

EGCG 联合顺铂抑制骨肉瘤 MG-63 细胞增殖、侵袭及迁移作用的实验研究

黄 磊^{1,2},邹日昌³,宋嘉琪¹,罗 超^{1,2},殷嫦嫦^{4*}

¹南昌大学 研究生院医学部; ²南昌大学第二附属医院骨科,南昌 330006; ³抚州市立医院骨科,抚州 344000;

⁴九江学院基础医学院,九江 332000

摘要:本文探讨了表没食子酸儿茶素没食子酸酯(epigallocatechin gallate,EGCG)联合顺铂(cisplatin,CDDP)对人骨肉瘤 MG-63 细胞生长抑制作用及可能的机制。分别采用不同浓度梯度表没食子酸儿茶素没食子酸酯和顺铂单独及联合作用于 MG-63 细胞;CCK-8 法检测细胞生长抑制率,显微镜观察细胞形态变化;Transwell 小室法检测细胞侵袭数,划痕实验检测细胞迁移能力;Western blot 检测相关蛋白 Bax、Bcl-2、Bcl-xL、MMP-2、MMP-9、Caspase-3、cleaved Caspase-3 表达情况。结果显示,骨肉瘤 MG-63 细胞的增殖、侵袭及迁移能力随表没食子酸儿茶素没食子酸酯及顺铂的剂量增加而降低($P < 0.05$),联合用药抑制作用更强;Bcl-2、Bcl-xL、MMP-2 及 MMP-9 表达水平明显下调($P < 0.05$),Bax、Caspase-3、cleaved Caspase-3 水平明显上调($P < 0.05$);与表没食子酸儿茶素没食子酸酯组、顺铂组单药应用相比,联合用药组 MG-63 细胞抑制比例最高,其相关蛋白表达量也更为显著。综上所述,表没食子酸儿茶素没食子酸酯能有效抑制人骨肉瘤 MG-63 细胞增殖并诱导细胞凋亡发生,与顺铂联合应用后效果更为明显。本研究结果为骨肉瘤的临床治疗提供了新的理论依据。

关键词:表没食子酸儿茶素没食子酸酯;顺铂;骨肉瘤;联合用药;细胞增殖

中图分类号:R73-36

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2020)12-2101-09

DOI:10.16333/j.1001-6880.2020.12.015

The research of EGCG combined with cisplatin in inhibiting the proliferation, invasion and migration of osteosarcoma MG-63 cells

HUANG Lei^{1,2}, ZOU Ri-chang³, SONG Jia-qi¹, LUO Chao^{1,2}, YIN Chang-chang^{4*}

¹Graduate School of Medicine, Nanchang University; ²The Second Hospital Affiliated of Nanchang University, Nanchang 330006, China;

³Fuzhou Municipal Hospital, Fuzhou 344000, China; ⁴Basic Medical College of Jiujiang University, Jiujiang 332000, China

Abstract: To investigate the effect of epigallocatechin gallate (EGCG) combined with cisplatin on cell proliferation of human osteosarcoma MG-63 cells and its possible mechanism. MG-63 cells were treated with different concentrations of EGCG and cisplatin alone or in combination. The cell growth inhibition rate was measured by CCK-8 morphology was observed by microscope, the Transwell chamber detects the number of cell invasions, and the scratch test detects the cell migration ability; Western blot detection of Bax, Bcl-2, Bcl-xL, MMP-2, MMP-9, Caspase-3 and cleaved Caspase-3. The results showed that the ability of proliferation, invasion and migration of MG-63 cells decreased with the increase of the dose of EGCG and cisplatin ($P < 0.05$), and the combined drug inhibition was stronger; the expression levels of Bcl-2, Bcl-xL, MMP-2 and MMP-9 were significantly down-regulated ($P < 0.05$), and the levels of Bax, Caspase-3 and cleaved Caspase-3 were significantly up-regulated ($P < 0.05$); Compared with the gallic acid catechin gallate group and the monotherapy application of the platinum group, the MG-63 cells in the combination group had the highest inhibition rate, and the related protein expression was also more significant. To sum up, EGCG can effectively inhibit the proliferation of human osteosarcoma MG-63 cells and induce apoptosis. The effect is more obvious when combined with cisplatin.

收稿日期:2019-09-26 接受日期:2020-11-09

基金项目:江西省卫生健康委科技计划(20204253)

*通信作者 Tel:86-013607920508; E-mail:yinchangchang112@163.com

Key words: EGCG; cisplatin; osteosarcoma; drug combination; cell proliferation

骨肉瘤(osteosarcoma, OS)是骨最常见的恶性肿瘤,好发于长骨的干骺端,常见于儿童和青少年,恶性程度高,预后差,容易发生肺转移,手术切除联合新辅助化疗、辅助化疗相结合为OS的主要治疗方式^[1],在临床治疗中,多柔比星、顺铂、异环磷酰胺等是常用于治疗骨肉瘤的化疗药物。随着医疗水平的进步,新辅助化疗能够有效提高患者5年生存率,但仍有30%~40%患者出现肿瘤复发、转移,尤其是对于已出现肺转移者,往往导致呼吸衰竭,预后极差^[1-2]。因此,寻找新的治疗OS的方法已经成为近几年医学领域的一大热点。

茶文化在我国有几千年的文化历史,茶中的主要活性成分为儿茶素,包括没食子酸儿茶素(gallocatechin, GC)、表没食子酸儿茶素(epigallocatechin, ECG)、表没食子酸儿茶素没食子酸磷脂(epigallocatechin gallate, EGCG)及表儿茶素(EC)等^[3]。EGCG是一类既亲水又亲脂的两性分子,能够在体液中充分溶解,轻松穿过细胞膜与细胞内靶点相结合^[3]。大量研究表明EGCG含有多种活性基因,具有抗肿瘤、抗氧化、抗炎等作用,这些基团可以与转录生长因子、蛋白激酶、细胞因子和酶等多种分子靶点结合而相互作用,导致癌细胞的凋亡。因此EGCG是一类理想的潜在抗癌药物。已有研究报道EGCG能够抑制宫颈癌细胞、肝癌细胞及胰腺癌细胞的增殖,在预防肝胆肿瘤发生发展过程中发挥重要作用^[4-6]。顺铂(cisplatin, CDDP)为骨肉瘤临床治疗中常用的化疗药物,在近年来的临床治疗中,多应用以CDDP为核心的联合化疗方案治疗骨肉瘤患者,且联合用药能够很好的提高疗效、降低耐药性。但是CDDP的副作用较大,最主要的就是肾毒性^[7],往往造成急性肾损伤,并呈剂量、时间相关性,这也在一定程度上限制了其在临床上的应用。大量抗氧化复合物如番茄红素^[8]、银杏果提取物^[9]、迷迭香^[10]等均能减轻CDDP的肾毒性,EGCG是一类抗氧化酶,具有较强的抗氧化、抗肿瘤、抗炎等作用,在医药及保健食品领域具有广阔的应用前景,已有研究报导EGCG能够通过提高细胞的抗氧化能力达到减少CDDP对细胞的损伤^[11]。本研究将EGCG联合CDDP作用于人骨肉瘤MG-63细胞,探讨其抑制骨肉瘤生长的作用机制,为临床寻找高效、低毒的新型抗癌化治疗方案提供新的策略。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

人骨肉瘤MG-63细胞株为本实验室冻存,EGCG(美国Sigma公司,纯度≥98%),顺铂(美国Sigma公司),胰蛋白酶-EDTA消化液(北京Solarbio公司)、DMEM高糖培养基(美国Hyclone公司)、胎牛血清(美国Gibco公司);兔抗人Bax、Bel-2、Bel-xL、MMP-2、MMP-9、Caspase-3、cleaved Caspase-3抗体(美国Proteintech公司);CCK-8试剂盒(上海经科化学科技有限公司);Transwell(美国Millipore公司);25 cm²塑料培养瓶、6孔板、96孔培养板(美国Corning公司);Annexin V-PE/7AAD细胞凋亡检测试剂盒(BD公司);BCA蛋白定量分析试剂盒(北京Solarbio公司);PVDF膜(美国Millipore公司);封闭奶粉(蒙牛公司);倒置相差显微镜(日本Nikon公司);酶标仪、电泳槽(美国BIO-RAD公司);凝胶成像分析系统(美国BIO-RAD公司);CO₂恒温培养箱(Eppendorf公司)。

2 方法

2.1 器材准备

本实验所需要使用的器械及其他材料均经过高压蒸汽锅高温(126 °C)灭菌30 min以上,再放入烘箱中干燥,备用。

2.2 细胞培养、分组及细胞形态观察

将骨肉瘤MG-63细胞培养于含10%胎牛血清的DMEM高糖培养基的7 mL培养瓶中。置于37 °C、5% CO₂的恒温培养箱培养,细胞均匀贴壁生长,隔天换液,换液时使用PBS清洗,当细胞达75%~85%汇合率时,用0.25%胰蛋白酶消化并传代。分别用倒置显微镜观察各组细胞贴壁生长状况及形态变化。EGCG联合CDDP实验分为空白对照组、EGCG组(60 μmol/L)、CDDP组(60 μmol/L)、联合用药组(EGCG 60 μmol/L+CDDP 60 μmol/L)。

2.3 CCK-8法检测不同药物对MG-63细胞活力的影响

调整MG-63细胞至1×10⁴个/孔接种于96孔培养板,DMEM培养基至每孔100 μL,设置浓度梯度,EGCG组:0(对照组)、20、40、60、80、100 μmol/L;CDDP组:0(对照组)、20、40、60、80、100 μmol/L,每组细胞接种5个复孔,待细胞生长贴壁后加入不同浓度EGCG及CDDP,常规培养72 h后每孔加入

CCK-8 试剂 100 μL, 孵育 2 h 后酶标仪测定其 450 nm 处吸光度值(*A*), 取对照组抑制率为 0%。后收集各组培养基, 加入乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒中的 NAD⁺/INT/diaphorase 配置成的混合液, 室温下孵育 30 min, 最后用酶标仪检测 96 孔板中 490 nm 波长处的吸光度, 吸光度值表示 LDH 水平, 以培养基中 LDH 水平反映细胞坏死情况。

2.4 Transwell 侵袭试验

将 Transwell 小室放入 24 孔板中, 在小室的上室中加入 50 μL Martrigel 基质胶(Martrigel 胶与无血清无双抗培养基 1:8 稀释), 置于 37 °C 培养箱中, 风干 5 h, 待 Martrigel 基质胶凝固后弃去上层培养液, 收集 MG-63 细胞, 调整细胞密度至 1×10^5 个/mL, 接种于 Transwell 小室的上室中, 加入 EGCG 组、CDDP 组、联合用药组(EGCG + CDDP)培养液(分组同“2.1”), 以 DMSO 为对照, 下室加入 500 μL 含 20% FBS 培养基, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中孵育 24 h 后取出小室, 用棉签拭去小室膜内层细胞, 置于 4% 多聚甲醛固定 15 min, 风干后置于结晶紫中染色 20 min, 超纯水洗涤, 干燥后将小室倒置于显微镜下, 随机选取 5 个视野观察并计数侵袭至小室下层的细胞, 计算平均值。

2.5 细胞划痕试验

胰蛋白酶消化 MG-63 细胞后接种于 6 孔板中, 待细胞生长密度达 80% 左右时用 100 μL 枪头在孔中划一条直线, PBS 漂洗后, 加入不含血清的 DMEM 培养基与 EGCG 组、CDDP 组、联合用药组(EGCG + CDDP)培养液(分组同“2.1”), 每组重复 3 次, 分别培养 24、48 h 后拍照。

2.6 流式细胞术检测 EGCG 联合 CDDP 对 MG-63 细胞凋亡的影响

分别收集对照组、EGCG 组、CDPP 组和联合用药组 MG-63 细胞后转入 5 mL 离心管中, 1 000 × g 4 °C 离心 10 min, 收集细胞, 弃上清。用预冷 PBS 液洗细胞 2 次, 弃上清, 收集细胞沉淀, 将细胞重悬于 500 μL 结合缓冲液中。加入 5 μL Annexin V-PE 混匀后加入 5 μL 7-ADD, 混匀后于室温避光孵育 15 min。1 h 内在流式细胞仪(FACS)检测各组细胞凋亡情况。

2.7 Western blot 检测相关蛋白表达水平

同“2.1”方法分组培养 48 h 后, PBS 漂洗后分别提取各组细胞总蛋白, 使用 BCA 法测定各组蛋白浓度, 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白, 之后将胶

内蛋白质电转至 PVDF 膜上, 将 PVDF 膜用 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 一抗 4 °C 孵育过夜, 洗膜后再用相应二抗孵育 2 h, 适当漂洗, 化学发光后放入化学发光成像系统观察条带, 分析结果。目的蛋白包括 Bax、Bcl-2、Bcl-xL、MMP-2、MMP-9、Caspase-3、及 cleaved Caspase-3。

2.8 统计学处理

实验数据均采用均数 ± 标准差(mean ± SD)表示, 组间比较采用单因素方差分析, 并通过 Scheffe 检验进行两两比较, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 形态学观察

显微镜下见空白对照组 MG-63 细胞贴壁良好, 细胞形态大小不一, 分布均匀, 多呈梭形, 胞核清晰, 胞质均匀透亮; EGCG 组可见部分细胞脱落降解, 贴壁细胞数减少, 部分脱落细胞形态由梭形变圆, 变小, 细胞间距增大, 且随着药物浓度梯度增加细胞死亡数量越多; CDDP 组可见较多细胞脱落, 贴壁细胞密度减低, 也随药物浓度梯度的增加细胞死亡数也增加; 联合用药组可见大量细胞坏死脱落, 细胞数量急剧减少, 培养液中可见较多悬浮死细胞, 随着时间的延长也愈加明显(图 1)。

3.2 不同浓度 EGCG 及 CDDP 均能抑制 MG-63 细胞增殖

如图 2 所示, CCK-8 结果显示与对照组相比, 不同浓度的 EGCG 及 CDDP 均能不同程度抑制骨肉瘤 MG-63 细胞增殖(*P* < 0.05), 造成细胞活力下降, 且随着药物浓度的增加, 对细胞的抑制作用愈加明显(*P* < 0.05)。各组分别取 100 μL 细胞上清于酶标板中检测 LDH 释放率, 各组 LDH 释放量如下: 对照组 LDH 释放量约为 0.86 ± 0.17 μU/mL, EGCG 组、CDDP 组释放量分别为 1.63 ± 0.21 μU/mL 与 2.18 ± 0.37 μU/mL, 而联合用药组中约为 5.61 ± 0.53 μU/mL, 表明单药组中 LDH 释放量水平均高于空白对照组, 而联合用药组中 LDH 释放量最高(*P* 均 < 0.05), EGCG 组及 CDDP 组两组之间差异无统计学意义。在 EGCG、CDDP 浓度超过 60 μmol/L 后抑制率曲线进入平台期, 表明这也是药物效果最佳浓度。

3.3 EGCG 联合 CDDP 对 MG-63 细胞增殖抑制作用更为显著

分别使用 EGCG、CDDP 单药及 EGCG + CDDP 联合用药作用于 MG-63 细胞(分组同“2.1”), 结果如图 3 示, 与对照组、EGCG 组及 CDDP 组相比, 联

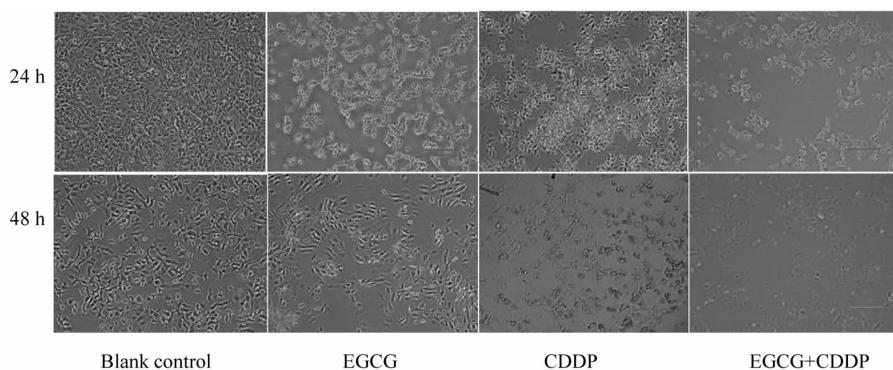


图1 不同时间 EGCG 组、CDDP 组、联合用药组细胞生长情况($\times 100$)

Fig. 1 Cell growth in EGCG group, CDDP group and combination group at different time ($\times 100$)

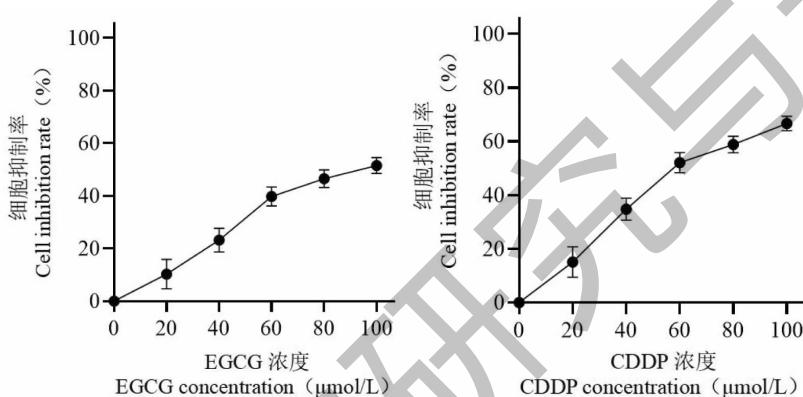


图2 EGCG 与 CDDP 对 MG-63 细胞抑制率($n=3$)

Fig. 2 Inhibition rate of EGCG and CDDP on MG-63 cells ($n=3$)

合用药组在不同时间(24、48、72 h)对 MG-63 细胞抑制作用更为显著,表明加入 EGCG 联合用药后能够

增强 CDDP 对骨肉瘤 MG-63 细胞增殖抑制作,且随着作用时间的延长抑制作用也更强($P < 0.05$)。

3.4 EGCG 联合 CDDP 抑制骨肉瘤 MG-63 细胞的侵袭能力

用不同浓度 EGCG、CDDP 及联合用药组处理 MG-63 细胞,采用 Transwell 小室法检测对 MG-63 细胞的侵袭能力,结果如图 4 所示,对照组及 DMSO 组穿透小室膜的细胞数分别为 296.74 ± 56.61 个和 275.26 ± 31.12 个,EGCG 组穿过小室膜的细胞数为 176.23 ± 16.76 个,CDDP 组穿过小室膜的细胞数为 121.26 ± 10.15 个,联合组穿个小室膜的细胞数为 42.69 ± 9.96 个,与对照组相比,EGCG 组及 CDDP 组穿过小室膜细胞数均减少,MG-63 细胞侵袭能力减弱;联合用药组穿过小室膜细胞数减少更为显著,作用更明显,表明联合用药对 MG-63 细胞的侵袭能力抑制作用最强,加入 EGCG 后能够增强 CDDP 对骨肉瘤 MG-63 的抑制作用,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

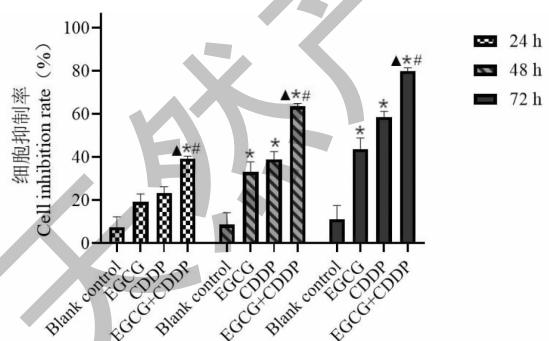


图3 不同时间 EGCG 组、CDDP 组及 EGCG 联合 CDDP 组对 MG-63 细胞抑制率($n=3$)

Fig. 3 Inhibition rate of MG-63 cells in EGCG group, CDDP group and combination group at different time ($n=3$)

注:与对照组相比, * $P < 0.05$; 与 EGCG 组相比, # $P < 0.05$; 与 CDDP 组相比, ▲ $P < 0.05$; 下同。Note: Compared with the control group, * $P < 0.05$; Compared with the EGCG group, # $P < 0.05$; Compared with the CDDP group, ▲ $P < 0.05$; the following is the same.

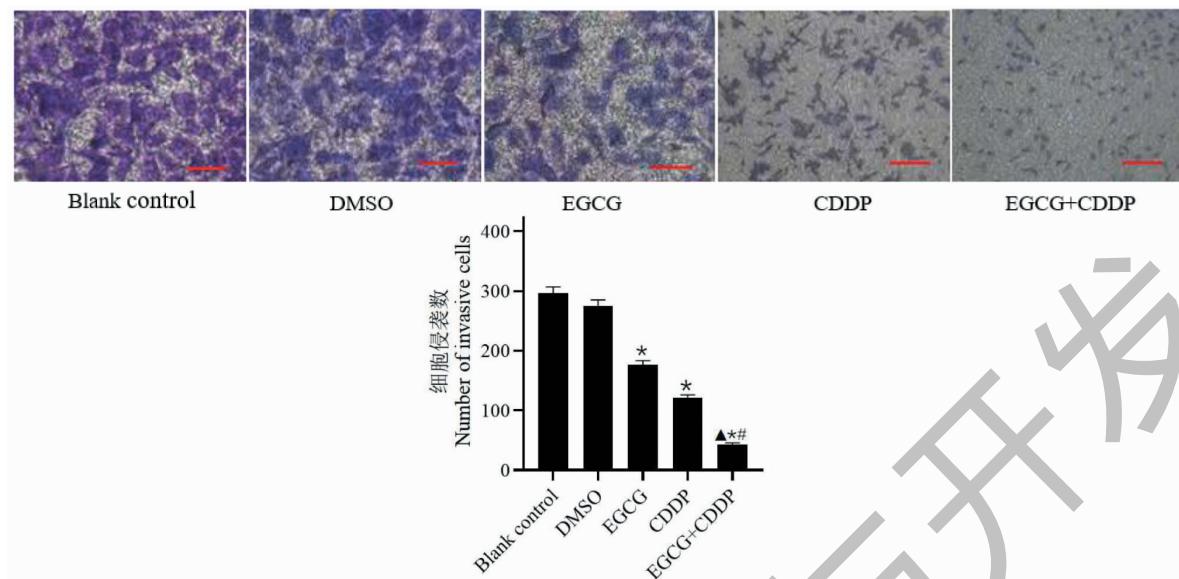


图 4 Transwell 小室法检测 EGCG、CDDP 及联合用药对 MG-63 细胞侵袭能力的影响

Fig. 4 Using Transwell chamber assay to detect the effects of EGCG, CDDP and their combination on the invasive ability of MG-63 cells

3.5 EGCG 联合 CDDP 对骨肉瘤 MG-63 细胞迁移能力影响

细胞划痕实验检测各组药物对 MG-63 细胞迁移能力影响,结果如图 5 所示,相比于对照组,EGCG 组及 CDDP 组 MG-63 细胞迁移能力均下降,EGCG 单药组细胞划痕面积愈合率为 $53.25\% \pm 6.21\%$,CDDP 单药组细胞划痕面积愈合率为 $43.27\% \pm$

5.76% ,并伴随少量细胞的脱落坏死,细胞向中线增殖减慢;而 EGCG + CDDP 联合用药组细胞迁移能力明显减弱,细胞划痕愈合率为 $22.69\% \pm 3.88\%$,几乎未见细胞向中线增长,表明 EGCG 联合 CDDP 能更有效的抑制骨肉瘤 MG-63 细胞增殖,联合用药能够增强骨肉瘤 MG-63 细胞对 CDDP 的敏感性($P < 0.05$)。

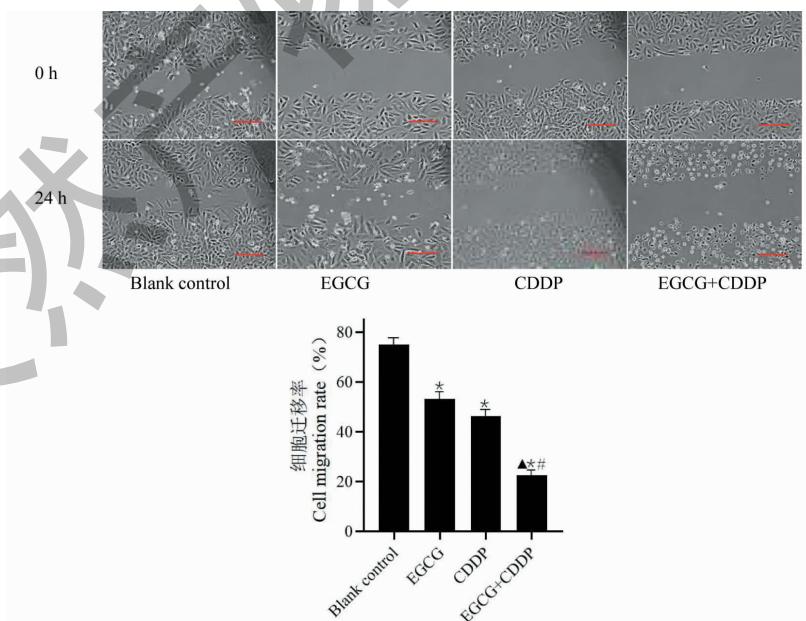


图 5 EGCG、CDDP 及联合用药对骨肉瘤 MG-63 细胞迁徙的抑制作用

Fig. 5 Inhibitory effect of EGCG, CDDP and their combination on the migration of osteosarcoma MG-63 cells

3.6 EGCG 联合 CDDP 对骨肉瘤 MG-63 细胞凋亡的影响

流式细胞仪检测发现如图 6 所示,与对照组相

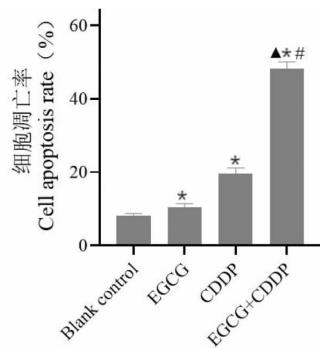


图 6 EGCG 联合 CDDP 对骨肉瘤 MG-63 细胞凋亡的影响

Fig. 6 Effects of EGCG combined with CDDP on apoptosis of osteosarcoma MG-63 cells

比,EGCG 组、CDDP 组凋亡率增加,分别为 $10.336\% \pm 0.028\%$ 、 $19.681\% \pm 3.755\%$,差异具有统计学意义($P < 0.05$) ;而 EGCG + CDDP 联合用药组凋亡率更高,凋亡率为 $48.279\% \pm 7.608\%$,与 EGCG 组及 CDDP 组比较差异具有统计学意义($P < 0.05$),提示两药联合应用能够显著诱导骨肉瘤 MG-63 细胞凋亡。

3.7 Western blot 检测 MG-63 细胞相关蛋白表达情况

Western blot 结果及灰度分析结果如图 7 所示:显影后的条带越黑越粗说明蛋白表达量越高,与对照组相比,分别单药应用 EGCG、CDDP 及将二者联合用药后,细胞中 MMP-2、MMP-9、Bcl-2 与 Bcl-xL 表达水平下调,同时 Bax、Caspase-3 以及 cleaved Caspase-3 蛋白水平上调,其中以联合用药组作用效果更明显,表明 EGCG + CDDP 对骨肉瘤 MG-63 细胞抑制作用效果最强,差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。

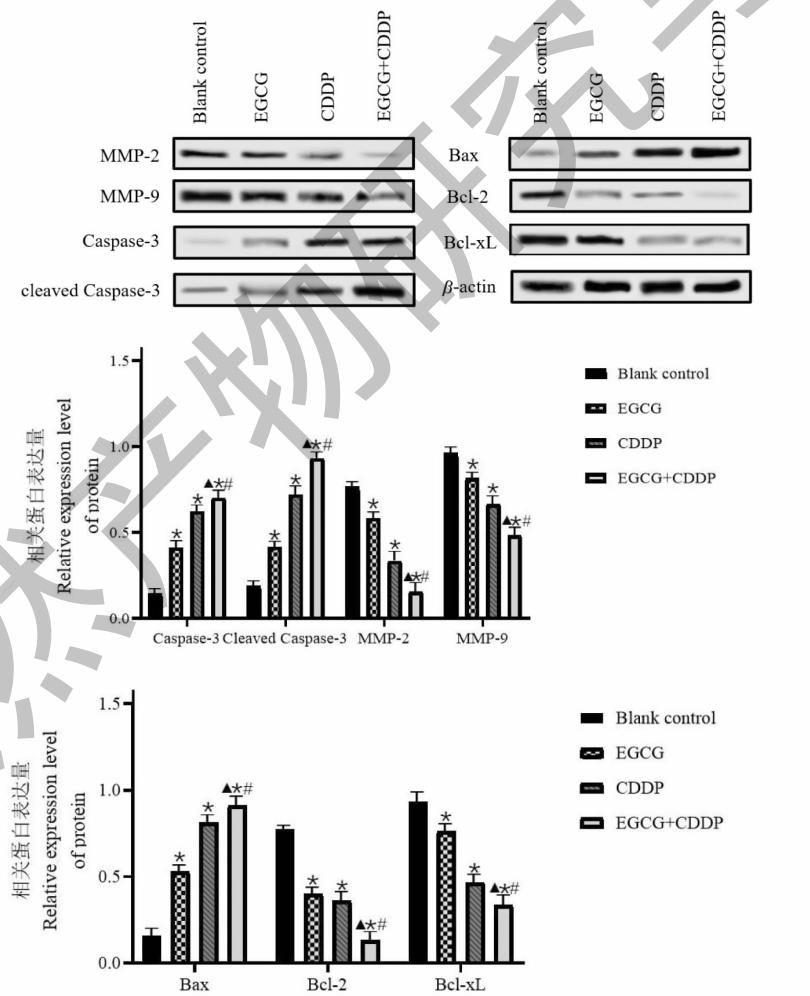


图 7 EGCG 组、CDDP 组及联合用药组对 MG-63 细胞相关蛋白表达的影响

Fig. 7 Effects of EGCG group, CDDP group and combination group on the expression of related proteins in MG-63 cells

4 讨论与结论

骨肉瘤是最常见的原发性骨恶性肿瘤,好发于儿童与青少年^[12],尽管有手术、新辅助化疗及手术联合辅助治疗的治疗方法,骨肉瘤患者的致死率仍较高,尤其对于肺转移者治疗效果极差,顺铂为临床中治疗骨肉瘤较为常用的化疗药物,但是近年来越来越多的患者对顺铂产生耐药性,寻找新的对抗骨肉瘤药物及联合顺铂增强其化疗敏感性的方案有极为重要的意义,因此以顺铂为核心的联合用药也成为了骨肉瘤治疗领域中的一大研究热点。

顺铂(CDDP)属铂类化疗药物中的一种,具有较强的广谱抗癌作用,其主要机制是通过抑制恶性肿瘤细胞中的DNA复制而发挥细胞毒性及抗肿瘤的作用^[8],临幊上 CDDP 可用于治疗多种恶性肿瘤如甲状腺癌、肺癌、食道癌、骨肉瘤等,具有较好的化疗效果,但是也存在不可避免的弊端如 CDDP 产生的肾毒性、耳毒性及耐药性,这也限制了 CDDP 的临幊应用,而肾毒性也是其最主要的副作用^[7,13],因此为顺铂寻找合适的辅药联合作用以减少 CDDP 药物毒性及提高整体化疔敏感性成为一大热点,目前临幊中也多应用以 CDDP 为核心的联合化疔方案,尽可能的在增强 CDDP 抗肿瘤作用的基础性减少药物对组织的损伤。儿茶素是茶中主要的活性物质,其中表没食子酸儿茶素没食子酸酯(EGCG)在绿茶中活性最高,具有多种生物特性如抗氧化、抗肿瘤及抗炎性反应^[14]。已有研究报道 EGCG 能够延缓 CDDP 造成的肾脏肾小球滤过率下降,缓解所致 HEK293 细胞的氧化损伤,在 CDDP 诱导的细胞损伤模型中,随着 EGCG 浓度的增加,HEK293 细胞的存活率也逐渐增加,表明 EGCG 能够在一定程度上对抗 CD- DP 的药物毒性^[11]。CDDP 对肾脏的损伤与氧化应激密切相关,而 EGCG 具有较强的抗氧化性,能够对抗氧化应激反应。有研究证实 EGCG 能够改善抗肾小球基底膜性肾小球肾炎,延缓 CDDP 造成的肾脏肾小球滤过率下降,对肾脏具有保护作用^[15,6]。在肿瘤领域中,EGCG 表现出广泛的抗癌作用,已有研究发现 EGCG 能够通过激活 JNK 信号通路诱导胃癌细胞凋亡^[17],通过下调 p65 的转录水平抑制膀胱癌的转移^[18]、上调 miRNA-1 抑制骨肉瘤细胞生长^[19],抑制宫颈癌^[4]、肝癌^[5]、胰腺癌^[6]细胞增殖的作用,这些都为 EGCG 发挥保护肾功能与抗癌作用提供了充足的理论依据。在本研究中,CCK-8 实验结果及显微镜下观察也表明 EGCG 具有抑制骨肉

瘤 MG-63 细胞增殖的作用,且 EGCG 联合 CDDP 能够发挥更强的抑制效果,表明二者联合作用能够更有效抑制 OS 的进展。

通过进一步实验我们发现,EGCG 联合 CDDP 对骨肉瘤细胞的抑制作用明显优于单药,在显微镜下观察各组药物处理的细胞可见,联合用药组的骨肉瘤 MG-63 细胞大量坏死,漂浮细胞明显增多,对细胞增殖的抑制作用明显强于单药组,表明 EGCG 联合 CDDP 对 MG-63 细胞具显著抑制作用。CCK-8 实验也证实,单独应用 EGCG 能够抑制骨肉瘤 MG-63 细胞生长,且随着药物浓度增加及作用时间的延长,细胞增殖抑制更明显,说明 EGCG 及 CDDP 对骨肉瘤 MG-63 细胞均有抑制作用,且具有剂量、时间依赖性,而在将 EGCG 与 CDDP 联合应用后结果发现其对 MG-63 细胞的抑制作用显著强于单药组;Transwell 侵袭实验结果表明,与对照组及 DMSO 处理组对比,EGCG、CDDP 单药应用组细胞侵袭能力均降低,穿过小室膜的细胞数也减少,而联合用药组的 MG-63 细胞侵袭能力最低,穿过小室膜的细胞数也最少;细胞划痕实验结果表明,EGCG 及 CDDP 单药组细胞的迁移能力减弱,划痕区域细胞数目增长减慢,而将 EGCG 与 CDDP 联合用药组细胞迁移能力大幅减弱,划痕区几乎没有明显细胞增长,同时细胞坏死数目也增多;Bcl 家族是重要的凋亡相关基因,其中 Bcl-2、Bcl-xL 是其阻止细胞凋亡的相关基因,而 Bax 是促进细胞凋亡的相关基因,Bcl 家族在胃肠道肿瘤、泌尿系肿瘤、骨肉瘤等恶性肿瘤中发生发展具有密切关联^[20]。通过 western blot 分析结果发现,EGCG、CDDP 单药组作用后,抗凋亡蛋白 Bcl-xL 与 Bcl-2 水平均下调,而促凋亡蛋白 Bax 水平明显上调,这一结果在 EGCG + CDDP 联合用药组更为显著,提示 EGCG 能够促进骨肉瘤 MG-63 细胞凋亡,与 CDDP 联合作用后效果更为明显。Caspase 家族是一组半胱氨酸蛋白酶,在介导细胞凋亡过程中起到重要作用,其中以 Caspase-3 最为关键,其激活是细胞凋亡的特异性标志^[21]。细胞凋亡有多种途径,但绝大多数途径末端都是通过 Caspase 的级联激活,最终激活为 Caspase-3,形成具有活性的 cleaved Caspase-3 片段,进而产生一系列级联反应^[22]。本研究结果表明在分别单药应用骨肉瘤 MG-63 细胞后,Caspase-3 及 cleaved Caspase-3 表达水平均增高,而联合用药组升高最为明显,提示 EGCG 也许能够通过上调 Caspase 家族基因表达促进 MG-63 细胞发

生凋亡,从而发挥抗骨肉瘤细胞的作用,流式细胞仪检测结果也提示 EGCG 能够诱导骨肉瘤 MG-63 细胞发生凋亡,且 EGCG + CDDP 联合用药效果更为显著。基质金属蛋白酶(MMPs)是一类蛋白水解酶,可通过破坏基质降解平衡而促进癌细胞突破基底膜和细胞外基质构成的组织学屏障,侵犯周围及远处组织,其中最具有代表性的便是 MMP-2 及 MMP-9 两个家族基因,基质金属蛋白酶的表达水平越高,肿瘤的侵袭能力也越强^[23]。本实验结果表明,药物作用骨肉瘤细胞后 MMP-2 及 MMP-9 表达水平均下调,且 EGCG + CDDP 联合组下降最为明显,表明 EGCG 联合 CDDP 作用能够发挥更为有效的抗骨肉瘤增殖的作用。以上结果均证实 EGCG 联合 CDDP 能够发挥更为显著的抑制骨肉瘤的增殖作用。

综上,本研究表明 EGCG 能够在体外抑制骨肉瘤 MG-63 细胞的增殖,联合 CDDP 用药后较 EGCG 及 CDDP 单药应用效果更强,由于 EGCG 对细胞具有一定的抗氧化性,能够保护肾功能,减少 CDDP 的肾毒性,联合用药还能够在发挥疗效的基础上减少 CDDP 对组织造成的损伤,是一类理想的化疗药物辅药,这也为骨肉瘤的临床治疗提供了新的理论依据与有价值的实验基础。然而本实验仅探讨了在体外对骨肉瘤 MG-63 细胞的影响,这也需继续完善相关实验以及进一步在体内实验中深入探究。

参考文献

- Verma AH, Kumar TS, Madhumathi K, et al. Curcumin releasing eggshell derived carbonated apatite nanocarriers for combined anti-cancer, anti-inflammatory and bone regenerative therapy [J]. *J Nanosci Nanotechnol*, 2019, 19: 6872-6880.
- Isakoff MS, Bielack SS, Meltzer P, et al. Osteosarcoma: Current treatment and a collaborative pathway to success [J]. *Clin Oncol*, 2015, 33: 3029-3035.
- Huo Y, Wang H, Study on the anticancer mechanism of epigallocatechin gallate [J]. *J Pract Med Tech* (实用医技杂志), 2016, 23: 253-255.
- Li J, Study on the anti-proliferative effect of epigallocatechin gallate combined with retinoic acid on cervical adenocarcinoma cells [J]. *Chin J Lab Diagn* (中国实验诊断学), 2015, 19: 547-551.
- Zhang Y, Shen YY, Feng Y, et al. Inhibitory effect of EGCG on human hepatocellular carcinoma cells and its possible mechanism [J]. *Chin J Cancer Biother* (中国肿瘤生物治疗杂志), 2014, 21(1): 38-43.
- Xiao H, Shi KW, Cao HY, Inhibitory effect of EGCG on the growth of pancreatic cancer cell line PANC-1 and its mechanism [J]. *J Pract Clin Med* (实用临床医药杂志) 2010, 14(7): 26-29.
- Ronald PM, Raghu KT, Ganesan R, et al. Mechanisms of cisplatin nephrotoxicity [J]. *Toxins*, 2010, 2: 2490-2518.
- Dimitrovic R, Potocnjak I, Crnecovic-Orlic Z, et al. Nephroprotective activities of rosmarinic acid against cisplatin-induced kidney injury in mice [J]. *Food Chem Toxicol*, 2014, 66: 321-328.
- Gao Z, Liu G, Hu Z, et al. Grape seed proanthocyanidin extract protects from cisplatin-induced nephrotoxicity by inhibiting endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis [J]. *Mol Med Rep*, 2014, 9: 201-207.
- Song J, Liu D, Feng L, et al. Protective effect of standardized extract of *Ginkgo biloba* against cisplatin induced nephrotoxicity [J]. *Evid Based Compl Alt*, 2013, 2013: 846126.
- Wang H, Lian YN, Gao LP, et al. Effect of catechin on oxidative damage of human embryonic kidney cells induced by cisplatin [J]. *Carcin Teratogen Mut* (癌变·畸变·突变), 2017, 29(1): 51-54.
- Gnoli M, Ponti F, Sangiorgi L. Tumor syndromes that include bone tumors: an update [J]. *Surg Pathol Clin*, 2017, 10: 749-764.
- Fennell DA, Summers Y, Cadranel J, et al. Cisplatin in the modern era: the backbone of firstline chemotherapy for non-small cell lung cancer [J]. *Cancer Treat Rev*, 2016, 44: 42-50.
- Wang T, Xiang Z, Wang Y, et al. Epigallocatechin gallate targets Notch to attenuate the inflammatory response in the immediate early stage in human macrophages [J]. *Front Immunol*, 2017, 8: 433.
- El-Mowafy AM, Salem HA, Al-Gayyar M, et al. Evaluation of renal protective effects of the green tea (EGCG) and red grape resveratrol: role of oxidative stress and inflammatory cytokines [J]. *Nat Prod Res*, 2011, 25: 850-856.
- Peng A, Ye T, Rakheja D, et al. The green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate ameliorates experimental immune-mediated glomerulonephritis [J]. *Kidney Int*, 2011, 80: 601-611.
- Zou SN, Lin M, Wu SH, et al. Mechanism of apoptosis of human gastric cancer BGC-823 cells induced by epigallocatechin gallate [J]. *Tumor* (肿瘤), 2011, 31: 508-512.
- Luo KW, Wei C, Lung MY, et al. EGCG inhibited bladder cancer SW780 cell proliferation and migration both *in vitro* and *in vivo* via down-regulation of NF-κB and MMP-9 [J]. *J Nutr Biochem*, 2016, 41: 56-64.

(下转第 2114 页)