

茶多酚抗肿瘤的分子生物学研究进展

陈清勇¹ 钱利生¹ 郭勇² 郑筱祥³ (杭州 310013 中国人民解放军第117医院¹ 浙江大学生物系博士生² 浙江省中医院肿瘤科³ 浙江大学医学系博士生导师)

茶多酚占茶叶干重的30%左右,由30多种酚性物质所组成。按其化学结构不同分为四类,主要有:1.儿茶素属黄烷醇类。2.黄酮及黄酮醇类。3.花白素及花青素。4.酚酸类和缩酚酸类。绿茶多酚中的儿茶素含量最高,约占茶多酚总量的60~80%,红茶中主要有茶黄素和茶红素。有关茶及茶多酚抗癌作用的研究以往的报告多从化学预防的角度进行探讨^[1,2],如抑制前体化合物形成终致癌物;一些酶的抑制干涉化学致癌物在体内的转化过程以及茶多酚作为一种强抗氧化剂对多种致突变物、致癌物的致突变性及致癌性的抑制。近年来有关茶多酚可以抑制细胞增殖,诱导细胞凋亡和阻滞细胞周期等有较多报道^[3,4,5]。本文从这方面进行综述。

1 茶多酚诱导肿瘤细胞凋亡

细胞凋亡或称程序性细胞死亡是细胞死亡的一种形式,是细胞在一定的环境下,由遗传基因控制的适应性反应,是保证机体内环境稳定的重要手段。细胞凋亡受到许多因素的调节。如TNF、TGF等生物活性介质都能影响细胞凋亡的发生、发展。凋亡细胞的主要形态学特性是胞质浓缩,细胞体积缩小,染色质凝集,核固缩及断裂,凋亡小体的形成等。近年来的研究表明^[6,7],它在肿瘤发生、发展及抗肿瘤药物等方面具有重要的作用,已发现许多抗癌化疗药物能诱导或强化肿瘤细胞凋亡。茶多酚的抗癌机理尚不十分清楚。大多数人认为可能与诱导细胞凋亡有关。赵燕等^[8]采用噻唑蓝(MTT)还原法, DNA凝胶以及透射电镜技术,观察了茶多酚对胃癌细胞(MGC-803)凋亡的影响。结果表明,被 $125\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 茶多酚作用24h后, MGC细胞凝胶电泳呈现典型的DNA条带,透射电镜下看到凋亡小体。认为茶多酚的抗癌作用与诱导细胞凋亡有关。Ahmad等^[9]用EGCG(没食子酰没食子儿茶素)作用于A431细胞后,发现肿瘤细胞被阻滞在细胞周期的G₀-G₁期,细胞凋亡与剂量呈依赖关系。Katdareden等^[10]采用茶多酚等天然化学产物处理癌前病变的人上皮细胞

184-B5细胞株,结果产生细胞异常增殖的抑制和凋亡与P53的表达密切相关。CHEN等^[11]的研究表明茶多酚可通过调节c-fos和c-myc基因的表达式来诱导细胞凋亡。

Yang等^[12]用 $30\mu\text{M}$ EGCG, ECG(没食子酰儿茶素)或茶黄素处理H661细胞株系24h,经annexinV细胞凋亡分析法测定,均可显示诱导细胞凋亡,凋亡率分别23%、26%和8%。当浓度为 $100\mu\text{M}$ 时,细胞凋亡率则为82%、76%和78%。H661细胞株系与EGCG一起培养时,可诱导H₂O₂的形成,且呈剂量效应关系。将H₂O₂加入到H661细胞株系中可产生与EGCG处理相似的细胞凋亡现象。在H661细胞株中,EGCG诱导的细胞凋亡现象可完全被外源添加的过氧化氢酶(50单位/mL)所抑制。表明H₂O₂可能参与细胞凋亡过程,茶多酚在活体外产生生长抑制活性与其诱导形成H₂O₂有关。H₂O₂诱导的细胞凋亡可能通过增强对转录因子激活物(NF-KB)的抑制蛋白(IKB)的解离,激活NF-KB与DNA结合活性,进一步激活NF-KB相关的转录因子,启动“死亡基因”(如ced-3和ced-4的同源基因等)的表达式:细胞凋亡基因p53的启动子上有NF-KB的结合位点, NF-KB与P53基因启动子结合激活p53的表达式,而p53蛋白对细胞周期素(Cyclin)中的cdk2的抑制蛋白基因(Cip1)有正调控作用,使cdk2的活性受到抑制,从而DNA的合成不能从G₁S而停留在G₁期,抑制细胞生长,诱导细胞凋亡^[13]。

2 茶多酚与细胞信号

越来越多的研究表明,肿瘤的生长分化与细胞信号有关。茶多酚抗肿瘤生长的分子机制可能与阻滞信号传导有关。最近Lin等^[14]认为EGCG抗增殖活性的分子机制是其阻止上皮生长因子(EGF)与它的受体相结合,抑制由EGF或TPA(12-氧-四萜酰佛波-13-2硬)诱导的活性蛋白1(AP-

陈清勇,男,35岁。现为浙江大学生物医学工程系博士生。

1) 的活性。进一步研究发现在人乳腺癌细胞中 EGCG 抑制了 cdk_2 和 cdk_4 等多种 G1 期关键调节蛋白的活性, 并诱导 P21 和 P27 等 cdk 抑制剂蛋白的表达。Liang 等^[15] 使用^[3H]胸腺嘧啶渗入法试验发现 EGCG 抑制 A431 细胞的 DNA 合成。体外试验表明, EGCG 能够强烈地抑制 EGF-R、PDGF-R 和 FGF-R 酪氨酸激酶的活性, 半抑制浓度 (IC₅₀) 为 $0.5 - 1 \mu g \cdot m l^{-1}$ 。但对 PP60v-src 的蛋白酶活性都几乎无抑制作用 (IC₅₀ $> 10 \mu g \cdot m l^{-1}$)。进一步体内试验证明, EGCG 能降低由 EGF 诱导的 EGF-R 自身磷酸化的水平。EGF-R 的磷酸胺酸分析显示 EGCG 可抑制 A431 细胞由 EGF 刺激的磷酸酪氨酸产物。

YU 等^[16] 发现 GTPs (绿茶多酚) 在质粒构建转染的人 heptom a HepG₂ 细胞中诱导出氯霉素乙酰转移酶 (CAT) 活性。该质粒含有一个抗氧化反应元件 (ARE) 和一个与 CAT 报道基因相关的最小谷胱甘肽硫转移酶 Y_a 启动子, 说明 GTPs 可通过 ARE 刺激阶段 II 脱毒酶的转录。用不同浓度的 GTPs 处理 HepG₂ 细胞, 研究了分裂素激活蛋白激酶 (MAPK); 细胞外信号调节激酶₂ (ERK₂) 和 c-junN 端激酶₁ (JNK1)。结果, ERK₂ 得到有效激活, JNK₁ 也得到一定程度的激活。动力学研究表明 JNK₁ 的激活慢而持久, ERK₂ 的激活迅速而短暂。逆转录 PCR 发现 GTPs 也增加早基因 c-jun 和 c-fos 的 mRNA 的水平。这些结果提示 GTPs 可通过 MAPKs 的刺激作为信号通道来激活 ARE 依赖性基因。

3 茶多酚抑制肿瘤细胞生长

细胞无限性的生长和分裂是肿瘤发生的基础。肿瘤细胞增殖动力学的研究可以了解肿瘤代谢增殖情况, 有助于阐明抗癌药物及理化因素对癌细胞的影响和作用机制, 是抗癌药物的筛选和探讨药物治疗恶性肿瘤的最佳方案。

郭建霞等^[17] 应用放射自显影法, 以标记指数和标记有丝分裂为观察指标研究茶多酚 (GTPs) 对人肝癌细胞 sMMC-7721 增殖周期的影响。结果: $0.025 mg \cdot m l^{-1}$ 和 $0.05 mg \cdot m l^{-1}$ 的 GTP 对肝癌细胞的生长有明显的抑制作用, 细胞分裂指数明显下降, 并能阻滞的肝癌细胞周期 (G₁S → G₂-M) 各个进程, 并与剂量有关。

Yang 等^[18] 发现茶多酚在始发期和促癌期均能抑制由 NNK 诱导的肺癌生成, 并可抑制肺腺癌进展到腺癌及自发性肺癌的形成。蒋义国等^[19] 以 0.02% 和 0.2% 的茶多酚溶液供小鼠饮用以研究茶多酚对肺肿瘤的抑制作用。18 周后作肺肿瘤病理分析, 饮茶多酚组发瘤率和发癌率显著低于阳性对照组, 平均肿瘤数和恶性肿瘤比例明显降低。高剂量茶多酚组平均肿瘤数明显低于低剂量茶多酚组。阳性对照组肺肿瘤雌激素受体阳性率为 37.3%, 饮用低剂量和高剂量茶多酚可使受体阳性率分别降低到 19.5% 和 12.5%。结果提示茶多酚对药物联合诱导的肺肿瘤发生有抑制作用, 在肺肿瘤预防上有重要意义。

HU 等^[20] 在实验中, 给小鼠腹腔注射 $1.3 mg \cdot kg^{-1}$ 的 NNK (4-甲基亚硝胺-1-(3-吡啶)-1-丁酮), 并给予小鼠 2% 茶水。4 周和 8 周后, 小鼠肺组织中 c-myc、c-raf 和 c-hras 癌基

因表达水平明显比 NNK 单独处理低。其抑制率分别为 50%、20% 和 50%。进一步研究发现单独用 $10 \mu m ol$ TPA 处理 4h 后, 导致鸟氨酸脱羧酶 (ODC) 基因, 蛋白激酶 C (PKC) 基因和 c-myc 癌基因表达水平 (1 或 $5 \mu m ol$) 可以抑制所有由 TPA 诱导的基因表达, 并呈剂量依赖式, 说明茶多酚抑制肿瘤生长与抑制致癌物诱导的癌基因表达有关。

Okabe 等^[21] 研究表明 EGCG 抑制肿瘤细胞生长的机制与细胞周期调控有关。 $50 \mu M$ 和 $100 \mu M$ 的 EGCG 处理人肺癌细胞株 (pc-9 细胞) 后, 流式细胞分析显示, 其 G₂-M 期细胞的百分比从 13.8% 分别增到 15.6% 和 24.1%。提示: EGCG 阻滞 G₂-M 期细胞转相来抑制肿瘤发生。

Otsuka 等^[22] 研究发现人体白血病细胞株系和小鼠 NFS60 细胞株系增殖受 EGCG 抑制。每个株系对 EGCG 的灵敏度不同, 当 EGCG 浓度为 $50 \mu M$ 时, 50% 以上的细胞株的 DNA 合成被抑制。当 EGCG 为 $10 \mu M$ 时, 正常的造血细胞仍维持它们对成熟细胞在活体外提供各种谱系的自然功能。即使 EGCG 浓度高达 $100 \mu M$ 时仍有一半的细胞菌落含有所有细胞谱系。每个细胞系中的死亡细胞显示凋亡的特征, 这可能是由于 EGCG 对生长因素的信号产生抑制作用所致。EGCG 除了具有抗癌活性外, 还可能具有对白血病治疗的新功能, 而且没有副作用。

茶多酚除了可抑制肿瘤的生长, 还可以抑制癌前病变转变为肿瘤及肿瘤的转移。宫芸芸等^[23] 采用腹腔注射二乙基亚硝胺 (DEN) 启动, 并用 CCl₄ 加于三分之二肝切除促进形成的大鼠肝癌癌前病变模型, 以研究茶多酚、茶色素对肝癌癌前病变的抑制作用。试验组分别饮用含 0.1% 茶多酚或 0.1% 茶色素的水, 用谷胱甘肽硫转移酶 (GST)-P_i 阳性灶的密度和面积作为判断肝癌癌前病变发生和进展程度的指标, 同时用免疫印迹法测定肝脏组织 GST-P_i 蛋白水平, 并用 Northern Blot 方法检测 GST-P_i mRNA 的转录活性。结果显示: 茶多酚和茶色素组对 GST-P_i 阳性灶的面积抑制率分别为 72% 和 60%, 对阳性数目的抑制率分别为 44% 和 50%。用 GST-P_i 多克隆抗体进行的免疫印迹分析显示: 肝癌癌前病变模型中 GST-P_i 蛋白表达明显升高, 茶多酚和茶色素有不同程度的抑制作用。GST-P_i mRNA 的改变基本与 GST-P_i 蛋白的变化相一致。试验表明: 茶叶中抗氧化成分茶多酚和茶色素能够在不同水平上拮抗 GST-P_i 的过度表达, 这可能是茶多酚、茶色素抑制肿瘤发生和发展的机制之一。Yamamoto 等^[24] 研究了茶多酚对具有高度转移性的人体纤维瘤 HT1080 细胞通过单层的人体脐静脉内皮细胞 (HUVECs) 及内皮细胞基部膜受侵染过程的影响。结果表明, 在供试的茶多酚化合物中, ECG, EGCG 和茶黄素可使 HT1080 细胞侵入到 HUVECs/明胶膜单层的过程受到抑制, 而表儿茶素、EGC, 茶黄烷醇化合物、茶黄酮化合物和没食子酸酯衍生物则无此效应。茶黄素双没食子酸酯和 Theasinensin D 对侵染过程只有弱的抑制效应。ECG 对侵染有明显的抑制作用, 而对癌细胞和 HUVECs 却无细胞毒性。酯型儿茶素 (ECG 和 EGCG) 和茶黄素可强烈抑制分泌到老

化的 HT1080 细胞培养基中的由基质金属蛋白酶 MMP-2 和 MMP-9 酶参与的明胶降解作用。他们认为,在供试的茶多酚化合物中,ECG 被认为是具最强转移活性的制剂,它可在没有细胞毒性的情况下抑制侵染过程。

4 茶多酚与端粒酶

端粒是真核线性染色体末端结构。人端粒 DNA 由 (TTAGGG)_n 重复序列组成。端粒酶是核糖核酸的酶,具有 RNA 依赖的 DNA 合成酶活性,可重新合成端粒的重复序列。端粒酶的去调节可导致肿瘤发生和细胞永生。肿瘤细胞获得永生必须经过两个阶段,即死亡期 I (M₁) 和死亡期 II (M₂),肿瘤能顺利通过 M₁ 期进入 M₁-M₂ 间期,在此期间,端粒缺陷的染色体不稳定性通过促其半合子化、转位、扩增及重组装而加速肿瘤进程。端粒磨损的最终结果是活化端粒酶,以弥补端粒的丢失而使细胞无限增殖,成为永生细胞。端粒酶的活化是在肿瘤的晚期,而且是细胞永生的关键点^[25]。Naasani 等^[26]在无细胞系统(细胞提取液)中和活细胞中都证明了 ECG 对端粒酶有抑制作用。此外,用 2 种具有代表性的人体癌细胞株-U₉₃₇ 原单核白血病细胞和 HT₂₉ 结肠腺癌细胞进行的实验表明,在存有无毒浓度 ECG 的情况下,细胞生命周期受限制,同时出现端粒变短,染色体异常,与衰老有关的 β 半乳糖苷酶表达。端粒酶受到限制可能是茶抗癌效应主要机理之一。茶多酚是通过什么途径抑制端粒酶,其机理目前尚不清楚,有待于进一步研究。

5 茶多酚与肿瘤耐药性

肿瘤耐药性(multidrug resistance, MDR)是指肿瘤细胞先天性存在或经化疗药物诱导后表现出的对一种抗肿瘤药物出现耐药并对其他结构不同、作用靶位不同的抗肿瘤药物也具有抗药性。抗药基因 mdr₁ 扩增和分子量为 170kD 的 P-糖蛋白(p-glycoprotein, Pgp)过度表达是形成 MDR 的重要机理^[27]。具有代表性的 MDR 逆转剂有异搏定、环孢菌素、三氟拉嗪和三苯氧胺等。大量体外实验证明这些 MDR 逆转剂之所以能够逆转肿瘤细胞的抗药性,是因为他们能够抑制 Pgp 的功能,使细胞内的抗癌药物积聚增加,从而达到克服 MDR 的目的。潘宏铭等^[28]用阿霉素(DOX)诱导人大肠癌细胞株 SW₁₁₆,建立了抗多药性细胞株 SW₁₁₆/DOX,在此基础上筛选 MDR 逆转剂,证实了茶多酚复合体对 SW₁₁₆/DOX 细胞的抗多药性具有逆转作用。并建立裸鼠 SW₁₁₆/DOX 移植瘤模型,初步观察了茶多酚复合体在体内的逆转作用。尽管茶多酚复合体的体外逆转作用不如异搏定好,但茶多酚复合体是一种纯天然的提取物,动物试验表明属实际无毒性,而且可提高机体外周血白细胞,并可提高机体的免疫功能。因此,茶多酚复合体在临床肿瘤抗药性的逆转治疗中可能具有良好的前景。

6 展望

茶多酚具有很强的生物学活性,除了抗氧化、清除自由基和抑制致癌物引起的突变,还可抑制细胞增殖、诱导细胞凋亡和阻滞细胞周期等,是一种较有前途的抗癌药物。茶多酚的抗癌机理较为复杂,以下几个方面仍有待进一步研究。

- 6.1 已知茶多酚可诱导细胞凋亡,但其发生机理仍不清楚。
- 6.2 茶多酚阻滞信号传导是通过什么途径或环节,目前还未能确定。
- 6.3 茶多酚与端粒酶关系的研究目前刚刚起步,还存在许多问题,特别对其发生机理需进一步研究。
- 6.4 逆转多药耐药基因的表达是近来研究的热点,寻找逆转剂是当务之急,茶多酚复合体或茶多酚单体是否真的具有逆转作用尚处于实验阶段,检测方法上仍未完全建立。我们准备运用流式细胞术来测定细胞内药物积聚浓度和 P₁₇₀ 糖蛋白的水平,以进一步论证其逆转效应。同时检测细胞凋亡与细胞周期及相关基因表达的关系,进一步探讨凋亡的机理。相信通过不断的研究可为茶多酚的开发应用提供理论基础。

参考文献

- 1 Shim oik. the pyrogallol related compound reduce UV. induced mutation in Escherichia coli B/rwp2 Mutat Res, 1986, 173(4): 224.
- 2 潘宏铭, 吴金民, 郑一树. 茶多酚对二甲胍诱发小鼠大肠肿瘤的抑制作用. 中华预防医学杂志, 1995, 29(6): 356.
- 3 Lin JK, Liang, YL, Lin Shiau SY. Cancer chemoprevention by tea polyphenols through mitotic signal transduction blockade. Biochem pharmacol. 1999, 58(6): 911.
- 4 Liang YC, chen YC, Lin YL et al. suppression of extracellular signals and cell proliferation by the black tea polyphenol, theaflavin-3, 3'-digallate. carcinogenesis, 1999, 20(4): 733.
- 5 Yang GY, Liao J, kink et al. Inhibition of growth and induction of apoptosis in human cancer cell lines by tea polyphenols. Carcinogenesis, 1998, 19(4): 611.
- 6 Kenji Sugamura, Masato Makino, Hiroyuki Shirai, et al. Paclitaxel-induced Apoptosis in Human Gastric Carcinoma Cell lines. Cancer, 1996; 77(1): 14.
- 7 Hannun YA. Review: Apoptosis and the Dilemma cancer cancer chemotherapy. Blood, 1997; 89(6): 1845.
- 8 赵燕, 曹进, 祝和成. 茶多酚诱导人胃癌细胞凋亡. 湖南医科大学学报, 1997, 22(5): 384.
- 9 Ahmad N, Feyes DK, Nieminen AL et al. Green tea constituent epigallocatechin-3-gallate and induction of apoptosis and cell cycle arrest in human carcinoma cells. Jnatl CANCER Inst. 1997, 89(24): 1881.
- 10 Katdare M, Osborne MP, Telang NT. Inhibition of aberrant proliferation and induction of apoptosis in preneoplastic human mammary epithelial cells by natural phytochemicals. Oncot-Rep. 1998. 5(2): 311.
- 11 Chen ZP Schell JB, Ho. CT et al. Green tea epigallocatechin gallate shows a pronounced growth inhibitory effect on cancerous cells, but not their normal counterparts, cancer Lett, 1998, 129(2): 173.
- 12 Yang GY, Liao J, Kink, Inhibition of growth and induction of apoptosis in human cancer cell lines by tea polyphenols. carcinogenesis, 1998, 19(4): 611.
- 13 李培峰, 方允中. 活性氧所致超氧化物歧化酶肽链断裂的观

察. 生物化学杂志, 1995, 11(1): 76.

- 14 Lin JK; Liang YC; Lin-Shiau SY. Cancer chemoprevention by tea polyphenols through mitotic signal transduction blockade. *Biochem pharmacol*, 1999, 15; 58(6): 911.
- 15 Liang YC, Linshiau SY, Chen CF et al. Suppression of extracellular signals and cell proliferation through EGF receptor binding by (-)-epigallocatechingallate in human A431 epidermoid carcinoma cells. *J cell Biochem*. 1997, 67(1): 55.
- 16 Yu R, Jiao JJ, Duh JL, Activation of mitogen-activated protein kinase by green tea polyphenols; potential signaling pathways in the regulation of antioxidant responsive element mediated phase II enzyme gene expression, carcinogenesis, 1997, 18(2): 451.
- 17 郭建霞. 茶多酚对人类肝癌细胞周期的影响. *广西医学*: 1995, 17(5): 361.
- 18 Yang CS, Yang GY, Landau JM et al. Tea and tea polyphenols inhibit cell hyperproliferation lung tumorigenesis, and tumor progression. *Exp. Lung Res*. 1998, 24(4): 629.
- 19 蒋义国, 陈家坤, 吴中亮. 茶多酚对雌激素与乌坦联合诱发小鼠肺肿瘤的抑制作用. *卫生毒理学杂志*, 1998, 12(1): 7.
- 20 Hu G, Han C, Chen J, Inhibition of oncogene expression by green tea and (-)epigallocatechingallate in mice. *Nutr Cancer*. 1995, 24(2): 203.
- 21 Okabe S, Suganuma M, Hayashi M, et al. Mechanisms of growth inhibition of human lung cancer cell line, pc-9, by tea polyphenols. *Jpn J Cancer Res*, 1997, 88(7): 639.
- 22 Otsuka T, Ogo T, Eto T. Growth inhibition of leukemic cell by (-)-epigallocatechingallate, the main constituent of green tea. *Life Sci* 1998, 63(16): 1397.
- 23 宫芸芸, 韩 驰, 陈君石. 茶多酚、茶色素对大鼠肝癌癌前病变抑制作用的研究. *卫生研究*. 1999, 28(5): 294.
- 24 Yamamoto M. M., Kawahara H., Tahara N. Effect of tea polyphenols on the invasion and matrix metalloproteinases of human fibrosarcoma HT1080 cells. *J. Agric. Food Chem*. 1999, 47(6): 2350.
- 25 张莉萍, 蒋纪恺, 刘祥贵. 端粒、端粒酶与肿瘤发生. *中国肿瘤临床*, 1998, 25(7): 543.
- 26 Nansani I, Seimiya H, Tsuruo T, Telomerase inhibition, telomere shortening and senescence of cancer cells by tea catechine. *Biochem, Bio-*细胞株 SW1116/Dox 的建立及茶多酚复合体的逆转作用研究. *肿瘤*, 1997, 17(4): 213.

收稿日期: 2000-03-27