

虫茶对癌细胞生长和肿瘤转移抑制作用的研究

冯霞¹, 罗敏², 赵欣¹

(1. 重庆第二师范学院生物与化学工程系, 重庆 400067) (2. 重庆第二师范学院图书馆, 重庆 400067)

摘要: 本研究对市售的虫茶进行 TCA8113 人舌鳞癌细胞体外抗癌效果和体内抗转移效果评价。通过 MTT 试验、DAPI 荧光染色分析和 RT-PCR 分析说明其体外抗癌效果, 并通过建立动物模型分析其体内抗肿瘤转移效果。通过用 50 $\mu\text{g/mL}$ 、100 $\mu\text{g/mL}$ 和 200 $\mu\text{g/mL}$ 三种不同浓度的虫茶对 TCA8113 人舌鳞癌细胞体外增殖的抑制效果的研究表明, 200 $\mu\text{g/mL}$ 浓度的虫茶(81%)表现出对该癌细胞有最强的生长抑制效果。通过用以上三种不同浓度的虫茶对该癌细胞的 mRNA 表达影响的研究表明, 200 $\mu\text{g/mL}$ 浓度的虫茶比 100 $\mu\text{g/mL}$ 和 50 $\mu\text{g/mL}$ 虫茶具有更强的细胞诱导凋亡效果, 而且随着虫茶浓度增加, Bax、caspase-3 和 caspase-9 的 mRNA 表达增强, 而 Bcl-2 表达减弱。通过 BALB/c 小鼠肿瘤转移的研究表明, 虫茶也能抑制由 26-M3.1 结肠癌细胞诱导的肿瘤转移。对虫茶进行了体外抗癌效能和动物体内抗肿瘤转移的比较实验, 虫茶是一种具有抗癌效果的功能性食品。

关键词: 功效; 小鼠; 抑制率

文章编号: 1673-9078(2013)8-1898-1901

Inbibitional Effect of Sandy Tea on the Carcinoma Cells Growth and Tumor Metastasis

FENG Xia¹, LUO Min², ZHAO Xin¹

(1. Department of Biological and Chemical Engineering, Chongqing University of Education, Chongqing 400067, China)

(2. Library of Chongqing University of Education, Chongqing 400067, China)

Abstract: In this study, a sandy tea product was purchased for the evaluation of in vitro anticancer effect on TCA8113 human tongue squamous carcinoma cells and in vivo anti-metastatic effect. By using MTT assay, apoptosis analysis by DAPI staining and RT-PCR assay, and western blot assay were employed to check the in vitro anticancer effect and in vivo anti-metastatic effect of Sandy tea at different concentration (50, 100 and 200 $\mu\text{g/mL}$) using animal models. Results showed that 200 $\mu\text{g/mL}$ of sandy tea (81%) had the best inhibitory effect and apoptosis-inducing activity on TCA8113 human tongue squamous carcinoma cells compared to those samples at other concentrations. With increasing the tea concentrations, mRNA expressions of Bax, caspase-3 and caspase-9 was up-regulated, but Bcl-2 expression was down-regulated. BALB/c tumor anti-metastasis test showed that sandy tea inhibited in vivo tumor metastasis induced by colon 26-M3.1 cells in BALB/c mice. These results suggest that sandy tea had potential as an anticancer functional food.

Key words: functions; mice; inhibition rate

虫茶是一种产于我国的区别于普通茶叶范畴, 但却以保健茶或者药用茶形式饮用的以昆虫食用叶片排泄的虫粪粒制成的特殊茶饮料^[1]。用来生产虫茶的昆虫已发现的有夜蛾科弓须亥夜蛾 *Hydrillodes morosa* Butler. (化香夜蛾、黄纹淡黑夜蛾); 雪疽夜蛾 *Nodaria niphona* Butler.; 螟蛾科米缟螟 *Aglossa dimidiata* Haworth. (米黑虫; 黄条谷螟 *Herculia glaucinalis* L. (谷粗喙螟) 以及白条谷螟 (*Fujimacia bicoloralis* Leech.)), 这些昆虫的幼虫取食苦藤茶、虫茶、化香树、

收稿日期: 2013-05-15

作者简介: 冯霞 (1976-), 女, 讲师, 研究方向: 功能性食品的保健效果

通讯作者: 赵欣 (1981-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 功能性食品的保健效果

大百解、三叶海棠等植物的叶片后, 排泄的虫粪颗粒, 收集后经过一系列加工的产品即为虫茶产品^[2]。其中贵州产虫茶除了遍销全国现在还远销东南亚, 贵州产虫茶主要是米缟螟弓须亥夜蛾等昆虫幼虫啃食樟科润楠属的川黔润楠 (*Machilus chuanchienensis* S. Lee.) 腐熟幼嫩叶片后经由昆虫体内特殊代谢排出粪粒晒干制成^[3]。

关于虫茶保健功效的研究越来越受到关注。目前对于虫茶的保健功效已经有一定的认识。虫茶作为传统饮品和中药, 具有清热、去暑、解毒、健胃、助消化等功效, 对腹泻、鼻衄、牙龈出血和痔出血均有较好疗效, 是一种很好的医药保健饮料^[4]。有些虫茶对治疗肠风下血、产后下痢、口疮耳肿、齿龈风毒等有

一定的效果,有些虫茶还具有护肝、降压降脂、润肤等功效。虫茶中含有K、Mg、Ca、Na、Fe、Mn、Zn等共17种矿物质元素,其中约有10种元素为人体必需微量元素,且Fe、Zn、Ca、Mg等元素含量较高,优于一些名优茶^[5]。此外,不同虫茶中还富含粗蛋白、粗纤维、脂肪、茶多酚、咖啡碱、糖分、维生素和氨基酸^[6~7]。为了验证虫茶的抗癌效果,本研究初步验证虫茶对TCA8113人舌鳞癌细胞体外抗癌功能性作用和利用小鼠动物模型进行虫茶的抗肿瘤转移的研究。

1 材料与方法

1.1 样品

虫茶:市售原产贵州虫茶,进行冷冻干燥后用沸水3次提取后蒸干,将蒸干后的水提物用DMSO(二甲基亚砜)全部溶解后冷藏保存待用。

1.2 癌细胞株

TCA8113人舌鳞癌细胞(TCA8113 Human Tongue Squamous Carcinoma Cells)购自中国科学院生物化学与细胞生物学研究所。26-M3.1结肠癌细胞(26-M3.1 colon carcinoma cells)由韩国釜山大学食品营养学科提供。

1.3 试剂

DMSO,日本纯正化学株式会社,日本;D-Biotin、NADP(sodium salt)、L-histidine·HCl(monohydrate)、D-glucose-6-phosphate(mono sodium salt)、4,6-diamidino-2-phenylindole和Paraformaldehyde、ethidium bromide, Sigma公司,美国;EMEM培养液、RPMI 1640、0.05% trypsin-0.02% EDTA、Fetal bovine serum (FBS)和100 unit/mL Penicillin-Streptomycin, GIBCO公司,美国。Trizol reagent, Invitrogen公司,美国,蛋白检测试剂盒, Bio-Rad公司美国,western抗体, Santa Cruz公司,美国。

1.4 仪器与设备

HB-205SW 恒温水浴震荡器, Hanbeak 科学株式会社,韩国;R-114 旋转蒸发器, Buchi 公司,瑞士;VS-15CFN 冷冻离心机, Vision 科学株式会社,韩国;HB-402V 超净工作台, Hanbeak 科学株式会社,韩国;MC096 二氧化碳培养箱, 三洋电机株式会社,日本;PM-10AK 倒置显微镜, 奥林巴斯株式会社,日本;Elx800 酶标仪, Bio Tek instruments 公司,美国;BXS0

荧光显微镜, 奥林巴斯株式会社, 日本。

1.5 实验动物

BALB/c 小鼠购于重庆医科大学实验动物中心,分为对照和样品组,每组10只。各组小鼠在温度为 23 ± 1 °C,相对湿度 $50\pm 5\%$ 环境下饲养,小鼠自由摄取饮水和小鼠标准饮食。

1.6 方法

1.6.1 癌细胞体外增殖抑制试验(MTT法)

在10%灭活小牛血清的RPMI 1640培养液中接种复苏后的TCA8113人舌鳞癌细胞,癌细胞在5%CO₂、37 °C条件下的培养箱中培养,2~3 d更换一次培养基,一周进行传代一次。将培养好的癌细胞按浓度 1×10^4 个/mL每孔接种于96孔培养板,每孔接入细胞悬浊液180 μL。接种后的细胞在5% CO₂、37 °C条件下培养24 h。样品设三个浓度量组,细胞贴壁后按每孔20 μL加入不同浓度的样品,使96孔板内不同孔内浓度分别为50 μg/mL、100 μg/mL和200 μg/mL。经过48 h培养后,吸出孔内上清液,每孔加入质量浓度为5 mg/mL的MTT试剂200 μL后继续培养4 h,然后再次吸出孔内上清液后,按每孔200 μL加入DMSO后充分震荡30 min,用酶标仪在540 nm波长下测定各孔OD值,按公式:抑制率(%)=[(空白孔OD值-样品孔OD值)/空白孔OD值]×100%计算细胞增殖抑制率^[8]。

1.6.2 反转录-聚合酶链反应法(RT-PCR)检测

表1 RT-PCR实验引物列表

Table 1 Primers of RT-PCR experiment	
基因	引物序列 Sequence
Bax	同义: 5'-AAGCTGAGCGAGTGTCTCCGGCG-3'
	反义: 5'-CAGATGCCGGTTCAGGTACTCAGTC-3'
Bcl-2	同义: 5'-CTCGTCGCTACCGTCGTGACTTGG-3'
	反义: 5'-CAGATGCCGGTTCAGGTACTCAGTC-3'
Caspase-3	同义: 5'-CAAACCTTTTTCAGAGGGGATCG-3'
	反义: 5'-GCATACTGTTTCAGCATGGCA-3'
Caspase-9	同义: 5'-GGCCCTTCTCGCTTCATCTC-3'
	反义: 5'-GGTCCTTGGGCCTTCTGGTAT-3'
GAPDH	同义: 5'-CGGAGTCAACGGATTGGTC-3'
	反义: 5'-AGCCTTCTCCATGGTCGTGA-3'

各组癌细胞在同等条件下,用RNAzol试剂制备癌细胞的总RNA。定量分离到RNA后,用oligo dT在AMV逆转录酶作用下制备ss cDNA,然后以该cDNA为模板,反转录-聚合酶链反应法扩增Bax, Bcl-2, caspase-3,9基因引物(表1)。持家基因lyceraldehyde-3-phosphatedehydrogenase(GAPDH)作为

对照内参照。以上程序结束后,以含浓度溴化乙锭的1%琼脂电泳检查PCR扩增产物^[9]。

1.6.3 BALB/c 小鼠肿瘤转移实验

将26-M3.1结肠癌细胞接种于EMEM培养液中,在5% CO₂、37℃充分湿化条件下的培养箱中培养。按2.5×10⁴/每只细胞量对6周龄雌性BALB/c小鼠实施尾部静脉注射,在随后两周内按400、800和1600 mg/kg浓度虫茶水提物对BALB/c小鼠每天实施灌胃一次。两周后进行解剖将小鼠肺部用Bouin's solution固定24 h,随后对肺部转移的肿瘤个数进行测算。抑制率(%)=[(空白组转移肿瘤个数-样品组转移肿瘤个数)/空白组转移肿瘤个数]×100%^[10]。

1.7 数据统计

使用SAS统计软件对所得数据采用one-way ANOVA法分析数据结果是否存在差异性(p<0.05)。

2 结果与讨论

2.1 虫茶对TCA8113人舌鳞癌细胞体外增殖的抑制效果

采用MTT法对虫茶的TCA8113细胞体外增殖抑制效果进行研究。用200 μg/mL浓度虫茶水提物溶液处理贴壁TCA8113细胞时,虫茶表现出很强的抑制率,抑制率达到83%。以100 μg/mL和50 μg/mL浓度虫茶水提物溶液处理TCA8113细胞时,癌细胞生长增殖抑制率分别达到60%和23% (表2)。可以看出,虫茶水提物对TCA8113人舌鳞癌细胞具有生长增殖抑制效果,并且作用浓度越高生长抑制效果越明显。

表2 MTT法测定虫茶对TCA8113人舌鳞癌细胞的生长抑制效果

Table 2 Inhibition effect of sandy tea on growth of TCA8113 human tongue squamous carcinoma cells evaluated by MTT assay

组别	OD540 值	抑制率/%
对照	0.507±0.007 ^{a1)}	/
虫茶/ (μg/mL)		
50	0.390±0.006 ^b	23.08
100	0.203±0.009 ^c	59.96
200	0.086±0.007 ^d	83.04

注: 1)均值±标准偏差; a-d 不同字母表示差各组数据平均显著性差异(p<0.05)。

2.2 虫茶对TCA8113人舌鳞癌细胞的Bax和Bcl-2基因的mRNA表达影响

在适宜的病理或生理环境中,细胞在基因调控下主动死亡的过程即为细胞凋亡。凋亡基因发生突变和表达异常的情况下能切断癌细胞的凋亡,出现这种情况的时候癌症便开始发生^[11]。Bcl-2基因是一种抑制细胞凋亡的基因,Bax是一种促进细胞凋亡的基因。它们可以共同作用产生二聚体。当Bax基因的量大于Bcl-2基因的时候,Bax基因和二聚体的量增加,此过程发生能促进癌细胞凋亡^[12]。

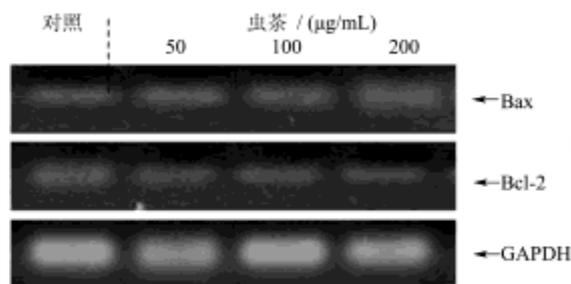


图1 经虫茶处理后TCA8113人舌鳞癌细胞的Bax和Bcl-2的mRNA表达

Fig.1 Effects of sandy tea on the mRNA expression of Bax and Bcl-2 in TCA8113 human tongue squamous carcinoma cells

虫茶水提取物以不同浓度对TCA8113人舌鳞癌细胞进行处理。在200 μg/mL浓度下,经过虫茶水提物处理的TCA8113人舌鳞癌细胞的Bax因子表达最强,在100和50 μg/mL浓度处理下的TCA8113人舌鳞癌细胞中的Bax表达随着浓度的降低表达强度也随之降低;经不同质量浓度虫茶水提物处理后,Bcl-2因子的mRNA表达随着虫茶浓度的升高表达反而减弱(图1)。通过实验检测结果分析表明增加作用于癌细胞的虫茶水提物浓度,癌细胞的Bax基因表达得到加强,Bcl-2基因的表达开始减弱,此机制可认定为虫茶促进了癌细胞凋亡的过程,从而起到了抗癌效果。

2.3 虫茶对TCA8113人舌鳞癌细胞的caspase-3和caspase-9基因的mRNA表达影响

Caspase基因可以选择性的对一些蛋白质进行切割,造成癌细胞的凋亡状况,caspase-9基因是凋亡过程中的上游半胱天冬酶,caspase-3是下游半胱天冬酶,caspase-9作为启动性半胱天冬酶,caspase-9基因表达的加强能加强对下游caspase-3的刺激,caspase-3可以直接降解胞内的结构和功能蛋白,引发癌细胞凋亡的发生^[13]。

虫茶水提取物对TCA8113人舌鳞癌细胞处理后观察癌细胞的凋亡因子caspase-3和caspase-9的表达得到与Bax因子表达相似的结果,随着处理细胞样品浓度的增加caspase-3和caspase-9也随之增加,200

μg/mL 浓度处理时, 表达最强(图 2)。由此可以看出, 经过 200 μg/mL 浓度虫茶水提物处理的 TCA8113 人舌鳞癌细胞表现出最强的细胞凋亡作用。通过实验检测结果分析表明虫茶对癌细胞的半胱天冬酶基因作用效果能促进癌细胞的凋亡。

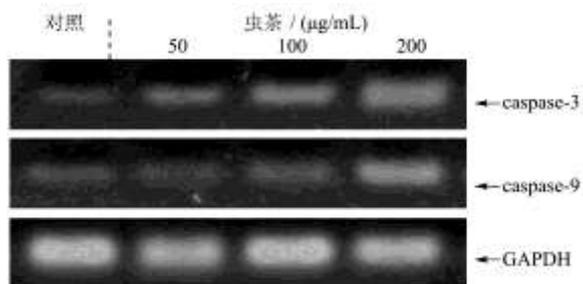


图 2 经虫茶处理后 TCA8113 人舌鳞癌细胞的 caspase-3 和 caspase-9 的 mRNA 表达

Fig.2 Effects of sandy tea on the mRNA expression of caspase-3 and caspase-9 in TCA8113 human tongue squamous carcinoma cells

2.4 虫茶对小鼠的肿瘤转移抑制效果

在临床治疗中多数肿瘤治疗失败的原因是因为转移, 因此抑制肿瘤转移是治疗癌症的重要手段。肿瘤转移是指恶性肿瘤细胞离开原发部位, 通过血液、淋巴运转或直接播散到不连续的组织器官中继续生长, 形成与原发肿瘤病理类型相同的肿瘤^[14]。

表 3 虫茶对 26-M3.1 结肠癌细胞诱导产生的 Balb/c 小鼠肿瘤转移的抑制效果

Table 3 Inhibitory effect of sandy tea on the metastasis of tumors produced by colon 26-M3.1 cells in Balb/c mice

组别	肿瘤转移个数	抑制率/%
对照	57±61 a	/
虫茶	400 mg/kg	54±4 a 5.26
	800 mg/kg	48±6 b 15.79
	1600 mg/kg	40±5 c 29.82

注: 1) 均值±标准偏差; a-c 不同字母表示差各组数据平均值显著性差异 (p<0.05)。

通过对 BALB/c 小鼠建立肿瘤转移动物模型, 观察虫茶对小鼠肿瘤转移的抑制效果可以更有效的验证虫茶的抗癌效果。26-M3.1 结肠癌细胞诱导转移后, 小鼠均发生肿瘤肺转移, 对照组小鼠肺部形成 57±6 个转移肿瘤, 虫茶样品组小鼠按 400、800 和 1600 mg/kg 灌胃两周, 小鼠肺部分别形成 54±4、48±6 和 40±5 个转移肿瘤, 浓度由低到高对肿瘤转移的抑制率分别为 5.3、15.8 和 29.8% (表 3)。可以看出虫茶可以明显的抑制肿瘤转移的发生。

3 结论

采用 MTT 法用不同浓度虫茶水提物对 TCA8113 人舌鳞癌细胞进行处理以研究虫茶的体外抗癌效果, 发现虫茶水提物的浓度与抗癌效果具有直接关系, 浓度越大, 癌细胞增值抑制效果越明显。随着处理癌细胞的虫茶水提物浓度的增加, TCA8113 人舌鳞癌细胞的 Bax 基因的 mRNA 表达增强, Bcl-2 基因的 mRNA 表达减弱, 同时 caspase-3 和 caspase-9 基因的 mRNA 表达都随之增强, 这些机制表明癌细胞的凋亡效果增强, 抗癌效果加强。由此可以看出虫茶可以起到促进癌细胞凋亡的作用。此外, 通过 BALB/c 小鼠体内抗肿瘤转移实验, 得出虫茶可以明显地抑制肿瘤转移的发生, 而且随着虫茶浓度的增加, 抑制效果明显增强。虫茶对人体的临床作用有待更深层次的研究。

参考文献

- [1] 励建荣,周李婷.中国虫茶现状及其研究开发思路[J].农产品加工.学刊,2005,34(3):4-7
Li J R, Zhou L T. Current Situation of Chinese Insect Tea and Way of Further Research and Development [J]. Academic Periodical of Farm Products Processing, 2005, 34(3): 4-7
- [2] 蒋三俊.中国虫茶资源及其保健功用[J].特种经济动植物,2000,5:36
Jiang S J. Chinese Sandy Tea Resource and Its Health Functional Activities [J]. Special Economic Animal and Plant, 2000, 5: 36
- [3] 汤灿辉,彭新君,文礼章,等.蒽酮-硫酸比色法测定三叶虫茶中总糖的含量[J].湖南中医药大学学报,2008, 28(5):38-40
Tang C H, Peng X J, Wen L, et al. Determination of total sugars in Sanyechong tea with anthrone-sulfuric colorimetric method [J]. Journal of Traditional Chinese Medicine University of Hunan, 2008, 28(5): 38-40
- [4] 李时珍.本草纲目:下册[M].哈尔滨:北方文艺出版社,2007
Li S Z. Compendium of Materia Medica: Lower volumes [M]. Harbin: Northern Arts Publishing House, 2007
- [5] 杨立昌,乙引.虫茶资源开发研究进展[J].食品工业科技,2011,32(8):470-472
Yang L C, Yi Y. Research Progress on the Insect Tea Resources Development [J]. Science and Technology of Food Industry, 2011, 32(8): 470-472
- [6] 许乾丽,茅向军,周雪松.老鹰茶和虫茶的 6 种生命元素分布状态和存在形态研究[J].贵州科学,1999,17(2): 140-143
Xu Q L, Mao X J, Zhou X S. Study of Distribution and Existence on Six Kinds of Necessary Elements in Hawk-tea and Sandy tea [J]. Guizhou Science, 1999, 17(2): 140-143

- [7] 郭时印,许伍霞,文礼章,等.三叶虫茶营养成分的分析与评价[J].昆虫知识,2008,45(1):128-132
Guo S Y, Xu W X, Wen L Z, et al. The Nutrient Analysis and Evaluation of Sanye Insect-fermented Tea [J]. Entomological Knowledge, 2008, 45(1): 128-132
- [8] SKEHAN P, STORENG R, MONKS S A, et al. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening [J]. Journal of the National Cancer Institute, 1990, 82: 1107-1112
- [9] ZHAO X, KIM S H, QI Y C, et al. Effects of different kinds of salt in comutagenicity and growth of cancer cells [J]. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition, 2012, 41(1): 26-32
- [10] JUNG K O, PARK S Y, PARK K Y. Longer aging time increases the anticancer and antimetastatic properties of doenjang [J]. Nutrition 2006, 22(5): 539-545
- [11] 徐立红.细胞凋亡相关的组合生物标志物的分子基础及其在环境毒理学中的意义[J].水生生物学报, 2005, 29(3): 329-335
Xu L H. Molecular Basis of Apoptosis-Related Integrated Biomarkers and Its Significance in Environmental Toxicology [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2005, 29(3): 329-335
- [12] DELIĆ R, ŠTEFANOVIĆ M. Optimal laboratory panel for predicting preeclampsia [J]. Journal of Maternal- Fetal and Neonatal Medicine, 2010, 23(1): 96-102
- [13] BLANC C, DEVERAUX Q L, KRAJEWSKI S, et al. Caspase-3 is essential for procaspase-9 processing and cisplatin-induced apoptosis of MCF-7 breast cancer cells [J]. Cancer Research, 2000, 60: 4386-4390
- [14] 郑宏强,刘德育.蛇葡萄素抗黑色素瘤侵袭和转移的作用[J].癌症,2003,22(4):363-367
Zhen H Q, Liu D Y. Anti-invasive and Anti-metastatic Effect of Ampelopsin on Melanoma[J]. Chinese Journal of Cancer, 2003, 22(4): 363-367