

茶多酚体外诱导人肺癌细胞凋亡的机理研究

谢 珏¹ 陈清勇² 周建英¹ 王彦刈³ 杨 凌² 江中勇²

摘要 目的 探讨茶多酚诱导人肺癌细胞的凋亡作用及其相关机理。方法 采用 MTT 法、激光共聚焦显微镜和流式细胞仪技术,体外观察茶多酚对肺癌细胞凋亡及相关蛋白表达的影响。结果 不同浓度的茶多酚(50、100、200、400 $\mu\text{g}/\text{ml}$)对肺癌细胞均有抑制作用,呈剂量依赖关系,抑制率(%)分别为 28.69 ± 1.27 、 46.19 ± 1.79 、 64.61 ± 1.29 、 75.90 ± 1.96 。在细胞增殖受到明显抑制时,细胞被阻滞于 G_0/G_1 期,不能进入S期及 G_2/M 期,同时诱导肺癌细胞凋亡,凋亡率(%)分别为 4.76 ± 0.11 、 5.78 ± 0.38 、 10.06 ± 0.67 、 24.44 ± 0.44 。激光共聚焦显微镜双荧光标记可见细胞凋亡的形态学改变,与对照组比较,随着茶多酚浓度的增高,细胞内 Ca^{2+} 浓度、Annexin V 表达和蛋白酪氨酸磷酸酶基因(PTEN)蛋白表达逐渐增高,细胞周期调控蛋白 D1 蛋白表达水平则呈逐渐下降。结论 茶多酚可诱导人肺癌细胞的凋亡,其作用机制与改变细胞内 Ca^{2+} 浓度、PTEN 蛋白和 Cyclin D1 蛋白表达有关。

关键词 茶多酚;人肺癌细胞;细胞内钙离子浓度;激光共聚焦显微镜;流式细胞术;细胞凋亡;细胞周期调控蛋白 D1;蛋白酪氨酸磷酸酶基因蛋白

Study on Mechanism of Tea Polyphenols in Inducing Human Lung Cancer Cell Apoptosis *in vitro* XIE Jue, CHEN Qing-yong, ZHOU Jian-ying, et al *Department of Respiratory Diseases, First Affiliated Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou (310003)*

Objective To investigate the apoptosis inducing effect of tea polyphenols (TPP) on human lung cancer cell (LCC) and its associative mechanism. **Methods** The apoptosis inducing effect of TPP on LCC *in vitro*, and its influence on expression of the related gene were determined by MTT assay, laser scanning confocal microscopy and flow cytometry. **Results** TPP in different concentration (50, 100, 200 and 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$) had dose-dependent inhibitory effect on LCC, the inhibitory rate was $28.69 \pm 1.27\%$, $46.19 \pm 1.79\%$, $64.61 \pm 1.29\%$, $75.90 \pm 1.96\%$, respectively. The inhibited LCC were blocked in G_0/G_1 phase, and could not transferred to S and G_2/M phase of cell cycle. Meanwhile, TPP could induce apoptosis of LCC, the apoptotic rate being $4.76 \pm 0.11\%$, $5.78 \pm 0.38\%$, $10.06 \pm 0.67\%$, $24.44 \pm 0.44\%$, respectively. Morphologic changes of cells were seen in laser scanning confocal microscopy observation. Compared to the control group, intracellular Ca^{2+} concentration, Annexin V expression, phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten (PTEN) protein and expression gradually increased, while Cyclin D1 protein expression gradually decreased in the TPP treated groups along with the increasing of TPS concentration. **Conclusion** TPP can induce LCC apoptosis, the mechanism is related to the change of intracellular Ca^{2+} concentration, PTEN protein and Cyclin D1 protein expression.

Key words tea polyphenols; human lung cancer cell; intracellular Ca^{2+} concentration; laser scanning confocal microscopy; flow cytometry; cell apoptosis; CyclinD1 protein; phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten protein

近年的研究表明,茶多酚可诱导多种肿瘤细胞凋亡^[1-3],但茶多酚能否诱导人肺癌细胞凋亡,目前的研究文献报道甚少。为进一步探讨肺癌细胞凋亡的分子

机制,寻找新的抗肺癌药物,本实验采用噻唑蓝(MTT)法、激光共聚焦显微镜(LSCM)和流式细胞术,体外观察茶多酚诱导人肺癌细胞的凋亡作用。

基金项目 南京军区医学科研“十五”计划课题(No.02MA025)

材料与方法

作者单位 1. 浙江大学医学院附属第一医院(杭州 310003) 2. 解放军第 117 医院呼吸内科 3. 浙江大学生物医学工程系

通讯作者:陈清勇, Tel:13858065468, E-mail: cqyong117@hotmail.

1 药物与试剂 茶多酚为中国茶叶研究所提供,从绿茶中提取,纯度为 99%。RPMI-1640 培养基(GIBCO 公司产品)。二甲基亚砜(DMSO) MTT

万方数据

(Sigma 公司产品)。鼠抗人单抗蛋白酪氨酸磷酸酶基因(PTEN)和细胞周期调控蛋白 D1(Cyclin D1)异硫氰酸荧光素(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。磷脂酰丝氨酸结合蛋白(Annexin V)-FITC、RNA 酶、碘化丙啶(PI)和 Ca^{2+} 荧光探针 Fluo-3AM (Sigma 公司产品)。FACsort 流式细胞仪为美国 BD 公司产品, LSCM 为德国 ZEISS 公司产品。

2 细胞来源及培养 人肺癌细胞株(A549)由浙江大学生物医学工程系提供(王彦刘博士赠送), 用含 10% 灭活小牛血清的 RPMI-1640 培养液培养并传代。

3 实验分组 空白对照组(单纯肺癌细胞)、茶多酚 1 组(茶多酚 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、茶多酚 2 组(茶多酚 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、茶多酚 3 组(茶多酚 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、茶多酚 4 组(茶多酚 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$)。

4 癌细胞生长抑制测定 采用体外 MTT 法, 即取对数生长的人肺癌细胞株 $1.0 \times 10^6/\text{ml}$ 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℃ 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, 型号为 DG3022 酶联检测仪测定每孔的 OD 值, 按下列公式求出生长抑制率进行评价。

生长抑制率(%) = $(1 - \text{用药组平均 OD 值} \div \text{对照组平均 OD 值}) \times 100\%$

5 细胞凋亡测定 采用流式细胞检测细胞周期及 Annexin V / PI 双标记。经茶多酚作用 72h 后, 取对数生长的人肺癌细胞株 $1.0 \times 10^6/\text{ml}$, 用 PBS 洗涤 2 次, 加入 RNA 酶 200 μl , 水浴 30min, PI 染色 30min, 4℃ 避光 30min, 用流式细胞仪检测。同时收集细胞再加入 Annexin V-FITC 5 μl 和 PI 0.5ml, 室温避光 30min, 用流式细胞仪检测。

6 肺癌细胞株 PTEN 和 Cyclin D1 的表达 采用流式细胞仪检测, 即肺癌细胞株传代后加入含有茶多酚(50、100、200、400 $\mu\text{g}/\text{ml}$)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% EDTA 消化, 制成细胞悬液。PBS 洗涤后, 加入鼠抗人单抗 PTEN 和 Cyclin D1 各 20 μl , 4℃ 孵育 30min 后, 加入 1:40 稀释的羊抗鼠 FITC 抗体 20 μl , 4℃ 孵育 30min。流式细胞仪检测, 每次实验重复 5 次。

7 细胞内 Ca^{2+} 浓度的测定 各实验组培养结束后调细胞浓度为 $2 \times 10^6/\text{ml}$, 取 $2 \times 10^6/\text{ml}$ 细胞液离心, 弃上清, 加 2ml Hank's 液后加入终浓度为 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的 Ca^{2+} 荧光探针, 在 37℃ 水浴中振荡温育 45 min,

再用 Hank's 液洗涤 2 次, 最后浮在 2ml 液中。用激光共聚焦显微镜检测细胞内 Ca^{2+} 浓度。

8 细胞凋亡形态学观察 采用吖啶橙(AO)溴化乙锭(EB)双荧光染色及激光共聚焦显微镜观察, 即用 PBS 配制的 AO(Sigma A-6014)EB(Sigma E-8751)各为 100mg/L 的混合染液, 避光保存于室温或 4℃。取 100 μl 受检细胞悬液, 加 4 μl 上述荧光染色液, 轻轻打匀后, 取细胞悬液一滴滴在洁净玻片上, 加盖玻片后立即置激光共聚焦显微镜下观察细胞凋亡的形态。

9 统计学方法 采用 t 检验。

结 果

1 茶多酚对肺癌细胞的抑制作用 4 个浓度的茶多酚(50、100、200、400 $\mu\text{g}/\text{ml}$)对肺癌细胞均有一定的抑制作用, 抑制率(%)分别为 28.69 ± 1.27 、 46.19 ± 1.79 、 64.61 ± 1.29 、 75.90 ± 1.96 , 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 即可表现出明显的杀伤力, 且随药物浓度的增加, 其作用增强, 经统计学分析差异均有显著性($t = 17.79$ 、 44.23 、 45.03 , $P < 0.01$)。

2 茶多酚作用后肺癌细胞的凋亡情况 经不同浓度茶多酚作用 72h 后, G_0/G_1 期的比例逐渐增加, G_2/M 期、S 期细胞比例下降, 细胞周期被阻滞于 G_0/G_1 期, 经统计学分析, 除了 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 组外, 其他各组与对照组比较差异均有显著性($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。在流式细胞周期分布图上同时也显示, 在 G_0/G_1 期前面可见亚二倍体峰, 为凋亡峰(apoptosis, AP), 说明经茶多酚作用后细胞生长抑制, 主要通过阻滞 G_1 -S 期的转化, 影响 DNA 合成, 从而抑制细胞增殖, 同时也诱导细胞的凋亡, 经统计学分析, 除了 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 组($t = 2.28$, $P > 0.05$)外, 其他各组差异均有显著性($t = 6.24$, 17.33 , 50.13 , $P < 0.01$, 见表 1)。

表 1 不同浓度茶多酚对肺癌细胞周期的影响 (% $\bar{x} \pm s$)

组别	n	细胞周期			AP
		G_0/G_1	S	G_2/M	
对照	5	44.23 \pm 1.21	33.31 \pm 1.04	22.46 \pm 1.13	4.44 \pm 0.29
茶多酚					
50 $\mu\text{g}/\text{ml}$	5	47.48 \pm 1.25	32.12 \pm 1.11	20.40 \pm 1.12	4.76 \pm 0.11
100 $\mu\text{g}/\text{ml}$	5	55.60 \pm 1.31 *	24.28 \pm 1.20 **	20.12 \pm 1.15 *	5.78 \pm 0.38 **
200 $\mu\text{g}/\text{ml}$	5	65.43 \pm 1.29 **	22.17 \pm 1.22 **	12.40 \pm 1.20 **	10.06 \pm 0.67 **
400 $\mu\text{g}/\text{ml}$	5	74.21 \pm 1.09 **	18.47 \pm 1.07 **	7.31 \pm 1.11 **	24.44 \pm 0.44 **

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3 流式细胞仪定量测定 PTEN 和 Cyclin D1 表达 见表 2。与对照组比较, 除茶多酚 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 组外, 随着茶多酚浓度(100 ~ 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$)的升高, 肺癌细胞中 PTEN 蛋白表达水平逐渐升高($P < 0.01$), Cyclin

D1 蛋白表达水平则逐渐下降 ($P < 0.01$)。

4 Annexin V / PI 双标记检测凋亡细胞 见表 2。经茶多酚作用后, Annexin V⁺ / PI⁻ 为凋亡细胞, 不同浓度的茶多酚作用 72h 后, Annexin V 表达明显升高, 呈剂量依赖关系。

5 肺癌细胞内 Ca²⁺ 浓度的变化 见表 2。激光共聚焦显微镜检测显示, 经不同浓度的茶多酚作用 72h 后, 细胞内游离 Ca²⁺ 浓度(荧光强度)发生变化, 呈剂量依赖性关系。

表 2 茶多酚对肺癌细胞中 PTEN 和 Cyclin D1 表达、Annexin V⁺ / PI⁻ 和 Ca²⁺ 浓度的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	PTEN	Cyclin D1 (%)	Annexin V ⁺ / PI ⁻	Ca ²⁺ (荧光强度)
对照	5	13.81 ± 0.27	58.21 ± 0.67	0.38 ± 5.03	53.94 ± 1.13
茶多酚					
50 μg/ml	5	14.20 ± 0.49	57.43 ± 0.58	0.42 ± 5.64	56.16 ± 1.90
100 μg/ml	5	20.40 ± 1.71 *	53.75 ± 0.85 *	0.67 ± 5.41 *	68.22 ± 1.29 *
200 μg/ml	5	27.30 ± 0.81 *	48.72 ± 0.78 *	1.35 ± 6.11 *	78.26 ± 1.09 *
400 μg/ml	5	32.24 ± 1.41 *	43.38 ± 0.86 *	1.91 ± 5.13 *	83.36 ± 1.85 *

注: 与对照组比较, * $P < 0.01$

6 细胞凋亡的形态学改变 激光共聚焦显微镜观察到 EB 为红色, 只能染色死亡细胞核。正常活细胞膜完整, EB 不能渗透, 细胞核不能染色。吖啶橙为绿色, 可用于染色活细胞。对照组可见整个细胞为绿色, 说明为正常活细胞。经茶多酚作用后, 整个细胞背景为绿色, 细胞膜较完整, 细胞核中红色和绿色重合时为黄色, 即为细胞凋亡时的形态学改变(凋亡小体), 偶见少许红色染色, 其中红色染色为死亡细胞碎裂。

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、抗突变及诱导肿瘤细胞凋亡, 尚未见有茶多酚诱导人肺癌细胞凋亡的研究报道^[1-3]。本实验选择人肺癌细胞(A549)为实验细胞, 体外观察茶多酚的抗肿瘤作用。MTT 试验显示 4 个浓度的茶多酚对肺癌细胞均有一定的抑制作用, 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, 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, 同时在 G₀/G₁ 期前面可见亚二倍体峰, 为凋亡峰, 其凋亡率与剂量呈依赖关系。表明茶多酚可抑制人肺癌细胞生长, 其机制主要是通过阻滞 G₁~S 期的转化, 影响 DNA 合成, 从而抑制细胞增殖和诱导细胞凋亡。

Annexin V 是一种分子量为 35~36Kd 的钙依赖脂结合蛋白, 易于与磷脂类如磷脂酰丝氨酸基因

(PS) 结合的特性, 对转向到细胞膜外的 PS 有高度的亲和性。由于 PS 外转到细胞膜外是细胞凋亡过程的早期改变现象, 所以用 FITC 标记 Annexin V 染色能够检测细胞核改变, 如 DNA 碎片更早地辨别凋亡细胞。但是由于坏死细胞膜上也存在有 PS 的外转, 也可被 Annexin V 染色。单独应用 Annexin V 染色, 仍然不能将凋亡与坏死细胞分辨开来。所以应用 FITC 标记 Annexin V 染色, 结合 PI 对凋亡细胞进行双染色, 即可区别凋亡细胞与坏死细胞, 其中 Annexin V⁺ / PI⁻ 为凋亡细胞, Annexin V⁺ / PI⁺ 为死细胞, Annexin V⁻ / PI⁻ 为活细胞。此方法是目前用来评价凋亡的一种定量方法, 也是用于检验流式细胞周期分布图上显示 G₀/G₁ 期前面可见亚二倍体峰是否为凋亡峰的一种定量方法。本实验经不同浓度的茶多酚作用 72h 后, Annexin V⁺ / PI⁻ 表达明显升高, 呈剂量依赖关系, 与流式细胞仪检测的凋亡峰相一致, 说明茶多酚可诱导人肺癌细胞凋亡。

Ca²⁺ 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^[4]。近年来, 一些研究表明, 细胞内 Ca²⁺ 浓度与癌细胞的增殖、凋亡、侵袭和转移相关^[4,5]。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及促进细胞凋亡。本实验将茶多酚作用于肺癌细胞后, 在细胞内钙离子浓度增高的同时, 肺癌细胞生长受到抑制, 说明茶多酚诱导肺癌细胞凋亡与其调节细胞内钙离子浓度有关, 其机制可能是茶多酚参与调控细胞膜上钙通道的运输系统或启动细胞凋亡的信号传导通路等, 有待于进一步研究。

PTEN 是一个具有双特异磷酸酶活性的抑癌基因, 其蛋白活性影响细胞和细胞外基质的相互作用及细胞间黏附功能。新近研究提示 PTEN 编码一个定位于胞质的磷酸酯酶, 通过阻断磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B 通路, 使局灶性粘着斑激酶去磷酸化, 下调 Ras 介导的丝裂酶原激活蛋白激酶活化而干扰细胞信号传导, 使细胞周期被阻滞于 G₁ 期, 并使其对凋亡敏感, 从而对肿瘤细胞的生长增殖、浸润和迁移等多方面起调控作用^[6,7]。Cyclin D1 在细胞周期调控中起重要作用, 在 G₁ 期细胞周期依赖激酶(CDK₄)与 Cyclin D1 结合而活化, 活化的 CDK₄ 可使视网膜母细胞瘤(RB)磷酸化, 失去抑制转录调控因子(E2 factor, E2F)启动 DNA 合成作用, 使细胞通过 G/S 限制点, 促进细胞的生长和增殖。在多种肿瘤细胞均有 Cyclin

D1 基因扩增和蛋白表达增强^[8,9]。本实验将茶多酚作用于肺癌细胞后,与空白对照组比较,PTEN 表达水平逐渐增高,Cyclin D1 表达水平逐渐降低,并呈剂量依赖性关系。表明茶多酚可能通过上调 PTEN 的表达,调节其下游包括 Cyclin E/D、CDKs 和细胞周期依赖激酶抑制物(CKIs)等活性,继而调控 Rb 和 p53 依赖或非依赖等途径;下调 Cyclin D1 表达,可阻滞细胞周期从 G₁ 期向 S 期运转,两者协同抑制细胞生长,并诱导细胞凋亡。但是茶多酚是否会影响细胞其它信号通路传导的改变,究竟哪条信号通路的改变起最主导作用,目前尚不清楚,需进一步研究。

本实验同时应用激光共聚焦显微镜双荧光标记法(吖啶橙/EB 方法)观察肺癌细胞凋亡的形态学改变,结果显示随着茶多酚浓度的升高,肺癌细胞内红色和绿色重合为黄色的程度增加,即凋亡的程度增加。我们认为应用激光共聚焦显微镜双荧光标记法观察肺癌细胞凋亡的形态学改变具有快速、高灵敏等优势。

通过研究,我们认为茶多酚具有抑制肺癌细胞生长及诱导凋亡的作用,改变 PTEN 和 Cyclin D1 表达和细胞内游离 Ca²⁺ 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 YC, Lin-Shiau SY. Cancer chemoprevention by tea polyphenols through mitotic signal transduction blockade. *Biochem Pharmacol* 1999; 58(6): 911—915.

- 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—736.
- 3 Yang GY, 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—616.
- 4 Morgan JI, Curran T. Role of ion flux in the control of c-fos expression. *Nature* 1986; 322(6079): 552—555.
- 5 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—348.
- 6 Han LQ, Gao J, Dong HY, et al. Studies on the gap junctional intercellular communication of human nasopharyngeal carcinoma cells and effect of RII. *Chin J Oncol* 1994; 16(5): 345—348.
- 7 Yokomizo A, Tindall DJ, Drabkin H, et al. PTEN/MMAC1 mutations identified in small cell, but not in non-small cell lung cancers. *Oncogene* 1998; 17(4): 475—479.
- 7 Tamura M, Gu J, Matsumoto K, et al. Inhibition of cell migration, spreading, and focal adhesion by tumor suppressor PTEN. *Science* 1998; 280(5369): 1614—1617.
- 8 Arato Ohshima T, Sawa H. Overexpression of cyclin D1 induces glioma invasion by increasing matrix metalloproteinase activity motility. *Int J Cancer* 1999; 83(3): 387—392.
- 9 Mate JL, Ariza A, Aricil C, et al. Cyclin D1 overexpression in non-small cell lung carcinoma: correlation with Ki67 labelling index and poor cytoplasmic differentiation. *J Pathol* 1996; 180(4): 395—399.

(收稿 2004-04-12 修回 2004-10-25)