

EGCG 通过调控 DNA 结合蛋白 Ku70 促进肺癌细胞凋亡

李晶晶, 徐琦, 罗聪, 陈磊(浙江省肿瘤医院, 杭州 310022)

摘要: 目的 观察表没食子儿茶素没食子酸酯[(-)-epigallocatechin-3-gallate, EGCG]对人肺腺癌细胞株的凋亡诱导作用, 探讨 Ku70 在 EGCG 促肺癌细胞凋亡中的作用机制。方法 构建 pSliencer 4.1-CMV-shKu70 质粒干扰 Ku70 的表达, 建立细胞系; MTT 法和 Annexin V/PI 双染色流式细胞术检测细胞的增殖及凋亡; Western blot 法检测 Bax、caspase-3(17 kDa)、Ku70 蛋白的表达; 免疫共沉淀法检测 Ku70 和 Bax 之间的相互作用。结果 EGCG 可明显抑制 A549 的增殖($P<0.01$), 并诱导其凋亡($P<0.05$), 上调 Bax、caspase-3 表达, 下调 Ku70 表达。抑制 Ku70 的表达后, EGCG 对 A549 细胞的抑制增殖和促进凋亡作用更加明显, 进一步显著上调 caspase-3 的表达($P<0.05$), 但是 Bax 的表达无明显变化; 同时 EGCG 可以减弱 Ku70-Bax 之间的相互作用($P<0.05$)。结论 EGCG 可抑制人肺腺癌细胞增殖及诱导细胞凋亡, 其机制与抑制 Ku70 的表达, 抑制 Ku70-Bax 之间的相互作用, 激活 Bax, 启动 caspase 级联反应有关。

关键词: 肺癌; 凋亡; Ku70; 表没食子儿茶素没食子酸酯

中图分类号: R966 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2019)22-2773-07

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.22.005

引用本文: 李晶晶, 徐琦, 罗聪, 等. EGCG 通过调控 DNA 结合蛋白 Ku70 促进肺癌细胞凋亡[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(22): 2773-2779.

EGCG Induced Apoptosis by Regulating DNA-binding Protein Ku70 in Lung Cancer Cells

LI Jingjing, XU Qi, LUO Cong, CHEN Lei(Zhejiang Cancer Hospital, Hangzhou 310022, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the effect of (-)-epigallocatechin-3-gallate(EGCG) on lung adenocarcinoma cell growth and to explore the mechanism of Ku70 in promoting apoptosis of lung cancer cells by EGCG. **METHODS** Construction of pSliencer 4.1-CMV-shKu70 plasmid interfered with the expression of Ku70 and established cell lines. Induction of apoptosis was examined by MTT method and Annexin V/PI double staining flow cytometry. Western blot analysis was used to detect the protein expression of cleaved Bax, caspase-3(17 kDa) and Ku70. Immunoprecipitation was used to detect the interaction between Ku70 and Bax. **RESULTS** EGCG significantly inhibited the proliferation of A549($P<0.01$), and EGCG could induce apoptosis of A549 cells($P<0.05$), up-regulate the expression of Bax and caspase-3 and down-regulate the expression of Ku70. After the expression of Ku70 was inhibited, the effect of EGCG on the proliferation inhibition and apoptosis promotion of A549 cells was more obvious, and the expression of caspase-3 was further up-regulated, the levels of proteins changes were significantly($P<0.05$), but the Bax level was not significantly changed. At the same time, EGCG could interfere the interaction between Ku70-Bax($P<0.05$). **CONCLUSION** EGCG may inhibit proliferation and induce apoptosis in lung adenocarcinoma cell. The mechanism is related to inhibition of Ku70 expression, inhibition of interaction between Ku70-Bax, activation of Bax, and initiation of caspase cascade.

KEYWORDS: lung cancer; apoptosis; Ku70; (-)-epigallocatechin-3-gallate

肺癌, 尤其是非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC), 是目前全球发病率和病死率均较高的恶性肿瘤^[1], 严重威胁人类的生命健康。研究发现表没食子儿茶素-3-没食子酸酯[(-)-epigallocatechin-3-gallate, EGCG]可以抑制 NSCLC 细胞的浸润和转移, 从而对肺癌起到抑制作用^[2], 但是具体作用机制仍然不明确。1999 年, Featherstone 和他的同事首次发现 Ku70, 其作为 Ku70/Ku80 异源二聚体的组成之一, 在非同源端连接(NHEJ)通路修复 DNA 双链断裂(DSBs)中发

挥重要作用, 主要通过 V(D)J 重组抗体和 T 细胞受体基因起作用^[3]。课题组前期的裸鼠移植瘤实验显示 EGCG 可以抑制肺癌 A549 细胞移植瘤的生长, 其作用机制可能与 Ku70 相关^[4], 但具体机制尚不清楚。本研究旨在通过细胞水平实验探讨 Ku70 在 EGCG 抗肿瘤中的具体作用机制。

1 材料和方法

1.1 细胞株、菌株和质粒载体

肺腺癌 A549 细胞株购于中南大学湘雅医学院细胞库, *E. Coli* DH5 α 菌株和 pSliencer 4.1-CMV

基金项目: 浙江省医药卫生科技计划项目(2016KYA050)

作者简介: 李晶晶, 女, 博士, 主治医师 Tel: (0571)88122062

E-mail: 348519870@qq.com

质粒均由中南大学湘雅医学院肿瘤研究所惠赠。

1.2 药物和试剂

EGCG(批号: 20150726; 纯度: 98%)、二甲亚砜均购于 Sigma 公司; Annexin V 和 PI 双染色法细胞凋亡检测试剂盒(Invitrogen 公司, 批号: 1249572); 兔抗人 Bax 抗体(Cell Signaling Technology, 批号: 5023-4); 兔抗人 caspase-3 抗体(Auragene, 批号: 2016098); 兔抗人 Ku70 抗体(Santa Cruz Biotechnology, 批号: SC-9033)。

1.3 质粒构建

pSliencer 4.1-CMV 质粒具有强大的巨细胞病毒(cytomegalovirus, CMV)启动子, 可在多种细胞类型中驱动发夹 siRNA 模板克隆的高水平表达。其拥有 1 种抗菌药物耐药基因, 通过该基因可以筛选表达 DNA 的转染细胞。pSliencer 4.1-CMV-shku70 载体通过在 pSliencer 4.1-CMV 质粒的 BamH I 和 Hind III 限制性位点之间插入 1 个双寡核苷酸(sh70-1: 5'-GATCCGAGTGAAGATGAGTTGACATTCAAGAGATGTCAACTCATCTTCACTCTGA-3'; sh70-2: 5'-GCTCACTTCTACTCAACTGTAAAGTTCTCTACAGTTGAGTAGAAGTGAGACTTCGA-3'), 可以有条件地表达抑制 Ku70 的 shRNA。该目标序列对应于人类 Ku70 编码序列的核苷酸 156-174。相应的单链 DNA 序列由上海圣工生物工程有限公司合成。单链 DNA 通过 DNA 连接反应制作成双链 DNA, 然后双链 DNA 被用来构建 pSliencer 4.1-CMV 质粒, 构建成功的质粒转染到 *E. Coli* DH5 α 进行扩增, 通过碱性裂解来检测 pSliencer 4.1-CMV 质粒样品, 最后采用限制性内切酶 Hind III 和 Bam HI 对样品进行电泳和测序。

1.4 细胞培养和转染

如课题组前期研究所述^[4], A549 细胞株用含有 10%胎牛血清的 RPMI-1640 培养基进行单层培养, 加入 100 U·mL⁻¹ 青霉素和 100 Ag·mL⁻¹ 链霉素, 培养于含 5%CO₂ 和 95%空气, 37 °C 的培养箱中。A549 细胞株接种于多聚-D-赖氨酸覆盖的 6 孔板中, 接种密度为 6×10⁸·L⁻¹, 细胞增殖到 90% 后根据试剂盒的操作指南通过 SuperFect 转染试剂转染 5 μ g 的 pSilencer 4.1-CMV 质粒, 再通过 G418 对 A549 细胞进行筛选, 以成功获得含有质粒的 A549 细胞。

1.5 细胞凋亡

在固定时间点使用不同浓度的 EGCG 对各组

细胞进行处理。然后将每组细胞分成 2 份, 一份用 MTT 法检测 EGCG 对人肺癌 A549 细胞的增殖情况, 另一份用 Annexin V/PI 双染色流式细胞术检测细胞凋亡。综合分析不同浓度、不同作用时间点 EGCG 对 A549 细胞增殖凋亡的影响。

1.6 Western blotting 法检测蛋白表达量

采用 Western blotting 法检测每组细胞中的蛋白表达情况。首先对处理后的细胞提取总蛋白, 然后测定蛋白浓度, 用 Western blotting 法分析蛋白的表达水平。细胞溶解产物中的等量蛋白(40 μ g)进行 SDS-PAGE 电泳, 然后转移到 PVDF 膜上, 封闭非特异性结合位点, 在 4 °C 条件下用一抗孵育过夜, 二抗室温孵育 1 h, 最后用增强化学发光检测系统检测免疫反应条带。

1.7 免疫共沉淀

在测定蛋白浓度后, 将 1 000 μ g 细胞裂解物分 2 份: 一份 100 μ g, 并加入等体积的 2×SDS 上样缓冲液, 混匀后于 100 °C 煮沸变性 10 min, 离心后取 50 μ g 上样, Western blotting 分析细胞全裂解液中的蛋白表达水平; 另一份 900 μ g, 加入 5 μ L 蛋白 A/G 琼脂糖珠和一定量的抗体(1~2 μ g), 用裂解液补至终体积 1 mL, 固定于垂直混匀器上缓慢旋转 3 h。之后用 1 mL 裂解液洗涤琼脂糖珠 3 次, 每次于冷冻离心机 4 °C 下 3 000 r·min⁻¹ 离心 3 min。最后一遍洗完吸去上清, 加入 50 μ L 1×SDS 上样缓冲液, 混匀, 于 100 °C 煮沸 10 min, 离心后取 15 μ L 上样, Western blotting 分析蛋白之间的相互作用情况。

1.8 统计学分析

所用的数据均采用 SPSS 10.0 进行统计学分析, 数据采用 $\bar{x} \pm s$ 的形式表示, Student's *t*-test 用于检测 2 组间的差异, SNK-q test 用于比较多组间的差异, *P*<0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 EGCG 诱导 A549 细胞凋亡

用 MTT 法和 Annexin V/PI 双染色流式细胞术检测在不同时间点(24, 48, 72 h)用不同浓度 EGCG(0, 20, 40, 60, 80, 100 μ mol·L⁻¹)处理后的 A549 细胞的增殖凋亡情况。MTT 法结果显示, 与 EGCG 0 μ mol·L⁻¹ 相比, EGCG 40 μ mol·L⁻¹ 24 h 时 A549 细胞的生长明显受到抑制[OD 值: (0.595±0.006) vs (0.683±0.012), (*P*<0.01)], 在 48 h 和 72 h 后抑制作用更加明显[OD 值: (0.525±0.020) vs (0.728±0.011), *P*<0.01; OD 值: (0.449±0.036) vs

(0.746 ± 0.032), $P < 0.01$]。其他剂量组也随着作用时间的延长呈上升趋势,表现出明显的时间效应关系($P < 0.05$)。Annexin V/PI 双染色流式细胞术显示不同浓度组 EGCG(0, 40, 80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)作用于 A549 细胞 24 h 后,对照组的细胞早期凋亡率是 3.15%, EGCG 处理 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组的凋亡率是 5.63%, 80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理组的凋亡率是 7.51%; 不同浓度处理组与对照组的细胞凋亡率相比差异有统计学意义($P < 0.05$); 随 EGCG 分组浓度的增加,各组细胞的凋亡率也相应增大,呈剂量依赖性关系。EGCG 作用时间延长至 48 h 后,凋亡率也随之增加($P < 0.05$),其诱导凋亡能力呈时间依赖性。结果见图 1~2。

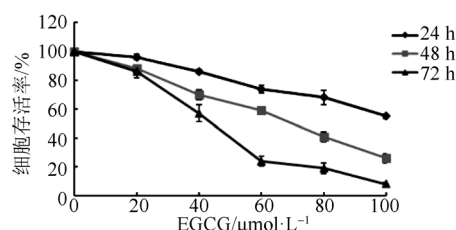


图 1 EGCG 对 A549 细胞存活率的影响

Fig. 1 Effect of EGCG on the survival rate of A549 cells

2.2 EGCG 调节 Bax、Ku70 的表达和 caspase-3 的降解

选择合适的作用时间(24, 48 h)和合适的作用浓度(0, 40, 80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)处理 A549 细胞,处理后的细胞用 Western blot 法检测裂解型 caspase-3、Bax、Ku70 的表达。实验结果显示在 EGCG 0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 作用 24 h 后 caspase-3 和 Bax 蛋白的表达水平较低,随着 EGCG 作用浓度增加到 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, caspase-3 和 Bax 蛋白的表达水平呈升高趋势,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。比较 EGCG 作用 48 h 和作用 24 h 后 2 个蛋白的表达差异,发现 48 h 组的表达水平明显高于 24 h 组。Western blot 结果显示,在处理 24 h 后 0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组 Ku70 蛋白的表达量较高,随着 EGCG 处理浓度的增高,在 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ EGCG 处理组中 Ku70 蛋白的表达量呈减弱的趋势,48 h 组 Ku70 的表达更低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。因此,EGCG 对 caspase-3、Bax 和 Ku70 蛋白的表达水平的调节存在浓度和时间依赖性。结果见图 3。

2.3 EGCG 对转染不同质粒 A549 细胞凋亡的诱导作用

Annexin V/PI 双染法结果显示,不同浓度组

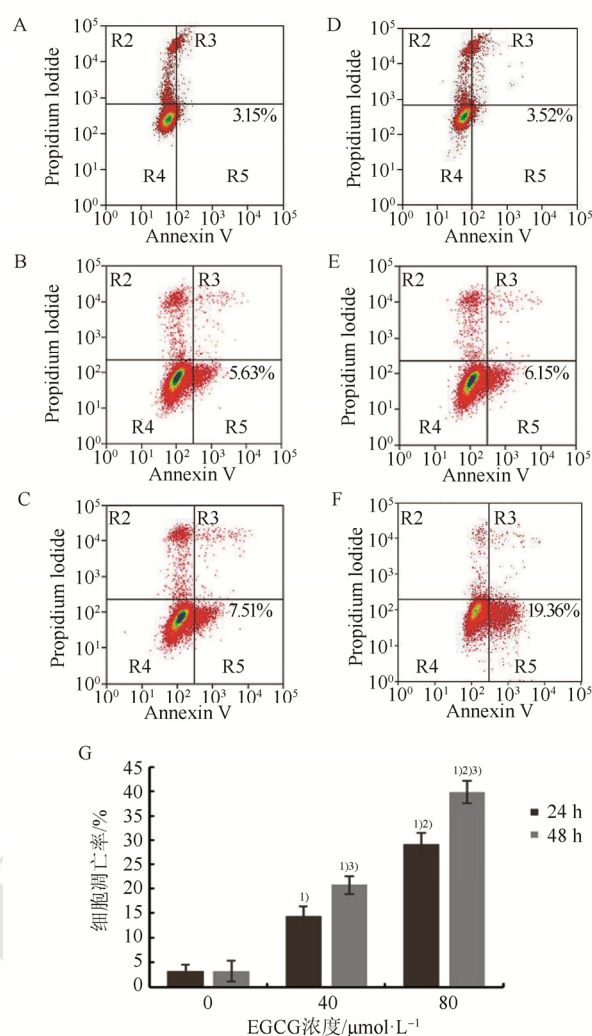


图 2 EGCG 对 A549 细胞凋亡的影响

A-0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 24 h; B-40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 24 h; C-80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 24 h; D-0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 48 h; E-40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 48 h; F-80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 48 h; G-细胞凋亡率柱形图。与同一时间点 0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组比较, ¹⁾ $P < 0.05$; 与同一时间点 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组比较, ²⁾ $P < 0.05$; 与同一浓度的 24 h 组比较, ³⁾ $P < 0.05$ 。

Fig. 2 Effect of EGCG on apoptosis of A549 cells

A-0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 24 h; B-40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 24 h; C-80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 24 h; D-0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 48 h; E-40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 48 h; F-80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 48 h; G-histogram of cell apoptosis rate. Compared with the 0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ group at the same time, ¹⁾ $P < 0.05$; compared with the 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ group at the same point, ²⁾ $P < 0.05$; compared with the same concentration group at 24 h, ³⁾ $P < 0.05$ 。

EGCG(0, 40, 80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)作用于转染不同质粒(空白对照组、空载体组和 Ku70-shRNA 载体组)的 A549 细胞 48 h 后,在同一转染质粒的 A549 细胞中不同浓度的 EGCG 处理细胞早期凋亡率呈现一致的增加趋势。但是比较各组间同一浓度 EGCG 处理细胞后发现, Ku70-shRNA 载体组在不受 EGCG 处理时,细胞的早期凋亡率和其他 2 组是相似的,而在受到 EGCG 的处理后其凋亡率呈现增加的趋势。结果见图 4。

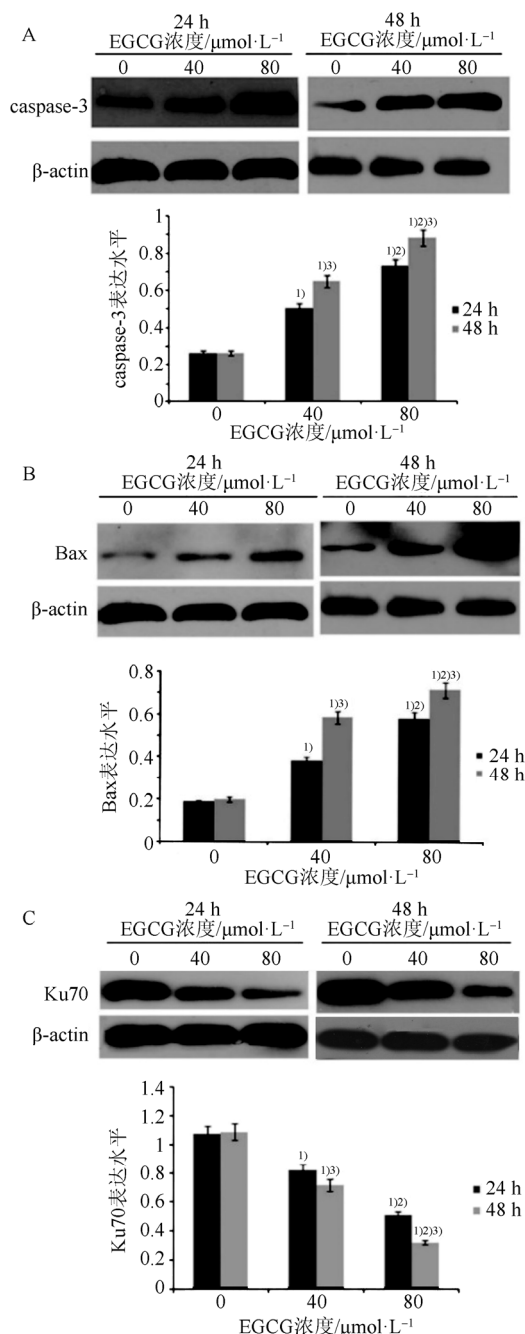


图 3 EGCG 对 caspase-3、Bax 和 Ku70 蛋白表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

与同一时间点 0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组比较, ¹⁾ $P<0.05$; 与同一时间点 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组比较, ²⁾ $P<0.05$; 与同一浓度 24 h 组比较, ³⁾ $P<0.05$ 。

Fig. 3 Effect of EGCG on the expression level of caspase-3, Bax, Ku70 protein ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Compared with the 0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ group at the same time, ¹⁾ $P<0.05$; compared with the 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ group at the same point, ²⁾ $P<0.05$; compared with the same concentration group at 24 h, ³⁾ $P<0.05$.

2.4 EGCG 对转染不同质粒 A549 细胞中 Bax 蛋白的表达和 caspase-3 降解的影响

Western blot 结果显示, 不同浓度 EGCG(0, 40, 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)作用于转染不同质粒(空白对照组、空

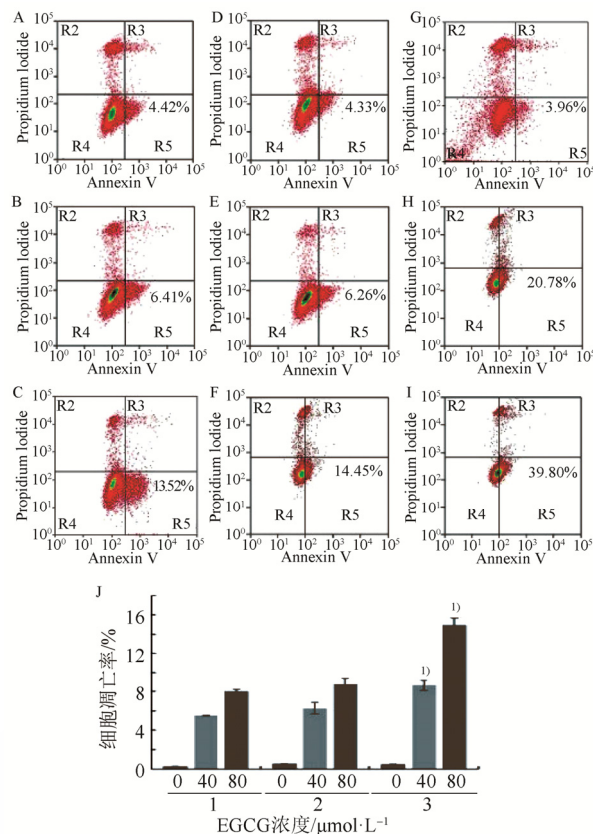


图 4 EGCG 对 A549 细胞凋亡的诱导作用

A-空白对照组, 0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; B-空白对照组, 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; C-空白对照组, 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; D-空载体组, 0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; E-空载体组, 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; F-空载体组, 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; G-Ku70-shRNA 载体组, 0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; H-Ku70-shRNA 载体组, 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; I-Ku70-shRNA 载体组, 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; J-细胞凋亡率柱形图; 1-空白对照组; 2-空载体组; 3-Ku70-shRNA 载体组。与空白对照组相应的 EGCG 浓度组比较, ¹⁾ $P<0.05$ 。

Fig. 4 Induction of EGCG on apoptosis of A549 cells

A-control group, 0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; B-control group, 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; C-control group, 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; D-pSliencer 4.1-CMV plasmid transfection group, 0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; E-pSliencer 4.1-CMV plasmid transfection group, 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; F-pSliencer 4.1-CMV plasmid transfection group, 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; G-pSliencer 4.1-CMV-shKu70 plasmid transfection group, 0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; H-pSliencer 4.1-CMV-shKu70 plasmid transfection group, 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; I-pSliencer 4.1-CMV-shKu70 plasmid transfection group, 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; J-histogram of cell apoptosis rate. 1-control group; 2-pSliencer 4.1-CMV plasmid transfection group; 3-pSliencer 4.1-CMV-shKu70 plasmid transfection group. Compared with the control group treated by the same concentration of EGCG, ¹⁾ $P<0.05$.

载体组和 Ku70-shRNA 载体组)的 A549 细胞 48 h 后, 在同一转染质粒的 A549 细胞中不同浓度的 EGCG 处理细胞 Bax 的蛋白表达和 caspase-3 的降解呈现一致的增加趋势。但是比较各组间同一浓度 EGCG 处理细胞后发现, 各组间细胞 Bax 的蛋白表达的差异无明显的统计学意义。提示 Bax 的表达只受 EGCG 的影响, 而不受 Ku70 表达的影响。而 caspase-3 降解比较各组间同一浓度 EGCG 处理细胞后发现, Ku70-shRNA 载体组在不受 EGCG

处理时, 细胞 caspase-3 和其他 2 组是相似的, 而在受到 EGCG 的处理后其凋亡率呈现增加的趋势, 差异有统计学意义($P<0.05$)。结果见图 5。

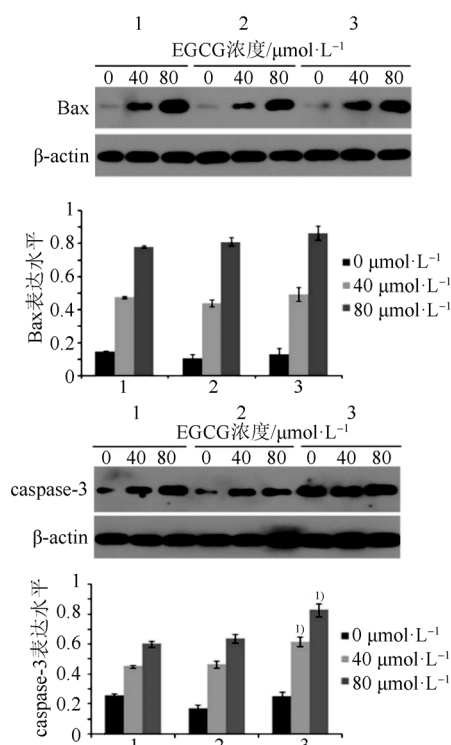


图 5 EGCG 对 Bax 和 caspase-3 蛋白表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

1-空白对照组; 2-空载体组; 3-pSliencer 4.1-CMV-shKu70 组; 与空白对照组相应的 EGCG 浓度组比较, $^{1)}P<0.05$ 。

Fig. 5 Effect of EGCG on the expression level of Bax and caspase-3 protein ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

1-control group; 2-pSliencer 4.1-CMV plasmid transfection group; 3-pSliencer 4.1-CMV-shKu70 plasmid transfection group; compared with the control group treated by the same concentration of EGCG, $^{1)}P<0.05$.

2.5 EGCG 干扰 Ku70-Bax 之间的相关作用

上述研究结果提示 EGCG 可以促进 Bax 表达的增加, 但是 Ku70 的缺失对 EGCG 对 Bax 的作用不明显。有文献提示 Ku70 和 Bax 之间通过蛋白与蛋白直接的结合形成二聚体, 从而 Ku70 可以抑制 Bax 的后续促凋亡作用。因此, 本研究就 EGCG 是否可以干扰 Ku70 和 Bax 之间的相互作用进行了验证。分别用浓度为 0, 40, 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 EGCG 作用于 A549 细胞 24 h 和 48 h 后, 免疫共沉淀结果显示, 在处理 24 h 后 0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组 Ku70 蛋白和 Bax 蛋白的相互作用较强, 随着 EGCG 处理浓度的增高, 在 40, 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ EGCG 处理组中两者的相互作用呈现出减弱的趋势。与此同时, 在 24 h 和 48 h 不同的时间点同一作用浓度的 EGCG 处理

下, 两者的相互作用随着作用时间的延长而逐渐减弱。结果见图 6。

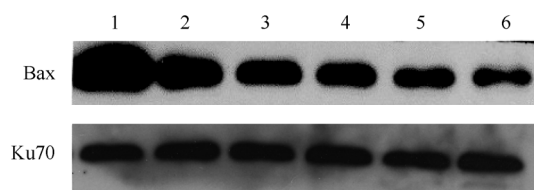


图 6 EGCG 对 Bax-Ku70 蛋白相互作用的影响

1-0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 24 h; 2-40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 24 h; 3-80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 24 h; 4-0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 48 h; 5-40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 48 h; 6-80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 48 h。

Fig. 6 Effect of EGCG on the interaction of Bax-Ku70 protein

1-0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 24 h; 2-40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 24 h; 3-80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 24 h; 4-0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 48 h; 5-40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 48 h; 6-80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 48 h.

3 讨论

大量的动物实验显示, 绿茶可以抑制不同器官肿瘤的发生发展。研究显示 EGCG 具有抗氧化、抗炎及抗基因突变的作用^[5-8], 且大型的人群流行病学调查证实, 长期大量饮用绿茶的人群乳腺癌^[9]、胃癌^[10]、肠癌^[11]等肿瘤的发生率较低。绿茶药食同源, 其在预防肿瘤和杀伤肿瘤细胞的同时, 对正常细胞的不良反应轻微。Kang 等^[12]研究显示, 25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 EGCG 可以有效抑制儿童 Ewing 氏肉瘤细胞 TC32 和 TC71 细胞株的生长, 但是对正常人微血管内皮细胞(HBMEC)的影响轻微, 甚至把 EGCG 的浓度增加到 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 也是如此。另一个相似的研究^[13]也证明 EGCG 对肾上腺癌 NCI-H926 细胞有抑制杀伤作用, 但是对正常人胚胎皮肤细胞无损伤。进一步的研究认为 EGCG 在正常肠上皮细胞和结肠癌细胞中表现出不同的遗传和细胞学效应^[14], 一方面可以促进肿瘤细胞凋亡, 另一方面对正常细胞有凋亡保护作用。基于 EGCG 的药理学活性及低毒特性, 其有望成为新的抗癌药物。

课题组前期研究^[4]发现绿茶中的主要成分 EGCG 可以有效抑制肺癌 A549 细胞在裸鼠移植瘤模型中的生长, 但是具体机制不甚明了。凋亡是控制细胞死亡, 调节组织稳态的主要步骤。Bcl-2 蛋白家族在细胞凋亡中起到了重要作用^[15], 其中 Bax 和 Bad 具有促进凋亡的作用, 而 Bcl-2 和 Bcl-xl 具有抑制细胞凋亡的作用^[16]。研究表明 EGCG 对胆管癌 HuCC-T1 细胞的促凋亡作用主要是通过上调 Bax 的表达, 下调 Bcl-2 的表达实现的^[17]。另外,

EGCG 可以在皮肤癌细胞中通过增加 Bax : Bcl-xl 比值、降解 caspase-3、caspase-8、caspase-9 和聚腺苷二磷酸核糖聚合酶和富集 subG1 细胞来增强细胞凋亡^[18]。这和本研究中的结果是一致的, 本研究显示 EGCG 可以上调 Bax 的表达及促进 caspase-3 的降解从而促进肺癌 A549 细胞的凋亡。

研究后续就 EGCG 对 Ku70 的作用进行了验证。Ku70 基因位于 22q13, 编码 609 个氨基酸, 相对分子质量约 69 kD, 广泛存在于人及哺乳动物的各种组织中。它是 Ku 蛋白的成分之一, 与 DNA 依赖性蛋白激酶结合形成 DNA 依赖性蛋白激酶复合物, 与 Ku80 形成二聚体在 DNA 修复中发挥作用, 其通过 NHEJ 途径来修复 DNA 双链断裂^[3]。Ku70 是 DNA 结合蛋白, 参与了 DNA 的转录调节, 亦可独立参与修复细胞 DNA 的损伤并具有抗细胞凋亡的作用。随着研究的深入, 人们发现 Ku70 参与了各种肿瘤发生发展的过程。研究表明, Ku70 在肿瘤组织中的表达强于正常组织, 且与肿瘤的恶性程度正相关^[19], 与患者生存指数负相关^[20]。Ku70 可以逆转人肺腺癌细胞对吉西他滨的耐药性^[21], Ku70 封闭后的宫颈癌 Hela 细胞对顺铂的敏感性明显增强^[22], 相反 Ku70 的过表达可以增强肿瘤细胞对放化疗的耐受性, 通过检测患者肿瘤细胞中 Ku70 的表达量可以预测患者后续放化疗的敏感性, 同时也发现了多种现今使用的化疗药物也可以通过下调 Ku70 的表达来实现其抗肿瘤的作用。因此, Ku70 将有可能成为今后抗肿瘤药物作用的新靶点。

本研究结果提示 EGCG 可以有效地抑制 Ku70 的表达。利用 shRNA 干扰 Ku70 的表达, 一方面可以增强 EGCG 对 A549 细胞的抑瘤作用, 但是另一方面却发现 Ku70 的干扰对 Bax 的表达无明显影响, 这与课题组之前推测的 Ku70 下调致 Bax 表达上调的假设相矛盾。在 2003 年, Swada 等^[23]首次发现 Ku70 可以与 Bax 相结合, 并通过调节这种蛋白与蛋白结合的形式来调节细胞的凋亡。Luo 等^[24]的研究显示在胶质瘤细胞中, Ku70 和 Bax 之间的相互作用可以受 Sirt3 的调节更加稳定, 从而抑制细胞的凋亡。在神经母细胞瘤中, Ku70 可以与 Bax 相结合, 抑制 Bax 的活性, 在 HDAC6 抑制剂或其他药物的作用下, Bax 可以从 Ku70-Bax 复合物中解离, 致 Bax 活化, 激活后续的促进凋亡的信号通路, 促进神经母细胞瘤细胞的凋亡^[25]。有研究者发现植

物提取物芹黄素可以通过抑制 Ku70-Bax 的相互作用从而诱导前列腺细胞的凋亡^[26]。那么假设 EGCG 是否也可以通过干扰 Ku70-Bax 的相互作用从而诱导肺癌 A549 细胞的凋亡, 因此本研究利用免疫共沉淀的方法检测 A549 细胞在 EGCG 作用下对 Ku70-Bax 相互作用的影响。研究结果提示 EGCG 通过干扰 Ku70-Bax 之间的相互作用从而诱导细胞的凋亡, 为 EGCG 诱导肿瘤凋亡提供了新的机制假说。

4 结论

本研究结果提示 EGCG 在离体环境下可以抑制 A549 细胞的增殖, 促进细胞的凋亡, 其机制是 EGCG 抑制 Ku70 的表达, 抑制 Ku70-Bax 之间的相互作用, 从而激活 Bax, 启动 caspase 级联反应, 最终导致细胞的凋亡。但是其中具体的机制有待进一步的研究和探讨。

REFERENCES

- [1] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394-424.
- [2] SHI J L, LIU F, ZHANG W Z, et al. Epigallocatechin-3-gallate inhibits nicotine-induced migration and invasion by the suppression of angiogenesis and epithelial-mesenchymal transition in non-small cell lung cancer cells [J]. Oncol Rep, 2015, 33(6): 2972-2980.
- [3] FEATHERSTONE C, JACKSON S P. Ku, a DNA repair protein with multiple cellular functions ? [J]. Mutat Res, 1999, 434(1): 3-15.
- [4] LI J J, GU Q H, LI M, et al. Role of Ku70 and Bax in epigallocatechin-3-gallate-induced apoptosis of A549 cells *in vivo* [J]. Oncol Lett, 2013, 5(1): 101-106.
- [5] ABD EL-RAHMAN S S, SHEHAB G, NASHAAT H. Epigallocatechin-3-gallate: the prospective targeting of cancer stem cells and preventing metastasis of chemically-induced mammary cancer in rats [J]. Am J Med Sci, 2017, 354(1): 54-63.
- [6] SHI J, DENG H P, PAN H C, et al. Epigallocatechin-3-gallate attenuates microcystin-LR induced oxidative stress and inflammation in human umbilical vein endothelial cells [J]. Chemosphere, 2017(168): 25-31.
- [7] KUO C L, CHEN T S, LIOU S Y, et al. Immunomodulatory effects of EGCG fraction of green tea extract in innate and adaptive immunity Via T regulatory cells in murine model [J]. Immunopharmacol Immunotoxicol, 2014, 36(5): 364-370.
- [8] HUANG L, LIU J J, DONG L H, et al. Protective effect of epigallocatechin gallate on ischemia-reperfusion injury [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2016, 33(6): 716-721.
- [9] BAKER K M, BAUER A C. Green tea catechin, EGCG, suppresses PCB 102-induced proliferation in estrogen-sensitive breast cancer cells [J]. Int J Breast Cancer, 2015, 2015: 163591.
- [10] PARK J S, KHOI P N, JOO Y E, et al. EGCG inhibits

- recepteur d'origine nantais expression by suppressing Egr-1 in gastric cancer cells [J]. *Int J Oncol*, 2013, 42(3): 1120-1126.
- [11] KUMAR N, SHIBATA D, HELM J, et al. Green tea polyphenols in the prevention of Colon cancer [J]. *Front Biosci*, 2007, 12: 2309-2315.
- [12] KANG H G, JENABI J M, LIU X F, et al. Inhibition of the insulin-like growth factor I receptor by epigallocatechin gallate blocks proliferation and induces the death of Ewing Tumor cells [J]. *Mol Cancer Ther*, 2010, 9(5): 1396-1407.
- [13] WU P P, KUO S C, HUANG W W, et al. (-)-Epigallocatechin gallate induced apoptosis in human adrenal cancer NCI-H295 cells through caspase-dependent and caspase-independent pathway [J]. *Anticancer Res*, 2009, 29(4): 1435-1442.
- [14] NI J, GUO X H, WANG H, et al. Differences in the effects of EGCG on chromosomal stability and cell growth between normal and Colon cancer cells [J]. *Molecules*, 2018, 23(4): E788.
- [15] DEVERAUX Q L, SCHENDEL S L, REED J C. Antiapoptotic proteins. The bcl-2 and inhibitor of apoptosis protein families [J]. *Cardiol Clin*, 2001, 19(1): 57-74.
- [16] ADAMS J M, CORY S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival [J]. *Science*, 1998, 281(5381): 1322-1326.
- [17] KWAK T W, PARK S B, KIM H J, et al. Anticancer activities of epigallocatechin-3-gallate against cholangiocarcinoma cells [J]. *Onco Targets Ther*, 2017(10): 137-144.
- [18] BALASUBRAMANIAN S, ADHIKARY G, ECKERT R L. The Bmi-1 polycomb protein antagonizes the (-)-epigallocatechin-3-gallate-dependent suppression of skin cancer cell survival [J]. *Carcinogenesis*, 2010, 31(3): 496-503.
- [19] SAYGILI U, GORKAY I B, KOYUNCUOGLU M, et al. The relationship between expression of Ku70 and survival in irradiated patients with endometrial carcinoma [J]. *Gynecol Oncol*, 2004, 95(3): 518-522.
- [20] GASINSKA A, BIESAGA B, WIDLA A J, et al. Positive effect of single nucleotide RAD51 135G >C polymorphism and low Ku70 protein expression on female rectal cancer patients survival after preoperative radiotherapy [J]. *Turk J Gastroenterol*, 2019, 30(1): 3-14.
- [21] BUSSE B, SANCEY L, JOSSERAND V, et al. Amphiregulin promotes resistance to gefitinib in nonsmall cell lung cancer cells by regulating Ku70 acetylation [J]. *Mol Ther*, 2010, 18(3): 536-543.
- [22] TIAN X Y, CHEN G, XING H, et al. The relationship between the down-regulation of DNA-PKcs or Ku70 and the chemosensitization in human cervical carcinoma cell line HeLa [J]. *Oncol Rep*, 2007, 18(4): 927-932.
- [23] SAWADA M, SUN W Y, HAYES P, et al. Ku70 suppresses the apoptotic translocation of Bax to mitochondria [J]. *Nat Cell Biol*, 2003, 5(4): 320-329.
- [24] LUO K, HUANG W, TANG S. Sirt3 enhances glioma cell viability by stabilizing Ku70-BAX interaction [J]. *Onco Targets Ther*, 2018(11): 7559-7567.
- [25] SUBRAMANIAN C, JARZEMBOWSKI J A, OPIARI A W, et al. HDAC6 deacetylates Ku70 and regulates Ku70-bax binding in Neuroblastoma [J]. *Neoplasia*, 2011, 13(8): 726-734.
- [26] SHUKLA S, FU P F, GUPTA S. Apigenin induces apoptosis by targeting inhibitor of apoptosis proteins and Ku70-Bax interaction in prostate cancer [J]. *Apoptosis*, 2014, 19(5): 883-894.

收稿日期: 2019-02-26

(本文责编: 沈倩)