

## 绿茶提取物对1,2-二甲基胍诱发小鼠大肠 隐窝上皮细胞微核与凋谢的拮抗作用

赵进英<sup>1</sup> 祝庆蕃 程书钧<sup>2</sup> 凌雁 付淑莉

(河南医科大学 病理解剖教研室, 郑州 450052)

**提要** 绿茶多酚和绿茶水溶性提取物对1,2-二甲基胍(1,2-DMH)诱发近交系C<sub>57</sub>BL小鼠大肠隐窝上皮细胞微核与凋谢的影响研究结果显示:提取物的不同剂量对1,2-DMH诱发小鼠大肠隐窝上皮细胞微核和凋谢有明显的拮抗作用,并存在剂量-效应关系。因而测定二甲基胍诱发小鼠大肠隐窝上皮细胞微核和凋谢,可作为抗结肠致癌物的快速筛选方法。

**关键词:** 微核 凋谢 绿茶提取物 抗结肠致癌物

茶叶中含有很多对人体有益的物质,具有兴奋、强心、利尿、杀菌消炎等多种药理作用<sup>[1]</sup>。近年的研究还表明,茶叶具有防治肿瘤的作用。

现已从绿茶中提取出多酚类化合物,它含有很强的抗氧化成分,主要为没食子酰表儿茶素[(-)-Epicatechin gallate, ECG],没食子酰表没食子儿茶素[(-)-Epigallo-catechin gallate, EGCG],表儿茶素[(-)-Epicatechin, EC]和表没食子儿茶素[(-)-Epigallocatechin, EGC]<sup>[2,3]</sup>。本实验用绿茶多酚和绿茶水溶性提取物不同剂量配成的水溶液灌喂小鼠,观察其对结肠致癌剂1,2-二甲基胍(1,2-DMH)诱发小鼠大肠隐窝上皮细胞微核及凋谢的影响。

### 1 材料与 方法

**1.1 材料** 绿茶多酚和绿茶水溶性提取物参照程书钧等<sup>[4]</sup>方法,从绿茶中提取。

**1.1.1 绿茶多酚:**绿茶65g用甲醇连续提取两次,去掉提取物中的甲醇,在活化的硅胶柱内,用不同比的正己烷,乙醚和甲醇洗脱,经有250nm紫外光检测器的液体色谱仪收集不同的成分。通过测定油脂的过氧化值的方法,检测不同成分的抗氧化性。其中以Fraction 6(F 6)的抗氧化性最强, F6的产量约为9.2g。

**1.1.2 绿茶水溶性提取物:**将绿茶20g加500ml沸水(100℃)浸泡30分钟后过滤,收集浸出液,经减压蒸干后,可得干提取物4~5g。

### 1.2 分组及实验<sup>[5]</sup>

近交系C<sub>57</sub>BL小鼠36只(本校实验动物中心繁殖),体重18g左右,雌雄兼用,分别置于塑料鼠盒饲养,每盒3只,饲喂标准

1. 女,1966年出生,硕士研究生,本课题经费由河南省卫生厅资助

2. 中国医学科学院肿瘤研究所,北京

干块饲料,自由饮用自来水,动物饲养室温度20℃左右,湿度50%,室内明暗各12小时。动物适应一周后,随机分为12组,每组3只,绿茶多酚和绿茶水溶性提取物各6组。

结肠致癌剂为1,2-二甲基肼(DMH),美国Sigma公司产品。临用前将1,2-DMH溶于1mM的EDTA溶剂中,用10%NaOH将pH值调至6.5<sup>[5,6]</sup>。

绿茶多酚组:第1组在注射1,2-DMH前,不给绿茶多酚灌胃,自由饮水,第2,3,4组先行绿茶多酚灌胃(灌胃前一晚禁食),其用量分别为1mg/只,2mg/只,4mg/只,每天1次,连续5天。第5天时第1,2,3,4各实验组动物分别腹腔注射1,2-DMH(20mg/kgBW),第5,6组为溶剂EDTA对照组,腹腔注射等量EDTA(0.5ml/只)。注射前分别用蒸馏水和绿茶多酚(4mg/只)灌胃,每天1次,连续5天。

绿茶水溶性提取物组:绿茶水溶性提取物剂量分别为2mg/只,4mg/只,8mg/只,其余处理同绿茶多酚组。

各组小鼠在注射1,2-DMH后24小时,颈椎脱臼处死<sup>[6,7-8]</sup>,解剖动物,取出大肠,沿肠纵轴剪开,将大肠浆膜面贴附于滤纸上铺平,以10%缓冲福尔马林固定,并以“卷帘法”将整个大肠卷成圆盘状,石蜡包埋,作间断连续切片,切片厚度为5μm,Feulgen染色。油镜(×1000)下自肛门端向近端观察纵切完整的大肠隐窝,每只小鼠观察20个完整隐窝,计数每个大肠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<sup>[5-7]</sup>。

微核是游离于肠上皮细胞胞浆中圆形或椭圆形小体,与主核不相连,其大小不超过主核的1/3,染色性与主核一致。凋谢(apoptosis)指细胞核和胞浆浓缩,随后核

碎裂成碎片,细胞表面突出发芽,后与胞体分离,形成大小不一的凋谢小体。微核与凋谢这两种变化都出现核碎片,Heddle等<sup>[8]</sup>将两者合称为核异常(nuclear anomalies, NA)

## 2 结果与讨论

各实验组所致小鼠大肠隐窝上皮细胞核异常(表1,2)

Table 1 Effect of green tea polyphenol (GTP) on nuclear anomalies (NA) in the colon crypt epithelial cells of mice

Group	NA/crypt
1. 1,2-DMH + water	3.23 ± 0.503 <sup>a</sup> (3.7, 3.3, 2.7)
2. GTP <sub>1</sub> + 1,2-DMH	2.27 ± 0.404 <sup>b</sup> (2.2, 1.9, 2.7)
3. GTP <sub>2</sub> + 1,2-DMH	1.57 ± 0.404 <sup>c</sup> (1.5, 2.0, 1.2)
4. GTP <sub>3</sub> + 1,2-DMH	0.53 ± 0.122 <sup>d</sup> (0.56, 0.64, 0.40)
5. EDTA + water	0.32 ± 0.047 <sup>d</sup> (0.37, 0.28, 0.30)
6. GTP <sub>3</sub> + EDTA	0.51 ± 0.042 <sup>d</sup> (0.48, 0.50, 0.56)

Note: GTP<sub>1</sub> 1mg/mouse, GTP<sub>2</sub> 2mg/mouse, GTP<sub>3</sub> 4mg/mouse; Means with different superscript letters are significantly different at P < 0.01

方差分析结果:绿茶多酚组和绿茶水溶性提取物组各剂量间P < 0.01,即各组间差异有高度显著性,单位组间P > 0.05,即组内每只小鼠个体差异无显著性。故绿茶多酚和绿茶水溶性提取物的不同剂量对1,2-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,并存在明显的剂量-效应关系。随着绿茶多酚、绿茶水溶性提取物剂量的增加,小鼠大肠隐窝上皮细胞核

**Table 2** Effect of green tea water extract (GTW) on nuclear anomalies (NA) in the colon crypt epithelial cells of mice

Group	NA-crypt
1. 1,2-DMH+water	3.23 ± 0.503 <sup>a</sup> (3.7, 3.3, 2.7)
2. GTW <sub>1</sub> +1,2-DMH	2.7 ± 0.500 <sup>b</sup> (2.2, 2.7, 3.2)
3. GTW <sub>2</sub> +1,2-DMH	1.87 ± 0.351 <sup>c</sup> (1.9, 1.5, 2.2)
4. GTW <sub>3</sub> +1,2-DMH	0.77 ± 0.217 <sup>d</sup> (0.85, 0.93, 0.52)
5. EDTA+water	0.32 ± 0.040 <sup>d</sup> (0.37, 0.28, 0.30)
6. GTW <sub>3</sub> +EDTA	0.48 ± 0.040 <sup>d</sup> (0.52, 0.49, 0.44)

Note: GTW<sub>1</sub> 2mg/mouse, GTW<sub>2</sub> 4mg/mouse, GTW<sub>3</sub> 8mg/mouse, means with different superscript letters are significantly different at  $p < 0.01$

异常率明显降低。

程书钧等<sup>[4]</sup>报道:用Ames试验,V79细胞姐妹染色单体交换(SCE)和染色体畸变等方法,证明绿茶水溶性提取物及茶叶中抗氧化剂成分能明显抑制黄曲霉毒素B<sub>1</sub>(AFB<sub>1</sub>),苯并(a)芘(B(a)P)的鼠伤寒沙门氏菌回复突变作用。茶叶中的多酚类抗氧化成分还能抑制AFB<sub>1</sub>和B(a)p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<sup>[10]</sup>。韩学良等<sup>[11]</sup>也报道绿茶提取物能明显抑制卷烟的致突变作用。

关于绿茶提取物拮抗大肠隐窝上皮细胞微核与凋谢的机制,目前还不清楚。近年来一些研究表明,许多致癌物和致突变物通过产生氧自由基,从而导致细胞DNA损伤,这和肿瘤的发生密切相关。许多抗氧化剂具有对抗氧自由基的作用,阻止脂质过氧化。因此,饮食中的抗氧化成分对预防肿瘤的发生具有重要意义<sup>[12,13]</sup>。我们的研究结果表

明,绿茶中天然抗氧化剂成分能明显抑制DMH引起的小鼠大肠隐窝上皮微核与凋谢的发生,提示很有可能抑制1,2-二甲基胍的致癌作用。最近,阎玉森、罗德元、覃国忠等<sup>[14~16]</sup>分别报道绿茶对实验性胃肠道肿瘤、肺癌和肝癌有明显的抑制作用。这和我们体内短期实验的结果是一致的。

#### 参 考 文 献

- 1 叶桔泉.食物中药与便方 第2版,南京:江苏人民出版社,1977:77
- 2 Ruch RJ et al. Prevention of cytotoxicity and inhibition of intercellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea. *Carcinogenesis* 1989, 10 (6):1003
- 3 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, 11(4):259
- 4 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
- 5 祝庆蕃等.结肠致癌物快速筛选—小鼠结肠隐窝上皮细胞微核及凋谢测定.中华肿瘤杂志 1991, 13(3):171
- 6 王永军等.酸牛乳抑制1,2-二甲基胍诱发小鼠大肠癌的实验研究.营养学报 1991, 13(2):120
- 7 孙含笑等.芦笋对二甲基胍诱发小鼠结肠隐窝上皮细胞微核及凋谢的拮抗作用.河南医科大学学报 1991, 26(1):17
- 8 Heddle JA et al. Micronuclei and Related Nuclear Anomalies as a Short-term Assay for Colon Carcinogens. In: Bridges BA, Butterworth BC and Weinstein IB(eds). Indicators of Genotoxic Exposure. Banbury Report 13. Cold Spring Harbor NK Cold Spring Harbor Laboratory. 1982:367
- 9 黄幸纾等.环境化学物致突变、致畸、致癌试验方法.浙江科学技术出版社, 1985: 223-224
- 10 刘晓立等.MeIQ及煎鱼提取物的致突变作用及抑制物的初步研究.中国医学科学院学报 1989, 11(2):97
- 11 韩学良等.绿茶提取物对卷烟遗传毒性的

- 影响.遗传与疾病 1989, 6(2):81
- 12 Pryor WA. Cancer and Free Radicals, In: Shankl, DM et al (eds). Antimutagenesis and Anticarcinogenesis Mechanisms New York; Plenum Press, 1986:491
- 13 Ames BN. Dietary carcinogens and anticarcinogens, oxygen radicals and degenerative disease. *Science* 1983, 221:1256
- 14 阎玉森 等.绿茶提取物防癌作用的动物和人体实验.第四次全国肿瘤学术会议文摘, 1990:17
- 15 罗德元 等.绿茶对MNNG诱发LACA小鼠肺癌及癌前的抑制作用.第四次全国肿瘤学术会议文摘, 1990:29
- 16 覃国忠 等.绿茶抑制AFB<sub>1</sub>致大鼠肝癌作用的综合实验研究报告.第四次全国肿瘤学术会议文摘 1990:30

## THE ANTAGONISTIC EFFECTS OF GREEN TEA EXTRACT ON MICRONUCLEI AND APOPTOSIS INDUCED BY 1,2-DIMETHYLHYDRAZINE (1,2-DMH) IN THE COLON CRYPT CELLS OF MICE

Zhao Jinying, Zhu Qingfan, Cheng Shujun,\* Ling Yan, Fu Shuli

(Department of Pathology, Henan Medical University, Zhengzhou 450052)

Thirty-six inbred C<sub>57</sub> BL mice were randomly divided into 12 groups (3 mice each). Group 1 to 6 assigned to GTP (green tea polyphenols) groups and other 6 groups to GTW (green tea water extract) groups. In GTP groups, mice of group 1 drank tap water in the whole period of experiment, group 2,3,4 were given GTP solution (1 mg/mouse, 2mg/mouse, 4mg/mouse, respectively) once a day for five days. Mice of group 5 and 6 were given distilled water and GTP solution (4mg/mouse) respectively once a day for five days. On the fifth day, 20mg 1,2-DMH/kg body weight was intraperitoneally administered to the mice of group 1,2,3 and 4, whereas group 5 and 6 received 1 mmol EDTA solution (0.5ml/mouse) as controls.

In GTW groups, treatment was similar to that of GTP groups except the different doses of GTW (2mg/mouse, 4mg/mouse, 8mg/mouse, respectively).

The mice were killed at 24 hours after intraperitoneal injection of 1,2-DMH. The results indicated that the frequencies of micronuclei and apoptosis in the colon crypt cells of mice were negatively correlated with the doses of GTP or GTW. Green tea extract had distinct antagonistic effects on micronuclei and apoptosis in the mouse colon crypt cells. The assay of micronuclei and apoptosis in the colon crypt cells of mice may be a simple, rapid, economical and useful test as a screening method for anticolon carcinogens.

Key words: green tea extract micronuclei apoptosis anticolon-carcinogen

\*Cancer Institute, Chinese Academy of Medical Science, Beijing

收稿日期: 1991-12-12

会 讯

## 中华医学会广东分会营养专业学会 第二届年会暨学术交流会在广州市召开

中华医学会广东分会营养专业学会第二届年会暨学术交流会在1992年5月22~23日在广州市召开,参加会议的代表来自广东各有关院校,各市、县的医院,妇幼保健院、卫生防疫站,工厂部门等单位,共128人,广东省科委、省卫生厅、中华医学会广东分会等单位领导到会指导。开幕式上,中国营养学会常务理事、中华医学会广东分会营养学会主任委员何志谦教授致开幕词,他代表委员会汇报了学会三年多来的工作,明确了本次会议的宗旨,内容和要求,省科委谭永正部长、省卫生厅麦嘉明副处长、中华医学会广东分会林相彬副秘书长先后在会上讲了话。

本次会议收到论文84篇,大会交流共46篇,内容有基础营养、临床营养、公共营养,妇幼营养和特殊营养等,本次会议收集的论文从数量和质量上,比第一届年会有较明显的提高和充实。

在中华医学会广东分会的主持下,经与第一届常委会商讨研究选出了第二届委员会,委员的年龄有较大下降,选举何志谦教授为第二届主任委员,何志谦、邱仞之、曾育生、杨燕华、王身笏、刘卫亚、李佑清、李振波、张亚非、林仲才、徐耀远为常务委员,原中国营养学会理事、广东营养专业学会副主任委员,张纫华教授为荣誉主任委员。

最后由主任委员何志谦教授对本次会议作了总结,代表本届委员会提出了今后工作的设想,并表示委员们将更加团结,互相协作,与全体会员一起把学会的工作做得更好,为营养事业作出贡献。

(王身笏)