

## · 实验肿瘤 ·

## 绿茶儿茶素对 BEL-7402 人肝癌细胞裸小鼠 异种移植瘤生长的影响 \*

张乃鑫 刘术娟 赵天如 杨海贤<sup>①</sup> 丁顺利<sup>②</sup> 褚建新<sup>②</sup>  
天津医科大学病理学教研室 (天津市 300070)

**摘要** 目的:探讨绿茶儿茶素(GTC)对 BEL-7402 人肝癌细胞在 BALB/C 裸小鼠体内生长的影响。方法:将受 100 $\mu$ g/ml GTC 作用 4 天的 BEL-7402 细胞接种于 BALB/C 裸小鼠,记录裸小鼠的发瘤时间。接种 50 天后处死裸小鼠,取瘤组织,测量其体积和重量。通过电镜、TUNEL 和免疫组化等方法检测移植瘤细胞的凋亡情况。结果:GTC 作用后的 BEL-7402 细胞在裸小鼠体内平均成瘤时间推迟,实验组:19.29 $\pm$ 12.92 (9~47)天,对照组:12.14 $\pm$ 7.86 (4~24)天;肿瘤平均体积缩小,实验组:0.35 $\pm$ 0.22 (0.05~0.73)cm<sup>3</sup>,对照组:1.45 $\pm$ 1.20 (0.17~3.28)cm<sup>3</sup>;平均重量减轻,实验组:0.18 $\pm$ 0.14 (0.03~0.42)g,对照组:0.65 $\pm$ 0.48 (0.14~1.31)g;瘤细胞凋亡增加,TUNEL 阳性细胞计数均值,实验组和对照组分别为 7.87 $\pm$ 3.75/油镜视野和 2.49 $\pm$ 0.96/油镜视野。结论:GTC 作用后的 BEL-7402 细胞在裸小鼠体内的生长受到抑制,其生长抑制作用可能与肿瘤细胞凋亡增加有关。

**关键词** 绿茶儿茶素 人肝癌细胞 裸小鼠 凋亡

中图分类号:R73-3 R364 文献标识码:A 文章编号:1000-8179(2003)07-0514-04

## Effect of Green Tea Catechins on Tumorigenicity of Human BEL-7402 Hepatoma Cells in Balb/c Nude Mice

Zhang Naixin Liu Shujuan Zhao Tianru et al

Department of Pathology, Tianjin Medical University, Tianjin

**Abstract Objective:** To study the effect of green tea catechins (GTC) on tumorigenicity of the human BEL-7402 hepatoma cells inoculated into balb/c nude mice. **Methods:** The growth inhibition of xenografts was determined by observing the tumor appearance, calculating the tumor volume and measuring the tumor weight. The apoptosis of the xenograft preparations was also examined by using the transmission electron microscopy, the terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) and immunohistochemical staining. **Results:** (1) The growth of BEL-7402 cells pretreated with 100 $\mu$ g/ml GTC was suppressed in Balb/c nude mice, which the occurrence of xenografts was 19.29 $\pm$ 12.92 (9~47)days in GTC treated group as compared with 12.14 $\pm$ 7.86(7~24)days in control group; the average xenografts' volume and weight were 0.35 $\pm$ 0.22(0.05~0.73)cm<sup>3</sup>, 0.18 $\pm$ 0.14(0.03~0.42)g respectively in GTC treated groups, versus 1.45 $\pm$ 1.20(0.17~3.28)cm<sup>3</sup>, 0.65 $\pm$ 0.48(0.14~1.31)g respectively in GTC non-treated groups. (2) The apoptosis of the hepatoma cells in xenografts was enhanced, in which the positive cell number per 1000x field in GTC treated and non-treated group were 7.87 $\pm$ 3.75, 2.49 $\pm$ 0.96, respectively by

\* 本文课题受天津市自然科学基金资助(编号 973609411)

① 天津医科大学电镜中心 ② 中国医学科学院血液学研究所

using TUNEL. **Conclusion:** It is suggested that the growth inhibition of the xenografts may involve in the apoptosis of tumor cells induced by GTC.

**Key words** Green tea catechins Human hepatoma cell Nude mice Apoptosis

绿茶儿茶素 (green tea catechins, GTC) 是绿茶多酚的主要组分。实验研究显示 GTC 具有一定的抑瘤作用<sup>[1]</sup>。GTC 能抑制 BEL-7402 和 SMMC-7721 人肝癌细胞的生长<sup>[2]</sup>, 能诱导 BEL-7402 细胞的凋亡<sup>[3]</sup>。本文进一步探讨了受 GTC 作用后的 BEL-7402 细胞移植瘤在裸小鼠体内的生长情况。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂

GTC, 日本产品, 由中国医学科学院肿瘤防治研究所程书钧院士惠赠。

### 1.2 细胞培养

BEL-7402 人肝癌细胞由中国医学科学院血液学研究所提供。用含 10% 新生牛血清的 RPMI 1640 完全培养液培养。将  $5 \times 10^4$  个/ml 的 BEL-7402 细胞悬液分装于 80ml 培养瓶中进行实验。对照组: 常规培养, 不加入 GTC; 实验组分为贴壁给药组 (贴壁组) 和悬浮给药组 (悬浮组)。贴壁组: 待培养细胞贴壁后, 向培养体系中加入  $100 \mu\text{g/ml}$  的 GTC; 悬浮组: 向细胞悬液中加入 GTC, 终浓度为  $100 \mu\text{g/ml}$ 。各组细胞均常规培养 4 天后, 0.4% 台盼蓝染色, 活细胞计数。将拟接种于裸小鼠的各组细胞浓度调至  $1.75 \times 10^7$  个/ml。

### 1.3 移植瘤细胞接种

BALB/C 裸小鼠 7 只, 5~6 周龄 (购自中国医学科学院肿瘤医院动物室), 在行细胞接种前, 先以放射性铯源低剂量照射 (300cGy)。预实验: 取裸小鼠 1 只, 分别在其右侧和左侧肋部的皮下接种对照组和悬浮组的细胞悬液各 0.2ml。正式实验 (实验 1、2) 2 次, 共 6 只鼠, 实验组和对照组各 3 只。在实验组裸小鼠左、右肋部皮下分别接种贴壁组和悬浮组的细胞悬液各 0.2ml, 在对照组裸小鼠左、右肋部皮下分别接种对照组的细胞悬液 0.2ml。常规饲养裸小鼠, 观察裸小鼠的成瘤时间, 定期测定肿瘤体积 (V),  $V = (L \times W^2) / 2$  (L: 肿瘤长度, W: 肿瘤宽度)。接种细胞 50 天后处死裸小鼠, 取肿瘤组织称重, 并进行以下检测。

1.3.1 电镜观察 取小块肿瘤组织, 2.5% 戊二醛-多聚甲醛溶液固定, 常规制备超薄切片, 柠檬酸和醋酸双氧铀染色, JEOL-100CX 型透射电镜下观察肿

瘤细胞凋亡情况。

1.3.2 核分裂象计数 肿瘤组织固定于 10% 福尔马林溶液中, 常规石蜡包埋制片, HE 染片观察, 并进行核分裂象计数。核分裂象计数方法: 于油镜 ( $\times 1000$ ) 下, 连续计数各组切片中全部存活肿瘤组织完整视野中核分裂的细胞数, 计算各组切片中每个油镜视野内核分裂细胞的均值。

1.3.3 TUNEL 检测 原位细胞死亡检测试剂盒为德国 Boehringer Mannheim 公司产品, 按照其说明书的程序进行操作。TUNEL 阳性细胞计数方法同上述的核分裂象计数方法。

1.3.4 bcl-2、p53、c-myc 蛋白表达和 PCNA 表达的免疫组织化学检测 bcl-2 和 p53 为美国 Santa Cruz 公司产品, c-myc 和 PCNA 为美国 ZYMED 公司产品。应用 SP 方法, 每一指标均以已知阳性表达的蜡切片作为阳性对照。阳性标记细胞计数方法同上述的核分裂象计数方法。

## 2 结果

### 2.1 移植瘤生长的一般情况

移植瘤的成瘤时间、体积和重量见表 1, 图 1。对照组 (7 个肿瘤) 的均值分别为  $12.14 \pm 7.86$  (4~24) 天、 $1.45 \pm 1.20$  (0.17~3.28)  $\text{cm}^3$  和  $0.65 \pm 0.48$  (0.14~1.31) g; 实验组 (7 个肿瘤) 的均值分别为  $19.29 \pm 12.92$  (9~47) 天、 $0.35 \pm 0.22$  (0.05~0.73)  $\text{cm}^3$  和  $0.18 \pm 0.14$  (0.03~0.42) g。提示受  $100 \mu\text{g/ml}$  GTC 作用 4 天后的 BEL-7402 细胞的裸小鼠移植瘤, 除个别例外者, 其成瘤时间普遍长于对照组, 而移植瘤的体积和重量普遍小于对照组。

### 2.2 移植瘤细胞的核分裂象计数

贴壁组和悬浮组分别为 4.10/油镜视野和 3.72/油镜视野, 均较对照组的 5.25/油镜视野趋于减少, 但未呈显著性差异。

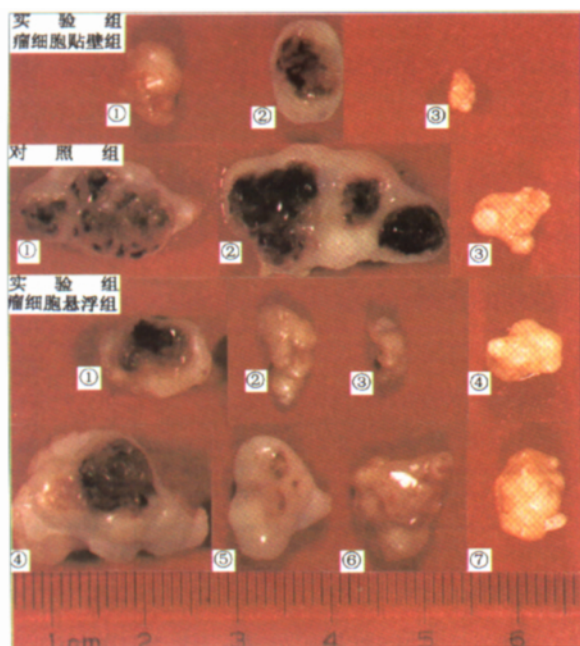
### 2.3 移植瘤细胞凋亡情况的检测

透射电镜观察: 对照组的移植瘤未见明显的凋亡细胞。实验组移植瘤呈现明显的细胞凋亡; 大约 20 个细胞中检见 1 个凋亡细胞, 也可见较多凋亡小体 (图 2)。TUNEL 检测: 实验组中贴壁组和悬浮组移植瘤中的凋亡细胞数均值皆显著大于对照组 (表 2)。

表1 100μg/ml GTC对BEL-7402细胞裸小鼠  
异种移植瘤生长的一般性观察

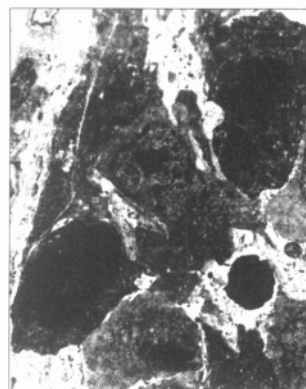
| 分组     | 成瘤时间(天)     | 肿瘤体积(cm <sup>3</sup> ) | 肿瘤重量(g)   |
|--------|-------------|------------------------|-----------|
| 对照组    |             |                        |           |
| 预实验    | 7           | 3.28                   | 1.31      |
| 实验1左侧* | 4           | 2.92                   | 1.23      |
| 实验1右侧* | 4           | 1.34                   | 0.84      |
| 实验1左侧  | 11          | 1.26                   | 0.46      |
| 实验1右侧  | 15          | 0.72                   | 0.36      |
| 实验2左侧  | 20          | 0.48                   | 0.19      |
| 实验2右侧  | 24          | 0.17                   | 0.14      |
| 均值(±s) | 12.14±7.86  | 1.45±1.20              | 0.65±0.48 |
| 实验组    |             |                        |           |
| 预实验    | 16          | 0.73                   | 0.42      |
| 实验1左侧  | 9           | 0.35                   | 0.19      |
| 实验1右侧  | 9           | 0.44                   | 0.31      |
| 实验1左侧  | 17          | 0.45                   | 0.12      |
| 实验1右侧  | 17          | 0.20                   | 0.05      |
| 实验2左侧  | 47          | 0.05                   | 0.03      |
| 实验2右侧  | 20          | 0.25                   | 0.15      |
| 均值(±s) | 19.29±12.92 | 0.35±0.22              | 0.18±0.14 |

\* 指裸小鼠肋部的左侧或右侧。实验组中,左侧为贴壁给药组,右侧为悬浮给药组

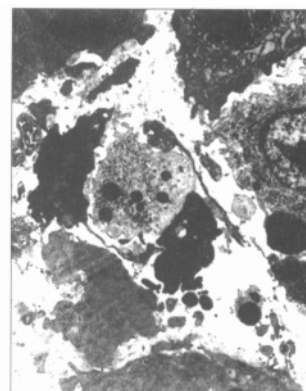


受100μg/ml绿茶儿茶素(GTC)作用4天后,(实验组)的移植瘤体积(无论瘤细胞贴壁组还是悬浮组)普遍小于相应的对照组  
图1 BEL-7402人肝癌细胞BALB/C裸小鼠异种移植瘤

bcl-2、p53、c-myc 蛋白表达和PCNA的免疫组化化学检测:与对照组相比,实验组移植瘤中 bcl-2、p53 蛋白和PCNA 的表达,皆未显示有意义的结果。各组移植瘤均未呈现 c-myc 蛋白表达。



A 瘤细胞贴壁给药组(×5 700)



B 瘤细胞悬浮给药组(×4 950)

受100μg/ml绿茶儿茶素(GTC)作用4天后凋亡的瘤细胞和凋亡小体

图2 BEL-7402人肝癌细胞BALB/C裸小鼠异种移植瘤细胞凋亡的电镜观察

表2 移植瘤切片中TUNEL阳性细胞计数均值(阳性细胞数/1 000倍视野)(±s)

| 组别  | 移植瘤数 | TUNEL阳性细胞计数 |
|-----|------|-------------|
| 对照组 | 7    | 2.49±0.96   |
| 实验组 |      |             |
| 贴壁组 | 3    | 5.96±2.13   |
| 悬浮组 | 4    | 9.30±4.97   |
| 合计  | 7    | 7.87±3.75*  |

\* 与对照组比较 P<0.05

### 3 讨论

本文将受100μg/ml GTC作用4天后的BEL-7402人肝癌细胞移植于裸小鼠体内,与对照组比较,移植瘤成瘤时间明显延长,移植瘤的体积和重量明显缩小和减轻。虽然用于本实验的裸小鼠样本较小、测得的指标数据变异程度较大,但这一结果可提示GTC作用后的BEL-7402细胞在裸小鼠体内的生长受到一定程度的抑制。对移植瘤细胞的增殖活

性和分裂活性检测的结果显示:实验组移植瘤中,瘤细胞的核分裂象计数和 PCNA 的表达稍低于对照组,但未呈现显著性差异。进一步检测移植瘤细胞的凋亡情况,电镜结果显示对照组细胞极少凋亡,而实验组(贴壁组和悬浮组)呈现大量凋亡细胞;TUNEL 结果也显示贴壁组和悬浮组凋亡细胞的均值显著高于对照组。这表明 GTC 对于移植瘤中 BEL-7402 细胞的增殖活性和有丝分裂活性可能无明显抑制作用,而对瘤细胞的凋亡可能有诱导作用。

绿茶提取物诱导体外培养人恶性肿瘤细胞凋亡的研究已见报道<sup>[3-8]</sup>。有关移植瘤的研究显示:绿茶提取物抑制 S180 肉瘤、EAC 腹水癌、HAC 肝癌等移植瘤在小鼠体内的生长<sup>[9]</sup>,抑制 BHP 诱发的仓鼠胰腺癌移植瘤的生长<sup>[10]</sup>,绿茶儿茶素 EGCG 抑制 PC-3 人前列腺癌和 MCF-7 人乳腺癌细胞株在 BALB/C 裸小鼠体内的生长,并可使已形成的肿瘤体积缩小<sup>[11]</sup>,但对 GTC 体内抑制移植瘤生长机制的研究很少。最近 Jung 报道,EGCG 通过阻断血管内皮细胞生长因子的产生,抑制血管的生成,从而抑制了 HT29 人结肠癌细胞在 BALB/C 裸小鼠体内的生长,同时诱导肿瘤细胞和血管内皮细胞的凋亡明显增加<sup>[12]</sup>。GTC 对移植瘤细胞生长的抑制作用,是否与凋亡有关,以及机制如何,尚不清楚。本研究中电镜和 TUNEL 检测表明,GTC 诱导了 BEL-7402 移植瘤细胞的凋亡。但用免疫组织化学方法进一步检测凋亡相关基因 bcl-2、p53 和 c-myc 在移植瘤细胞中的表达结果却显示,实验组瘤细胞的 bcl-2 和 p53 蛋白表达均与相应的对照组无显著性差异,两组均未检测到 c-myc 蛋白的表达。提示 BEL-7402 细胞中存在 bcl-2 和 p53 蛋白的过度表达,细胞的异常增殖可能与这两种基因的调控异常有关,但 GTC 对于 BEL-7402 细胞凋亡的诱导可能与 bcl-2、p53 和 c-myc 的表达无直接关系,或者由于检测手段的灵敏度不足以精确测出三者的改变。推测 BEL-7402 细胞受 GTC 作用后可能某些性状发生了改变,因而易于凋亡,使移植瘤的生长受到抑制。由于本实验中使用台盼蓝染色进行细胞计数,实验组细胞中可能含有较多细胞膜仍完整而不能被台盼蓝染色识别的早期凋亡细胞,这种早期凋亡细胞仍被计数为“活细胞”,致使接种于实验组裸小鼠皮下的 BEL-

7402 活细胞数实际少于对照组,也可能是使实验组移植瘤生长较慢的一个原因。关于 GTC 诱导 BEL-7402 人肝癌细胞凋亡的机制有待通过更精确的手段进一步阐明。

#### 参考文献

- 1 Yang CS, Wang ZY. Tea and cancer[J]. J Natl Cancer Inst, 1993,85(13):1038~1049
- 2 刘术娟,丁顺利,张乃鑫,等.绿茶儿茶素对人肝癌细胞的生长抑制作用[J].中国肿瘤临床,1999,26(9):691~692
- 3 刘术娟,张乃鑫,杨海贤,等.绿茶儿茶素对于人肝癌细胞的凋亡诱导作用[J].中国肿瘤临床,2000,27(12):902~905
- 4 Ahmad N, Feyes DK, Nieminen AL, et al. Green tea constituent epigallocatechin-3-gallate and induction of apoptosis and cell cycle arrest in human carcinoma cells[J]. J Natl Cancer Inst, 1997,89(24): 1881~1886
- 5 Yang GY, Liao J, Kim K, et al. Inhibition of growth and induction of apoptosis in human cancer cell lines by tea polyphenols[J]. Carcinogenesis, 1998,19(4): 611~616
- 6 Tan X, Hu D, Li S, et al. Differences of four catechins in cell cycle arrest and induction of apoptosis in LoVo cells [J]. Cancer Lett, 2000,158(1):1~6
- 7 Hibasami H, Komiya T, Achiwa Y, et al. Induction of apoptosis in human stomach cancer cells by green tea catechins [J]. Oncol Rep, 1998,5(2):527~529
- 8 Chen C, Yu R, Owuor ED, et al. Activation of antioxidant-response element (ARE), mitogen-activated protein kinases (MAPKs) and caspases by major green tea polyphenol components during cell survival and death [J]. Arch Pharm Res, 2000,23(6):605~612
- 9 叶钟祥,叶泉声,李子瑜,等.茶叶对小白鼠移植性肿瘤的影响[J].肿瘤,1984,4(3):128~130
- 10 Hiura A, Tsutsumi M, Satake K. Inhibitory effect of green tea extract on the process of pancreatic carcinogenesis induced by N-nitrosobis-(2-oxypropyl) amine (BOP) and on tumor promotion after transplantation of N-nitrosobis-(2-hydroxypropyl) amine (BHP)-induced pancreatic cancer in Syrian hamsters[J]. Pancreas,1997,15(3): 272~277
- 11 Liao S, Umekita Y, Guo J, et al. Growth inhibition and regression of human prostate and breast tumors in athymic mice by tea epigallocatechingallate[J]. Cancer Lett, 1995,96(2):239~243
- 12 Jung YD, Kim MS, Shin BA, et al. EGCG, a major component of green tea, inhibits tumour growth by inhibiting VEGF induction in human colon carcinoma cells [J]. Br J Cancer, 2001,84(6):844~850

(2002-07-15收稿)

(柏敏霜校对)