

茶多酚对肺癌 PG 细胞生长的调控研究

陈清勇 王彦刈¹ 周建英² 叶隼¹ 郑筱祥¹ (杭州 310013 杭州市 117 医院肺科; ¹杭州 310006 浙江大学生物医学工程系; ²杭州 310006 浙江大学医学院附属一院呼吸内科)

摘要 目的: 探讨茶多酚对人 PG 细胞生长的影响。方法: 采用 MTT 法体外观察不同浓度茶多酚对 PG 细胞的杀伤作用; 应用激光共聚焦显微镜和流式细胞仪分析, 检测用药后 PG 细胞内 Ca^{2+} 浓度、CD44V6 表达和细胞增殖周期分布的变化。结果: 3 个浓度的茶多酚对 PG 细胞均有杀伤作用, 呈剂量依赖关系。细胞增殖受到明显抑制, 使细胞阻滞于 G0/G1 期, 不能进入 S 期及 G2/M 期, 细胞增殖指数明显下降。细胞内 Ca^{2+} 浓度与对照组相比, 逐渐上升; CD44V6 表达水平则呈逐渐下降。结论: 茶多酚对 PG 细胞的生长具有抑制作用, 其作用机制与改变细胞内 Ca^{2+} 浓度和 CD44V6 表达有关。

关键词 茶多酚; 肺癌细胞; CD44V6 蛋白; 细胞内钙离子浓度; 细胞周期 激光共聚焦显微镜; 流式细胞术

Regulative studies on growth of human high lung tumor cell lines by tea polyphenols

Chen Qingyong, Wang Yanyi, Zhou Jianying *et al* (Department of Pulmonary Disease, The 117th Hospital of PLA, Hang Zhou, 310013.)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To explore the effects of tea polyphenols on growth of PG cell lines. **METHOD:** The in vitro anti-proliferation effects of three different concentration of tea polyphenols on PG cell lines were determined with MTT assay. Laser scanning confocal microscopy and flow cytometry techniques were used to determine the changes of intracellular calcium concentration, CD44V6 protein expression and cell cycle distribution after treatment with tea polyphenols. **RESULTS:** Three different concentrations dose-dependently inhibited the proliferation of PG cell lines. It caused a decline in the proportion of cells in S and G2/M phase, blocked the cell cycle progression in G0/G1 phase and reduced the proliferation index of PG cell lines. Compared with control group, intracellular calcium concentration are gradually increased; the expression of CD44V6 protein are gradually decreased. **CONCLUSION:** Tea polyphenol could inhibit growth of PG cell lines. The mechanism of anti-tumor is associated with the changes of intracellular calcium concentration and the expression of CD44V6 protein.

KEY WORDS Tea polyphenols, Lung neoplasm, Intracellular calcium concentration, CD44V6 protein, Cell cycle, Laser scanning confocal microscopy, Flow cytometry

茶多酚占茶叶干重的 30% 左右, 由 30 多种酚性物质所组成。一些研究表明, 茶多酚对癌症具有良好的化学预防和抑制作用^[1-3]。有关茶多酚抑制肺癌细胞转移的研究文献报道甚少, 本实验采用 MTT 法、激光共聚焦显微镜(LSCM)和流式细胞术, 体外观察茶多酚对高转移性人肺癌细胞的杀伤作用及对细胞增殖周期、细胞内 Ca^{2+} 浓度和黏附分子表达的影响, 进一步探讨其作用机制。

1 材料与方法

1.1 试剂与药物: 茶多酚为中国茶叶研究所产品。M199 培养液(GIBCO 公司), RPMI-1640 培养基(GIBCO 公司)。DMSO, MTT(SIGMA 公司)。鼠抗人单抗 CD44V6, FITC 标记的羊抗鼠 mAb IgG, 为美国 Zymed 公司产品。无关小鼠 mAb IgG, 购于北京中山公司。 Ca^{2+} 荧光探针 Fluo-3AM(SIGMA 公司)。FACsort 流式细胞仪为美国 BD 公司产品。LSCM 为德国 ZEISS 公司产品。

1.2 细胞来源及培养: 高转移性人肺癌细胞株(PG)由浙江省肿瘤研究所提供, 用含 10% 灭活小牛血清的 RPMI-1640 培养液内培养并传代。

1.3 实验分组: 单纯 PG 细胞组(空白对照组); 茶多酚 1 组(100 $\mu\text{g}/\text{m}^1$); 茶多酚 2 组(50 $\mu\text{g}/\text{m}^1$); 茶多酚 3 组(25 $\mu\text{g}/\text{m}^1$)。

1.4 体外噤唑蓝(MTT)法: 取对数生长的人肺癌细胞株(PG 细胞)1.0 $\times 10^6/\text{m}^1$ 分装于 96 孔。设阴性对照组和不同浓度的茶多酚组, 各组设 5 个平行孔, 置 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 72h, 实验终止前 4h 加入 MTT 液, 再培养 4h, 测试前加入 DMSO, 待结晶溶解后置于 570nm 波长处, 型号为 DG3022 酶联检测仪测每孔的吸收度 A 值, 按下列公式求出生长抑制率进行评价。

生长抑制率(%) = (1 - 用药组平均 A 值 / 对照组平均 A 值) $\times 100\%$

1.5 流式细胞仪检测高转移性人肺癌细胞株经茶多酚作用后的细胞增殖周期。 计算细胞周期各时相比比例, 以下列公式计算增殖指数(PI):

$$\text{PI} = (\text{S} + \text{G2/M}) / (\text{G0/G1} + \text{S} + \text{G2/M}) \times 100\%。$$

1.6 流式细胞仪检测肺癌细胞株 CD44V6 的表达: PG 细胞株传代后加入含有茶多酚(100, 50, 25 $\mu\text{g}/\text{m}^1$) 的 RPMI-1640 细胞培养液为茶多酚组, 对照组加入等体积的生理盐水, 培

养 72 h。0.01% 的 EDTA 消化,制成细胞悬液。PBS 洗涤后,加入鼠抗人单抗 CD44V6 20μl,4℃ 孵育 30 min 后,加入 1:40 稀释的羊抗鼠 FITC 抗体 20μl,4℃ 孵育 30 min。FACSORT 流式细胞仪检测,每次实验重复 5 次。

1.7 细胞内 Ca^{2+} 浓度的测定:实验各组培养结束后调细胞浓度为 $2 \times 10^6 / ml$,取 $2 \times 10^6 / ml$ 细胞液离心,弃上清,加 2 ml Hank 液,后加入终浓度为 $10 \mu mol/L$ 的 Ca^{2+} 荧光探针,在 37℃ 水浴中振荡温育 45 min,再用 Hank 液洗涤二次,最后浮在 2 ml 液中。激光共聚焦显微镜检测细胞内 Ca^{2+} 浓度。

1.8 激光共聚焦显微镜测定肺癌细胞株 CD44V6 的表达:单层细胞爬片经 0.01 mmol/L PBS 洗涤,40 mmol/L 多聚甲醛固定 20 min,30 ml/L 正常山羊血清封闭 30 min,充分洗涤,分别加鼠抗人 CD44V6 mAb 37℃ 孵育 1 h, PBS 洗涤 10 min,共 3 次。分别加入 FITC 标记的羊抗鼠 IgG 30 min, PBS 洗涤,无荧光甘油缓冲液封片,在 LSCM 下观察抗原表达情况。

1.9 统计学分析:将以上每次实验重复 5 次后,进行 t 检验。

2 结果

2.1 茶多酚对肺癌 PG 细胞杀伤活性的测定:由表 1 可见,上述 3 个浓度的茶多酚对 PG 细胞均有杀伤活性,50μg/ml 即可表现出明显的杀伤力。且随药物浓度的增加,作用加强。

表 1 不同浓度茶多酚对 PG 细胞的杀伤活性(MTT 法)

分组	$A_{570}(\bar{x} \pm s)$	P 值	杀伤率(%)
对照组	0.972±0.045	-	-
25μg/ml	0.705±0.055	< 0.05	22.5
50μg/ml	0.423±0.046	< 0.01	56.5
100μg/ml	0.274±0.056	< 0.01	71.9

注:不同浓度茶多酚组与对照组相比

2.2 茶多酚对 PG 细胞增殖周期的影响:表 2 显示:经不同浓度茶多酚作用 72h 后,PG 细胞 G2/M 期, S 期细胞比例下降,细胞被阻滞于 G0/G1 期,将不同浓度茶多酚组与对照组相比,细胞增殖指数(PI)逐渐降低。25μg/ml 茶多酚组的 PI 与对照组相比,大致相同。50μg/ml 和 100μg /ml 茶多酚组的 PI 明显低于对照组。

表 2 不同浓度茶多酚对 PG 细胞增殖周期的影响

组别	细胞周期时相分析(%)			PI(%)
	G0/G	S	G2/M	
对照组	45.223	33.317	21.458	54.777
25ug/ml	48.481	32.124	19.401	51.520
50ug/ml	55.601	24.285	20.122	44.402
100ug/ml	67.323	22.867	9.866	22.743

2.3 PG 细胞内 Ca^{2+} 浓度的变化:共聚焦显微镜检测显示,经不同浓度的茶多酚作用 72h 后,细胞内游 Ca^{2+} 浓度发生变化,呈剂量依赖关系(表 3)。

2.4 共聚焦显微镜定位,定量分析 CD44V6 表达:共聚焦显微镜显示 CD44V6 蛋白在 PG 细胞膜上表达,为绿色荧光点,经茶多酚作用后,其膜上的荧光像素产生不同程度的改变,定量分析结果见表 3。

表 3 激光共聚焦显微镜检测细胞内 Ca^{2+} 和 CD44V6 表达

分组	Ca^{2+} 浓度(μmol/L)	P 值	CD44V6	P 值
对照组	71±29		145±33	
25μg/ml	99±17	> 0.05	136±35	> 0.05
50μg/ml	125±25	< 0.01	121±33	< 0.01
100μg/ml	162±30	< 0.01	108±29	< 0.01

注:不同浓度茶多酚组与对照组相比

2.5 流式细胞仪定量测定 CD44V6 表达:结果表明,经不同浓度的茶多酚作用 72h 后,PG 细胞中 CD44V6 蛋白表达水平分别为 125±14,108±12,85±12,与对照组(137±13)相比逐渐下降,呈剂量依赖关系。经统计学分析,25μg/ml 的茶多酚组与对照组相比无显著性差异($P > 0.05$),50μg/ml 和 100μg/ml 的茶多酚组有显著性差异($P < 0.01$)。

3 讨论

茶多酚的抗癌效应已被广泛接受,确切的作用机制目前尚不清楚,一般认为其主要作用为抗氧化,抗突变^[4]。PG 细胞为高转移的人肺癌细胞株,我们选择 PG 细胞为实验细胞,体外观察茶多酚的抗肿瘤作用。MTT 试验显示茶多酚在 25~100μg/ml 浓度之间对 PG 细胞均有杀伤活性,杀伤率分别为 22.5%,56.5% 和 71.9%。50μg/ml 即可表现出明显的杀伤作用,且随药物浓度的增加,作用加强,呈剂量依赖性关系。流式细胞仪检测不同浓度的茶多酚作用 72h 后,PG 细胞周期分布显示:G0/G1 期的比例逐渐增加,细胞周期被阻滞于 G0/G1 期。细胞增殖指数明显下降,呈剂量依赖关系。说明茶多酚可抑制 PG 细胞生长,主要通过阻滞 G1-S 期的转化,影响 DNA 合成,而抑制细胞增殖。

Ca^{2+} 作为细胞的重要信使物质,广泛地调节着细胞的生长、分泌及输送等功能,并可直接地或间接地影响细胞的某些 DNA 复制和 RNA 表达,包括了某些原癌基因及抑癌基因的表达式^[5]。近年来,一些研究表明,细胞内 Ca^{2+} 离子浓度与癌细胞的增殖、凋亡、侵袭和转移相关^[6,7]。细胞内钙离子浓度增高可激活内源性内切酶,导致 DNA 在核小体间降解,从而阻断细胞生长周期的运行。本实验将茶多酚作用于肺癌 PG 细胞后,在细胞内钙离子浓度增高的同时,PG 细胞生长受到抑制,说明茶多酚抗肿瘤作用与其调节细胞内钙离子浓度有关,确切的机制尚不清楚,可能是茶多酚参与调控膜上钙通道的运输系统或上调细胞间隙连接通讯功能等,有待于进一步研究。

CD44V6 是与肿瘤转移密切相关的黏附分子之一,其表达水平反映了肿瘤转移的潜能^[8,9]。Yamamoto 和 Mamoru 等^[10,11]的研究表明,茶多酚能够抑制高转移性人纤维肉瘤和肺癌细胞株通过单层的人体脐静脉内皮细胞及内皮细胞基底膜的侵袭及黏附过程;同时也抑制基质金属蛋白酶 MMP-2 和 MMP-9 酶参与的明胶降解作用,认为茶多酚具有抗肿瘤转移的作用。本实验结果显示:经茶多酚作用 72h 后,共聚焦显微镜上可见细胞膜的绿色荧光点明显减少,流式细胞仪与共聚焦显微镜定量分析所得结果一致。即 CD44V6 表达水平从空白对照组到不同浓度茶多酚组呈逐渐下降。经统计学

分析, 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 茶多酚组与对照组相比无显著性差异($P > 0.05$), 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 和 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的茶多酚组有显著性差异($P < 0.01$)。表明茶多酚可能具有一定的抗肺癌转移作用。

通过研究, 我们认为茶多酚具有抑制 PG 细胞生长的作用。改变 CD44V6 表达和细胞内游离 Ca^{2+} 浓度的变化可能是其抗肿瘤作用的重要机制之一。

参考文献

- 1 Lin JK, Liang YL, Lin shiau SY. Cancer chemoprevention by tea polyphenols through mitotic signal transduction blockade. *Biochem pharmacol*, 1999, 58(6): 911.
- 2 Liang YC, chen YC, Lin YL *et al.* Suppression of extracellular signals and cell proliferation by the black tea polyphenol, theaflavin-3, 3'-digallate. *Carcinogenesis*, 1999, 20(4): 733.
- 3 Yang G, Liao J, Kim K, *et al.* Inhibition of growth and induction of apoptosis in human cancer cell lines by tea polyphenols. *Carcinogenesis*, 1998, 19(4): 611.
- 4 陈清勇, 钱利生, 郭勇. 茶多酚抗肿瘤的分子生物学研究进展. *中国现代应用药学杂志*, 2001, 18(3): 175.
- 5 Mergan J, Curran T. Role of ion flux in the control of c-fos expression. *Nature*, 1986, 322(6079): 552.
- 6 Carson D, Ribeiro J. Apoptosis and disease. *Lancet*, 1993, 341: 1251.
- 7 韩立群, 高进, 董化一, 等. 人鼻咽癌细胞及其不同亚系细胞间缝隙连接通讯功能和维胺酸作用效应的研究. *中华肿瘤杂志*, 1994, 16(5): 345.
- 8 Birch M, Mitchell S, Hart I. Isolation and characterion of human melanoma cell variant expressing high and low levels of CD44. *Cancer Res*, 1991, 51(5): 6660.
- 9 陈清勇, 江中勇, 方宝红, 等. CD44V6 表达与肺癌转移的相关性研究. *实用癌症杂志*, 2001, 16(1): 27.
- 10 Yamamoto MM, Kawahara H, Tahara N. Effect of tea polyphenols on the invasion and matrix metalloproteinases activities of human fibrosarcoma HT1080 cells. *J Agric Food Chem*. 1999, 47(6): 2350.
- 11 Mamoru I, Yasuo S, Ken S, *et al.* Effects of catechins on the mouse lung carcinoma cell adhesion to the endothelial cells. *Cell Biol Int*, 1993, 17(6): 559.

收稿日期: 2001-04-19