

## 绿茶多酚抑制突变和癌变的研究进展

程书钧 何其饶\* 冯 杰 白谨峰 郭素萍 李秀琴

(中国医学科学院肿瘤研究所 北京 \*美国罗格斯大学 新泽西食品科学研究室 新泽西)

**摘要** 绿茶提取物可以抑制 AFB<sub>1</sub>, BaP 等致癌物诱导细菌回复突变及 V79 细胞 SCE 和染色体畸变等, 并明显抑制 BaP, X-射线或 MCA/TPA(启动和促癌变)诱导 BALB/3T3 细胞恶性转化。绿茶提取物抑制突变和癌变(尤其是促癌)的机制与其下列作用有关: 诱导谷胱甘肽硫转移酶活性; 抑制 TPA 诱导的炎症反应; 抑制 TPA 诱导鸟氨酸脱羧酶活性; 阻止 TPA 对细胞间信息传递的抑制作用, 清除自由基; 及具有抗氧化作用等。绿茶提取物的主要成分是茶多酚。该研究表明, 绿茶多酚可能对于人类肿瘤的预防及抗衰老具有应用价值。

**关键词** 绿茶多酚; 抗突变; 抗癌变

饮茶在中国已有数千年的历史, 茶不仅有止渴, 提神的生理功能, 而且有许多药理作用, 如利尿、降血压, 降胆固醇等, 但饮茶和肿瘤发生的关系还不清楚。日本学者最近报道, 日本静冈县中西部盛产绿茶, 该地区居民肿瘤死亡率, 尤其是胃癌死亡率明显低于全国肿瘤平均死亡率, 认为这和当地居民主要饮用绿茶有明显关系<sup>[1]</sup>。近几年来我们从绿茶中提取了多酚类抗氧化剂<sup>[2]</sup>, 并对这种绿茶提取物抑制突变和癌变及其作用机制进行了比较系统的研究, 本文将就其中一些主要研究进展作扼要的综合报道。

### 1. 绿茶提取物(GTE)抑制致癌物诱导鼠伤寒沙门氏菌回复突变

Ames 试验结果表明, GTE在2mg/平皿剂量时, 可以抑制多种致癌物诱导 TA98 回复突变, 其抑制率分别为: 80% (苯并(a)芘, BaP 5 $\mu$ g/平皿); 92% (黄曲霉素 B<sub>1</sub>, AFB<sub>1</sub> 1 $\mu$ g/平皿); 98% (2-氨基-3, 4-二甲基咪唑(4, 5-f)喹啉, MeIQ 7 $\times$ 10<sup>-4</sup> $\mu$ g/平皿)及95%(煎鱼提取物, 1.5g鱼重/平皿)。在抑制香烟凝集物诱导 TA98 回复突变的比较研究中, 发现在等浓度条件下, GTE 的抑制作用要明显强于鞣花酸, 丁羟基苯甲

醚, 维生素 C,  $\beta$ 胡萝卜素和维生素 E。

### 2. 绿茶提取物抑制致癌物诱导哺乳动物细胞染色体损伤及基因正向突变

在培养的V79细胞试验中, GTE(20 $\mu$ g/ml)可使 AFB<sub>1</sub> (3 $\times$ 10<sup>-8</sup>mol/L)诱导的姊妹染色单体交换(SCE)由 14.8/细胞降至 7.8/细胞。GTE(40 $\mu$ g/ml)使 AFB<sub>1</sub> (10<sup>-6</sup>mol/L)诱导 V79 细胞染色体畸变率由 20% 下降至 6%。在6-TG抗性突变试验中, GTE (200 $\mu$ g/ml)可使 BaP (8 $\times$ 10<sup>-6</sup>mol/L)诱导的突变率由 48.3/10<sup>6</sup> 存活细胞降至 11.3/10<sup>6</sup> 存活细胞, 使 AFB<sub>1</sub> (10<sup>-6</sup>mol/L) 诱导的突变率由 25.4/10<sup>6</sup> 存活细胞降至 1.1/10<sup>6</sup> 存活细胞。GTE 同样明显地抑制 MeIQ 诱导 V79 细胞 SCE 及微核的增高。大鼠原代肝细胞试验表明, GTE(40 $\mu$ g/ml)可以使 MeIQ(10<sup>-4</sup>mol/L)或煎鱼提取物12.5mg鱼重/ml诱导的非程序性DNA合成中<sup>3</sup>H-胸苷掺入分别下降 68% 及 58%。以上各项试验中, GTE 的抑制作用均有明显的剂量效应关系。

### 3. 绿茶提取物抑制细胞恶性转化

BALB/3T3细胞转化试验已被广泛应用于研究细胞癌变机制。我们将BALB/3T3种

于含10%胎牛血清的MEM培养基中,于5% CO<sub>2</sub>温箱中培养。将1×10<sup>5</sup>细胞和300细胞分别种于25cm<sup>2</sup>培养瓶,前者用于转化试验,后者用于观察毒性作用。按表1至表3的说明,分别用致癌物或X射线处理,以及

加入促癌物12-O-四癸酰基-佛波-13-乙酸酯(TPA)。在相应的组别中加入GTE,观察其抑制作用。实验进行4~5周,按我们以前报道的标准计数Ⅲ型转化灶<sup>[3]</sup>,计算每组平均转化率(平均细胞转化灶/10<sup>5</sup>存活细胞)。

**表 1 GTE 抑制 BaP 诱导 BALB/3T3 细胞转化**

绿茶提取物* μg/ml	苯并芘 μg/ml (3d)	集落形成率 %	转化灶数 /平皿	转化频率 /10 <sup>5</sup> 成活细胞	抑制率 %
0	0	64.5	0.13	2	
0	2	6.3	1.4	222**	
5	2	7.0	0.87	124**	44.1
25	2	13.4	0.87	65**	70.7

\* 绿茶提取物在苯并芘处理前6小时加入,其后每次换液继续加入  
\*\* P<0.05

**表 2 GTE 抑制 MCA/TPA 诱导 BALB/3T3 细胞转化**

	绿茶提取物		3-甲基胆蒽		每次换液培养基中含**		集落形成率 %	转化灶数 /平皿	转化频率 /10 <sup>5</sup> 成活细胞	抑制率 %
	处理3天*	μg/ml	0	μg/ml	绿茶提取物+TPA	μg/ml				
实验 I	0	0	0	0	0	0	41.4	0	0	
	0	0	0	0.1	0	0.1	40.4	0	0	
	0	0.5	0	0	0	0	24.8	0.2	8.1	
	0	0.5	0	0.1	0	0.1	23.6	1.0	42.3***	
	2.5	0.5	2.5	0.1	2.5	0.1	31.3	0.3	9.6***	77.3
	0	0.5	2.5	0.1	2.5	0.1	29.4	0.5	17.0***	59.8
实验 II	0	0	0	0	0	0	52.5	0	0	
	0	0.5	0	0.1	0	0.1	28.5	1.8	63.2***	
	5.0	0.5	5.0	0.1	5.0	0.1	53.2	0.2	5.6***	91.1
	0	0.5	5.0	0.1	5.0	0.1	46.5	0.4	8.6***	86.4

\* 绿茶提取物在3-甲基胆蒽处理前6小时加入  
\*\* 在用3-甲基胆蒽处理3天后进行  
\*\*\* P<0.01

**表 3 GTE 抑制 X-射线诱导 BALB/3T3 细胞转化**

绿茶提取物* μg/ml	X-线照射 Gy	集落形成率 %	转化灶数 /平皿	转化频率 /10 <sup>5</sup> 成活细胞	抑制率
0	0	52.5	0	0	
0	4	2.4	1.20	333.33**	
5.0	4	41.6	0.11	1.76**	99.5

\* 绿茶提取物在X-线照射前48小时加入,其后每次换液中继续加入  
\*\* P<0.01

表1结果表明, GTE可以明显抑制BaP诱导BALB/3T3细胞转化。表2结果指出, GTE(2.5~5.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )有明显抑制TPA促进细胞癌变的作用, 如果GTE先于3-甲基胆蒎(MCA), 则其抑制作用更为明显。

从表3结果可以看出, GTE(5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )几乎完全抑制x射线(400 rad)诱导BALB/3T3转化, 并明显降低x射线对细胞的致死作用, 使细胞集落形成率明显升高。

#### 4. 绿茶提取物阻断TPA对细胞间隙交通的抑制作用

近年来研究表明, 促癌物可以抑制细胞间的信息传递, 这对于已经启动的细胞发生癌变有重要影响<sup>[4]</sup>。我们的研究发现, 将荧光素Lucifer yellow介入培养的小鼠肝细胞, 有94.7%的细胞, 其介入的荧光素可以通过细胞间隙交通转移到相邻的细胞中去, 加入肝促癌物苯巴比妥24h后, 再介入荧光素, 结果只有66%的细胞可见这种转移作用。如果把GTE和苯巴比妥同时加入, 则这种荧光素转移又可恢复到93.5%。利用人表皮角化细胞培养获得同样的结果, 即TPA使这种细胞间荧光素转移由36.7%降到9.8%, 若GTE和TPA同时加入, 又可使细胞间这种交通恢复到36.7%(Randel等将发表资料)。该实验表明, GTE可以明显阻断促癌物对细胞间隙交通的抑制作用。

#### 5. 绿茶提取物对体内某些酶活性的影响及对TPA诱导炎性水肿的抑制

昆明种小鼠喂GTE 5mg/d, 共19d, 其肝脏中谷胱甘肽硫转移酶活性增高36%, 而超氧化物歧化酶(SOD)活性增高25%, 肺组织中这种酶活性也有增高, 但不如肝脏明显, 而食管粘膜中酶活性未见增高<sup>[5]</sup>。

TPA(5nmol)涂抹小鼠皮肤, 5h后可引起表皮中鸟氨酸脱羧酶活性明显增高, 如果同时加入GTE(0.72-3.6mg), 则TPA诱导

鸟氨酸脱羧酶的活性分别被抑制85%和89%<sup>[6]</sup>。TPA(0.4 $\mu\text{g}$ )可引起小鼠耳皮肤炎性水肿, 重量增加。如GTE(0.5~2.0mg)和TPA同时涂抹, 则因炎性水肿导致的耳重量增加可下降21.5%~47.0%。

#### 6. 绿茶提取物清除自由基

利用电子自旋共振技术发现TPA可以刺激人白细胞产生自由基(超氧阴离子和羟自由基), 当加入GTE后, 这种自由基受到明显清除。GTE清除TPA产生的自由基的作用比维生素C和维生素E更强<sup>[7]</sup>。我们最近研究表明, 次黄嘌呤和黄嘌呤氧化酶反应产生的超氧阴离子可以诱导IAR20肝细胞SCE增高, 当加入GTE后, 则明显抑制这种自由基诱导细胞SCE的增高。在20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度时, GTE的抑制作用似比超氧化物歧化酶更强(表4)。

#### 7. 绿茶提取物的主要成分

研究表明, 这种绿茶提取物主要成分是茶多酚, 包括没食子酰表没食子儿茶素(-)-Epigallocatechin-3-gallate; 没食子酰表儿茶素(-)-Epicatechin-3-gallate; 表没食子儿茶素(-)-Epigallocatechin; 及表儿茶素(-)-Epicachin。在这几种茶多酚中, 没食子酰表没食子儿茶素的含量约占50%以上。抑制脂质过氧化的试验表明, 这种绿茶多酚提取物的抗氧化性比人工合成的抗氧化剂丁羟基苯甲醚更强<sup>[8]</sup>。

#### 讨论

许多与人类肿瘤发生有关的致癌物, 致突变物及促癌物, 已经从环境或食品中分离出来。人们不可避免地会经常摄入一定数量的致癌物, 但多数人不一定都发生肿瘤, 这除了人体内有一些保护因素之外, 还可能和人们从饮食中同时也摄入了抗癌物、抗促癌物有关。致癌物和抗癌物在人体内的相互作用

表 4 GTE 和 SOD 对次黄嘌呤和黄嘌呤  
氧化酶诱导 IAR 20 细胞 SCE 的抑制作用

	抑制剂 μg/ml	次黄嘌呤 7μg/ml	黄嘌呤氧化酶 15μg/ml	SCE均值±标准误
GTE	0	0	0	11.3±0.8
	0	+	0	10.4±0.6
	0	0	+	12.0±0.9
	0	+	+	25.1±1.5*
	2.5	+	+	17.4±0.9*
	5.0	+	+	16.7±1.1*
	10.0	+	+	15.3±1.1*
	20.0	+	+	12.6±0.5*
SOD	10.0	+	+	16.8±1.1*
	20.0	+	+	16.0±0.8*

\* P<0.001

用及其平衡失调,可能和人类某些常见肿瘤的发生有密切关系。流行病学研究表明,经常食用新鲜蔬菜和水果的人群,某些肿瘤发病率明显降低<sup>[7]</sup>,说明某些天然食物中可能含有抗致癌物。我们在研究天然抗致突变物的过程中,发现绿茶提取物有抑制突变作用,并可以明显抑制 BaP 或x射线诱导细胞恶性转化,以及抑制TPA的促癌作用。最近研究表明,这种绿茶多酚可以抑制 DMBA/TPA诱发小鼠皮肤乳头瘤的发生<sup>[9]</sup>。绿茶提取物抑制细胞癌变的机制是比较复杂的。我们的研究初步表明,GTE 虽然可能抑制某些致癌物对细胞的致癌作用,但更明显地表现出很强的抑制TPA的促癌作用。近年来的研究指出,TPA的促癌作用与其有下列作用有关,包括引起局部组织炎症反应:诱导鸟氨酸脱羧酶活性增高;抑制细胞间信息传递;以及引发自由基产生等<sup>[8]</sup>。而绿茶多酚在这几个环节上都表现出明显的拮抗TPA的作用。我们认为 GTE抑制x射线诱导细胞转化作用,很可能也是由于其清除x射线产生的自由基的结果。GTE 化学分析表明,绿茶提取物的主要成分是多酚类化合物,这些多酚类富有羟基,具有很强的抗氧化性。这

种化学结构可以解释为什么绿茶提取物具有很强的清除自由基的作用。研究表明,自由基对细胞 DNA 的损伤作用和人类肿瘤、心脏病及衰老进程均有密切关系<sup>[9]</sup>。研究天然的自由基清除剂在抗衰老及预防肿瘤中的应用,已引起科学家的很大兴趣。天然的绿茶多酚抑制突变、癌变及其机制的一系列研究提示,对于经常接触能激发自由基产生的有害因素(如x射线,吸烟,某些化学致癌物等)的人群,饮用绿茶可能是有益的。

#### 参考文献

1. Oguni I, et al. Epidemiological and physiological studies on the antitumor activity of fresh leaf green tea. Abstracts of International Conference on Tea-Quality-Human Health. Hang-zhou: 1987; 43.
2. 程书钧,等。绿茶抗氧化剂成分抑制突变作用的初步研究。实验生物学报。1986; 19(4): 427.
3. Cheng SJ, et al. Mutagenic, transforming and promoting effect of pickled vegetables from Linxian County, China. Carcinogenesis. 1980; 1: 685.
4. Yamasaki H, Katoh F. Further evidence for the involvement of gap-junctional intercellular communication in induction and

(下转第11页)

6. Kleeberg U, Klinger W. Sensitive formaldehyde determination with NASH's reagent and a tryptophan reaction. *J Pharm Exper Therap* 1982; 8: 19.
6. 余应年, 等. A modified method of UDS detection in vitro suitable for screening the DNA-damaging effects of chemicals. *Mutat Res* 1983; 122: 377.
8. 余应年, 等. The possibility of using ADPRT mediated decrease of cellular NAD content as an end-point in detecting the chemical induced DNA damage---Development of a new short-term screening test for carcinogens mutagens. *Proc Chin Acad Med Sci. & PUMC* 1989; in press.
9. Bernofsky C and Swan M. An improved cycling assay for nicotinamide adenosine dinucleotide. *Ann Biochem* 1973; 53: 452.
10. 戴一凡, 等. The cell-cycle dependent and the DNA damaging agent-induced changes of cellular NAD content and their significance. *Mutat Res* 1987; 191: 29.
11. Lowry OH, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 194: 265.
12. Wiebel FJ. Activation and inactivation of carcinogens by microsomal monooxygenases: modification by benzoflavones and polycyclic aromatic hydrocarbons. In: Slaga TJ, ed. *Carcinogenesis* vol. 5. New York: Raven press, 1980; 57-84.
13. Brookes P, et al. Summary report on the performance of in vitro mammalian assays. In: de serres FJ, Ashby J, eds. *Evaluation of short term tests for carcinogens: report of the international collaborative program*. New York: Elsevier, 1981: 77-85.
14. Dhami MSI, et al. Evidence for variation in membrane phospholipids following the induction of cytochrome P450 and P448. In: Vereczkey L, Magyar K, eds. *Cytochrome P450, biochemistry, biophysics and induction*. Budapest: Akademiai Kiado, 1985; 517-520.
15. Steward AR, et al. Synthesis and degradation of 3-methyl cholanthreneinducible cytochrome P450 and their mRNA in primary monolayer cultures of adult rat hepatocytes. *Arch Biochem Biophys* 1985; 241: 494.
16. 孙路, 等. A test using cultured cells with induced mixed-function oxygenase in the unscheduled DNA synthesis assay for detecting promutagens / procarcinogens. *Mutat Res* 1987; 191: 45.

~~~~~

(上接第4页)

- maintenance of transformed foci in BALB/3T3 cells. *Cancer Res* 1988; 48: 3490.
5. 钟山. 绿茶F-6和鞣花酸对 GST 和 SOD 活性的影响. 中国医科院, 中国协和医科大学, 研究生毕业论文. 1987; 1~43.
  6. 程书钧, 等. 绿茶提取物抑制TPA促癌作用及其机制的研究. *中国医学科学院学报*. 1989; (印刷中)
  7. 忻文娟, 等. 自旋捕获和自旋标记技术应用于活细胞的某些研究. *自由基生物学与自由基医学学术会议资料*. 北京: 中国生物物理学会, 1988; 69-71.
  8. Kozumbo WJ, Cerrutti PA. Antioxidants as antitumor promoters. In: Shankel DM, et al, eds. *Antimutagenesis and anticarcinogenesis mechanisms*. New York: Plenum Press, 1986; 491-506.
  9. Ames BN. Dietary carcinogens and anticarcinogens. Oxygen radicals and degenerative disease. *Science* 1983; 221: 1256.

## INHIBITORY EFFECT OF GREEN TEA POLYPHENOLS ON MUTAGENESIS AND CARCINOGENESIS

Cheng Shujun, Ho Chitang\*, Feng Jie, Bai Jinfeng, Guo Suping, Li Xiuqin

Cancer Institute, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing

\* Department of Food Sciences, Rutgers University, NY, USA

Green tea extract(GTE) inhibited the mutagenicity of AFB-1, BaP, MeIQ, cigarette smoke condensate and extract of fried fish in *Salmonella typhimurium* test. A significant inhibitory effect of GTE on malignant transformation was observed in BTB/3T3 cells induced by BaP, X-ray, or MCA/TPA (initiation and promotion)separately. Our preliminary results indicate that the mechanism, especially for anti-promotion, is related to the following functions;

1. GTE induces glutathione-s-transferase,
2. GTE inhibites inflammation induced by TPA,
3. GTE reduces the TPA-induced ornithine decarboxylase activity, & prevents the inhibition ofintervellular communication by TPA,
4. GTE shows a very strong scavenging effects on active oxygen radicals.

## INDUCTION OF CYTOCHROME P450 ISOZYMES IN FL CELL AND ITS APPLICATION IN SHORT-TERM BIOASSAYS FOR PROVIDING ACTIVATING SYSTEM

Yu Yinnian, Zhang Liyan, Sun Lu\*, Dai Yifan\*, Fang Ming\*, and Chen Xingruo

Institute of Basic Medical Sciences, Zhejiang Medical University

and Zhejiang Division of Chinese Academy of Medical Sciences, Hongzhou

The inducible expressions of genes of cytochrome IA and IIB in human amnion FL cell line was showed with 3-MC, beta-NF, NE and PB as inducer and AHH, EROD, ECOD and APND as marker end points. It is indicated that the FL cell has kept a broad spectrum of xenobiotic metabolizing enzymes. The highest inducing response was obtained in EROD and APND by 3-MC in combination with NE. Characteristics of cytochrome P448 dependent MFO has been showed also in FL cell both in the original and induced situations. The activity of the induced cytochrome P450 isozymes keeps at a high level for 36 hours at the least after the removal of the xenobiotic inducers from the culture medium. The capability of activating a variety of promutagens and procarcinogens was further demonstrated in FL cell with UDS and ADPRT assays in media with low cellular NAD content. Above mentioned results indicates the substitution of the hepatocyte microsomal-NAD activation system by induced FL cell culture is feasible.