

· 论 著 ·

茶多酚对 ACC-M 细胞株 Fas、FasL 表达的影响*

李 萍, 杨志刚, 文国容, 魏 丹, 宋 琦[△]

(遵义医学院附属口腔医院, 贵州 563003)

摘要:目的 体外观察茶多酚对肺高转移性腺样囊性癌细胞株(ACC-M)生长、Fas 及其配体 FasL 表达的影响。方法 (1) 采用 MTT 比色实验法观察茶多酚对 ACC-M 细胞增殖的影响;(2)用免疫组化(SP 法)检测不同浓度茶多酚对 ACC-M 细胞中 Fas 及其配体 FasL 表达的影响。**结果** (1)茶多酚对 ACC-M 细胞增殖抑制作用明显,差异有统计学意义($P < 0.05$);(2)细胞免疫组化结果显示,加入不同浓度茶多酚后,Fas 蛋白在 ACC-M 细胞中表达增高,差异有统计学意义($P < 0.05$),FasL 表达降低,差异有统计学意义($P < 0.05$),且随浓度增加更为明显。**结论** 茶多酚可影响 ACC-M 细胞中 Fas、FasL 表达,茶多酚具有抑制 ACC-M 细胞生长的作用可能与此有关。

关键词:茶多酚;肺高转移性腺样囊性癌细胞株;Fas/FasL;MTT 法;免疫组化

中图分类号:R734.2;R730.2

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2010)03-0268-02

Effect of tea polyphenols on ACC-M cell Fas/FasL expression*

LI Ping, YANG Zhi-gang, WEN Guo-rong, et al.

(Affiliated Stomatological Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi 563003, China)

Abstract: Objective To observe the influence of polyphenols(TP) on the proliferation and analyze the expression of Fas/FasL protein of adenoid cystic carcinoma of salivary gland cell(ACC-M) in vitro. **Methods** (1)The influence of TP on the proliferation of ACC-M was measured by MTT. (2)The expression of Fas/FasL protein by streptavidin peroxidase method, and quantified measured by image analysis systems. **Results** (1)The more and longer use of TP on ACC-M, the higher restrain rate on the proliferation of ACC-M was observed($P < 0.05$). (2)The expression of Fas increased but FasL declined after stimulated by TP by immunocytochemistry. It became distinct with the increase of TP concentration. **Conclusion** TP can inhibit the proliferation of ACC-M in vitro, and the mechanism has a correlation with induction of the expression of Fas, and down-regulation of the expression of FasL.

Key words: TP;ACC-M;Fas/FasL;MTT;ICC

茶多酚是茶叶最主要组成成分,也是茶叶的主要活性成分,具有抗氧化、抗炎、抗病毒、清除自由基、抗肿瘤等多种生物学活性和药理功能。茶多酚抗肿瘤作用的机制多集中于胃癌、大肠癌、肝癌的研究,对口腔肿瘤的研究较少,特别是茶多酚对具有明显侵袭性的口腔腺样囊性癌生长的研究少见。Fas 属于肿瘤坏死因子及神经生长因子受体家族成员,是细胞凋亡信号受体,与其配体 FasL 结合,在肿瘤凋亡及肿瘤免疫方面起重要作用。本文采用体外试验研究茶多酚对肺高转移性腺样囊性癌细胞株(adenoid cystic carcinoma cell clones highly metastatic to the lung, ACC-M)生长以及 Fas 及其配体 FasL 表达的影响。

1 材料与方 法

1.1 药品与试剂 ACC-M(中科院上海细胞库),RPMI1640 培养液(Sigma,美国),鼠抗人 Fas、FasL、S-P 染色试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司),MTT 试剂(北京华美生物工程公司),全自动酶标检测仪(BIO-TEK,美国)等。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 ACC-M 复苏后于 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养液、5%CO₂ 饱和湿度、恒温 37℃ 条件下培养,按 1:3 细胞比例传代,选择对数生长期细胞进行试验。

1.2.2 茶多酚对 ACC-M 生长的影响(MTT 法) 将对数期细胞调整至 5×10^4 个,接种于 96 孔板,5%CO₂、37℃、孵育

24h,细胞单层铺满孔底,加入 0.00、0.05、0.1、0.15、0.2g/L 浓度茶多酚,5%CO₂、37℃ 培养,分别于 24、48、72h 时间段观察细胞形态,并弃上清液,加入 0.5%MTT 20μL,培养 4h,加入 150μL 二甲亚砜(DMSO),用酶联免疫检测仪(测定波长 490nm)测定各孔吸光度值(optical density, OD 值),记录结果。细胞增殖抑制率(%)=(1-实验组平均 OD 值/对照组平均 OD 值)×100%。

1.2.3 免疫组化(SP 法) 将对数期生长的 ACC-M 细胞胰酶消化,制成细胞悬液,以每孔约 5×10^4 个细胞接种于 6 孔板内盖玻片上,在 5%CO₂ 饱和湿度、恒温 37℃ 培养箱中培养 24h 后加入 0.00、0.05、0.1、0.15、0.2g/L 浓度茶多酚。用 PBS 液冲洗,4%多聚甲醛室温固定,操作方法严格按照 SP 试剂盒说明进行。鼠抗人 Fas 浓度为 1:40,鼠抗人 FasL 浓度为 1:100。

1.2.4 判定标准 阳性细胞必须具备:(1)细胞结构清晰;(2)阳性棕黄色颗粒定位于细胞膜或细胞浆;(3)着色明显高于背景;(4)采用 PBS 代替一抗为空白对照组。用 Image-proplus 6.0 图像分析软件进行图像分析,计算平均 OD,然后求视野平均值作为该标本的表达量。

1.3 统计学方法 采用 SPSS13.0 统计软件进行数据分析,实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异比较采用 ANOVA 单因素方差分析检验法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

* 基金项目:贵州省卫生厅资助项目(黔卫发 2007-119)。△ 通讯作者。

表 1 不同浓度茶多酚对 ACC-M 细胞作用后 OD 值及抑制率比较($\bar{x} \pm s$)

浓度(g/L)	24h		48h		72h	
	OD 值	抑制率(%)	OD 值	抑制率(%)	OD 值	抑制率(%)
0.00	0.441±0.024	—	0.586±0.095	—	0.654±0.028	—
0.05	0.369±0.032	16.5	0.474±0.007*#	19.1	0.519±0.014*#	20.6
0.10	0.351±0.019	20.5	0.343±0.032*#	40.8	0.337±0.021*#	48.1
0.15	0.332±0.170*	24.9	0.249±0.114*#	57.5	0.231±0.072*#	64.7
0.20	0.316±0.038*	28.3	0.229±0.008*#	60.9	0.217±0.010*#	66.8

*:与同期对照组比较, $P < 0.05$; #:与 24h 同浓度组比较, $P < 0.05$ 。—:表示无此项。

2 结 果

2.1 细胞形态 未经茶多酚处理的 ACC-M 细胞融合致密成单层,呈鹅卵石样镶嵌排列,细胞间连接紧密,细胞呈多边形,界清,胞浆丰富,并可见多个处于分裂相的细胞。经不同浓度茶多酚处理后,细胞呈不规则状,细胞间隙增大,细胞数量、分裂相细胞数目减少,细胞内空泡形成,尤以 0.2g/L 茶多酚处理 72h 后明显。

2.2 细胞抑制率 茶多酚对 ACC-M 细胞生长抑制随浓度增加,抑制作用逐渐明显,差异有统计学意义($P < 0.05$),同时随茶多酚作用时间逐渐延长,抑制细胞生长亦越明显,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

2.3 Fas、FasI 在 ACC-M 细胞的表达 对照组 Fas 蛋白在 ACC-M 细胞胞浆中微弱甚至无阳性染色;经不同浓度茶多酚作用后 ACC-M 细胞胞浆可见棕黄色颗粒,弥漫分布于胞浆沿核膜周边,0.05、0.1、0.15、0.2g/L 茶多酚作用组表达明显高于对照组,差异有统计学意义,见插页 I 彩图 4。对照组 FasI 蛋白在 ACC-M 细胞胞膜、胞浆中有明显棕黄色染色,其细胞形态正常;经不同浓度茶多酚作用后 ACC-M 细胞在胞膜、胞浆内仍可见阳性表达,但数量明显减少,且阳性程度减弱,0.05、0.1、0.15、0.2g/L 茶多酚作用组明显低于对照组,差异有统计学意义,见插页 I 彩图 5。

3 讨 论

茶多酚是茶叶的主要活性成分,由茶叶提取物儿茶素、黄酮类、酚酸类、花色素等 30 多种物质组成,具有抗氧化、抗炎、抗病毒、清除自由基、抗肿瘤等多种生物学活性和药理功能,茶多酚对多种肿瘤生长具有明显抑制作用,不仅可抑制肿瘤形成,还可以减少已形成肿瘤的数量、大小。Hwang 等^[1]发现茶多酚主要活性成分——没食子儿茶素、没食子酸酯可通过抑制 COX-2 表达、诱导细胞凋亡、调节细胞周期调节蛋白表达等多个途径发挥抗大肠癌作用。韩丽娟^[2]的实验证明没食子儿茶素、没食子酸酯可抑制人卵巢癌 COC1 细胞株增殖,延长细胞增殖周期,诱导细胞凋亡。杜春华等^[3]发现茶多酚使人肺癌细胞株 SPC-AI 细胞周期阻滞于 G₀ 期,抑制肺癌细胞增殖。本实验结果显示在茶多酚作用后 ACC-M 细胞形态、数量发生改变,细胞数量减少,细胞间隙增大,分裂相细胞数目减少,细胞内空泡形成。同时,各时间段实验组与对照组比较,增殖活性明显下降,差异有统计学意义($P < 0.05$);而在同一浓度的茶多酚作用下,随着时间延长,ACC-M 细胞增殖能力也逐渐下降,72h 组较 24、48h 组的 ACC-M 细胞存活率明显下降,差异有统计学意义($P < 0.05$)。表明 0.05~0.2g/L 茶多酚可抑制 ACC-M 细胞增殖,并有明显量效和时效依赖关系。茶多酚主

要可能通过以下几种方式抑制肿瘤生长:(1)抑制肿瘤细胞 DNA 复制,一方面茶多酚通过影响修复系统促进 DNA 损伤的修复,并通过与 DNA 聚合酶相互作用而增加 DNA 复制的准确性;另一方面还可以通过抑制 DNA 拓扑异构酶和抑制与 DNA 合成有关的酶与 DNA 结合而抑制肿瘤细胞 DNA 复制,从而抑制肿瘤生长。(2)阻滞肿瘤细胞进入细胞周期,茶多酚可使肿瘤细胞分裂相明显减少,细胞增殖受到抑制,生存率下降;S 期细胞明显减少,G₀/G₁ 细胞所占比率增加,细胞出现 G₁/S 阻滞。

Fas 系统在细胞凋亡的信号转导过程中具有重要作用,Fas 属 I 型跨膜蛋白,是肿瘤坏死因子超家族成员,当膜表面 Fas 蛋白与其配体 FasI 结合后,导致 Fas 空间构象改变,引起死亡诱导信号复合体形成,进而激活 caspase-8,启动蛋白级联反应,诱导携带 Fas 细胞凋亡,这是细胞凋亡的主要途径之一^[4]。本研究发现随着茶多酚浓度增加,ACC-M 细胞中 Fas 蛋白表达逐渐增多,明显高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),并且 Fas 蛋白表达随着茶多酚浓度递增而逐渐增强;同时不同浓度茶多酚作用后,ACC-M 细胞中 FasI 蛋白表达低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),并且 FasI 蛋白表达随着茶多酚浓度递增而逐渐降低,尤其是胞浆中表达明显减少。说明茶多酚引起 ACC-M 细胞凋亡的机制可能与 Fas/FasI 途径有关,可能是通过上调 Fas,下降 FasI,启动 Fas/FasI 介导的细胞凋亡通路。肿瘤细胞表达 FasI 蛋白还可诱导其周围 Fas 阳性表达的淋巴细胞与之结合,导致肿瘤内淋巴细胞凋亡,得以逃避免疫系统的监视和攻击,肿瘤细胞凋亡受到抑制^[5]。同时,作者认为茶多酚还可使 ACC-M 肿瘤细胞 Fas 表达增高,FasI 表达降低,使肿瘤周围 FasI 阳性表达的淋巴细胞与之结合,启动机体免疫系统的监视和攻击,促进肿瘤细胞凋亡。

但茶多酚并不能完全抑制 ACC-M 细胞活力,即使茶多酚浓度达到 0.2g/L,细胞仍有部分存活,这可能是因为在 ACC-M 细胞中除 Fas/FasI 凋亡途径外,还可能存在其他信号转导途径,这是一个复杂的信号网络系统^[6]。因此茶多酚抗肿瘤作用的分子机制与其他信号通路之间的关系还需进一步研究。

参考文献:

[1] Hwang JT, Ha J, Park IJ, et al. Apoptotic effect of EGCG in HT-29 colon cancer cells via AMPK signal pathway [J]. Cancer Lett, 2007, 247(1):115.
 [2] 韩丽娟. 表没食子儿茶素没食子酸酯抑制人卵巢癌 CoCl 细胞生长[J]. 长治医学院学报, 2008, 22(5):333.
 [3] 杜春华, 成炜, 胡晓玲, 等. 茶多酚对肺癌(下转第 272 页)

型糖尿病标准。

糖尿病心肌病变主要以微血管病变为主,其发病机制目前仍不十分清楚,可能与心肌细胞能量代谢紊乱、细胞功能改变、凋亡增加、细胞因子的异常表达有关。心肌细胞内葡萄糖的摄取及氧化障碍导致脂肪酸氧化增加,其代谢产物积聚引起细胞内酶系统活性抑制。由于长期代谢紊乱,血液动力学、血液流变学等方面的改变引起心肌微血管病变。心肌微血管管壁增厚,管腔狭窄,心肌可发生广泛的缺血、变性、坏死和纤维化等。本研究结果显示毛细血管基底膜增厚、管腔狭窄、心肌细胞肿胀均是心肌细胞代谢障碍的结果,与文献报道一致^[5]。

近年来 HGF 对心血管的保护作用已倍受关注。HGF 在肝脏大量合成,并分泌入血液循环中。HGF 在许多靶器官包括心脏和血管中具有多种生物学作用,能促进细胞分裂、迁移以及形态的发生,是形成、维持及重塑多细胞组织结构的重要血管营养因子。本研究结果显示替米沙坦增加心肌中 HGF 表达,这与 Nakano 等^[6]研究发现利用血管紧张素转化酶抑制剂和血管紧张素 II (Ang II) 受体-1 阻断剂治疗 6 周后,心脏、血管局部 HGF 含量明显上升的结果一致。

替米沙坦是一种新型的 AT1 受体拮抗剂,其对心肌微血管结构的保护作用可能与下列机制有关:(1)选择性激动 PPAR γ 。有研究表明替米沙坦能在治疗剂量下选择性激动 PPAR γ ^[7]。当 PPAR γ 被激活后脂联素(APN)表达则明显增加;同时血管紧张素受体阻滞剂(ARBs)还能抑制细胞内 APN 降解,使 APN 含量增加,从而起到调节代谢、改善胰岛素抵抗、增加胰岛素敏感性的作用,减少由于代谢紊乱对心肌结构的损害。同时发现可以通过 PPAR γ 途径下调 AT1 表达,进一步对心肌起保护作用^[8]。(2)升高心肌中 HGF 表达。有研究显示 AT1 受体拮抗剂可降低心肌局部 Ag II 表达^[9],而 Ag II 为 HGF 抑制剂,从而升高心肌中 HGF 表达。本研究结果显示替米沙坦升高心肌中 HGF 表达,与文献报道一致^[10]。HGF 通过抗凋亡、促血管新生、修复内皮细胞等对心肌具有保护作用。其机制可能与 HGF 负向调节转化生长因子- β_1 (TGF- β_1) 和 Ag II 有关。总之,替米沙坦能够改善糖尿病心肌超微结构,可能与升高心肌中 HGF 表达有关。进一步研究如何升高心肌中 HGF 表达将成为治疗糖尿病心肌病变的新思路。

参考文献:

[1] Hamby RI, Zoneraich S, Sherman L. Diabetic cardiomyop-

athy[J]. JAMA, 1974, 229 (13): 1749.

- [2] 王晓梅, 金涛, 俞淑静. 氯沙坦对糖尿病性心肌病患者的干预研究[J]. 山东医药, 2008, 48(10): 33.
- [3] 招少枫, 江钟立, 王磊. 饮食和运动干预对 2 型糖尿病大鼠心肌 Bcl-2 和 Bax 表达的影响[J]. 中国康复医学杂志, 2006, 21(5): 393.
- [4] 杨瑞馥, 宋亚军. 微生物法医学: 理论与技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 65.
- [5] Schneider R, Welt K, Aust W, et al. Cardiac ischemia and reperfusion in spontaneously diabetic rats with and without application of EGb 761: II. Interstitium and microvasculature[J]. Histol Histopathol, 2009, 24(5): 587.
- [6] Nakano N, Moriguchi A, Morishita R, et al. Role of angiotensin II in the regulation of a novel vascular modulator, hepatocyte growth factor (HGF), in experimental hypertensive rats[J]. Hypertension, 1997, 30(6): 1448.
- [7] Deuosa G, Ragonesi PD, Mugellini A, et al. Effect of telmisartan compared with eprosartan on blood pressure control, glucose metabolism and lipid profile in hypertensive, type 2 diabetic patients: a randomized, double-blind, placebo-controlled 12-month study[J]. Hypertens Res, 2004, 27: 457.
- [8] Zhao SM, Shen LH, Li HW, et al. Down-regulation of the expression of angiotensin II type 1 receptor in neonatal rat cardiac fibroblast by activation of PPARgamma signal pathway[J]. Physiol, 2008, 51(6): 357.
- [9] 张萍, 何国祥, 迟路湘, 等. Irbesartan 和培哚普利对压力超负荷大鼠循环与心脏组织 RAS 的影响[J]. 重庆医学, 2000, 29(4): 306.
- [10] Tomita N, Yamasaki K, Izawa K, et al. Improvement of organ damage by a non-depressor dose of imidapril in diabetic spontaneously hypertensive rats[J]. Int J Mol Med, 2007, 19(4): 571.

(收稿日期: 2009-07-10 修回日期: 2009-08-15)

(上接第 269 页)

- SPC A1 细胞增殖的影响[J]. 山东医药, 2007, 47(31): 1.
- [4] Baskin-Bey ES, Gores GJ. Caspase-8, death-receptor signaling, and hepatocarcinogenesis: the Fas and the furious [J]. Gastroenterol, 2005, 129(5): 1790.
- [5] 徐银祥, 蒋耀光, 林一丹, 等. 非小细胞肺癌 fas 异常表达与肿瘤浸润性淋巴细胞凋亡的关系[J]. 重庆医学, 2007, 36(5): 441.

- [6] Yu C, Friday BB, Lai JP, et al. Cytotoxic synergy between the multikinase inhibitor sorafenib and the proteasome inhibitor bortezomib in vitro: induction of apoptosis through Akt and c-Jun NH2-terminal kinase pathways [J]. Mol Cancer Ther, 2006, 5(9): 2378.

(收稿日期: 2009-06-19 修回日期: 2009-08-07)