

EGCG 对体外培养喉癌 Hep-2 细胞生物学行为的影响

邓守明¹, 石芳²

(1. 中国五冶集团有限公司医院, 四川 成都 610081;

2. 湖北医药学院附属人民医院, 湖北 十堰 442000)

摘要: [目的] 研究表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)对体外培养喉癌 Hep-2 细胞增殖、凋亡和侵袭的影响。[方法] 采用 CCK-8 法检测 EGCG 对喉癌细胞增殖的影响; 流式细胞法检测细胞凋亡及细胞周期; 细胞划痕法和 Transwell 法检测体外侵袭; 蛋白质免疫印迹法检测血管内皮生长因子(VEGF)表达水平。[结果] EGCG 5~160mg/L 作用 Hep-2 细胞 24~72h, 可对细胞增殖产生明显的抑制作用, 其 24、48、72h 的 IC_{50} 值分别为 139.6、38.7、24.3mg/L。10、20、40mg/L EGCG 作用 48h, Hep-2 细胞凋亡率分别为 $(3.1 \pm 0.2)\%$ 、 $(9.9 \pm 0.6)\%$ 、 $(11.7 \pm 1.2)\%$, 细胞被阻滞于 G_1 期。5、10、20、40 mg/L EGCG 作用 48h, Hep-2 细胞侵袭抑制率分别为 $(19.6 \pm 2.2)\%$ 、 $(37.2 \pm 3.8)\%$ 、 $(49.3 \pm 4.1)\%$ 和 $(62.6 \pm 3.4)\%$, VEGF 蛋白表达下调率分别为 $(15.8 \pm 2.2)\%$ 、 $(51.4 \pm 2.1)\%$ 、 $(78.4 \pm 3.1)\%$ 和 $(89.6 \pm 2.4)\%$, 与对照组相比差异均有统计学意义。[结论] EGCG 可通过下调 VEGF 蛋白表达对喉癌细胞产生抑制增殖、诱导凋亡和降低侵袭等作用。

关键词: 表没食子儿茶素没食子酸酯; 喉癌; 血管内皮生长因子

中图分类号: R739.65 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0242(2015)01-0064-04

doi: 10.11735/j.issn.1004-0242.2015.01.A014

Effect of EGCG on Biological Behaviour of Human Laryngeal Cancer Hep-2 Cells in vitro

DENG Shou-ming¹, SHI Fang²

(1. Hospital of The Fifth Metallurgy Group in China, Chendu 610081, China;

2. People Hospital of Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the effects of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) on biological behaviour of human laryngeal cancer Hep-2 in vitro. [Methods] The growth and proliferation of Hep-2 cell were detected by CCK-8 assay. Cell apoptosis and cell cycle were detected by the flow cytometry. Cell invasive ability was measured with cell scratch assay and Transwell method. The expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) was detected by Western blot. [Results] After treatment with EGCG 5~160mg/L for 24~72h, the proliferation of Hep-2 cell could be inhibited obviously. The IC_{50} value in 24, 48, 72h was 139.6, 38.7, 24.3mg/L respectively; After treatment with EGCG 10, 20, 40 mg/L for 48h, The apoptosis rate of Hep-2 cell was $(3.1 \pm 0.2)\%$ 、 $(9.9 \pm 0.6)\%$ 、 $(11.7 \pm 1.2)\%$ respectively; and the cell phase was arrested in G_1 period. After treatment with 5, 10, 20, 40 mg/L EGCG for 48h, the invasive inhibitory rate to Hep-2 cells was $(19.6 \pm 2.2)\%$ 、 $(37.2 \pm 3.8)\%$ 、 $(49.3 \pm 4.1)\%$ and $(62.6 \pm 3.4)\%$ respectively. The down regulating rate of VEGF protein was $(15.8 \pm 2.2)\%$ 、 $(51.4 \pm 2.1)\%$ 、 $(78.4 \pm 3.1)\%$ and $(89.6 \pm 2.4)\%$ respectively. [Conclusion] EGCG suppresses the proliferation, induces apoptosis and decreases invasion in Hep-2 cells by down-regulating the expression of VEGF.

Key words: epigallocatechin-3-gallate; laryngeal cancer; vascular endothelial growth factor

表没食子儿茶素没食子酸酯(epigallocatechin-3-gallate, EGCG)是绿茶中含量最高, 活性最强的单

体^[1]。研究显示, EGCG 具有清除氧自由基、抗氧化、抗衰老、防紫外线以及预防心血管疾病等功效^[2]。近年来, EGCG 抗肿瘤作用逐渐引起了人们的重视, EGCG 可通过多种途径对肺癌、宫颈癌、结肠癌、胃癌、肝癌和鼻咽癌等产生杀伤作用, 有望开发成一

收稿日期: 2014-07-22; 修回日期: 2014-09-30

基金项目: 湖北省自然科学基金项目(2008CDZ053)

通讯作者: 石芳, E-mail: 1220658176@qq.com

种抗肿瘤新药^[3]。有关 EGCG 对喉癌的作用目前报道较少,本文对此进行研究。

1 材料与方法

1.1 细胞系及药物

人喉癌细胞株 Hep-2 购自中国科学院上海细胞生物研究所,培养于含 10%灭活小牛血清的 RPMI1640 培养基内,于 37℃、饱和湿度,5%CO₂ 条件下培养,每 2~3d 用 0.25%胰酶消化,1:2 传代。表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)为美国 Sigma 产品。

1.2 试剂与仪器

碘化丙锭(PI)为美国 Sigma 产品;CCK-8 试剂盒购自日本同仁公司;Transwell 小室购自美国 Costar 公司;VEGF 鼠抗人单克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司);Mod 550 型全自动酶标仪(美国 Bio-Rad 公司);Epics Elite ESP 型流式细胞仪(美国 Coulter 公司)。

1.3 CCK-8 法检测细胞增殖

取指数生长期 Hep-2 细胞,以 1×10^5 个/孔接种于 96 孔板,37℃、饱和湿度,5%CO₂ 条件下培养 24h 后吸出原培养液,加入含不同浓度 EGCG 的 RPMI1640 培养基,使每孔终浓度分别为 0、5、10、20、40、80、160mg/L,每组设 5 个复孔,继续培养 24、48、72h 后,吸去上清液,每孔加入 10μl CCK-8 试剂,继续培养 1h,酶标仪检测各孔在 450nm 波长下的吸光度(OD)值,代入公式计算细胞增殖抑制率。增殖抑制率=(对照组 OD 值-实验组 OD 值)/对照组 OD 值×100%。

1.4 流式细胞法检测细胞周期及细胞凋亡

收集经 0、5、10、20、40mg/L EGCG 处理 48h 各组细胞,0.01mol/L PBS 0.5ml 重悬细胞,加 70%乙醇 1ml,-20℃固定 24h,加入 PI (终浓度为 50μl/ml)和 RNA 酶 (终浓度为 0.25mg/ml),室温下避光孵育 30min 后流式细胞仪进行 DNA 分析,以 ModFit LT 软件分析,拟合计算各时相细胞百分比。

1.5 细胞迁移检测^[4]

参考文献^[4]将细胞接种于培养板中 24h 后去除培养液,用 10μl 移液器枪头沿培养孔底部轻划一条划痕,用无血清培养液洗涤后更换含 1%胎牛血清的培养液培养 24h,再换含 10%胎牛血清的培养液继续培养 24h,显微镜下观察划痕区细胞的迁移情况。

1.6 Transwell 法检测细胞侵袭性改变

细胞分组及处理同 1.4,以 NIH3T3 细胞培养液作为趋化液,在 Transwell 上室内加入 100μl 不含小牛血清的 RPMI1640,37℃孵育 1h,加入上述各组细胞悬液 20μl(调细胞浓度为 1.0×10^5 个/ml),每组 5 个复孔。37℃、12h 后取出滤膜,甲醇固定,HE 染色。显微镜下计数滤膜外表面的细胞数,每张滤膜随机取 5 个视野(×200)取均值,实验重复 3 次,以相对侵袭抑制率表示肿瘤细胞的侵袭力。相对侵袭抑制率(%)=(对照组-实验组)/对照组×100%。

1.7 免疫印迹法检测 VEGF 蛋白表达

细胞分组及处理同 1.4,消化收集细胞,PBS 洗 2 次,裂解,离心,收集上清,即为细胞总蛋白,进行蛋白定量,调节每份样品蛋白浓度,加等量蛋白于上样缓冲液,煮沸,SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳。电泳后转膜,依次加入 VEGF 蛋白一抗和二抗,加入底物液显色,拍照。蛋白条带用 Quanti Scan 软件进行密度扫描分析。

1.8 统计学处理

采用 SPSS 17.0 软件进行数据分析,数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间数据分析采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 EGCG 对细胞增殖的抑制作用

EGCG 0~160mg/L 等 7 个浓度分别作用于体外培养的 Hep-2 细胞 24~72h,对细胞增殖产生明显的抑制作用。24、48、72h 的半数抑制浓度 IC₅₀ 分别为 139.6、38.7、24.3mg/L。不同 EGCG 浓度作用 24、48、72h 时的细胞抑制率见 Table 1。

2.2 EGCG 对细胞周期分布、细胞凋亡的影响

在 2.1 筛选结果基础上,采用 0、10、20、40 mg/L EGCG 处理 Hep-2 细胞 48h 用于检测细胞凋亡及周期分布改变,结果显示,未经药物处理的空白对照细胞凋亡率很低,仅为 $(0.8 \pm 0.1)\%$,经上述浓度 EGCG 作用 48h,细胞凋亡率分别升至 $(3.1 \pm 0.2)\%$ ($P = 0.037$)、 $(9.9 \pm 0.6)\%$ ($P = 0.016$)、 $(11.7 \pm 1.2)\%$ ($P = 0.007$),与对照组比较差异均有统计学差异($P < 0.05$)。细胞周期分析结果显示,EGCG 能够增加 G₁ 期细胞比例,降低 S 期细胞比例,EGCG 剂量越大上述效果越

明显 ($P<0.05$) (Table 2), 说明 EGCG 可通过阻滞 Hep-2 细胞于 G_1 期诱导细胞凋亡。

2.3 EGCG 对细胞迁移及侵袭的影响

荧光显微镜下可见, 经 5、10、20、40 mg/L EGCG 作用 48h 后的 Hep-2 细胞进入划痕区的数目明显少于空白对照组, EGCG 浓度越高上述现象越明显。细胞侵袭实验也显示出相似的作用结果, 与空白对照组相比较, 上述浓度 EGCG 对实验组细胞侵袭产生的抑制率分别为 $(19.6\pm2.2)\%$ ($P=0.037$)、 $(37.2\pm3.8)\%$ ($P=0.009$)、 $(49.3\pm4.1)\%$ ($P=0.005$) 和 $(62.6\pm3.4)\%$ ($P=0.002$), 差异均有统计学意义 (Table 3)。

2.4 EGCG 对细胞 VEGF 蛋白表达的影响

免疫印迹及灰度扫描结果显示, 未经处理的空白对照组 Hep-2 细胞内 VEGF 蛋白呈高表达 (灰度值为 1.084 ± 0.27)。经 5、10、20、40 mg/L EGCG 作用

48h 后, 细胞内 VEGF 蛋白灰度值分别降至 0.912 ± 0.04 、 0.362 ± 0.04 、 0.243 ± 0.03 和 0.114 ± 0.02 , 下调率分别为 $(15.8\pm2.2)\%$ 、 $(51.4\pm2.1)\%$ 、 $(78.4\pm3.1)\%$ 和 $(89.6\pm2.4)\%$, P 值分别为 0.068、0.006、0.003、0.001。与空白对照组比较, 除 5mg/L EGCG 下调效果未达到统计学差异外, 其余组均具有统计学差异 ($P<0.01$) (Figure 1)。

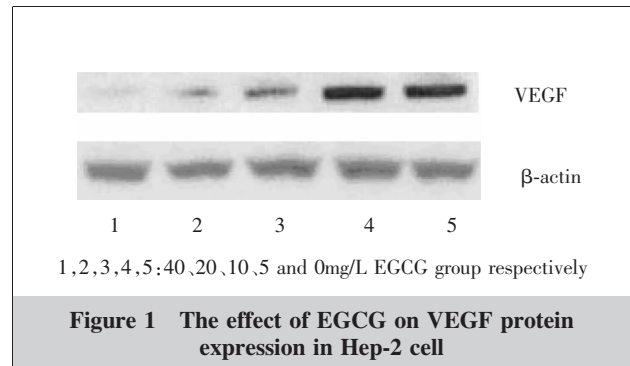


Table 1 The proliferation inhibitory effect of EGCG on Hep-2 cell ($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

EGCG(mg/L)	Inhibitory rate(%)		
	24h	48h	72h
0	0	0	0
5	2.1 ± 0.1	5.3 ± 0.8	$10.2\pm2.1^*$
10	$7.2\pm1.2^*$	$13.7\pm1.4^*$	$27.2\pm1.8^{**}$
20	$12.3\pm1.3^*$	$30.3\pm2.2^{**}$	$42.7\pm2.4^{**}$
40	$24.7\pm2.9^{**}$	$48.6\pm2.4^{**}$	$68.2\pm3.3^{**}$
80	$37.2\pm2.8^{**}$	$64.8\pm2.9^{**}$	$90.9\pm4.1^{**}$
160	$49.5\pm3.2^{**}$	$86.5\pm2.2^{**}$	$98.6\pm3.5^{**}$

Compared with control, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

Table 2 Influence of EGCG on apoptosis rate and cell phase in Hep-2 cell($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

EGCG (mg/L)	G_1 (%)	S (%)	M (%)	Apoptosis rate (%)
0	47.1 ± 2.8	44.2 ± 1.1	8.7 ± 1.1	0.8 ± 0.1
10	$49.5\pm2.1^*$	42.3 ± 1.8	9.3 ± 1.3	$3.1\pm0.2^*$
20	$53.8\pm1.7^*$	40.6 ± 2.1	5.6 ± 0.5	$9.9\pm0.6^*$
40	$57.3\pm2.4^*$	$35.8\pm2.7^*$	6.9 ± 1.3	$11.7\pm1.2^{**}$

Compared with control, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

Table 3 Influence of EGCG on invasive ability in Hep-2 cell ($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

EGCG(mg/L)	Cell number(n)	Inhibitory rate(%)
0	221 ± 17	—
5	$173\pm22^*$	$19.6\pm2.2^*$
10	$128\pm18^{**}$	$37.2\pm3.8^{**}$
20	$97\pm13^{**}$	$49.3\pm4.1^{**}$
40	$74\pm8^{**}$	$62.6\pm3.4^{**}$

Compared with control, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

3 讨论

喉癌是来源于喉黏膜上皮组织的消化道恶性肿瘤, 多为鳞状细胞癌, 其发生与吸烟、酗酒、长期吸入有害物质及乳头状瘤病毒感染等因素有关。喉癌发病率约占全身肿瘤的 1%~5%, 失控性增殖和凋亡受阻是包括喉癌在内的恶性肿瘤的重要特征, 而许多抗肿瘤药物也正是通过抑制肿瘤细胞增殖或(和)诱导肿瘤细胞凋亡产生作用。本文中, 笔者将绿茶中的主要成分 EGCG 作用于体外培养的喉癌细胞株 Hep-2, 采用 CCK-8 法检测了其对细胞增殖的影响, 结果发现, EGCG 可明显抑制细胞增殖, 且呈一定的时间和剂量效应关系。经 10、20、40mg/L EGCG 作用 48h, 喉癌细胞凋亡率随药物剂量加大而增大, S 期细胞数量显著性减少, 细胞周期被明显阻滞于 G_1 期, 这与许多学者在其他肿瘤细胞上观察的 EGCG 作用结果相一致^[5], 由于细胞增殖的速度主要取决于细胞周期的长短, 而细胞周期的长短又主要取决于 G_1 期, G_1 期阻滞可使细胞增殖周期延长, 部分细胞出现凋亡^[6]。

局部浸润和远处转移是恶性肿瘤另一重要生物学行为, 也是恶性肿瘤致人死亡的主要原因。研究发现, 尿激酶型纤溶酶原激活物(uPA)通过激活纤溶酶原产生纤溶酶, 进而激活基质金属蛋白酶而溶解细

胞外基质,这一关联机制在肿瘤浸润转移中发挥着重要作用。本实验中,笔者分别采用细胞划痕法和Transwell法对细胞侵袭能力进行检测,结果显示经EGCG作用后的喉癌细胞侵袭转移能力受到了明显抑制,表现为经EGCG作用后的肿瘤细胞进入划痕区和穿过基底膜的能力大大下降,数量明显减少。

VEGF是血管内皮细胞特异性的肝素结合生长因子,也是上述MMPs信号通路上游诱导信号^[7],可在体内诱导血管新生,是肿瘤生长、侵袭和转移的重要细胞因子。大量研究表明,在包括喉癌在内的多种肿瘤细胞中,VEGF过表达与肿瘤细胞的凋亡抵抗、侵袭转移及对化疗药物的多药耐药等有关^[8,9]。本研究显示EGCG还可明显下调VEGF表达,说明EGCG对喉癌细胞产生的抑制增殖、诱导凋亡、降低侵袭和转移等作用与下调细胞内VEGF蛋白有关。但由于EGCG是一种多靶点的抑制剂,其对喉癌细胞的作用机制及靶点还远未阐明,尚需进行深入研究。

参考文献:

- [1] Ahmad N, Feyes DK, Nieminen AL, et al. Green tea constituent epigallocatechin-3-gallate and induction of apoptosis and cell cycle arrest in human carcinoma cells[J]. Natl Cancer Inst, 1997, 89(24): 1881-1886.
- [2] Wen XL, Li JY, Jiang JL, et al. Research progress in anti-cancer mechanism of epigallocatechin gallate (EGCG) [J]. Science and Technology of Food Industry, 2013, 34(5): 347-349. [温旭烨, 李记英, 蒋洁琳, 等. 表没食子儿茶素没食子酸酯的抗癌机制的研究进展[J]. 食品工业科技, 2013, 34(5): 347-349.]
- [3] Li BB, Huang PC, Huang GL, et al. Effect of EGCG on proliferation, apoptosis and E2F-1 expression of nasopharyngeal carcinoma cell [J]. Cancer Research on Prevention and Treatment, 2012, 39(12): 1407-1410. [李彬彬, 黄培春, 黄国良, 等. EGCG对鼻咽癌细胞增殖、凋亡及E2F-1表达的影响[J]. 肿瘤防治研究, 2012, 39(12): 1407-1410.]
- [4] Sun HC, Guo ML, Wang JG, et al. Effect of stable transfection of recombinant signal transducers and activators of transcription 3 on the invasion of laryngeal cancer Hep-2 cells[J]. Chin J Ophthalmol and Otorhinolaryngol, 2013, 13(2): 105-108. [孙红村, 郭明丽, 王俊阁, 等. 稳定转染重组信号转导及转录激活因子3对喉癌Hep-2细胞侵袭性的影响[J]. 中国眼耳鼻喉科杂志, 2013, 13(2): 105-108.]
- [5] Zhang CX, Wang SM, Jin HY, et al. Epigallocatechin-3-gallate on colorectal cancer cells in vitro [J]. Lishizhen-Medicine and Materia Medica Research, 2012, 23(4): 833-836. [张春霞, 王水明, 金黑鹰, 等. 表没食子儿茶素没食子酸酯对结肠癌细胞株抑制作用的体外研究[J]. 时珍国医国药, 2012, 23(4): 833-836.]
- [6] Deng SH, Cao FJ, Cai XJ, et al. Effect of Selenium chitosan on the proliferation and apoptosis of promyelocytic leukemia cells in vitro [J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2010, 21(5): 1178-1179. [邓守恒, 曹凤军, 蔡晓军, 等. 硒化壳聚糖诱导人早幼粒白血病细胞凋亡的研究[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(5): 1178-1179.]
- [7] Dung TD, Feng CC, Kuo WW, et al. Suppression of plasminogen activators and the MMP-2/-9 pathway by a Zanthoxylum avicennae extract to inhibit the HA22T human hepatocellular carcinoma cell migration and invasion effects in vitro and in vivo via phosphatase 2A activation [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2013, 77(11): 1814-1821.
- [8] Han HP, Hao L, Wu CJ, et al. The research on the expression of Gli1 and VEGF in laryngeal cancer [J]. Chinese Journal of Aesthetic Medicine, 2012, 21(11): 37-38. [韩海平, 赫莉, 武川君, 等. 喉癌Gli1的表达及其与VEGF表达关系的研究[J]. 中国美容医学, 2012, 21(11): 37-38.]
- [9] Su R, Li Z, Li H, et al. Grp78 promotes the invasion of hepato-cellular carcinoma [J]. BMC Cancer, 2010, Jan 19.