

EGCG 抑制 HL-60 细胞增殖作用的机制研究

欧阳琳, 姜 浩

(南华大学第一附属医院 血液内科, 湖南 衡阳 421001)

摘要: **目的** 探讨 EGCG 抑制白血病 HL-60 细胞增殖的作用机制。 **方法** 采用软琼脂集落形成实验和绘制细胞生长曲线, 检测 EGCG 对 HL-60 细胞增殖的影响; FCM 及 DNA 凝胶电泳法检测 EGCG 处理 HL-60 细胞后的凋亡情况; 实时荧光定量 RT-PCR 和 Western blotting 检测 AKT1 的表达。 **结果** 细胞生长曲线和软琼脂集落形成实验结果均显示 EGCG 呈浓度依赖性抑制 HL-60 细胞的增殖 ($P < 0.05$); FCM 及 DNA 凝胶电泳法结果显示 EGCG 呈浓度依赖性诱导 HL-60 细胞的凋亡 ($P < 0.05$)。实时荧光定量 RT-PCR 和 Western blotting 结果显示 EGCG 浓度升高, HL-60 细胞中 AKT1 的表达降低。 **结论** EGCG 可能通过下调 AKT1 的表达, 促进细胞凋亡, 发挥其对 HL-60 细胞增殖的抑制作用。

关键词: EGCG; HL-60 细胞; 细胞增殖; 细胞凋亡; AKT1

中图分类号: R733.7 文献标识码: A 文章编号: 2095-1116(2011)01-0029-04

Study of EGCG Inhibited Proliferation of HL-60 Cells

OUYANG Lin, JIANG Hao

(Department of Blood, the First Affiliated Hospital of University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract: Objective To investigate action mechanism of EGCG inhibited proliferation of leukemia HL-60 cells.

Methods The proliferation of HL-60 cells was detected by soft agar colony forming experiment and drawing cellular growth curve. The cellular apoptosis was observed by flow cytometry and DNA gel electrophoresis. Meanwhile, the expression of AKT1 was analyzed by real time fluorescent quantitation RT-PCR and western blotting. **Results** The results of cellular growth curve and soft agar colony forming experiment both showed that proliferation of HL-60 cells was inhibited by EGCG, which depended on its concentration ($P < 0.05$). The results of flow cytometry and DNA gel electrophoresis showed that the cellular apoptosis was induced by EGCG, which depended on its concentration ($P < 0.05$). The results of real time fluorescent quantitation RT-PCR and western blotting showed that the expression of AKT1 was depressed by EGCG with concentration of its heightening in HL-60 cells. **Conclusion** EGCG inhibited the proliferation of HL-60 cells because it probably down-regulated the expression level of AKT1 and led to increase cellular apoptosis.

Key words: EGCG; HL-60 cell line; cellular proliferation; cellular apoptosis; AKT1

白血病是一类起源于造血系统的恶性肿瘤, 其发生发展与多种遗传学改变有关。近年的研究发现, PI3K/AKT 信号通路的持续性活化与白血病的发生、发展密切相关^[1]。茶是全世界人们喜欢的饮料, 特别是像中国、朝鲜及日本等亚洲国家, 茶中含有大量的多酚类化合物, 是天然的抗氧化剂, 表没食

子儿茶素没食子酸酯 (epigallocatechin-3-gallate, EGCG) 是茶中含量最高、抗氧化和抗癌作用最强的成分^[2], 本研究旨在探讨 EGCG 体外抑制 HL-60 细胞增殖的机制。

1 材料与amp;方法

1.1 细胞系

白血病 HL-60 细胞系购置上海细胞生物研究所,用含 10% 小牛血清(购自杭州四季青公司)的 RPMI-1640(Gibco BRL 产品)培养基,于 37℃、5% CO₂ 饱和湿度的培养箱培养。

1.2 试剂与引物

实验所用 EGCG 为 Sigma 产品(纯度大于 98%),AMV Reverse Transcription 试剂盒、PCR 系列试剂盒购自 Promega 公司,单克隆抗体(一抗和二抗)购自 Zymed Ltd,其他化学和生化试剂均为 Sigma 产品。PCR 引物(见表 1)用 Primer5 软件设计,由上海英骏生物技术有限公司合成。

表 1 PCR 引物序列

| 引物名称 | 引物序列 | 产物大小(bp) |
|---------|-------------------------------|----------|
| AKT1 | P1:5' AAGAAGGAAGTCATCCTGG 3' | 177 bp |
| | P2:5' GGACAGGTGGAAGAACAGC 3' | |
| | P3:5' ACCCTGGAGAAGAGCTACGA 3' | |
| β-actin | P4:5' GTACTGCGCTCAGAAGGAG 3' | 309 bp |

1.3 绘制生长曲线

将 HL-60 细胞(1×10^4)接种于 96 孔板种(分 1、10、100、1 000 mg/L 4 组,每组设 3 个平行孔,对照为未处理组),每天对细胞进行计数,每次重复计数三次,取平均值代表测量值,用校正值(每次测量值与第一天的测量值之商)代表细胞生长曲线的测量值,总共检测 6 天,将细胞的校正值绘制在坐标纸上,即得出细胞的生长曲线。

1.4 软琼脂集落实验

配制 0.6% 琼脂糖底层琼脂,用 HL-60 细胞(密度为 1×10^4 个细胞/孔)配制 0.3% 琼脂糖顶层琼脂,连续培养 2 周后,计数集落数。实验分别用 1、10、100、1 000 EGCG 4 组,每组 3 个平行孔。于倒置显微镜下观察集落的数目和大小,计算出细胞集落形成率(集落形成率 = 集落数/接种细胞数 \times 100%)。然后,计算克隆形成 IR 和 IC₅₀ 值: $IR(\%) = [1 - (\text{处理组集落均数} / \text{空白对照组集落均数})] \times 100\%$ 。

1.5 流式细胞仪(FCM)检测

生长状态良好的 HL-60 细胞,分别用 1、10、100、1 000 mg/L EGCG 处理 48 h,收集细胞,70% 预

冷的乙醇 4℃ 至少固定 2 h,调整细胞浓度为 10^6 个/mL。送北京鼎国生物公司用流式细胞仪测定细胞的凋亡情况。

1.6 琼脂糖凝胶电泳检测细胞凋亡

分别用 1、10、100、1 000 mg/L EGCG 处理 48 h,收集细胞,加细胞裂解液 450 μL,混匀,置 37℃ 水浴箱过夜,以等体积苯酚氯仿抽提。加 1/10 体积 3 mmol/L 醋酸钠,2 倍体积冰无水乙醇沉淀 DNA,离心弃上清,溶解 DNA,取 10 μL 于 1.5% 琼脂糖凝胶电泳紫外灯下观察并摄影。

1.7 实时荧光定量 RT-PCR 检测 AKT1 基因的表达

收集细胞,按 Trizol 试剂操作程序抽提细胞总 RNA,逆转录后,使用 SYBR Green I 荧光染料在密闭的毛细硅管中进行定量 PCR 反应。取模板 2 μL,上下游引物各 0.4 μL,与 10 μL 混合染料混合后注入毛细硅管中,放入 Lightcycler PCR 热循环仪中进行反应,计算出 Threshold cycle(Ct)。每一次反应均以 ddH₂O 代替模板做为阴性对照,计算基因的表达量:目的基因的量 = $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (表示实验组目的基因的表达相对于对照组的变化倍数), $\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{\text{管家基因}})_{\text{实验组}} - (Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{\text{管家基因}})_{\text{对照组}}$ 。

1.8 Western blotting 检测 AKT1 蛋白的表达

提取细胞总蛋白后测定蛋白浓度,以各泳道 50 μg 蛋白量经 10% SDS 不连续聚丙烯酰胺凝胶 120 V 电泳 2 h,使分离的蛋白质转移至 PVDF 膜上,温封闭,一抗(1:1 000)室温孵育 1 h,HRP 标记的二抗(1:2 000)室温孵育 1 h,洗膜后进行 ECL 化学发光,X 光片曝光并显影、定影和分析结果。

1.9 统计学分析

用 SPSS13.0 统计软件包进行 *t* 及 χ^2 检验。数据以均数 \pm 标准差表示,*P* < 0.05 表示差异有显著性。

2 结果

2.1 EGCG 对 HL-60 细胞增殖的抑制作用

分别用 1、10、100、1 000 mg/L 的 EGCG 溶液分别处理细胞,每天计数细胞数,连续 6 天后,结果发现,与对照组比较,不同浓度 EGCG 液处理 HL-60 细胞后,细胞增殖速度减慢(*P* < 0.05),且随着浓度的增加,抑制作用逐渐增强(见图 1)。

2.2 EGCG 对 HL-60 细胞集落形成的抑制作用

采用软琼脂集落形成实验检测 EGCG 对 HL-60 细胞集落形成能力的影响,结果显示,EGCG 对 HL-

60 细胞集落形成能力具有一定的抑制作用,呈剂量依赖性,IC₅₀ 为 47.97 mg/L(见表 2)。

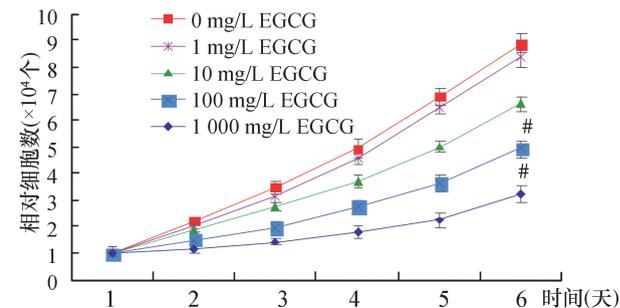


图 1 不同浓度 EGCG 抑制 HL-60 细胞的生长曲线
与 0 mg/L EGCG 组比较, # $P < 0.05$

表 2 EGCG 对 HL-60 细胞集落形成的影响 ($n = 3$)

| EGCG 浓度 (mg/L) | 集落数 | 抑制率 (%) | IC ₅₀ (mg/L) |
|----------------|---------------------------|---------|-------------------------|
| 0 | 94.65 ± 4.82 | 0.00 | |
| 1 | 90.82 ± 4.25 | 4.05 | |
| 10 | 65.87 ± 10.56 | 30.41 | |
| 100 | 30.23 ± 3.41 ^a | 68.06 | |
| 1 000 | 11.28 ± 1.62 ^a | 88.08 | 47.97 |

与 0 mg/L EGCG 组比较, a: $P < 0.05$

2.3 FCM 检测 EGCG 处理 HL-60 细胞的凋亡情况

分别用 1、10、100、1 000 mg/L 的 EGCG 溶液处理细胞 48 h 后,经流式细胞术检测细胞凋亡。结果显示,经 EGCG 处理后,随着浓度的升高,HL-60 细胞的凋亡率逐渐增加(见表 3, $P < 0.05$),即 EGCG 呈浓度依赖性诱导 HL-60 细胞的凋亡。

表 3 不同浓度 EGCG 处理 HL-60 细胞的凋亡

| EGCG 浓度 (mg/L) | 凋亡率 (%) |
|----------------|-------------------|
| 0 | 4.7 |
| 1 | 7.0 |
| 10 | 16.3 |
| 100 | 24.4 ^a |
| 1 000 | 39.5 ^a |

与 0 mg/L EGCG 组比较, a: $P < 0.05$

2.4 DNA 琼脂糖凝胶电泳法检测 EGCG 诱导 HL-60 细胞的凋亡

EGCG 处理 HL-60 细胞后,随着浓度升高可见 DNA 梯形条带(图 2),即 EGCG 可呈浓度依赖性诱导 HL-60 细胞的凋亡。

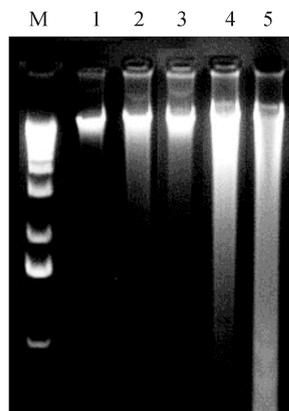


图 2 DNA 琼脂糖凝胶电泳法观察 EGCG 处理 HL-60 细胞的凋亡

M: Marker; 1: 0 mg/L EGCG 组; 2: 1 mg/L EGCG 组;
3: 10 mg/L EGCG 组; 4: 1 00 mg/L EGCG 组;
5: 1 000 mg/L EGCG 组

2.5 实时荧光定量 RT-PCR 检测 AKT1 基因的表达

随着 EGCG 浓度的升高, AKT1 基因的表达水平逐渐降低。

表 4 EGCG 溶液处理 HL-60 细胞后 AKT1 基因的 mRNA 表达

| EGCG 浓度 (mg/L) | mRNA 相对表达量 |
|----------------|--------------------------|
| 0 | 2.48 ± 0.64 |
| 1 | 2.04 ± 0.52 |
| 10 | 1.25 ± 0.46 |
| 100 | 0.86 ± 0.24 ^a |
| 1 000 | 0.56 ± 0.18 ^a |

与 0 mg/L EGCG 组比较, a: $P < 0.05$

2.6 Western-blotting 检测 AKT1 蛋白的表达

结果显示与实时荧光定量 RT-PCR 检测结果相似,即随着 EGCG 浓度增加,HL-60 细胞中 AKT1 蛋白表达亦降低(图 3, $P < 0.05$),提示 EGCG 可能通过抑制 AKT1 蛋白表达发挥其对 HL-60 细胞增殖的抑制作用。

3 讨 论

细胞增殖与凋亡失衡是肿瘤发生、发展的主要原因之一,抑制肿瘤细胞增殖和诱导其细胞凋亡是肿瘤防治的重要方法。大量研究证实,EGCG 可能通过抑制肿瘤细胞增殖和诱导肿瘤细胞凋亡^[3,4],如肺癌、鼻咽癌、乳腺癌、胃癌、结肠癌、前列腺癌、肝癌、口腔癌和卵巢癌等恶性肿瘤^[5~7],但其作用的

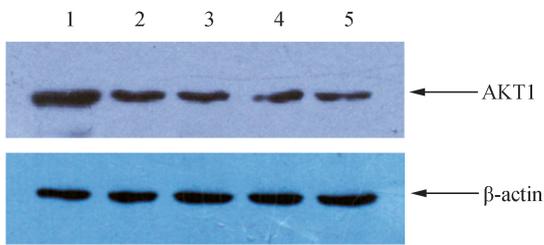


图3 Western-blotting 检测 AKT1 蛋白的表达

1:0 mg/L EGCG 组;2:1 mg/L EGCG 组;3:10 mg/L EGCG 组;
4:100 mg/L EGCG 组;5:1 000 mg/L EGCG 组

分子机制尚不清楚。

许多抗癌物质活性为抑制肿瘤细胞的恶性增殖,通过不同细胞信号通路发挥其抗肿瘤效用,本研究证实,EGCG 在体外可有效抑制 HL-60 细胞的增殖,且呈浓度依赖性,结果与文献报道基本一致^[3-7]。为了进一步了解 EGCG 抑制 HL-60 细胞增殖的具体机制,FCM 和 DNA 凝胶电泳检测发现,EGCG 呈浓度依赖性诱导 HL-60 细胞的凋亡。因此,推测 EGCG 在体外诱导 HL-60 细胞的凋亡可能是其抑制细胞增殖的作用机制之一。

PI3K/AKT 是细胞内重要的信号转导通路之一,其对调控细胞周期进程、细胞分化、细胞存活、细胞浸润和转移等具有重要作用,能够促进细胞增殖和避免细胞凋亡^[8,9]。AKT 又名蛋白激酶 B 是 PI3K 信号转导通路下游的一个重要激酶。AKT 激酶下游也有众多靶分子,包括促凋亡蛋白 Bad、Caspase-9、GSK3、NF- κ B 和 Foxo、P21 等^[10,11]。目前已发现 3 个 AKT 家族成员,即 AKT1、AKT2 和 AKT3,AKT1 是该信号通路的活性中心和联系上游突变调控蛋白和下游存活信号途径蛋白的中间环节^[12]。本研究结果显示,随着处理 HL-60 细胞的 EGCG 浓度增加,细胞中 AKT1 的表达逐渐降低。结果提示 EGCG 可能通过抑制 HL-60 细胞中 AKT1 的表达,促进细胞凋亡,抑制细胞增殖,AKT1 可能为 EGCG 抑制 HL-60 细胞增殖的候选靶标。EGCG 抑制 HL-60 细胞增殖的分子机制是本文作者下一步研究的目标。

参考文献:

[1] Goussetis DJ,Platanias LC. Arsenic Trioxide and the

PI3K/AKT pathway in chronic lymphocytic leukemia [J]. Clin Cancer Res. 2010,9.

[2] Tachibana H. Molecular basis for cancer chemoprevention by green tea polyphenol EGCG [J]. Forum Nutr, 2009, 61:156-169.

[3] Rao SD, Pagidas K. Epigallocatechin-3-gallate, a Natural Polyphenol, Inhibits Cell Proliferation and Induces Apoptosis in Human Ovarian Cancer Cells [J]. Anticancer Res, 2010, 30 (7):2519-2523.

[4] Patra SK, Rizzi F, Silva A, et al. Molecular targets of (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG): specificity and interaction with membrane lipid rafts [J]. J Physiol Pharmacol, 2008, 59 (9):217-235.

[5] Yang H, Zonder JA, Dou QP. Clinical development of novel proteasome inhibitors for cancer treatment [J]. Expert Opin Investig Drugs, 2009, 18 (7):957-971.

[6] Johnson JJ, Bailey HH, Mukhtar H. Green tea polyphenols for prostate cancer chemoprevention: a translational perspective [J]. Phytomedicine, 2010, 17 (1):3-13.

[7] Mandel SA, Amit T, Kalfon L, et al. Cell signaling pathways and iron chelation in the neurorestorative activity of green tea polyphenols: special reference to epigallocatechin gallate (EGCG) [J]. J Alzheimers Dis, 2008, 15 (2):211-222.

[8] Porta C, Figlin RA. Phosphatidylinositol-3-kinase/Akt signaling pathway and kidney cancer, and the therapeutic potential of phosphatidylinositol-3-kinase/Akt inhibitors [J]. J Urol, 2009, 182 (6):2569-2577.

[9] Martelli AM, Evangelisti C, Chiarini F, et al. Targeting the PI3K/AKT/mTOR signaling network in acute myelogenous leukemia [J]. Expert Opin Investig Drugs, 2009, 18 (9):1333-1349.

[10] Inamura Y, Miyamae M, Sugioka S, et al. Sevoflurane postconditioning prevents activation of caspase 3 and 9 through antiapoptotic signaling after myocardial ischemia-reperfusion [J]. J Anesth, 2010, 24 (2):215-224.

[11] Liu XB, Jiang J, Gui C, et al. Angiotensin II protects mesenchymal stem cells against serum deprivation and hypoxia-induced apoptosis through the PI3K/Akt pathway [J]. Acta Pharmacol Sin, 2008, 29 (7):815-822.

[12] Di Lorenzo A, Fernández-Hernando C, Cirino G, et al. Akt1 is critical for acute inflammation and histamine-mediated vascular leakage [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106 (34):14552-14557.

(此文编辑 蒋湘莲)