

EGCG 通过降低 Notch1 和 Jagged1 表达抑制鼻咽癌干细胞 SP18 的增殖

欧琼¹, 张志伟², 罗招阳², 刘重元³, 杨科³, 崔贵文³, 赵强⁴, 陈波⁵

(1. 南华大学附属第二医院妇产科, 湖南 衡阳 421001; 2. 肿瘤细胞与分子病理学湖南省高校重点实验室; 3. 南华大学医学院肿瘤研究所; 4. 南华大学附属第一医院病理科; 5. 邵阳医学高等专科学校病理教研室)

摘要: **目的** 探讨表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)抑制鼻咽癌干细胞 SP18 增殖的机制。 **方法** 采用 MTT 法检测 EGCG 抑制 SP18 细胞增殖的 IC_{50} ; 选用细胞生长曲线、平皿克隆形成实验和软琼脂集落形成实验观察 EGCG 对鼻咽癌干细胞 SP18 增殖的影响; 采用 Western blot 检测 Notch1 和 Jagged1 蛋白表达。 **结果** EGCG 抑制 SP18 细胞增殖的 IC_{50} 值为 149.02 mg/L; EGCG 呈浓度和时间依赖性抑制 SP18 细胞的增殖($n=3, P<0.05$); EGCG 呈浓度依赖性抑制 Notch1 和 Jagged1 蛋白的表达。 **结论** EGCG 能有效抑制鼻咽癌干细胞 SP18 的增殖, 其可能通过降低 Notch1 和 Jagged1 蛋白的表达而发挥作用。

关键词: EGCG; 鼻咽癌干细胞 SP18; 细胞增殖; Notch1 蛋白; Jagged1 蛋白

中图分类号: R739.6 **文献标识码:** A

EGCG Decreased the Expression of Notch1 and Jagged1 Proteins and Inhibited the Proliferation of Nasopharyngeal Cancer Stem Cell SP18

OU Qiong, ZHANG Zhiwei, LUO Zhaoyang, et al

(Department of Gynaecology and Obstetrics, the Second Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract: **Objective** To analyze the mechanism of Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) inhibiting the proliferation of nasopharyngeal cancer stem cell SP18. **Methods** 50% inhibiting concentration (IC_{50}) of which EGCG inhibited the proliferation of nasopharyngeal cancer stem cell SP18 was detected by MTT method. The proliferation of SP18 cells affected by EGCG was analyzed by the cellular growth curve, colony formation and soft agar formation. Then the expression of Notch1 and Jagged1 protein were respectively detected by Western blot in SP18 cells treated by EGCG. **Results** IC_{50} of which EGCG inhibited the proliferation of SP18 cells, was 149.02 mg/L. The proliferation of SP18 cells was inhibited with EGCG concentration increasing and treatment time extending ($n=3, P<0.05$). The expression of Notch1 and Jagged1 proteins in SP18 cells was obviously decreased with EGCG concentration increased. **Conclusion** EGCG can inhibit the proliferation of nasopharyngeal cancer stem cell SP18, which probably decreased the expression of Notch1 and Jagged1 proteins to achieve the role.

Key words: Epigallocatechin-3-gallate; nasopharyngeal cancer stem cell SP18; cellular proliferation; Notch1 protein; Jagged1 protein

收稿日期: 2013-05-16

基金项目: 湖南省自然科学基金省市联合基金(12JJ9033); 湖南省自然科学基金(12JJ3102、13JJ3079); 湖南省高校创新平台开放基金(12K094、10K052); 湖南省研究生科研创新项目(CX2010B380); 湖南省教育厅科研项目(11C1112、12C0340); 衡阳市科技局科研项目(2011kj52、2011kj53)。

作者简介: 欧琼, 硕士研究生, 研究方向: 临床病理学, E-mail: lzy@163.com. 通讯作者张志伟, 硕士, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 恶性肿瘤的发病及其防治, E-mail: nhdxzzw@qq.com. 罗招阳, 本科, 教授, 硕士生导师, 研究方向: 临床病理学, E-mail: lzy@163.com.

放疗或化疗及放化疗仍然是治疗鼻咽癌(Nasopharyngeal carcinoma,NPC)的主要手段之一。许多研究显示,肿瘤干细胞的残留被认为是肿瘤发生与复发的根源^[1-2]。肿瘤干细胞的形成与多条信号通路的异常活化有关,如 Notch、Bmi-1、Shh 和 Wnt 等信号通路。有研究显示,Notch 信号通路在多种实体瘤形成过程中发挥重要的作用,有望成为可抗癌药物的重要靶点之一。2007 年,曾益新等首次报道,筛选建立了鼻咽癌干细胞 SP 细胞系^[3]。许多研究证实,儿茶素的主要单体表没食子儿茶素没食子酸酯((-)-epigallocatechin-3-gallate,EGCG)能够有效抑制多种恶性肿瘤的产生与发展^[4-7]。本文旨在探讨 EGCG 抑制鼻咽癌干细胞 SP18 生长增殖的分子机制,为开发新的抗肿瘤药物提供有价值的实验资料。

1 材料与方法

1.1 细胞及主要试剂

鼻咽癌干细胞 SP18 细胞系由中山大学肿瘤防治中心惠赠,该细胞培养选用含 5% 小牛血清(购自杭州四季青公司)的 RPMI1640(Gibco BRL 公司)培养基,于 37℃、5% CO₂ 饱和湿度的培养箱中常规培养。一抗及二抗购自 Santa Cruz 公司;丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、PVDF 膜等均购自 Takara 公司。

1.2 MTT 比色法

按 1×10⁴ 个/孔接种细胞于 96 孔培养板,分别加入不同浓度的 EGCG,实验分为阴性对照组(PBS)和 EGCG 处理组(1.0、10.0、100.0 和 1 000.0 mg/L EGCG),每组设 3 个平行孔,培养 48 h 后加入 MTT 溶液,DMSO 溶解结晶,酶标仪测定每孔的吸光值,计算 EGCG 对 SP18 细胞的半抑制浓度(50% inhibiting concentration,IC₅₀)。

1.3 绘制生长曲线

按 1×10³ 个/孔接种细胞于 24 孔培养板,分别加入不同浓度的 EGCG,实验分为阴性对照组(PBS)和 EGCG 处理组(50.0、100.0、150.0 mg/L(≈IC₅₀值)和 200.0 mg/L EGCG),每组设 3 个平行孔。每天取 3 孔细胞计数,计算细胞平均数,连续计数 6 天,绘制出 EGCG 影响 SP18 细胞生长增殖的曲线。

1.4 平皿克隆形成实验

按 500 个/孔接种细胞于 6 孔培养板,分别加入不同浓度的 EGCG,实验分为阴性对照组(PBS)和 EGCG 处理组(50.0 mg/L、100.0 mg/L、150.0 mg/L

(≈IC₅₀值)和 200.0 mg/L EGCG),每组设 3 个平行孔。静置于培养箱培养 2 周后,甲醇固定、结晶紫染色,计数细胞克隆形成数,计算 EGCG 对 SP18 细胞克隆形成的 IC₅₀。

1.5 软琼脂集落形成实验

用 RPMI1640 培养基、0.6% 琼脂糖(终浓度)配制底层琼脂于 24 孔板内,另外,分别用 SP18 细胞(密度为 1×10⁴ 个/孔)、不同浓度的 EGCG(50.0、100.0、150.0 mg/L(≈IC₅₀值)和 200.0 mg/L EGCG)、RPMI1640 培养基和 0.3% 琼脂糖(终浓度),配制成顶层琼脂,实验设阴性对照组(PBS),每组设 3 个平行孔,连续静置培养 2 周后,计数集落数的平均数,计算 EGCG 对 SP18 细胞集落形成的 IC₅₀值。

1.6 Western blot 检测蛋白表达

取生长状态良好的 SP18 细胞,分别加入不同浓度的 EGCG,实验分为阴性对照组(PBS)和 EGCG 处理组(50.0、100.0、150.0 mg/L(≈IC₅₀值)和 200.0 mg/L EGCG),培养 48 h,收集细胞,裂解、提取蛋白,测定蛋白浓度,以各泳道 50 μg 总蛋白量经 10% SDS 不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳分离、转膜、封闭,一抗(1:1 000)和二抗(1:2 000)孵育、洗膜、发光、曝光、显影、定影和结果分析。

1.7 统计学处理

用 SPSS17.0 统计软件包对所有的数据进行统计分析,所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验进行分析,以 *P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 EGCG 抑制 SP18 细胞增殖的 IC₅₀ 值

MTT 结果显示,随着 EGCG 处理浓度的升高,其对 SP18 细胞的增殖抑制作用增强(表 1)。EGCG 呈浓度依赖性抑制 SP18 细胞的增殖,其 IC₅₀ 值为 149.02 mg/L。

表 1 不同浓度 EGCG 对 SP18 细胞增殖的抑制作用

组别	OD ₅₇₀ 值	IR(%) IC ₅₀ 值(mg/L)
阴性对照组	1.821 ± 0.128	0.00
不同浓度 EGCG 组(mg/L)		
1.0	1.798 ± 0.115	1.26
10.0	1.618 ± 0.108	11.14
100.0	0.924 ± 0.085 ^a	49.26
1 000.0	0.383 ± 0.046 ^a	78.97 149.02

OD₅₇₀:波长 570 nm 的吸光值;IR:抑制率;与阴性对照组比较,
a:*P* < 0.05

2.2 EGCG 抑制 SP18 细胞的增殖曲线

实验结果发现,与阴性对照组比较,EGCG 处理后 SP18 细胞的增殖速度减慢,且呈浓度依赖性 ($n=3, P<0.05$),EGCG 可有限抑制 SP18 细胞的增殖,且随着其浓度的不断升高,作用时间的延长,对 SP18 细胞的增殖抑制作用更明显(图 1),EGCG 对 SP18 细胞的抑制呈时效与量效关系。

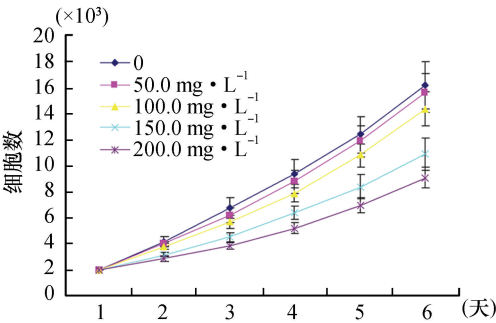


图 1 EGCG 抑制 SP18 细胞增殖的曲线 与阴性对照组比较, # $P<0.05$

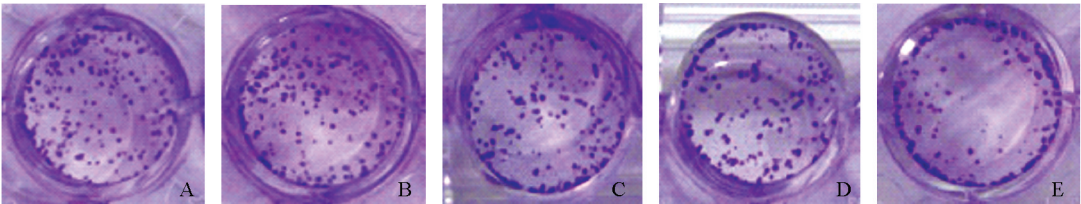


图 2 EGCG 对 SP18 细胞平皿克隆形成的抑制作用 A: 阴性对照组; B: 50.0 mg/EGCG 组; C: 100.0 mg/EGCG 组; D: 150.0 mg/EGCG 组; E: 200.0 mg/L EGCG 组

2.4 EGCG 对 SP18 细胞非停泊依赖性生长的抑制作用

取生长状态良好 SP18 细胞,通过软琼脂集落形成实验观察不同 EGCG(EGCG 浓度为 50.0、100.0、150.0 和 200.0 mg/L)对 SP18 细胞集落形成的影

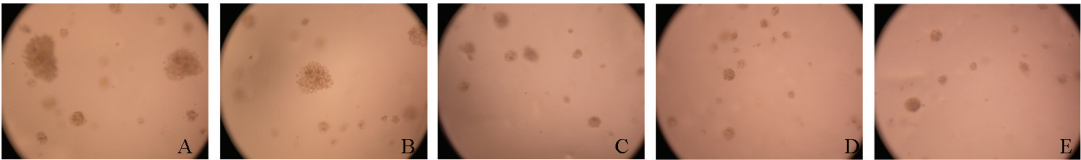


图 3 EGCG 对 SP18 细胞非停泊依赖性生长的抑制作用 A: 阴性对照组; B: 50.0 mg/EGCG 组; C: 100.0 mg/EGCG 组; D: 150.0 mg/EGCG 组; E: 200.0 mg/L EGCG 组

2.5 EGCG 对 SP18 细胞中 Notch1 和 Jagged1 蛋白表达的影响

Western blot 实验结果显示,不同浓度 EGCG 处

2.3 EGCG 对 SP18 细胞锚定依赖性生长能力的抑制作用

平皿克隆形成实验结果显示,随着 EGCG 浓度的升高,SP18 细胞克隆体积逐渐变小,数目减少,EGCG 呈浓度依赖性抑制 SP18 细胞的平皿克隆形成,其 IC_{50} 为 146.13 mg/L(表 2、图 2)。

表 2 EGCG 抑制 SP18 细胞平皿克隆形成的影响

组 别	克隆数	IR(%)	IC ₅₀ (μg/mL)
阴性对照组	295 ± 52	0.00	
不同浓度 EGCG 组(mg/L)			
50.0	276 ± 38	6.44	
100.0	218 ± 32	26.10	
150.0	125 ± 28 ^a	57.63	
200.0	102 ± 25 ^a	65.42	146.13

与阴性对照组比较, a: $P<0.05$

响。实验结果显示,随着处理 SP18 细胞的 EGCG 浓度升高,软琼脂中的细胞集落体积变小,数目减少(图 3)。结果示 EGCG 呈浓度依赖性抑制 SP18 细胞的集落形成,其 IC_{50} 为 152.59 mg/L(表 3)。

理后,SP18 细胞中 Notch1 和 Jagged1 蛋白表达较阴性对照组下降,其表达呈浓度依赖性下降 ($P<0.05$)。见图 4。

表 3 EGCG 对 SP18 细胞软琼脂集落形成的影响

组 别	集落数	IR (%)	IC ₅₀ (μg/mL)
阴性对照组	482 ± 73	0. 00	
不同浓度 EGCG 组 (mg/L)			
50. 0	436 ± 68	9. 54	
100. 0	329 ± 65	31. 74	
150. 0	245 ± 47 ^a	49. 17	
200. 0	182 ± 38 ^a	62. 24	152. 59

与阴性对照组比较, a: P < 0. 05

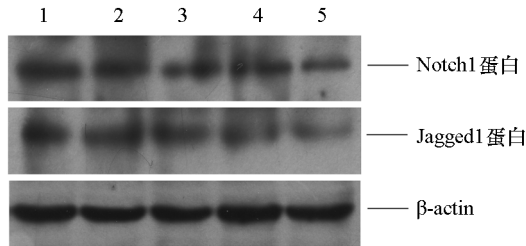


图 4 Western blot 检测 SP18 细胞中 Notch1 和 Jagged1 蛋白的表达 1: 阴性对照组; 2: 50.0 mg/L EGCG 组; 3: 100.0 mg/L EGCG 组; 4: 150.0 mg/L EGCG 组; 5: 200.0 mg/L EGCG 组

3 讨 论

至今,多条肿瘤干细胞相关的信号通路逐渐被人们认识与了解,如 Wnt、Notch、Hedgehog、Bmi-1 和 Shh 等是肿瘤干细胞维持干细胞特性的重要信号通路之一^[8-11]。鼻咽癌干细胞的获得为进一步了解鼻咽癌的发生发展、肿瘤的耐药、放化疗抵抗和鼻咽癌易转移的分子机制提供了非常有应用价值的实验模型。为了寻找有效的抗鼻咽癌药物,本文选取鼻咽癌干细胞进行研究,能充分体现相关药物的抗肿瘤作用,也为难治性、复发性鼻咽癌患者临床预防和治疗提供有价值的实验基础与依据。

大量研究证实,长期饮茶对人体多种恶性肿瘤均具有一定的预防和治疗作用。茶的主要成分 EGCG 对包括鼻咽癌、肺癌、胃癌、肝癌、结肠癌、乳腺癌、宫颈癌、卵巢癌、白血病、膀胱癌、黑色素瘤、骨肉瘤以及头颈部鳞癌干细胞等多种恶性肿瘤的生长与增殖均具有一定的抑制作用^[4-7,12-16]。本实验通过绘制细胞生长曲线、平皿克隆形成和软琼脂集落形成实验,三者均同样显示 EGCG 对 SP18 细胞增殖的抑制作用,且抑制作用呈浓度与时间依赖性。这在以往 EGCG 抑制多种恶性肿瘤细胞增殖的基础上,显示其也具有抑制肿瘤干细胞增殖的作用,进一步丰富了 EGCG 的抑瘤机制,也为 EGCG 临床预防

鼻咽癌的发生发展、转移、耐药和放化疗抵抗等提供了理论依据。

Notch 信号通路由受体、配体和 DNA 结合蛋白三部分组成。至今,人们已在哺乳动物中发现了 4 种 Notch 受体(即 Notch1、Notch2、Notch3 和 Notch4)和 5 种 Notch 配体(即 Jagged1、Jagged2、Delta-like-1、Delta-like-3 和 Delta-like-4)^[16-17]。许多研究表明,Notch1/Jagged1 信号通路的异常活化与细胞分化、胚胎发育、组织自我更新、多种人类肿瘤的发生、发展与转移密切相关,是肿瘤细胞内的重要信号通路之一^[18],尤其是肿瘤干细胞中,该通路异常活化。为了解 EGCG 抑制 SP18 细胞增殖的分子机制,本实验采用 Western blot 分别检测 Notch1 蛋白在 EGCG 孵育 SP18 细胞后的表达情况。结果显示,EGCG 呈浓度依赖性抑制 Notch1 蛋白的表达。可推测 EGCG 抑制 Notch1 的表达可能是其抑制 SP18 细胞增殖的作用之一。为了进一步核实,通过 Western blot 分析了 EGCG 孵育 SP18 细胞后,Notch1 配体 Jagged1 蛋白的表达情况。结果显示,EGCG 处理后,SP18 细胞中 Jagged1 蛋白表达较阴性对照组下降,其表达呈浓度依赖性下降。上述结果进一步证实 EGCG 可有效下调 Notch1 与 Jagged1 蛋白,阻止 Notch1/Jagged1 信号通路的活化,从而抑制鼻咽癌干细胞 SP18 细胞的增殖。

总之,本研究初步分析了 EGCG 抑制鼻咽癌干细胞 SP18 增殖的分子机制。EGCG 可有效抑制 SP18 细胞的增殖,具体分子机制与下调 SP18 细胞中 Notch1 与 Jagged1 蛋白的表达,阻止 Notch1/Jagged1 信号通路的活化有关。至于 EGCG 如何调控鼻咽癌干细胞中 Notch1 与 Jagged1 蛋白的表达,以及其他细胞内信号通路间的交互作用,仍有待后续的深入研究。本研究为长期饮茶的人们防治鼻咽癌以及开发新的抗癌药物,提供了新的实验资料、思路,也开辟了新途径。

参考文献:

[1] Wang L,Chen F,Zhang Z,et al. Cancer stem cells in the mechanism of metal carcinogenesis[J]. J Environ Pathol Toxicol Oncol,2012,31(3):245-263.

[2] Cheng L,Alexander R,Zhang S,et al. The clinical and therapeutic implications of cancer stem cell biology[J]. Expert Rev Anticancer Ther,2011,11(7):1131-1143.

[3] Wang J,Guo LP,Chen LZ,et al. Identification of cancer stem cell-like side population cells in human nasopharyn-

- geal carcinoma cell line [J]. *Cancer Res*, 2007, 67 (8) : 3716-3724.
- [4] Braicu C, Gherman CD, Irimie A, et al. Epigallocatechin-3-Gallate (EGCG) inhibits cell proliferation and migratory behaviour of triple negative breast cancer cells [J]. *J Nanosci Nanotechnol*, 2013, 13 (1) : 632-637.
- [5] Liu LC, Tsao TC, Hsu SR, et al. EGCG inhibits transforming growth factor- β -mediated epithelial-to-mesenchymal transition via the inhibition of Smad2 and Erk1/2 signaling pathways in nonsmall cell lung cancer cells [J]. *J Agric Food Chem*, 2012, 60 (39) : 9863-9873.
- [6] Vézina A, Chokor R, Annabi B. EGCG targeting efficacy of NF- κ B downstream gene products is dictated by the monocytic/macrophagic differentiation status of promyelocytic leukemia cells [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2012, 61 (12) : 2321-2331.
- [7] Lee YH, Kwak J, Choi HK, et al. EGCG suppresses prostate cancer cell growth modulating acetylation of androgen receptor by anti-histone acetyltransferase activity [J]. *Int J Mol Med*, 2012, 30 (1) : 69-74.
- [8] Wang J, Sullenger BA, Rich JN. Notch signaling in cancer stem cells [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2012, 727 (1) : 174-185.
- [9] Milla LA, González-Ramírez CN, Palma V. Sonic Hedgehog in cancer stem cells: a novel link with autophagy [J]. *Biol Res*, 2012, 45 (3) : 223-230.
- [10] Wang Y, Zhe H, Ding Z, et al. Cancer stem cell marker Bmi-1 expression is associated with basal-like phenotype and poor survival in breast cancer [J]. *World J Surg*, 2012, 36 (5) : 1189-1194.
- [11] Tang SN, Fu J, Nall D, et al. Inhibition of sonic hedgehog pathway and pluripotency maintaining factors regulate human pancreatic cancer stem cell characteristics [J]. *Int J Cancer*, 2012, 131 (1) : 30-40.
- [12] Singh BN, Shankar S, Srivastava RK. Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate (EGCG): mechanisms, perspectives and clinical applications [J]. *Biochem Pharmacol*, 2011, 82 (12) : 1807-1821.
- [13] Chen D, Wan SB, Yang H, et al. EGCG, green tea polyphenols and their synthetic analogs and prodrugs for human cancer prevention and treatment [J]. *Adv Clin Chem*, 2011, 53 (1) : 155-177.
- [14] Tachibana H. Molecular basis for cancer chemoprevention by green tea polyphenol EGCG [J]. *Forum Nutr*, 2009, 61 : 156-169.
- [15] Fujimura Y, Sumida M, Sugihara K, et al. Green tea polyphenol EGCG sensing motif on the 67-kDa laminin receptor [J]. *PLoS One*, 2012, 7 (5) : e37942.
- [16] Lee SH, Nam HJ, Kang HJ, et al. Epigallocatechin-3-gallate attenuates head and neck cancer stem cell traits through suppression of Notch pathway [J]. *Eur J Cancer*, 2013, 19, (13) 500-505.
- [17] Greenwald I, Kovall R. Notch signaling: genetics and structure [J]. *WormBook*, 2013, 17 : 1-28.
- [18] Kopan R. Notch signaling [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2012, 4 (10). pii: a011213.
- [19] Gao J, Liu J, Fan D, et al. Up-regulated expression of Notch1 and Jagged1 in human colon adenocarcinoma [J]. *Pathol Biol (Paris)*, 2011, 59 (6) : 298-302.

(此文编辑: 蒋湘莲)