

中国绿茶的抗肿瘤作用

II. 龙雾茶提取物抗癌和免疫动物实验

阎玉森 游联勤 邹玉珍

(中国人民解放军第八一医院肿瘤药理研究室, 南京)

摘 要

龙雾茶提取物对荷瘤小鼠艾氏腹水癌、肝癌、肉瘤180等实体瘤, 以每公斤体重50毫克剂量给药为最佳, 抑瘤率分别为45%、57%和61%; 艾氏腹水型荷瘤小鼠生命延长率为128%。免疫实验证明, 茶叶提取物对小鼠因荷瘤而导致的T淋巴细胞和自然杀伤细胞免疫活性反应下降具有显著的回升作用, T淋巴细胞¹²⁵IUDR参入值(cpm)由对照组的932±27提高到2998±210, 自然杀伤细胞活性由对照组10.7%提高到41%, 恢复到了正常实验小鼠的水平。

关键词: 绿茶, 抗癌作用, 免疫功能, 动物实验

前 言

前报^[1]业已报道, 龙雾茶提取物 T-8750 具有阻断亚硝基化合物形成, 清除有害自由基和抑制人胃腺癌克隆细胞的生长作用。本文则对龙雾茶提取物进行了动物体内抗肿瘤作用的实验, 并测定了其对于荷瘤小鼠免疫功能的影响。

材料与方 法

(一) 材 料

1. 龙雾茶(绿茶)中提取物——T-8750 提取方法同前报^[1]。
2. NIH, BALB/C 纯种小鼠, 由江苏省实验动物中心提供。
3. 可移植性小鼠艾氏腹水癌(EAC)、腹水型肝癌(HAH)、肉瘤180(S₁₈₀), 均由本研究室提供。
4. YAC-I 细胞(一种 Moloney 病毒诱

发 A/SU 小鼠产生的 T 淋巴细胞瘤), 由上海细胞所提供。

5. PRMI1640 细胞培养液(日本 NISSUI 公司产品), 在使用前称 10.4 克, 加 3 次蒸馏的水配制成 1000 毫升内含 2—10⁻² 摩 HEPES, 5—10⁻⁶ 摩 2-巯基乙醇, 每毫升加青、链霉素各 100 单位, 经无菌过滤后备用。

6. 同位素 ¹²⁵IUDR(5-¹²⁵碘-2'-脱氧尿嘧啶核苷), 由上海细胞所提供。

7. 5FUDR(5-氟-2'-脱氧尿嘧啶核苷), Serva 产品。

(二) 方 法

1. 抑瘤试验^[2] 小鼠体重 18—20 克, 雄雌兼用。实体瘤按常规接种 3×10⁶ 个肿瘤细胞, 24 小时后随机分组, 每组 10 只, 腹腔注射和口服给药每天 1 次, 连续 10 天, 停药后 24 小时处死小鼠, 取瘤称重, 与对照组比较, 计算抑瘤率。腹水瘤给药组实验小鼠与对照

文稿收到日期: 1988-03-11

组小鼠比较生存天数, 求出生命延长率。以 t 检验判断其差异显著性。

2. 免疫实验 取 18—20 克健康的 BALB/C, 纯种小鼠, 雌雄兼用, 每组 4 只, 分别腋下接种 3×10^6 细胞。实验分成给药组、生理盐水对照组和正常小鼠对照组。腹腔以每公斤 20 毫克、40 毫克、80 毫克给药, 每天 1 次, 连续 7 天, 停药后第 4 天处死小鼠, 取瘤称重, 计算抑制率; 无菌取脾, 同组小鼠脾合并, 制备脾细胞悬液, 调整细胞浓度 2×10^7 /毫升, 每个样品均设 3 个平行管分别进行 N. K 细胞(Natural Killer Cell 自然杀伤细胞)和 T 淋巴细胞测定^[3]。

N. K 细胞活性试验 取制备的脾淋巴细胞为效应细胞, YAC-1 细胞为靶细胞, 用 ^{125}I UDR 标记靶细胞, 效靶比 200:1。将细胞接种到 2 毫升塑料管内, 最终反应体积为 1 毫升, 500 转离心 1 分钟后置 37°C 5% CO_2 培养箱内温育 16—18 小时, 测定上清液和细胞放射活性脉冲数, 按下列公式表示结果:

N. K 细胞活性(%)

$$= \frac{\text{上清液中 } ^{125}\text{IUDR 参入值(cpm)}}{\text{上清液中 cpm} + \text{细胞 cpm 值}} \times 100$$

脾淋巴细胞转化反应应用 ^{125}I UDR 作为 DNA 合成前体物, 测定致分裂原刀豆球蛋白(Con A)。对脾脏 T 淋巴细胞的转化反应, 将 2.5×10^6 脾脏 T 淋巴细胞与 Con A $5 \mu\text{g}$ 置入含 1 毫升 1640 培养液的塑料小管内, 于 37°C 5% CO_2 湿润空气条件下温育 48 小时, 去上清液, 用 1640 培养液洗涤 2 次后, 加入 0.09 毫升新鲜的 1640 液, 12 微升 10^3 摩 5FUdR 和 0.1 毫升 0.2 微居里的 ^{125}I UDR 1640 液, 再温育 12 小时, 洗涤 2 次, 洗涤后的细胞在 CP-1 型 r 计数器上计 1 分钟脉冲数, (简称 cpm), 按下列公式求淋巴细胞转化抑制率和刺激指数:

淋巴细胞转化反应的抑制率(%)

$$= \left[1 - \frac{\text{实验小鼠脾淋巴细胞对 Con A 反应(cpm)}}{\text{正常小鼠淋巴细胞对 Con A 反应(cpm)}} \right] \times 100$$

$$\text{刺激指数} = \frac{\text{各组脾细胞加入 Con A 时参入 } ^{125}\text{IUDR 每分钟脉冲数}}{\text{各组脾细胞未加入 Con A 时参入 } ^{125}\text{IUDR 每分钟脉冲数}}$$

以上所有试验均重复 3 份样品, 以平均值 ± 标准误表示, 实验数据以 t 检验作统计学处理。

结 果

1. T-8750 的抗肿瘤作用 由表 1 可见, 不同剂量的给药组对荷瘤均有明显的抑制作用, 其中以每公斤体重 50 毫克给药组最为明显, 并经重复实验证明该剂量是 T-8750 抗肿瘤作用的最佳剂量, 剂量的增加或减少, 抗肿瘤作用则未见增强。灌胃给药对 EAC 荷瘤小鼠也具有明显的抑制作用。

2. 不同给药时间对荷瘤小鼠的影响 由表 2 可见, 3 种不同给药时间对荷瘤小鼠均有明显的抑制作用, 和对照组比较, 差异显著, 其中提前 7 次预防 + 接种肿瘤后 7 次治疗组的肿瘤抑制率, 优于提前 7 次预防组和接种肿瘤后 7 次治疗组。

3. T-8750 对荷瘤小鼠脾淋巴细胞 ^{125}I UDR 参入的影响 由表 3 可见, 对照组荷瘤小鼠脾淋巴细胞对 con A 反应受到明显抑制, 抑制率为 79.8%, 给药后的荷瘤小鼠脾淋巴细胞转化反应明显, 与对照组比较, 差异显著。

4. T-8750 对荷瘤小鼠自然杀伤细胞活性的影响 实验结果表明, 对照组荷瘤小鼠对 ^{125}I UDR 标记的 YAC-1 细胞, 平均 N. K 活性(10.7%)明显低于各剂量给药组(图 1), 其中每公斤体重 80 毫克给药组 N. K 细胞活

表1 T-8750对小鼠EAC、HAH和S₁₈₀三种肿瘤的抑瘤效果
Table 1 Inhibiting effect of T-8750 on the growth of EAC, HAH, S₁₈₀ solid tumor in mice

组别 Group	剂量 Dose (mg/kg)	实验动物数 No. of mice beginning end	平均肿瘤重 Tumor average weight	抑制率 Inhibition rate(%)
EAC	Control	30 30	2.7±1.4	
	10	20 20	2.0±1.2	28*
	50	20 20	1.6±1.0	45**
	100	20 20	1.9 1.0	31**
S ₁₈₀	Control	30 29	2.8±1.2	
	10	20 20	1.9±0.8	31*
	50	20 20	1.3±0.6	55**
	100	20 18	1.6±1.0	42**
HAH	Control	30 30	2.6±0.3	
	10	20 20	1.3±0.3	48*
	50	20 20	1.1±0.2	57**
	100	20 19	1.4±0.3	45**
EAC	Control	30 29	1.6±0.3	
	500	20 19	1.1±0.3	32**
	1000	20 18	0.9±0.2	44**

* P<0.05 ** P<0.01

表2 T-8750不同时间腹腔注射对艾氏腹水癌小鼠的影响
Table 2 Effects of different ip. times of T-8750

组别 Group	剂量 Dose (mg/kg/d)	动物数 No. of mice	平均存活时间 Average survival time(d)	生命延长率 Increase of life span(%)
对照组 Control	—	30	32.9±1.8	
肿瘤接种前预防给药组 Prevent	50	20	52.3±2.1	58**
接种肿瘤后治疗组 Treat	50	20	64.0±2.1	95***
接种前预防 +接种后治疗 Prevent+Treat	50	20	75.0±2.5	128***

** P<0.01 *** P<0.001

性恢复正常。N.K 细胞活性达40.95%，差异非常显著。表明T-8750对荷瘤小鼠导致的N. K 细胞活性低下，具有明显的回升作用。

讨 论

癌症(恶性肿瘤)是一大类威胁人民身体

表3 T-8750对荷瘤BALB/C小鼠脾淋巴细胞的¹²⁵IUDR掺入影响Table 3 ¹²⁵IUDR incorporation effect of T-8750 on splenic lymphocyte in BALB/C mice bearing S₁₈₀

组 别 Group	正常鼠 Normal	对照组 Control	不 同 剂 量 组 Dose (mg/kg)		
			20mg	40mg	80mg
同位素掺入值 Incorporating value (cpm)	3692 ± 40	932 ± 30	2260 ± 20	2427 ± 40	2998 ± 40
刺激指数 Index of stimulation	90.7	11.0	40.8	50.1	60.3
细胞分裂抑制率 Inhibition of cell division (%)	4.95	79.8	50.9	47.5	35.7
回升率 Reversion (%)			49.1	52.5	64.3
P 值			<0.01	<0.001	<0.001

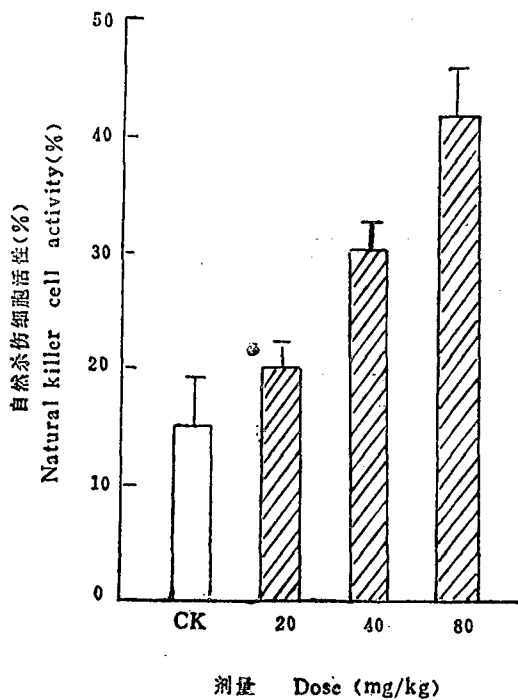


图1 T-8750对荷瘤小鼠(EAC)自然杀伤细胞的活性影响

Fig. Effect of T-8750 on the activity of natural killer cell in BALB/C mice bearing EAC

健康的严重疾病, 据不完全统计, 全世界每

年死于肿瘤的人为430万, 每年有540万人发生肿瘤。我国每年死于肿瘤的病人在100万人以上, 目前癌症的死亡率仍有上升趋势^[4]。而临床常用的化学抗癌药物由于对人体副作用大, 造成使用受到限制。因此, 寻找天然无毒无副作用的抗癌药物是目前国内外研究课题之一。1983年美国国立肿瘤研究所拨出巨款, 号召各国科学家投标, 目的是鼓励寻找新的天然有效物质进行防癌、抗癌的研究。毫无疑问, 用预防的方法控制肿瘤的发生是制服肿瘤最理想的方法。

近年来, 对茶叶药理学研究引起了国内外医学界、药学界和茶叶界的关注。大量的文献报告用确凿的证据肯定了茶叶的医用价值; 对茶叶的抗衰老、抗癌和抗突变的研究也取得了一定进展^[6]。本文研究结果证明, 绿茶提取物除直接作用于肿瘤细胞外, 对宿主的免疫监视系统也起着重要的作用。动物体内给药抑瘤实验证明: T-8750对EAC, HAH和S₁₈₀实体肿瘤以每公斤50毫克剂量给药, 均出现明显的抑制效果。不同剂量给药实验表明, 以每公斤50毫克作用为最佳, 高于或低于这一剂量, 作用就会减弱, 说明

T-8750抗肿瘤作用具有特异的最佳剂量,这与药物的纯度关系密切。对接种后的腹水小鼠以每公斤50毫克,分别对肿瘤接种前、接种后和接种前后连续7次给药,观察小鼠带瘤生存率。结果发现,接种前7次给药组平均生命延长率为58%,接种后7次治疗组生存延长率95%,提前7次预防+7次治疗组,平均生命延长率为128%。和对照组比较差异达 $P < 0.001$ 水平。

为进一步了解T-8750抗肿瘤作用机理,本文从细胞免疫方面进行自然杀伤细胞(N.K)和T淋巴细胞的实验。已知T细胞是一类不需要抗体参与,而具有自然杀伤细胞作用的多功能的细胞群^[6]。啮齿类动物和正常人的淋巴样细胞,不需要任何抗原预先致敏或抗体补体参与,就能在体外破坏或溶解各种靶细胞,这种现象被称为自然杀伤。参与这种细胞毒性的效应细胞称为自然杀伤细胞(Natural killer cell)简称N.K细胞。研究表明,体外高N.K活性和体内抗肿瘤之间存在着正相关,若将N.K细胞注入体内,能延缓肿瘤生长,因此,检测N.K细胞活性在一定程度上能反应带瘤机体的免疫状况。机体内T细胞是主要担负免疫的胸腺依赖淋巴细胞(Thymusdependent Lymphocyte,称之T淋巴细胞),它能产生各种淋巴因子,直接杀伤靶细胞,起着干扰和阻止病毒生长的作用。T淋巴细胞水平的高低,代表免疫功能的强弱。从而认为淋巴细胞转化在测定细胞免疫功能上具有一定重要性。众所周知,肿瘤所能引起抗体免疫功能低下,其中T细胞是一个重要方面。

从本文实验结果所见,随着肿瘤细胞在宿主体内继续生长,宿主的免疫反应也开始下降。当肿瘤生长到可触及水平时,荷瘤小

鼠的细胞活性迅速下降,对T淋巴细胞的抑制率可达80%。有报道指出这种抑制现象可能与荷瘤小鼠脾脏中的抑制性巨噬细胞有关^[7]。当腹腔注射T-8750后,T淋巴细胞转化率由对照组的20%回升到63.4%。随着T-8750剂量的增加,N.K细胞和T细胞有着同步效应,当剂量增加到每公斤80毫克时,N.K细胞活性即恢复到正常水平。研究结果证明:茶叶不仅能抑制肿瘤生长,而且对T淋巴细胞的转化和N.K细胞活性有明显的增强作用,这一作用甚至超过某些已知的免疫调节剂。目前,茶叶的免疫调节功能尚未见其它报道,本实验证明,T-8750在体外和体内都具有抗肿瘤和免疫调节作用。临床研究也初步证明,T-8750既提高了肿瘤病人的免疫防御功能,又对患者体内的肿瘤细胞具有一定的杀伤作用。因此,预计T-8750有可能成为一种较理想的天然无毒的防癌抗癌双重功能药物。

参 考 文 献

- [1] 阎玉森,游联勤,邹玉珍等:中国绿茶的抗肿瘤作用I.龙券茶提取物防癌体外实验,《茶叶科学》,1989,9(2):161—166
- [2] 阎玉森:老山云芝多糖抗肿瘤作用的实验研究,《解放军医学杂志》,1985,10(3)
- [3] 王球达:健脾合剂对鼠免疫功能的影响,《肿瘤》,1983(7):374
- [4] 韩锐:癌的化学预防,《中国肿瘤临床》,1986,13(4):224—227
- [5] 陈宗懋:国外茶叶医学现状,《茶叶文摘》,1988,2(5):5—6
- [6] Herberman R. B.: *Science*, 1981, 214(2): 24
- [7] Kirchner H: Suppressor Cell of Immuno reactivity in Malignancy, *Europe, Cancer*, 1978(14): 453—459

Anticarcinogenic Activity of Chinese Green Tea

II. In Vitro Experiment on the Anticarcinogenic Activity and Immune Stimulation with the Extract of Chinese Green Tea

Yan Yusen You Lianqin Zhou Yuzhen

(Department of Cancer and pharmacology, 81st Hospital of the Chinese People's Liberation Army, Nanjing, China)

Summary

The dynamic Changes of cellular immune function and anticancer effect of T-8750 (an extract of Chinese green tea) in the BALB/C mice bearing EAC, HAH, and S₁₈₀ tumor were investigated. Results showed that intraperitoneal injection T-8750 daily dose 50 mg/kg inhibited the EAC, HAH and S₁₈₀ tumor growth about 45%, 51% and 61% respectively and the life span of T-8750 mice bearing EAC ascites tumor prolonged 128%. Daily dose of T-8750 80 mg/kg stimulated the proliferation of T-Lymphocyte S₁₈₀ tumor bearing mice. The ¹²⁵IUDR incorporation value (cpm) of control group was 932 and that of T-8750 treated group enhanced to 2988. The Natural Killer cell's activity (cpm) enhanced from 10.7% of control group to 41% of treated group. The authors suggested that the mechanism of T-8750's anticancer possibly included both the cellular immune function and the inhibition of tumor growth.

Key words: Green tea, Anticancer, Immune stimulation, In vitro experiment