

• 药理实验与临床观察 •

茶多酚与亚硒酸钠联合对 EBV 抗原表达的抑制作用[△]

中山医科大学肿瘤防治中心 (广州 510060) 刘宗潮* 简少文 李志铭 朱孝峰 李 端 谢冰芬 冯公侃

摘 要 用间接免疫荧光法测定 Raji 细胞和 B₉₅₋₈ 细胞 EB 病毒抗原的表达。结果显示无细胞毒浓度的茶多酚与亚硒酸钠联合对 Raji 细胞 EBV-EA 表达有显著的抑制作用, 优于单纯茶多酚或亚硒酸钠的抑制作用。两药显示相互协同增效的作用。抑制率与药物浓度相关; 单纯茶多酚对 B₉₅₋₈ 细胞 EBV-VCA 表达无抑制作用, 但茶多酚能增强亚硒酸钠对 B₉₅₋₈ 细胞 EBV-VCA 表达的抑制作用, 抑制率随药物浓度的升高而升高。表明茶多酚能增强亚硒酸钠对 Raji 细胞 EBV-EA 及 B₉₅₋₈ 细胞 EBV-VCA 表达的抑制作用。

关键词 茶多酚 亚硒酸钠 EBV 抗原表达 抑制作用

Inhibitory Effect of Tea Polyphenol and Sodium Selenite Combination on EBV Antigen Expression

Cancer Center, Sun Yat-sen University of Medical Sciences (Guangzhou 510060) Liu Zongchao, Jian Shaowen, Li Zhiming, Zhu Xiaofeng, Li Duan, Xie Bingfen and Feng Gongkan

Abstract EBV antigen expression of Raji cells and B₉₅₋₈ cells was detected using indirect immunofluorescence staining methods. The experimental results showed that tea polyphenol and sodium selenite used in combination at non-cytotoxic concentrations showed markedly inhibitory effects, on EBV-EA expression of Raji cells, superior to either tea polyphenol or sodium selenite when used alone. The two drugs showed synergetic effect with each other. With a rate of inhibition dependent on tea polyphenol concentration. Single tea polyphenol had no inhibitory effect on EBV-VCA expression of B₉₅₋₈ cells, but could enhance the inhibitory effect of sodium selenite in such cases on a concentration dependent manner. Tea polyphenol would enhance the inhibitory effect of sodium selenite on EBV-EA expression of Raji cells and EBV-VCA expression of B₉₅₋₈ cells.

Key words tea polyphenol sodium selenite expression of EBV antigen inhibitory effect

华南地区,特别是广东省是全世界鼻咽癌 (Nasopharyngeal Carcinoma, NPC) 最高发的地区。EB 病毒 (Epstein-Barr Virus, EBV) 与鼻咽癌密切相关。曾毅^[1]认为完整的 EB 病毒能诱发上皮细胞癌变。黄腾波等人^[2]在高发区对队列人群进行了 10 年的前瞻性观察。在提出癌前状态和癌前病变的基础上确定凡处于癌前状态或癌前病变者应视为鼻咽癌的高危人群。癌前状态人群血清中各种抗 EB 病毒抗原的抗体,如 EB 病毒壳抗原抗体 IgA (VCA/IgA), 早期抗原抗体 IgA (EA/IgA) 和 DNA 酶抗体 (DEAb) 的检测水平或同时升高,或单项异常升高。因此,如果能控制 EB 病毒在人群中的感染和激活,降低人群 EB 病毒抗原抗体水平,就有可能预防或降低鼻咽癌的发病率。

据文献报道^[3-6],绿茶水、绿茶提取物及茶多酚 (tea polyphenol, TP) 具有抗氧化、抗突变、防癌和抗癌作用;亦有文献证明^[7],硒有防癌、抗癌作用。罗慧玲等人^[8,9]还证明,无毒性浓度的亚硒酸钠 (sodium selenite, Se) 对正丁酸巴豆油协同诱导的 Raji 细胞 EA 抗原和 B₉₅₋₈ 细胞的 VCA 抗原呈显著的抑制作用。笔者研究了茶多酚和亚硒酸钠分别对 Raji 细胞 EB 病毒 EA 抗原表达和 B₉₅₋₈ 细胞 EB 病毒 VCA 抗原表达的抑制作用,还测定了茶多酚与亚硒酸钠联合对 Raji 细胞 EB 病毒 EA 抗原表达和 B₉₅₋₈ 细胞 EB 病毒 VCA 抗原表达的抑制作用。

1 材料

1.1 材料: FITC 抗人 IgG 购于上海生化所, RPMI-1640 培养基为 Sigma 公司产品。

* Address: Liu Zongchao, Cancer Center, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou

刘宗潮 男,研究员,硕士生导师,中国药理学学会肿瘤药理及化疗专业委员会委员,癌症杂志常务编委。专长肿瘤药理及肿瘤化疗研究。除 4 次获得国家自然科学基金的资助外,还负责或参与广东省科委基金、卫生部科研基金及国家“九·五”攻关资助课题的研究。主要学术成就有:超螺旋 DNA 和 DNA 拓扑异构酶 II 分别在抗癌药物研究中的应用;绿茶提取物的抗癌作用和药理作用,被第二届世界中西医结合学术论坛年会评为“国际名医成果贡献奖”。

[△]本课题系国家“九·五”攻关研究项目,项目编号: 96-906-01-03

1.2 受试药物: 绿茶提取物, 购于暨南大学生物系, 含茶多酚 86.9%。亚硒酸钠为广州化学试剂厂产品, 化学纯, 批号 970601

1.3 细胞株: Raji 细胞含 EB 病毒 DNA 和核抗原 (EBNA) 阳性, 其余抗原阴性的人淋巴母细胞株。在正丁酸钠 4 mmol/L 和巴豆油 200 ng/mL 激发下可产生 EB 病毒的早期抗原 (EA)。B₉₅₋₈ 细胞为 EB 病毒转化的绒猴淋巴母细胞株, 恒定表达 5% 左右壳抗原 (VCA)。在正丁酸钠 4 mmol/L 激发下, 可增加 VCA 的表达。上述二种细胞按常规培养于含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液中, 在二氧化碳培养箱中培养传代。末次传代后 24 h 检查活细胞数在 90% 以上方可用于试验。

2 方法

2.1 细胞毒性测定: 用台盼蓝拒染法^[10]分别测定茶多酚、亚硒酸钠及茶多酚+亚硒酸钠对 Raji 细胞和 B₉₅₋₈ 细胞的细胞毒作用。测出茶多酚、亚硒酸钠、茶多酚+亚硒酸钠最大的无毒浓度。

2.2 EBV-EA 和 EBV-VCA 抗原检测: 将待检测的 Raji 细胞或 B₉₅₋₈ 细胞悬液分装入试管, 将不同浓度的药液加入各细胞培养管中, 同时加入激发物正丁酸钠 4 mmol/L 和巴豆油 200 ng/mL。每一药物浓度设 3 个平行管, 培养 48 h 后收获细胞制成抗原涂片、固定。用间接免疫荧光法染色, 再经伊文思蓝复染, 在荧光显微镜下每管数 500 个细胞中 EA 或 VCA 阳性的细胞数, 算出阳性百分率。实验重复两次, 按下列公式计算抑制率 (IR):

$$IR = \frac{\text{对照组阳性百分率} - \text{实验组阳性百分率}}{\text{对照组阳性百分率}} \times 100\%$$

两个单药合用是否增效, 按下列公式算出 q 值^[11]:

$$q = \frac{E(A+B)}{EA + (1-EA) \times EB}$$

$E(A+B)$ 为两药合用的抑制率; EA 和 EB 为各药单用的抑制率; $q = 0.85 \sim 1.15$ 表示两药作用相加; $q > 1.15$ 表示两药作用协同增强; $q < 0.85$ 表示两药作用互相拮抗。

3 结果

3.1 药物最大无毒浓度的测定: 茶多酚、亚硒酸钠、茶多酚+亚硒酸钠对 Raji 细胞最大无毒浓度分别为 100.0, 1.0 和 (50+0.5) $\mu\text{g/mL}$; 对 B₉₅₋₈ 细胞的最大无毒浓度分别为 100.0, 1.0 和 (25+0.25) $\mu\text{g/mL}$ 。与 Raji 细胞对比, B₉₅₋₈ 细胞对茶多酚+亚硒酸钠作用更敏感。

3.2 茶多酚对 Raji 细胞 EB 病毒 EA 表达的抑制作用: 茶多酚在 12.5, 25.0, 50 和 100 $\mu\text{g/mL}$ 浓度下对 Raji 细胞 EB 病毒 EA 表达 3 批实验的平均抑制率分别为 25.9%, 32.4%, 42.7% 和 54.1%。IC₅₀ 为 79.62 $\mu\text{g/mL}$, 显示中度的抑制作用。

3.3 亚硒酸钠对 Raji 细胞 EB 病毒 EA 表达的抑制作用: 亚硒酸钠在 0.125, 0.25, 0.5 和 1.0 $\mu\text{g/mL}$ 浓度下, 对 Raji 细胞 EB 病毒 EA 表达 3 批实验的平均抑制率分别为 2.5%, 21.6%, 33.7% 和 63.7%, 呈现中度的抑制作用。IC₅₀ 为 0.7 $\mu\text{g/mL}$ 。

3.4 茶多酚与亚硒酸钠联合对 Raji 细胞 EB 病毒 EA 表达的抑制作用: 见表 1。从表 1 可以看出, 茶多酚+亚硒酸钠分别为 (6.25+0.0625), (12.5+0.125), (25+0.25) 和 (50+0.5) $\mu\text{g/mL}$ 浓度下, 对 Raji 细胞 EB 病毒 EA 表达 3 批实验的平均抑制率分别为 40.3%, 56.9%, 64.9% 和 72.3%, 根据 q 值公式计算 q 分别为 2.05, 1.38 和 1.17, 均大于 1.15, 说明两药联合应用有相互增效的作用。

3.5 茶多酚对激发 B₉₅₋₈ 细胞 EB 病毒 VCA 表达的抑制作用: 单纯茶多酚对激发 B₉₅₋₈ 细胞 EB 病毒 VCA 表达无抑制作用。

3.6 亚硒酸钠对激发 B₉₅₋₈ 细胞 EB 病毒 VCA 表达的抑制作用: 亚硒酸钠浓度为 0.125, 0.25, 0.5 和 1.0 $\mu\text{g/mL}$ 情况下, 对激发 B₉₅₋₈ 细胞 EB 病毒 VCA 表达 3 批实验的平均抑制率分别为 1.4%, 8.7%, 21.7% 和 25.6%, 呈现轻度的抑制作用。

3.7 茶多酚与亚硒酸钠联合对激发 B₉₅₋₈ 细胞 EB 病毒 VCA 表达的抑制作用: 见表 2。从表 2 中可以看出, 茶多酚+亚硒酸钠分别为 (6.25+0.0625),

表 1 茶多酚与亚硒酸钠联合对 Raji 细胞 EB 病毒 EA 表达的抑制作用

药物浓度 ($\mu\text{g/mL}$)		抑制率 (%)			q 值
茶多酚	亚硒酸钠	茶多酚*	亚硒酸钠*	茶多酚+亚硒酸钠**	
6.25	0.0625	—	—	40.3	—
12.5	0.125	25.9	2.5	56.9	2.05
25.0	0.25	32.4	21.5	64.9	1.38
50.0	0.5	42.7	33.7	72.3	1.17
100.0	1.0	54.1	63.7	—	—

* 单纯茶多酚或亚硒酸钠的抑制率; ** 茶多酚+亚硒酸钠合并的抑制率

表 2 茶多酚与亚硒酸钠联合对激发 B₉₅₋₈细胞 EB病毒 VCA表达的抑制作用

药物浓度 (μg /mL)		抑 制 率 (%)			q值
茶多酚	亚硒酸钠	茶多酚*	亚硒酸钠*	茶多酚+ 亚硒酸钠**	
6. 25	0. 0625	—	—	2. 8	—
12. 5	0. 125	0	1. 4	18. 8	13. 4
25. 0	0. 25	0	8. 7	37. 3	4. 3
50. 0	0. 5	0	21. 7	—	—
100. 0	1. 00	0	25. 6	—	—

* 单纯含茶多酚或亚硒酸钠的抑制率; ** 茶多酚+ 亚硒酸钠合并的抑制率
(12. 5+ 0. 125)和 (25+ 0. 25) μg /mL混合物浓度下,对激发 B₉₅₋₈细胞 EB病毒 VCA表达 3批实验的平均抑制率分别为 2. 8% ,18. 8% 和 37. 3%。两药联合作用对激发 B₉₅₋₈细胞 EB病毒 VCA表达的抑制作用有所加强,但仍属轻度的抑制作用。

4 讨论

黄腾波等^[2]认为凡具有下列条件之一者:① EB病毒 VCA/IgA≥ 1∶ 80;② EB病毒 EDAb≥ 60%;③ EB病毒 VCA/IgA≥ 1∶ 5 EA/IgA≥ 1∶ 5 EDAb≥ 30% 3项中任何 2项或 3项阳性;④ EB病毒 VCA/IgA EA/IgA EDAb 3项中任何单项持续高滴度或滴度持续升高,为处于鼻咽癌的癌前状态。特别是 EA/IgA抗体阳性,发生鼻咽癌的危险性增高。因此,控制 EB病毒的感染和激活可能从根本上降低鼻咽癌的发生率。

绿茶是我国居民最喜爱的饮料。从绿茶中提取的茶多酚有许多生理学活性和药理作用^[3- 6]。硒是机体必须的微量元素。它的抗癌作用已为大多数学者所肯定^[7]。王辉云等^[12]实验证明,硒可以预防 Wistar大鼠鼻咽癌的发生。罗慧玲^[8, 9]等报告,无细胞毒性亚硒酸钠对正丁酸 巴豆油协同诱导的 Raji细胞 EBV-EA表达和 B₉₅₋₈细胞 EBV-VCA表达呈现显著的抑制作用。

本文分别用无细胞毒性作用的茶多酚、亚硒酸钠以及茶多酚与亚硒酸钠联合分别测定对 Raji细胞 EBV-EA表达和 B₉₅₋₈细胞 EBV-VCA表达的作用。单纯的茶多酚或亚硒酸钠对 EBV-EA表达呈现中度的抑制作用。而茶多酚与亚硒酸钠联合在分别降低药物浓度的情况下,仍能相互增强对 EBV-EA

表达的抑制作用。单纯茶多酚对 B₉₅₋₈细胞 EBV-VCA的表达无抑制作用。单纯亚硒酸钠对 B₉₅₋₈细胞 EBV-VCA的表达呈轻度的抑制作用。而茶多酚与亚硒酸钠联合在分别 4倍降低药物浓度下,茶多酚仍能增强亚硒酸钠对 EBV-VCA表达抑制作用。茶多酚的加入可减少亚硒酸钠的用量,降低亚硒酸钠的毒性。

黄家琛^[13]等人测定了鼻咽癌高发区四会县鼻咽癌病人与健康人血清及头发中硒的含量,发现 50例鼻咽癌病人血清硒平均含量是 (0. 084± 0. 016) μg /mL;显著低于 56例健康人 (0. 096± 0. 029) μg /mL, 54例鼻咽癌病人头发硒平均含量 (0. 443± 0. 070) μg /g,显著地低于 53例健康人 (0. 469± 0. 066) μg /g。揭示高发现场人群服用茶多酚及亚硒酸钠合剂有可能降低人群中 EBV 抗原体的滴度,从而有可能降低鼻咽癌的发病率。

参 考 文 献

1 曾毅. 中国肿瘤, 1996, 5(5): 8
2 黄腾波,等. 癌症, 1997, 16(2): 81
3 Yang C S, *et al.* National Cancer Institute, 1993, 85(13): 1035
4 唐幼英. 中草药, 1991, 22(9): 419
5 姚林,等. 肿瘤防治研究, 1995, 22(2): 123
6 刘宗潮,等. 癌症, 1996, 15(3): 164
7 孔祥瑞编. 必须微量元素的营养、生理及临床. 合肥: 安徽科学技术出版社, 1982: 296
8 罗慧玲,等. 癌症, 1986, 5(4): 341
9 罗慧玲,等. 中山医科大学学报, 1993, 14(3): 192
10 张鸿卿,等主编. 细胞生物学实验方法及技术. 北京: 北京师范大学出版社, 1992: 60
11 金正均. 中国药理学报, 1980, 1(2): 70
12 王辉云,等. 中华预防医学杂志, 1992, 26(5): 281
13 黄家琛,等. 癌症, 1986, 5(1): 17

(1999-06-14收稿)

敬告读者

本刊编辑部尚存部分过刊精装合订本,包括: 1991~ 1994年 (50元/年); 1995~ 1997年 (102元/年); 1998年 (120元); 1999年 (130元); 1996年增刊 (50元); 1997年增刊 (45元); 1998年增刊 (55元); 1999年增刊 (70元)。欢迎来函来电订购,电话: 022- 27474913