

表没食子儿茶素没食子酸酯对结肠癌皮下易位的原位荧光动物模型肿瘤生长和转移的作用

王水明, 金黑鹰, 张春霞, 孙宇, 杨志坚, 丁义江

■背景资料

绿茶是一种常见的饮料, 研究发现其主要成分茶多酚能够抑制多种肿瘤的生长, 尤其在消化系统肿瘤中的作用更为明显。茶多酚是由多种儿茶素组成, 其中表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)已证明是茶多酚中含量最高、最具有抗癌活性的成分。

王水明, 张春霞, 南京中医药大学研究生部 江苏省南京市 210068

金黑鹰, 丁义江, 全国肛肠医疗中心 南京中医药大学第三附属医院 江苏省南京市 210001

孙宇, 杨志坚, 南京源端生物科技公司 江苏省南京市 210003

国家自然科学基金资助项目, No. 30572447; No. 30973837

江苏省自然科学基金资助项目, No. BK2007009

作者贡献分布: 此课题由王水明, 金黑鹰, 张春霞, 孙宇, 杨志坚及丁义江设计; 研究过程由王水明, 金黑鹰, 孙宇及张春霞操作完成; 研究所用试剂及分析工具由孙宇提供; 数据分析由王水明, 金黑鹰及孙宇完成; 本论文写作由王水明与金黑鹰完成。

通讯作者: 金黑鹰, 210001, 江苏省南京市, 全国肛肠医疗中心, 南京中医药大学第三附属医院, jinheiyang@yahoo.com.cn

收稿日期: 2010-06-15 修回日期: 2010-08-10

接受日期: 2010-08-17 在线出版日期: 2010-10-08

Epigallocatechin-3-gallate suppresses subcutaneous tumor growth in an orthotopic transplantation mouse model of colorectal cancer derived from cells expressing enhanced green fluorescent protein

Shui-Ming Wang, Hei-Ying Jin, Chun-Xia Zhang, Yu Sun, Zhi-Jian Yang, Yi-Jiang Ding

Shui-Ming Wang, Chun-Xia Zhang, Graduate School, Nanjing University of Tradition Chinese Medicine, Nanjing 210068, Jiangsu Province, China

Hei-Ying Jin, Yi-Jiang Ding, National Medical Center for Colorectal Care, the Third Affiliated Hospital of Nanjing University of Tradition Chinese Medicine, Nanjing 210001, Jiangsu Province, China

Yu Sun, Zhi-Jian Yang, Nanjing Origin Biosciences Inc., Nanjing 210003, Jiangsu Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, Nos. 30572447 and 30973837; and the Natural Science Foundation of Jiangsu Province, No. BK2007009

Correspondence to: Hei-Ying Jin, National Medical Center for Colorectal Care, the Third Affiliated Hospital of Nanjing University of Tradition Chinese Medicine, Nanjing 210001, Jiangsu Province, China. jinheiyang@yahoo.com.cn

Received: 2010-06-15 Revised: 2010-08-10

Accepted: 2010-08-17 Published online: 2010-10-08

Abstract

AIM: To investigate the anticancer effect of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) in an orthotopic transplantation mouse model of colorectal cancer

derived from cells expressing enhanced green fluorescent protein (eGFP).

METHODS: The human colon cancer cell line HT-29 expressing eGFP was used to establish a subcutaneous tumor model of colorectal cancer in nude mice. Four weeks later, the subcutaneous tumors were subjected to orthotopic transplantation to establish an orthotopic transplantation mouse model of colorectal cancer. A total of 39 model mice were obtained and divided into four groups: a control group receiving saline and three treatment groups receiving different doses of EGCG (5, 10 and 20 mg/kg, respectively) for 14 d. Tumor metastasis was then observed and tumor volume was calculated using a fluorescence imaging system.

RESULTS: At 7, 14, 26 and 35 d after treatment with different doses of EGCG, tumor growth velocity was significantly lower in all the treatment groups than in the control group. Tumor volume was significantly smaller in the EGCG (20 mg/kg) treatment group than in the control group ($106.7 \text{ mm}^3 \pm 155.5 \text{ mm}^3$ vs $393.3 \text{ mm}^3 \pm 361.1 \text{ mm}^3$, $P < 0.05$). There were no significant differences in tumor volume among the three treatment groups.

CONCLUSION: EGCG can significantly inhibit tumor growth in an orthotopic transplantation mouse model of colorectal cancer in a time-dependent manner.

Key Words: Tea extract; Epigallocatechin-3-gallate; Colorectal cancer; *In vivo*; Orthotopic transplantation model

Wang SM, Jin HY, Zhang CX, Sun Y, Yang ZJ, Ding YJ. Epigallocatechin-3-gallate suppresses subcutaneous tumor growth in an orthotopic transplantation mouse model of colorectal cancer derived from cells expressing enhanced green fluorescent protein. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(28): 3016-3019

摘要

目的: 研究表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)

■同行评议者

王学美, 研究员, 北京大学第一医院中西医结合研究室

在结肠癌皮下易位的原位荧光动物模型中, 对结直肠癌的生长、转移的作用。

方法: 采用人结肠癌HT-29建立裸鼠的皮下瘤模型, 4 wk后进行皮下瘤原位移植, 建立结肠皮下易位的结肠癌荧光原位移植模型。39只荷瘤裸鼠分为生理盐水对照组和5、10、20 mg/kg EGCG组。EGCG灌胃治疗14 wk后, 在荧光影像系统下观察原发肿瘤以及有无转移情况, 并计算肿瘤的体积。

结果: 使用5、10和20 mg/kg 3个剂量EGCG治疗后, 在第7、14、26和35天, 治疗组肿瘤生长速度明显低于对照组肿瘤生长速度, 20 mg/kg EGCG组治疗第26天肿瘤体积明显小于对照组, 差异具有统计学意义($106.7 \text{ mm}^3 \pm 155.5 \text{ mm}^3$ vs $393.3 \text{ mm}^3 \pm 361.1 \text{ mm}^3$, $P < 0.05$); 3个治疗组之间比较, 差异无统计学意义。

结论: EGCG对结肠癌皮下原位荧光动物模型肿瘤生长有明显的抑制作用, 其作用效果与作用时间成正相关。

关键词: 茶提取物; 表没食子儿茶素没食子酸酯; 结直肠癌; 在体研究; 原位移植模型

王水明, 金黑鹰, 张春霞, 孙宇, 杨志坚, 丁义江. 表没食子儿茶素没食子酸酯对结肠癌皮下易位的原位荧光动物模型肿瘤生长和转移的作用. 世界华人消化杂志 2010; 18(28): 3016-3019
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/3016.asp>

0 引言

体外和在体研究表明绿茶提取物茶多酚可以抑制结直肠癌的生长, 一些研究表明表没食子儿茶素没食子酸酯(epigallocatechin-3-gallate, EGCG)是绿茶提取物茶多酚中含量最高、最具有抗癌活性成分^[1,2]。但是目前许多结论均为体外研究的结果, 在体研究中EGCG是否仍可以表现出类似的抗癌活性呢? 本实验利用结肠皮下易位的结肠癌原位移植模型, 观察EGCG对于该模型肿瘤生长的作用, 为进一步应用研究提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料 人结肠癌HT-29, 购自美国美国组织细胞库(American Type Culture Collection, ATCC)。该细胞在1640培养液中37℃、50 mL/L CO₂饱和湿度条件下培养。39只 BALB/c裸鼠, 周龄4-6 wk, 雌雄各半, 所有裸鼠在SPF级屏障系统中饲养和实验(实验室使用许可证编号: SYXK

(苏)2007-0011)。裸鼠饲养用饲料为钴60辐射灭菌过的大小鼠专用颗粒饲料(江苏省协同医药生物工程有限公司)。EGCG购自上海晶纯试剂有限公司, 纯度为99%, 以无菌注射用水配成50 g/L的溶液, 灭菌后备用。

1.2 方法

1.2.1 人结肠癌细胞系的荧光蛋白逆转录病毒转染: 绿色荧光蛋白逆转录病毒转染载体PT67-pLPCX-EGFP, 由南京源端生物科技公司构建。培养绿色荧光蛋白逆转录病毒转染载体PT67-pLPCX-EGFP包装细胞。收集包装细胞培养上清, 将上清分别加入培养的人结肠癌HT-29细胞中, 37℃、50 mL/L CO₂条件下, 转染24-72 h。用不同浓度的新霉素(G418)和克隆挑选技术筛选绿色荧光蛋白阳性细胞。

1.2.2 结肠癌细胞皮下种植: 荧光蛋白标记人结肠癌细胞株(HT-29-GFP)在1640培养液中37℃、50 mL/L CO₂饱和湿度条件下培养。取 5×10^6 细胞接种于3只裸鼠皮下, 饲养4 wk, 建立皮下瘤模型。

1.2.3 肿瘤组织的原位移植: 取皮下种植生长的结肠癌肿瘤, 在培养液中分割成1 mm×1 mm的组织碎块。选BALB/C nu/nu裸鼠48只, 氯胺酮(0.17 mg/L)裸鼠腹腔注射麻醉, 左腹部碘酊消毒, 将皮肤及腹膜剪一小口, 将裸鼠盲肠提出腹膜外约1 cm, 缝合盲肠与腹膜间隙, 将盲肠转移至皮下; 切开盲肠浆膜, 以8-0缝线2块直径约为1 mm的携带荧光的肿瘤移植在盲肠处, 关闭皮肤。

1.2.4 分组及用药: 完成原位移植后对小鼠的健康状况和肿瘤的生长情况进行监测, 48只接种肿瘤的裸鼠中有39只长出肿瘤。手术后第18天, 各组平均肿瘤体积达到12 mm³时, 根据动物的平均肿瘤体积大小将39只荷瘤鼠随机分成4组, 分为对照组和5、10、20 mg/kg EGCG的治疗组。治疗组予相应剂量的EGCG灌胃, 对照组每天1次给予100 μL生理盐水灌胃, 连续用药14 d, 在荧光影像系统下观察原发肿瘤以及有无转移情况。

统计学处理 采用SPSS11.0统计软件进行统计分析, 计数资料使用卡方检验或秩和检验, *t*-test进行计量资料检验, 以方差分析比较各治疗组间的肿瘤生长差异。分别于用药前和用药后1、2、3、4、5和6 wk末测量在体肿瘤大小, 计算肿瘤体积。肿瘤体积(*V*) = 肿瘤长径(*L*)×肿瘤短径(*S*)²/2。

2 结果

2.1 EGCG对结肠癌皮下原位荧光动物模型肿瘤

■ 相关报道

Yang等对EGCG的抗肿瘤及其他生物活性作用进行了许多论述, 对多种抗肿瘤机制进行探讨, 拓宽了EGCG的研究领域, 并促进了这一领域更进一步的研究。

■ 创新盘点

本研究设计了结肠皮下易位的结肠癌荧光原位移植模型, 观察肿瘤的生长, 造模成功率高、死亡率低。研究发现EGCG可以抑制结直肠癌肿瘤的生长, 而且其作用呈时间依赖性。

■应用要点

本研究设计的结肠皮下易位的结肠癌荧光原位移植模型是一个独立创新的模型,具有制作容易、便于观察、可以反复取材、可行性高等优点,是结肠癌原位移植模型的重要进步。本实验的结果为EGCG抗肿瘤的在体研究提供了理论依据。

表 1 治疗期间各组肿瘤的平均体积 (mean \pm SD, mm³)

分组	第1天	第14天	第26天
对照组	12.6 \pm 6.3	88.1 \pm 61.0	393.3 \pm 361.1
EGCG组			
5 mg/kg组	12.3 \pm 7.5	30.0 \pm 24.0 ^a	131.6 \pm 148.6 ^a
10 mg/kg组	12.8 \pm 11.7	49.5 \pm 37.6	108.5 \pm 82.5 ^a
20 mg/kg组	12.4 \pm 8.3	25.1 \pm 24.2 ^b	106.7 \pm 155.5 ^a

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 对照组。

表 2 EGCG对肿瘤转移的影响 (n)

分组	荷瘤鼠总数	转移荷瘤鼠数量	肠系膜淋巴结	腰淋巴结	腹膜
对照组	10	6	3	2	4
EGCG组					
5 mg/kg组	10	5	5	2	1
10 mg/kg组	9	6	3	4	2
20 mg/kg组	10	5	5	1	2

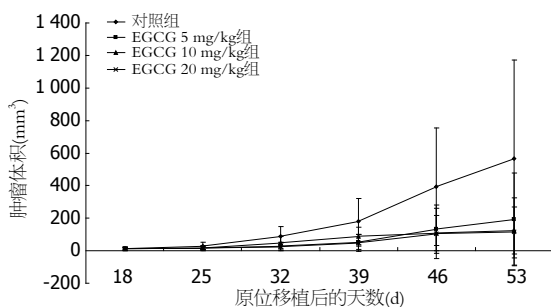


图 1 治疗期间各组肿瘤的平均体积变化。

生长的作用 在原位移植模型建立后的第18天开始给予药物治疗,测量原发肿瘤的生长曲线,结果显示:应用5、10和20 mg/kg EGCG的3个治疗组,第7天肿瘤就有缩小;在第14天,5和20 mg/kg EGCG组与对照组即有统计学差异($P < 0.05$);在第26天时应用EGCG的3个治疗组均与对照组有统计学差异($P < 0.05$);第35天后,3个治疗组荷瘤鼠原发肿瘤平均肿瘤体积较对照组明显减少,且统计学分析有显著性差异。以方差分析进行3个治疗组之间的原发肿瘤体积比较,差异无统计学意义($P > 0.05$,表1,图1)。

2.2 EGCG对肿瘤转移的影响 实验结束时对照组有6只小鼠发生转移,转移率为60%,淋巴结转移率为50%。5 mg/kg EGCG治疗组有5只发生转移,转移率为50%,淋巴结转移率为50%。10 mg/kg EGCG治疗组有6只发生转移,转移率为60%,淋巴结转移率为50%。20 mg/kg EGCG治疗组有

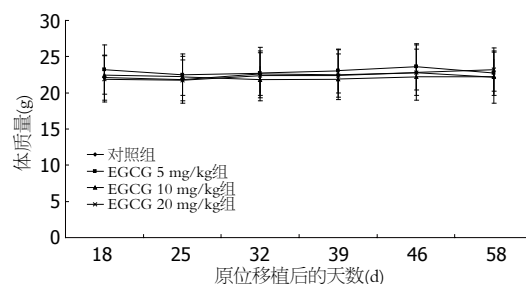


图 2 EGCG治疗组体质量变化曲线。

5只发生转移,转移率为50%,淋巴结转移率为50%。应用卡方检验各组之间的转移率,各组之间的差异无显著意义。肿瘤转移以临近淋巴结为主,并向远端淋巴、组织和器官转移(表2)。

2.3 药物EGCG安全性和不良反应 在给予EGCG开始治疗后的2 wk内,通过监测整个实验过程中荷瘤鼠的体质量和身体状况,显示各组裸鼠体质量变化不明显,提示3个剂量的EGCG治疗组皆没有明显的不良反应(图2)。

3 讨论

对于茶及其有效成分是否具有抗癌的效果一直存在争议,Yuan等^[3]对上海饮茶人群的流行病学研究表明饮茶可以降低结直肠癌的发生率,Il'yasova等^[4]对美国黑人和白人喝茶和结直肠癌之间的关系研究发现,饮茶并不能防止结直肠癌的发生。但是体外研究和一些在体研究证实茶多酚可能是一种有效的抑制结直肠癌的成分^[5,6]。我

们在前期的研究中发现, 绿茶提取物茶多酚可以抑制结直肠癌的肿瘤细胞株的增殖^[7], 而且在对结肠造口结肠癌原位移植模型的处理中发现茶多酚的水溶液可以抑制结直肠癌的增长^[8]. 茶多酚是由几种成分组成的复合物, 目前研究表明EGCG是最具有抗癌活性的成分^[9,10], 我们利用结肠易位结肠癌原位移植模型进行EGCG的在体研究, 以进一步了解EGCG的抗癌活性.

在前期研究中, 本组建立了结肠造口的结肠癌原位移植模型, 尽管该模型在肿瘤观察和取样上有诸多优势, 但是该模型建立时死亡率比较高, 而且肿瘤在体外, 可能会受到周围环境的影响^[11]. 本研究中我们设计了结肠皮下易位的结肠癌原位移植模型, 该模型将结肠易位于皮下而且在肿瘤细胞中带有绿色荧光, 可以实时观察肿瘤的生长, 而且容易建立, 死亡率低, 并且在早期可以观察到肿瘤的生长从而尽早进行治疗, 提高其治疗的效果. 建立的48只模型中, 有39只成功的建成了肿瘤模型, 成瘤率达到81.25%. 说明该模型具有制作容易、便于观察、可以反复取材、可行性高等优点. 结肠皮下易位的结肠癌荧光原位移植模型是一个独立创新的模型, 是结肠癌原位移植模型的重要进步^[12].

本组研究中, 与对照组相比, 3个不同剂量的EGCG均可以使肿瘤缩小, 随着用药时间的延长, EGCG抑制肿瘤的能力会增加, 特别在治疗后35 wk肿瘤缩小明显, 说明EGCG可以抑制结直肠癌的肿瘤的生长而且其作用呈时间依赖性, 随着用药时间的延长, 其疗效会更明显. 但是本研究在研究不同剂量对动物处理效果的研究中发现, 在5、10、20 mg/kg 3个治疗组中, EGCG作用之间的差异无统计学意义. 但是由于本组研究中3组剂量均比较小, 与文献报道EGCG的LD₅₀可以达2 170 mg/kg^[13]不同, 如果提高剂量之间差异可能会出现剂量与效果之间的关系.

本研究观察了肿瘤转移的情况, 发现对照组和治疗组的肿瘤转移率差异无显著意义. 各组转移的部位集中在肠系膜淋巴结、腰淋巴结、腹膜、下腹腔、睾丸、前列腺, 没有发现肝脏、肺、脑等组织器官的转移. 李鹏等^[14]使用正常小鼠结肠癌肝转移组织建立的裸鼠的原位移植癌模型, 可以增加结肠癌的侵袭性, 可以在接下来的研究中进一步的探讨. 可能是由于本组研究中, 在停药后仍然观察超过4 wk以上, 可能在药物效果逐渐降低后肿瘤出现了转移. 但是按照定期给药是否可以降低转移率仍然是一

个需要探索的课题.

总之, 通过本研究发现结肠皮下易位结肠癌原位移植模型是一个理想的肿瘤模型, 使用EGCG干预该结肠癌模型发现EGCG可以明显抑制结直肠癌的增长, 其效果与作用时间成正相关; 但是使用不同的剂量其抑制肿瘤的效果差异无显著意义, 可能与使用剂量差别不大有关, 因而难以发现其差异, 这需要进行剂量梯度研究, 探索其剂量与效果之间的关系.

4 参考文献

- 1 Yang CS, Lambert JD, Sang S. Antioxidative and anti-carcinogenic activities of tea polyphenols. *Arch Toxicol* 2009; 83: 11-21
- 2 Cheynier V. Polyphenols in foods are more complex than often thought. *Am J Clin Nutr* 2005; 81: 223S-229S
- 3 Yuan JM, Gao YT, Yang CS, Yu MC. Urinary biomarkers of tea polyphenols and risk of colorectal cancer in the Shanghai Cohort Study. *Int J Cancer* 2007; 120: 1344-1350
- 4 Il'yasova D, Martin C, Sandler RS. Tea intake and risk of colon cancer in African-Americans and whites: North Carolina colon cancer study. *Cancer Causes Control* 2003; 14: 767-772
- 5 Ju J, Lu G, Lambert JD, Yang CS. Inhibition of carcinogenesis by tea constituents. *Semin Cancer Biol* 2007; 17: 395-402
- 6 Ju J, Hong J, Zhou JN, Pan Z, Bose M, Liao J, Yang GY, Liu YY, Hou Z, Lin Y, Ma J, Shih WJ, Carothers AM, Yang CS. Inhibition of intestinal tumorigenesis in Apcmin/+ mice by (-)-epigallocatechin-3-gallate, the major catechin in green tea. *Cancer Res* 2005; 65: 10623-10631
- 7 刘秀芳, 金黑鹰, 丁义江, 陆茵, 李璘, 丁曙晴, 刘飞, 倪敏, 王静. 抗突变中药对错配修复基因缺失结直肠癌细胞的抑制作用. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 2201-2204
- 8 Dai GJ, Jin HY, Ding YJ, Xia JG, Liu XF, Liu F, Tan XZ, Geng JX. [Anticancer effects of tea polyphenols on colorectal cancer with microsatellite instability in nude mice] *Zhongxiyi Jiehe Xuebao* 2008; 6: 1263-1266
- 9 崔云甫, 石林, 秦虹, 刘适. 茶多酚没食子儿茶素没食子酸酯抗肿瘤机制研究进展. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 229-235
- 10 Lambert JD, Kwon SJ, Ju J, Bose M, Lee MJ, Hong J, Hao X, Yang CS. Effect of genistein on the bioavailability and intestinal cancer chemopreventive activity of (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Carcinogenesis* 2008; 29: 2019-2024
- 11 Jin H, Liu X, Li VK, Ding Y, Yun S, Liu F, Zhou S, Song Y, Ni M. A simple colostomy implantation model for evaluating colon cancer. *Int J Colorectal Dis* 2009; 24: 41-47
- 12 金黑鹰, 王建东, 张魁寅, 孙宇, 杨志坚, 丁义江. 结肠皮下易位结肠癌荧光原位移植模型的建立. *中华胃肠外科杂志* 2010; 13: 448-449
- 13 Verschoye RD, Steward WP, Gescher AJ. Putative cancer chemopreventive agents of dietary origin-how safe are they? *Nutr Cancer* 2007; 59: 152-162
- 14 李鹏, 吴爱国. 裸小鼠人侵袭性结肠癌模型的建立. *现代肿瘤医学* 2007; 15: 611-613

■同行评价

本文创新性较好, 有一定的临床研究意义.