

绿茶对大鼠大肠癌前病变预防作用的研究

崔文明 贾旭东 韩 驰

(中国疾病预防控制中心营养与食品安全所,北京 100050)

摘要:为了观察绿茶对大鼠大肠癌前病变的预防作用,将 24 只雄性 Wistar 大鼠随机分为 3 组:阳性对照组,饮茶组和阴性对照组,每组 8 只。阳性对照组大鼠从实验第 2 周开始颈部皮下注射致癌剂二甲基胍,每周 1 次,连续 10 周。饮茶组致癌剂处理同阳性对照组,并在整个实验期间饮用 2% 绿茶水。阴性对照组皮下注射相同剂量的生理盐水。阳性对照组和阴性对照组大鼠在整个实验期间饮用自来水。结果表明,与阳性对照组相比,饮茶组变性隐窝病灶 (ACF) 数目显著降低 ($P < 0.05$);增殖细胞核抗原标记指数 (PCNA-LI) 和核仁组成区嗜银蛋白颗粒数目 (AgNORs) 显著减少 ($P < 0.05$);此外,饮茶还抑制了 Bcl-2 蛋白的表达,诱导了 Bax 蛋白的表达。本研究条件下绿茶对二甲基胍诱发的大鼠大肠癌前病变具有预防作用,其机制可能与抑制细胞增殖和诱导细胞凋亡有关。

关键词:茶;癌;化学预防;细胞分裂;细胞凋亡

Prophylactic Effect of Green Tea on Precancerous Lesions of Colorectal Cancer in Rats

CUI Wen-ming, JIA Xu-dong, HAN Chi

(National Institute for Nutrition and Food Safety, Chinese CDC, Beijing 100050, China)

Abstract: The present study was to investigate the chemopreventive effect of green tea on the precancerous lesion of colorectal cancer in rats based on a series of biomarkers. Twenty four Wistar rats were randomly divided into 3 groups, 8 rats for each. Rats in the positive control group were subcutaneously injected with a carcinogen (DMH) from the second week, once a week for 10 weeks. Animals in tea-drinking group were given the same treatment as the positive control group and received 2% green tea as drinking water during the whole study. Rats in the negative control group were subcutaneously injected with the same volume of saline. Rats in the positive control group and the negative control group received tap water as drinking water during the whole study. The results showed that tea-drinking significantly reduced the number of aberrant crypt foci (ACF), the putative precancerous lesions of colorectal cancer ($P < 0.05$). The number of silver-stained nucleolar organizer dots per nucleus (AgNORs) and labeling index (LI) of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) of intestinal mucosa in the tea-drinking group were also significantly reduced as compared with those in the positive control group ($P < 0.05$). In addition, tea-drinking inhibited the expression of Bcl-2 protein and induced the expression of Bax protein. In conclusion, green tea had a chemoprophylactic effect on the precancerous lesions of colorectal cancer. The possible mechanisms may be the inhibition of cell proliferation and induction of apoptosis.

Key word: Tea; Carcinoma; Chemoprevention; Cell Division; Apoptosis

大肠癌是最常见的恶性肿瘤之一。由于生活方式和膳食习惯的改变,中国大肠癌发生率和死亡率逐年增长。本着防治结合,预防为主方针,迫切需要加强对大肠癌的研究,特别是对大肠癌化学预防方面的研究。茶叶是一种被人们广泛接受的饮品,流行病学资料显示茶叶与大肠肿瘤的发生具有相关性。^[1]本研究应用二甲基胍(DMH)诱发的大鼠大肠癌前病变动物模型,选用一系列生物学标志物,观察绿茶对大鼠大肠癌前病变变性隐窝病灶(ACF)的化学预防作用,并探讨可能的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 雄性断乳 Wistar 大鼠(清洁级,合格证号:医动字第 01-3008 号)由中国医学科学院动物中心提供,饲以动物中心提供的常规饲料。

1.1.2 主要试剂 绿茶(杭州炒青)由中国农业科学院茶科所提供;二甲基胍(DMH) Sigma 公司;鼠抗大鼠 PCNA 抗体 ZYMED 公司;兔 Bcl-2 抗体和兔 Bax 抗体 Santa Cruz 公司;碱性磷酸酶标记二抗 VECTOR 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 动物分组与处理 24 只大鼠,平均体重 69.7 g(59~81 g)。在动物房适应 1 周后,随机分为 3 组,(1) 阳性对照组;(2) 绿茶水组;(3) 阴性对照

作者简介:崔文明 男 副主任技师

组。阳性对照组从实验第 2 周开始颈部皮下注射二甲基胍(DMH), 20 mg/kg BW, 每周 1 次, 连续 10 周。绿茶组处理同阳性对照组, 并在整个实验期间给予 2% 绿茶水, 直至实验结束。茶水每天新鲜配制。阴性对照组颈部皮下注射相同剂量的生理盐水。阳性对照组和阴性对照组在整个实验期间饮用自来水。整个实验期间, 每天观察动物一般情况, 记录各组大鼠饮水或饮茶量。注射 DMH 期间每周称一次体重以调整 DMH 注射量。于实验第 16 周断头处死大鼠, 取出大肠组织进行指标测定。

1.2.2 变性隐窝病灶(ACF)观察 参照 Bird^[2]的方法固定标本和染色: 动物处死后立即分离大肠, 用生理盐水冲洗肠内容物, 将整根大肠铺平夹于两层滤纸之间, 固定于 10% 中性缓冲福尔马林溶液中, 至少 24 h。固定好的标本用 0.2% 美蓝染色 3~5 min, 立即在 $\times 40$ 光学显微镜下观察计数 ACF 数目。判断标准: 与正常大肠隐窝相比, ACF 有以下 3 个形态学上的特征: 体积更大; 上皮细胞层次更多; 隐窝腔呈椭圆形而非圆形。

1.2.3 增殖细胞核抗原(PCNA)分析 PCNA 测定用免疫组化法。用 0.01 mol/L 磷酸缓冲液替代一抗作为阴性对照。PCNA 阳性细胞为细胞核染成棕黄色, 判定标准为每张切片在高倍光学显微镜下选有代表性的 10 个隐窝, 记录其视野中细胞的 PCNA 阳性细胞数, 计算其标记指数(LI), 标记指数以每 100 个细胞中的 PCNA 阳性细胞数表示。

1.2.4 核仁组成区嗜银蛋白颗粒(AgNORs)分析 石蜡切片常规脱蜡, 梯度酒精水化, 将明胶溶于 1% 的甲酸中, 浓度为 2%, 再与 50% 的硝酸银按 1:2 的比例混合。在室温下避光染色 60 min, 终止染色后, 梯度酒精脱水、二甲苯透明、封片。每张切片在油镜下选有代表性的 10 个变性隐窝, 每个变性隐窝计数 20 个细胞, 测量指标为每个细胞核的平均 AgNORs 颗粒数目。

1.2.5 Bcl-2 和 Bax 分析 Bcl-2 和 Bax 分析方法同 PCNA 测定。Bcl-2 和 Bax 阳性细胞为细胞膜、细胞浆或核膜染成棕黄色。判定标准为每张切片在光学显微镜下选有代表性的 10 个隐窝, 根据隐窝中细胞的 Bcl-2 和 Bax 阳性细胞数占总细胞数的比例进行阳性分级: 0%~25% 为 0 级; 26%~50% 为 1 级; 51%~75% 为 2 级; 76%~100% 为 3 级。

1.3 统计学分析

采用方差分析和 *t* 检验比较各组 ACF 数、PCNA 阳性细胞数和 AgNORs 颗粒数目。利用 Wilcoxon 检验分析各组 Bcl-2 和 Bax 阳性细胞数。

2 结果

2.1 ACF 数目

实验结束处死大鼠, 分析从肛门至回盲部整根大肠的 ACF 数目。结果如表 1 所示: 阳性对照组及饮茶组均发现了 DMH 诱发的 ACF, 而阴性对照组没有 ACF。与阳性对照组相比, 饮茶显著抑制了 ACF 的发生。

表 1 饮茶对 DMH 诱发大鼠大肠癌前病变 ACF 的影响

组别	动物数	ACF 数目
阳性对照	8	249.88 ±10.89
2% 绿茶	8	148.25 ±14.05 ^a
阴性对照	8	0

注: a: 与阳性对照组比较, 经 *t* 检验, $P < 0.05$ 。

2.2 大肠粘膜组织 PCNA 标记指数和 AgNORs 颗粒数目

如表 2 所示, 阳性对照组的 PCNA 标记指数和每核 AgNORs 颗粒数目显著高于阴性对照组。与阳性对照组比, 饮用绿茶后, PCNA 标记指数和 AgNORs 颗粒数均显著降低。

表 2 PCNA 标记指数和 AgNORs 颗粒数目

组别	PCNA 标记指数	AgNORs 颗粒数目
阳性对照	3.89 ±0.32	4.17 ±0.25
2% 绿茶	3.41 ±0.31 ^a	3.68 ±0.21 ^a
阴性对照	2.96 ±0.24	3.04 ±0.16

注: a: 与阳性对照组比较, 经 *t* 检验, $P < 0.05$ 。

2.3 大肠粘膜组织 Bcl-2 蛋白和 Bax 蛋白表达

如表 3 所示, Bcl-2 和 Bax 蛋白在阴性对照组均低表达, 与阳性对照组比, 饮茶 16 周后 Bcl-2 的表达显著降低, 而 Bax 的表达显著增加。

表 3 饮茶对 DMH 诱发大鼠大肠粘膜组织 Bcl-2 蛋白和 Bax 蛋白表达的影响

组别	Bcl-2 蛋白				Bax 蛋白			
	0	1	2	3	0	1	2	3
阳性对照	1	1	3	3	2	5	1	0
2% 绿茶	2	5	1	0 ^a	0	1	5	2 ^a
阴性对照	6	2	0	0	6	2	0	0

注: a: 与阳性对照组比较, 经 Wilcoxon 检验, $P < 0.05$ 。

3 讨论

变性隐窝病灶(ACF)是指一个或多个聚集成簇的形态异常的隐窝形成的病灶, 越来越多的证据支持 ACF 是大肠癌的癌前病变。^[3] 本次研究发现绿茶组大鼠 ACF 数目显著减少, 表明绿茶对 ACF 的发生具有抑制作用。Weisburger 在氧化偶氮甲烷(AOM)诱导的大鼠结肠癌模型中也发现了类似的效果。^[4]

增殖细胞核抗原(PCNA)是 DNA 聚合酶 的辅

助蛋白,与DNA复制密切相关。近年来发展起来的一步胶体银染技术可在常规组织切片上显示细胞核内的核仁组织区(NORs),称为AgNORs,在显微镜下显示为黑色颗粒,计数为银颗粒。^[5]银颗粒是银与位于该区域的rRNA相关酸性非组蛋白相结合而成,该蛋白称为核仁组成区嗜银蛋白,参与rDNA的转录调节机制或维持rDNA链的伸展构型,因此,银颗粒数目可作为一种细胞增殖指标,反映细胞的增殖活性。近年来,PCNA和AgNORs已作为生物学标志物被广泛应用于大肠癌的研究中。在本次研究中,给大鼠饮用2%的绿茶水16周后显著降低了PCNA标记指数和AgNORs颗粒数目。

研究表明,Bcl-2基因家族的成员通常以二聚体的形式发挥作用,Bcl-2与Bax形成异二聚体,抑制细胞凋亡;Bax本身可形成同二聚体,促进细胞凋亡。^[6]本次研究结果发现与阳性对照组相比,饮茶抑制了Bcl-2蛋白的表达,诱导了Bax蛋白的表达。说明茶对细胞凋亡具有诱导作用。

在本研究条件下,给大鼠饮用2%绿茶水对DMH诱发的大肠癌前病变的发生具有预防作用,其机制可能与抑制细胞增殖和诱导细胞凋亡有关。

参考文献

- [1] Arab L, Il 'yasova D. The epidemiology of tea consumption and colorectal cancer incidence [J]. J Nutr, 2003, 133: 3310S-3318S.
- [2] Bird R P. Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings[J]. Cancer Lett, 1987, 37: 147-151.
- [3] Luebeck E G, Moolgavkar S H. Multistage carcinogenesis and the incidence of colorectal cancer[J]. PNAS, 2002, 99: 15095-15100.
- [4] Weisburger J H, Rivensin A, Carr K, et al. Tea, or tea and milk, inhibit mammary gland and colon carcinogenesis in rats [J]. Cancer Lett, 1997, 114:323-327.
- [5] Howell W M, Black D A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: 1-step method[J]. Experientia, 1980,36:1014-1015.
- [6] Sjöström J, Blomqvist C, von Boguslawski K, et al. The predictive value of bcl-2, bax, bcl-xL, bag-1, fas, and fasl for chemotherapy response in advanced breast [J]. Cancer Clin Cancer Res, 2002, 8: 811-816.

[收稿日期:2006-07-12]

中图分类号:R15; R730.1; TS272.51

文献标识码:A

文章编号:1004-8456(2006)06-0532-03

卫生部文件

卫监督发[2006]336号

卫生部关于撤销“唐新牌唐新胶囊” 保健食品批准证书的通知

蓬莱深奥生物科技研究所:

根据我部卫生监督局的监督检查结果,你单位生产“唐新牌唐新胶囊”(生产批号:20041215)中含有“格列美脲”、“格列本脲”成分,已经有关单位检验证实。

根据《保健食品管理办法》第二十七条规定,我部对你单位生产的“唐新牌唐新胶囊”进行了重新审查。经审查,确认“唐新牌唐新胶囊”中含有《中华人民共和国食品卫生法》规定禁止在食品中添加的“格列美脲”和“格列本脲”等化学合成药物。我认为,你单位的行为违反了《中华人民共和国食品卫生法》第九条、第十条和《保健食品管理办法》第四条的规定。现依据《保健食品管理办法》第二十七条规定,决定撤销“唐新牌唐新胶囊”的保健食品批准证书(批准文号:卫食健字(2002)第0382号)。

如不服本决定,可以依照有关法律申请行政复议或提起行政诉讼。

中华人民共和国卫生部
二 六年八月二十八日