

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.28.005

文章编号: 1005-8982 (2018) 28-0028-05

茶多酚联合顺铂对肺癌细胞 A549 增殖和凋亡的影响

王若石, 蔡钧

(华中科技大学同济医学院附属武汉中心医院 急诊创伤外科, 湖北 武汉 430030)

摘要: 目的 观察茶多酚 (TP)、顺铂 (DDP) 及两者联合对人肺癌细胞 A549 增殖和凋亡的影响, 探讨 TP 联合 DDP 联合影响 A549 细胞生长的机制。**方法** 人肺癌细胞 A549 经 TP、DDP 单独或联合处理后, 将 A549 细胞分成 TP 组、DDP 组、TP 联合 DDP 组 (TP+DDP 组) 及空白对照组, MTT 法检测细胞增殖情况, Annexin V/PI 双染流式细胞术分析细胞凋亡, Western blot 检测细胞中 p-AKT 和 p-ERK1/2 的表达。**结果** TP 组、DDP 组及 TP+DDP 组细胞增殖率分别为 (91.0±3.6) %、(84.3±5.0) % 和 (70.3±4.2) %, TP+DDP 组的细胞增殖率与 DDP 组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), TP+DDP 组低于 DDP 组; 流式细胞术示 TP 组细胞凋亡率无明显影响, TP+DDP 组凋亡率与 DDP 组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); DDP 组细胞中 p-AKT、p-ERK1/2 蛋白表达降低, TP 联合 DDP 组中 p-AKT、p-ERK1/2 的蛋白表达与 DDP 组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), TP+DDP 组低于 DDP 组。**结论** TP 与 DDP 联合用药可增强 DDP 的抑制增殖和促进凋亡作用, 其机制可能与下调 AKT 的表达和 ERK1/2 蛋白的磷酸化有关。

关键词: 顺铂; 茶多酚; AKT; ERK1/2

中图分类号: R734.2

文献标识码: A

Effect of tea polyphenols combined with cisplatin on A549 lung cancer cells and its mechanism

Ruo-shi Wang, Jun Cai

(Department of Traumatology, Wuhan Central Hospital Affiliated to Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430030, China)

Abstract: Objective To study the effect of tea polyphenols (TP), cisplatin (DDP) alone and in combination on the proliferation and apoptosis ability of human lung carcinoma cell line A549 *in vitro* and the mechanism. **Methods** A549 cells were treated with 10 $\mu\text{g/ml}$ TP (TP group), 5 $\mu\text{g/ml}$ DDP (DDP group) and 10 $\mu\text{g/ml}$ TP plus 5 $\mu\text{g/ml}$ DDP (TP+DDP group) respectively, the cells without treatment were used as the blank control group. Cell proliferation was determined by MTT assay. The morphology of apoptotic cells was observed by Annexin V/PI double staining. Flow cytometry was used to analyze apoptosis. The expressions of ERK1/2 and p-AKT were detected by Western blot. **Results** The cell proliferation rate of the TP, DDP and TP+DDP groups was (91.0±3.6)%, (84.3±5.0) % and (70.3±4.2)% respectively. The anti-proliferation effect of the TP+DDP group was superior to that of the DDP group ($P < 0.05$). The results of flow cytometry showed that the apoptotic rate was not obviously changed in the TP group, but the apoptotic rate in the TP+DDP group was significantly different from that in the DDP group ($P < 0.05$). Low doses of TP had no significant apoptosis-promoting effect. Western blot analysis showed that the expressions of ERK1/2 and p-AKT decreased in the DDP group, which were significantly different from those in the TP+DDP group ($P < 0.05$).

收稿日期: 2018-01-29

[通信作者] 蔡钧, E-mail: juncai9993@126.com

Conclusions TP combined with DDP can significantly inhibit the proliferation of A549 cells, induce cell apoptosis, which may be associated with the reduction of ERK1/2 expression and AKT phosphorylation.

Keywords: cisplatin; tea polyphenols; AKT; ERK1/2

肺癌是发病率最高的恶性肿瘤之一, 目前居我国恶性肿瘤发病率的第一位^[1], 肺癌的治疗主要包括手术、放疗、化疗及分子靶向治疗。非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 常用的化疗药是顺铂 (Cisplatin, DDP), 一种细胞周期非特异性细胞毒药物, 主要通过干扰肿瘤细胞的 DNA 复制达到抗肿瘤效果, 并且与给药浓度呈正相关, 但同时毒性作用也会增加^[2-3]。此外, 顺铂治疗肺癌产生耐药的研究时有报道^[4], 因此有必要寻找降低毒副作用、提高治疗效果的联合用药方案。

茶多酚 (tea polyphenols, TP), 其是一类多羟基酚类化合物, 普遍存在于茶叶中, 目前学术界对它的研究较多, 文献报道其有化疗增敏、抑制肿瘤细胞生长、减轻化疗药的毒副作用的功效^[5-6]。但茶多酚在肺癌中的报道较少, 因此本研究在体外采用 TP 与 DDP 联合作用于肺癌细胞, 以阐明其对肺癌细胞增殖和凋亡能力的作用和影响, 探讨其对 DDP 抗肿瘤疗效的增敏作用, 并初步探讨其作用机制, 以期为临床提供参考。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

人肺癌细胞系 A549 购自北京协和医学院实验医学中心, RPMI-1640 培养基及胰酶均购自美国 Invitrogen 公司, MTT 试剂盒、二甲亚砜 (DMSO) 购自美国 Invitrogen 公司, AnnexinV/PI 双染试剂盒购自南京博泰生物科技有限公司, p-AKT、p-ERK1/2、AKT、ERK1/2 抗体购自美国 Cell signaling technology 公司, HRP 标记羊抗兔 IgG、HRP 标记的羊抗鼠 IgG 均购于上海碧云天生物技术研究所, 离心机购自日本久保田公司, 超净工作台购自江苏苏净集团, 生化床购自苏州威尔实验用品公司, 电泳仪、电转仪购自北京市六一仪器厂。

1.2 方法

1.2.1 实验分组 结合临床及预实验结果, TP 和 DDP 给药浓度分别选择 10 和 5 $\mu\text{g/ml}$, 实验分为 TP 组、DDP 组、TP 联合 DDP 组 (TP+DDP 组) 及空白对照组, 空白对照组仅加入等量溶媒。

1.2.2 细胞培养 将人肺癌细胞系 A549 细胞, 于

37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% 二氧化碳 CO_2 的条件下, 加入 RPMI 1640 培养基 (含 10% 胎牛血清) 中, 置于培养箱中培养, 待细胞长至融合后, 胰酶消化细胞, 并待细胞长至对数期时加入药物行相关实验。

1.2.3 MTT 实验 细胞增殖率的检测采用 MTT 法, 选取对数生长期的细胞, 接种于 96 孔板, 按每孔 5×10^3 个的数量接种, 每孔 100 μl 。培养条件为: 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 , 细胞培养生长至 70%, 按分组要求给予不同处理药物, 每组设 5 个复孔。药物作用 24 h 后, 每孔加入 5 g/L MTT 20 μl , 继续培养 4 h, 弃去培养液, 每孔按 150 μl 的量加入 DMSO, 在室温条件下, 震荡 10 min, 在 570 nm 处用酶标仪检测 4 组细胞的吸光度值 (OD 值)。细胞增殖率 = 处理组 OD 值 / 对照组 OD 值 $\times 100\%$ 。每组实验重复 3 次。

1.2.4 细胞凋亡检测 细胞凋亡率的检测采用流式细胞术, 将 TP 组、DDP 组、TP+DDP 组及空白对照组 4 组细胞以每孔 5×10^5 个接种于 12 孔板, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中继续培养 24 h 后, 收集细胞, 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 5 min (1 500 r/min), 弃上清。用 500 μl PBS 溶液重悬细胞并计数, 取 1×10^6 个细胞数, 加入 5 μl AnnexinV-FITC 并混匀, 加入 5 μl PI 并混匀, 在 2 ~ 8 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 15 min, 冰浴避光保存, 1 h 内使用流式细胞仪进行检测, 每组实验重复 3 次。

1.2.5 Western blot 检测 采用 Western blot 检测 p-ERK1/2、p-AKT 蛋白的相对表达, 裂解 4 组细胞后, 提取 4 组细胞总蛋白, 测定 4 组蛋白浓度后, 定量, 上样, 以 50 μg /孔的标准上样, 常规湿法转膜, 条件: 浓缩胶 60 mA 50 min、分离胶 120 mA 1 min, 将凝胶内蛋白转至 PVDF 膜上, 放入含 50 g/L 脱脂奶粉的溶液中封闭 1 h, 加入 p-ERK1/2、p-AKT、GAPDH 一抗, 浓度为 1 : 200, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育过夜, TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, 加入相应的 HRP 标记的羊抗兔 IgG (1 : 1 000) 或 HRP 标记的羊抗鼠 IgG (1 : 1 000), 室温孵育 2 h, TBST 洗膜 3 次, 用 ECL 化学发光液在凝胶成像仪中显色, 采用 Image J 软件对蛋白条带进行灰度分析, 以 p-AKT、p-ERK1/2 分别与 AKT、ERK1/2 条带灰度的比值表示目的蛋白的相对表达。

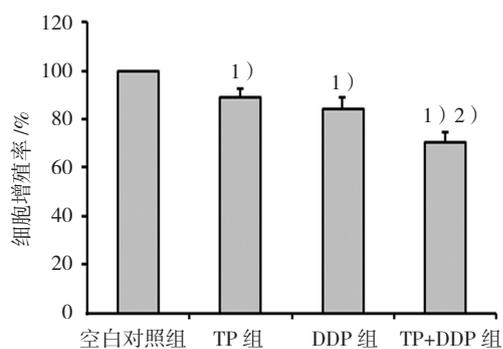
1.3 统计学方法

数据分析均采用 SPSS 17.0 统计软件, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间的比较采用单因素方差分析, 差异有统计学意义时, 两两比较采用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 A549 细胞增殖率比较

MTT 示: TP 组增殖率为 (91.0 \pm 3.6)%, DDP 组增殖率为 (84.3 \pm 5.0)%, TP+DDP 组增殖率为 (70.3 \pm 4.2)%, 空白对照组增殖率为 100%, 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 84.47$, $P = 0.000$), TP 组、DDP 组及 TP+DDP 组增殖率均低于空白对照组; TP+DDP 组细胞增殖率与 DDP 组比较, 经 LSD-*t* 检验, 差异有统计学意义 ($t = 2.398$, $P = 0.002$), TP+DDP 组



1) 与空白对照组比较, $P < 0.05$; 2) 与 DDP 组比较, $P < 0.05$

图 1 TP、DDP 及两者联用对细胞 A549 增殖的影响

低于 DDP 组 (见图 1)。培养第 2 天开始 DDP 对细胞 A549 有抑制作用, 且随着作用时间的延长, 生长曲线下降逐渐明显, TP+DDP 组生长曲线下下降较 DDP 组更为明显, 两者差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (见图 2)。

2.2 各组细胞凋亡率比较

流式细胞术所示, 空白对照组总凋亡率为 (7.86 \pm 0.34)%, DDP 组总凋亡率为 (18.78 \pm 0.62)%, TP 组总凋亡率为 (5.85 \pm 0.41)%, TP+DDP 组为 (26.46 \pm 0.45)%, 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 102.93$, $P = 0.000$); DDP 组和 TP+DDP 组总凋亡率与空白对照组比较, 经 LSD-*t* 检验, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), TP+DDP 组细胞凋亡率高于 TP 组 ($t = 8.398$, $P = 0.015$), TP 组与空白对照组凋亡率差异无统计学意义 ($t = 5.839$, $P = 0.265$)。见图 3。

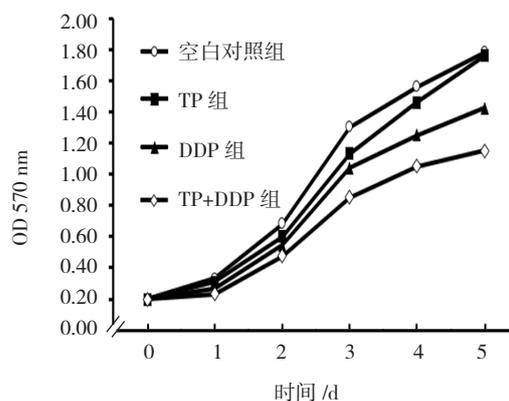


图 2 TP、DDP 及两者联合作用下 A549 细胞的生长曲线

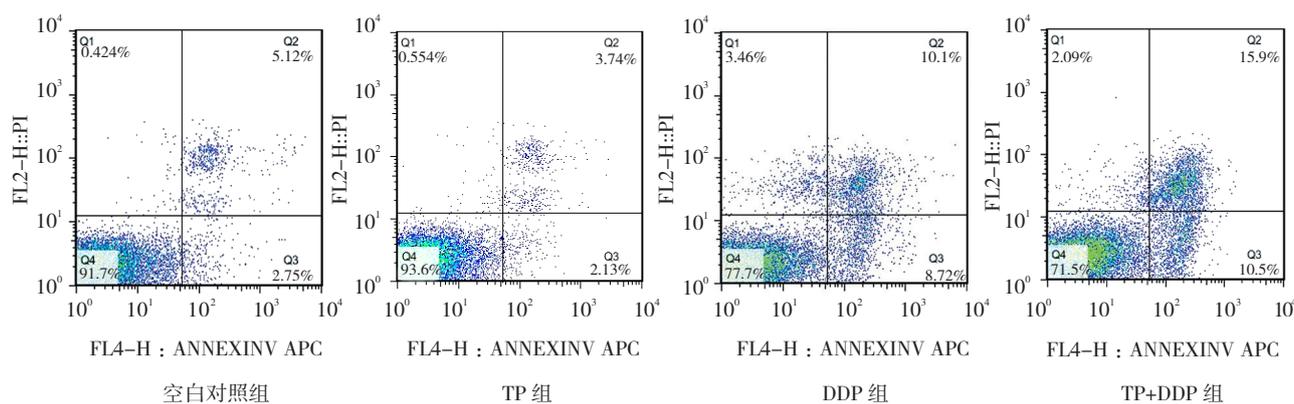


图 3 TP、DDP 及两者联用对 A549 细胞凋亡的影响

2.3 p-AKT、p-ERK1/2 蛋白表达变化

空白对照组 p-AKT 蛋白相对表达为 (1.0 \pm 0.03), TP 组为 (1.0 \pm 0.04), DDP 组为 (0.79 \pm 0.06), TP+DDP 组为 (0.68 \pm 0.02), 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 25.12$, $P = 0.000$); DDP 组 p-AKT 蛋白相

对表达与空白对照组比较, 经 LSD-*t* 检验, 差异有统计学意义 ($t = -5.422$, $P = 0.005$), DDP 组低于空白对照组; TP+DDP 组 p-AKT 蛋白相对表达与空白对照组比较, 经 LSD-*t* 检验, 差异有统计学意义 ($t = -15.372$, $P = 0.000$), TP+DDP 组低于空白对照组。见图 4。

空白对照组 p-ERK1/2 蛋白相对表达为 (1.0 ± 0.02), TP 组为 (0.98 ± 0.04), DDP 组为 (0.82 ± 0.05), TP+DDP 组为 (0.65 ± 0.05), 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ($F=35.970$, $P=0.000$); DDP 组 p-ERK1/2 蛋白相对表达与空白对照组比较, 经 LSD-*t* 检验, 差异有统计学意义 ($t=-5.789$, $P=0.004$), DDP 组低于对照组; 经 LSD-*t* 检验, TP+DDP 组 p-ERK1/2 蛋白相对表达与空白对照组比较, 差异有统计学意义 ($t=-11.257$, $P=0.000$), TP+DDP 组低于空白对照组。见图 4。

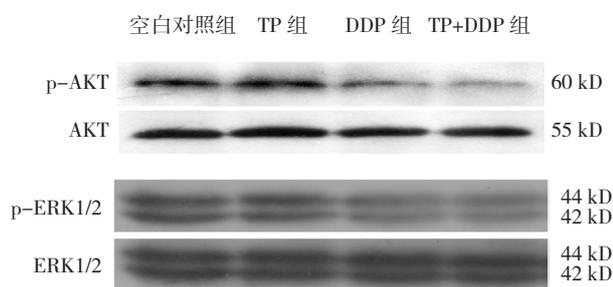


图 4 TP、DDP 及两者联用对 A549 细胞 p-ERK1/2 及 p-AKT 蛋白表达的影响

3 讨论

顺铂是治疗非小细胞肺癌的重要药物, 单药有效率为 16% ~ 20%, 通常与紫杉醇或长春瑞滨联用作为标准一线化疗方案^[7-8]。但抗肿瘤的化疗药副作用大, 引起诸多不良反应, 诸如: 脱发、骨髓抑制、肝肾毒性及胃肠道反应等, 而且长期使用容易导致耐药性发生, 进而引起肿瘤复发或转移等^[9], 如何减轻化疗药物的毒性, 并增强化疗药物疗效成为了肿瘤研究人员关注的热点。

TP 作为一种无毒性作用的天然植物提取物, 有研究报道, 其有一定的抗肿瘤作用, 少量的茶多酚作用于前列腺癌、乳腺癌及肺癌细胞可诱导其发生凋亡^[10-12]。本研究发现, 低剂量 TP 作用于 A549 细胞未能引起细胞凋亡, 然而与 DDP 联用却可以增加 A549 细胞的凋亡率。细胞凋亡是细胞在受到生理和病理性刺激后出现的一种自发性死亡过程, 在细胞凋亡过程中, 半胱氨酸蛋白酶 (Caspase) 家族发挥着重要的作用, 凋亡信号转导过程被启动后, 半胱氨酸蛋白酶 8 (Caspase-8) 可由酶原变成具有活性的蛋白, 并诱导凋亡级联反应发生, 半胱氨酸蛋白酶 3 (Caspase-3) 是细胞凋亡性死亡的最终执行者, 它最终被活化为裂

解型 Caspase-3, 能够直接裂解多个重要的结构与功能蛋白^[13-14]。

细胞凋亡过程可分为 3 个阶段, 即起始阶段、效应阶段和凋亡执行阶段, 机体内存在多种因素影响着细胞凋亡的过程。

丝裂素活化蛋白激酶家族 (mitogen-activated protein kinases, MAPKs) 在信号转导过程中的作用越来越受到关注, 它可以调节细胞各种生理过程, 包括炎症、应激、生长发育、分化与死亡^[15]。MAPK 信号通路包括细胞外信号调节激酶 (ERK1/2)、Jun 氨基末端激酶 (JNK)、p38 蛋白和细胞外信号调节激酶 5 (ERK5) 途径, 其中 ERK 通路在细胞增殖、分化和凋亡过程中发挥着重要作用, 它可在上游因子 MEK 的作用下发生磷酸化而激活^[16-17]。

ERK 通路与 PI3K/AKT 通路存在密切的联系, ZHANG 等^[18]证明 ERK 通路与 AKT 通路有交互作用, 他们发现抑制 HeLa 细胞 ERK 的活化, 可引起 mTOR 的激活, 而 PI3K/AKT 信号通路的激活可阻断该过程所致 mTOR 的活化。PI3K 信号通路可调控着诸如细胞凋亡、分裂、分化等多种生物学过程。丝氨酸 / 苏氨酸 AKT, 又称蛋白激酶 B, 为其直接靶作用蛋白, 可诱导细胞增殖和凋亡的发生。在 PI3K 的作用下, AKT 发生磷酸化而被激活, 从而作用于多种底物来调节细胞的生存、增殖和代谢^[19]。

本研究发现, 在肺癌细胞 A549 中, TP 与 DDP 联合后可显著增强 DDP 的抗肿瘤效应, MTT 法检测结果显示 DDP 组的细胞活力为 (84.3 ± 5.0)%, 而 TP+DDP 组的细胞活力仅为 (70.3 ± 4.2)%, 差异有统计学意义, TP 组的细胞增殖仅有轻度抑制, 因此 TP 与 DDP 联合可明显提高 DDP 对细胞 A549 增殖的抑制作用。流式细胞术测定凋亡发现, TP 对细胞凋亡作用不明显, 无显著影响。DDP 组与空白对照组比较, 细胞凋亡率升高, 而 TP+DDP 组细胞凋亡率高于 TP 组, 说明 TP 可促进 DDP 对肺癌细胞 A549 的毒性作用。Western blot 检测 AKT 和 ERK1/2 的磷酸化水平发现, DDP 组与 TP+DDP 组细胞中 p-AKT 和 p-ERK1/2 蛋白表达均降低, 并且 TP+DDP 组细胞中 p-ERK1/2 和 p-AKT 蛋白表达低于 DDP 组, 而 TP 组对 p-ERK1/2 和 p-AKT 蛋白表达均无明显影响。

综合以上结果, 说明 DDP 可抑制 A549 细胞增殖, 并且可引起细胞凋亡, 但低剂量 TP 对 A549 细胞的增殖仅有轻微抑制作用, 并且对细胞凋亡无明显影

响, 而 TP 与 DDP 联合应用却可使细胞增殖率大幅降低, 并使细胞凋亡率明显升高, 同时 TP 与 DDP 联用对 ERK1/2 和 AKT 蛋白磷酸化的抑制作用也明显增加, 说明 TP 可增强 DDP 的抗肿瘤作用, 其机制可能与抑制 AKT 和 ERK1/2 蛋白磷酸化有关。

参 考 文 献:

- [1] 陈万青, 张思维, 曾红梅, 等. 中国 2010 年恶性肿瘤发病与死亡[J]. 中国肿瘤, 2014, 23(1): 1-10.
- [2] HU W, JIN P, LIU W. Periostin contributes to cisplatin resistance in human non-small cell lung cancer A549 cells via activation of stat3 and akt and upregulation of surviving[J]. Cell Physiol Biochem, 2016, 38(3): 1199-2008.
- [3] YANG T, ZHAO P, RONG Z, et al. Anti-tumor efficiency of lipidcoated cisplatin nanoparticles co-loaded with microRNA-375[J]. Theranostics, 2016, 6(1): 142-154.
- [4] NASCIMENTO A V, GATTACCECA F, SINGH A, et al. Biodistribution and pharmacokinetics of Mad2 siRNA-loaded EGFR-targeted chitosan nanoparticles in cisplatin sensitive and resistant lung cancer models[J]. Nanomedicine (Lond), 2016, 11(7): 767-781.
- [5] CAO J, HAN J, XIAO H, et al. Effect of tea polyphenol compounds on anticancer drugs in terms of anti-tumor activity, toxicology, and pharmacokinetics[J]. Nutrients, 2016, 8(12): E762.
- [6] HAO X, XIAO H, JU J, et al. Green tea polyphenols inhibit colorectal tumorigenesis in azoxymethane-treated F344 rats[J]. Nutr Cancer, 2017, 69(4): 623-631.
- [7] VAN DER STEEN N, DEBEN C, DESCHOOLMEESTER V, et al. Better to be alone than in bad company: the antagonistic effect of cisplatin and crizotinib combination therapy in non-small cell lung cancer[J]. World J Clin Oncol, 2016, 7(6): 425-432.
- [8] TSENG C Y, LIN C H, WU L Y, et al. Potential combinational anti-cancer therapy in non-small cell lung cancer with traditional Chinese medicine Sun-Bai-Pi extract and cisplatin[J]. PLoS One, 2016, 11(5): e0155469.
- [9] KANG J H, AHN M J, KIM D W, et al. Tolerability and outcomes of first-line pemetrexed- cisplatin followed by gefitinib maintenance therapy versus gefitinib monotherapy in Korean patients with advanced nonsquamous non-small cell lung cancer: a post hoc descriptive subgroup analysis of a randomized, phase 3 trial[J]. Cancer Res Treat, 2016, 48(2): 458-464.
- [10] LIU S M, OU S Y, HUANG H H. Green tea polyphenols induce cell death in breast cancer MCF-7 cells through induction of cell cycle arrest and mitochondrial-mediated apoptosis[J]. J Zhejiang Univ Sci B, 2017, 18(2): 89-98.
- [11] KOBALKA A J, KECK R W, JANKUN J. Synergistic anticancer activity of biologicals from green and black tea on DU 145 human prostate cancer cells[J]. Cent Eur J Immunol, 2015, 40(1): 1-4.
- [12] ZHANG Y, WANG X, HAN L, et al. Green tea polyphenol EGCG reverse cisplatin resistance of A549/DDP cell line through candidate genes demethylation[J]. Biomed Pharmacother, 2015, 69(2): 285-290.
- [13] MOTAWI T M, BUSTANJI Y, EL-MARAGHY S, et al. Evaluation of naproxen and cromolyn activities against cancer cells viability, proliferation, apoptosis, p53 and gene expression of survivin and caspase-3[J]. J Enzyme Inhib Med Chem, 2014, 29(2): 153-161.
- [14] LU W, LU T, WEI X. Downregulation of DNMT3a expression increases miR-182-induced apoptosis of ovarian cancer through caspase-3 and caspase-9-mediated apoptosis and DNA damage response[J]. Oncol Rep, 2016, 36(6): 3597-3604.
- [15] BI X, WANG P, MA Q, et al. Anti-inflammatory activities and liver protection of alisol F and 25-anhydroalisol F through the inhibition of MAPK, STAT3, and NF- κ B activation in vitro and in vivo[J]. Molecules, 2017, 22(6): E951.
- [16] KONG L R, CHUA K N, SIM W J, et al. MEK inhibition overcomes cisplatin resistance conferred by SOS/MAPK pathway activation in squamous cell carcinoma[J]. Mol Cancer Ther, 2015, 14(7): 1750-1760.
- [17] YAO W, YUE P, ZHANG G, et al. Enhancing therapeutic efficacy of the MEK inhibitor, MEK162, by blocking autophagy or inhibiting PI3K/Akt signaling in human lung cancer cells[J]. Cancer Lett, 2015, 364(1): 70-78.
- [18] ZHANG L, HUO X, LIAO Y, et al. Zeylenone, a naturally occurring cyclohexene oxide, inhibits proliferation and induces apoptosis in cervical carcinoma cells via PI3K/AKT/mTOR and MAPK/ERK pathways[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 1669.
- [19] HONG S Y, YU F X, LUO Y, et al. Oncogenic activation of the PI3K/Akt pathway promotes cellular glucose uptake by downregulating the expression of thioredoxin-interacting protein[J]. Cell Signal, 2016, 28(5): 377-383.

(张西倩 编辑)