DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.08.027

论著

文章编号:1000-5404(2001)08-0931-03

表没食子儿茶素没食子酸酯对胃癌细胞端粒酶活性的抑制作用

杨金亮,房殿春,杨仕明,罗元辉,鲁 荣 (第三军医大学附属西南医院全军消化专科中心,重庆 400038)

提 要:目的 探讨表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)对SGC-7901胃癌细胞端粒酶活性的影响。**方法** 用不同浓度的EGCG处理7901细胞,采用MTT法和PCR-ELISA法测定增殖抑制率和端粒酶活性,用RT-PCR法测定端粒酶亚单位hTR、TP1、hEST2/hTRT和c-myc mRNA的表达。**结果** EGCG在100 μmol/L以下浓度对7901细胞增殖无明显抑制作用,而在200 μmol/L以上浓度时对7901细胞增殖有明显的抑制作用,其24 h和48 h IC_{50}分别为805.4 μmol/L和463.3 μmol/L。12.5 μmol/L以上浓度的EGCG对7901细胞的端粒酶活性有明显的抑制作用,其24 h和48 h IC_{50}分别为27.4 μmol/L和19.5 μmol/L。EGCG处理7901细胞能显著抑制其hEST2/hTRT和c-myc mRNA表达,且抑制程度与EGCG剂量有关,但对hTRRNA和TP1 mRNA表达无明显影响。**结论** EGCG在非细胞毒性剂量时就能有效地抑制肿瘤细胞的端粒酶活性,此可能是其防癌抗癌的机制之一。

关键词:表没食子儿茶素没食子酸酯;端粒酶;胃癌细胞
中图法分类号:R282.71;R394.2;R735.2 **文献标识码**:A

Inhibitory effects of EGCG on telomerase activity of gastric carcinoma cells

YANG Jin-liang, FANG Dian-chun, YANG Shi-ming, LUO Yuan-hui, LU Rong (Department of Gastroenterology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of (-)-Epigallocatechin gallate (EGCG) on telomerase activity of gastric carcinoma cells SGC-7901. **Methods** The inhibitory rate of proliferation and telomerase activity were determined by MTT and PCR-ELISA methods and the expression of telomerase subunit hTR, TP1, hEST2/hTRT and c-myc by RT-PCR. **Results** Concentration of EGCG less than 100 μmol/L had no apparent inhibitory effect on proliferation of SGC-7901 cell line, but concentration more than 200 μmol/L could significantly inhibit its growth and induce apotosis, the IC_{50} of 24 h and 48 h were 805.4 μmol/L and 463.3 μmol/L respectively. EGCG in non-cytotoxic dose (12.5 μmol/L) could significantly decrease its telomerase activity, the IC_{50} of 24 h and 48 h were 27.4 μmol/L and 19.5 μmol/L respectively. Further study indicated that EGCG could down-regulate transcription of hEST2/hTRT and c-myc, but not hTR and TP1 of SGC-7901 in dose-dependent manner. **Conclusion** EGCG in non-cytotoxic dose could effectively inhibit telomerase activity of SGC-7901, this may be one of the machenisms of its prevention and treatment of cancer.

Key words: telomerase; (-)-Epigallocatechin gallate(EGCG); gastric carcinoma cells

许多研究表明,茶叶中的多酚类物质具有防癌抗癌作用。而表没食子儿茶素没食子酸酯[(-)-Epigallocatechin gallate, EGCG]是茶多酚的主要成分,约占50%,也被证明具有强烈的抗肿瘤活性,其机制尚不十分清楚,可能与其能诱导肿瘤细胞凋亡、抑制DNA拓朴异构酶活性和诱导谷胱甘肽-S-转移酶活性等有关[1~4]。端粒酶是近年来发现的一种最为广谱特异的肿瘤标志,与细胞衰老、永生化和肿瘤发生发展有密切关系[5,6]。本研究发现EGCG能有效抑制SGC-7901胃癌细胞的端粒酶活性,进一步阐明了茶叶防癌抗癌的机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

表没食子儿茶素没食子酸酯(Sigma);MTT(Sigma);RPMI 1640(Gibco);Telomerase PCR-ELISA Kit(Roche);RNA提取试剂Tripure (Roche);Acess RT-PCR system (Promega)。

1.2 RT-PCR引物(上海生物工程公司合成,PAGE纯化)

hTR(126 bp):5′-TCTAACCCTAACTGAGAAGGCGCGTAG-3′
5′-GTTTGCTCTAGAATGAACGGTGGAAG-3′
TP1(264 bp):5′-TCAAGCCAAACCTGAATCTGAG-3′
5′-CCCGAGTGAATCTTTCTACGC-3′
hEST2/hTRT(145 bp):5′-CGGAAGAGTGTCTGGAGCAA-3′
5′-GGATGAAGCGGAGTCTGGA-3′
GAPDH(598 bp):5′-CCACCCATGGCAAATTCCATGGCA-3′
5′-TCTAGACGGCAGGTCAGGTCCAC-3′
c-myc(505 bp):5′-CCAGGACTGTATGTGGAGCG-3′
5′-CTTGAGGACCAGTGGGCTGT-3′

1.3 细胞系及培养条件

人胃癌细胞系SGC-7901培养于含10%灭活的小牛血清、100 μg/ml链霉素、100 U/ml青霉素的RPMI 1640培养液中,培养条件为37 ℃、5% CO_2、饱和湿度,每隔2~3 d用0.25%胰酶/0.02% EDTA消化,以1:3~1:5传代1次。

1.4 EGCG浓度选择

EGCG浓度(μmol/L)参照文献[3]选择为:6.25,12.5,25,50,100,200,400,800,1 600,3 200,6 400。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39770302)
作者简介:杨金亮(1967-),男,山西省平顺县人,博士,主治医师,主要从事肿瘤的基因和免疫治疗方面的研究,发表论文9篇。电话:(023)65180109
收稿日期:2000-12-02;修回日期:2001-01-11

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.5 细胞增殖抑制率测定和细胞增殖抑制浓度(IC_{50})计算

采用MTT法测定细胞增殖抑制率。5×10^3 细胞(0.2 ml)于96孔板,加入不同浓度的EGCG,每组设3个平行孔,培养24~48 h。培养结束前4 h,每孔加入MTT(5 mg/ml)10 μl,继续培养4 h后,快速弃去培养液,加入DMSO 150 μl,振荡20 min使甲瓒充分溶解,在酶联检测仪上测其 D_{490} 值,以此结果计算细胞增殖抑制率。抑制率(%) = 1 - 实验孔 D_{490} 值/对照孔 D_{490} 值。半数细胞增殖抑制浓度 IC_{50} 用寇氏法(Karber)计算。

1.6 端粒酶活性测定

采用Telomerase PCR-ELISA法,将标准程序略作修改,在测定EGCG对7901细胞增殖抑制率时平行测定。取不同浓度EGCG处理的7901细胞(培养于96孔板)弃培养液,加200 μl DEPC处理过的PBS漂洗30 s,每孔加50 μl裂解液(每种浓度3复孔)冰浴30min(其间用枪头吹吸数次),吸出液体至Ep管,4 ℃、12 000 r/min离心20 min,小心吸取上清速冻于-80 ℃。余按试剂盒标准程序进行。

1.7 RT-PCR

RNA提取按Tripure试剂说明书进行。RT-PCR采用一步一管法。反应体系为:总体积25 μl、dNTP 0.2 mmol/L,上下游引物各1 mmol/L、$MgSO_4$ 1 mmol/L、AMV逆转录酶0.1 U/ml、Tfl DNA聚合酶0.1 U/ml、1×反应缓冲液、RNA模板100 ng,扩增条件为48 ℃,45 min→94 ℃,2 min→94 ℃,30 s;60 ℃,40 s;68 ℃,1 min;40 cycles→68 ℃,7 min。取3~6 μl扩增产物行2%琼脂糖凝胶电泳,紫外灯下观察并拍照。

1.8 统计学分析

采用 t 检验。

2 结果

2.1 EGCG对7901细胞生长增殖的抑制作用

EGCG在100 μmol/L以下浓度对7901细胞增殖无明显抑制作用($P>0.05$),而在200 μmol/L以上浓度时对7901细胞增殖有明显的抑制作用,且随作用时间延长和剂量增大,抑制作用也随之增强,其24 h和48 h IC_{50} 分别为805.4 μmol/L和463.3 μmol/L,说明EGCG抑制7901细胞增殖存在一定的时间剂量效应关系。

2.2 EGCG对7901细胞端粒酶活性的影响

我们观察了6.25~200 μmol/L EGCG对7901细胞端粒酶活性的影响,见图1,结果发现:12.5 μmol/L的EGCG处理7901细胞24 h,即能抑制其24.3%的端粒酶活性;100 μmol/L EGCG对7901细胞增殖基本上无抑制作用,但此浓度作用24 h却能抑制7901细胞84.3%的端粒酶活性。表明EGCG在非细胞毒性剂量下即对7901细胞的端粒酶活性有明显的抑制作用,且有时间剂量依赖关系,其24 h和48 h IC_{50} 分别为27.4 μmol/L和19.5 μmol/L。

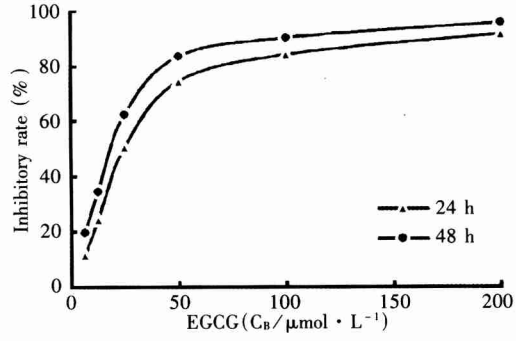


图1 EGCG对7901细胞端粒酶活性的抑制作用

Fig 1 Inhibitory effect of EGCG on telomerase activity of 7901 cells

2.3 EGCG对7901细胞hTR、TP1、hEST2/hTRT和c-myc mRNA表达的影响

如图2所示,EGCG处理7901细胞能显著抑制其hEST2/hTRT和c-myc mRNA表达,且抑制程度与EGCG剂量有关,但对hTR和TP1 mRNA表达无明显影响。

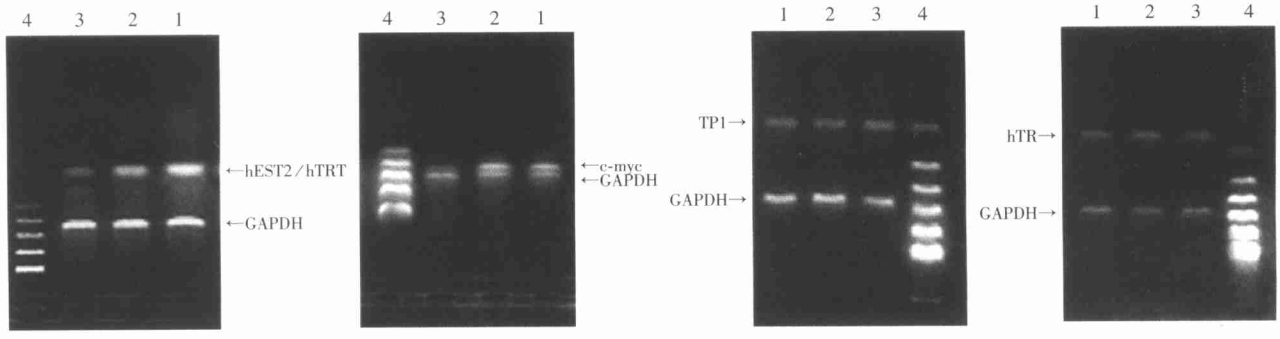


图2 EGCG对hEST2/hTRT、c-myc、TP1和hTR mRNA表达的影响(RT-PCR结果)

Fig 2 Effects of EGCG on mRNA expression of hEST2/hTRT, c-myc, TP1 and hTR in 7901 cells (Results of RT-PCR)

Lane 1~3: EGCG 0, 50, 200 μmol/L; Lane 4: PCR marker from up to down 237,377,515,695,994,1 543 by turns

3 讨论

茶叶的抗癌机制尚不完全清楚,已有研究表明:茶叶中多酚类物质如EGCG能够抑制肿瘤细胞的增殖并诱导凋亡[3~4]。本研究也证实了EGCG能够抑制7901胃癌细胞的生长增殖,并呈时间剂量效应依赖关系,其24 h和48 h IC_{50} 分别为805.4 μmol/L和463.3 μmol/L。倒置显微镜观察也发现200 μmol/L以上浓度EGCG处理7901细胞可见凋亡细胞出现。另有研究表明,EGCG可阻止细胞由 G_1 期向S期移行,而且能够提高

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

细胞间通讯能力，提示 EGCG 可能还具有诱导肿瘤细胞分化的作用[7]。

端粒酶是一种由 RNA 和蛋白质构成的一种特殊的逆转录酶，与细胞衰老、永生化和肿瘤发生发展关系密切，是肿瘤治疗的较理想靶点[5,6,8,9]。本研究发现 EGCG 在较低浓度（非细胞毒性浓度）时即对端粒酶活性有很强的抑制作用，其 IC_{50} 为 19.5～27.4 μmol/L，较 EGCG 抑制细胞增殖的 IC_{50}（463.3 μmol/L）低 20 倍左右。100 μmol/L EGCG 几乎不能抑制 7901 细胞增殖，但此浓度作用 24 h 足以抑制 7901 细胞的 84.3% 端粒酶活性。同期，日本学者 Nassani 等[10] 比较了几种茶多酚单体对端粒酶活性的抑制作用，也发现 EGCG 的作用最强，其 IC_{50} 为 1 μmol/L；15 μmol/L EGCG 作用于人结肠腺癌细胞系 HT29 和单核细胞白血病细胞系 U937 24 h，即可抑制其端粒酶活性的 90%，如持续作用于两种肿瘤细胞可导致其端粒进行性缩短，经 35 和 60 个倍增周期细胞衰老死亡。这在一定程度上很好地解释了流行病学调查中人群饮茶的 EGCG 剂量远远小于动物体内及体外实验所用的剂量，就具有一定的防癌作用的现象。因此，抑制端粒酶活性可能是茶叶防癌抗癌的主要机制之一。

Nassani 等[10] 还发现 EGCG 能直接抑制无细胞端粒酶提取物的端粒酶活性，表明 EGCG 可与端粒酶组份相互作用而影响其活性。hTR 为端粒酶合成端粒重复序列的模板，而 hEST2/hTRT 为端粒酶的催化亚单位，与端粒酶活性成正比，hEST2/hTRT 启动子区域内含有 *c-myc* 结合位点，*c-myc* 可以快速而不依赖于额外蛋白质合成就能激活端粒酶[11,12]。本研究发现 EGCG 处理的 7901 细胞 *c-myc* 和 hEST2 mRNA 表达降低，而 hTR 和 TP1 mRNA 表达水平无明显变化，表明 EGCG 能通过下调 *c-myc* 和 hEST2/hTRT 表达来抑制端粒酶活性。EGCG 对蛋白酶 C 活性的抑制，也可能参与了端粒酶活性的调节[13,14]。因此，EGCG 可能是通过多种途径来抑制肿瘤细胞的端粒酶活性，其确切的信号转导模式值得进一步研究。

参考文献：

[1] Yang C S, Wang Z Y. Tea and cancer[J]. J Natl Cancer Inst, 1993, 85(13): 1 038 - 1 049.

[2] 赵　燕，曹　进，祝和成. 茶抗消化系统肿瘤的研究进展[J]. 肿瘤，1998, 18(2): 121 - 123.

[3] 赵　燕，曹　进，祝和成，等. 表没食子儿茶素酸酯诱导 HL60 细胞程序性死亡[J]. 中国药理学杂志，1998, 33(8): 469 - 472.

[4] Asano U, Okamura S, Ogo T, *et al*. Effect of (－)-epigallocatechin gallate on leukemia blast cells from patients with acute myeloblastic leukemia [J]. Life Sci, 1997, 60(1): 135 - 142.

[5] 杨仕明，房殿春. 端粒、端粒酶与肿瘤[J]. 国外医学：病理生理科学与临床分册，1997, 17(4): 302 - 307.

[6] 杨金亮，杨仕明，房殿春. 抗端粒酶治疗肿瘤的研究进展[J]. 肿瘤，1999, 19(2): 117 - 119.

[7] Krist S, Randall J R. Enhancement of gap junctional intercellular communication in tumor promoter treated cells by components of green tea[J]. Cancer Lett, 1993, 69(1): 15 - 18.

[8] 杨金亮，房殿春，杨仕明，等. 反义 hTR 对人胃癌细胞株 SGC-7901 恶性表型的逆转作用[J]. 第三军医大学学报，2000, 23(7): 611 - 614.

[9] Naka K, Yokozaki H, Yasui W, *et al*. Effect of antisense human telomerase RNA transfection on growth of human gastric cancer cell lines[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1999, 255(5): 753 - 758.

[10] Nassani I, Seimiya H, Tsuruo T. Telomerase inhibition, telomere shortening, and senescence of cancer cells by tea catechins[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1998, 249(2): 391 - 396.

[11] Meyerson M, Counter C M, Eaton E N, *et al*. hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization[J]. Cell, 1997, 90(5): 785 - 795.

[12] Wu K J, Grandori C, Amacker M, *et al*. Direct activation of TERT transcription by c-myc[J]. Nat Genet, 1999, 21(2): 220 - 224.

[13] Romanova L Y, Alexandrov I A, Schwab G, *et al*. Mechanism of apoptosis suppression by phorbol ester in IL-6 starved murine plasmacytomas: role of PKC modulation and cell cycles[J]. Biochemistry, 1996, 35(30): 9 900 - 9 906.

[14] Ku W C, Cheng A J, Wang T C. Inhibitory of telomerase activity by PKC inhibitors in human nasopharyngeal cancer cells in culture[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1997, 241(3): 730 - 736.

（编辑　王　红）

（上接 930 页）

合术治疗胰管结石伴慢性胰腺炎文献上报道较少。保留脾脏胰体尾切除术在手术操作上因脾动静脉与胰体尾部的密切解剖关系而颇有难度，早在 1943 年 Mallet-Guy 首先描述了保留脾脏的远端胰腺切除术，认为该手术可用于胰腺外伤、急慢性胰腺炎、胰腺囊肿、无功能性胰岛细胞瘤、胰石症等疾病的治疗。但也有人认为应尽量避免应用在慢性胰腺炎的病例，因为胰腺与脾血管的分离常因胰尾脾门处的广泛致密粘连而十分困难，Aldridge 等[1] 则在总结了 77 例行远端胰腺切除的病例后指出，在许多病例包括胰腺炎患者均可安全的保留脾脏而行远端胰腺切除术。Kimura 等[2] 在 1996 年也得出上述手术操作是安全的，适用于远端胰腺良性病变治疗的结论。近年来，随着对脾脏功能和其局部解剖的深入研究，保留脾脏胰体尾切除术的价值及应用前景已得到越来越多的认识。最新研究提示保留脾脏的价值在于：①保留了脾脏本身所具有的参与人体免疫、血液代谢等功能；②避免了脾脏切除后发生败血症、脓肿等感染危险；③降低了切除远端胰腺后糖尿病的发生率[3]。而后一点机制尚不明确，需要更多的病例和长期的观察去证实。

关键词： 胰管结石；胰切除术

中图法分类号： R657.5　　**文献标识码：** B

参考文献：

[1] Aldridge M C, Williamson R C N. Distal pancreatectomy with and without splenectomy[J]. Br J Surg, 1991, 78(8): 976 - 979.

[2] Kimura W, Inoue T, Futakawa N, *et al*. Spleen-preserving distal pancreatectomy with conservation of the splenic artery and vein[J]. Surgery, 1996, 120(5): 885 - 890.

[3] Govil S, Imrie C W. Value of splenic preservation during distal pancreatetctomy for chronic pancreatitis[J]. Br J Sury, 1999, 86(7): 895 - 898.

（编辑　陈聪连）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net