维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2004)04-0441-03

茶多酚与 EGCG 对人乳癌细胞株侵袭影响的研究

鲁 蓼,邓华瑜

(重庆医科大学基础医学院病理生理教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:观察茶多酚和 EGCG[(-)-epigallocatechin-3-gallate 表没食子儿茶素没食子酸酯]对人乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 粘附和侵袭运动能力的影响。方法:用 125μg/ml 茶多酚、EGCG 处理后人乳腺癌 MDA-MB-231 高转移细胞株,分别用 MTT 法、Transwell 侵袭运动实验来研究茶多酚、EGCG 对细胞的粘附和侵袭运动能力的影响。结果:经茶多酚、EGCG 处理后,MDA-MB-231 对细胞外基质成分的粘附能力降低,同时侵袭能力降低。结论:茶多酚和 EGCG 可能通过抑制肿瘤细胞的粘附和侵袭运动能力来发挥预防肿瘤侵袭的作用,茶多酚的抗粘附侵袭能力表现较 EGCG 显著。

【关键词】茶多酚;EGCG(表没食子儿茶素没食子酸酯);人乳腺癌细胞株 MDA-MB-231;粘附;肿瘤侵袭;MTT

【中国图书分类法分类号】R994 【文献标识码】A 【收稿日期】2003-10-31

The effects of TP and EGCG on the adherence and invasion of MDA-MB-231 human breast cancer cells

LU Li, et al

(*Department of Pathophysiology, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effects of EGCG on the in vitro adhesion, invasion and motility of MDA-MB-231 cells, and explore the possible mechanism of the preventive effects of EGCG on tumor metastasis. *Methods*: MDA-MB-231 cells were cultured in RPMI-1640 medium, 10% fetal bovine serum and 0(control), 125μg/ml TP, EGCG for 48 hours in vitro, the adhesion and invasion ability of EGCG-treated cells was investigated with MTT colorimetric assay and transwell. *Results*: The ability of EGCG-treated cells to adhere to Matrigel decreased significantly($P<0.01$), EGCG inhibited the invasion of MDA-MB-231. *Conclusion*: TP and EGCG may prevent metastasis by affecting adhesion, invasion and migration ability of tumor cells.

【Key words】TP; EGCG; MDA-MB-231; Adhesion; Invasion; MTT

关于茶叶的有效成分对肿瘤的化学预防作用,已有较深入的研究。近来的一些文献报道,EGCG([(-)-epigallocatechin-3-gallate(EGCG)表没食子儿茶素没食子酸酯]能抑制癌细胞的人工基底膜侵袭和体内人侵袭转移实验[1~4]。转移是恶性肿瘤的一个重要特征,又是癌症患者死亡的直接原因[5]。近年来国内外学者展开对日常饮口茶叶中可预防肿瘤转移成分的研究,以期能通过长期摄入可预防肿瘤转移的饮品而达到延缓肿瘤的进展速度,为手术提供最佳时机,同时茶叶尚可预防肿瘤的发生,如茶多酚(TP),茶黄素,茶碱等。研究最多的是茶多酚里的有效成分 EGCG 本研究将从侵袭转移级联反应的环节粘附运动来探讨茶多酚和 EGCG 对肿瘤转移作用的可能机制。

1 材料与方法

1.1 受试药物

茶多酚由浙江东方茶叶有限公司(中国杭州)惠赠。EGCG 购自 Sigma 公司。

1.2 主要试剂

Matrigel(人工基底膜胶)购自 BD 公司,实验时用无血清 RPMI1640 培养基稀释为适当浓度后作用。Transwell 细胞培养小室,Costar 产品,直径 24mm,membrane filter(聚乙烯吡咯烷酮膜)孔径 8μm。四甲基偶氮唑盐(MTT)购自上海华舜生物工程有限公司。

1.3 细胞株

人高转移乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 由重庆医科大学临床学院外科教研室赠送。

作者介绍:鲁 蓼(1977-),女,硕士生,
主要研究方向:肿瘤侵袭转移。

基金项目:重庆市医学科技计划项目(合同编号:99-2031)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.4 高转移乳腺癌细胞 MDA－MB－231 与基底膜成分粘附能力的测定[6]

将受试 TP、EGCG 分别以浓度为 125μg/ml 加入含 10% 新生牛血清的 RPMI1640 培养基中，与 MDA－MB－231 细胞在 37℃、5%CO_2 条件下共同孵育 48h，经 0.1% 胰蛋白酶，消化细胞，调节细胞浓度为 2×10^5/ml，将 100μl 细胞悬液加入 Matrigel 5μg 包被的 96 孔板，设 5 个平行孔，CO_2 箱孵育 1h 后，弃去各孔培养液，PBS 洗去未粘附的细胞；弃 PBS 后加 5mg/ml MTT 溶液 50μl，CO_2 箱孵育 4h；吸弃 MTT 溶液，DMSO 200μl 溶解甲月瞥，酶联免疫检测仪 570nm 测各孔 OD 值，计算细胞粘附率和粘附抑制率，重复实验 8 次。

细胞粘附率＝(实验组 OD 值/对照组 OD 值)×100%

粘附抑制率＝[1－(实验组 OD 值/对照组 OD 值)]×100%

1.5 TP、EGCG 对高转移肿瘤细胞株侵袭能力的影响[7]

用 TP、EGCG(125μg/ml)孵育 MDA－MB－231 细胞 48h 后进行实验，Transwell 聚碳酯膜上铺 Matrigel 30μl，下室放入 NIH 3T3 上清液 1.5ml。侵袭上室加入含 125μg/ml TP、EGCG 培养的 MDA－MB－231 细胞 2×10^5 个，37℃ 培养箱孵育 8h。用棉签擦净膜上室面细胞，HE 染色，400 倍光镜下随机计数 5 个视野的细胞数，取均值，结果以抑制率表示。实验设 5 个平行小室，重复实验 5 次。

侵袭率＝(穿膜细胞数/细胞总数)×100%

1.6 TP、EGCG 对高转移细胞株迁移能力的影响

不铺 Matrigel 胶，其余步骤同侵袭实验

迁移率＝(穿膜细胞数/细胞总数)×100%

2 结 果

TP 和 EGCG 对 MDA－MB－231 细胞粘附、侵袭、运动能力的影响

结果见表 1，茶多酚和 EGCG 与 MDA－MB－231 细胞共同孵育 48h 后细胞在 Matrigel 上粘附 60min 时，表现了明显的肿瘤粘附促进作用以及侵袭运动抑制作用，其中以茶多酚效果较显著，与 EGCG 比较有显著性差异($P<0.01$)

表 1 TP 和 EGCG 对 MDA－MB－231 细胞粘附、侵袭、运动能力的影响

组别	粘附率	侵袭率	迁移率	P 值
对照组	38.0±0.6	40.6±0.6	21.4±1.1	
EGCG 组	44.0±1.2	40.9±0.8	15.1±0.4	0.01
茶多酚组	57.2±0.7	28.7±0.4	14.1±0.9	0.00003*

* 与对照组比较，茶多酚组 $P<0.01$

细胞侵袭穿膜情况见下图(图 1～3)。

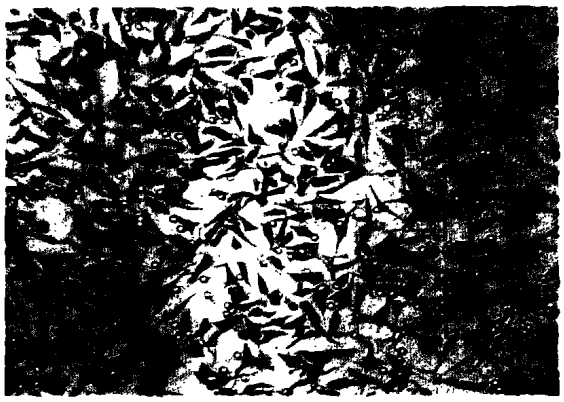


图 1 未加 EGCG 侵袭实验组 HE×200

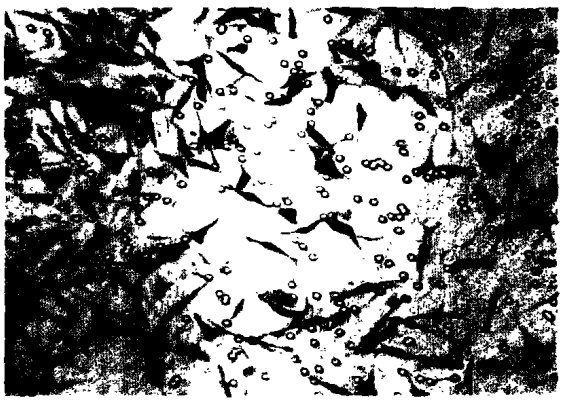


图 2 加 EGCG 侵袭实验组 HE×200



图 3 加茶多酚侵袭实验组 HE×200

3 讨 论

茶叶是中国的传统饮品，已有四千多年的历史，与健康密切相关，茶叶及其主要成分儿茶素的防癌抗癌作用愈来愈引起注意，先前研究证明绿茶提取物对多种人癌细胞有细胞毒作用，体内有抗小鼠移植性肿瘤的作用[8]。还可诱导肝癌细胞的凋亡，影响细胞生长周期[9,10]。但国内对茶多酚及主要成分 EGCG 对肿瘤侵袭转移的影响鲜有报道。肿瘤的侵袭和转移是肿瘤细胞与宿主细胞间质以及宿主细胞之间的一系列复杂作用的结果，肿瘤细胞通过

维普资讯 http://www.cqvip.com

表面粘附分子、受体等与细胞外基质成分特异性粘附,到达基底膜的肿瘤细胞分泌蛋白水解酶降解局部的基质,基质降解区域发生癌细胞的移动和侵袭[11],因此,粘附力降低、侵袭运动力增强都是促进肿瘤细胞转移的重要因素。本实验用铺有 Matrigel 的 96 孔板进行细胞粘附实验,用铺有 Matrigel 的重组人工基底膜和直径只有 8μm 的聚碳酸酯微也滤膜的 Transwell 侵袭实验体外转移模型,来探讨茶叶的有效成分茶多酚以及茶多酚有效成分表没食子儿茶素没有食子酸酯(EGCG)对高转移乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 的转移能力的影响。多也生物膜培养系统是近年来发展的一项实验技术,用于体外 Matrigel 侵袭实验。不仅可用于研究细胞分化和细胞与基质的相互作用,还可用来筛选抗侵袭和抗迁移药物。以前的研究可知茶多酚和 EGCG 具有杀伤体外生长肿瘤细胞的作用(文章未发表),进一步的研究发现,茶多酚的有效成分 EGCG 在粘附、侵袭转移能力上不及茶多酚显著(EGCG 组 $P=0.01$, TP 组 $P=0.00003$)。茶多酚成分复杂,包括儿茶素、黄烷双醇、黄酮类和茶多酚酸类。其中大部分为儿茶素,其包括表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)、表没食子儿茶素(EGC)、表儿茶素没食子酸酯(ECG)、表儿茶素(EC)、(+)-没食子儿茶素[(-)-gallocatechin]、(+)-儿茶素[(+)-catechin]。以 EGCG 的含量最高,占儿茶素的 50% 左右。茶多酚抗侵袭运动能力强于 EGCG,可能茶多酚中的其它成分协同了 EGCG 抗转移,其具体是何种成分,有待于进一步的探讨。本研究表明,一定浓度的茶多酚对 MDA-MB-231 细胞的侵袭和转移有明显的抑制作用,而茶多酚的副作用却很低,有可能开发成高效、低毒、经济的抗侵袭转移的药物。

参 考 文 献

[1] Anoop KS, Pankaj S, Peter A, et al. Green tea constituent epigallocatechin-3-gallate inhibits angiogenic differentiation of human endothelial cells[J]. Arch of Biochem and Biophys, 2002;401:29-37.

[2] Yukiaki K, Yukihiko H. Antimutagenic and anticarcinogenic activity of tea polyphenols[J]. Mut Res, 1999;436:69-97.

[3] M. Esmura, M. Sazuka, H. Ewazawa, et al. Inhibitory effects of green tea infusion on in vitro invasion and in vivo metastasis of mouse lung carcinoma cells[J]. Food factors for cancer prevention, 1997;134-137.

[4] Mari MY, Hiroharu K, Nobufumi T, et al. Effects of tea polyphenols on the invasion and matrix metalloproteinases activities of human fibrosarcoma HT1080 cells[J]. J. Agric. Food Chem, 1999;47:2350-2354.

[5] 张天泽,主编. 肿瘤学[MJ]. 天津科学技术出版社, 1993;1410.

[6] Saiki I, Muraya J, Iida J, et al. The inhibition of murine lung metastasis by synthetic polypeptide[poly(arg-gly-asp) and poly (try-ile-gly-ser-arg)]with a core sequence of adhesion molecules[J]. Br J Cancer, 1989;59:194.

[7] Albini A, Iwamoto Y, Kleinman HK, et al. A rapid vitro assay for quantitating the invasive potential of tumor cells[J]. Cancer Res, 1987;47:3239-3245.

[8] 谢冰芬,郝东磊,刘宗潮,等. 毛叶茶和龙井茶提取物的抗瘤作用及对 DNA 拓扑异构酶 II 的抑制作用[J]. 癌症, 1991;11(6):424-428.

[9] Yang GY, Liao J, Kim K, et al. Inhibition of growth and induction of apoptosis in human cancer cell lines by tea polyphenols[J]. Carcinogenesis, 1998;19(4):611-616.

[10] 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]. J Natl Cancer Inst, 1997;89(24):1881-1886.

[11] Hendrix MJC, Wood WR, Seftor EA, et al. Retinoic acid inhibition of human melanoma cell invasion through a reconstituted basement membrane and its relation to decreases in the expression of proteolytic enzymes and motility factor receptor [J]. Cancer Res, 1990;50:4121-4130.