

· 论 著 ·

茶多酚对 ACC-M 细胞 Fas/FasL、PCNA 表达的影响*

李 萍, 杨志刚, 魏 丹, 宋 琦[△]
(遵义医学院附属口腔医院, 贵州 遵义 563003)

摘要:目的 体外观察不同浓度茶多酚对腺样囊性癌肺高转移细胞株(ACC-M)生长、Fas/FasL 和增殖细胞核抗原(PCNA)表达的影响。方法 (1)不同浓度茶多酚(0.05、0.1、0.15、0.2 g/L)组处理对数期生长 ACC-M 细胞;(2)用 MTT 法观察不同浓度茶多酚对 ACC-M 细胞生长的影响;(3)用免疫细胞化学法检测不同浓度茶多酚对 ACC-M 细胞中 Fas/FasL 和 PCNA 表达的影响。结果 (1)茶多酚对 ACC-M 细胞生长抑制作用明显($P < 0.05$);(2)细胞免疫组化结果显示:与未加茶多酚相比,加入茶多酚后,在 ACC-M 细胞中 Fas 蛋白表达增高($P < 0.05$)、FasL 和 PCNA 蛋白表达降低($P < 0.05$),且随着浓度的增加更为明显。结论 茶多酚可抑制 ACC-M 细胞生长,这种抑制作用可能与茶多酚促进 ACC-M 细胞中 Fas 表达和抑制 FasL、PCNA 表达有关。

关键词:茶多酚;腺样囊性癌肺高转移细胞株;Fas/FasL;增殖细胞核抗原

中图分类号:R73-361;R979.1

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2010)10-1219-03

Influence of tea polyphenols on expression of Fas/FasL and PCNA in ACC-M*

LI Ping, YANG Zhi-gang, WEI Dan, et al.

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

Abstract: Objective To observe the influence of tea polyphenols(TP) on the growth and to analyze the expression of Fas/FasL and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) of adenoid cystic carcinoma cell clones highly metastatic to the lung (ACC-M) in vitro. **Methods** (1)ACC-M was cultured to exponential phase of growth with different concentration(0.05 g/L, 0.1 g/L, 0.15 g/L, 0.2 g/L)of TP. (2)The influence of TP on the growth of ACC-M was measured by MTT. (3)The protein expression of Fas/FasL and PCNA was examined by immunohistochemical method and quantitatively analyze by immunohistochemical assay. **Results** (1)TP effectively inhibited the growth of ACC-M in a concentration-dependent manner($P < 0.05$). (2)The expression of Fas increased but FasL and PCNA declined after stimulated by TP by immunocytochemistry. It was more obvious with the increase of the concentration. **Conclusion** TP could up-regulate the expression of Fas and down-regulate the expression of FasL and PCNA, which maybe contribute to inhibit the growth of ACC-M in vitro.

Key words: TP; ACC-M; Fas/FasL; PCNA

Fas,又名 CD95 或 APO-1,属于肿瘤坏死因子受体和神经生长因子受体家族成员,当 Fas 与其配体 FasL 结合后,诱导细胞凋亡,由 Fas/FasL 介导的肿瘤细胞凋亡作用近年来逐渐受到关注。增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)是一种仅在增殖细胞中合成与表达的核蛋白,PCNA 的出现与细胞增殖周期密切相关,是反映细胞增殖活性的重要生物学指标。茶多酚(tea polyphenols, TP)是茶叶的主要活性成分,具有抗炎、抗病毒、抗肿瘤等多种生物学活性和药理功能,对其抗肿瘤作用机制研究多集中于胃癌、大肠癌、肝癌等肿瘤,对发生于口腔颌面部的肿瘤研究较少。本实验采用体外试验研究 TP 对腺样囊性癌肺高转移细胞株(adenoid cystic carcinoma cell clones highly metastatic to the lung, ACC-M)生长及对 Fas/FasL 和 NCAM 表达的影响,以探讨茶多酚对口腔颌面部 ACC-M 细胞株生长的影响及其作用机制,为拓展茶多酚抗肿瘤作用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料 ACC-M 细胞株(中科院上海细胞库),RPMI1640

培养液(Sigma,美国),鼠抗人 Fas、FasL、PCNA、SP 试剂盒(北京中杉公司),TMS-1015 型倒置显微镜(Olympus,日本),图像分析软件(四川大学),茶多酚(安徽歙县茶叶有限公司,99%分析纯)。

1.2 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、37℃培养,按 1:3 细胞比例传代,选择对数期生长细胞进行试验。

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 ,接种于 96 孔板,5%CO₂、37℃孵育 24 h,分为 0.05、0.1、0.15、0.2 g/L 茶多酚 4 组和未加茶多酚组,在 24、48、72 h 时间段观察细胞形态并弃上清液,加入 0.5%MTT 20 μL,培养 4 h,加入 150 μL 二甲基亚砜(DMSO),酶联免疫检测仪(测定波长 490 nm)测定各孔的吸光密度值(optical density, OD 值),以上操作重复 3 次,取平均值计算细胞生长抑制率。细胞生长抑制率(%)=(1-实验组平均 OD 值/对照组平均 OD 值)×100%。

* 基金项目:贵州省卫生厅资助项目(黔卫发 2007-119);遵义医学院基金资助项目(F-150、229)。△ 通讯作者,电话:15985068919;E-mail:391613734@qq.com。

1.2.3 免疫细胞化学(SP)法 将对数期生长 ACC-M 细胞调整至 5×10^4 , 接种于盖玻片上, 分组同上, 培养 24 h 后, PBS 液冲洗, 4% 多聚甲醛固定, 按照 SP 试剂盒说明书进行免疫细胞化学实验。Fas 工作浓度为 1:40, FasL 为 1:100, PCNA 为 1:50。设对照组。

1.2.4 判定标准 阳性细胞必须具备:(1)细胞结构清晰;(2)细胞内出现阳性棕黄色颗粒;(3)着色明显高于背景。用图像分析软件进行图像分析。

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

2 结果

2.1 细胞形态观察 未加茶多酚组, ACC-M 细胞排列致密呈鹅卵石样, 细胞异型性明显, 有丝分裂相较多甚至可见异常核分裂; 经不同浓度茶多酚作用后, ACC-M 细胞逐渐失去贴壁形态, 细胞皱缩, 胞体变小呈圆形, 细胞间隙逐渐增大, 分裂相细胞数目减少, 尤以 0.2 g/L 茶多酚作用 72 h 变化最明显, 有较明显药物剂量和时间依赖性。

2.2 茶多酚对 ACC-M 生长的影响(MTT 法) 经不同浓度茶多酚作用 24、48、72 h 后对 ACC-M 细胞生长影响(图 1), 茶多酚对 ACC-M 细胞生长抑制随着浓度增加, 抑制作用逐渐明显, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 同时, 随着茶多酚作用逐渐延长, 其抑制细胞生长亦明显, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。

表 1 茶多酚对 Fas、FasL、PCNA 表达的影响($\bar{x} \pm s$)

浓度(g/L)	样本量	Fas 阳性值	FasL 阳性值	PCNA 阳性值
0	6	0.156 ± 0.015	0.408 ± 0.024	0.456 ± 0.016
0.05	6	0.174 ± 0.043*	0.387 ± 0.003*	0.431 ± 0.004*
0.10	6	0.184 ± 0.003*	0.361 ± 0.011*	0.413 ± 0.008*
0.15	6	0.198 ± 0.010*	0.327 ± 0.007*	0.386 ± 0.007*
0.20	6	0.222 ± 0.009*	0.285 ± 0.035*	0.359 ± 0.014*

*: 与未加茶多酚组相比较, $P < 0.05$ 。

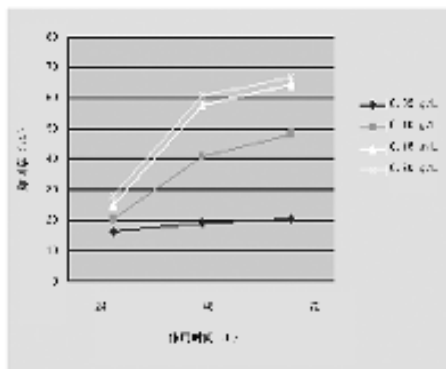


图 1 茶多酚作用后 ACC-M 细胞的抑制率

2.3 Fas、FasL、PCNA 在 ACC-M 细胞的表达 未加茶多酚组, Fas 蛋白在 ACC-M 细胞胞浆呈弱阳性或阴性表达, FasL 蛋白和 PCNA 蛋白呈明显阳性染色。经不同浓度茶多酚作用后, ACC-M 细胞中 Fas 蛋白表达逐渐增强(图 2), FasL 蛋白和 PCNA 蛋白阳性表达逐渐减弱(图 3、4)。图像分析结果见表 1。

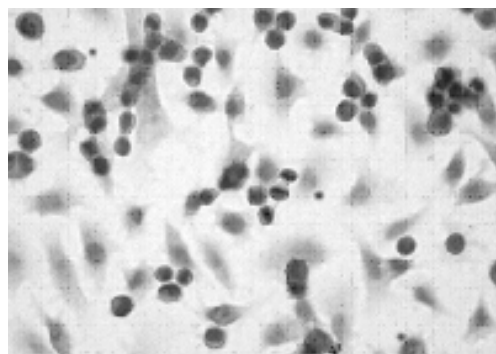


图 2 0.1 g/L 茶多酚 Fas 表达(SP × 400)

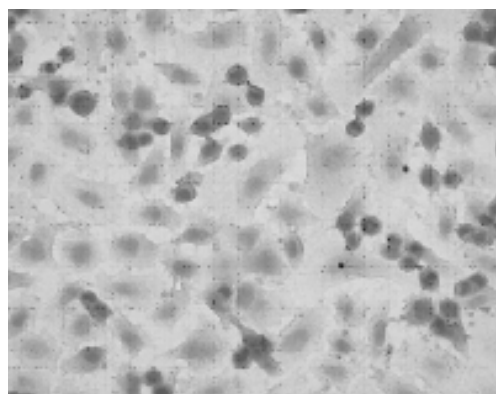


图 3 0.1 g/L 茶多酚 FasL 表达(SP × 400)

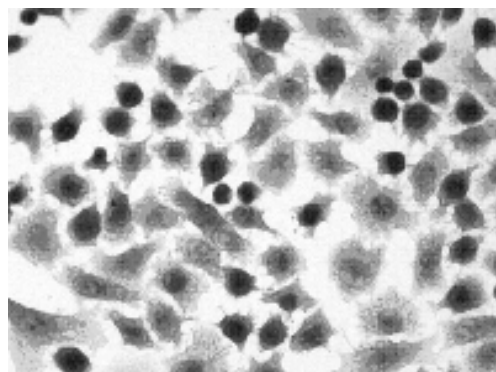


图 4 0.1 g/L 茶多酚 PCNA 表达(SP × 400)

3 讨论

细胞增殖和凋亡之间的动态平衡是维持组织和机体自身稳定的基础。肿瘤的发生是一个多因素、多步骤、多阶段作用的复杂过程, 细胞增殖活跃(和)凋亡受阻, 导致细胞异常增殖, 是肿瘤发生的重要机制之一。腺样囊性癌是口腔颌面部常见的恶性肿瘤, 约占涎腺恶性肿瘤的 24%, 早期易侵袭发病部位血管和神经, 造成血行转移, 是口腔颌面部恶性肿瘤中转移率最高的肿瘤之一^[1]。因此, 研究腺样囊性癌细胞增殖和凋亡, 有助于了解该肿瘤的特异性, 为提高腺样囊性癌诊疗水平提供基础理论依据。

茶多酚是茶叶中多酚类物质的总称, 包含儿茶素、黄酮类、酚酸类、花色素等多种物质, 具有广泛的生物学效应, 如抗氧化、抗炎、抗病毒、清除自由基、抗肿瘤等作用。其抗肿瘤作用机制多集中在对胃癌、大肠癌、肝癌、前列腺等肿瘤增殖和凋亡的研究, 而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报道。

Fas 属于肿瘤坏死因子受体和神经生长因子受体家族成员,当细胞表面 Fas 和其天然受体 FasL 结合形成复合物启动细胞凋亡信号传导系统,凋亡信号通过胞质信号蛋白传导至细胞凋亡执行者 caspase,对其特异性底物进行降解,最终导致细胞 DNA 分裂,造成细胞凋亡^[2]。黄述斌等^[3]发现: Fas、FasL 在胃癌及非典型增生组织中的表达显著高于正常胃黏膜,认为 Fas、FasL 的异常表达可能是胃黏膜癌变过程中细胞凋亡抑制的重要机制之一,并与胃癌的免疫逃逸有关。Gillenwater 等^[4]发现 SAHA(一种组蛋白去乙酰化酶抑制剂)可通过上调 Fas 表达、下调 FasL 表达激活头颈部鳞状细胞癌的凋亡从而发挥抗癌作用。既往研究表明,茶多酚可诱导肝癌、甲状腺癌、卵巢癌等多种恶性肿瘤凋亡,对 ACC-M 细胞的作用尚未见报道。夏燕萍和喻茂华^[5]采用流式细胞仪和电镜观察到茶多酚有诱导人甲状腺乳头状癌细胞凋亡的作用,Hwang 等^[6]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。本实验显示,随着茶多酚浓度增加,ACC-M 贴壁细胞逐渐减少,体积变小,部分细胞变形、核固缩,增殖细胞数量逐渐减少,显示茶多酚可抑制 ACC-M 细胞生长;同时,随着茶多酚浓度增加,ACC-M 细胞中 Fas 蛋白表达逐渐增多,FasL 蛋白表达逐渐降低,提示茶多酚可能是通过上调 Fas、下调 FasL 蛋白启动 Fas/FasL 介导的细胞凋亡通路,促进 ACC-M 细胞凋亡,从而抑制 ACC-M 细胞生长。

PCNA,又叫周期蛋白,是一种仅在增殖细胞中合成与表达的核蛋白,PCNA 表达水平直接与细胞增生和 DNA 合成有关,是反映细胞增殖活性的重要生物学指标。一般而言,PCNA 表达越高,意味着处于增殖 S 期的细胞越多。大量研究证明,PCNA 在多种恶性肿瘤如肿瘤性淋巴结转移^[7]、口腔鳞状细胞癌^[8]、胰腺癌^[9]、乳腺癌^[10]中表达水平升高,其增高水平与肿瘤细胞的恶性程度有关,还可作为组织癌变的一个标记物。因此用免疫组化检查肿瘤细胞 PCNA 指数,已成为临床判断肿瘤细胞增殖和恶性程度的常用指标。本实验中,随着茶多酚浓度增加,ACC-M 细胞数量逐渐减少,说明茶多酚可抑制 ACC-M 细胞生长,这与姚华等^[11]研究相一致。同时,随着茶多酚的作用,ACC-M 中 PCNA 表达逐渐降低,表明茶多酚可抑制 ACC-M 细胞内 PCNA 表达,PCNA 表达减少意味着 ACC-M 细胞的增殖活性逐渐降低,表明茶多酚可通过抑制 ACC-M 细胞增殖而抑制 ACC-M 生长。

本实验研究显示,茶多酚能够抑制 ACC-M 生长,为了解其作用机制,检测了 ACC-M 中 Fas、FasL、PCNA 表达水平的变化,随着茶多酚浓度的增加,茶多酚抑制 ACC-M 生长作用逐渐增强,同时 Fas 表达增强,FasL、PCNA 表达降低,提示茶

多酚能够抑制 ACC-M 生长与促进 ACC-M 细胞中凋亡和抑制增殖有关。

参考文献:

- [1] 张震康,俞光岩. 口腔颌面外科学[M]. 北京:北京大学出版社,2007:388.
- [2] 张柏林. Fas 及 Fas 配体基因多态性与肿瘤发生风险的关系[J]. 中华乳腺病杂志(电子版),2009,3(3):338.
- [3] 黄述斌,刘振虹,金小平,等. Fas 及 FasL 在胃癌组织非典型增生组织和正常胃黏膜中表达研究[J]. 河北医学,2008,14(8):886.
- [4] Gillenwater AM, Zhong ML, Lotan R. Histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid induces apoptosis through both mitochondrial and Fas (Cd95) signaling in head and neck squamous carcinoma cells[J]. Mol Cancer Ther,2007,6:2967.
- [5] 夏燕萍,俞茂华. 茶多酚诱导人甲状腺乳头状癌细胞凋亡作用的研究[J]. 中国现代医学杂志,2004,14(22):43.
- [6] 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.
- [7] 肖一平,王珊,胡陶,等. PCNA、Ki-67 及 VEGF 在淋巴结肿大疾病中表达差异的临床价值[J]. 重庆医学,2009,38(14):1800.
- [8] 高黎,王国芳,季旭东,等. 口腔黏膜白斑及鳞癌组织中核因子- κ B p65 与 PCNA 的表达[J]. 郑州大学学报(医学版),2009,44(3):582.
- [9] Mäkinen K, Sami L, Tapio H, et al. Tumour suppressor protein (p53), apoptosis inhibiting protein (Bcl-2) and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expressions in a rat pancreatic tumour model[J]. Anticancer Res,2007,27:23.
- [10] Malkas LH, Herbert BS, Abdel-Aziz W, et al. A cancer-associated PCNA expressed in breast cancer has implications as a potential biomarker[J]. PNAS,2006,103(51):19472.
- [11] 姚华,王慧明,吴求亮,等. 茶多酚对舌鳞状细胞癌细胞增殖和端粒酶催化亚基的抑制作用[J]. 中华口腔医学杂志,2005,40(6):451.

(收稿日期:2009-12-25)

启事:本刊对院士及 863、973 项目文章开通绿色通道,欢迎投稿。