

## EGCG 抑制苯并(a)芘诱导大鼠气管上皮细胞转化的研究

冯继农 徐晋康 程书钧<sup>1</sup>

卫生部食品卫生监督检验所 北京 100021 <sup>1</sup>中国医学科学院肿瘤研究所

**摘要** 本文利用大鼠气管上皮细胞体内一体外转化模型,对绿茶提取成分—没食子酰表没食子儿茶素(epigallocatechin gallate, EGCG)的抗突变抗转化作用进行了初步研究。结果显示,腹腔注射总剂量为300mg/kg.bw, 600mg/kg.bw的EGCG可以明显抑制苯并(a)芘(benzo(a) pyrene, BP)诱导的活体大鼠气管上皮细胞转化(大鼠气管内滴注BP, 25mg/kg.bw),并可抑制BP诱导的大鼠气管上皮细胞的微核形成。本研究提示了茶叶防治肿瘤的可能性。

**关键词** 没食子酰表没食子儿茶素; 气管上皮细胞转化; 微核

寻找天然植物中的抑制癌变物质已成为目前癌化学预防的一个热点。近年来,茶叶与人类肿瘤关系的研究提示了茶叶防癌的可能性。化学分析证明,茶叶中含有丰富的茶多酚及维生素E,维生素C,硒等多种对人体有益的活性物质<sup>(1)</sup>。本研究应用大鼠气管上皮细胞体内一体外转化模型,初步探讨了绿茶提取物中分离纯化的成分EGCG对BP诱导的大鼠气管上皮细胞转化和微核形成的抑制作用。

### 材料和方法

1. EGCG由日本三井农林株式会社Hara博士提供,纯度为98%以上。

2. 给受试物方式

7~8周龄的Wistar大鼠腹腔注射EGCG,总剂量为300mg/kg.bw, 600mg/kg.bw,均分十次注射,每日一次。给受试物的第五天,第八天,乙醚麻醉大鼠,气管内滴注BP玉米油溶液,总剂量为25mg/kg.bw。

3. 大鼠气管上皮细胞的分离和培养

参照文献2进行<sup>(2)</sup>。给受试物后第十一天处死大鼠,消化气管上皮细胞,每平皿接种3万细胞。培养基为Ham'sF12,补以牛脑垂体提取物,(180μg/ml),牛血清白蛋白(0.5mg/ml),表皮生长因子(5ng/ml),

乙醇胺(1.0μM),磷酸乙醇胺(1.0μM),氢化考的松(0.1μg/ml),胰岛素(5μg/ml),转铁蛋白(5μg/ml),霍乱弧菌毒素(0.1μg/ml),青链霉素(50U/ml)。培养7~10天后计数细胞集落,并计算出集落形成率(colony forming efficiency, CFE)。

$$CFE = \frac{\text{集落数}}{\text{接种细胞数}} \times 100\%$$

### 4. 转化集落的选择

以上大鼠气管上皮细胞接种10天左右,将完全培养基换为去除了牛脑垂体提取物,牛血清白蛋白,表皮生长因子等促生长因素的选择培养基,加入促进上皮细胞分化的胎牛血清。第一周换液两次,以后每周换液一次,五周左右终止实验,固定,吉姆萨染色,计数转化细胞集落数并统计转化率(transforming frequency, TF)。

$$TF = \frac{\text{转化集落数}}{\text{进入选择集落数}} \times 100\%$$

### 5. 气管上皮细胞微核试验<sup>(3)</sup>

按上述方法用EGCG+BP处理的大鼠处死取出气管,收集细胞接种于平皿,细胞贴壁后加入细胞松弛素B,30μg/ml,继续培养48h,弃去培养液,加0.075MKCl低渗液及等体积固定液(甲醇:冰乙醇=3:1),1min后换成固定液,固定30min,用

4%吉姆萨染色,计数每500个双核细胞中有微核的细胞数。微核的形态标准为:微核染色与主核相同,并与主核分离,体积小于主核的1/5,排除其它细胞染色颗粒及核碎片。

结果

1. EGCG 阻断 BP 诱导的大鼠气管上

皮细胞转化试验

实验期间,EGCG 组动物体重增长与阴性对照组无显著性差异,表明EGCG对大鼠生长无明显影响。腹腔注射 300mg/kg.bw, 600mg/kg.bw 剂量的EGCG可以抑制由气管内滴注 25mg/kg.bwBP 诱导的大鼠气管上皮细胞转化。见表1。

表 1 EGCG阻断BP诱导的大鼠气管上皮细胞转化

	BP(mg/kg.bw)	EGCG(mg/kg.bw)	CFE(%)	TF(%)
实 验 一	0	0	1.57	0.68
	25	0	1.46	5.23
	25	600	1.49	1.73*
实 验 二	0	0	1.26	0.76
	25	0	0.51	4.79
	25	300	0.56	1.09*
	25	600	0.58	0.64*

\*P<0.01

2. EGCG抑制BP诱导的大鼠气管上皮细胞的微核形成试验。

EGCG可以降低由BP诱导的大鼠气管上皮细胞微核率。见表2。

表 2 EGCG对BP诱导微核形成的影响

BP(mg/kg.bw)	EGCG(mg/kg.bw)	微核率(%)	抑制率(%)
0	0	1.4	—
25	0	4.4	—
25	600	2.8	53*

\*P<0.01

讨论

据报道,绿茶提取物可以抑制BP诱导的细菌回复突变及V<sub>79</sub>细胞基因突变,姐妹染色单体交换和染色体畸变,并明显抑制BP诱导的BALB/3T3细胞恶性转化<sup>(4-5)</sup>。绿茶提取物还可抑制BP同DNA的共价结合,研究还表明,绿茶抗氧化剂可直接与BP的终末致癌代谢产物结合。该实验还观察到,绿茶抗氧化剂可明显清除BP产生的自由基<sup>(6)</sup>。由于茶叶成分复杂,提纯工作比较困难,因此单一成分的抗癌抗突变作用研

究较少。EGCG是绿茶中主要的多酚类物质,是一种抗突变物,它可抑制7,12-二甲基苯并(o)蒽诱导的皮肤肿瘤及甲基硝基亚硝基胍诱导的小鼠十二指肠肿瘤发生<sup>(7-8)</sup>。

以前的实验表明,BP诱导的大鼠气管上皮细胞转化集落是早期转化细胞,还不具备致瘤性。当转化细胞不断传代至一定代数后,才可以在裸鼠内致瘤<sup>(9)</sup>。因此,BP诱导的转化集落是一种癌前期的改变。本试验首次将EGCG作用于大鼠体内,参与体内代

谢过程,其结果是既抑制了反映染色体损伤的微核形成,又较强烈地抑制了BP诱导的大鼠气管上皮细胞转化,说明EGCG可以影响癌前期改变。而EGCG本身对大鼠未见明显的毒性。

EGCG产生抑制作用的可能机制是它含有OH基团,有强的抗氧化性,帮助机体清除有氧代谢产生的有害物质—自由基,已知自由基能启动癌形成过程中的一些异常化学变化<sup>(10)</sup>。也可能是多酚类物质能干扰与辅基相连的芳香基团结构的致癌物的活化。由于人类肿瘤大多数起源于上皮组织,因此利用上皮细胞转化系统研究抗癌作用更接近实际。本实验采取机体内接触受试物体外检测的方法,与单纯体外细胞培养研究其抑制作用相比,可在更接近于人体实际条件下更好地了解机体的作用。

以上研究提示,茶叶对某些肿瘤的发生有一定的抑制作用,经常饮用绿茶是具有一定益处的。

### 参考文献

1. 沈增,等。茶与消化系统肿瘤。1990; 5: 236
2. Gray TE, et al. Quantitation of cell proliferation, colony formation, and carcinogen induced cytotoxicity of rat tracheal epithelial cell grown in culture on 3T3 feeder layers. *In vitro* 1983; 19: 559

3. Krishna G, et al. Use of the cytokinesis-block method for the analysis of micronuclei in V79 Chinese hamster lung cells, results with mitomycin C and cyclophosphamid. *Mutat Res* 1989; 212: 63
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; 9: 328
5. 程书钧,等。绿茶多酚抑制突变和癌变的研究进展。癌变、畸变、突变 1989; 1: 1
6. 王志远,等。绿茶多酚类化合物对小白鼠的实验皮肤化学致癌作用的保护效应。“茶—品质—人类健康”国实学术讨论会 杭州 1987
7. Yoshizawa S et al. Antitumor promoting activity of (-)-Epigallocatechin gallate, the main constituent of “tannin” in green tea. *Phytother Res* 1987; 1: 44
8. Fujita Y et al. (-)-Epigallocatechin gallate on carcinogenesis with N-ethyl-N'-nitrosoquandine in mouse duodenum. *Jap J Cancer Res* 1989; 80: 503
9. Nettesheim P et al. Tracheal epithelial transformation: a model system for studies on neoplastic progression. *CRC Critical Reviews in Toxicology* 1982; 12: 215
10. Ames BN. Dietary carcinogens and anticarcinogens, oxygen radicals and degenerative disease. *Science* 1983; 221: 1256

(上接第31页)

### 参考文献

1. Maron DM and Ames B N. Revised methods for Salmonella mutagenicity test. *Mutat Res* 1983; 113: 173-215
2. Ames BN, et al. Methods for detecting Carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutat Res* 1975; 31: 347-364
3. 殷学军,等。小鼠脾脏与骨髓细胞在微核试验和染色体畸变中的应用。遗传 1988; 10(6): 18-22

4. Mizata M, et al. Mutagenic activities of dictamnine and r-fagarine from Dictamnii Radicis Cortex (Rutaceae). *Mutat Res* 1985; 144: 221-225
5. Yin Xue-Jun, et al. A Study on the mutagenicity of 102 raw pharmaceuticals used in chinese traditional medicine. *Matat Res* 1991; 260: 73-82
6. 刘德祥,等。102种中药水酸性提取物的抗诱变性筛选。中国中药杂志 1990; 15(19): 41-45

## **INHIBITORY EFFECT OF EPIGALLOCATECHIN GALLATE ON PROMOTION INDUCED BY TPA**

Tong Tong<sup>1</sup>, Cheng Shujun, Li Xiugin, Bai Jingfeng, and Hara Yukihiro<sup>2</sup>  
Cancer Institute, CAMS, Beijing 100021, <sup>1</sup>Institute of Medicinal Biotechnology, CAMS;<sup>2</sup> Food Research Laboratories, Mitsui Norin CO., LTD. Japan

This experiment demonstrated that epigallocatechin gallate(EGCG), the main component in green tea poly-phenols, showed a strong inhibitory effect on TPA-induced edema and hyperplasia in mouse skin, and TPA-induced promotion effect in BALB/3T3 cells initiated by 3-methylcholanthrene.

These experimental results indicate that EGCG is probably the main component in green tea polyphenols which inhibit TPA-induced promotion.

## **INHIBITORY EFFECT OF EPIGALLOCATECHIN GALLATE ON TRANSFORMATION**

Feng Jinong, Xu Jinkang, Cheng Shujun<sup>1</sup>  
Institute of Food Safety Control and Inspection, Ministry of Public Health, Beijing 100021 <sup>1</sup>Cancer Institute, Chinese Academy of Medical Sciences

The antimutagenic and anticarcinogenic effects of green tea extract epigallocatechin gallate(EGCG) were studied with rat tracheal epithelial (RTE) cells in vivo--in vitro transformation system. The results showed that transformation induced by benzo(a)pyrene (BP 25mg/kg. bw) was significantly inhibited by EGCG (300mg/kg.bw, 600mg/kg.bw). Also EGCG can inhibit the micronuclei induced by BP. The results indicate that EGCG practica limplcation in human cancer prevention