

绿茶提取物对口腔鳞癌抗肿瘤效应及作用机制的研究

刘晓亮¹ 刘环秋¹ 李 季¹ 杨 乐² 赵 欣¹

摘要 **目的** 探讨绿茶提取物(green tea extract, GTE)对不同的人口腔鳞癌细胞株的抗肿瘤效应及其相关机制。**方法** 体外培养人舌鳞癌 CAL-27 细胞株、人舌鳞癌 SCC-25 细胞株、人口腔上皮癌 KB 细胞株,应用 MTT 法检测 GTE 对细胞增殖的影响,筛选出敏感细胞株,用流式细胞术检测 GTE 对 CAL-27 细胞周期的影响,采用蛋白芯片技术检测 GTE 对 CAL-27 细胞株蛋白表达的影响,并应用 Western blot 检测周期蛋白依赖性激酶 4 (cyclin-dependent kinases, CDK4)、周期蛋白依赖性激酶 6 (cyclin-dependent kinases, CDK6)、磷酸化 3-磷酸肌醇依赖性蛋白激酶-1 (phospho-3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1, p-PDK1) 蛋白表达情况。**结果** 与对照组比较,50、100、200、400 $\mu\text{g/mL}$ GTE 作用于 CAL-27 细胞抑制率升高,100、200、400 $\mu\text{g/mL}$ GTE 作用于 KB 细胞抑制率升高,25、50、100、200、400 $\mu\text{g/mL}$ GTE 作用于 SCC-25 细胞抑制率亦升高,差异均有统计学意义($P < 0.01$),并呈剂量依赖性。流式细胞术显示:与对照组比较,50 $\mu\text{g/mL}$ GTE 介导 CAL-27 细胞 G_2/M 期阻滞($P < 0.05$);100 $\mu\text{g/mL}$ GTE 能够介导 CAL-27 细胞 S 期及 G_2/M 期阻滞($P < 0.01$), G_0/G_1 期细胞减少($P < 0.01$)。应用蛋白芯片技术共分析 107 种蛋白,应用 GTE 处理后,CAL-27 细胞共有 13 种蛋白发生明显变化。应用 Western blot 技术确认了 25、50、100 $\mu\text{g/mL}$ GTE 作用于 CAL-27 细胞后 p-PDK1、CDK4、CDK6 蛋白表达,药物浓度越高,抑制率越高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** GTE 能够抑制多种类型人口腔鳞癌细胞株的增殖,敏感细胞株为 CAL-27。GTE 主要影响表皮生长因子受体(EGFR)和 Notch 信号传导通路,并通过以上信号传导通路影响细胞周期相关蛋白表达水平的变化,导致细胞周期 S 期及 G_2/M 期阻滞。

关键词 绿茶提取物;口腔鳞癌;抗肿瘤效应;细胞周期;信号传导通路

Experimental Study on Anti-tumor Effect and Mechanism of Green Tea Extract LIU Xiao-liang¹, LIU Huan-qiu¹, LI Ji¹, YANG Le², and ZHAO Xin¹ 1 Tumor Center, First Hospital of Jilin University, Changchun (130021), China; 2 Department of Endocrinology, People's Hospital of Jilin Province, Changchun (130021), China

ABSTRACT **Objective** To explore anti-cancer effect and mechanism of green tea extract (GTE) in three human oral squamous carcinoma cell lines (CAL-27, SCC-25 and KB). **Methods** The cell lines were *in vitro* cultured and its growth inhibition was detected by MTT. After screening most sensitive cell line, effect of GTE on CAL-27 cell cycle was analyzed by flow cytometry. The protein expression of GTE on CAL-27 cell strain was determined by protein chip technique. The protein expression of CDK4, CDK6, and p-PDK1 was verified by using Western blot. **Results** Compared with the control group, the inhibition rate on CAL-27 increased significantly after treated by 50, 100, 200, and 400 $\mu\text{g/mL}$ GTE; the inhibition rate on KB increased after treated by 100, 200, and 400 $\mu\text{g/mL}$ GTE; the inhibition rate on SCC-25 increased after treated by 25, 50, 100, 200, and 400 $\mu\text{g/mL}$ GTE, all with statistical difference and in dose dependant manner ($P < 0.01$). Flow cytometric analysis showed that, when compared with the control group, 50 $\mu\text{g/mL}$ GTE arrested CAL-27 cells in the G_2/M phase ($P < 0.05$), and 100 $\mu\text{g/mL}$ GTE arrested CAL-27 cells in the G_2/M phase with concurrent decreased cells in the G_0/G_1 phase ($P < 0.01$). Totally 107 proteins were analyzed by protein chip technique. After treated by GTE, a total of 13 proteins significantly changed in CAL-27 cell line. Western blot showed that 25, 50, and 100 $\mu\text{g/mL}$ GTE inhibited the expres-

作者单位:1. 吉林大学第一医院肿瘤中心(长春 130021);2. 吉林省人民医院内分泌科(长春 130021)

通讯作者:赵 欣, Tel: 0431-88783239, E-mail: jlcxzx1980@163.com

DOI: 10.7661/CJIM.2014.11.1369

sion of phospho-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (p-PDK1), cyclin-dependent kinase 4 (CDK4), and CDK6 of CAL-27 cell line with statistical difference ($P < 0.05$). The higher the drug concentration, the higher the inhibition rate ($P < 0.05$). Conclusions GTE could inhibit the proliferation of different human oral squamous carcinoma cell lines. CAL-27 is a sensitive cell line. GTE significantly affected EGFR and Notch signal network, and influenced changes of cell cycle related protein expression levels through the aforesaid channels, resulting in cell cycle arrest in S and G₂/M phases.

KEYWORDS green tea extract; oral squamous carcinoma; anti-tumor effect; cell cycle; signaling network

绿茶是一种世界流行的健康饮品。近年来发现绿茶提取物 (green tea extract, GTE) 具有较强的抗肿瘤活性, 对皮肤癌、肺癌、胃癌、乳腺癌、结肠癌以及头颈部肿瘤等多种肿瘤具有预防和治疗作用^[1,2]。口腔癌是严重危害人类健康的恶性疾病, 大部分属于鳞状上皮细胞癌。GTE 抗肿瘤作用的具体机制尚未完全阐明, 特别是其对口腔鳞癌细胞的作用研究较少, 为探讨绿茶对人口腔鳞癌细胞增殖的作用及其可能的作用途径, 本研究根据 GTE 对不同人口腔鳞癌细胞株的抗肿瘤效应, 从细胞凋亡、细胞分化、细胞周期、细胞信号传导通路等多方面研究 GTE 的抗肿瘤机制, 为将 GTE 应用于临床肿瘤治疗奠定基础。

材料与方法

1 细胞 人口腔鳞癌细胞株 CAL-27、SCC-25、KB 由美国西奈山医学院 David Y Zhang 实验室惠赠, 来源于美国 Type Culture Collection (Manassas, VA)。

2 药物 绿茶提取物粉末由中国广东一方制药有限公司惠赠, 生产批号为 20090103。GTE 采用溶剂提取法提取, 其 GTE 的有效活性成分包括 50.0% 表没食子儿茶素没食子酸酯 (EGCG)、14.7% 表儿茶素没食子酸酯 (ECG)、6.5% 表儿茶素 (EC) 和 4.1% 表没食子儿茶素 (EGC)。将 GTE 溶于蒸馏水中, 配置成浓度为 10 mg/mL 的溶液。室温下涡旋 1 min, 37 °C 孵育 1 h, 离心机 5 000 r/min 离心 10 min, 取上清液并去除未溶解物质, 用 0.22 μm 的过滤器过滤上清液以达到灭菌目的, 用培养基稀释 GTE 至终浓度为 0~400 μg/mL。

3 主要仪器及试剂 细胞裂解液 (美国 Cell Signaling 公司); 蛋白酶抑制剂 (美国 Roche 公司); BCA 蛋白测定试剂盒 (美国 Pierce 公司); 周期蛋白依赖性激酶 4 (cyclin-dependent kinases, CDK4)、周期蛋白依赖性激酶 6 (cyclin-dependent kinases,

CDK6)、磷酸化 3-磷酸肌醇依赖性蛋白激酶-1 (phospho-3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1, p-PDK1) 一抗 (美国 Santa Cruz 公司); 内参照 β-actin (美国 Sigma 公司); 酶标仪 (ELx800 型, 美国 Bio-Tek 公司)。

4 细胞培养 CAL-27 细胞株为人类舌上皮细胞癌细胞株, 细胞培养于含 10% 胎牛血清, 100 U/mL 青霉素/链霉素的 DMEM 培养基中, 于 37 °C、5% CO₂ 条件下常规传代。KB 细胞株来源于人类口腔上皮癌, SCC-25 细胞株来源于舌鳞状上皮癌, 以上两种细胞培养于含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素/链霉素的 DMEM: Ham's F12 = 1:1 的培养基中, 于 37 °C、5% CO₂ 条件下常规传代。每 2~3 天传代 1 次, 取对数生长期细胞用于实验。

5 检测指标及方法

5.1 测定不同浓度 GTE 对鳞癌细胞的生长抑制作用 应用 MTT 法测定 GTE 对 3 种鳞癌细胞的生长抑制作用。将对数生长期的细胞分别接种在 96 孔培养皿中, 密度为 5×10^3 /孔, 5% CO₂ 条件下培养 24 h 后, 分别给予不同浓度的 GTE (0、10、25、50、100、200、400 μg/mL), 每组均含 3 个复孔, 共培养 72 h。72 h 后每孔加入 8 μL 浓度为 5 mg/mL 的 MTT, 孵育 3 h 后弃孔内上清液, 加入 100 μL 二甲基亚砷 (DMSO) 溶解结晶物, 立即应用酶标仪在波长 570 nm 下测定吸光度 (OD), 以上实验至少重复 2 次。细胞生长抑制率 (%) = (对照组 OD 值 - 给药组 OD 值) / 对照组 OD 值 × 100%。

5.2 不同浓度 GTE 对细胞周期的影响 采用流式细胞检测法。取对数生长期的 CAL-27 细胞种于培养皿内, 密度为 5×10^5 /孔, 培养 24 h 后, 加入不同浓度的 GTE (0、25、50、100 μg/mL), 共培养 72 h。PBS 洗涤离心 2 次, 加入 70% 冷乙醇固定 30 min, PBS 离心沉淀去除固定液, 染色前用 PBS 离心沉淀去除固定液, 加入 200 μL 核糖核酸酶 (Ribonuclease, RNase), 在 37 °C 水浴 30 min 再加入 800 μL 碘

化丙锭(PI)染色液混匀,于4℃避光30 min,用流式细胞术进行检测并用其软件分析结果。

5.3 蛋白芯片技术检测蛋白表达 在直径为10 cm的培养皿中培养 CAL-27 细胞浓度至 $1 \times 10^6/L$,培养24 h后加入100 μg/mL的GTE,共孵育48 h。48 h后分别收集细胞,在4℃下1 000 r/min离心10 min,弃掉上清培养液,再用PBS洗涤细胞2次,收集下层沉淀物。在每个沉淀的细胞中加入300 μL含有蛋白酶抑制剂的细胞裂解液,裂解细胞3~5 min,超声处理裂解物15 s,共2次,然后4℃下14 000 r/min离心15 min。用BCA蛋白测定试剂盒测定蛋白浓度。把含300 μg蛋白的细胞提取物加入到一个跨越全胶宽度的槽中,应用SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白。将蛋白转到硝基纤维膜上,在5%的牛奶或3% BSA 中室温孵育1 h,用带有20个泳道的装置(Bio-Rad, Hercules, CA)夹膜。在每个泳道中加入2~3种一抗,4℃过夜。洗膜后加入二抗,室温孵育45 min。用ChemiDoc XRS系统显像,扫描光密度,光密度的高低不同对应蛋白表达水平的不同。以上实验至少重复2次。

5.4 Western blot 检测蛋白表达 应用Western blot 技术检测蛋白表达变化。选择 CAL-27 细胞系作为代表验证 CDK4、CDK6、p-PDK1 蛋白的表达情况。在直径为10 cm的培养皿中培养细胞,浓度至 $1 \times 10^6/L$ 。培养24 h后加入GTE(浓度为0、10、25、50、100 μg/mL),共孵育48 h。48 h后分别收集细胞,在4℃下1 000 r/min离心10 min,弃掉上清培养液,再用PBS洗涤细胞2次,收集下层沉淀物。按照上述方法提取蛋白,将20 μg蛋白经10%的SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳转移到硝基纤维素膜上。在硝基纤维素膜上加入CDK4、CDK6、p-PDK1的一抗(1:1 000稀释),4℃过夜。洗膜后加入二抗,室温孵育1 h后应用放射自显影技术检测蛋白发射信号,以β-actin(1:10 000稀释)作为内参照。

6 统计学方法 采用统计学软件SPSS 10.0进行数据分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据统计采用t检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 不同浓度GTE对鳞癌细胞株的抑制作用比较(表1) 与对照组比较,50、100、200、400 μg/mL GTE对CAL-27抑制率均升高,100、200、400 μg/mL GTE对KB抑制率均升高,25、50、100、200、400 μg/mL GTE对SCC-25细胞的抑制率升高,差异

均有统计学意义($P < 0.01$),呈剂量依赖性。GTE对CAL-27、KB、SCC-25细胞的半数抑制浓度值(IC_{50})分别为70、145、125 μg/mL。

表1 GTE 对不同浓度鳞癌细胞株的抑制作用的比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	n	抑制率		
		CAL-27	KB	SCC-25
对照	3	1.12 ± 0.41	1.80 ± 0.75	1.45 ± 0.67
GTE 10 μg/mL	3	0.76 ± 0.47	1.61 ± 0.53	2.52 ± 0.96
25 μg/mL	3	1.42 ± 0.79	2.13 ± 0.87	6.49 ± 1.21 *
50 μg/mL	3	35.28 ± 1.09 *	3.12 ± 0.72	13.83 ± 0.85 *
100 μg/mL	3	67.45 ± 1.45 *	31.35 ± 0.79 *	39.89 ± 1.21 *
200 μg/mL	3	72.82 ± 1.38 *	64.83 ± 1.26 *	73.15 ± 0.98
400 μg/mL	3	62.41 ± 1.09 *	64.73 ± 1.25 *	71.12 ± 0.94 *

注:与对照组比较,* $P < 0.01$

2 不同浓度GTE对CAL-27细胞周期影响的比较(表2) 与对照组比较,50 μg/mL GTE介导CAL-27细胞G₂/M期阻滞($P < 0.05$);100 μg/mL GTE可以介导CAL-27细胞S期和G₂/M期阻滞($P < 0.01$),G₀/G₁期细胞减少($P < 0.01$)。

表2 不同浓度GTE处理后的CAL-27细胞周期比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	n	细胞周期		
		G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
对照	3	91.10 ± 1.41	3.20 ± 0.41	5.70 ± 0.67
GTE 25 μg/mL	3	89.87 ± 2.47	3.61 ± 0.58	6.52 ± 0.91
50 μg/mL	3	87.49 ± 6.79	4.11 ± 0.72	8.40 ± 1.21 *
100 μg/mL	3	61.91 ± 4.38 **	19.39 ± 2.25 **	18.70 ± 1.89 **

注:与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

3 GTE处理后CAL-27细胞蛋白表达的比较(图1) 应用蛋白芯片技术分析GTE对CAL-27细胞信号传导相关蛋白表达的影响,共检测107个磷酸化和非磷酸化蛋白,共有13种蛋白发生了明显变化。其中cPKCα、Notch 4蛋白水平上调,p-ERK、p-PDK1、p-Cdc2、p-RB、CDK6、CDK4、CDK2、Cdc2P34、Cyclin E、14-3-3beta、XIAP蛋白表达下调。

4 Western blot 检测蛋白表达的比较(表3,图2) 与对照组比较,25、50、100 μg/mL GTE作用于CAL-27细胞后p-PDK1、CDK4、CDK6蛋白表达均降低($P < 0.05$),同时药物浓度越高,抑制率越高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

讨 论

目前手术联合放化疗仍然是治疗肿瘤的主要手段,但是化疗药物不仅作用于肿瘤细胞,同时也作用于

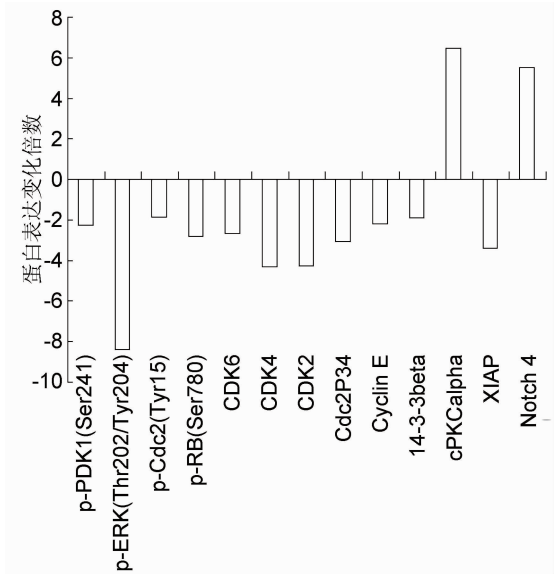
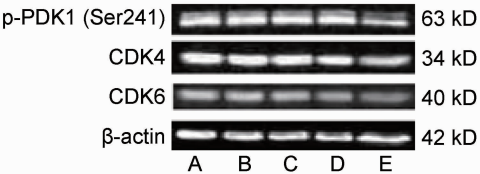


图1 100 μg/mL GTE 处理 CAL-27 细胞 48 h 后的蛋白表达变化



注:A 为对照组;B 为 10 μg/mL GTE ;C 为 25 μg/mL GTE;D 为 50 μg/mL GTE;E 为 100 μg/mL GTE
图2 不同浓度 GTE 作用于 CAL-27 细胞后 CDK6、CDK4 及 p-PDK1 蛋白表达的电泳图

正常细胞,存在较强的毒副反应及肿瘤细胞耐药现象。因此在天然药物中筛选研发高效、低毒的抗肿瘤药物是当前研究热点之一。绿茶是日常生活中颇受人们喜欢的饮料,茶多酚是绿茶的主要成分,而 EGCG、EGC、ECG 和 EC 又是茶多酚的主要成分^[3]。其中 EGCG 是最主要的活性成分,有报道发现 EGCG 具有抑制肿瘤细胞增殖、血管生成和诱导肿瘤细胞凋亡的作用,而对正常细胞无毒副作用^[3]。GTE 对多种肿瘤有预防和治疗的作用,其抑制癌细胞生长而不影响

正常细胞生长的作用使其成为肿瘤防治领域的热点^[4]。既往有研究表明 GTE 可以抑制头颈部鳞癌、肺鳞癌及口腔鳞癌等多种肿瘤细胞的生长^[5-7]。本研究结果显示 GTE 在体外对 3 种类型的人口腔鳞癌细胞有明显的抑制作用,GTE 作用 CAL-27、KB、SCC-25 细胞后,GTE 浓度越高,细胞增殖抑制越明显,呈剂量依赖性。GTE 处理 CAL-27 细胞 72 h 后,IC₅₀ 为 70 μg/mL,处理 KB 细胞 72 h 后,IC₅₀ 为 145 μg/mL,表明 GTE 对 CAL-27 细胞抑制作用最强,对 KB 细胞的抑制作用最弱。CAL-27 细胞对 GTE 比 SCC-25 和 KB 细胞更为敏感,可能是 3 种细胞系中不同的信号传导通路改变所致。为了进一步研究 GTE 对细胞增殖和凋亡的影响,本实验对 CAL-27 细胞进行了细胞周期分析,结果显示 100 μg/mL GTE 可以使 CAL-27 细胞阻滞在 S 期和 G₂/M 期,既往有报道显示结肠癌和肺癌中也存在类似的现象^[8,9]。

为了研究 GTE 抑制鳞癌细胞生长的分子机制,本实验应用蛋白芯片技术共分析了 107 种与细胞增殖、凋亡及细胞周期调节通路相关的蛋白。结果显示 GTE 作用于 CAL-27 细胞系后,共有 13 种蛋白表达水平发生改变,其中 4 种(PDK1、cPKCα、Notch4、14-3-3β)为与信号传导有关的蛋白,1 种(RB)是已知的肿瘤抑制基因,1 种(XIAP)为凋亡抑制蛋白,5 种(Cdc2、CDK6、CDK4、CDK2、Cyclin E)为细胞周期或细胞增殖相关蛋白,有 4 种蛋白(p-PDK1、p-ERK、p-Cdc2、p-RB)的磷酸化水平受到影响。本研究通过对细胞信号传导通路的全面检测及评价分析显示 GTE 对信号传导网络影响显著,这些影响可以是直接的,也可以是间接的(如通过上游因子的表达改变)。由于 GTE 对信号传导网络的改变是复杂的,因此不能用单一某种信号通路的改变来解释 GTE 的作用。既往研究曾报道 CAL-27 细胞中表皮生长因子受体和 Akt 的表达增高^[10,11],本研究显示 GTE 主要通过 EGFR 和 Notch 通路影响细胞周期相关蛋白表达水平的变化,起到抑制肿瘤细胞生长的作用。本研究

表3 不同浓度 GTE 作用 CAL-27 细胞后 p-PDK1、CDK4 及 CDK6 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	p-PDK1	CDK4	CDK6
对照	3	15 075.2 ± 1 239.8	27 547.2 ± 908.7	25 398.0 ± 1 076.2
GTE 10 μg/mL	3	14 210.8 ± 989.1	27 527.6 ± 1 980.4	21 499.9 ± 1 564.9 *
25 μg/mL	3	13 313.6 ± 1 709.2 *	23 160.7 ± 1 436.0 *△	21 190.8 ± 1 629.4 *
50 μg/mL	3	10 573.0 ± 985.3 *△▲	16 454.1 ± 1 123.5 *△▲	2 760.0 ± 1 375.2 *△▲
100 μg/mL	3	10 009.8 ± 786.3 *△▲	15 572.4 ± 976.0 *△▲○	11 799.6 ± 1 573.9 *△▲○

注:与对照组比较,*P<0.05;与 10 μg/mL GTE 组比较,△P<0.05;与 25 μg/mL GTE 组比较,▲P<0.05;与 50 μg/mL GTE 组比较,○P<0.05

还显示 GTE 可以导致 PDK1 的去磷酸化以及 14-3-3 β 的表达下调,既往未见报道。PDK1 和 14-3-3 β 在鳞癌的发病机理中起着重要作用,在多种肿瘤中均发现 PDK1 通路的激活以及 14-3-3 β 的过表达^[12,13]。PDK1 的去磷酸化以及 14-3-3 β 的表达下调可能与 GTE 的细胞增殖抑制作用有关。CDK 和细胞周期蛋白是细胞周期必不可少的因子,直接调控细胞周期。Hung PF 等^[14]研究发现 EGCG 可下调细胞周期蛋白 D1 和 Rb,并抑制 CDK,这被认为是导致细胞周期多种负性调节的主要事件^[15]。既往有报道 EGCG 可以抑制细胞周期相关蛋白 (CyclinD1、CDK4、CDK6) 的表达及抑制激酶 (CDK2、CDK4、CDK6) 活性从而起到抑制增殖的作用^[16]。EGCG 为 GTE 的主要成分,本研究中 GTE 处理 CAL-27 细胞后,p-PDK1、p-ERK、p-Cdc2、CDK6、CDK4、CDK2、Cyclin E 表达下调,Notch4 表达上调,与既往研究结果一致。

综上所述,GTE 能够抑制多种人口腔鳞癌细胞增殖,通过多个信号传导通路影响细胞周期相关蛋白表达水平的变化而抑制肿瘤细胞增殖,具有直接抗肿瘤作用,为绿茶发展成抗肿瘤药物、应用于肿瘤的预防及临床治疗奠定实验基础。本研究不足之处在于缺乏对 GTE 的不同成分抗肿瘤作用的研究,今后需要对 GTE 的不同成分是否有协同作用及具体机制进行深入探讨。

参 考 文 献

- [1] Shankar S, Ganapathy S, Srivastava RK. Green tea polyphenols: Biology and therapeutic implications in cancer[J]. *Front Biosci*, 2007, 9(12): 4881-4899.
- [2] Shimizu M, Deguchi A, Lim JT, et al. (-)-Epigallocatechin gallate and polyphenon E inhibit growth and activation of the epidermal growth factor receptor and human epidermal growth factor receptor-2 signaling pathways in human colon cancer cells[J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(7): 2735-2746.
- [3] Butt MS, Sultan MT. Green tea: nature's defense against malignancies[J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2009, 49(5): 463-473.
- [4] Bode AM, Dong Z. Epigallocatechin 3-gallate and green tea catechins: United they work, divided they fail[J]. *Cancer Prev Res*, 2009, 2(6): 514-517.
- [5] Khan N, Afaq F, Saleem M, et al. Targeting multiple signaling pathways by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(5): 2500-2505.

- [6] Clark J, You M. Chemoprevention of lung cancer by tea[J]. *Mol Nutr Food Res*, 2006, 50(2): 144-151.
- [7] Philips BJ, Coyle CH, Morrisroe SN, et al. Induction of apoptosis in human bladder cancer cells by green tea catechins[J]. *Biomed Res*, 2009, 30(4): 207-215.
- [8] Sadava D, Whitlock E, Kane SE. The green tea polyphenol, epigallocatechin-3-gallate inhibits telomerase and induces apoptosis in drug-resistant lung cancer cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 360(1): 233-237.
- [9] Salucci M, Stivala LA, Maiani G, et al. Flavonoids uptake and their effect on cell cycle of human colon adenocarcinoma cells (CaCO₂) [J]. *Br J Cancer*, 2002, 86(10): 1645-1651.
- [10] Tong X, Yang L, Lang JC, et al. Application of immunomagnetic cell enrichment in combination with RT-PCR for the detection of rare circulating head and neck tumor cells in human peripheral blood[J]. *Cytometry B Clin Cytom*, 2007, 72(5): 310-323.
- [11] Simons AL, Parsons AD, Foster KA, et al. Inhibition of glutathione and thioredoxin metabolism enhances sensitivity to perifosine in head and neck cancer cells[J]. *J Oncol*, 2009: 519563.
- [12] Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Sivridis E, et al. Pyruvate dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase kinase expression in non-small cell lung cancer and tumor-associated stroma[J]. *Neoplasia*, 2005, 7(1): 1-6.
- [13] Qi W, Liu X, Qiao D, et al. Isoform-specific expression of 14-3-3 proteins in human lung cancer tissues[J]. *Int J Cancer*, 2005, 113(3): 359-363.
- [14] Hung PF, Wu BT, Chen HC, et al. Anti-mitogenic effect of green tea (-)-epigallocatechin gallate on 3T3-L1 preadipocytes depends on the ERK and CDK2 pathways[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2005, 288(5): C1094-C1108.
- [15] Khan N, Afaq F, Saleem M, et al. Targeting multiple signaling pathways by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(5): 2500-2505.
- [16] Ahmad N, Cheng P, Mukhtar H. Cell cycle dysregulation by green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 275(2): 328-334.

(收稿:2013-01-14 修回:2014-07-27)