

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2014.01.007

EGCG 对人肝癌细胞的抑制作用及其可能的机制

张勇, 沈筱芸, 冯雁, 谢裕安, 张力图, 利基林, 罗小玲(广西医科大学附属肿瘤医院 实验研究部, 广西南宁 530021)

[摘要] 目的: 观察表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)对体外培养的人肝癌细胞株生物学特性的影响, 研究其作用效果与血红素氧合酶-1(hemeoxygenase-1, HO-1)及相关信号分子的关系, 探讨其作用机制。方法: 利用 MTT 法检测 EGCG 对 HepG2、Sk-hep1、SMMC7721 等肝癌细胞增殖的影响, 并用吖啶橙/溴化乙锭(AO/EB)双染法观察肝癌细胞的形态学变化, 流式细胞术检测 EGCG 作用后 Sk-hep1 细胞周期的变化, Real-time PCR 和 Western blotting 法检测 EGCG 作用后 Sk-hep1 细胞中 HO-1、IL-10 及 TNF- α 等信号分子表达的变化。结果: EGCG 作用后, 3 株肝癌细胞贴壁细胞数量显著少于对照组, 凋亡细胞数增多[HepG2: (16.33 \pm 3.51) vs (3.67 \pm 1.15)个, $P < 0.01$], Sk-hep1: (18.33 \pm 2.31) vs (2.33 \pm 2.08)个, $P < 0.01$], SMMC7721: (15.33 \pm 3.06) vs (3.33 \pm 2.08)个, $P < 0.01$]。实验组 Sk-hep1 细胞 G₂/M 期比例明显高于对照组[(34.33 \pm 8.09)% vs (3.07 \pm 2.32)% , $P < 0.01$]。设对照组基准值为 1.00, 实验组 Sk-hep1 细胞中 HO-1、IL-10、及 TNF- α 的 mRNA 相对表达水平依次为(0.58 \pm 0.15)、(5.91 \pm 1.11)、(5.29 \pm 1.14), 差别均有统计学意义($P < 0.01$); 与对照组相比, 实验组 HO-1 蛋白表达水平明显下调(0.16 \pm 0.04 vs 0.33 \pm 0.08, $P < 0.05$), IL-10(0.42 \pm 0.06 vs 0.24 \pm 0.08, $P = 0.034$, $P < 0.05$)和 TNF- α 蛋白(0.95 \pm 0.17 vs 0.58 \pm 0.08, $P < 0.05$)表达水平明显上调。结论: EGCG 可抑制肝癌细胞增殖及诱导细胞凋亡, 并将 Sk-hep1 细胞阻滞在 G₂/M 期, 其机制可能与 HO-1、IL-10、TNF- α 等炎症信号分子表达的变化有关。

[关键词] 没食子儿茶素没食子酸酯; 肝癌细胞; 血红素氧合酶-1

[中图分类号] R735.7; R730.5

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2014)01-0038-06

Epigallocatechin-3-gallate-induced growth inhibition and the underlying mechanisms in human hepatocellular carcinoma cells

Zhang Yong, Shen Xiaoyun, Feng Yan, Xie Yu'an, Zhang Litu, Li Jilin, Luo Xiaoling(Department of Research, Affiliated Cancer Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) on hepatocellular carcinoma cell growth and the molecular mechanisms underlying the effect *in vitro*. **Methods:** Three human hepatocellular carcinoma cell lines (i. e., HepG2, Sk-hep1 and SMMC7721) were used in this study. Cells were cultured in the presence of 0, 40, 80 or 120 μ g/ml EGCG. At 24, 48 and 72 h after EGCG treatment, cell viability was assessed by MTT assay, apoptosis by AO/EB staining, cell cycle progression by flow cytometer, and mRNA and protein levels of HO1, IL-10 and TNF- α by Realtime PCR and Western blotting respectively. **Results:** EGCG treatment significantly induced cell attachment ($P < 0.05$), increased the proportion of apoptotic cells ($P < 0.01$), and induced G₂/M arrest ($P < 0.01$) in all three cell lines tested as compared with the control. HO-1, IL-10 and TNF- α mRNA levels were 0.58 \pm 0.15, 5.91 \pm 1.11 and 5.29 \pm 1.14 in EGCG-treated Sk-hep1 cells, significantly different from the levels in the control cells ($P = 0.008$, $P = 0.002$, $P = 0.003$). EGCG resulted in a significant decrease in HO-1 protein content as compared with the control (0.16 \pm 0.04 vs 0.33 \pm 0.08, $P < 0.05$). In contrast, EGCG significantly increased levels of IL-10 protein (0.42 \pm

[基金项目] 广西医科大学青年科学基金项目(No. 02602211011); 广西自然科学基金项目(No. 2013GXNSFBA019186); 广西科学研究与技术开发计划课题(No. 1140003A-32)。Project supported by the Youth Science Foundation of Guangxi Medical University (No. 02602211011), the Guangxi Natural Science Foundation (No. 2013GXNSFBA019186), and the Scientific Research and Technological Development Program of Guangxi (No. 1140003A-32)

[作者简介] 张勇(1987-), 男, 湖北省荆门市人, 硕士生, 主要从事肿瘤生物治疗研究及肿瘤的放、化疗研究。E-mail: drzhang08@163.com

[通信作者] 罗小玲(Luo Xiaoning, corresponding author), E-mail: lxlcool@sina.com.cn

0.06 vs 0.24 ± 0.08, $P < 0.05$) and TNF- α protein (0.95 ± 0.17 vs 0.58 ± 0.08, $P < 0.05$). **Conclusions:** EGCG may inhibit proliferation and block cell cycle progression and induce apoptosis in hepatocellular carcinoma cells. The mechanism(s) underlying these effects of EGCG may involve modulation of HO-1, IL-10 and TNF- α expression.

[**Key words**] (-)-epigallocatechin-3-gallate; hepatocellular carcinoma; hemeoxygenase-1 (HO-1)

[Chin J Cancer Biother, 2014, 21(1): 38-43]

肝癌是我国常见的恶性肿瘤之一,虽然目前临床治疗以手术切除为主,术后辅以化疗,在一定程度上提高了患者的5年生存率,但化疗后往往出现骨髓抑制、胃肠道反应、脱发等不良反应,不同程度地影响患者的生活质量。因此,减轻化疗药物的不良反应、寻找毒性作用更低的抗癌药物,是广大医疗工作者亟需解决的难题。近年来,采用天然中药辅助治疗肝癌的方法逐渐成为研究者关注的热点^[1]。表没食子儿茶素没食子酸酯[(-)-epigallocatechin-3-gallate, EGCG]是从绿茶中提取的一种水溶性成分,具有抑制肿瘤细胞生长及促进其凋亡的作用^[2]。由于EGCG的抑癌机制尚不明确,仅有相关文献^[3]报道,高浓度的EGCG诱导肺癌A549细胞凋亡与其下调血红素氧合酶-1(heme oxygenase-1, HO-1)表达有关。因此,本研究拟观察EGCG对肝癌细胞的抑癌效果,并检测EGCG作用前后HO-1等相关信号分子基因及蛋白表达量的变化,以此来探讨EGCG对肝癌细胞的作用效果与HO-1等信号分子的关系,为进一步研究EGCG对肝癌的作用机制提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 试剂及仪器

EGCG购自美国Sigma公司,纯度 $\geq 95\%$ 。MTT购自美国Sigma公司,DMEM培养液、胎牛血清购自北京Hyclone公司,HO-1、IL-10、TNF- α 、 β -actin兔抗人一抗及抗兔红外荧光二抗购自美国Cell Signaling Technology公司。活细胞/凋亡细胞/坏死细胞鉴别试剂盒、细胞DNA含量检测试剂盒及细胞凋亡检测试剂盒均购自南京凯基生物科技发展有限公司,ReverTra Ace qPCR RT Kit购自日本TOYOBO公司,GoTaq[®] qPCR Master Mix试剂盒购自Promega公司。Real-time PCR仪购自美国Bio-Rad公司,流式细胞仪购自美国BECKMAN公司,Odyssey红外荧光扫描仪购自美国LI-COR公司。TRIzol试剂购自美国Invitrogen公司,RIPA裂解液购自美国Cell Signaling Technology公司,蛋白酶抑制剂购自瑞士Roche公司,BCA蛋白浓度测定试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司。

1.2 细胞培养

人肝癌细胞株HepG2、Sk-hep1、SMMC7721均购自中国科学院上海生命科学研究所以,用含10%胎牛血清(FBS)、100 U/ml青霉素、100 μ g/ml链霉素的DMEM培养液于37 $^{\circ}$ C、含5% CO₂的细胞培养箱中培养,每2~3 d传代1次。

1.3 MTT法检测EGCG对肝癌细胞增殖的抑制

分别取对数生长期的人肝癌HepG2、Sk-hep1、SMMC7721细胞,消化并制备成单细胞悬液,调整为 2×10^5 个/ml后接种于96孔板,每孔100 μ l,置于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂的细胞培养箱中,培养24 h细胞贴壁后,设实验组和对照组,每组设3个复孔。实验组即EGCG组,加入终质量浓度为40、80、120 μ g/ml的EGCG(用DMEM配制),对照组不加EGCG。最后用DMEM培养液调整每孔液体总体积至200 μ l, FBS为10%,分别培养24、48、72 h后进行检测。检测前4 h,每孔先弃掉20 μ l上清液,加入20 μ l 2 mg/ml的MTT继续培养,于检测前弃掉全部上清,每孔再加入100 μ l DMSO,轻微振荡使结晶溶解后立即用酶标仪在492nm波长下测出各孔的光密度值(D)。计算细胞存活率和抑制率,存活率(%) = 加药组 D 值/对照组 D 值 $\times 100\%$,抑制率 = 1 - 存活率。

1.4 AO/EB双染法检测EGCG对肝癌细胞的致凋亡作用

AO能透过胞膜完整的细胞,嵌入细胞核DNA,使之发出明亮的绿色荧光;EB仅能透过胞膜受损的细胞,嵌入核DNA,发橘红色荧光;因此可以在荧光显微镜下鉴别出活细胞、凋亡细胞和坏死细胞。分别取 2×10^5 个/ml处于对数生长期的人肝癌HepG2、Sk-hep1、SMMC7721细胞悬液1 ml,均匀地接种于六孔板,置于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂的细胞培养箱中,培养24 h细胞贴壁后,弃掉上清液。设实验组和对照组,实验组加EGCG(浓度为MTT实验所得IC₅₀),对照组不加药,均加培养液至2 ml,继续培养48 h后弃掉上清液, PBS洗涤2遍。将活细胞/凋亡细胞/坏死细胞鉴别试剂盒中的AO和EB以等体积混合形成混合液,分别向实验组及对照组中加入5 μ l,轻微摇

晃培养板 3 ~ 6 s 使混合液铺开, 5 ~ 10 min 后置于荧光倒置显微镜下观察, 可见四种细胞形态: 活细胞(viable normal cell, VN), 核染色质着绿色并呈正常结构; 早期凋亡细胞(viable apoptotic cell, VA), 核染色质着绿色呈固缩状或圆珠状; 非凋亡的死亡细胞(non-apoptotic viable necrotic cell, NVN), 核染色质着橘红色并呈正常结构; 晚期凋亡细胞(non viable apoptotic cell, NVA), 核染色质为橘红色并呈固缩状或圆珠状。

1.5 流式细胞仪检测 EGCG 对肝癌细胞周期的影响

取 2×10^5 个/ml 处于对数生长期的人肝癌 Sk-hep1 细胞悬液 1 ml, 均匀地接种于六孔板, 置于 37°C 、5% CO_2 的培养箱中培养 24 h 细胞贴壁后, 弃掉上清液, 实验组加 EGCG(浓度为 MTT 实验所得 IC_{50}), 对照组不加药, 各组均加培养液至 2 ml, 继续培养 48 h。消化并收集细胞, 计数并调整密度为 1×10^6 个/ml。取 1 ml 单细胞悬液, $120 \times g$ 离心 5

min, 去除上清, 加入 $500 \mu\text{l}$ 70% 冷乙醇固定, 4°C 保存。PBS 洗去固定液后, 加 $100 \mu\text{l}$ RNaseA, 37°C 水浴 30 min, 再加入 $400 \mu\text{l}$ PI 混匀染色, 4°C 避光 30 min 后上机检测。

1.6 Real-time PCR 检测肝癌细胞中 HO-1、IL-10 及 TNF- α mRNA 的表达

收集待检测细胞, 用 TRIzol 法提取细胞总 RNA, 用 ReverTra Ace qPCR RT Kit 逆转录成 cDNA, 采用 GoTaq[®] qPCR Master Mix 试剂盒中已合成 cDNA 为模板进行 RT 反应。HO-1、IL-10、TNF- α 和 GAPDH 的引物序列见表 1。PCR 反应条件: 95°C 预变性 2 min, 95°C 变性 3 s, 60°C 退火/延伸 30 s, 扩增 40 个循环; 最后再 72°C 延伸 5 min。PCR 完成后, 软件分析基因的扩增情况, 得到相应 Ct 值。以 GAPDH 作为内参照, 每组设 3 个复孔。基因相对表达量(RQ)采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 方法计算。

表 1 Real-time PCR 引物
Tab. 1 Primers of Real-time PCR

Target	Upstream	Downstream
GAPDH	5'-AAGGTGAAGGTCGGAGTCAAC-3'	5'-GGGGTCATTGATGGCAACAATA-3'
HO-1	5'-AGTCTTCGCCCTGTCTACT-3'	5'-GCTGCTGTGATAGGGGATGAC-3'
IL-10	5'-CATCAAGGCGCATGTGAACT-3'	5'-ACGGCCTTGCTCTTGTTC-3'
TNF- α	5'-CCCGAGTGACAAGCCTGTAG-3'	5'-TGAGGTACAGGCCCTCTGAT-3'

1.7 Western blotting 检测肝癌细胞中 HO-1、IL-10 及 TNF- α 蛋白的表达

收集待检测细胞, 加入 RIPA 裂解液(含蛋白酶抑制剂) 充分裂解, 提取蛋白, BCA 蛋白浓度测定试剂盒定量, 加入等量的蛋白样品进行 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 然后转移到 PVDF 膜上, 用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 室温封闭 1 h, 分别加入按 1:1 000 稀释的 HO-1、IL-10、TNF- α 和 β -actin(作内参) 等一抗(兔抗人), 4°C 孵育过夜, TBST 洗膜 3 次, 再加入 1:10 000 稀释的红外荧光二抗(DyLight[®] 680 Conjugate-Anti-rabbit IgG), 避光室温孵育 2 h, TBST 洗膜 3 次, Odyssey 红外荧光扫描成像系统扫描成像并分析得到条带灰度值, 计算每组蛋白的灰度值与相应的内参灰度值的比值作为各目的蛋白的相对表达量。

1.8 统计学处理

采用 SPSS16.0 统计软件分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表

示, 两样本均数的比较采用 t 检验, 多组间数据比较采用方差分析, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 EGCG 抑制肝癌细胞的增殖

采用 MTT 法分别检测不同浓度 EGCG 作用 24、48、72 h 后对 HepG2、Sk-hep1、SMMC7721 三种肝癌细胞株增殖的影响, 计算出相应的细胞抑制率, 绘制药物浓度-抑制率关系曲线(图 1)。结果显示, EGCG 对这 3 种肝癌细胞株均有明显的增殖抑制作用, 且作用效果呈时间和浓度依赖性, 随浓度的增加和作用时间的延长, 其对细胞增殖的抑制作用逐渐增强。根据药物浓度-抑制率关系曲线得出 EGCG 作用 48 h 对 HepG2、Sk-hep1、SMMC7721 细胞的半数抑制药物浓度(IC_{50}) 分别为(74.7 ± 3.8)、(61.3 ± 2.1)、(59.6 ± 1.7) $\mu\text{g/ml}$ 。

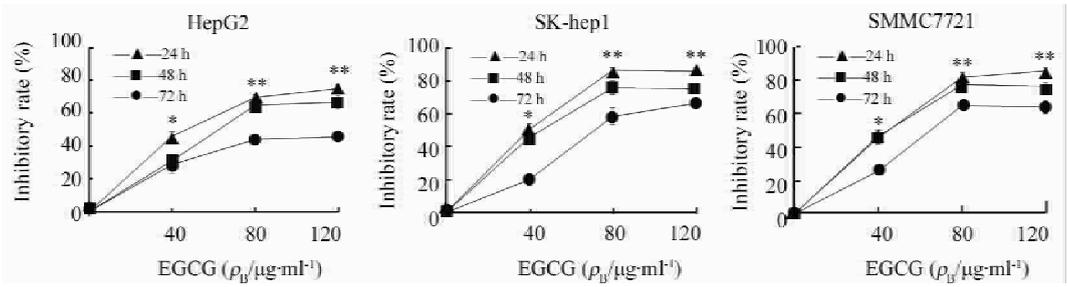


图1 EGCG 作用于3种肝癌细胞的药物浓度-抑制率

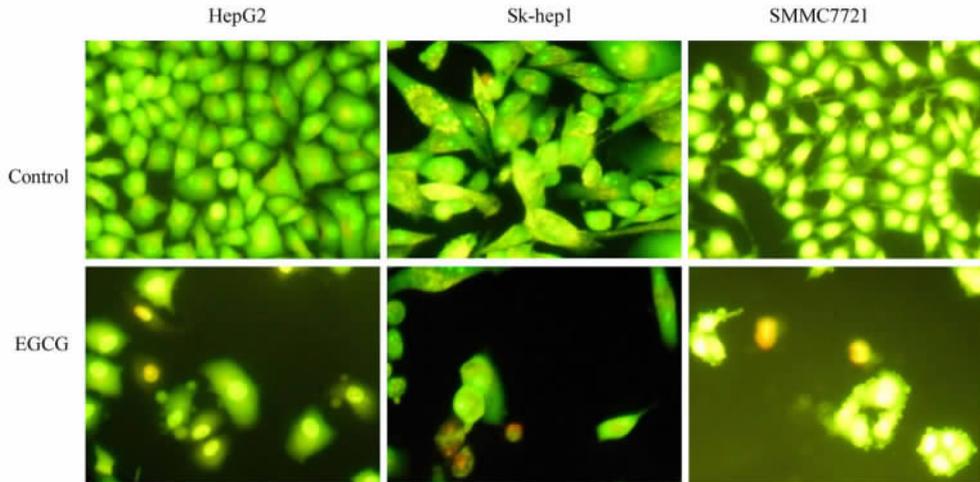
Fig. 1 The growth inhibition rate of HCC cells treated by different concentration of EGCG

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs EGCG 0 $\mu\text{g/ml}$

2.2 EGCG 诱导肝癌细胞的凋亡

将给药浓度为 IC_{50} 的 EGCG 分别作用 HepG2 (74.7 $\mu\text{g/ml}$)、Sk-hep1 (61.3 $\mu\text{g/ml}$)、SMMC7721 (59.6 $\mu\text{g/ml}$) 48 h 后,采用 AO/EB 双染法染色,置于荧光倒置显微镜下观察,结果(图2)显示,与对照组相比,实验组贴壁细胞明显减少,可见部分凋亡细胞,多数细胞已出现核固缩、核碎裂,说明 EGCG 对肝癌细胞生长不仅有抑制作用,还能诱导其凋亡。

分别取 3 个 200 倍视野计数凋亡细胞,与 HepG2 对照组相比,实验组凋亡细胞数显著增加 [(3.67 \pm 1.15) vs (16.33 \pm 3.51) 个, $P < 0.01$]; Sk-hep1,实验组凋亡细胞数显著升高 [(18.33 \pm 2.31) vs (2.33 \pm 2.08) 个, $P < 0.01$]; SMMC7721 实验组凋亡细胞数也显著增加 (15.33 \pm 3.06) vs (3.33 \pm 2.08), $P < 0.01$]。

图2 EGCG 作用后肝癌细胞的形态观察($\times 200$)Fig. 2 The image of HCC cells treated with EGCG($\times 200$)

2.3 EGCG 对肝癌细胞周期的阻滞作用

根据上述结果,本研究选择了生长状态、药物敏感度适中的 Sk-hep1 肝癌细胞进行后续研究。流式细胞术检测 61.3 $\mu\text{g/ml}$ EGCG 作用 48 h 后的细胞周期,结果(图3)显示,对照组 Sk-hep1 细胞 G_0/G_1 期为 (86.64 \pm 7.65)%, S 期为 (10.29 \pm 5.67)%, G_2/M 期为 (3.07 \pm

2.32)% ; 实验组 Sk-hep1 细胞 G_0/G_1 期为 (51.62 \pm 7.85)%, S 期 (14.05 \pm 4.51)%, G_2/M 期为 (34.33 \pm 8.09)%, 实验组 G_2/M 期细胞所占的百分比明显高于对照组,差别有统计学意义 ($P < 0.01$)。由此说明,EGCG 对 Sk-hep1 肝癌细胞的细胞周期有阻滞作用,可使细胞周期明显阻滞在 G_2/M 期。

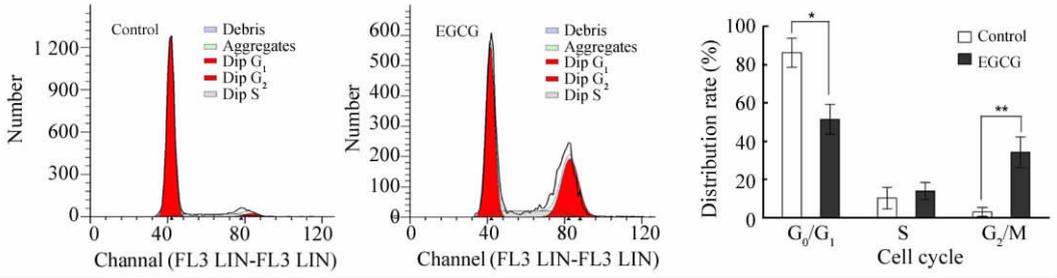


图 3 流式细胞术检测 EGCG 对 Sk-hep1 细胞周期的阻滞作用

Fig. 3 Effect of EGCG on cell cycle of Sk-hep1 cells detected by flow cytometry

* $P < 0.05$ vs control group, ** $P < 0.01$ vs control group

2.4 EGCG 对肝癌 HO-1、IL-10 及 TNF- α mRNA 表达的影响

Real-time PCR 法检测 61.3 $\mu\text{g/ml}$ EGCG 作用 48 h 后, Sk-hep1 细胞 HO-1、IL-10 及 TNF- α mRNA 表达水平。结果显示, 实验组的 HO-1 mRNA 的相对表达水平较对照组降低 [(0.58 \pm 0.15) vs (1.00 \pm 0.00)], 而 IL-10 和 TNF- α mRNA 的相对表达水平较对照组增高 [(5.91 \pm 1.11)、(5.29 \pm 1.14) vs (1.00 \pm 0.00)], 差异均有显著统计学意义 ($P < 0.01$)。可见, EGCG 能在 mRNA 水平下调 HO-1 的表达、上调 IL-10 和 TNF- α 的表达。

2.5 EGCG 对肝癌细胞 HO-1、IL-10 及 TNF- α 蛋白表达的影响

进一步采用 Western blotting 法检测 HO-1、IL-10 和 TNF- α 蛋白表达水平, 以 β -actin 为内参照。结果 (图 4) 显示, 实验组 HO-1 蛋白相对表达量明显低于对照组 [(0.16 \pm 0.04) vs (0.33 \pm 0.08)], $P < 0.05$], 而 IL-10 和 TNF- α 蛋白相对表达量明显高于对照组 [(0.42 \pm 0.06) vs (0.24 \pm 0.08)], (0.95 \pm 0.17) vs (0.58 \pm 0.08); 均 $P < 0.05$)。可见, EGCG 作用于 Sk-hep1 细胞后在蛋白水平引起的改变与基因水平改变一致, 能促进 HO-1 的表达同时抑制 IL-10 和 TNF- α 的表达。

3 讨论

EGCG 是绿茶提取物儿茶素中含量最高且生物活性最强的一种水溶性成分, 具有抗氧化、清除自由基、抗突变和抗肿瘤等多种生物学活性和药理效应 [4]。在治疗剂量内, EGCG 对正常肝组织及肝细胞无明显不良反应 [5]。EGCG 具有诱导肿瘤细胞凋亡、阻止肿瘤细胞浸润和转移的作用, 如抑制胃癌 [6]、结直肠癌 [7] 的生长及转移、降低膀胱癌的发生率 [8]、改善乳腺癌的预后 [9] 等。本研究选用了

HepG2、Sk-hep1 和 SMMC7721 三种肝癌细胞株, 观察 EGCG 对肝癌细胞株的作用效果, 结果显示, 随着药物浓度的增高, EGCG 对这 3 种肝癌细胞株的抑制率不断增高, 且在作用 24、48 和 72 h 的不同时间点, 相同浓度的 EGCG 在 48 h 的抑制率比 24 h 明显增高, 但与 72 h 无显著差异, 说明 EGCG 也能明显抑制肝癌细胞的增殖。本研究结果还显示, EGCG 能诱导肝癌细胞凋亡, 可使 Sk-hep1 细胞周期明显阻滞在 G₂/M 期, 直接影响细胞进入下一个增殖周期。

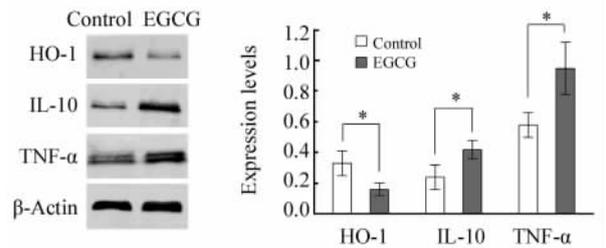


图 4 EGCG 作用后 Sk-hep1 细胞中某些蛋白的表达

Fig. 4 Some proteins expression in Sk-hep1 cells after EGCG treatment

* $P < 0.05$ vs control group

EGCG 的抗肿瘤机制目前尚未十分明确, 有学者在体外实验中证实, 一定浓度的 EGCG 对 MDA-MB-231 细胞的侵袭和转移有明显的抑制作用, 其机制可能与去糖基化相关 [10]。此外, EGCG 可以使人结肠癌 HCT-116 细胞和高侵袭性肺癌 CL1-5 细胞生长分别停滞在 G₀/G₁ 期和 G₂/M 期, 且阻滞细胞的数量和 EGCG 的药物浓度呈正相关, 其机制可能为 EGCG 抑制了细胞从 G₀/G₁ 期向 S 期及从 G₂/M 期返回 G₀/G₁ 期过渡的中间产物的合成, 从而导致细胞无法正常分化而凋亡 [11-12]。由此可见, EGCG

的抗肿瘤作用可能是多种机制共同作用的结果,且对不同来源的肿瘤细胞可能有不同的作用机制。

高浓度的 EGCG 能通过抑制 HO-1 的过表达来诱导肺癌细胞株 A549 凋亡^[3]。HO-1 广泛存在于哺乳动物体内,是生物体内催化血红素分解的限速酶之一,有着重要的生物学作用^[13-14]。HO-1 作为一种高度保守的应激酶,可以保护正常器官、组织和细胞免受各种外来刺激和病理因素的损伤^[15],同时,HO-1 也具有促进细胞增殖和抗凋亡功能,这点在肿瘤细胞中尤为明显。当凋亡缺陷或对凋亡抵抗力增强时,可致癌变发生。肝癌^[16]、黑色素瘤^[17]、卵巢癌及前列腺癌^[18]等均能发现 HO-1 高表达;而由化学药物、细胞因子等因素诱导 AH136B 肝癌细胞和 SW480 结肠癌细胞高表达 HO-1 后,可明显促进肿瘤细胞增殖并减少细胞凋亡^[19]。相反,抑制 HO-1 表达,可明显抑制肿瘤细胞增殖、诱导细胞凋亡^[20]。因此,HO-1 抗肿瘤细胞凋亡的功能使其成为肿瘤治疗的潜在靶点。由于 HO-1 在肿瘤炎症反应中能抑制 TNF- α 和 IL-10 等炎症因子的产生,因此,本研究进一步检测肝癌细胞中 HO-1 及其炎症通路的相关分子 TNF- α 、IL-10 的 mRNA 和蛋白的表达。结果显示,EGCG 能明显抑制肝癌细胞增殖并诱导肝癌细胞凋亡,且 HO-1 的 mRNA 和蛋白表达均受到明显抑制,而 HO-1 调控的炎症因子 TNF- α 和 IL-10 的 mRNA 和蛋白表达均因其被抑制而显著增高。提示 EGCG 抗肝癌作用与抑制 HO-1 的表达有关,HO-1 可能是 EGCG 作用的靶点之一。而 EGCG 是如何调控 HO-1 信号通路产生抗肝癌作用则有待进一步中探讨。

综上,本研究证实了 EGCG 对肝癌细胞具有抑制增殖、诱导凋亡及周期阻滞的作用效果,并进一步探讨其抑癌机制可能与调控 HO-1、IL-10、TNF- α 等信号分子表达有关,为阐明 EGCG 对肝癌细胞发生、发展的作用机制提供了新的思路。

[参 考 文 献]

- [1] 夏玉玲. 中药治疗肝癌的作用机制研究进展 [J]. 亚太传统医药, 2012, 8(6): 216-217.
- [2] Manohar M, Fatima I, Saxena R, et al. (-)-Epigallocatechin-3-gallate induces apoptosis in human endometrial adenocarcinoma cells via ROS generation and p38 MAP kinase activation [J]. J Nutr Biochem, 2013, 24(6): 940-947.
- [3] Kweon MH, Adhami VM, Lee JS, et al. Constitutive overexpression of Nrf2-dependent heme oxygenase-1 in A549 cells contributes to resistance to apoptosis induced by epigallocatechin 3-gallate [J]. J Biol Chem, 2006, 281(44): 33761-33772.
- [4] Lambert JD, Elias RJ. The antioxidant and pro-oxidant activities of green tea polyphenols: A role in cancer prevention [J]. Arch

- Biochem Biophys, 2010, 501(1): 65-72.
- [5] Lamber JD, Kennett MJ, Sang S, et al. Hepatotoxicity of high oral dose (-)-epigallocatechin-3-gallate in mice [J]. Food Chem Toxicol, 2010, 48(1): 409-416.
- [6] 朱宝和, 詹文华, 贺德, 等. EGCG 对肿瘤生物抑制机制影响的探讨 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2008, 15(20): 1552-1556.
- [7] Chiou YS, Ma NJ, Sang S, et al. Peracetylated (-)-epigallocatechin-3-gallate (AcEGCG) potently suppresses dextran sulfate sodium-induced colitis and colon tumorigenesis in mice [J]. J Agric Food Chem, 2012, 60(13): 3441-3451.
- [8] Boehm K, Borrelli F, Ernst E, et al. Green tea (camellia sinensis) for the prevention of cancer [J]. Cochrane Database Syst Rev, 2009(3): CD005004.
- [9] Braicu C, Gherman CD, Irimie A, et al. Epigallocatechin-3-Gallate (EGCG) inhibits cell proliferation and migratory behaviour of triple negative breast cancer cells [J]. J Nanosci Nanotechnol, 2013, 13(1): 632-637.
- [10] 邓华瑜, 鲁黎, 范维珂, 等. 茶叶有效成分抗肿瘤侵袭转移作用与相关机制探讨 [J]. 中国病理生理杂志, 2005, 21(11): 2174-2177.
- [11] Du GJ, Zhang Z, Wen XD, et al. Epigallocatechin gallate (EGCG) is the most effective cancer chemopreventive polyphenol in green tea [J]. Nutrients, 2012, 4(11): 1679-1691.
- [12] Deng YT, Lin JK. EGCG inhibits the invasion of highly invasive CL1-5 lung cancer cells through suppressing MMP-2 expression via JNK signaling and induces G₂/M arrest [J]. J Agric Food Chem, 2011, 59(24): 13318-13327.
- [13] Pittala V, Salerno L, Romeo G, et al. A focus on heme oxygenase-1 (HO-1) inhibitors [J]. Curr Med Chem, 2013, 20(30): 3711-3732.
- [14] Lundvig DM, Immenschuh S, Wagener FA. Heme oxygenase, inflammation, and fibrosis: The good, the bad, and the ugly? [J]. Front Pharmacol, 2012, 3(1): 81.
- [15] Was H, Dulak J, Jozkowicz A. Hemeoxygenase-1 in tumor biology and therapy [J]. Curr Drug Targets, 2010, 11(12): 1551-1570.
- [16] Sass G, Barikbin R, Tiegs G. The multiple functions of heme oxygenase-1 in the liver [J]. Z Gastroenterol, 2012, 50(1): 34-40.
- [17] Grimm S, Mvondo D, Grune T, et al. The outcome of 5-ALA-mediated photodynamic treatment in melanoma cells is influenced by vitamin C and hemeoxygenase-1 [J]. Biofactors, 2011, 37(1): 17-24.
- [18] Wang S, Avery JE, Hannafon BN, et al. Zinc protoporphyrin suppresses cancer cell viability through a heme oxygenase-1-independent mechanism: The involvement of the Wnt/beta-catenin signaling pathway [J]. Biochem Pharmacol, 2013, 85(11): 1611-1618.
- [19] 谭泽明, 伍莹, 张华莉, 等. CoCl₂ 缺氧诱导 SW480 细胞化疗耐药及其机制 [J]. 中南大学学报: 医学版, 2006, 31(3): 345-349.
- [20] Tanaka S, Akaike T, Fang J, et al. Antiapoptotic effect of haem oxygenase-1 induced by nitric oxide in experimental solid tumour [J]. Br J Cancer, 2003, 88(6): 902-909.

[收稿日期] 2013 - 10 - 30

[修回日期] 2013 - 12 - 18

[本文编辑] 黄静怡