

绿茶茶多酚防癌作用的分子机制及其药代动力学的研究进展

李志铭, 刘宗潮, 管忠震

关键词: 绿茶茶多酚; 药理作用

中图分类号: R730.53 文献标识码: A

文章编号: 1000-467X(1999)-S0-0140-02

茶叶气味芬芳, 是世界上仅次于水的第二大饮料。按加工工艺的不同可分为绿茶、红茶和乌龙茶。占干重30%的绿茶茶多酚(以下简称茶多酚)主要为黄烷醇, 通常称儿茶素。其中以表没食子儿茶素没食子酸酯[(-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG)]含量最高, 占儿茶素的80%左右。一杯200ml绿茶(中国杭州)约含142mg EGCG, 65mg ECG, 28mg EGC, 17mg EC和76mg咖啡因^[1]。饮茶是否有益于健康? 这是一个重要而复杂的问题。茶叶与肿瘤发生的流行病学研究已有大量正相关、负相关和无相关的文献报告^[1-2]。结论如此纷纭, 可能与各地区地质条件、居民生活习惯(如饮茶量、种类、温度、还有吸烟和饮酒习惯等), 甚至茶叶本身的定义不尽相同有关。七十年代以来, 许多国家对茶叶的防癌作用进行了广泛的研究, 越来越多的实验室研究证实茶叶确能抑制肿瘤。本文将就其研究新进展——分子机制和药代动力学方面作一综述。

1 茶叶的生物学活性和药理学作用

黄烷醇类易被氧化为相应的O-醌类, 二者可作为氢受体和氢供体。在黄烷醇的结构中, 5位和7位二羟基团和1位氧能使6位和8位碳原子产生强烈的亲核性, C-O或C-C骨架的形成可使黄烷醇发生氧化聚合。茶多酚对金属离子、生物碱和生物大分子, 如脂类、碳水化合物、蛋白质和核酸有高度的亲和力。这是茶多酚多种作用的结构基础^[1]。

茶多酚有高于Vit C、E的强烈抗氧化、清除自由基的作用, 主要通过以下四个机制^[1,2]: 因茶多酚具有“Catechol”结构, 从而是很强的金属离子螯合

剂, 能结合并降低在Fenton和Haber-Weiss反应中产生反应氧自由基所必须游离铁和铁离子; 茶多酚是超氧阴离子自由基和羟自由基很强的捕获剂, 这两种自由基引起DNA和其它细胞内分子的损伤及脂质过氧化反应; 反应氧自由基能损伤DNA, 改变基因表达, 在肿瘤发生中起重要作用。黄烷醇类能与过氧自由基发生反应, 从而终止脂质过氧化链反应; 增强谷胱甘肽过氧化物酶、过氧化氢酶、酯还原酶、谷胱甘肽-S-转移酶的活性。

茶多酚能诱导肿瘤细胞凋亡。谢冰芬等^[3]用流式细胞术发现茶多酚可使鼻咽癌CNE₂细胞停滞于G₁期, 并诱导其凋亡。另有学者发现EGCG诱导人肺癌细胞PC-9停滞于G₂-M期^[4], 诱导Molt 4B人淋巴细胞性白血病细胞的凋亡^[5]。茶叶中的咖啡因对不同的肿瘤细胞凋亡有双向性的作用。茶碱也能诱导细胞凋亡。

肿瘤的形成是多因素、多阶段、多基因突变的过程。已知有许多化学致癌物及物理因素能诱发和促进肿瘤的形成。人们发现绿茶及其组分茶多酚对多种肿瘤形成的各个阶段都有预防和抑制作用。在大量动物模型中, 茶多酚不仅可抑制各种致癌物的致癌发生率, 还可降低已形成肿瘤的大小、数目及其侵袭和转移^[6]。

另外, 茶多酚还有阻止亚硝基化反应、抗突变、放射防护、抑菌、提高免疫力、抗老化、降压、降脂、抗血栓和体外杀精等作用。本室刘宗潮^[7,8]等证实绿茶提取物对DNA拓扑异构酶、DNA引物酶-多聚酶复合体有抑制作用, 与其抗肿瘤作用有密切关系。

2 茶多酚防癌作用的分子机制

茶多酚防癌作用的机制尚未完全清楚。目前的研究进展有: 增强抗氧化酶(谷胱

甘肽过氧化物酶、过氧化氢酶和酯还原酶)和相酶(如谷胱甘肽-S-转移酶)的活性; 抑制放射线或TPA诱导的上皮鸟氨酸脱羧酶(ODC)和环氧化酶; 抑制蛋白激酶C和细胞增殖; 抗炎活性和加强细胞间和缝隙连接等^[2]; 抑制上皮生长因子(EGF)与其受体的相互作用^[9]; 抑制肿瘤细胞的核苷转运, 阻断外源性核苷对于抗代谢药的抵消作用, 增强阿糖胞苷、氨甲喋呤对肿瘤细胞的杀伤作用^[10]。另外, 最近还有报道EGCG还能强烈抑制端粒酶的活性, 引起肿瘤细胞端粒的缩短、染色体的改变和对与细胞寿命相关的-半乳糖苷酶的表达的抑制^[11]。

2.1 茶多酚抑制一氧化氮合成酶(NOS)的诱导

亚硝酸盐能引起亚硝基化, 是腌制食品中的致癌物。哺乳动物也能产生内源性的亚硝酸盐^[12]。NO在体内由L-精氨酸在NADPH和氧原子参与下经NOS催化合成。分子克隆及序列分析示NOS至少存在3种异构体: 和异构体由Ca²⁺-钙调素激活, 产生生理条件下的低水平的NO。它有广泛的生物学效应。异构体即iNOS(诱导性NO合成酶), 一旦产生就能长期激活, 持续产生高浓度的NO。后者在体外使脱氧核苷酸和碱基发生脱氨基, 在体内是致突变的。胞内高浓度的NO导致基因毒性的机制是: NO与氧原子反应形成NO₂, 再聚合为N₂O₄, 并在水中自发歧化为硝酸盐与亚硝酸盐。硝酸盐在体内也能还原为亚硝酸盐。亚硝酸盐与食物中氨基酸或酰胺反应生成致癌物N-亚硝酸盐复合物, 直接对DNA碱基亚硝基化而脱氨基, DNA链的断裂和过氧化亚硝酸盐和/或羟自由基的形成而氧化DNA^[13]。

已克隆出鼠iNOS基因5'端的一部分。它的启动子含有TATA盒及转录因子(NF- κ B和干扰素调节因子)的结合位点。NF- κ B是从免疫球蛋白的轻链基因增强子的位点(5'-GGGACTTTC-3')处发现特异性结合的转录因子。现已知许多与免疫和炎症相关的基因调控区均含此顺式作用元件。NF- κ B属于Rel族, 一般指P50/P55杂二聚体。NF- κ B在胞浆中存在, 并被I κ B(inhibitor of NF- κ B)结合抑制。I κ B有I κ B和I κ B等6种异型体。当I κ B上的Ser³²、Ser³⁶磷酸化后就从NF- κ B上脱离下来, 并经泛素途径分解。释放出的NF- κ B与HMG1(High mobility group)

收稿日期: 1998-11-23 修回日期: 1998-12-28

作者单位: 中山医科大学肿瘤研究所(广州, 510060)

清楚。目前的研究进展有: 增强抗氧化酶(谷胱

形成三元复合物,结合于位点激活转录。同时 I κ B 基因也被激活,从而反馈抑制 NF- κ B,保持转录平衡^[14]。Kleinert 等^[15]发现至少存在 3 种不同的信号传导通路激活转录因子 NF- κ B,从而激活 iNOS mRNA 的表达:酪氨酸激酶受体通路(由 IFN- γ 、TNF- α 、LPS 诱导)、蛋白激酶 A 通路(由 8-OHdG 诱导)和蛋白激酶 C 通路(由 TPA 诱导)。ROIs(reactive oxygen intermediate)也参与 NF- κ B 的活化。同时 NF- κ B 的激活机制有细胞特异性。

EGCG 是目前第一个同时抑制 iNOS 基因的表达和酶活性的复合物^[12]。EGCG 以浓度依赖关系特异地抑制 iNOS mRNA 的表达。EGCG 对激活 NF- κ B 的信号传导通路的主要作用机制为:(1)抑制 LPS 等与其受体的相互作用(sealing effect);(2)清除 ROIs;(3)抑制蛋白激酶^[14]。而且,EGCG 还可阻断信号诱导 I κ B 的磷酸化;阻断 N-亚硝酸盐复合物、过氧化亚硝酸盐或羟自由基的形成。另外,NOS 的结构在氨基端相似于细胞色素 P₄₅₀ 氧化酶,在羧基端相似于细胞色素 P₄₅₀ 还原酶。已知绿茶多酚能与不同的肝细胞色素 P₄₅₀s 结合并抑制依赖 P₄₅₀ 的各功能,所以它能抑制 NOS 的酶活性^[12,13]。

2.2 茶多酚对肿瘤启动剂诱导的 AP-1 (Activator Protein 1) 和细胞转化的抑制

近来,人们发现丝/苏氨酸家族的丝原激活蛋白激酶(MAPKs)是蛋白激酶级联反应的中间体,是细胞内重要的激酶系统。MAPK 包括胞外信号调节蛋白激酶(extracellular signal regulated protein kinases,ERKs)和 c-Jun N-末端激酶(c-Jun N-terminal kinases,JNKs)。ERKs 主要由生长因子激活,部分也被细胞应激信号激活。JNKs 即应激激活蛋白激酶(SAPK)^[16]。AP-1 亦称 Fos/Jun 杂二聚体。正常情况下,核内无 FOS,仅有少量 JUN。fos 和 jun 均属即早基因。在 GFs(生长因子)刺激后 15 分钟即呈现 FOS mRNA 增高,30 分钟达高峰,迅速合成 FOS。JUN 是由 331 个氨基酸组成,可由 PKC 催化其 Ser⁶³、Ser⁷³ 磷酸化而激活。活化的 JUN 和新合成的 FOS 聚合为杂二聚体(即 AP-1)。FOS 和 JUN 均含有“LZ”(亮氨酸拉链)的保守序列,可结合于 TRE(5'-TCACTCA-3'),促进许多基因的转录^[17]。

转录因子 AP-1 调节着 MAPKs。c-Jun 的 Ser^{63/73} 突变引起的 c-Jun 对生长

因子、佛波酯和紫外线诱导的信号通路的非应答。EGCG 或茶黄素对 ErK₁ 或 ErK₂ 无抑制作用,而是在 Ser⁷³ 位点抑制 c-Jun 蛋白的磷酸化。EGCG 还抑制 JNK 的活性。因此,茶多酚抑制了肿瘤促进剂诱导的 AP-1 活性的升高^[18]。有学者^[18]用儿茶素 3 种同系物对 TPA 诱导鼠成纤维细胞的转化有抑制作用。并发现在儿茶素类中,有顺式结构、在 R1 位附加有羟基、R2 位附加有没食子酸的衍生物(如 EGCG)有更强的抑制效应。咖啡因对细胞转化的抑制很弱。因此 EGCG、茶黄素,而不是咖啡因,抑制了 TPA-或 EGF 诱导的细胞转化。

2.3 封闭作用(sealing effect)

EGCG 抑制肿瘤促进剂 TPA 激活 PKC 是通过以下三方面:抑制 TPA 与受体的作用;EGCG 与磷脂双分子层相互作用;EGCG 阻碍 5-三磷酸腺苷和 TPA 结合到 PKC 的能力。绿茶提取物、EGCG 抑制肿瘤促进剂 teleocidin 对 PKC 的激活。EGCG 抑制依赖雌激素的乳腺癌 MCF-7 细胞中雌激素与其受体的作用。Komori 等^[19]把绿茶提取物、EGCG 阻止肿瘤促进剂、激素、生长因子与受体的相互作用,称为 sealing effect。

3 茶多酚的药代动力学

1997 年,Chen L. S. 等^[20]首次报道了 EGCG、EGC 和 EC 在啮齿动物中的吸收、分布、代谢、排泄过程。尽管 EGCG、EGC、EC 化学结构相似,但药代动力学却不尽相同。它们在血浆、组织中的水平采用 HPLC 测定。静脉注射 DGT(去咖啡因的绿茶) 25mg/kg 后,EGCG、EGC 和 EC 的血浆浓度符合二室模型。它们的相半衰期($t_{1/2B}$)分别是 212、45 和 41 min,清除率(CL)分别是 2.0、7.0 和 13.9 ml/min/kg,表观分布容积(Vd)分别为 1.5、2.1、和 3.6dl/kg。EGC 和 EC 的 k₁₂ 和 k₂₁(中央室与周围室间的分布速率常数)相似,但 EGCG 的 k₁₂ 比 k₂₁ 高 3 倍,提示 EGCG 更易分布于周围室。EGCG 的 $t_{1/2}$ 较长,CL 较小,提示 EGCG 比 EGC 和 EC 在体内能停留更长时间。当用 EGCG 静注时, $t_{1/2}$ 为 135 min,清除率为 72.5 ml/min/kg,Vd 为 22.5 dl/kg,提示在 DGT 中有其他物质影响 EGCG 的浓度和排泄。DGT 灌胃给药(200 mg/kg)时,EGCG、EGC 和 EC 的生物利用度分别为 13.7%、31.2%和 0.1%。静脉注射 DGT(25mg/kg)后,EGCG 在小肠组织中浓度

最高,其半衰期($t_{1/2}$)为 175 min。EGC 和 EC 在肾中浓度最高, $t_{1/2}$ 分别为 29 min 和 28 min。EGCG 的 AUC 在肠中比肾中高 4 倍,而 EGC 和 EC 的 AUC 在肠和肾中相似,提示 EGCG 由胆汁排泄,而 EGC 和 EC 既从胆汁也从尿中排泄。他们还认为 EGCG 经加入饮水中给药比灌胃给药吸收更好。去咖啡因的绿茶提取物中的 EGCG 的吸收速率常数(Kd)比纯 EGCG 高 3.6 倍。基于每单位 EGCG 产生的 AUC 和 C_{max},DGT 似乎比纯 EGCG 更有效。值得一提的是 Yang^[21]发现把 1.5 g、3.0 g、4.5 g 去咖啡因的绿茶溶于 500 ml 水后给人饮用,随剂量由 1.5g 升至 3.0g 时,茶多酚的血浆 C_{max} 也增加 2.7~3.4 倍,但当剂量增至 4.5g 时 C_{max} 却不能明显增加。这被称为饱和现象。

结束语

近年来,植物来源的药物倍受青睐。不只因它对发现新药有很大潜力,还可为设计更理想的新药提供独特的化学结构,后者可被用为创制新药的先导化合物。众所周知,癌的发生至少经过三个阶段:即始发(initiation)、促癌(promotion)、演进(progression)。茶多酚的作用机制,特别是促癌阶段的分子机制是研究的热点。茶多酚来源于天然植物,茶叶为平常人家饮用。研究它的药理机制,特别在防癌抗癌方面,不仅顺应了抗癌药物从传统人工合成细胞毒药物向开发天然产物转变的大趋势,也必将促进它的进一步应用。

【参 考 文 献】

- [1] Yang CS, Wang ZY. Tea and cancer [J]. J. Natl. Cancer Inst, 1993, 85: 1038 ~ 1049.
- [2] Stoner GD, Mukhtar H. Polyphenols as cancer chemopreventive agents [J]. J Cell Biochem Suppl, 1995, 22: 169 ~ 180.
- [3] 郝东磊,谢冰芬,刘宗潮,等.茶多酚对人鼻咽癌 CNE2 细胞周期影响的流式细胞术的检测 [J]. 国外医学, 1998, 25 (5): 64.
- [4] Okabe S, Suganuma M, Hayashi M, et al. Mechanisms of growth inhibition of human lung cancer cell line, PC-9, by tea polyphenols [J]. Jpn J Cancer Res, 1997, 88 (7): 639 ~ 643.
- [5] Achiwa Y, Hibasami H, Katsuzaki H. Inhibitory effects of persimmon (Diospyros kaki) extract and related polyphenol compounds on growth of human lymphoid leukemia cells [J]. Biosci biotechnol Biochem, 1997, 61 (7): 1099 ~ 1101.
- [6] Sazuka M, Murakami S, Isemura M. Inhibitory effects of green tea infusion on in vitro invasion and in vivo metastasis of mouse lung carcinoma cells (下转 151 页)

表1 参数归纳表

摆位	d	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
新法	f	44	28	63	51	16	6						
旧法	f	6	9	23	33	35	27	19	15	17	11	8	5

注:d:偏离距离;单位:mm:f:频数

表2 配对样本差值表(缩略)

样本号	1	2	3	4	5	204	205	206	207	208
旧法	11	9	7	6	0	4	4	1	3	9
新法	3	4	2	3	1	0	1	1	0	6
差值	8	5	5	3	-1	4	3	0	3	3

注:结果 $\bar{X} = 2.96, S_{n-1} = 2.77$, 单位:mm表3 $(X - \bar{X})$ 归纳表

d	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
d ²	0	1	4	9	16	25	36	49	64	81	100	121
新法 f	44	28	63	51	16	6						
d ² xf	0	28	252	459	256	150						
旧法 f	6	9	23	33	35	27	19	15	17	11	8	5
d ² xf	0	9	92	297	560	675	684	735	1088	891	800	605

注:(X - \bar{X}) = d(偏离距离)(\bar{X} = 0); d² = d * d; f:频数

在每张样本纸上作一座标,将所有样本纸上的点作分布情况分析。用卡方检验进行统计。分析前偏和后偏以及上偏和下偏是否有对应关系,结果前偏和后偏各组的P值都比 $\alpha_1 (= 0.05)$ 大,可以认为前偏和后偏有对应关系,上偏和下偏各组P值比 $\alpha_2 (= 0.05)$ 小,不能认为上偏和下偏有对应关系。

在模拟机下,对一例病人作拍X光片(非作者摆位)进行新法与旧法面罩照射野重复性验证。经投影修正,新法4张X光片的偏差分别为2.6 mm、2.8 mm、2.6 mm和2.8 mm,平均2.7 mm;而旧法为5.9 mm、4.6 mm、4.8 mm和4.6 mm,平均5 mm。

3 讨论

在国内,各医院应用的面罩固定有所不同,有些医院剪去照射野面积(中心点除外),用纹身墨水在体表标出照射野中心,这样同样起到提高照射野重复性作用。另外,有些医院的面罩固定包括头和肩,照射野重复性尚不清楚。本研究证实,目前使用的面罩,如果只依靠面罩与头面部轮廓凹凸外形特性达到位置重复,作者认为,这种摆位带有不稳定性。这种面罩照射野重复性与质量要求存在一定距离。而新法是针对这一不足,在面罩的两侧照射野中心点处旁开10~15mm开一小孔,并在体表对应点处作上标记,作为摆位时确定面罩与人体

解剖标志的重复参考点,有利于提高照射野重复性。

所有点分布情况分析表明,头在面罩里以长轴为轴心与前、后偏转有对应关系,但与上、下偏转无对应关系,说明随机性大,面罩底座与头之间有一定角度要求。这两点是面罩旧法偏差具体表现,即半盲法摆位所致。

造成旧法均值和标准差差别较大,主要有为人和面罩两方面的因素。其一,人为因素:正像面罩产品书介绍,认为面罩是一种固定头部理想的辅助工具,只要能把头罩住固定好,再按要求把面罩照射野摆好,便认为体表照射野也会好。作者认为:位置重复(Repeated Positioning)不一定等于照射野重复(Repeated Fielding)。其二,面罩因素:人体头部虽然骨骼标志较多且凹凸不平,但仍被不同厚度软组织包裹,软组织与骨骼之间在力的作用下可以错位。再加上病人治疗过程脸部的肿胀和消瘦的改变,可导致面罩与头部的吻合性差。作者见过两例新面罩定位时无法吻合。

所有结果表明新法在照射野重复性、标准差和分散性都比旧法有显著的改善。新法有临床推广意义,除上述结果证明外,当照射野偏离5mm,所给剂量占D_T68Gy的50%,可造成照射野边缘剂量偏差在6.6Gy~10Gy之间^[1]。照射野的重复性好坏直接关系到治疗质量和生存质量。

【参考文献】

[1] 梁俊斌. 鼻咽癌放射治疗的头部带式固定法[J]. 癌症, 1997, 16(2): 157.

(编辑:钟均行,校对:孙优奋)

(上接141页)

- [7] 谢冰芬,刘宗潮,潘启超,等. 毛叶茶提取物的抗癌作用以及对DNA拓扑异构酶抑制作用[J]. 癌症, 1992, 11(6): 424~428.
- [8] 朱孝峰,刘宗潮,潘启超,等. 绿茶提取物对肿瘤细胞DNA引物酶-多聚酶复合体的影响[J]. 癌症, 1997, 16(3): 161~164.
- [9] Liang YC, Lin SSY, Chen CF. Suppression of extracellular signals and cell proliferation through EGF receptor binding by (-)-epigallocatechin gallate in human A431 epidermoid carcinoma cells [J]. J. Cell Biochem, 1997, 67(1): 55~65.
- [10] 甄永苏. 天然来源的新型抗肿瘤生化调节剂[J]. 国外医学, 1998, 25(5): 7~8.
- [11] Imad Naasani, Hiroyudi Seimiya. Telomerase inhibition, telomere shortening, and senescence of cancer cells by tea catechins [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1998, 249: 391~396.
- [12] Tannenbaum SR, Goldmann P. Nitrite synthesis in the germfree and conventional rat

- [13] Chan MM, Fong D, Ho Ct. Inhibition of inducible nitric oxide synthase gene expression and enzyme activity by epigallocatechin gallate, a natural product from green tea [J]. Biochem. Pharmacol, 1997, 54(12): 1281~1286.
- [14] Lin YL, Lin JK. (-)-Epigallocatechin-3-gallate blocks the induction of nitric oxide synthase by down-regulating lipopolysaccharide-induced activity of transcription factor nuclear factor-kappaB [J]. Mol. Pharmacol, 1997, 52(3): 465~472.
- [15] Kleiner HC, Euchenhofer B, Orstermann U. F. Immune 3T3 fibroblasts, different second messenger pathways resulting in the induction of NO synthase (iNOS) converge in the activation of transcription factor NF- κ B [J]. J. Biol. Chem, 1996, 271: 6039~6044.
- [16] Rong Yu Jiao JJ, Duh JL. Activation of mitogen-activated protein kinases by green tea polyphenols: potential signaling pathways in the regulation of antioxidant-responsive element-mediated Phase enzyme gene expression [J]. Carcinogenesis, 1997, 18: 451~

- 456.
- [17] Dong Z, Ma W, Huang C. Inhibition of tumor promoter-induced activator protein 1 activation and cell transformation by tea polyphenols, (-)-epigallocatechin gallate, and theaflavins [J]. Cancer Res, 1997, 57(19): 4414~4419.
- [18] Lee SF, Lin JK. Inhibitory effects of polyphenols on TPA-induced transformation, PKC activation, and c-jun expression in mouse fibroblast cells [J]. Natr Cancer, 1997, 28(2): 177~183.
- [19] Komori A, Yatsunami J, Okabe S. Anticarcinogenic activity of green tea polyphenols [J]. Jpn J. Clin Oncol, 1993, 23(3): 186~190.
- [20] Chen LS, Lee MJ. Absorption, distribution, and elimination of the tea polyphenols in rats [J]. Drug Meta and Disp, 1997, 25(9): 1045.
- [21] Yang CS, Chen L. Blood and urine levels of tea catechins after ingestion of different amounts of green tea by human volunteers [J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 1998, 7(4): 351~354.

(编辑及校对:杨允贵)