

绿茶提取物对人肝癌细胞株 SMMC-7721 体外凋亡的影响

蒲霞¹, 郭庆喜¹, 任美萍², 杨成万¹, 龙汉安^{1*}

¹泸州医学院病理教研室; ²泸州医学院药理学教研室 泸州 646000

摘要:从茶多酚中分离提纯表没食子儿茶素没食子酸酯(Epigallocatechin gallate, EGCG)单体。体外培养人肝癌 SMMC-7721 细胞, 采用不同浓度的 EGCG 对其进行干预, 用流式细胞仪检测其对肝癌细胞凋亡的影响; 免疫细胞化学法和 RT-PCR 检测 EGCG 作用于 SMMC-7721 细胞后对 Survivin、突变型 P53 mRNA 和蛋白表达的影响。结果显示在 EGCG 的作用下, SMMC-7721 凋亡明显增加 ($P < 0.05$); Survivin 和突变型 P53 蛋白和 mRNA 表达水平均下调 ($P < 0.05$)。表明 EGCG 可能通过下调人肝癌细胞株 Survivin 和突变型 p53 的表达, 进而促进人肝癌细胞株 SMMC-7721 凋亡, 以达到抗癌作用。

关键词:表没食子儿茶素没食子酸酯; 肝癌细胞; 凋亡; Survivin; 突变型 P53

中图分类号: R735.7; S571.1

文献标识码: A

Effect of Epigallocatechin Gallate Extracted from Green Tea on the Apoptosis of Human Hepatocellular Carcinoma Cell Line SMMC-7721 *in vitro*

PU Xia¹, GUO Qing-xi¹, REN Mei-ping², YANG Cheng-wan¹, LONG Han-an^{1*}

¹Department of Pathology, Luzhou Medical College; ²Department of Pharmacology, Luzhou Medical College Luzhou 646000, China

Abstract: In this study, epigallocatechin gallate (EGCG) was isolated and purified from green tea polyphenols. The effect of EGCG on cultured human hepatoma SMMC-7721 cells was investigated. The apoptosis of cultured SMMC-7721 cells in different concentrations of EGCG were detected using flow cytometry. The expressions of mRNA and protein of Survivin, P53 in SMMC-7721 cells treated with EGCG were detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and immunocytochemistry technique, respectively. The results showed that after treating with EGCG, the apoptosis of SMMC-7721 cells significantly raised ($P < 0.05$); the expression levels of protein and mRNA of Survivin and P53 were down-regulated ($P < 0.05$). These results indicated that the antineoplastic effect of EGCG was possibly induced through directly or indirectly inhibiting expressions of Survivin and P53.

Key words: EGCG; human hepatocellular carcinoma cell line; apoptosis; Survivin; P53

绿茶在我国有着悠久的种植和饮用历史, 其主要成分是茶多酚, 而茶多酚中大部分为儿茶素 (catechin), 其中表没食子儿茶素没食子酸酯 [(-) epigallocatechin-3-gallate, EGCG] 含量最高, 是绿茶最主要的功效成分^[1]。最近的研究表明, EGCG 不仅具有抗菌、抗病毒、抗氧化、降血糖、神经保护等多种生物学活性和药理作用, 而且还对多种肿瘤具有抑制作用^[2,3], 但具体作用机制尚不清楚。本实验选择在人肝癌细胞凋亡过程中发挥重要作用的 Survivin 和 P53 进行研究, 旨在探讨 EGCG 对体外培养的肝癌细胞凋亡的作用及其可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株

人肝癌细胞株 SMMC-7721 购于中国科学院上海生物研究所细胞库。

1.1.2 主要试剂与仪器

EGCG 标准品购自 Sigma 公司; 流式细胞仪凋亡试剂盒 Annexin V-FITC Kit 购自 BECKMAN 公司; 免疫细胞化学试剂购自美国 Bioworld Technology 公司; RT-PCR 相关试剂购自北京天根科技有限公司; PCR 引物购自上海生工生物工程有限公司; 主要实验仪器包括 Binary HPLC Pump 高压液相色谱仪 (JEOL)、德国 BT8100 液相色谱分析仪、美国 Beckman Coulter 流式细胞仪、德国 Eppendorf PCR

仪等。

1.2 实验方法

1.2.1 EGCG 单体的制备

将商品茶多酚溶解于 pH 4.0 (柠檬酸酸化) 的蒸馏水,再加入三倍于蒸馏水的乙酸乙酯,振荡摇匀混合液,静置。约 10 min 后,溶液分层,上层棕色溶液即为第一次萃取的酯层。重复萃取两次,过滤酯层,用制备色谱流动相将得到的滤液配制成一定浓度的制备样品溶液,进色谱柱收集相应馏分,馏分再经 P-1 大孔树脂吸附脱溶剂,低沸点无毒溶剂洗脱,相应低沸点组分经旋转蒸发浓缩(温度控制在 25 °C,真空度为 1 kPa),浓缩液冷冻干燥后,得到 EGCG 白色粉末。经外标法测定^[4],所得 EGCG 单体浓度达 98.6%。

1.2.2 细胞培养

SMMC-7721 细胞培养于含 10% 特级胎牛血清、链霉素和青霉素各 100 U/mL、pH 7.3 的 DMEM 培养液,37 °C,饱和湿度,5% CO₂ 的培养箱中培养。每日倒置相差显微镜观察细胞形态及生长情况,约 3 d 传代一次。

1.2.3 流式细胞仪 Annexin V-FITC/PI 法检测肝癌细胞的凋亡情况

将对数生长期的 SMMC-7721 细胞以 2.0×10^5 个/mL 的浓度接种于 6 孔板,每孔 2 mL,待细胞贴壁后参照既往实验^[5]加入 EGCG,分为对照组(0 μg/mL)、EGCG 低浓度组(32 μg/mL)、EGCG 高浓度组(128 μg/mL)。孵育 48 h 后用 0.25% 的胰蛋白酶消化,吹打细胞为单细胞悬液。用 4 °C PBS 液洗涤细胞两次,4 °C 下 1000 rpm 离心 5 min,弃上清。100 μL PBS 液重悬细胞,使细胞密度为 $5 \times 10^5 \sim 5 \times 10^6$ 个/mL,放置冰盒上。每 100 μL 细胞悬液中加入 Annexin V-FITC 5 μL 和 PI(0.25 mg/mL) 2.5 μL,300 μL 结合缓冲液,轻柔混匀,冰上避光孵育 10 min 后上机测定分析。此外制备 A 孔为正常待测细胞,B 孔正常待测细胞中加入 1 mL 3% 多聚甲醛(PFA)PBS 固定,冰上孵育 30 min 后离心,100 μL PBS 液重悬。A、B 孔加入 PI(0.2 mg/mL) 2.5 μL,300 μL 结合缓冲液。视 A 孔为正常细胞,B 孔为死亡细胞,调节适合的补偿参数,完成凋亡检测前的参数设定,上机测定。

1.2.4 免疫细胞化学检测 SMMC-7721 细胞 Survivin、P53 蛋白表达

将 SMMC-7721 细胞以 1.0×10^5 个/mL 接种于

12 孔培养板中,每孔 1 mL,待细胞贴壁后分别加入终浓度为 0、32、128 μmol/L 的 EGCG 培养 48 h 后终止培养。取出细胞爬片,按免疫细胞化学 SABC 法进行 Survivin、突变型 P53 标记,DAB 显色,苏木精复染,乙醇梯度脱水,封片,光镜观察。以试剂提供的阳性表达切片作阳性对照,以 PBS 代替第一抗为阴性对照。阳性显色为棕黄色颗粒,Survivin 阳性表达于胞浆,P53 阳性表达于细胞核。高倍视野下($\times 400$)随机选取图像,运用 Image Pro Plus 6.0 软件分析 Survivin、P53 阳性表达的积分光密度(Integral Optical Density, IOD)值。

1.2.5 RT-PCR 检测 SMMC-7721 细胞 Survivin、P53 mRNA 表达

用 Oligo 6.71 Pemo 引物设计软件,设计目的基因 Survivin、突变型 P53 及内参 GAPDH 特异性引物。

Survivin 上游引物:5'-CCTGGCAGCCCTTTCTCA-3'

下游引物:5'-TCAGTGGGGCAGTGGATG-3'

突变型 P53 上游引物:5'-CGTGTITGTGCCTGTCCT-3'

下游引物:5'-TGCTCGCTTAGTGCTCCCT-3'

GAPDH 上游引物:5'-ATGCTGGCGCTGAGTACGTC-3'

下游引物:5'-GGTCATGAGTCCTTCCACGATA-3'

SMMC-7721 细胞以 2.0×10^5 个/mL 接种于 6 孔培养板中,每孔 2 mL,待细胞贴壁后分别加入终浓度 0、32、128 μmol/L 的 EGCG 培养 48 h 后终止培养。按照 RNA simple Total RNA Kit 试剂盒说明提取细胞总 RNA,并验证总 RNA 完整性及总 RNA 样品纯度和浓度后,逆转录合成 cDNA,PCR 扩增 30 个循环,取 5 μL PCR 产物在 1.6% 琼脂糖凝胶中以 100 mv 恒压电泳 45 min,在紫外线凝胶成像系统成像,使用 BIO-RAD Quantity One 4.6 软件分析 DNA 条带,并与内参 GAPDH 吸光值比较,得到目的基因 mRNA 的相对表达量。

1.2.6 统计学方法

结果采用 SPSS16.0 软件进行分析。计量资料用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,检测结果经方差齐性检验,组间两两比较采用单因素方差分析(One Way Anova)SNK 法,以 $P < 0.05$ 视为有统计学差异。

2 实验结果

2.1 流式细胞仪检测肝癌细胞的凋亡

流式细胞仪检测,EGCG 各实验组凋亡均增加,其凋亡指数(%)与对照组相比差异有显著性。散

点图上可见代表凋亡细胞的右下象限细胞数随 EGCG 浓度增高而明显增加,见表 1、图 1。结果显示绿茶提取物 EGCG 单体对人肝癌 SMMC-7721 细胞的凋亡有明显诱导作用。

表 1 不同浓度 EGCG 对人肝癌细胞株 SMMC-7721 凋亡的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 1 The effect of EGCG on the apoptosis of SMMC-7721 cells *in vitro* ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别 Group	剂量 Dose ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	凋亡指数 Apoptotic index (%)	P 值(与对照组比较) P value (compare with control)
对照组 Control	-	1.28 \pm 0.34	
EGCG 低浓度组 EGCG-L	32	10.06 \pm 1.22	<0.01
EGCG 高浓度组 EGCG-H	128	28.55 \pm 1.72	<0.01

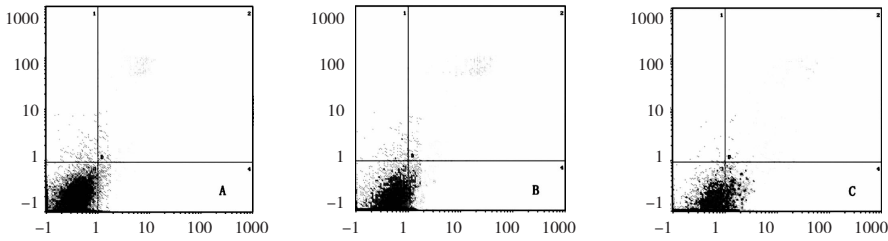


图 1 EGCG 对 SMMC-7721 凋亡的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 1 The apoptosis of SMMC-7721 cells treated with EGCG

A: 阴性对照; B: 32 $\mu\text{mol}/\text{L}$ EGCG; C: 128 $\mu\text{mol}/\text{L}$ EGCG; A: control; B: 32 $\mu\text{mol}/\text{L}$ of EGCG; C: 128 $\mu\text{mol}/\text{L}$ of EGCG

2.2 免疫细胞化学法检测 SMMC-7721 细胞中 Survivin、P53 蛋白表达

随着 EGCG 浓度的增加, SMMC-7721 细胞中 Survivin、突变型 P53 的蛋白表达降低。见表 2。

表 2 EGCG 对 SMMC-7721 细胞中 Survivin、P53 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 2 The expression of Survivin and P53 proteins in SMMC-7721 cells treated with EGCG ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别 Group	剂量 Dose ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	积分光密度值 Integral optical density	
		Survivin	P53
对照组 Control	-	73.21 \pm 8.25	52.11 \pm 4.94
EGCG 低浓度组 EGCG-L	32	56.84 \pm 5.09 [▲]	38.23 \pm 4.76 [▲]
EGCG 高浓度组 EGCG-H	128	41.07 \pm 4.26 ^{▲*}	26.38 \pm 3.15 ^{▲*}

注:与对照组相比, [▲] $P < 0.05$; 与 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组比较, ^{*} $P < 0.05$ 。

Note: Compare with control, [▲] $P < 0.05$; compare with 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ group, ^{*} $P < 0.05$.

2.3 RT-PCR 检测 SMMC-7721 细胞中 Survivin、P53 mRNA 表达

P53 mRNA 表达,而且随着药物剂量的增加,下调趋势更加明显($P < 0.05$)。见表 3,图 2。

实验结果显示,EGCG 能下调 Survivin mRNA、

表 3 EGCG 对 Survivin、P53 mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 3 The expression of Survivin and P53 mRNA in SMMC-7721 cells treated with EGCG ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别 Group	剂量 Dose ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	相对灰度值 Relative gray value	
		Survivin	P53
对照组 Control	-	0.91 \pm 0.01	0.88 \pm 0.06
EGCG 低浓度组 EGCG-L	32	0.78 \pm 0.02 [▲]	0.61 \pm 0.02 [▲]
EGCG 高浓度组 EGCG-H	128	0.64 \pm 0.05 ^{▲*}	0.53 \pm 0.01 ^{▲*}

注:与对照组相比, [▲] $P < 0.05$; 与 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组比较, ^{*} $P < 0.05$ 。

Note: Compare with control, [▲] $P < 0.05$; compare with 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ group, ^{*} $P < 0.05$.

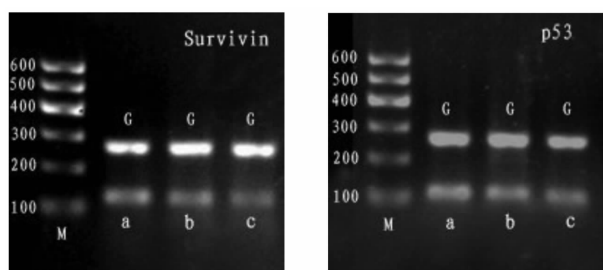


图2 EGCG对突变型Survivin mRNA、P53 mRNA表达的影响

Fig. 2 The expression of Survivin and P53 mRNA in SMMC-7721 cells treated with EGCG

M: Marker; G: 内参; a: 阴性对照; b: 32 $\mu\text{g/mL}$; c: 128 $\mu\text{g/mL}$

M: Marker; G: GAPDH; a: control; b: 32 $\mu\text{g/mL}$; c: 128 $\mu\text{g/mL}$

3 讨论

肝细胞肝癌在我国具有较高的发病率和死亡率,一直是肿瘤治疗研究的重点之一,寻找价廉易得低毒副作用的植物药也一直是肿瘤治疗的重要方向。绿茶提取物经实验证实对肝细胞肝癌具有抑制作用^[6],但具体作用机制不明,制约了绿茶提取物EGCG运用于临床肝癌治疗的前景。本实验旨在探讨EGCG对体外培养的肝癌细胞凋亡的作用和其可能的机制,为EGCG运用于临床抗肝癌治疗提供更多实验依据。

Survivin是凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis proteins, IAP)家族中分子量最小的蛋白,分子结构由一个N端的BIR结构域和一个长的C端(螺旋结构组成,其中BIR结构域被认为是Survivin发挥抗凋亡作用的关键部位^[7]。正常情况下Survivin仅在胚胎组织中高表达,且其表达还具有细胞周期依赖性,在细胞周期G2/M期高表达,能够精确调控姐妹染色体的分离。同时,Survivin可以通过线粒体途径和死亡受体途径,最终作用于Caspase-3和Caspase-7起到抗凋亡作用。也可能通过阻断Caspase-9依赖的细胞凋亡信号传导起到间接抗凋亡作用。有大量的研究表明Survivin在大多数的癌组织中有不同程度的表达,并且Survivin的过表达导致细胞凋亡减少,与肿瘤的临床分期、组织分化等具有相关性。由于Survivin基因表达特异性强,在肿瘤组织中表达率高,因此成为了肿瘤基因治疗的理想靶点。本实验结果证实,在人肝癌细胞株SMMC-7721凋亡增加的过程中,的确存在Survivin基因的表达抑制,这一结果与既往实验结果一致^[8]。因此可以推测绿

茶提取物EGCG可以作用于Survivin基因,通过抑制Survivin基因的表达达到诱导凋亡的目的。

野生型的P53基因具有重要的抑癌作用,主要通过检测G1和G2/M期校正点并阻滞细胞周期、抑制肿瘤血管生成和促进细胞凋亡等发挥作用。其中抑制Survivin的表达可能是野生型P53促进细胞凋亡的主要途径,但抑制表达的机制复杂,目前尚无定论。大多数人认为野生型P53可与Survivin启动子结合,从而抑制Survivin表达。Survivin表达与P53状态及启动子多态性有关,也有研究认为P53与Survivin外显子去甲基化状态有关。当野生型P53发生基因缺失、杂合和(或)突变时,将对机体产生不同程度的影响。比如由于突变型的P53缺乏在转录水平对Survivin表达的抑制,会使得Survivin过度表达,从而抑制肿瘤细胞的凋亡,促进肿瘤的发生发展。已有的研究表明,人类大多数肿瘤都存在P53基因的突变,并且Survivin和突变型P53表达具有相关性,对抑制肿瘤细胞的凋亡起着协同作用。下调Survivin和突变型P53表达可以诱导肿瘤细胞凋亡并使肿瘤细胞出现有丝分裂阻滞而抑制增殖^[9]。Chang等^[10]也认为,当p38MAPK-p53-survivin信号通路受到抑制时可以诱导人结肠癌细胞株HCT116的凋亡。以上实验均证明,通过抑制Survivin或突变型P53的表达,可以达到诱导肿瘤细胞凋亡的作用,与本实验结果基本一致。

综上所述,Survivin和突变型P53都在肿瘤细胞的凋亡过程中起到了重要的作用,而绿茶提取物EGCG可以通过抑制Survivin和突变型P53的表达,诱导人肝癌细胞株SMMC-7721凋亡,进而发挥抗肿瘤作用。

参考文献

- 1 Li B(李博), Wu YY(吴媛媛), Tu YY(屠幼英). Research progress of (-)-epigallocatechin-3-gallate transformation *in vitro* and *in vivo* and bioactivities of its products. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2010, 2: 351-355.
- 2 Jiang T(姜涛), Li L(李岚), Du Y(杜阳), et al. Inhibitory effect of crude extract from green tea on mycobacterium smegmatis mc²155. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2012, 1: 84-88.
- 3 Gu JW, Kristina LM, Kevan BT, et al. EGCG, a major green tea catechin suppresses breast tumor angiogenesis and growth via inhibiting the activation of HIF-1 α and NF κ B, and VEGF expression. *Vasc Cell*, 2013, 5: 9.