

绿茶对实验性大肠癌抑制作用的研究

银平章 程书钧¹ 赵进英 祝庆蕃² Y. Hara³

刘政国 孔令非 徐继跃 张广甫 党伟一 吴凯彦

(河南省人民医院病理科 郑州 450003)

摘要 本实验观察了绿茶儿茶素对1,2-DMH诱发小鼠大肠癌的影响,结果显示:①绿茶多酚及绿茶水溶性提取物对1,2-DMH诱发C₅₇BL小鼠大肠隐窝上皮细胞微核及凋谢有明显的拮抗作用。本实验所用微核及凋谢的测定方法是一种简便、快速而且经济的抗结肠致癌物筛选方法。②绿茶儿茶素对大肠癌有预防作用,其抗癌机制可能与绿茶儿茶素成分中超氧化物歧化酶及其它抗氧化剂清除癌组织中自由基有关。

关键词 绿茶儿茶素 大肠癌 凋谢 微核 二甲基胍 超氧化物歧化酶

茶叶是人们喜用的饮料,它含有许多对人体有益的物质,具有兴奋、强心、利尿、杀菌消炎等许多生理功能,有益于人体健康。近年研究发现,从绿茶提取的多酚类化合物含有多种儿茶素,具有防癌抗癌作用,这些儿茶素主要有没食子酰表儿茶素(EGC)、没食子酰表没食子儿茶素(EGCG)、表儿茶素(EC)和表没食子儿茶素(EGC)。本研究观察绿茶儿茶素对1,2-二甲基胍(DMA)诱发小鼠大肠隐窝上皮细胞微核和凋谢以及大肠癌的抑制作用。

材料和方法

材料 近交系C₅₇BL小鼠36只,昆明种封闭群小鼠350只,标准颗粒饲料均由河南医科大学实验动物中心提供,1,2-DMH为美国Sigma公司产品,儿茶素(GTE,含量为91%),EGCG(纯度98%)由日本三井农林株式会社食品研究所Hara博士提供,绿茶多酚(GTP)和绿茶水溶性提取物(GTW)参照程书钧等介绍的方法从绿茶中提取^[1],兔PAP为Dako公司产品,兔抗SOD-1抗血清由第二军医大学同位素室提供。

方法 近交系C₅₇BL小鼠及昆明种封闭群小鼠体重18g左右,雌雄各半,饲养室温20℃,湿度50%,室内明暗各12h,10天检疫后随机分组。

一. C₅₇BL小鼠分12组,每塑料盒3只,①GTP组,第一组DMH+水,第二组GTP 1mg+DMH,第三组GTP 2mg+DMH,第四组GTP 4mg+DMH,第五组EDTA+水,第六组GTP 4mg+EDTA。②GTW组,第一组DMH+水,第二组GTW 2mg+DMH,第三组GTW 4mg+DMH,第四组GTW 8mg+DMH,第五组EDTA+水,第六组GTW 8mg+EDTA。第一组小鼠注射DMH前不给绿茶GTP或GTW,自由饮水,第二、三、四组先行GTP或GTW灌胃,每天1次,连续5天;第5天时,第一、二、三、四组分别腹腔注射DMH(20mg/kg BW),第五、六组腹腔注射等量EDTA(0.5mg/只)作阴性对照,注射前分别用蒸馏水和GTP或GTW(4mg/只)灌胃,每天1次,连续5天。

二. 昆明小鼠分七组,第一组DMH+水,第二组DMH+儿茶素1mg,第三组DMH+儿茶素2mg,第四组DMH+儿茶素4mg,第五组DMH+EGCG 2mg,第六组儿茶素3mg,第

1. 中国医学科学院肿瘤研究所 2. 河南医科大学 3. 日本三井农林株式会社社会食品研究所

七组 EDTA, 后两组作为对照组。第一、二、三、四、五组皮下注射 DMH 20 mg/kg BW, 每周 1 次, 第 7 组皮下注射 1 mmol/L 的 EDTA, 连续 20 周。不同剂量的儿茶素用蒸馏水溶介后灌胃, 每天 1 次, 每周 5 次, 于注射 DMH 前 7 天开始至 23 周结束。

C₅₇BL 小鼠各组注射 DMH 后 24 h, 昆明小鼠 27 周末以颈椎脱臼处死。解剖动物取大肠, 沿大肠纵轴剪开, 以“卷帘”法将整个大肠卷成圆盘状, 入 10% 缓冲福尔马林液固定, 石蜡包埋切片, HE 染色, C₅₇BL 小鼠以 Feulgen 染色观察 20 个完整的大肠隐窝计数, 每个隐窝出现微核及凋谢的上皮细胞数, 统计每组动物每个隐窝的微核和凋谢平均数; 昆明小鼠处死后摘眼球取血测血浆红细胞内超氧化物歧化酶(SOD), 大肠用 PAP 法作免疫组化测 SOD 活性。

DMH 溶液配制, 临用前将 DMH 溶于 1 mmol/L 的 EDTA 溶液中, 用 10% NaOH 将 pH 值调至 6.5。

结 果

一. 绿茶多酚和绿茶水溶性提取物对小鼠大肠隐窝上皮细胞微核与凋谢作用观察, 见表 1 及表 2。

从上表看出, GTP 和 GTW 组各剂量间差异有高度显著性, 组内每只小鼠个体差异无显著性, 故 GTP 和 GTW 的不同剂量, 对 DMH 诱发小鼠大肠隐窝上皮细胞的微核和凋谢有明显的抑制作用。

二. 绿茶儿茶素对小鼠大肠癌抑制作用的观察结果见表 3、4、5、6。

从表 3 看, DMH 处理的小鼠, 诱发大肠腺癌 86 例, 除 7 例为浸润癌外, 79 例为粘膜内癌, 第 5 组 1 例为腺鳞癌, 其它均为高分化腺癌。从表 3、4 看, DMH 组诱癌率及每只鼠平均带瘤数, 每只带瘤鼠平均带瘤数均明显高于第二、三、四、五组 ($P < 0.05$), 而且体积多数较大, 肿瘤局部肠管周径几乎全波及, DMH 组肺转移占 10.34%, 其余组无大肠腺癌转移。表 5 显示, 第七组血浆 SOD 活性正常, 第一组活性明显降低, 两者差异显著; 第一组与其它各组比较差异非常显著; 儿茶素 3 mg 组 SOD 活性明显高于溶剂对照组。免疫组化检测, 正常大肠 35 只 SOD 表达非常明显, 大肠癌组织 31 只, 呈轻度表达或不表达。

表 1 绿茶多酚对 1,2-二甲基胍诱小鼠大肠隐窝上皮细胞核异常 (NA) 的影响

组 别	动物数	GTP 剂量 (mg/只)	NA/隐窝
1. DMH+水	3	0	3.23±0.503 ^a (3.7, 3.3, 2.7)
2. GTP ₁ +DMH	3	1	2.27±0.404 ^b (2.2, 1.9, 2.7)
3. GTP ₂ +DMH	3	2	1.57±0.404 ^c (1.5, 2.0, 1.2)
4. GTP ₃ +DMH	3	3	0.53±0.122 ^d (0.56, 0.64, 0.40)
5. EDTA+水	3	0	0.32±0.047 ^d (0.37, 0.28, 0.30)
6. GTP ₃ +EDTA	3	3	0.51±0.042 ^d (0.48, 0.50, 0.56)

注: a, b, c, d 示各组均数比较有显著性差异 ($P < 0.01$)

表 2 绿茶水溶性提取物对 1,2-DMH 诱发小鼠大肠隐窝上皮细胞核异常的影响

组 别	动物数	GTW 用量 (mg/只)	NA/隐窝
1. DMH+水	3	0	3.23±0.503 ^a (3.7, 3.3, 2.7)
2. GTW ₁ +DMH	3	2	2.7±0.500 ^b (2.2, 2.7, 3.2)
3. GTW ₂ +DMH	3	4	1.87±0.351 ^c (1.9, 1.5, 2.2)
4. GTW ₃ +DMH	3	8	0.77±0.217 ^d (0.85, 0.93, 0.52)
5. EDTA+水	3	0	0.32±0.040 ^d (0.37, 0.28, 0.30)
6. GTW ₃ +EDTA	3	8	0.48±0.040 ^d (0.52, 0.49, 0.44)

注: a, b, c, d 示各组均数比较有显著性差异 ($P < 0.01$)

表 3 DMH 诱发小鼠大肠癌的情况

组别 [△]	动物数 (只)	大肠癌 发生率(%)	浸润性腺癌 发生率(%)	浸润深度			肺内转移 (%)	肛门鳞癌 转移(%)	χ^2	P
				粘膜下层	肌层	浆膜层				
1	36	80.0	13.1	10.3	0	3.5	10.3	13.9		
2	36	36.0	0	0	0	0	0	2.8	14.63	<0.001
3	39	35.9	14.3	14.3	0	0	0	5.1	15.26	<0.001
4	40	40.0	6.25	0	6.25	0	6.25*	7.5	12.90	<0.001
5	39	35.9	0	0	0	0	0	0	15.26	<0.001
6	47	0	0	0	0	0	0	0		
7	50	0	0	0	0	0	0	0		

[△] 1 为 DMH+水, 2 为 DMH+儿茶素 1mg/只·d, 3 为 DMH+儿茶素 2mg/只·d, 4 为 DMH+儿茶素 4mg/只·d, 5 为 DMH+EGCG 2mg/只·d, 6 为儿茶素 3mg/只·d, 7 为 EDTA, 6,7 为对照组, 2,3,4,5 组间比较差异不明显 P>0.05, *鳞状上皮癌转移至肺、肝、肾。

表 4 DMH 诱发小鼠大肠癌带瘤数目变化

组别	每只鼠平均带瘤数			每只带瘤鼠平均带瘤数		
	$\bar{x} \pm s$	t	P	$\bar{x} \pm s$	t	P
1. DMH+水	4.389±4.709			5.448±4.665		
2. DMH+儿茶素 1 mg	0.667±1.312	4.503	<0.05	1.846±1.609	5.409	<0.05
3. DMH+儿茶素 3 mg	1.410±2.993	3.194	<0.05	3.929±3.882	5.281	<0.05
4. DMH+儿茶素 4 mg	1.350±2.475	3.417	<0.05	3.375±2.913	2.929	<0.05
5. DMH+EGCG 2 mg	0.795±1.343	4.334	<0.05	2.214±1.372	4.617	<0.05
6. 儿茶素 3 mg	0			0		
7. EDTA	0			0		

表 5 小鼠血浆红细胞 SOD 活性测定 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	血浆细胞 SOD 活性(U/ng)	t	P
1. DMH+水	21	30.193±14.630		
2. DMH+儿茶素 1 mg	22	48.508±10.651	4.70	<0.001
3. DMH+儿茶素 2 mg	24	50.119±12.595	4.90	<0.001
4. DMH+儿茶素 4 mg	25	60.170±10.667	8.02	<0.001
5. DMH+EGCG 2 mg	0	0		
6. 儿茶素 3 mg	25	60.599±11.287	7.10	<0.001
7. EDTA	17	39.45 ± 7.320	2.27	<0.05

讨 论

绿茶与人肿瘤之间的关系尚未确定,多数学者认为它具有抗癌作用^[2,3],我们实验的结果发现:①绿茶多酚和绿茶水溶性提取物,对 DMH 诱发 C₅₇BL 小鼠大肠隐窝上皮细胞微核与凋谢具有明显拮抗作用。②用 DMH

诱发大肠癌高达 80%,如若同时喂绿茶儿茶素后,诱发大肠癌的例数和瘤结数及体积大量减少和减小,每只平均带瘤数和每只带瘤鼠平均带瘤数亦减少,提示绿茶儿茶素有抗癌作用。此结果与国内外培养及动物试验中所产生明显抑癌抗癌作用是一致的;例如程书钧报道的用 Ames 试验, V₇₉ 细胞姊妹染色单体交换(SCE)和染色体畸变等方法^[1],证实绿茶水溶性提取物

表 6 小鼠大肠 SOD 表达情况

组别	动物 数目	SOD 活性			
		-	+	++	+++
正常	35			4	31
癌肿	31	14	14	3	

- 为不显色, + 为显色细胞低于 10%, ++ 为显色细胞 10%~50%, +++ 为显色细胞大于 50%

及茶叶中抗氧化剂成分,能够明显抑制黄曲霉菌 B₁(AF₁B₁)、苯并芘的鼠伤寒沙门菌回复突变作用;茶叶多酚类抗氧化成分还能抑制 AFB₁ 和苯并芘诱导的 V₇₉细胞基因正向突变及煎鱼提取物等的致突变作用;韩学良等报道绿茶提取物能明显抑制卷烟的致突变作用;罗德元等报道绿茶对 MNNG 诱发小鼠肺癌有抗癌作用等^[5],都证明绿茶可以抑制致癌物诱发的多种肿瘤,包括食道、胃、肝、皮肤等。

绿茶抗癌机制未明,近年发现,绿茶所以有很强的抑癌作用,与它有很强的抗氧化作用有关^[4],不仅能抑制食物中的脂质过氧化,也防止细胞脂质过氧化。我们的实验结果发现,DMH 组血浆红细胞 SOD 活性低于正常,癌组织 SOD 表达明显降低或消失,证明癌细胞抗氧化功能损伤,当给一定剂量绿茶儿茶素并持续一定时间后,SOD 活性明显增高,大肠癌发生率下降,表明绿茶儿茶素的防癌作用与其能增强消除超氧阴离子自由基、阻止反应性自由基的产生即增强消除超氧阴离子自由基的诱癌、促癌作用,终止了脂质过氧化。也有认为儿茶素抗癌作用与调整癌代谢酶活性,捕捉致癌因子、抑制细胞中与增殖有关因子的活性有关。

参 考 文 献

1. 程书钧. 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.
 2. Wang ZY, Huang ZC, Bickers DR, et al. Inhibition of chemical and photocarcinogenesis in marine skin by green tea polyphenols. Proc Am Cancer Res, 1990, 31: 159.
 3. Wang ZY, Hong JY, Huang MT, et al. Inhibition of N-nitro-sodiethylamine and 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone induced tumorigenesis in A/J mice by green tea and black tea. Cancer Res, 1992, 52: 1994.
 4. 韩学良,程书钧,等. 绿茶提取物对卷烟遗传毒性的影响. 遗传与疾病, 1989, 6(2): 81.
 5. 罗德元,王玉琼. 绿茶对 MNNG 诱发小鼠肺癌的防治作用. 中华肿瘤杂志, 1992, 14: 392.
- (本实验血浆 SOD 测定由河南职工医学院生化教研室桂兴芬等老师协助完成,特表谢意。)

收稿:1994-12-16 修回:1995-03-10

THE INHIBITORY EFFECT OF GREEN TEA ON LARGE INTESTINE CANCER INDUCED BY 1,2-DMH

Yin Ping-zhang Cheng Shu-jun Zhao Jin-ying et al

(Department of pathology, Henan People's Hospital, Zhengzhou 450003)

Abstract In this study, we observed the effects of green tea catechin on large intestine cancer induced by 1,2-DMH in mice. Our results indicated that ① the green tea polyphenols and green tea water extract had distinct antagonistic effect on micronucleus and apoptosis in the colon crypt cells of C₅₇ BL mice. The method used in this study might be a simple, rapid economical and useful test in the screening of anticolon carcinogens. ② green tea catechin have preventive effects on large intestine cancers. Their anticancerous mechanism may be related to the antagonistic effect of SOD and other anti-oxidizers in green tea catechin on free radicals in cancer.

Keywords green tea, 1,2-dimethylhydrazine, large intestinal cancer, superoxide dismutase