

绿茶提取物联合辐射对人直肠低分化腺癌细胞系(HR-8348)的杀伤效应

张鸿未* 戴惠芳* 钱丽娟* 陈旭峰*

摘要 应用人直肠低分化腺癌细胞系(HR-8348),测定不同浓度的绿茶提取物对细胞的增殖抑制作用,结果抑制率呈剂量依赖性关系, ID₅₀ 为 88.48 μ g/ml。各组细胞核内 Ag-NOR_s, 不论其数目和形态均显示出明显的动态变化, Ag-NOR_s 从致密的聚合型大颗粒,直至出现核仁内型颗粒及弥散型颗粒, Ag-NOR_s 含量 C、T、R、T+R 组分别为 14.06 \pm 6.42, 10.63 \pm 4.71, 9.96 \pm 4.68, 8.14 \pm 5.13, 经统计学处理均 $P < 0.001$, 有极显著差异。细胞毒检测试验结果, 实验后第 3 天细胞生长抑制最明显, T、R、T+R 组抑制率分别为 33.31%、45.32%、62.59%。经统计学处理 T 组 $P < 0.05$, R、T+R 组均 $P < 0.001$ 。

关键词 绿茶提取物 人直肠低分化腺癌细胞系(HR-8348) 绿茶联合辐射

绿茶多酚化合物具有捕捉活性自由基或灭活亲电性终致癌物,抑制亚硝酸的合成,酶的调控及保护细胞的过氧化损伤作用,故绿茶具有防癌抗癌的功效^[1-3]。但最近的研究指出,茶叶具有抗氧化和促氧化的双重特性^[4],为此我们利用人直肠低分化腺癌细胞系(HR-8348)进行了绿茶联合辐射对该细胞的杀伤效应研究。

材料和方法

细胞: 人直肠低分化腺癌细胞系(HR-8348), RPMI-1640 培养液含 20% 小牛血清, 37 $^{\circ}$ C 单层贴壁培养。

药物: 绿茶提取物, 由浙江省茶叶研究所提供。

照射条件: ⁶⁰Co, FSD = 60cm, 射野 15cm \times 15cm 剂量率 129.85 cGy/min。

实验分组: 取对数生长期细胞, 2×10^5 /ml 细胞共 3ml 等量接种在 30ml 培养瓶中, 同时, 以 6×10^4 /瓶细胞接种在有

盖片的青霉素小瓶中, 37 $^{\circ}$ C 温箱培养 48 小时后随机分组: 对照组(C): 不加药也不照射。单纯辐射组(R): 一次 600cGy 照射。单纯药物组(T): 绿茶提取物作用 2 小时后置以新鲜培养液培养。药物加辐射组(T+R): 绿茶提取物作用 2 小时后, 换新鲜培养液, 接着一次 600cGy 照射。

方法: 药物对细胞的增殖抑制: 取对数生长期的(HR-8348)细胞, 稀释成 2×10^5 /ml 细胞, 取 50ul/孔细胞悬液, 加入到 96 孔培养板的小孔内, 将绿茶提取物用 0.9% 生理盐水稀释, 取 50ul 加入到含细胞悬液的小孔内, 使最终浓度分别为 5、10、25、50、100 μ g/ml, 置于含 5% CO₂ 的恒温箱中, 37 $^{\circ}$ C 培养 72 小时后, 每孔加入 50ul MTT 液, 继续培养 4~6 小时后, 每孔中加入酸化异丙醇 50ul 中止反应, 震荡 10 分钟, 酶标仪(DG3022 型) 570nm, 测量 O.D. 值, 并求其抑制率(%)。

* 浙江省肿瘤医院 杭州市 310022

$$\text{抑制率(\%)} = \frac{\text{对照组 } X_{OD} - \text{用药组 } X_{OD}}{\text{对照组 } X_{OD}}$$

细胞核分裂指数: 细胞经药物及辐射不同程序处理后, 每组各取一片盖片固定于 95% 酒精中, 连续 7 天。经 H.E. 染色后, 在光镜下计数 2000 个细胞, 计算核分裂指数。

细胞核内核仁组成区嗜银蛋白 (Ag-NOR) 的定量分析: 实验后的第 1、3、5、7 天每组各取二片盖片用“(50% 无水乙醇+50% 丙酮)”固定, 银胶染色以 1% 甲酸配成含 2% 的明胶溶液为 A 液, 以 50% 的硝酸银为 B 液, A、B 两液以 1: 2 混合成工作液, 避光, 在 22℃ 条件下染色 40 分钟。油镜下每组随机观察 200 个细胞, 计每个细胞核内 NOR 数, 计算平均数, 并进行统计学处理。

细胞毒试验: 将药物及辐射处理后的各组细胞, 制成单细胞悬液, 并稀释成 $2 \times 10^5 / \text{ml}$ 细胞, 取 50ul / 孔细胞悬液加入到 40 孔培养板的小孔内, 各组设四个复孔, 共设四块培养板, 用 MTT 法(方法见上)在实验后的第 1、3、5、7 天各取一块培养板, 测各组的 O.D. 值, 并求其抑制率。

结果

药物对细胞的增殖抑制: 绿茶提取物在一定浓度下(10~100μg/ml) 能抑制肠癌细胞(HR-8348)的生长, 且呈剂量依赖性关系, 小剂量(5μg/ml) 时无抑制作用(见表 1)

细胞核分裂指数: 从图 1 可见, 实验后四天内各实验组细胞有丝分裂均受阻, 至第 5 天除 T+R 组外, 其余各组的核分裂指数均高于对照组, 且单纯药物组较明显。经统计学处理, 各组无明显差异 ($P > 0.05$)。

表 1 绿茶提取物对(HR-8348)细胞增殖的抑制作用

绿茶(ug/ml)	$X_{OD} \pm SD$	抑制率(%)
5	0.47 ± 0.012	0
10	0.435 ± 0.007	7.4
25	0.373 ± 0.006	20.6
50	0.315 ± 0.007	33.0
100	0.217 ± 0.021	53.9
$IC_{50}^*(\text{ug/ml})$	88.48	

* IC_{50} 以加权直线回归法计算

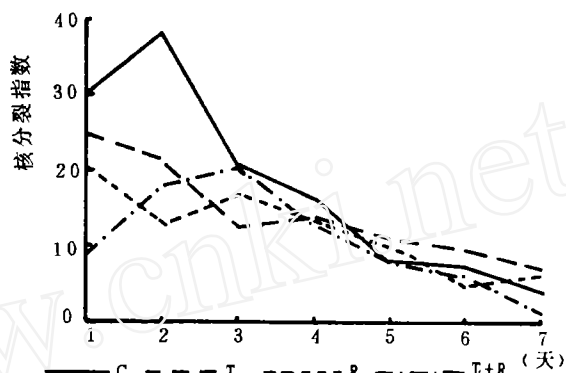


图 1 绿茶提取物和辐射对(HR-8348)细胞核分裂指数的影响

细胞核内 Ag-NOR 定量分析: Ag-NOR 在镜下显示核内黑色颗粒, 胞核呈淡黄色, 对比鲜明。Ag-NOR 呈三种形态: ①聚合型颗粒直径较大, 常聚合成团, 且多为不规则状, 单个颗粒界限不清。②弥散型, 颗粒直径较小常散布于核内, 为圆型。③核仁内型, Ag-NOR 在核仁内分散分布, 大小与核内颗粒类似。

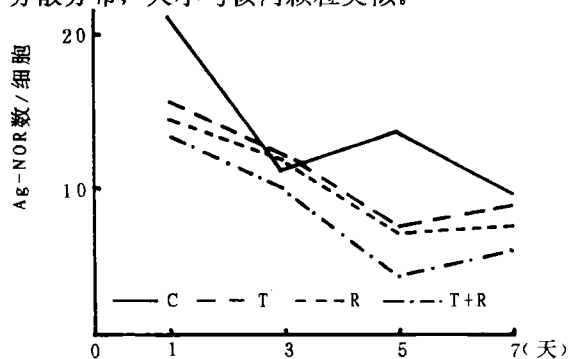


图 2 绿茶提取物和辐射对(HR-8348)细胞核内 Ag-NOR 含量的影响

从图 2 可见各实验组的平均 Ag-NOR 均低于对照组,特别是 T+R 组更明显。经统计学外理,均有极显著差异 ($P < 0.001$)。实验后第一天各组细胞核均见有致密的聚合型团块组成贺形或不规则形的核仁,对照组 Ag-NOR 含量明显高于其它各组, T+R 及 R 组细胞核分别见不同程度的肿胀和空泡。第 3 天各组细胞核内均见较小的聚合型团块及少量的弥散型颗粒,除 T+R 组核内出现少量空泡外,其余各组细胞形态良好, T 组核内聚合型颗粒较致密,且 Ag-NOR 含量比对照组高。至第 5 天各组细胞核内大多为核仁内型颗粒及少量的弥散型颗粒,除 C 组外 Ag-NOR 含量明显减少, T+R 组细胞生长稀疏,胞质破损,核肿胀,出现空胞等。

细胞毒试验: (见图 3)。

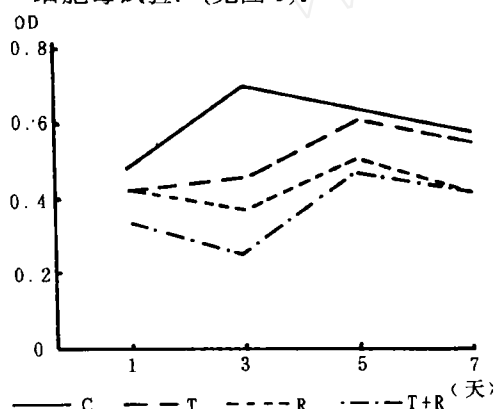


图 3 绿茶提取物和辐射对(HR-8348)细胞生长的抑制作用

用 MTT 法检测绿茶提取物或辐射及绿茶联合辐射对 HR-8348 细胞的生长抑制作用,发现实验后第 3 天细胞生长抑制最明显, T, R 及 T+R 组抑制率分别为 33.81%、45.32% 和 62.59%, 至第 5 天 T 组细胞抑制率仅为 3.9%, 说明此细胞尚有恢复生长的能力。各实验组比较,绿茶联合辐射作用下细胞生长明显受抑,经统计

学处理, T 组 $P < 0.05$, R 及 T+R 组均 $P < 0.001$ 。

讨论

茶叶是一种高多酚类化合物含量的植物,其主要成分为儿茶素。目前研究发现,绿茶不仅具有防癌作用,而且有抗癌效应。茶碱能抑制环-磷酸腺苷磷酸二酯酶,从而使环磷酸腺苷水平提高,抑制细胞分裂^[5];绿茶中的没食子酸表儿茶素有抑制肿瘤生长的作用^[6]。我们的实验结果也证实绿茶提取物能明显抑制肠癌细胞(HR-8348)的增殖,且呈剂量依赖性关系,其相对增殖存活率下降 50% 的剂量 (LD_{50}) 为 $83.48 \mu\text{g}/\text{ml}$ 。

绿茶中的表儿茶素衍生物是很强的酚性抗氧化剂,能捕捉氧化自由基(O_2^{\cdot})和氢氧自由基(OH^{\cdot}),但最近的研究指出^[4],茶叶多酚化合物具有抗氧化和促氧化的双重特性,即在一定浓度下,特别是有微量的过渡金属离子存在时,茶叶可以产生过氧化氢,表现出促氧化性质。但在高浓度下,又表现出明显的链阻断类型的抗氧化性质。我们的实验结果也发现,绿茶提取物 ($100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 作用 2 小时) 与辐射对肿瘤细胞(HR-8348)有协同杀伤作用,表现出促氧化性质。

Ag-NOR 是与核仁组成区相关的嗜银蛋白的简称。核仁组成区(NOR)包含着核糖体基因(rRNA),并通过其转录而合成 rRNA 和蛋白质,可用来反映核仁的结构和功能的变化。从我们的实验结果发现,各组细胞的 Ag-NOR 不论其数目和形态均显示出明显的动态变化,实验后第 1 天大多为致密的聚合型颗粒,随着培养时间的延长,大多出现核仁内型颗粒及弥散型颗粒。Ag-NOR 含量也发生明显变化,随着培养时间的延长含量下降,特别是绿茶联合辐射组, Ag-NOR 含量明显低于其他各

组,初步推论绿茶和辐射很可能是通过影响细胞核的核仁组成区(NOR)的功能,致Ag-NOR合成减少,细胞增殖抑制,从而起抑制癌作用,Ag-NOR似可作为抗肿瘤药物筛选及药敏试验的客观指标之一。

参考资料

1 阎玉森等. 绿茶提取物对体外培养的人体胃癌细胞的作用. 中华预防医学杂志 1990, 24(2): 80-82.

2 宁志军等. 云南抗癌保健茶的实验研究. 中华肿瘤杂志

1990.12(2): 137.

3 高国栋等. 绿茶防癌的初步研究(动物试验和流式细胞分析). 肿瘤, 1990, 10(1): 42-43.

4 韩锐. 肿瘤化学预防及药物治疗. 第一版. 北京: 北京医科大学. 中国协和医科大学联合出版社, 1991.93

5 叶钟祥等. 茶叶对小白鼠移植性肿瘤的影响. 1984, 4(3): 128.

6 Fujik H, et al: Green tea cuts cancerous growths. New Scientist 1987, 116(1586): 32.

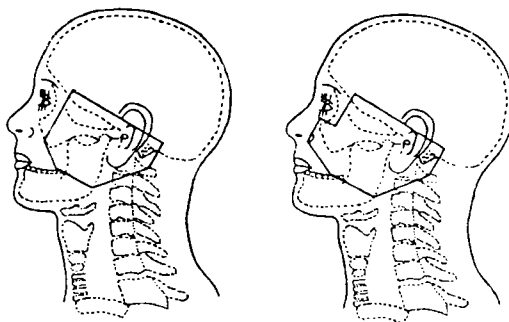
(收稿: 1993-04-13, 修回: 1993-06-21)

鼻咽癌照射野的探讨

崔书祥* 王迎选* 赵路军* 孙洪森* 吴佃久* 陈国雄**

我院 1990 年 1 月~1991 年 6 月收治鼻咽癌 22 例, 经 CT 或 MRI 检查咽旁间隙受侵率为 77.18%。将患者 CT 或 MRT 图像输入放疗计划系统进行照射野分析, 结果表明以往的常规耳前野仅对少数 I 期患者适用, 对于大部分患者照射野并未完全包括靶区。鼻咽癌只要没有颅底骨质破坏, 无颅神经受损, 一般情况下, 放射治疗对鼻咽部控制均较好, 而失控、复发绝大多数发生在咽旁间隙。以往的常规耳前野后界一般设在外耳孔处, 但以此作为耳前野后界的标志不够合理, 对大部分鼻咽癌来讲照射范围不够。为解决上述问题, 我们改变过去常规耳前布野观念, 如附图所示, 将野的后界向后移至耳根部或乳突后缘, 当照射至 DT40Gy 缩野时, 在模拟机下定位, 将野的后界压在颈椎椎体的前 1/3 处。采用扩大

的双侧耳前野, 可在放疗全过程中自始至终完全包括整个靶区(鼻咽、咽旁间隙、颅底)。



附图 改进后的耳前野(后界扩大)

后鼻孔受侵前界相应扩大

(收稿: 1992-12-25 修回: 1993-04-29)

* 中国人民解放军总医院 北京市 100853

included and an elective irradiation to the whole brain with a dose of 30 Gy in 2 weeks should also be considered for patients with adenocarcinoma.

POSTOPERATIVE RADIOTHERAPY FOR SYNOVIOSARCOMA: ANALYSIS OF 81 PATIENTS

Xue Chao-gui, et al

Cancer Hospital, Sun Yat-sen Medical University, Guangzhou

The influence factors of prognosis on synoviosarcoma treated by various methods was analyzed. The 3- and 5-year survival rates were 52% and 42% in post-operative radiotherapy plus surgery group, and 42% and 25.8% in surgery alone group ($p > 0.05$). Local recurrence rates were 12.8% and 68.8% in the above two groups ($p < 0.01$). The patient's age was closely related to prognosis with the 3- and 5-year survival rates of 58.7% and 41.2% in the group of aged 30-65, and 34.4% and 28.6% in aged 10-29 group. 45.8% patients died of distant metastasis. Delay of treatment, improper aspiration or excision biopsy and repeated surgery for recurrence are prone to distant metastasis. 9 of 31 patients with lung metastasis died within one year despite different chemotherapy regimens.

IN VITRO SYNERGISTIC KILLING EFFECT OF EXTRACTION OF GREEN TEA COMBINED WITH IRRADIATION ON HUMAN RECTUM POORLY DIFFERENTIATED ADENOCARCINOMA CELL LINE (HR-8348)

Zhang Hong-wei, et al

Zhejiang Cancer Hospital (Institute), Hangzhou

The aim of this study was to evaluate if different concentrations of extraction of green tea could inhibit the growth of human rectum poorly differentiated adenocarcinoma cell line (HR-8348). The results showed that there was a line dependence of inhibition ratio on the dose. ID₅₀ was 88.48ug/ml. The result of the argyrophilic staining of nuclear organize regions showed dynamic changes not only the number but also the morphology. It was observed that the morphology of AgNORS varied from the granule of dense polymeric type through the granule of ennuclolar type to the granule of diffuse type under the microscope. The mean numbers of AgNORS in C, T, R and T+R groups were 14.06 ± 6.42 , 10.63 ± 4.71 , 9.96 ± 4.68

and 8.14 ± 5.13 , respectively. The differences were statistically significant ($p < 0.001$). The inhibiting effect of the cell growth was most obvious on the 3rd day after experiment by cellular toxicity assay. The inhibiting ratio of T, R and T+R groups were 33.81%, 45.32% and 62.59%, respectively. Compared with the control group, the P value in the T group was < 0.05 , in R and T+R groups were < 0.001

THE LATE DAMAGE IN PIG SKIN TO FRACTIONATED DOSES OF 35 MEV P— BE FAST NEUTRON IRRADIATION

Wang Jun-Jie, et al

The First Hospital, Beijing Medical University, Beijing

The late damage in pig skin to fractionated doses of 35 Mev fast neutron was studied. Neutron fractionation scheme comprised of 12 fractions in 42 days. The latent period of late damage of 19.8, 22.2, 24.6 and 27.0 nGy groups were 17.00 ± 1.53 , 13.67 ± 1.45 , 14.00 ± 2.31 and 17.00 ± 2.00 weeks, respectively ($p > 0.05$). The ED50 value for late damage was 21.0 nGy. The mean latency of late pig skin damage was not related to the total dose. However, the incidence of late damage was related to the total dose. The late damage in pig skin was characterized by a dusky/mauve erythema which could progress to dermal necrosis. The mean latency for the development of necrosis was longer and it was harder to heal than the pig skin early reaction.