文章编号:1000-5404(2012)02-0165-03

论著

表没食子儿茶素没食子酸酯增强低剂量顺铂对小细胞肺癌H446细胞株的细胞毒作用

赵汉玺[1],胡旭东[2],谢 鹏[2],孙新东[2],于金明[2] (250012 济南,山东大学医学院研究生院[1];250117 济南,山东省肿瘤医院放疗四病区[2])

[摘要] **目的** 探讨表没食子儿茶素没食子酸酯[(-)-epigallocatechin-3-gallate, EGCG]联合顺铂(Cisplatin,DDP)对小细胞肺癌细胞株H446的细胞毒作用及其机制。**方法** 采用MTT法检测EGCG及DDP影响H446细胞增殖的量效和时效关系。采用流式细胞仪检测不同浓度EGCG、DDP及二者联合作用于H446细胞对细胞周期及凋亡的影响。**结果** EGCG和DDP均可抑制H446细胞增殖,该增殖抑制作用呈浓度及时间依赖模式。不同浓度的EGCG(80、160 μmol/L)与DDP(1.0 μg/ml)联合应用时,可使H446细胞阻滞于G_2/M期。EGCG可诱导H446细胞凋亡,并能增强DDP诱导H446细胞凋亡的作用。**结论** EGCG能够抑制H446细胞增殖,诱导H446细胞凋亡,增强DDP诱导H446细胞凋亡的作用,其机制可能与G_2/M期阻滞有关。

[关键词] 小细胞肺癌;表没食子儿茶素没食子酸酯;顺铂;凋亡
[中图法分类号] R73-36;R734.2;R979.1 [文献标志码] A

(-)-epigallocatechin-3-gallate enhances low-dose cisplatin cytotoxicity to human small cell lung cancer cell line H446

Zhao Hanxi[1], Hu Xudong[2], Xie Peng[2], Sun Xindong[2], Yu Jinming[2] ([1]College of Postgraduate, Shandong University School of Medicine, Jinan, Shandong Province, 250012; [2]Department of Radiotherapy Ⅳ, Shandong Tumor Hospital, Jinan, Shandong Province, 250117, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) combined with cisplatin (DDP) on the cytotoxicity, apoptosis, and cell cycle in human small cell lung cancer cell line H446 cells. **Methods** Human small cell lung cancer H446 cells were treated with different concentrations of EGCG and DDP. The proliferation of cells was assayed by MTT assay. Flow cytometry (FCM) was used to detect cell cycle arrest. Cell apoptosis was analyzed by FCM with Annexin V/PI staining. **Results** Treatment of EGCG led to a significant inhibition in the proliferation of H446 cells in a dose- and time-dependent manner. The percentage of cells at G_2/M phase was increased markedly after treatment with EGCG and low-dose DDP. The apoptosis of H446 cells was induced by EGCG and low-dose DDP. The apoptotic rate was higher in the group of EGCG combined with DDP than in either of them alone. **Conclusion** EGCG can effectively inhibit the proliferation of H446 cells and induce cell apoptosis. Moreover, EGCG enhances H446 cells apoptosis induced by low-dose of DDP, which may be due to the cell cycle arrest at G_2/M phase.

[**Key words**] small cell lung cancer; (-)-epigallocatechin-3-gallate; cisplatin; apoptosis

Corresponding author: Yu Jinming, Tel:86-531-67626142, E-mail: 171459576@qq.com

小细胞肺癌约占肺癌的16%。与非小细胞肺癌相比,小细胞肺癌倍增时间短,生长分数高,易发生早期转移[1]。茶多酚主要成分为表没食子儿茶素没食子酸酯[(-)-epigallocatechin-3-gallate, EGCG]。体内外研究证实EGCG对非小细胞肺癌[2]、白血病[3]有抑制作用。并且体外研究显示EGCG可以通过多种机制增强抗肿瘤药物的作用[4-6]。前期研究发现EGCG对敏感及耐药的SCLC细胞株有抑制作用[7],但目前尚少见EGCG与化疗药物联合应用于小细胞肺癌的体外实验研究。本研究观察EGCG联合顺铂(cisplatin,

[通信作者] 于金明,电话:(0531)67626142,E-mail:171459576@qq.com

DDP）对人小细胞肺癌H446细胞的体外作用，并初步探讨其作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

人小细胞肺癌H446细胞株购于中国协和医科大学细胞库，EGCG购自杭州禾田生物技术有限公司，DDP购自齐鲁制药有限公司，RPMI1640培养基购自美国Gibco公司，PI（Propidium iodide，碘化丙啶）、RNA酶（RibonucleaseA，核糖核酸酶A）购自美国Sigma公司，Annexin V-FITC/PI双染色法凋亡检测试剂盒购自美国B-D pharmingen公司，MTT购自华美生物试剂公司，CO_2培养箱（Heraeus，德国），倒置显微镜（Olympus，日本），荧光显微镜（Olympus，日本），DG-3201型酶标仪（南京），FACS Calibur型流式细胞仪（Becton Dickinson，USA）。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 H446细胞使用RPMI1640培养基，内含10%胎牛血清，青霉素100 U/ml，链霉素100 μg/ml，置37 ℃，5% CO_2培养箱内培养。

1.2.2 MTT法检测H446细胞存活率 取对数生长期的H446细胞，用含10%胎牛血清的培养液配成单细胞悬液，以每孔约5×10^3个细胞接种到2个96孔板，每孔体积200 μl。培养6 h后分别与0、20、40、80、160、320 μmol/L的EGCG或者0、0.25、0.5、1、2、4、8 μg/ml的DDP共同孵育，同时设立空白对照组，空白对照组只加培养液。每24小时测量1次，测量前，吸弃孔内的含药物培养液，加入200 μl常规培养液。之后，每孔加MTT溶液20 μl（5 mg/ml，用PBS配制），继续孵育4 h，终止培养，小心吸弃孔内的上清液，每孔加150 μl DMSO，振荡15 min，使结晶物充分融解。选择570 nm波长，以空白对照调零，在酶标仪上测定各孔的光吸收值[D(570)]，记录结果，以时间为横坐标，吸光值为纵坐标绘制细胞生长曲线。全部实验重复3次，取平均值。根据D(570)值计算各组细胞存活率。根据各药物组细胞存活率，由药物浓度的对数值与细胞存活率线性回归求出各药物的半数抑制浓度（IC_{50}）。

细胞存活率 = 用药组D(570)值/对照组D(570)值×100 %

1.2.3 流式细胞术检测细胞周期 取对数生长期的H446细胞以1×10^5/ml接种于6孔细胞培养板，细胞悬液中含10%胎牛血清的完全培养基，在细胞培养箱中培养24 h；然后丢弃完全培养基，每孔细胞加入5 ml不含胎牛血清的基础培养基进行细胞周期同步化；分别采用80 μmol/L或160 μmol/L的EGCG加或不加1.0 μg/ml的DDP作用48 h；后用0.25%胰酶消化细胞，离心机1 000 r/min离心5 min弃上液；每管中加入2 ml PBS液混匀，细胞离心洗涤2次。弃上清后混匀细胞，然后加入4 ℃预冷的70%乙醇2 ml，4 ℃冰箱固定24 h。离心去乙醇，用PBS洗2次，加200 μg/ml RNase 37 ℃消化60 min。碘化丙啶（propidium iodide，PI）20 μg/ml 4 ℃染色30 min，经300目尼龙网过滤后，用FACS Calibur型流式细胞仪测定。实验结果经计算机软件ModFit LT 2.0处理，分析细胞周期，得出G_0/G_1期、S期和G_2/M期的相对比例。全部实验重复3次，取平均值。

1.2.4 Annexin V/PI双染色法流式细胞仪检测凋亡 分别采用80 μmol/L或160 μmol/L的EGCG加或不加1.0 μg/ml的DDP作用48 h；0.02% EDTA消化，吹打均匀，细胞直接收集到15 ml的离心管中，1 000 r/min离心5 min，PBS漂洗2次，弃去上清液，混匀后每样本取细胞数1×10^5个加入100 μl 1× binding buffer中；依说明分别加入5 μl Annexin V-FITC和5 μl PI，冰浴反应18 min。每管再加入1× binding buffer 300 μl，经300目尼龙网过滤后，用FACS Calibur型流式细胞仪检测细胞凋亡。全部实验重复3次，取平均值。

1.3 统计学方法

采用SPSS 11.5统计软件，两组计量数据的比较行t检验。

2 结果

2.1 不同浓度EGCG和DDP处理H446细胞24、48、72 h的抑制情况

应用不同浓度的EGCG处理H446细胞24、48、72 h后可见存活率均随EGCG浓度的增大和时间的增加而降低，具有浓度依赖性及时间依赖性（表1）。EGCG处理24、48、72 h的IC_{50}分别为254、160、114 μmol/L。应用不同浓度的DDP处理H446细胞24、48、72 h后可见存活率均随DDP浓度的增大和时间的增加而降低，具有浓度依赖性及时间依赖性（表2）。DDP处理24、48、72 h的IC_{50}分别为3、1.98、1.32 μg/ml。根据此实验结果及文献[12]，后面的实验主要观察了80、160 μmol/L EGCG和1.0 μg/ml DDP处理H446细胞48 h的情况。

表1 不同时间及剂量的EGCG处理H446的存活率（%，$\bar{x}\pm s$）

组别	0 μmol/L	20 μmol/L	40 μmol/L	80 μmol/L	160 μmol/L	320 μmol/L
24 h	100±0	80.8±1.4	114.0±1.8	104.0±1.6	66.7±1.0	41.6±0.4
48 h	100±0	98.3±0.2	105.5±1.6	71.7±2.1[ab]	49.1±0.2[ac]	5.1±0.1
72 h	100±0	86.0±0.5	84.6±0.6	63.1±0.4	35.7±0.8	17.4±0.7

a：$P<0.05$，与同浓度下24、72 h比较；b：$P<0.05$，与其余浓度比较；c：$P<0.05$，与同一时相点20、40、320 μmol/L比较

表2 不同时间及剂量的DDP处理H446的存活率（%，$\bar{x}\pm s$）

组别	0 μg/ml	0.25 μg/ml	0.5 μg/ml	1 μg/ml	2 μg/ml	4 μg/ml	8 μg/ml
24 h	100±0	100.5±1.1	93.1±1.2	94.2±1.1	60.6±0.8	40.8±0.6	14.3±0.6
48 h	100±0	98.7±0.5	84.4±1.0	68.7±1.2[a]	47.2±0.8	10.5±3.5	0±0
72 h	100±0	65.5±2.4	65.1±1.4	55.3±0.1	35.7±0.6	10.5±1.0	2.6±0.4

a：$P<0.05$，与同浓度下24、72 h及同一时间不同浓度比较

2.2 不同处理方法H446细胞周期的变化

80 μmol/L或160 μmol/L的EGCG分别联合1.0 μg/ml的DDP处理H446细胞48 h，与对照组比较，单纯应用EGCG时细胞周期未发生明显变化，单纯应用1.0 μg/ml的DDP时，可见G_2/M期阻滞。与单纯应用1.0 μg/ml的DDP比较，联合应用80 μmol/L的EGCG引起的G_2/M期阻滞更加明显（$P<0.05$，表3）。

2.3 不同方法处理H446细胞凋亡的变化

80 μmol/L或160 μmol/L EGCG分别联合1.0 μg/ml的

DDP 处理 H446 细胞 48 h,与对照组比较,单纯应用 EGCG 时,早期凋亡明显增加,并具有浓度依赖性。与单纯应用 1.0 μg/ml 的 DDP 比较,联合应用 80 μmol/L 或 160 μmol/L 的 EGCG 引起的早期凋亡更加明显($P<0.05$,表 3)。

表 3 不同方法处理 H446 细胞 48 h G_2/M 期及早期凋亡的比例
($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

组别	G_2/M	早期凋亡
对照组	11.3 ± 2.9	2.5 ± 0.3
EGCG 80 μmol/L	13.4 ± 3.3	7.8 ± 0.7
EGCG 160 μmol/L	13.9 ± 0.0	17.9 ± 3.0
DDP 1.0 μg/ml	46.5 ± 2.3[a]	2.5 ± 2.5
EGCG 80 μmol/L + DDP 1.0 μg/ml	72.5 ± 1.6[ab]	21.8 ± 3.0[ab]
EGCG 160 μmol/L + DDP 1.0 μg/ml	46.5 ± 2.7[a]	36.3 ± 4.0[ab]

a: $P<0.05$,与对照组比较; b: $P<0.05$,与 DDP 1.0 μg/ml 比较

3 讨论

SCLC 临床表现为生长迅速的恶性肿瘤,在诊断时常常已出现广泛转移。约 2/3 以上的 SCLC 患者对化疗敏感。因此,作为全身治疗的化疗在 SCLC 治疗中起主导作用。尽管近年来 SCLC 的化疗有了长足的发展,患者长期生存率仍亟待提高[1]。

绿茶是我国及东南亚一带的传统饮品,它富含多酚类化合物(即儿茶素),其中以 EGCG 单体含量最高。虽然 EGCG 抗肿瘤作用的分子机制尚不十分明了,但主要与抗氧化作用、提高机体免疫调节水平、细胞周期阻滞、诱导凋亡及抑制端粒酶活性有关,且 EGCG 能增强其他抗肿瘤药物的活性或减少其毒副反应[8]。近年来发现,DDP 的抗肿瘤毒性与诱导细胞凋亡密切相关[9]。研究显示 DDP 在 0.1 ~ 2.0 μg/ml 浓度范围内出现的 G_2/M 期阻滞是导致细胞早期凋亡的主要原因[10]。

本研究显示:EGCG 能够抑制 H446 细胞增殖,其 24、48、72 h 的 IC_{50}分别为 254、160、114 μmol/L。采用 80 μmol/L 或 160 μmol/L 的 EGCG 处理 H446 细胞 48 h,与对照组相比,细胞周期未见明显变化,与 Sadava 等[7]的研究结果相似。既往报道显示 40 ~ 50 μmol/L EGCG 即可将非小细胞肺癌 A549 细胞[2]或胰腺癌细胞 PANCO1[11]阻滞于 G_0/G_1期,但本研究显示,80 μmol/L 或 160 μmol/L 的 EGCG 与 1.0 μg/ml 的 DDP 联合应用可明显将 H446 细胞阻滞于 G_2/M 期。

采用 Annexin V/PI 双染色法流式细胞仪凋亡检测显示单纯应用 80 μmol/L 或 160 μmol/L EGCG 时,早期凋亡即明显增加,并具有浓度依赖性,与之前的报道相似[12-13]。与单纯应用 1.0 μg/ml 的 DDP 比较,联合应用 80 μmol/L 或 160 μmol/L 的 EGCG 引起的早期凋亡更加明显。之前有研究显示,更低剂量的 EGCG(~ 10 μmol/L)即可增加 DDP 的细胞毒作用[14]。结合以前的研究结果及本实验结果,我们认为 EGCG 不仅可以诱导 H446 细胞发生凋亡,而且可以明显增强 DDP 的诱导凋亡作用,有可能具有化疗增敏作用。

总之,本研究显示 EGCG 可诱导 H446 细胞凋亡,并可增强 DDP 诱导细胞凋亡的作用,其机制可能与 G_2/M 期阻滞有关,但具体的分子机制尚需进一步研究。

参考文献:

[1] Jemal A, Siegel R, Ward E, *et al*. Cancer statistics, 2009[J]. CA Cancer J Clin, 2009, 59(4): 225 - 249.
[2] 高云, 唐旭东, 周克元, 等. EGCG 对 A549 细胞增殖抑制及其机制的研究[J]. 肿瘤学杂志, 2009, 15(8): 728 - 730.
[3] Shanafelt T D, Call T G, Zent C S, *et al*. Phase I trial of daily oral Polyphenon E in patients with asymptomatic Rai stage 0 to II chronic lymphocytic leukemia[J]. J Clin Oncol, 2009, 27(23): 3808 - 3814.
[4] Milligan S A, Burke P, Coleman D T, *et al*. The green tea polyphenol EGCG potentiates the antiproliferative activity of c-Met and epidermal growth factor receptor inhibitors in non-small cell lung cancer cells[J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(15): 4885 - 4894.
[5] Zhang X, Zhang H, Tighiouart M, *et al*. Synergistic inhibition of head and neck tumor growth by green tea (-)-epigallocatechin-3-gallate and EGFR tyrosine kinase inhibitor [J]. Int J Cancer, 2008, 123(5): 1005 - 1014.
[6] Stearns M E, Wang M. Synergistic Effects of the Green Tea Extract Epigallocatechin-3-gallate and Taxane in Eradication of Malignant Human Prostate Tumors[J]. Transl Oncol, 2011, 4(3): 147 - 156.
[7] Sadava D, Whitlock E, Kane S E. 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.
[8] 陈志鸿, 罗招阳. 表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)抗肿瘤研究进展[J]. 中国肿瘤, 2006, 15(7): 453 - 456.
[9] Kosmider B, Osiecka R, Ciesielska E, *et al*. Induction of apoptosis and necrosis in lymphocytes by the cis-Pt(II) complex of 3-aminoflavone in comparison with cis-DDP [J]. Mutat Res, 2004, 558(1/2): 169 - 179.
[10] 戢福云, 钱桂生, 钱频, 等. 顺铂诱导人小细胞肺癌细胞系 NCI-H446 细胞的凋亡[J]. 中国癌症杂志, 2007, 17(5): 354 - 357.
[11] 肖华, 时开网, 曹红勇. EGCG 对胰腺癌细胞 PANC-1 生长的抑制作用及机制[J]. 实用临床医药杂志, 2010, 14(7): 26 - 29.
[12] 王坤英, 梁清清, 李卫国, 等. 绿茶多酚表没食子儿茶素没食子酸酯对肝癌 Hep G2 细胞的增殖抑制作用和凋亡诱导效应[J]. 河南师范大学学报: 自然科学版, 2009, 37(1): 126 - 130.
[13] 刘晓辉, 丁丽娟. EGCG 诱导甲状腺乳头状癌细胞凋亡及对 Survivin 蛋白表达的影响[J]. 肿瘤基础与临床, 2009, 22(1): 27 - 29.
[14] Yunos N M, Beale P, Yu J Q, *et al*. Synergism from sequenced combinations of curcumin and epigallocatechin-3-gallate with cisplatin in the killing of human ovarian cancer cells[J]. Anticancer Res, 2011, 31(4): 1131 - 1140.

(**收稿**:2011-08-25;**修回**:2011-10-25)
(编辑 汪勤俭)