

论 著

绿茶对黄曲霉毒素B₁致大鼠
肝癌作用的抑制

广西肿瘤研究所病理研究室 严瑞琪 覃国忠 陈志英 李 瑗 覃柳亮

【提 要】应用本室建立的黄曲霉毒素B₁(AFB₁)致肝癌作用短期体内实验模型,研究了三种绿茶(广西灵山茶、云南大叶茶和福建鼎坑茶)对AFB₁致肝癌作用的影响。实验用雄性纯系Wistar大鼠,以AFB₁作为肝癌启动剂(400 μ g/kg体重/次,ip,每周6次,连续2周),然后饲以含0.015%AAF饲料2周,加大部份肝切除,作为选择性促进程序,使被AFB₁启动的肝细胞迅速增生灶。各实验组大鼠从注AFB₁前10天至停注后3天饲以含5%绿茶的饲料,对照组则给以基础饲料。大鼠于停饲AAF饲料3天后处死。肝脏按规定部位取材,作r-谷氨酰转肽酶(r-GT)染色,用测微计测算肝癌前病变r-GT阳性灶,数据输入微型计算机,算出平均每cm²肝面积中r-GT灶的数目、面积,每cm³肝组织的灶数和每个灶的体积。结果,三种绿茶均显示明显抑制AFB₁的致肝癌作用。r-GT灶的数量、面积及体积均明显地少于和小于对照组。这一发现对人类肝癌的化学预防将有重要的实用价值。

黄曲霉毒素(AFT)能引起多种动物的肝癌,它与人类肝癌也有密切关系^[1-2]。防止AFT致癌,最根本的措施是阻止人类暴露于AFT。但在目前条件下,要完全避免AFT的暴露,不是近期内所能达到的,尤其是在经济比较落后,而AFT污染又比较严重的地区。因此,找化学预防方法预防肝癌,己为许多研究者所重视^[3-4]。我们曾初步报导过,绿茶等对黄曲霉毒素B₁(AFB₁)致肝癌作用有显著的抑制效果^[4-6],但不同品系的绿茶是否都具有抑制作用,尚未清楚。为此,我们选用广西灵山绿茶、云南大叶茶和福建鼎坑茶等三种绿茶作进一步研究。结果表明,所用的三种绿茶对AFB₁致大鼠肝癌作用均有显著抑制效果。现报告如下。

材料与方 法

一、材料:

雄性纯系Wistar大鼠,6周龄,体重130 \pm 10g($\bar{x}\pm s$),AFB₁为本所化学霉菌研究室制备的结晶品,经鉴定质量与美国Sigma公司售品相同。2-乙酰氨基芴(2-AAF)为美国Sigma化学

公司产品(含量95~97%,批号:53-96-3)。二甲基亚砷(DMSO)为上海金山化工厂产品(批号:840310)。广西灵山茶,为广西灵山县产品(一级绿茶,本地品种,中小叶型);云南大叶茶,为广西贵县黄练产品(一级绿茶,云南大叶种,1985年从云南引进);福建鼎坑茶,为广西国营桂北农场产品(一级绿茶,福建福丁大白茶种,中小叶型)。基础饲料是本室按恒定处方配制的蛋白质含量为25%的粉状饲料^[6-7],各种实验饲料在基础饲料中分别加入上述三种茶叶粉末,含量为5%。

二、方法

(一)动物分组:将动物按随机法分为4组,即:AFB₁+云南大叶茶(简称云南茶组),AFB₁+广西灵山茶(称广西茶组),AFB₁+福建鼎坑茶(称福建茶组)和AFB₁组(对照组)。每鼠一笼,饲料和自来水(自动供水系统供给)任动物自由饮食。动物室空调温度控制在24 \pm 1 $^{\circ}$ C,相对湿度为40~70%。

(二)实验程序:如图1所示。实验采用本室近年建立的短期动物实验模型^[7]。其程序为:

动物 8 周龄时, 腹腔注以肝癌启动剂 AFB₁ (DMSO 为溶剂, 含量为 500 μg/ml), 400 μg/kg 体重/次, 每周 6 次, 连续 2 周。停注 AFB₁ 后 2 周, 大鼠饲以含 0.015% 2-AAF 饲料 2 周, 并于饲此饲料的第 7 天, 乙醚全麻下切除肝中叶和左外侧叶 (PH)。停饲含 2-AAF 饲料后给基础饲料 2 天, 禁食 1 天, 断颈处死。各实验组大鼠从注 AFB₁ 前 10 天至停注 AFB₁ 后 3 天饲以含 5% 绿茶饲料, 对照组则只饲以基础饲料。

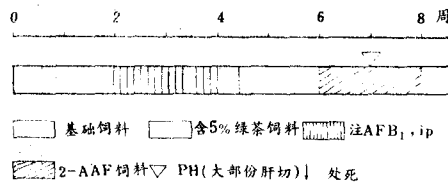


图 1 实验程序

(三) 组织处理: 动物处死之后, 检查各主要器官。从肝右前叶、右后叶规定部位各取 2 块组织, 尾叶取 1 块组织, 4 °C 丙酮: 酒精 (1: 1, V: V) 固定 24 小时, 低温石蜡包埋, 切片作 H. E. 染色和用 Ogawa 等方法做 r-谷氨酰转胺酶 (r-GT) 染色 [8]。

(四) r-GT 灶的观察及统计学处理: 用网形测微器, 在显微镜下测出每只动物 5 张肝切片所有 ≥150 μ 的 r-GT 灶的个数和面积; 用标准计算纸测量肝切片面积。然后将所有数据输入微型计算机内, 求出平均每 cm² 肝切面的 r-GT 灶数 (个/cm²) 灶的面积 (mm²/cm²) 和平均每个灶的面积, 以及平均每 cm² 肝组织中的 r-GT 数 (个/cm²) 和每个灶的体积 (mm³ 个)。立体指标按 Fullman 公式计算 [9]。

结 果

一、一般情况

实验中, 各组注入 AFB₁ 总量均无明显差别, P > 0.05 (见表 1)。整个实验期间, 除 PH 时 4 只大鼠意外死亡外, 无自然死亡现象。图 2 示各组动物的体重变化情况。各实验组动物进食实验饲料 10 天时平均体重稍低于对照组, 但无显著差别 (P > 0.05)。注射 AFB₁ 期间各组体重增长减慢, 但以对照组最为明显, 该组体重不但不增长, 反而减轻, 各实验组与对照组比较, 有非常显著的差异 (P < 0.01)。实验开始至结束时体重的增长, 各实验组稍高于或显著高于对照组, 云南茶组与对照组相比, 有显著差别 (P < 0.05)。处死时各组间的肝重体重比均无明显的差异 (P > 0.05), 详见 (表 1)。

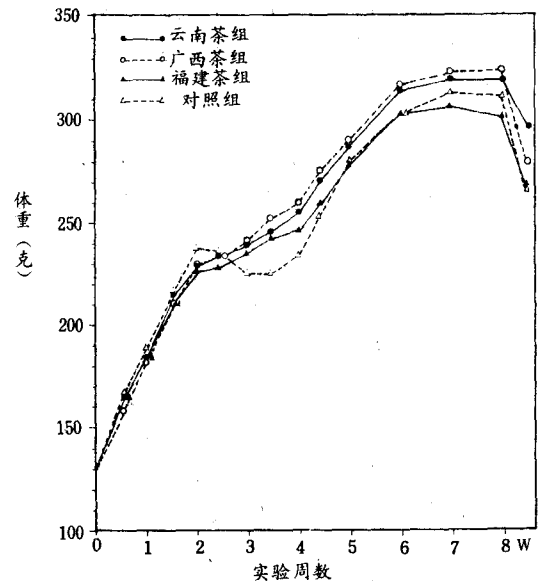


图 2 各组大鼠体重曲线

表 1 各组大鼠注入 AFB₁ 量、体重、肝重体重比的情况 ($\bar{x} \pm SD$)

组 别	大 鼠 数		注 入 AFB ₁ 量 (μg/鼠)	体 重 增 长 (克)		处 死 大 鼠 肝 重 体 重 比 (克/100克)
	开 始	结 束		注 AFB ₁ 期间	开 始 实 验 至 结 束	
云南茶组	13	13	1142 ± 69	25.08 ± 23.95 ^b	168.8 ± 30.1 ^c	2.61 ± 0.19
广西茶组	12 ^a	10	1134 ± 109	28.00 ± 17.03 ^b	152.0 ± 28.2	2.69 ± 0.22
福建茶组	13	13	1124 ± 87	19.62 ± 13.19 ^b	140.0 ± 36.5	2.57 ± 0.45
对 照 组	13 ^a	11	1129 ± 108	-4.64 ± 21.39	135.7 ± 30.9	2.55 ± 0.42

a: 各有 2 只动物意外死亡;

b: p < 0.01;

c: p < 0.05

二、肝脏的病理变化

对照组大部分大鼠的肝脏表面及切面可见较多散在的灰白色病灶,直径多为1~2mm,略隆起;各实验组的病灶均少于和小于对照组。镜下,各组动物可见到散在的肝细胞增生灶,多少不等,但以对照组为多。卵圆细胞增生程度不一,各实验组增生较轻,大多数限于汇管区内,而对照组卵圆细胞增生较严重,呈条索状围绕在肝小叶周围或向肝小叶内增生浸润,少数有分割肝小叶现象。

三、r-GT灶统计结果

r-GT染色切片可见肝组织中散在r-GT阳性灶,呈类圆形,棕红色,与周围淡黄色的阴性背

景形成鲜明对比。部份灶周围肝细胞有明显的被压迫现象。其形态学已报道^[6]。

r-GT灶统计结果如表2所示。从表可以看出:反映灶数量的指标(个/cm²及个/cm³),在云南茶组显著少于对照组, P<0.01;广西茶组和福建茶组平均每cm²肝切面的灶数也明显少于对照组, P<0.05。反映灶大小的指标(mm²/个和mm³/个)以及反映灶总面积的指标(mm²/cm²),云南茶组和广西茶组的三个指标以及福建茶组的mm²/个和mm³/个都显著小于对照组, P<0.01;福建茶组的mm²/个与对照组相比,也有显著差别, P<0.05。

表2 各组大鼠肝r-GT灶统计结果($\bar{x} \pm SD$)

组别	有效统计大鼠数	平面指标			立体指标	
		个/cm ²	mm ² /cm ²	mm ² /个	个/cm ³	10 ⁻⁴ mm ³ /个
云南茶组	13	8.54±4.32 ^a	0.64±0.43 ^a	0.08±0.02 ^a	335.0±160.0 ^a	193.0±114.0 ^a
广西茶组	10	10.27±8.64 ^b	0.63±0.56 ^a	0.06±0.03 ^a	473.7±382.9	138.2±95.5 ^a
福建茶组	13	10.04±8.10 ^b	0.75±0.64 ^a	0.08±0.04 ^b	414.1±296.8	177.0±76.9 ^a
对照组	11	19.65±10.76	2.73±2.02	0.12±0.04	578.0±256.1	423.1±234.0

a: p<0.01;

b: p<0.05

讨 论

有致癌作用的化学物质,在环境中广泛存在,人类要完全避免接触致癌物,看来难以做到。所以研究癌的化学预防,寻找抑制化学致癌的抑制物,越来越受到重视^[3-4]。与化学合成的抑制物相比,天然抑制物,尤其从人类饮食物中发现的抑制物,更具有安全性,也更易为人群所接受。本实验应用AFB₁致肝癌作用的短期体内实验模型研究云南大叶茶、广西灵山茶和福建鼎坑茶等三种绿茶对AFB₁致肝癌作用的影响,发现大鼠在注AFB₁期间,体重增长速度所受到的抑制,明显轻于对照组。肝细胞增生性病变及卵圆细胞增生,也以对照组较多和较严重,而实验组则较轻,提示绿茶有抵抗AFB₁毒性作用。

癌的发生是一个多阶段的发展过程,每一个阶段由一定的细胞群所代表。在肝脏, r-GT阳性细胞灶被认为是肝细胞癌前病变^[10],这些病变的发生和发展与其后发生肝细胞癌有密切的关系^[11-12],因而被广泛用作研究化学致癌物诱发肝癌形成的分析指标^[10-12]。本研究即用它作为抑制AFB₁致肝癌作用的主要观察指标。

在我们的实验模型中, AFB₁是肝癌发动剂,启动肝细胞的癌变过程; 2-AAF+PH是促癌程序,使被AFB₁启动了的肝细胞迅速增生成镜下可计数的癌前r-GT灶,结果显示,进食绿茶的各实验组,不论是r-GT灶的数目、面积,还是每个灶的面积和体积,都显著少于和小于对照组。叶钟祥等也发现茶叶对小白鼠移植性肿瘤有显著抑制作用^[13]。这强烈提示绿茶对肿瘤有非常明显的抑制效果,它将可能成为预防人类癌症的有效食用植物。

关于茶叶能抑癌的机理尚未清楚,但已知茶叶中含有咖啡碱、茶单宁、黄酮类、维生素C、E以及某些矿物质(如锰等)等药用成份^[14]。其中咖啡碱、黄酮类、茶单宁等具有抗氧化作用,维生素C、E有抗癌作用。Tanizawa等发现茶叶中的儿茶素和表儿茶素(L-epicatechin)有显著的抗氧化作用,其抗氧化强度与食品添加剂叔丁基对羟基苯氧醚(BHA)相近^[15]。程书钧等^[16]报道,用色谱方法从绿茶中分离出的第6带成份抗氧化作用很强,并有抑制AFB₁致突变作用。茶叶抑癌可能与此作用有关。

据研究, BHA等抗氧化剂可诱导谷胱甘肽一

S-环氧化物转移酶、环氧化物水化酶、葡萄糖醛酸转化酶及生理性捕捉剂谷胱甘肽^[17~18]，能非特异地与致癌物质及其活化代谢产物结合而使其灭活，或催化其解毒，促进其排泄，是BHA抗氧化剂抑制各种致癌物包括AFB₁致癌作用的基础。Sparnis等曾报导红茶和绿茶有诱导小鼠肝和小肠上皮谷胱甘肽-S-环氧化物转移酶的作用^[19]。由此推测茶叶的抑制作用与其某些成份，如儿茶素、表儿茶素和咖啡碱等，具有诱导以上一些酶，促进AFB₁灭活、解毒及排泄有关。我们曾发现绿茶抑制AFB₁致肝癌作用强于红茶^[4~5]，可能是绿茶中含上述成份较多之故。但茶叶的抑癌机理还有待进一步研究。

茶叶是世界三大无酒精饮料之一，它既便宜，又有保健作用，被誉为人类理想的饮料。茶叶，尤其绿茶，有抑癌作用的发现，在预防人类癌症中将具有重要的实用意义。

参 考 文 献

- [1] Newberne, P.M. Chemical Carcinogenesis: Mycotoxins and Other Chemicals to Which Humans Are Exposed. *Seminars in Liver Disease*. 1984; 4:122
- [2] 叶毓荪. 建国以来广西肝癌防治研究的进展. *广西医学* 1984; 6:226
- [3] Wattenberg, L.W. Chemoprevention of Cancer. *Cancer Res.* 1985; 45:1
- [4] YAN Rui-qi (严瑞琪), et al. Chemoprevention of Aflatoxin B₁ Hepatocarcinogenesis. Abstract: 1986 Shanghai International Symposium on Liver Cancer and Hepatitis. 1986; p19
- [5] 陈志英, 等. 茶叶等六种可食植物对黄曲霉毒素B₁致大鼠肝癌作用的影响. *广西医学院学报* 1985; 4:23
- [6] 严瑞琪, 等. 当归等三种中药及联苯双酯对黄曲霉毒素B₁致大鼠肝癌作用的影响. *癌症* 1986; 5:141
- [7] 陈志英, 等. 建立黄曲霉毒素B₁致肝癌作用体内短期实验模型的进一步研究. *广西医学院学报* 1985; 3:17
- [8] Ogawa, K. et al. Phenotypic Diversity as an property of Putative Preneoplastic Hepatocyte Populations in Liver Carcinogenesis. *Cancer Res.* 1980; 4:725
- [9] Campbell, H.A. et al. Application of Quantitative Stereology to the Evaluation of Enzyme-altered Foci in Rat Liver. *Cancer Res.* 1982; 42:465
- [10] Farber, E. The Sequential Analysis of Liver Cancer Induction. *Biochem. et Biophys. Acta.* 1980; 605:149
- [11] Solt, D. B. et al. Rapid Emergency of Carcinogen-induced Hyperplastic Lesions in a New Model for the Sequential Analysis of Liver Carcinogenesis. *Am. J. Pathol.* 1977; 88:595
- [12] Meaura, Y. et al. Dose-dependent Reduction of N-2-fluorenylacetamide induced Liver Cancer and Enhancement of Bladder Cancer in Rats by Butylated Hydroxyanisole. *Cancer Res.* 1984; 44:1604
- [13] 叶钟祥, 等. 茶叶对小白鼠移植性肿瘤的影响. *肿瘤* 1984; 3:128
- [14] 毛先旦, 等. 饮茶与健康. *甘肃人民出版社* 1983; p18, 123
- [15] Tanizawa, H. et al. Natural Antioxidants. I. Antioxidative Component of Tea Leaf. *Chem. & Pharma. Bull.* 1984; 32:2011
- [16] Chen Shu-jun (程书钧), et al. A Preliminary Study on Antimutagens In International Workshop of Carcinogenesis and Mutagenesis 1986, Guangzhou, China 1986; p241
- [17] Benson, A.M. et al. Elevation of Extrahepatic Glutathione-S-Transferase and Epoxide Hydratase Activities by 2(3)-Tert-Butyl-4-Hydroxyanisole. *Cancer Res.* 1979; 39:2071
- [18] Batizinger, P. R. et al. Antimutagenic Effects of 2(3)-Tert-Butyl-4-Hydroxyanisole and of Antimicrobial Agents. *Cancer Res.* 1978; 38:4478
- [19] Sparnis, V. L. et al. Glutathione S-Transferase Activity: Enhancement by Compound Inhibiting Chemical Carcinogenesis and by Dietary Constituents. *J. Natl. Cancer Inst.* 1982; 68:493

INHIBITION OF GREEN TEA ON AFLATOXIN B₁ (AFB₁)-INDUCED HEPATOGENESIS IN RATS

YAN Rui-qi QIN Guo-zhong CHEN Zhi-ying LEE Yuan QIN Liu-liang

(Department of Pathology, Guangxi Cancer Institute, Nanning)

[ABSTRACT] Three kinds of green tea, Guangxi Lingshan green tea, Yunnan Large Leaf green tea and Fuzian Dingkeng green tea, were tested for their effects on AFB₁-induced r-glutamyltranspeptidase (r-GT) positive hepatocellular foci (r-GT foci) in rats by using the short term in vivo experiment. AFB₁ was administrated (ip) to inbred male Wistar rats for 14 days (400 μ g/Kg body weight/day) as an initiator. After an interval of two weeks, 0.015% 2-AAF-diet was given to the rats for 14 days and partial hepatectomy (PH) was performed at the middle of the AAF-diet feeding, which served as a selective promotion for the rapid growth of the AFB₁-initiated liver cells to generate the precancerous r-GT foci. Green tea was mixed with the basic diet and fed to the rats of the experimental groups from the 10th day before the exposure of AFB₁ to the 3rd day after withdrawing the carcinogen. The control group was given with basic diet. At the 3rd day after the cessation of the AAF-diet feeding all the rats were sacrificed and examined. The liver tissues were processed to r-GT staining. The number and size of the r-GT foci were counted and measured with micrometer and calculated by computer. The results revealed that all these three kinds of green tea showed the remarkable inhibitory effect on the induction of r-GT foci. In comparison with the control group, the No./cm² and No./cm³ of r-GT foci in Yunnan tea group as well as the No./cm² of r-GT foci in Guangxi tea group and Fujian tea group significantly lesser than those of the controls ($p < 0.01$, $p < 0.05$); the mm²/focus, mm³/focus and mm²/cm² of the r-GT foci in Yunnan and Guangxi tea groups as well as the mm²/focus in Fujian tea group were much smaller than the controls ($p < 0.01$, $p < 0.05$). That the green tea possesses the remarkable inhibitory effect on the AFB₁-carcinogenesis is practically valuable in the field study of chemoprevention of cancer in men.

(上接第150页)

讨论: 根据上述用人体白细胞干扰素治疗晚期转移性肺癌观察, 治疗后症状有所消退, 观察近一年肿瘤无明显增大, 且对周围组织的浸润减轻。

目前认为人体白细胞干扰素抗肿瘤作用是直接抗肿瘤作用, 抑制在快速分裂中的细胞。实验证明, 干扰素有调节培养中癌细胞增殖和分化的作用, 将Daudi (伯基特淋巴瘤) 细胞暴露于人体 β -干扰素后24小时

内, 其原癌基因的信息核糖核酸浓度下降。此外, 干扰素可调节靶细胞中的原癌基因的表达, 并通过免疫途径起作用。有人认为人体白细胞干扰素最大的副作用是对造血功能有抑制。但我们在应用的过程中, 多次检查血常规, 并未发现红、白细胞数目减少。

通过对本例观察表明, 干扰素可以改善肺癌病人的自觉症状, 抑制咯血, 并延长存活时间, 有明显近期疗效。目前病人仍在随访之中。