

绿茶提取物抑制 TPA 促癌作用及其机制的研究

程书钧 何其儆* 黄茂端* 王志远* 刘晓立

高燕宁 白瑾峰 郭素萍 李秀琴

(肿瘤研究所, 北京)

摘要 从绿茶中提取的多酚类化合物, 具有很强的抗氧化作用。这种绿茶提取物 (GTE) 在 BALB/3T3 细胞转化实验中, 可以明显抑制 TPA 的促癌作用。体内实验表明, GTE 可以抑制 TPA 诱导小鼠耳皮肤水肿, 并抑制 TPA 诱导小鼠皮肤鸟氨酸脱羧酶活性增高。次黄嘌呤和黄嘌呤氧化酶反应产生的含氧自由基可以引起 IAR20 肝细胞 SCE 增高, 而 GTE 可明显抑制这种自由基对细胞 SCE 的诱导作用。本文讨论了 GTE 抑制促癌作用的有关机制。实验结果表明, GTE 可能对于某些肿瘤的预防具有应用价值。

关键词 绿茶提取物 促癌作用 TPA 氧自由基

环境因素, 尤以饮食及生活方式对人类肿瘤的发生有重要影响。人们不仅从食物中摄入致突变物和致癌物, 而且还摄入抗致突变物和抗致癌物。流行病学研究表明, 经常食用新鲜蔬菜和水果的人群, 某些肿瘤的发生率明显降低^[1]。近年来, 寻找天然抗致癌物和抗致突变物的研究已经引起人们很大兴趣。我们曾利用本实验室改良的 Ames 法筛选了多种新鲜蔬菜、水果、饮料等, 在所测 108 个样品中, 有 67 个分别对黄曲霉素 B₁ (AFB₁), 苯并(a)芘 (BaP) 以及 4-硝基喹啉-N-氧化物诱导的回复突变有不同程度的抑制作用, 其中以绿茶提取物的抑制作用最强^[2]。进一步研究表明, 绿茶中分离的抗氧化剂可以抑制 AFB₁ 诱导 V79 细胞基因正向突变, 及 AFB₁ 或 BaP 诱导 V79 细胞姊妹染色单体交换 (SCE) 和染色体畸变^[3]。

材料与 方法

一、GTE 成分分析 按照文献 3 方法提取 GTE。每 65 g 绿茶经提取后可得到 9.2 g 提取物。用非极性高效液相色谱进行分离鉴定。溶剂系统 A 与 B 分别是由 0.12% 醋酸铵 (pH 5.4) 和甲醇所组成。并以 Waters 1440 型吸收检测仪在 280 nm 波长处进行紫外吸收检测。参照 Ryoyasu Saijo (日本 Vegetable and Ornamental Corp. 研究站) 及 Matsuzaki (日本 Mitsui Nurin Co. 食品研究室) 提供的标准样品进行检测。

二、GTE 抗氧化性测定 按照美国油脂化学协会公布的方法^[4], 将猪油于 60°C 避光储存 1~4 周, 实验组分别加入绿茶提取物或丁化羟基苯甲醚 (BHA), 测定不同时间内对照组及实验组猪油的过氧化值, 以过氧化值的降低率代表抗氧化性的强弱。

本文于 1988 年 8 月 31 日收到; *美国新泽西州 Rutgers 大学

三、GTE 抑制 TPA 促细胞转化试验 实验用含 10% 胎牛血清的 Eagle 最低必需培养基 (MEM)。参照文献 5 方法, 将 BALB/3T3 细胞 (东京大学黑木教授赠送) 1×10^4 (转化试验) 和 3×10^3 (集落形成率) 分别种于 10 和 3 个培养瓶中, 在 37°C , 5% CO_2 温箱中培养 24 h, 再按表 2 的实验程序分别加入 GTE, 3-甲基胆蒽 (MCA, Fluka) 和 12-0-四癸酰基-佛波-13-乙酸酯 (TPA, P.Borchert, USA), 每周换液两次。培养瓶分别于 8 d (集落形成率) 和 30 d (转化试验) 进行染色。计算每瓶中出现的 III 型转化灶, 即细胞明显堆积, 深染, 边缘排列紊乱并伸向周围。

四、GTE 抑制 TPA 诱导小鼠耳皮肤炎性水肿反应 参照 Gschwendt 的方法^[6], 实验用 BALB/C 雌性小鼠, 体重 20~25g。左右两侧耳作自身对照, 即左耳涂以丙酮 (4 μl), 右耳涂 TPA 0.4 μg (溶于 4 μl 丙酮); 或左耳涂以磷酸盐缓冲液 (PBS) 4 μl 加 0.4 μg TPA, 右耳涂 GTE (溶于 PBS) 加 0.4 μg TPA。6h 后, 用打耳器取下 0.5cm 直径耳块, 称重。每剂量用 3 只小鼠, 实验重复 2~3 次。

五、GTE 抑制 TPA 诱导鸟氨酸脱羧酶 (Ornithine decarboxylase ODC) 活性 实验用 7 周龄 CD-1 雌性小鼠, 背部去毛 2d 后, 皮肤涂 TPA 5 nmol 或 GTE 加 TPA, 5h 后处死动物, 按照 Smart 等方法^[7], 分离背部皮肤的表皮层, 制成匀浆, 与 [^{14}C] 鸟氨酸 (3.8 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$; 20 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$, Amersham Corp., Arlington Heights IL) 在 30°C 保温, 用液体闪烁计数器测定从鸟氨酸中释放的 $^{14}\text{CO}_2$ 。表中鸟氨酸脱羧酶活性按 $^{14}\text{CO}_2$ nmol/mg 表皮蛋白/h 表示, 每剂量用 3 只小鼠, 每只小鼠表皮测三个样品, 求出两次实验平均值。

六、GTE 抑制自由基诱导肝细胞 SCE 参照 Emerit 的方法^[8], 用次黄嘌呤 (Hypoxanthine, HX, Sigma) 和黄嘌呤氧化酶 (Xanthine oxidase, XO, Sigma) 反应过程中产生的超氧阴离子, 诱导细胞 SCE 增高。实验用 IAR20 肝细胞系 (东京大学黑木教授赠送), 培养于含 10% 胎牛血清的 MEM 中。实验组提前 10min 先加入 GTE 或超氧化物歧化酶 (Superoxide dismutase, SOD, Sigma), 然后加入 HX 7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 和 XO 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 整个反应在 Hank's 液中进行, 10min 后, 以 PBS 洗两遍, 换以含 5-溴脱氧尿苷 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 完全培养基, 按文献 3 方法制片、染色, 实验重复一次。

结 果

一、高效液相色谱分析结果显示绿茶提取物中主要含有 4 种多酚类化合物: 没食子酰表儿茶素 ((-)-Epicatechin gallate, ECG), 没食子酰表没食子儿茶素 ((-)-Epigallocatechin gallate, EGCG), 表儿茶素 ((-)-Epicatechin, EC) 和表没食子儿茶素 ((-)-Epigallocatechin, EGC) (图 1, 2)。从表 1 结果可看出, 绿茶提取物具有明显的抗氧化作用, 比人工合成的抗氧化剂 BHA 更强。

二、表 2 实验结果表明, TPA 可以明显促进经 MCA 作用的 BALB/3T3 细胞发生转化, GTE 无论是作用于 MCA 和 TPA 全过程或只作用于 TPA 阶段, 均可以明显抑制 MCA/TPA

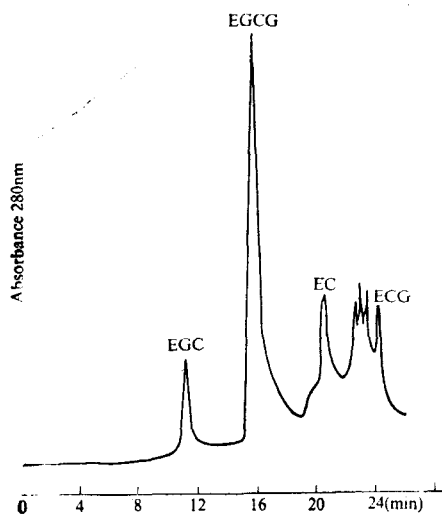
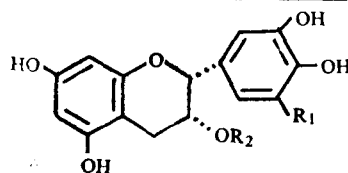


图 1 GTE 高效液相色谱分离图

Fig 1 HPLC Map of GTE



(-)-Epicatechin (EC)

R₁=HR₂=H

(-)-Epicatechin gallate (ECG)

R₁=HR₂=-OC-

(-)-Epigallocatechin (EGC)

R₁=OHR₂=H

(-)-Epigallocatechin gallate (EGCG)

R₁=OHR₂=-OC-

图 2 绿茶提取物的主要成分

Fig 2 Components of green tea extract

表 1 GTE及BHA的抗氧化性研究

Table 1 Antioxidant activities of GTE and BHA

Additive (0.02%)	Peroxide value (meq/kg) lard stored for weeks at 60°C				
	0	1	2	3	4
No additive	0.2	4.2	58.2	82.5	191.0
GTE	0.2	1.4	2.6	4.4	5.8
BHA	0.2	1.9	3.7	6.1	8.9

表 2 GTE抑制MCA/TPA诱导BALB/3T3细胞转化

Table 2 Inhibitory effect of GTE on transformation induced by MCA/TPA in BALB/3T3 cells

	GTE MCA Treatment *for 3 days (μg/ml)		GTE+TPA Treatment **in each medium change(μg/ml)		Plating efficiency (%)	No. of foci /plate	Transformation frequency /10 ⁶ survivors	Inhibition (%)
	0	0	0	0				
Exp. I	0	0	0	0	41.4	0	0	
	0	0	0	0.1	40.4	0	0	
	0	0.5	0	0	24.8	0.2	8.1	
	0	0.5	0	0.1	23.6	1.0	42.3***	
	2.5	0.5	2.5	0.1	31.3	0.3	9.6***	77.3
	0	0.5	2.5	0.1	29.4	0.5	17.0***	59.8
Exp. II	0	0	0	0	52.5	0	0	
	0	0.5	0	0.1	28.5	1.8	63.2***	
	5.0	0.5	5.0	0.1	53.2	0.3	5.6***	91.1
	0	0.5	5.0	0.1	46.5	0.4	8.6***	86.4

*GTE was added 6h before MCA; **After MCA treatment for 3 days; ***P<0.01

诱导的细胞转化。GTE 剂量增大，其抑制作用加强。

三、TPA (0.4μg) 可使小鼠耳皮肤产生红肿炎症反应，耳重量增高，为正常对照的两倍左右。涂GTE (0.5~2mg) 后，TPA 诱导的炎症反应受到明显抑制，(表 3)。

四、从表 4 结果可以看出, 涂抹 TPA 5 nmol 可使小鼠表皮 ODC 活性明显增高, GTE (0.72~3.6mg) 和 TPA 同时使用, 明显抑制 TPA 诱导 ODC 活性。

五、表 5 结果指出, 加入 HX 和 XO 可明显诱导 IAR20 肝细胞 SCE。若先加入 GTE 或 SOD, 则可以显著抑制 HX 和 XO 诱导的 SCE, 在 20 μ g/ml 时, GTE 的抑制作用比 SOD 更强。

表 3 GTE 抑制 TPA 诱导小鼠耳水肿试验

Table 3 Inhibitory effect of GTE on TPA-induced edema in mouse ear

GTE (mg)	TPA (μ g)	Mean weight of ear plug \pm SE (mg)
0	0	6.36 \pm 0.22
0	0.4	13.24 \pm 0.56*
2.0	0.4	7.02 \pm 0.37*
1.0	0.4	9.00 \pm 0.86*
0.5	0.4	10.40 \pm 0.70*

*P<0.05

表 4 GTE 对 TPA 诱导小鼠表皮鸟氨酸脱羧酶的影响

Table 4 Effect of GTE on TPA-induced epidermal ornithine decarboxylase activity in mouse

Treatment	ODC activity 14 CO ₂ released \pm SE (nmol/mg/h)	Inhibition (%)
acetone	0.007 \pm 0.002	—
5nmol TPA	5.810 \pm 0.599*	—
5nmol TPA + 0.72mg GTE	0.870 \pm 0.250*	85
5nmol TPA + 3.6mg GTE	0.629 \pm 0.230*	89

*P<0.05

表 5 GTE 和 SOD 对次黄嘌呤和黄嘌呤氧化酶诱导 IAR20 细胞 SCE 的抑制作用

Table 5 Inhibitory effect of GTE and SOD on SCE induced by hypoxanthine and xanthine oxidase in IAR 20 cells

Inhibitor (μ g/ml)	Hypoxanthine (7 μ g/ml)	Xanthine oxidase (15 μ g/ml)	SCE \pm SE
GTE	0	0	11.3 \pm 0.8
	0	+	10.4 \pm 0.6
	0	0	12.0 \pm 0.9
	0	+	25.1 \pm 1.5*
	2.5	+	17.4 \pm 0.9*
	5.0	+	16.7 \pm 1.1*
	10.0	+	15.3 \pm 1.1*
	20.0	+	12.6 \pm 0.5*
SOD	10.0	+	16.8 \pm 1.1*
	20.0	+	16.0 \pm 0.8*

*P<0.001

讨 论

曾发现绿茶提取物有抑制多种致癌物诱导的突变及染色体损伤的作用^[3]。本研究进一步表明,绿茶提取物有强的抑制促癌物 TPA 促进细胞转化的作用,即使在 MCA 作用 3d 后,再与 TPA 同时加入绿茶提取物,其细胞转化抑制率可达 59~86%。绿茶提取物抗 TPA 的促癌作用在体内也已观察到,局部涂抹或在饮水中加入绿茶提取物,可使二甲基苯蒽加 TPA 诱导的小鼠皮肤乳头状瘤的数目明显下降,肿瘤发生的时间推迟^[9]。

促癌作用在细胞癌变中的重要性已经引起人们的广泛重视。研究表明,TPA 促进细胞转化的机制是十分复杂的。TPA 可以诱导局部组织炎症,增生和 ODC 活性增高^[10],抑制细胞间的通讯作用^[11],刺激炎性白细胞产生含氧自由基,这些自由基和细胞癌变有密切关系^[12]。研究表明,GTE 抑制 TPA 的促癌作用至少和下列几方面有关:①抑制 TPA 诱导的炎症反应;②抑制 TPA 诱导 ODC 活性增高;③可以清除 TPA 诱导人白细胞产生的含氧自由基,其作用比维生素 C 或 E 更强^[9]。本研究进一步指出,GTE 可以抑制自由基对细胞染色体的损伤作用;④我们最近在表皮角化细胞研究中发现,GTE 可以明显清除 TPA 对细胞间通讯的抑制作用^[13]。其它有关拮抗 TPA 的作用机制正在进一步研究之中。

化学分析表明,GTE 主要含有四种多酚类化合物,这些化合物富有 OH 基团,具有强的抗氧化性。体内实验发现,喂 GTE 后,小鼠肝 SOD 活性增高^[9]。这种化学结构和性质可以解释为什么 GTE 有很强的捕获含氧自由基的作用。我们最近的实验还发现,GTE 明显抑制 X 射线诱导 BALB/3T3 细胞的转化,可以显著降低 X 射线对该细胞的致死作用(待发表资料)。近年来研究表明,自由基和人类肿瘤、心脏病,以及衰老的发生有密切关系^[14]。GTE 具有很强的清除自由基的性质,对研究饮茶和人类健康及长寿的关系提供了重要理论基础。以上一系列研究提示,从健康、长寿和预防肿瘤的观点出发,至少对于某些人群,包括吸烟者,接触放射线人员、高脂肪饮食及接触某些化学致癌物的人,经常饮用绿茶可能是有益的。

参 考 文 献

1. Higginson J. Etiology of gastrointestinal cancer in man. Natl Cancer Inst Monogr 1967; 25:191
2. 罗唤造,等. 蔬菜水果抑制突变作用的初步研究. 中华肿瘤杂志 1987; 9:328
3. 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; 9:328
4. American Oil Chemists'Society. Official and tentative methods of the American Oil Chemists'Society. Vol II, 3rd Edition, Champaign American Oil Chemists'Society. 1973:IL
5. Cheng SJ, et al. Mutagenic, transforming and promoting effect of pickled vegetables from Linxian County, China. Carcinogenesis 1980; 1:685
6. Gschwendt M, et al. The mouse ear edema, a quantitatively evaluable assay for tumor promoting compounds and for inhibitors of tumor promotion. Cancer Letter 1984; 25:177
7. Smart RC, et al. Sn-1, 2-diacylglycerols mimic the effects of 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate in vivo by inducing biochemical changes associated with tumor promotion in mouse epidermis. Carcinogenesis 1986; 7:1865

8. Emerit I, et al. Activated oxygen species at the origin of chromosome breakage and sister-chromatid exchanges. *Mutation Res* 1982; 103:165
9. 程书钧, 等. 绿茶抗氧化成分抑制突变和肿瘤发生的研究. 中国近代医学 (印刷中)
10. Kozumbo WJ, et al. Antioxidant as antitumor promoters. In Shankel DM, et al. eds. *Antimutagenesis and Anticarcinogenesis Mechanisms* Plenum Press. 1986:491
11. Yotti LP, et al. Elimination of metabolic cooperation in Chinese hamster cells by a tumor promoter. *Science* 1979; 206:1089
12. Pryor WA. Cancer and free radicals. In; Shankel DM et al. eds. *Antimutagenesis and Anticarcinogenesis Mechanisms*. Plenum Press. 1986:45
13. Ruch RJ, et al. Prevention of oxygen radical mediated cell killing and inhibition of intercellular communication by green tea extract. *Carcinogenesis* 1989;10:1003
14. Ames BN. Dietary carcinogens and anticarcinogens, oxygen radicals and degenerative disease. *Science* 1983; 221:1256

Inhibitory Effect of Green Tea Extract on promotion and Related Action of TPA

Cheng Shujun, et al

(Institute of Oncology, Beijing)

Polyphenol components isolated from green tea showed strong antioxidant activity. The green tea extract (GTE) significantly inhibited the promoting effect of TPA in BALB/3T3 cell transformation assays. In in vivo experiments, GTE inhibited edema induced by TPA in mouse ear. The inhibitory effect of GTE on the induction of ornithine decarboxylase activity was also found in mouse skin treated with TPA. GTE decreased the frequency of SCE induced by oxygen radical in IAR 20 liver cells treated with hypoxanthine and xanthine oxydase. Mechanisms of the antipromoting effect of GTE are discussed. Our experimental results suggest that GTE may have some practical use in cancer prevention.

Key words green tea extract promotion TPA oxygen radical