阻断亚硝胺在体内合成的实验观察(附图)

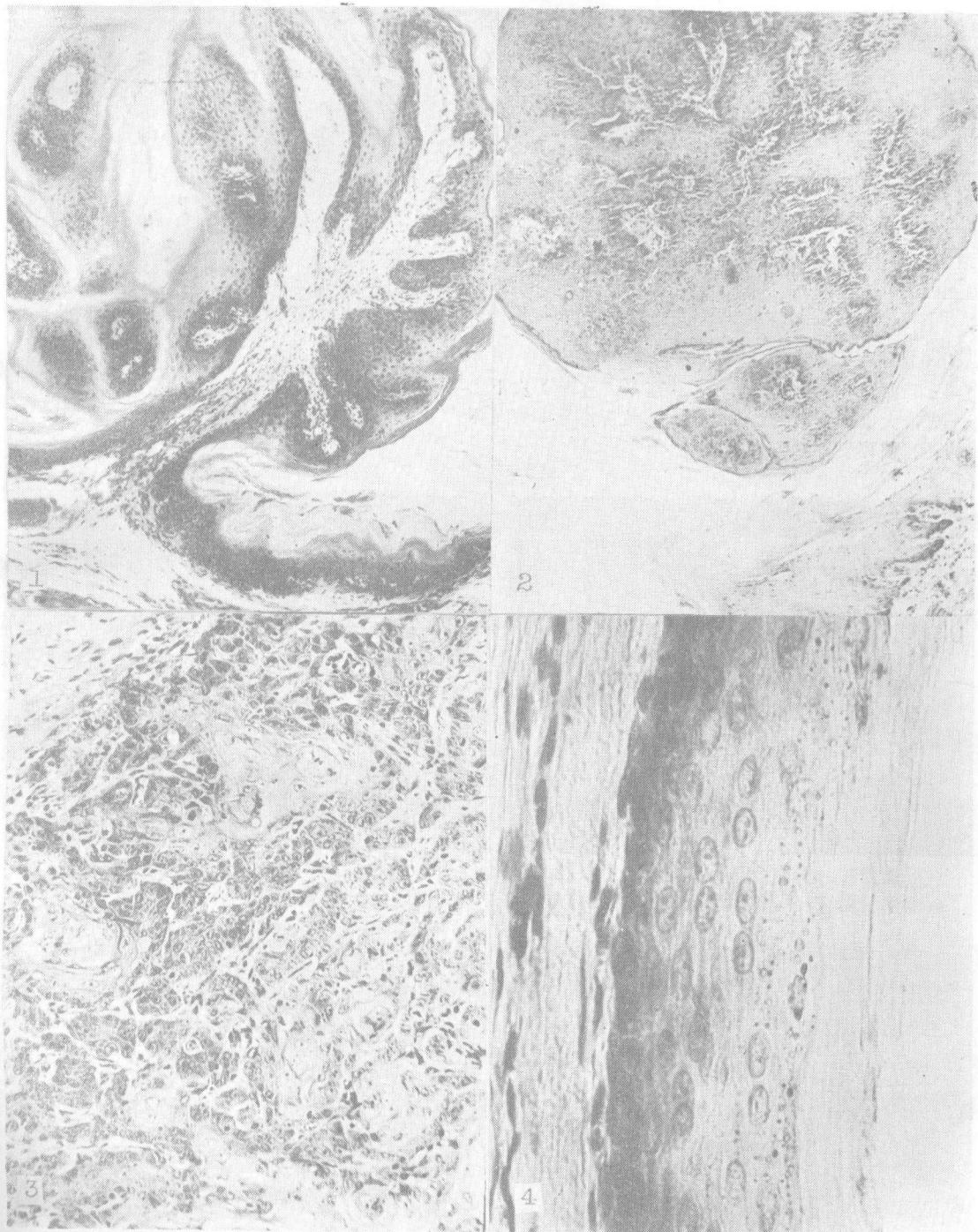


图 1 食管乳头瘤组织切片(甲基苄基亚硝胺组) $\times 50$

图 2 食管乳头瘤横切面(甲基苄胺与亚硝胺组) $\times 55$

图 3 食管鳞状细胞癌(甲基苄基亚硝胺加维生素C及菸酰胺组) $\times 180$

图 4 大鼠食管上皮表现正常形态(甲基胺与亚硝酸钠加维生素C组) $\times 550$