

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2007)16-1471-03

EGCG 抑制肺癌细胞增殖及其机制的研究

孙辑凯¹, 黄立军², 常东胜¹(¹ 齐齐哈尔医学院药理学系实验中心 黑龙江 齐齐哈尔 161042, ² 第四军医大学唐都医院胸外科 陕西 西安 710038)

Effect of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) on proliferation of human lung cancer cell and its mechanism

SUN Ji-Kai¹, HUANG Li-Jun², CHANG Dong-Sheng¹¹Department of Pharmacology, Qiqihar Medical College, Qiqihar 161042, China, ²Department of Thoracic Surgery, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, China

【Abstract】 AIM: To explore the effect of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) on the proliferation of lung cancer cells and its mechanism. **METHODS:** Human lung cancer cell line A549 was cultured with and without EGCG and its suppressed curve was drawn. Apoptosis of the cells was analyzed by Hoechst staining. The expressions of survivin mRNA and protein were investigated by RT-PCR and Western Blot. **RESULTS:** EGCG inhibited the proliferation of the lung cancer cell A549 and cell apoptotic rate was increased to 18% when A549 was cultured with 60 mg/L EGCG ($P < 0.01$). The expression of survivin was inhibited significantly in A549 cells treated with 60 mg/L EGCG. **CONCLUSION:** EGCG can inhibit the growth of human lung cancer cells and induce cell apoptosis. Its mechanism may be associated with blocking survivin expression.

【Keywords】 epigallocatechin-3-gallate (EGCG); lung neoplasms; survivin; apoptosis

【摘要】目的: 研究表没食子儿茶素-3-没食子酸酯(EGCG)对人肺癌细胞增殖的影响及机制。方法: 培养肺癌细胞A549, 加入EGCG制作细胞抑制曲线; EGCG作用于人肺癌A549细胞株前后通过Hoechst染色检测细胞凋亡。RT-PCR及Western Blot印迹法研究survivin的mRNA及蛋白表达的变化。结果: EGCG可明显抑制A549细胞的增殖, 60 mg/L EGCG作用后, 细胞出现明显的凋亡。同时肺癌细胞中survivin mRNA和蛋白表达减少。结论: EGCG可抑制肺癌细胞的增殖, 这可能与survivin表达降低有关。

【关键词】 表没食子儿茶素-3-没食子酸酯; 肺肿瘤; survivin; 细胞凋亡

收稿日期 2007-05-20; 接受日期 2007-06-10

通讯作者: 黄立军. Tel: (029) 84777494 Email: hljyxq@fmmu.edu.cn

作者简介: 孙辑凯. 实验师. Tel: (0452) 6887592 Email: sjk9877@

tom.com

【中图分类号】R734.2

【文献标识码】A

0 引言

肿瘤的发生是多种因素综合作用的结果。抗肿瘤机制主要有直接细胞毒作用、诱导癌细胞凋亡或分化、抗突变、抗肿瘤转移、抗肿瘤多药耐药等作用^[1]。表没食子儿茶素-3-没食子酸(EGCG)是茶多酚中最主要的成分^[2], 其对于肺癌细胞的影响报道较少。本研究发现表没食子儿茶素-3-没食子酸酯(epigallocatechin-3 gallate, EGCG)对肺癌细胞有明显的诱导凋亡作用, 而抑制凋亡抑制基因 survivin 的表达可能是其潜在机制之一。

1 材料和方法

1.1 材料 表没食子儿茶素-3-没食子酸(EGCG)购自Sigma公司。人肺癌细胞系A549为本室保存。采用DMEM培养基(含100 mL/L小牛血清, 10万U/L青霉素, 10万U/L链霉素), 在37℃ 50 mL/L CO₂培养箱内进行培养。EGCG以无血清DMEM培养基稀释冻存于-20℃。

1.2 方法

1.2.1 细胞毒试验(MTT法) 将常规培养的A549细胞用胰蛋白酶消化后制成 1×10^5 /L的单细胞悬液, 加入96孔细胞培养板中每孔0.2 mL, 培养24 h后, 换含不同浓度的EGCG培养液, 每浓度设6复孔, 培养48 h。实验终止前4 h每孔加入MTT液(5 g/L) 20 μL, 继续培养4 h。小心吸去上清液后每孔加入DMSO 150 μL, 在振荡器上轻轻振荡5 min后, 酶标仪测定各孔的吸光度值($A_{490\text{nm}}$)。按下式计算各用药组的生长抑制率IR(%)。生长抑制率IR(%) = $(1 - \text{用药组平均 } A_{490\text{nm}} / \text{对照组 } A_{490\text{nm}}) \times 100\%$ 。

1.2.2 Hoechst染色 EGCG处理48 h后的肺癌细胞与对照组细胞制作细胞爬片, 用PBS洗3次, 40 g/L多聚甲醛固定30 min, PBS洗3次。吸弃PBS, 加入0.5 mL Hoechst染色液, 染色10 min, 染色时摇动数次。之后吸弃染色液, 加一滴抗淬灭液于载玻片上, 细胞面朝下轻轻放在载玻片液滴上, 荧光显微镜下观察凋亡。

1.2.3 survivin RT-PCR 将 EGCG 处理 48 h 后的肺癌细胞与对照组细胞以 TRIZOL Reagent 提取总 RNA , 紫外分光光度计准确定量 , 相同条件下进行反转录 survivin 上游引物 P1 : 5'-CGGAATTCATGGGTGC-CCCCGACGTTG- 3' ; 下游引物 P2 5'-C GGGATCCTCA ATCCATGGCAGC CAGC-3'。预计片段为 420 bp 同时以人 β -actin 为内参照。 β -actin 的引物序列为 P1 : 5'-TGGGCATGGGTCAGAAGG GATTC-3' ; P2 : 5'-ATGT-CACGCACGCACGATTCCCG-3' , 预计片段为 502 bp。 PCR 条件以 94℃ 变性 5 min 后 , 按下述参数循环 25 次 94℃ 变性 15 s 57℃ 退火 40 s 72℃ 延伸 1 min。

1.2.4 Western Blot 检测 survivin 收集 EGCG 处理 48 h 后的肺癌细胞与对照组细胞 PBS 洗两遍后 , 离心。加入 RIPA 细胞裂解液 , 收集上清。按照 BCA Protein Assay Kit 说明书操作 , 酶标仪蛋白定量。蛋白样品各取 100 μ g , 150 g/L SDS-PAGE 电泳后 , 转膜。TTBS 洗膜。将羊抗人 survivin 抗体用 TTBS 按 1:1000 稀释 , 膜置于一抗中室温缓摇 1 h。 37℃ TTBS 洗膜。将辣根过氧化物酶标记的兔抗羊 IgG 用 TTBS 按 1:10 000 稀释 , 室温 1 h。 37℃ 洗膜按照 Supersignal [®] West Pico Chemiluminescent Substrate 说明书 , 配置发光工作液。暗室操作曝光底片。同时取各蛋白样品 100 μ g , 同样方法进行 β -actin 检测。(鼠抗人 β -actin 1:2000 稀释 , 辣根酶 (HRP) 标记兔抗鼠 IgG 1:10 000 稀释)。

2 结果

2.1 EGCG 对 A549 细胞的抑制作用 不同浓度 EGCG 作用于 A549 细胞 48 h 后 , 细胞生长有不同程度的抑制作用 , 且有明显的浓度依赖性。当浓度大于 60 mg/L 以上时 , 对细胞生长均有显著的抑制作用 (图 1)。

2.2 EGCG 对 A549 细胞的凋亡诱导作用 Hoechst 染色后 , 发现肺癌细胞经 60 mg/L EGCG 处理后部分染色质固缩 , 在荧光显微镜下 , 呈现出致密浓染或碎块状浓染 , 说明凋亡细胞大量增加。随机计数 10 个高倍视野细胞核 , 计算凋亡率。未加入 EGCG 的对照细胞凋亡率 1.8% , 治疗组 11.2%(图 2)。

2.3 RT-PCR 检测 survivin 基因 总 RNA 经反转录 , 相同条件下 25 个 PCR 反应循环后 , 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳显示 , 作为内参照的 β -actin (502 bp) , 两组 PCR 样品 DNA 量基本一致。对照细胞有约 420 bp 特异的 survivin DNA 条带 , EGCG 60 mg/L 作用 48 h 后仅有非常微弱的条带 (图 3)。

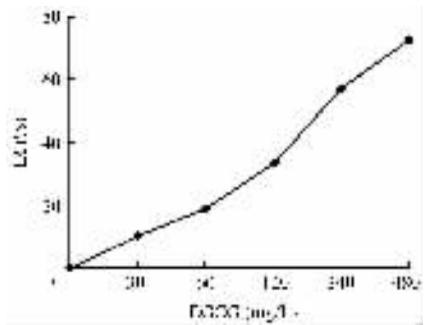
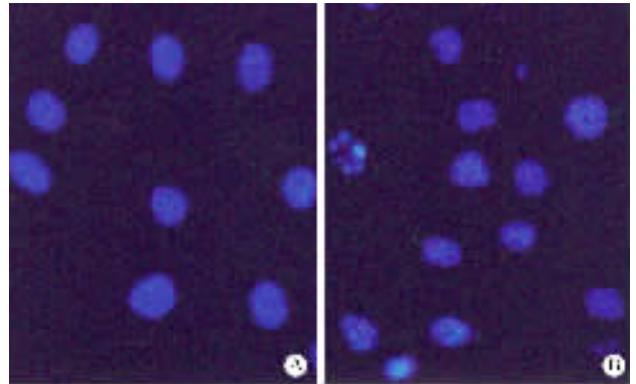
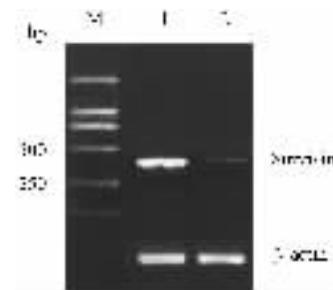


图 1 EGCG 对 A549 细胞的抑制作用



A 对照组细胞 B EGCG 60 mg/L 作用 48 h。

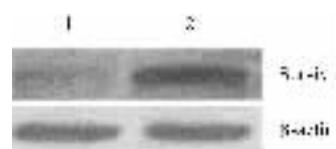
图 2 EGCG 对 A549 细胞的凋亡诱导作用 Hoechst \times 400



M : DNA marker 1 对照组细胞 2 EGCG 60 mg/L 作用 48 h。

图 3 EGCG 作用后 A549 细胞中 survivin 的 RT-PCR 检测

2.4 Western Blot 检测 survivin 蛋白 两组细胞 β -actin 均有显示 , 量基本相同。对照组 survivin 蛋白条带明显存在 , 治疗组同样位置的条带则非常弱。说明其 survivin 的蛋白表达受到明显抑制 (图 4)。



1 EGCG 60 mg/L 作用 48 h 2 对照组细胞。

图 4 EGCG 作用后 A549 细胞中 survivin 蛋白 Western Blot 检测

3 讨论

茶多酚是从绿茶中提取出来的最主要的对人体最有益成分,是一类存在于茶树中的多羟基酚类化合物的混合物,俗名茶单宁、茶鞣质。其主要组分为儿茶素类(黄烷醇类)、黄酮及黄酮醇类、花色素类和酚酸及缩酚酸类多化合物的复合体。其中儿茶素类约占总量的80%,包括4种形式:表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG),没食子儿茶素(EGC),儿茶素没食子酸酯(ECG),儿茶素(EC)。其中以表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)含量最高,占儿茶素的50%左右^[3-4]。

研究表明茶多酚对肺癌细胞的生长具有明显的抑制作用。其抑制肿瘤细胞生长的机制尚不十分清楚。陈清勇等^[5]应用MTT法体外观察不同浓度茶多酚(I)对人肺癌细胞株(PG)细胞的杀伤作用,结果显示I可明显抑制PG细胞表面CD44、CD54的表达。I对PG细胞和静息血管内皮细胞的黏附性也具有明显的抑制作用,并可抑制黏附分子C7344、CD54的表达,呈剂量依赖关系。I的抗黏附作用可能与其抗肿瘤转移有关。Banerjee等^[6]发现茶多酚可以通过抑制Cox2,诱导caspase-3表达抑制肺癌细胞的生长。

本研究通过细胞毒实验(MTT)发现EGCG很小浓度就能抑制A549细胞的生长,Hoechst染色后,发现肺癌细胞经60 mg/L EGCG处理后部分染色质固缩,在荧光显微镜下,呈现出致密浓染或碎块状浓染,

说明凋亡细胞大量增加。凋亡率明显高于对照组。survivin在许多肺癌组织中表达,是迄今发现的作用最强的凋亡抑制因子^[7]。本研究通过Western Blot法检测两组细胞survivin蛋白表达,结果发现治疗组其survivin的蛋白表达受到明显抑制,说明EGCG可能通过抑制Survivin蛋白表达途径促进肺癌细胞凋亡。

【参考文献】

- [1] Yang CS, Lambert JD, Hou Z, et al. Molecular targets for the cancer preventive activity of tea polyphenols [J]. Mol Carcinog, 2006, 45(6): 431-435.
- [2] Ahmad N, Gupta S, Mukhtar H. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate differentially modulates nuclear factor kappaB in cancer cells versus normal cells [J]. Arch Biochem Biophys, 2000, 376(2): 338-346.
- [3] 盛丽,任爱梅.天然抗氧化剂茶多酚[J].化学教育,2004,25(11): 8-29.
- [4] 汪新.茶多酚的应用研究与皖南茶竹资源的开发[J].中国资源综合利用2004,9: 26.
- [5] 陈清勇,王彦钊,周建英.茶多酚对肺癌PC细胞生长的调控研究[J].中国现代应用药学2002,19(6): 440-442.
- [6] Banerjee S, Manna S, Mukherjee S, et al. Black tea polyphenols restrict benzo(a)pyrene-induced mouse lung cancer progression through inhibition of Cox-2 and induction of caspase-3 expression [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2006, 7(4): 661-666.
- [7] Singhal S, Vachani A, Antin-Ozerkis D, et al. Prognostic implications of cell cycle, apoptosis, and angiogenesis biomarkers in non-small cell lung cancer: A review [J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(11): 3974-3986.

编辑 王雪萍

· 经验交流 · 文章编号 1000-2790(2007)16-1473-01

急性重症胰腺炎32例诊治

张孝洁 (开封市中西医结合医院外科,河南 开封 475001)

【关键词】急性重症胰腺炎 治疗 发病原因
【中图分类号】R657.51 【文献标识码】B

1 临床资料 我院自1993-10/2003-10收治胰腺炎患者264例,其中重症胰腺炎32(男21,女11)例。年龄21~76(平均48.6)岁。发病至就诊时间1~10 d。患者均有腹痛,多为持续性剧烈的刀割样疼痛,并向肩部、腰背部放射,同时伴恶心呕吐、腹胀等胃肠道症状。其中出现休克患者11例;“B”超见胰腺肿大,边界不清,回声不均匀,腹水及肠胀气患者28例,合并有左侧胸腔积液患者4例。32例患者的血清淀粉酶均有显著升高,血性腹水在1000 mL以上。在给予禁食、胃肠减压、抗胆碱药物、抑肽酶、抗生素及激素治疗、抗休克、补充水和电解质、热量及蛋白质等对症支持治疗外,及时手术,采用胰腺被膜切开,坏死组织清除,加局部引流,腹腔灌洗,尽可能引出和稀释含有胰酶的腹腔渗液。辅以中医清热解毒、扶正祛邪、攻下等治疗。治愈22人,死亡6人,死亡率15.6%。

2 讨论 急性重症胰腺炎发病急骤,进展迅速,病情极易恶化,加上临床症状多变、不典型,容易造成误诊,延误治疗。因此明确诊断尤其是早期诊断显得至关重要^[1]。我们对有突发上腹部疼痛,伴恶心呕吐、腹胀、腹膜刺激症的患者,经检查排除胃肠道穿孔、绞窄性肠梗阻等其他急腹症外,具备①血、尿淀粉酶升高,或有升高又突然降至正常甚至低于正常,病情恶化或出现休克;②腹穿抽出血性腹水,腹水中淀粉酶含量较高;③病情较重,患者迅速出现难以纠正的休克(补足血容量后休克无明显好转者);④B超显示胰腺体积增大,质地不均匀的回声,胰腺内有粗大的强回声,胰腺周围有无回声带,或CT见有胰腺增大,密度不均匀,边缘模糊,甚至出现横结肠系膜外团块影。两项者就可诊断为急性重症胰腺炎。

急性重症胰腺炎治疗的关键在于迅速有效地阻止胰酶的释放及活化,预防休克、感染等并发症的发生。治疗包括内科综合治疗,手术治疗及中西医结合治疗^[2]。由于急性重症胰腺炎的病理过程较为复杂,涉及多个系统和器官,在疾病的转归过程中常常会有多种并发症出现,有些并发症往往是造成死亡的直接原因,因此预防和治疗并发症在胰腺炎的治疗中显得极为重要。

【参考文献】

- [1] 刘永雄.在探索和实践发展中发展我国胰腺外科[J].中华外科杂志,1997,35(3): 131-133.
- [2] 黄庭庭,邢墨儒.急性坏死性胰腺炎手术指征和手术时机的探究[J].中华外科杂志,1995,33: 201-203.

编辑 黄良田

收稿日期 2007-04-16; 接受日期 2007-05-22

作者简介 张孝洁,本科,主治医师。Tel: (0378) 3991454