

·论 著·

# 饮食与抗氧化剂——营养干预研究

何 玲<sup>1</sup> Irene Persson<sup>2</sup> Ragnar Rylander<sup>3</sup>

**摘要** 流行病学研究表明多吃蔬菜可以减少癌症的危险性。抗氧化剂已被认为是主要的抗癌系统。谷胱甘肽转移酶(GSTs)是抗氧化损伤抵抗系统的组成之一,它可被抗氧化剂和氧化压力通过抗氧化反应因子诱导。为了进一步研究蔬菜的作用和其抗癌机制,在本干预试验中,8个研究对象接受正常饮食以外的附加蔬菜。用 HPLC 法测定血清维生素 A 醇和  $\alpha$ -生育酚的含量,用反转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)技术测定淋巴细胞 GST $\pi$  基因的表达。结果表明,增加蔬菜摄入前后,血清维生素 A 醇和  $\alpha$ -生育酚含量没有显著性差异。但增加蔬菜摄入后,5个研究对象中,4人淋巴细胞 GST $\pi$  mRNA 水平升高。结果提示:在蔬菜中,除维生素 A 和维生素 E 以外的其他的抗氧化剂可能诱导了 GST $\pi$  基因的转录。本试验为以后的大规模人群干预研究奠定了方法学基础。

**关键词** 饮食 抗氧化剂 营养干预

**Diet and Antioxidant - a Nutritional Intervention Study** He Ling\*, Irene Persson, Ragnar Rylander. \* Institute for chemical Carcinogenesis, Guangzhou Medical College, Guangzhou, PR. China 510182

**Abstract** It has been implicated that high vegetable intake is associated with a decreased risk for various forms of cancer in epidemiological studies. A major defense system against cancer has shown to be antioxidants. Glutathione S-transferases (GSTs), one of the major defense systems against oxidative damage, can be induced by antioxidant and addition of vegetables to their normal diet. Serum retinol and  $\alpha$ -tocopherol were determined by HPLC and the gene expression of GST $\pi$  in lymphocytes was measured by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) techniques. The results showed that there was no significant difference in the levels of serum retinol and  $\alpha$ -tocopherol before and after the addition of vegetables. GST $\pi$  mRNA levels in lymphocytes were higher in four out of five subjects after addition of vegetables. The results suggested that it might be other antioxidants than vitamin A and E in the vegetables that induced the gene transcription of GST $\pi$ .

**Key words** Diet Antioxidant Nutritional intervention

大约 10%~70% 的人类癌症病因被认为是饮食因素<sup>[1]</sup>。一些研究表明抗氧化剂在抵抗环境致癌物中起着重要作用<sup>[2,3]</sup>。某些食物成分,如蔬菜,含有抗氧化剂,蔬菜的摄取量较少会增加癌症的危险性。许多流行病学调查已显示蔬菜的摄取与癌症危险性的

关系<sup>[4]</sup>。目前一致认为多吃蔬菜会减少癌症的危险性,特别是肺癌的危险性<sup>[5,6]</sup>。

根据 536 名男女肺癌病例及 916 名对照组中肺癌危险性和蔬菜摄入情况的比值(OR)。胡萝卜、西红柿、莴苣、卷心菜和红/绿椒的摄取用次/周表示。已经作了年龄和吸烟习惯调整。经常吃蔬菜的人,其肺癌危险性为不经常吃蔬菜人的一半。

谷胱甘肽转移酶(GSTs)是一类重要的抗氧化酶系。它由  $\alpha$ 、 $\pi$ 、 $\mu$  三种同功酶组成

1 广东省广州医学院化学致癌研究所 510182

2 瑞典 Karolinska 研究所环境医学系分子毒理研究室

3 瑞典 Gothenburg 大学环境医学系



(Mannervik 等 1985 年)。GSTs 可催化谷胱甘肽(GSH)与亲电基团反应。许多化学致癌物的作用形式是以亲电基团形式反应,因此此酶系活力的提高,潜在地增加了人类每日抵抗致癌物负荷的能力,从而降低了癌症的危险性(Carr 1985 年)。GSTs 在致癌物的失活过程中可能起着相当重要的作用(Coles 1990 年),一些研究结果提示抗氧化剂可能是通过激活重要的抗氧化应激力(against oxidative stress)的特异性调控因子而起保护作用的(Rushmore 等 1990 年, Paulson 等 1990 年)。目前已知道 GSTs 在其 5' - 非编码区含有抗氧化剂反应因子<sup>[7]</sup>。饮食对血浆、淋巴细胞和肠液 GSTs 酶活力和蛋白质水平的影响,已有研究报道。食用甘蓝类蔬菜可增加血浆 GST $\alpha$  和直肠粘膜 GST $\alpha$ 、 $\pi$  的水平<sup>[8]</sup>。一些研究也表明淋巴细胞基因表达可作为肝脏基因表达水平的镜子。如 CYP2E1 和 CYP2D6 在淋巴细胞的表达已被证明可以反映此酶在肝脏中的表达<sup>[9]</sup>。因此,利用反转录 - 聚合酶链式反应(RT - PCR)技术有可能分析淋巴细胞 GSTs 基因在 mRNA 水平的表达。为了进一步评价蔬菜的可能作用,我们进行了饮食/营养干预试验。受试对象在正常饮食以外,每天可得到 300g 附加的蔬菜,测定试验前和饮食干预三周后 GST $\pi$  基因在 mRNA 水平的表达。

### 材料和方法

一、研究对象:研究对象为 8 名来自瑞典大学的学生,通过广告招聘,年龄在 20~30 岁之间,非吸烟健康男性。通过面谈记录平时的饮食习惯,以及前一天的饮食情况。计算身体指数和卡路里摄入量。

二、干预试验:实验开始第一天早晨抽血,然后研究对象可得到每天 300g 的混合蔬菜,研究对象在保持原来饮食习惯基础上,每天多吃附加的蔬菜。此试验得到哥德堡大学医学院伦理学委员会的批准。

三、血清维生素 A 醇和  $\alpha$  - 生育酚的测

定:用凝胶阻隔的 EDTA 管收集 6ml 全血(避光),室温下离心 4000rpm 10 分钟,上清液转移至另一管,用高压液相色谱(HPLC)法测定血清中维生素 A 醇和  $\alpha$  - 生育酚的含量(George LC, 等, 1983 年)。

四、淋巴细胞的分离:用 Vacutainer - CPT 管收集 8ml 全血,一小时内室温下在 1500g 离心 15 至 20 分钟。将淋巴细胞层转移至另一管。

五、淋巴细胞 RNA 的制备:总 RNA 用快速硫氰酸胍/酚/氯仿一步抽提法(Trizol LS Reagent, Life Technologies, Gaithersburg, Maryland)。用紫外分光光度仪分析 RNA 的纯度并定量。在琼脂糖/福尔马林凝胶上确定 RNA 的质量。质量不好的 RNA 不予采用。

六、反转录、PCR 扩增(RT - PCR):总 RNA 用 Advantage RT - for - PCR Kit (Clontech, East Meadow Circle, CA)反转录合成 cDNA。GST $\pi$  特异引物对应于外显子 4 和 7。Exon 4, 190 - 209 : 5' - TAC CAG TCC AAT ACC ATC C - 3'; Exon 7, 611 - 630 : 5' - CTG TTT CCC GTT GCC ATT G - 3'; cDNA 在 94 $^{\circ}$ C 变性 40 秒, 58 $^{\circ}$ C 淬火 45 秒, 72 $^{\circ}$ C 延伸 90 秒, 循环 30 次。每一扩增反应,均以  $\beta$  - actin 作为内标记。

### 结 果

一、血清维生素 A 醇和  $\alpha$  - 生育酚的测定:血清维生素 A 醇和  $\alpha$  - 生育酚含量见表 1。增加蔬菜摄取量前后,血清维生素 A 醇和  $\alpha$  - 生育酚含量没有显著性差异。

二、淋巴细胞 GST $\pi$  基因的表达:从研究对象 No. 1、5、6 提取的 RNA 质量不好,不予采用。对其他 5 个研究对象测定的结果见表 2。在这 5 个研究对象中, 4 人的 GST $\pi$  mRNA 水平在增加蔬菜摄取量后升高。研究对象 No. 2 的 GST $\pi$  mRNA 从低水平表达变成增加蔬菜摄取量后的高水平表达。研究对象 No. 3、4、7、8 的 mRNA 只在增加蔬菜摄



取量后才能检测到。

表 1 8 名研究对象在给予附加蔬菜前后血清中维生素 A 醇和  $\alpha$ -生育酚的含量

受试者	维生素 A 醇 ( $\mu\text{mol/l}$ )		$\alpha$ -生育酚 ( $\mu\text{mol/l}$ )	
	附加前	附加后	附加前	附加后
1	2.0	2.0	11.8	11.7
2	2.9	3.0	21.1	23.8
3	2.0	2.0	20.8	18.1
4	2.5	2.4	17.5	19.4
5	1.7	1.8	12.7	12.6
6	2.1	2.2	17.2	20.2
7	1.9	2.4	18.1	19.0
8	2.6	2.6	13.0	15.0
平均值	$2.2 \pm 0.4$	$2.3 \pm 0.4$	$16.5 \pm 3.6$	$17.5 \pm 4.1$

表 2 5 名研究对象在给予附加蔬菜前后淋巴细胞中 GST $\pi$  mRNA 水平

受试者	GST $\pi$ mRNA	
	附加前	附加后
2	+	++
3	ND	ND
4	ND	+
7	ND	+
8	ND	+

注:ND 未能测出

## 讨 论

本研究属干预实验性质,主要目的是为大规模流行病学干预实验建立方法和实验程序。研究对象数量小,因此对结果应慎重解释。在正常饮食基础上增加蔬菜的摄取量,这对研究对象来说是可以接受的,并没有引起基础饮食的任何改变(具体数据未列出)。

在饮食中增加蔬菜的摄取量没有引起血清维生素 A 醇和  $\alpha$ -生育酚含量的增加,但 GST $\pi$  基因的转录水平却增加了。这提示着蔬菜的保护功能并不完全归功于一至两种微营养素,如维生素 A 和 E。蔬菜中某些其他的抗氧化剂可能激活了 GST $\pi$  基因调控区的抗氧化反应因子,从而诱导了基因转录。已有研究报道了 Sulforaphane, 一种在十字花科

类蔬菜中发现的异硫氰酸胍基脂肪族化合物与它的类似物 Sulforamate, 能与抗氧化反应因子作用,非常显著地诱导小鼠乳房 GSTs 活动。在致癌物处理的小鼠乳腺器官培养过程中,这两种化合物被确认对肿瘤前损害的形成具有潜在的抑制作用<sup>[10]</sup>。

## 参 考 文 献

- 1 Doll R, Peto R. The causes of cancer: Quantitative estimates of avoidable risk in the United States today. *J Natl Cancer Inst*, 1981, 68: 1191 - 1303.
- 2 Frei B, Stocker R, Ames BN. Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma. *Proc Natl Acad Sci*, 1988, 85: 9748 - 9752.
- 3 Bailey GS, Williams DE. Potential mechanisms for food related carcinogens and anticarcinogens. *Food Technology* 1993, 47: 107 - 118.
- 4 Ziegler RG, Mayne ST, Swanson CA. Nutrition and lung cancer. *Cancer Causes and Control*, 1996, 7: 157 - 177.
- 5 Rylander R, Axelsson G, Andersson L, et al. Lung cancer, smoking and diet among Swedish men. *Lung cancer*, 1996, 14: S75 - S83.
- 6 Serdula MK, Byers T, Mokdad AH, et al. The association between fruit and vegetable intake and chronic disease risk factors. *Epidemiology*, 1996, 7: 161 - 165.
- 7 Truyen Nguyen, Thomas HRushmore, Cecil BPickett. Transcriptional regulation of a rat liver glutathione S-transferase Ya subunit gene. *J Biol Chem*, 1994, 69: 13656 - 13662.
- 8 Wim AN, Marima JAL Grubben, Fokko MNagengast, et al. Effects of consumption of Brussels sprouts on intestinal and lymphocytic glutathione S-transferases in human. *Carcinogenesis*, 1995, 16: 2125 - 2128.
- 9 Carcillo JA, Parise RA, Adedoyin A, et al. CYP 2D6 mRNA expression in circulating peripheral blood mononuclear cells correlates with in vivo debrisoquine hydroxylase activity in extensive metabolizers. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*, 1996, 91: 149 - 159.
- 10 Gerhauser C, You M, Liu J, et al. Cancer chemopreventive potential of sulforamate, a novel analogue of sulforaphane that induces phase 2 drug-metabolizing enzymes. *Cancer Res*, 1997, 57: 272 - 278.

(收稿:1997-07-20 修回:1997-08-20)