文章编号:1000-5404(2012)20-2043-04

论著

茶氨酸对内皮细胞生长及肺癌血管生成的影响

莫贵艳,李 敏,胡成平,雷明盛,胡 赞 (410008 长沙,中南大学湘雅医院呼吸科)

[摘要] **目的** 探讨茶氨酸对人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells,HUVECs)增殖、凋亡、小管形成及肺腺癌移植瘤血管生成的影响。**方法** HUVECs分为6组,予以6种不同浓度茶氨酸处理,MTT法检测细胞生长抑制率,流式细胞仪检测细胞凋亡率,应用三维培养反映体外小管形成能力;建立异位肺腺癌裸鼠模型,分为茶氨酸组和对照组,每组6只,茶氨酸组予以茶氨酸腹腔注射,对照组予以等体积生理盐水腹腔注射。检测肿瘤中VEGF的表达及肿瘤微血管密度(microvessel density,MVD),明确茶氨酸对肿瘤血管生成的影响。**结果** 随着茶氨酸浓度的增加,HUVECs的生长抑制率及凋亡率增加($P<0.05$,$P<0.01$);茶氨酸浓度依赖性地抑制体外小管形成($P<0.05$,$P<0.01$);茶氨酸组较对照组肿瘤中VEGF表达、MVD明显下降($P<0.05$)。**结论** 茶氨酸呈浓度依赖性地抑制内皮细胞增殖,诱导内皮细胞凋亡,抑制内皮细胞体外小管形成。茶氨酸能抑制裸鼠移植瘤新生血管形成。

[关键词] 茶氨酸;内皮细胞;血管生成;肺癌;微血管密度
[中图法分类号] R73-37;R734.2;R977.4 [文献标志码] A

Theanine suppresses angiogenesis of endothelial cells *in vitro* and *in vivo*

Mo Guiyan, Li Min, Hu Chengping, Lei Mingsheng, Hu Zan (Department of Respiratory Diseases, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha, Hunan Province, 410008, China)

[**Abstract**] Objective To determine the effects of theanine on the proliferation, apoptosis, and tubule formation of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs), and on tumor angiogenesis of lung cancer heterotopic xenograft. Methods HUVECs were treated with theanine at 6 different concentrations (0, 25, 50, 100, 200 and 400 mmol/L). MTT assay was used to measure cell viability. Flow cytometry was applied to analyze cell apoptosis. *In vitro* three-dimensional (3-D) model was employed for analyzing tube formation *in vitro*. Heterotopic lung adenocarcinoma xenograft of A549 cells was established in nude mice, and then these mice were divided into 2 groups ($n=6$). In theanine group, theanine was given at 100 mg/(kg·d) *via* intraperitoneal injection for 14 d, while the control group was given the same volume of normal saline. All mice were sacrificed at the end of treatment, and tumor masses were resected for the size. The expression of VEGF in the tumor and tumor microvessel density (MVD) were measured with immunohistochemical assays. Results Theanine treatment resulted in a decrease of cell proliferation, an increase in cell apoptosis and tubule formation of HUVECs in a dose-dependent manner ($P<0.01$). Theanine also made a decrease in VEGF expression and MVD in the xenograft ($P<0.05$). Conclusion Theanine suppresses the proliferation, induces cell apoptosis and reduces tube formation in a 3-D *in vitro* model in a dose-dependent fashion, and also, inhibits the angiogenesis in lung adenocarcinoma xenograft in nude mice.

[**Key words**] theanine; angiogenesis; human umbilical vein endothelial cells; lung cancer; microvessel density

Corresponding author: Hu Chengpin, E-mail: huchengp28@yahoo.com.cn

茶氨酸是茶叶中特有的氨基酸,占茶叶中游离氨基酸的40%以上,占茶叶干质量的1%~2%。研究表明,茶氨酸对肺癌等多种肿瘤均具有预防及抑制肿瘤生长的作用[1-3]。虽然茶氨酸抗癌作用的一些机制已经被发现,但是对于其具体机制目前尚不完全清楚,比如茶氨酸是否通过抑制肺癌血管生长以抑制肺癌生长的研究尚缺乏有力证据。

血管生成是牵涉到内皮细胞多个水平的一系列过程,内皮细胞在血管生成中起着极其重要的作用。因此,我们将茶氨酸作用于血管内皮细胞,观察茶氨酸对

[通信作者] 胡成平,E-mail:huchengp28@yahoo.com.cn

内皮细胞增殖、凋亡、小管形成的影响，其后进行体内实验，验证茶氨酸对肺癌血管生成的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

原代人脐静脉内皮细胞（human umbilical vein endothelial cells，HUVECs）、胎牛血清、内皮细胞生长支持物（endothelial cell growth supplement，ECGS）购自 ScienCell 公司，HUVECs 应用5%胎牛血清及添加了1% ECGS 的内皮细胞完全培养液进行培养；A549 细胞株来自中南大学湘雅医院呼吸研究室冻存；茶氨酸系湖南农业大学国家植物功能成分利用工程技术研究中心施玲教授惠赠；血管内皮生长因子（vascular endothelial growth factor，VEGF）购自 Peprotech 公司；CD34 购自 Santa Cruz 公司；鼠单抗 VEGF 购自 Biosciences 公司；免疫组化试剂盒购自中杉金桥；12 只雌性 BALB/c 裸鼠，4～6 周龄，体质量 15～17 g，购自中南大学实验动物中心，SPF 级饲养。

1.2 方法

1.2.1 MTT 实验　选取生长状态良好的细胞，应用内皮细胞完全培养液调整 HUVECs 密度为 10^4/ml，96 孔板每孔加入 200 μl。置恒温 CO_2 培养箱培养，至细胞单层铺满约60%时，将孔分为6组，每组分别加入不同浓度的茶氨酸［0（对照组）、25、50、100、200、400 mmol/L］，每组培养条件相同，每组设5个平行孔。在茶氨酸处理24、48 h 后，加 MTT 液、DMSO 后在酶联免疫检测仪（检测波长 570 nm，参考波长 630 nm）测各孔的光密度值［D(570)］，计算细胞生长抑制率。实验重复 3 次，计算均值。

抑制率 =［1 －药物组 D(570)/对照组 D(570)］×100%。

1.2.2 流式细胞仪检测细胞凋亡率　将 HUVECs 传代接种在 50 cm^2 培养瓶中放于 37 ℃、5% CO_2 的细胞培养箱，饱和湿度下培养。待细胞长至约 80% 满时，将培养瓶分为6组，每组培养瓶中分别加入0（对照组）、25、50、100、200、400 mmol/L 6个浓度梯度的茶氨酸，分别于24、48 h 后收集消化细胞，按说明加入 Annexin Ⅴ/PI 凋亡检测试剂后上流式细胞仪检测细胞凋亡情况。实验重复3次，计算均值。

1.2.3 体外小管形成实验　将Ⅰ型胶原蛋白、无菌 10×PBS、无菌蒸馏水、无菌 1 nmol/L NaOH 置于冰上混匀至胶原蛋白浓度为 3.5 mg/ml，将胶原蛋白溶液加至 96 孔板，每孔 60 μl。将 96 孔板放入 37 ℃培养箱中培养约 40 min 后用 1×PBS 冲洗胶体。消化、收集 HUVECs，用添加了不同浓度茶氨酸和 40 ng/ml VEGF 内皮细胞完全培养液重悬细胞密度至 10^4/ml，将细胞悬液接种至胶体上，每孔 100 μl，置细胞培养箱培养。倒置相差显微镜下观察形成的小管。培养 48 h 后甲醛固定，倒置显微镜下摄像并计算形成小管的数目。

1.2.4 移植瘤实验

1.2.4.1 建立 A549 裸鼠移植瘤模型　消化收集对数生长期的 A549 细胞，予以 1 000 r/min 离心 6 min 后，用不含血清的 RPMI1640 培养基重悬细胞，调细胞密度至 2.5×10^7/ml，于裸鼠右肩背部皮下注入 0.2 ml 细胞悬液。接种约 1 周后，待肿瘤体积长至约 5 mm^3 时。将裸鼠按随机数字表法分为2组（每组6只）：茶氨酸组、对照组。实验组予以茶氨酸腹腔注射［100 mg/（kg·d）］，对照组予以腹腔注射等体积生理盐水。隔日称质量，应用游标卡尺测出瘤体的长径（a）与短径（b），计算出肿瘤体积。茶氨酸处理 14 d，处死裸鼠，取出移植瘤，予以称瘤质量，计算抑瘤率。

$$肿瘤体积=\frac{1}{2}ab^2$$

抑瘤率 =（对照组瘤质量 －实验组瘤质量）/对照组瘤质量 ×100%

1.2.4.2 测移植瘤微血管密度（microvessel density，MVD）　移植瘤予以 4% 多聚甲醛固定，石蜡包埋，切为 4 μm 薄片。CD34 免疫组化染色按照说明书操作。MVD 计数按 Weidner 法，低倍镜（×100）下观察全片，找到血管密度最高处，再在高倍镜下（×400）拍照，每张片拍5个视野，计数每个视野内的微血管数，将5个视野内微血管数的平均值作为该标本的 MVD 值。

1.2.4.3 免疫组化检测 VEGF 的表达　标本处理及免疫组化操作步骤与测 CD34 相同。将切片置于倒置相差显微镜下拍照，应用 IPP 6.0 图像处理软件检测各组肿瘤表达 VEGF 蛋白的平均光密度值（IOD）。

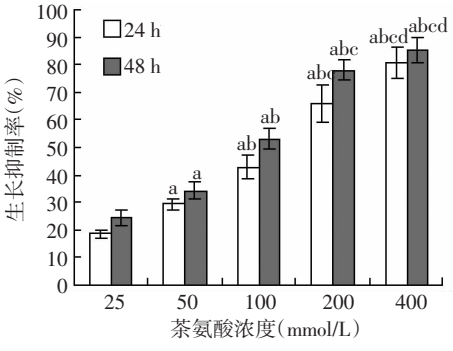
1.3 统计学方法

实验结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示。数据采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计分析，同一时间点各组间生长抑制率、凋亡率、小管数目比较采用单因素方差分析进行统计，裸鼠体质量、瘤体积、瘤质量、MVD、IOD 值组间比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 茶氨酸对内皮细胞增殖的影响

MTT 实验检测结果显示，25～400 mmol/L 茶氨酸可明显抑制内皮细胞增殖，随浓度不断增大，内皮细胞生长抑制率随之增加，呈剂量依赖性。在同一时间点，各组两两比较，差异均有统计学意义（$P<0.01$）。随着作用时间的延长，内皮细胞生长抑制率增加。见图1。

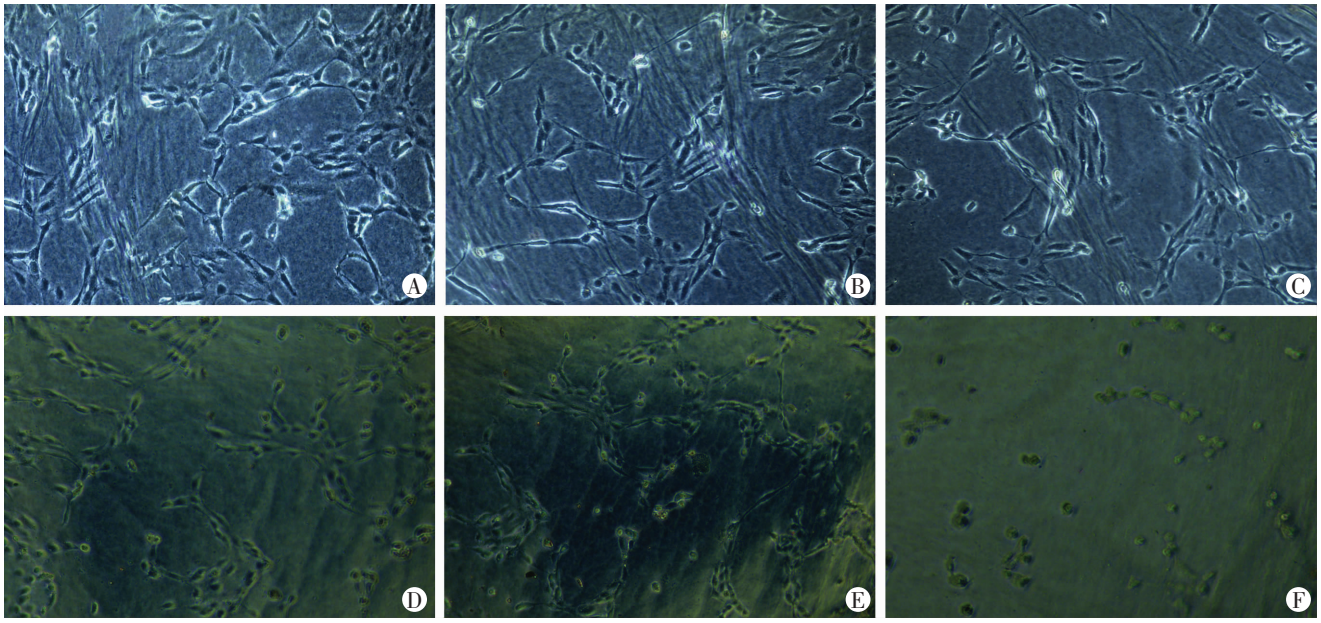


a：$P<0.01$，与 25 mmol/L 比较；b：$P<0.01$，与 50 mmol/L 比较；c：$P<0.01$，与 100 mmol/L 比较；d：$P<0.01$，与 200 mmol/L 比较

图1 MTT 法检测不同浓度茶氨酸对内皮细胞增殖的影响

2.2 茶氨酸对内皮细胞凋亡的影响

流式细胞仪检测结果显示，HUVECs 经茶氨酸作用后，浓度在 25～400 mmol/L 成倍数增加时，细胞凋亡率逐步升高，同一时间点组间比较凋亡率差异有统计学意义（$P<0.01$）。24 h 时，25 mmol/L 与对照组比较差异无统计学意义（$P>0.05$），其余各组与对照组比较差异均有统计学意义（$P<0.01$）。48 h 时，



A:0 mmol/L(对照)组;B: 25 mmol/L 组;C: 50 mmol/L 组;D: 100 mmol/L 组;E: 200 mmol/L 组;F: 400 mmol/L 组

图 2　倒置相差显微镜观察接种 48 h 各组管腔形成　(×100)

各组与对照组比较差异均有统计学意义($P<0.05$,$P<0.01$)。随着茶氨酸处理时间的延长,凋亡率增加。见表 1。

表 1　不同浓度茶氨酸对 HUVECs 凋亡的影响(%,$n=3$, $\bar{x}\pm s$)

茶氨酸浓度(mmol/L)	24 h	48 h
0(对照)	0.06 ± 0.01	0.05 ± 0.07
25	3.30 ± 0.72	4.57 ± 0.92[a]
50	20.07 ± 2.95[b]	24.70 ± 2.89[b]
100	27.00 ± 2.21[b]	34.61 ± 2.72[b]
200	36.17 ± 3.27[b]	46.73 ± 3.53[b]
400	72.57 ± 3.19[b]	80.77 ± 1.33[b]

a:$P<0.05$, b:$P<0.01$,与 0 mmol/L 比较

2.3　茶氨酸对内皮细胞体外小管形成的影响

将 96 孔板置于倒置相差显微镜下观察可见,对照组及低浓度茶氨酸组细胞管腔状结构逐渐增多,相互之间连接形成复杂的网状结构。随着茶氨酸浓度的增高,形成的管腔状结构逐渐减少,400 mmol/L 茶氨酸组细胞固缩成圆形,未见明显的细胞索及管腔状结构形成。见图 2。在低倍镜下对管腔数目进行计数,统计分析结果显示,随着茶氨酸浓度的增高,管腔数目逐渐减少,组间比较差异有统计学意义($P<0.05$,$P<0.01$)。见表 2。

表 2　三维培养中茶氨酸不同浓度组形成的小管数目比较($n=9$, $\bar{x}\pm s$)

茶氨酸浓度(mmol/L)	小管数目
0(对照)	25.60 ± 2.70
25	22.80 ± 2.04[a]
50	18.00 ± 1.58[bc]
100	13.00 ± 1.87[bcd]
200	8.20 ± 1.92[bcde]
400	0.40 ± 0.54[bcdef]

a:$P<0.05$, b:$P<0.01$,与 0 mmol/L 比较;c: $P<0.01$,与 25 mmol/L比较;d:$P<0.01$,与 50 mmol/L 比较;e:$P<0.01$,与 100 mmol/L 比较;f:$P<0.01$,与 200 mmol/L 比较

2.4　茶氨酸对裸鼠皮下移植瘤生长的影响

茶氨酸处理 2 周后,茶氨酸组肿瘤体积及瘤质量均较对照组明显降低($P<0.05$),抑瘤率为 36.4%。见表 3。

表 3　茶氨酸处理前后裸鼠肿瘤体积、质量的变化($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

组别	肿瘤体积(mm^3)	瘤质量(g)
对照组	272.73 ± 84.30	0.280 ± 0.071
茶氨酸组	119.81 ± 22.31[a]	0.178 ± 0.029[a]

a:$P<0.05$,与对照组比较

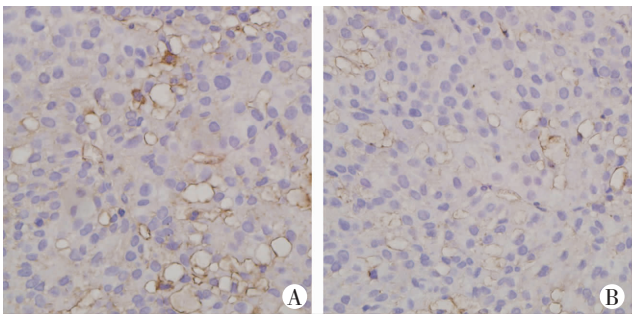
2.5　茶氨酸对裸鼠移植瘤微血管形成、VEGF 表达的影响

肿瘤免疫组化结果显示,茶氨酸组 CD34 标记的 MVD、VEGF 表达较对照组明显下降($P<0.05$)。见表 4,图 3、4。

表 4　茶氨酸处理前后对肿瘤 MVD、VEGF IOD 值的影响($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

组别	MVD	IOD 值
对照组	20.10 ± 4.25	0.126 ± 0.012
茶氨酸组	14.80 ± 3.99[a]	0.074 ± 0.008[a]

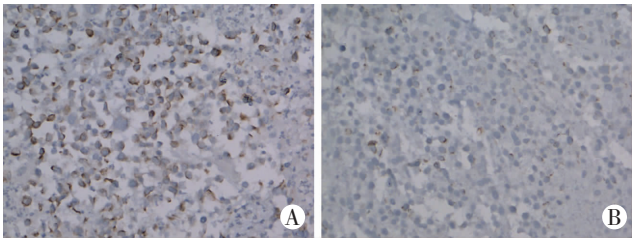
a:$P<0.05$,与对照组比较



图中棕黄色为标记的血管

A:对照组;B:茶氨酸组

图 3　免疫组化检测 2 组肿瘤 MVD 变化　(S-P ×400)



A:对照组;B:茶氨酸组

图4 免疫组化检测2组肿瘤VEGF表达(S-P ×200)

3 讨论

实体肿瘤是血管新生依赖性疾病,肿瘤的生长、侵袭和转移均依赖于血管生成[4-5]。因此,抑制肿瘤血管生成对于控制肿瘤生长起着极其重要的作用。研究显示,茶活性成分具有抗肿瘤血管生成的作用[6-7]。茶氨酸是茶的主要活性成分之一,具有抗肿瘤作用,但其对于内皮细胞生长及血管生成的影响报道较少。本研究从体外研究茶氨酸对内皮细胞生长及凋亡的影响入手,通过三维培养模型观察其对内皮细胞体外小管形成的影响,进一步在体内观察茶氨酸对裸鼠肺腺癌移植瘤血管生成的影响。

血管生成的基本过程是:①促血管生成因子与血管生成抑制因子失衡,形成血管生成表型;②内皮细胞分泌蛋白水解酶引起血管内皮基底膜降解;③内皮细胞向组织间隙迁移及增殖;④内皮细胞管腔形成、分支化形成血管网;⑤形成新基底膜[8]。因而,内皮细胞在血管生成中起着极其重要的作用,抑制血管内皮细胞增殖,可达到抑制血管生成的目的。而内皮细胞过度凋亡可限制血管生成,且可使血管退化[9]。研究发现许多血管生成抑制剂的主要抗血管生成的机制之一是诱导内皮细胞凋亡[10-11]。本研究发现,茶氨酸浓度在25~400 mmol/L时,呈浓度依赖性地抑制内皮细胞增殖,诱导内皮细胞凋亡,组间比较,差异有统计学意义($P<0.01$);且在三维培养中发现茶氨酸浓度依赖性地抑制体外内皮细胞小管形成。提示茶氨酸对于血管生成具有抑制作用,茶氨酸可能通过作用于血管生成而抑制肿瘤的生长。我们进行的裸鼠肺腺癌移植瘤实验结果不仅证实了茶氨酸能抑制移植瘤生长,且发现茶氨酸组移植瘤MVD、VEGF表达明显下降($P<0.05$)。MVD反映了肿瘤新血管生成的程度,是客观的形态学指标,到目前为止,MVD仍是评估肿瘤血管生成活动的标准[12]。

VEGF是迄今所发现的、最重要的促血管生成因子,VEGF与其受体结合后,可刺激内皮细胞存活、增殖、迁移,促进肿瘤血管生成[4,13]。因此提示,下调VEGF的表达可能是茶氨酸抑制肿瘤血管生成的机制之一。

我们既往研究发现,茶氨酸能直接抑制A549细胞生长、促进A549细胞凋亡从而抑制A549移植瘤生长[14]。本实验结果显示,茶氨酸能够通过抑制内皮细胞增殖、促进其凋亡、抑制内皮细胞小管形成能力等多步骤抑制肿瘤血管生成,从而抑制移植瘤的生长,其具体机制有待于进一步研究,下调VEGF表达可能是其机制之一。总之,茶氨酸不仅通过直接作用于肺腺癌A549细胞,而且通过抑制肿瘤血管生成从而达到抑制肺腺癌移植瘤生长的目的。

参考文献:

[1] Friedman M, Mackey B E, Kim H J, *et al*. Structure-activity relationships of tea compounds against human cancer cells[J]. J Agric Food Chem, 2007, 55(2): 243-253.

[2] Liu Q, Duan H, Luan J, *et al*. Effects of theanine on growth of human lung cancer and leukemia cells as well as migration and invasion of human lung cancer cells[J]. Cytotechnology, 2009, 59(3): 211-217.

[3] Fujii S, Inai K. Tumorigenicity study of L-theanine administrated orally to mice[J]. Food Chem, 2008, 110(3): 643-646.

[4] Cook K M, Figg W D. Angiogenesis inhibitors: current strategies and future prospects[J]. CA Cancer J Clin, 2010, 60(4): 222-243.

[5] Fukumura D, Jain R K. Tumor microvasculature and microenvironment: targets for anti-angiogenesis and normalization[J]. Microvasc Res, 2007, 74(2/3): 72-84.

[6] Sagara Y, Miyata Y, Nomata K, *et al*. Green tea polyphenol suppresses tumor invasion and angiogenesis in N-butyl-(-4-hydroxybutyl) nitrosamine-induced bladder cancer[J]. Cancer Epidemiol, 2010, 34(3): 350-354.

[7] Mohan N, Karmakar S, Banik N L, *et al*. SU5416 and EGCG work synergistically and inhibit angiogenic and survival factors and induce cell cycle arrest to promote apoptosis in human malignant neuroblastoma SH-SY5Y and SK-N-BE2 cells[J]. Neurochem Res, 2011, 36(8): 1383-1396.

[8] Ucuzian A A, Greisler H P. *In vitro* models of angiogenesis[J]. World J Surg, 2007, 31(4): 654-663.

[9] Dimmeler S, Zeiher A M. Endothelial cell apoptosis in angiogenesis and vessel regression[J]. Circ Res, 2000, 87(6): 434-439.

[10] Folkman J. Angiogenesis and apoptosis[J]. Semin Cancer Biol, 2003, 13(2): 159-167.

[11] Kunimasa K, Ahn K R, Kobayashi T, *et al*. Brazilian propolis suppresses angiogenesis by inducing apoptosis in tube-forming endothelial cells through inactivation of survival signal ERK1/2[J]. Evid Based Complement Altern Med, 2011: 870-753.

[12] Kiessling F, Razansky D, Alves F. Anatomical and microstructural imaging of angiogenesis[J]. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2010, 37(Suppl 1): S4-S19.

[13] Scagliotti G, Govindan R. Targeting angiogenesis with multitargeted tyrosine kinase inhibitors in the treatment of non-small cell lung cancer[J]. Oncologist, 2010, 15(5): 436-446.

[14] 雷明盛, 李敏, 顾其华, 等. 茶氨酸刺激树突状细胞调节T淋巴细胞抑制抗肺癌A549细胞移植瘤实验研究[J]. 中国医师杂志, 2011, 13(7): 887-891.

(**收稿**:2012-06-22;**修回**:2012-07-30)

(编辑 王 红)