

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.29.017

茶多酚对人鼻咽癌细胞裸鼠移植瘤的生长抑制作用*

田梦秋^{1,2},袁东杰¹,郑实兴¹,李庆玉¹,石书婧¹,徐志文^{1△}

(1. 广西医科大学第一附属医院耳鼻喉-头颈外科,广西南宁 530021;

2. 南华大学附属南华医院耳鼻喉科,湖南衡阳 421002)

[摘要] **目的** 通过观察茶多酚在体内对人鼻咽癌细胞的抑制作用,探讨其可能的抗癌机制。**方法** 以人鼻咽癌细胞株 HONE1 建立裸鼠皮下移植瘤模型,以茶多酚腹腔注射干预,在观察抑瘤率基础上,以实时荧光定量 PCR 及 Western blot 法分别检测裸鼠移植瘤 VEGF 在 mRNA 及蛋白水平上的表达变化。**结果** 茶多酚具有显著抑制鼻咽癌细胞 HONE1 移植瘤生长的作用,与模型对照组相比,低、高剂量茶多酚组体内抑瘤率分别为 18.82%、47.66%,呈浓度相关性($P < 0.05$);荧光定量 PCR 及 Western blot 结果显示,茶多酚可下调 VEGF 的 mRNA 和蛋白表达水平,且呈浓度依赖性,其中高剂量组变化明显,差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 茶多酚对人鼻咽癌 HONE1 细胞裸鼠移植瘤的生长具有明显抑制作用,机制可能与调节 VEGF 表达,从而抑制肿瘤血管生成等作用有关。

[关键词] 鼻咽肿瘤;小鼠,裸;茶多酚;血管生成**[中图分类号]** R739.63**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2015)29-4080-03

Inhibitive effect of tea polyphenol on the growth of human nasopharyngeal carcinoma cell xenograft in nude mice*

Tian Mengqiu^{1,2}, Yuan Dongjie¹, Zheng Shixing¹, Li Qingyu¹, Shi Shujing¹, Xu Zhiwen^{1△}

(1. Department of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi 530021, China; 2. Department of Otolaryngology, the Affiliated Nanhua Hospital of Nanhua University, Hengyang, Hunan 421002, China)

[Abstract] **Objective** To evaluate the inhibitive effect of tea polyphenol on the growth of human nasopharyngeal carcinoma HONE1 cell xenograft in nude mice, and to explore the underlying mechanisms. **Methods** Tumor model was established by subcutaneous inoculation of nasopharyngeal carcinoma cell HONE1 into nude mice, was used to evaluate the antitumor effect of tea polyphenol in vivo. The expression levels of VEGF were detected by real-time PCR and western blot. **Results** The growth of xenograft in nude mice was significantly suppressed after application of tea polyphenol at a dose-dependent manner. To compare with control group, the inhibition rates were 18.82% ($P < 0.05$) and 47.66% ($P < 0.05$) when treated at low and high dose respectively. With increased concentration of TP, the inhibition rates increased. Real-time fluorescence quantitative-PCR and western blot results showed that the expression of VEGF decreased at a dose-dependent manner. The change of high dose group was obviously, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** Tea polyphenol could significantly inhibit the growth of human nasopharyngeal carcinoma HONE1 cell xenograft in nude mice, probably by down regulating the VEGF protein level to inhibit tumor angiogenesis effects.

[Key words] nasopharyngeal neoplasms; mice, nude; tea polyphenol; angiogenesis

鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma)是头颈部常见的恶性肿瘤,高发于我国湖南、广东和广西等地^[1]。98%属于低分化鳞状细胞癌,因此目前早期鼻咽癌以放射治疗为主,晚期通过高强度化疗虽然能够有效控制和杀灭肿瘤细胞,但化疗在杀伤肿瘤细胞的同时,也造成增殖活跃的正常组织干细胞的损伤,引起诸多毒副反应,5年生存率只有40%^[2],因此安全有效的药物治疗是临床迫切需要解决的问题。

研究报道,天然绿茶提取物茶多酚,已被证实有抗癌等药理作用^[3-4],对正常组织细胞没有毒性^[5],其作用通过抑制基因表达及相关酶的活性、提高机体免疫功能和诱导细胞凋亡等机制来实现^[6],目前茶多酚抑制鼻咽癌血管生成方面的研究目前还较少。肿瘤组织微血管生成是肿瘤转移的前提和基础,因此抗血管形成治疗是控制肿瘤生长非常有潜力的治疗方法。本实验旨在研究茶多酚体内抗鼻咽癌作用及其对血管生成的影

响机制。

1 材料与方

1.1 材料 人鼻咽癌细胞株 HONE1;广西医科大学耳鼻喉实验室培养。动物: BALB/C 雄性裸鼠 18 只,4~6 周龄,体重(20±2)g,广西医科大学动物实验中心饲养,动物质量合格证号: SCXK(桂)2009-0002,饲养于无特定病原体(specific pathogen free, SPF)环境中。

1.2 药物及仪器 茶多酚:黄褐色粉末,纯度 98%,购自上海源叶生物科技有限公司。RPMI1640 培养基(Hyclone 公司),小牛血清(Gibco 公司),青链霉素双抗溶液(Solarbio 公司),胰蛋白酶(Solarbio 公司),HRP 标记 GAPDH(康成公司)、兔抗 VEGF(proteintech 公司),HRP 标记山羊抗兔 IgG(联科公司),逆转录试剂盒(Roche 公司),7300 型定量 PCR 仪(ABI 公司),RIPA 裂解液(碧云天公司),Trizol(Invitrogen 公司),PCR

* 基金项目:广西医疗卫生重点科研课题(重 2012060)。 作者简介:田梦秋(1980—),硕士,主治医师,主要从事耳鼻喉头颈外科的研究。

△ 通讯作者, Tel:13977165755; E-mail: xuzhiwen3@163.com。

引物(Invitrogen 公司合成),BCA 蛋白浓度测量试剂盒(碧云天公司),SDS-聚丙烯酰胺(双螺旋公司),Tris(Sigma 公司),ECL 显影液(Thermo 公司)。

1.3 方法

1.3.1 裸鼠移植瘤模型的建立与给药 人鼻咽癌敏感细胞株 HONE1,常规体外培养,处于对数生长期时胰酶消化、离心后,用无血清的 RPMI1640 培养基制备单细胞悬液,浓度为 1×10^7 /mL,裸鼠右前腋皮下接种细胞悬液,每只 0.2 mL(无菌操作),接种后每天同一时间观察,造模成功的标准为瘤块触之质硬且长径大于 5 mm。将造模成功的 18 只裸鼠随机分为 3 组,对照组:0.1 mL/10 g 生理盐水;低剂量组:7.5 mg/kg 茶多酚;高剂量组:30.0 mg/kg 茶多酚,每组 6 只,腹腔注射给药,隔日 1 次,共 7 次。

1.3.2 移植瘤生长情况观察 隔日测量裸鼠体质量、移植瘤最长径(a)及最短径(b),按照公式 $V = a \times b^2 / 2$ 计算移植瘤体积,绘制生长曲线。末次给药第 2 天用颈椎脱臼法处死裸鼠,完整解剖出瘤块,称质量,计算抑瘤率(IR),《现代肿瘤治疗药理学》^[7]中抗肿瘤药物有效的标准为抑瘤率大于 30%, $IR(\%) = (1 - \text{治疗组平均瘤质量} / \text{对照组平均瘤质量}) \times 100\%$

1.3.3 RT-PCR 法检测 VEGF mRNA 的表达情况 根据 Trizol 法提取 3 组裸鼠瘤组织总 RNA。依照逆转录试剂盒说明书逆转录合成 cDNA,ABI7300 系统行荧光定量 PCR 扩增,设计反应体系为 20 μ L。PCR 反应所用引物序列见表 1,以 GAPDH 作为内参照。扩增结束后收集溶解曲线,以确定扩增产物的特异性。基因表达分析采用 Livak ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) 法进行, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值表示目的基因 mRNA 表达的差异倍数, $\Delta\Delta Ct = \text{实验组}(Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{\text{GAPDH}}) - \text{对照组}(Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{\text{GAPDH}})$,生理盐水组为对照组。

表 1 实时荧光定量 PCR 的引物序列

| 引物名称 | 引物序列(5'~3') | 引物长度(bp) |
|-------|----------------------------------|----------|
| GAPDH | 上游:GAC AAC TTT GGC ATC GTG GA | 133 |
| | 下游:ATG CAG GGA TGA TGT TCT GG | |
| VEGF | 上游:GTC CAA CTT CTG GGC TGT TCT | 151 |
| | 下游:CCC TCT CCT CTT CCT TCT CTT C | |

1.3.4 Western blot 法检测 VEGF 蛋白的表达差异 给药满 7 次后颈椎脱臼法处死裸鼠,剥离瘤结节,迅速称质量,取部分瘤组织 RIPA 细胞裂解液提取蛋白,BCA 法测定蛋白浓度。20 μ g 蛋白上样,8% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳跑胶分离,转 PVDF 膜,转膜时间 60 min。5%脱脂牛奶室温封闭 2h,兔抗 VEGF 抗体 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,洗膜,HRP 标记山羊抗兔 IgG 抗体室温标记 2 h,1 \times TBST 充分洗膜后,ECL 显影液显影,暗盒中压片。Image J 软件分析 Western blot 图片条带吸光度,以 GAPDH 为内参照。

1.4 统计学处理 实验数据采用 SPSS16.0 统计软件,多样本均数比较采用单因素方差分析(One-way ANNOVA),检验水准 $\alpha = 0.05$,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 茶多酚对人鼻咽癌细胞 HONE1 裸鼠移植瘤生长速度的影响 裸鼠接种人鼻咽癌细胞 HONE1 后,于第 7 天 18 只裸鼠全部达到造模标准。相对对照组,给药组(高、低剂量组)肿

瘤生长均较慢,其中高剂量组最慢,见图 1。

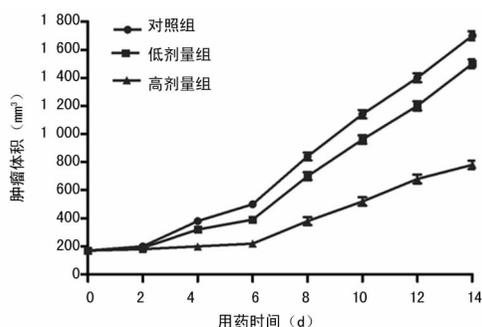


图 1 茶多酚对人鼻咽癌 HONE1 裸鼠移植瘤生长的影响

2.2 茶多酚对荷人鼻咽癌裸鼠移植瘤重量的影响 本实验结果显示:低剂量组平均抑瘤率为 18.82%,高剂量组为 47.66%,表明高剂量组茶多酚能有效抑制人鼻咽癌 HONE1 裸鼠皮下移植瘤生长,并呈浓度相关。而低剂量组抑瘤率为 18.82%,效果不明显,见表 2。

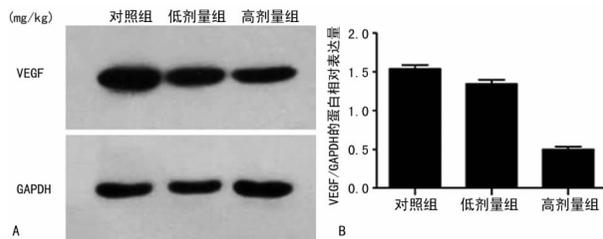
表 2 茶多酚对人鼻咽癌 HONE1 裸鼠移植的抑瘤率(n=6)

| 组别 | 瘤质量($\bar{x} \pm s$,g) | 抑瘤率(%) |
|------|--------------------------|--------|
| 对照组 | 1.312 \pm 0.133 | — |
| 低剂量组 | 1.065 \pm 0.095 | 18.82 |
| 高剂量组 | 0.687 \pm 0.059* | 47.66 |

*: $P < 0.05$,与对照组比较;—:表示无数据。

2.3 RT-PCR 法检测 VEGF mRNA 相对表达量 浓度梯度茶多酚作用裸鼠后,移植瘤内 VEGF mRNA 表达水平下调,并呈浓度相关,低剂量组为 0.78 ± 0.05 ,高剂量组为 0.32 ± 0.12 。其中高剂量组下调明显,与对照组相比差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.4 Western blot 法检测 VEGF 蛋白表达量 浓度梯度茶多酚作用裸鼠后,移植瘤内 VEGF 蛋白表达量下降。高剂量组蛋白表达量与对照组相比明显下降,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 2。



A: Western blot; B: VEGF 蛋白表达分析图。

图 2 茶多酚对人鼻咽癌 HONE1 裸鼠移植瘤 VEGF 蛋白表达量影响

3 讨论

茶多酚占茶叶干质量的 30% 左右,特别在绿茶中水平较多,具有不良反应小、普遍存在、易获取等优势。研究证实茶多酚能抗肿瘤、抗氧化等多种功能,潜藏巨大的实用价值,可发展为新型的抗肿瘤治疗药物。我国茶叶原材料丰富,因此茶多酚的抗肿瘤前景非常可观。

肿瘤的生长和转移依赖于瘤区血管丰富程度。研究发现,实体瘤生长至 1 mm^3 以上如果没有新生血管来提供氧和营养,肿瘤将停滞于休眠状态,也不发生转移^[8],因而有效抑制血

管新生,切断肿瘤血供,有望成为肿瘤靶向治疗的一个新途径^[9]。VEGF 是最重要的促血管生长因子之^[10],在血管生成过程中起关键性的调节作用^[11],可由多种肿瘤细胞分泌,是目前已知的作用最强、特异性最高的血管生长因子,其作用包括增加血管通透性、促进血管内皮增生、增强内皮细胞抗凋亡和刺激体外培养的内皮细胞的迁移等,这些作用促进了肿瘤细胞生长和新生血管的形成^[12]。

本课题组前期研究已证实茶多酚体外能明显抑制鼻咽癌细胞增殖,且抑制作用呈浓度依赖关系^[13]。本实验中,对照组裸鼠移植瘤生长迅速,而给药组肿瘤生长缓慢,高浓度组的抑瘤率为 47.66%(与对照组比较, $P < 0.05$),提示高浓度茶多酚具有抑制人鼻咽癌细胞 HONE1 荷瘤裸鼠移植瘤生长的作用。为了进一步明确茶多酚抑制鼻咽癌分子机制,本研究观察茶多酚对鼻咽癌移植瘤组织 VEGF 表达的作用,荧光定量 PCR 及 Western blot 法分别观察茶多酚作用后移植瘤 VEGF 在 mRNA 及蛋白水平上的表达变化,结果表明,与对照组比较,茶多酚可明显下调 VEGF 的 mRNA 和蛋白表达水平,呈浓度依赖性,其中高剂量组变化明显,差异有统计学意义($P < 0.05$)。由此推断,茶多酚能够抑制鼻咽癌肿瘤生成,可能通过在转录水平抑制 VEGF mRNA 表达,减少 VEGF 产物,从而抑制肿瘤血管生成等作用有关。

综上所述,本实验表明茶多酚对人鼻咽癌 HONE1 裸鼠皮下移植瘤具有显著的生长抑制作用,为茶多酚应用于鼻咽癌的临床药物治疗提供依据,有望减少鼻咽癌放化疗不良反应,改善患者生活质量。但这些功能在鼻咽癌的防治上仍未得到证明,是其今后在抗鼻咽癌研究的方向,由于目前缺乏完整的对茶多酚的毒理学研究,并且对其组成成分未能充分分离提纯,大大限制了茶多酚研究,这也是今后研究的重点方向。

参考文献

[1] Chou J, Y C Lin, J Kim, et al. Nasopharyngeal carcinoma—review of the molecular mechanisms of tumorigenesis[J]. *Head Neck*, 2008, 30(7): 946-963.

[2] Leung TW, Wong VY, Tung SY. Stereotactic radiotherapy for locally recurrent nasopharyngeal carcinoma[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2009, 75(3): 734-741.

[3] Stangl V, Dreger H, Stangl K, et al. Molecular targets of tea polyphenols in the cardiovascular system[J]. *Cardiovasc Res*, 2007, 73(2): 348-358.

[4] Mnich CD, Hoek KS, Virkki LV, et al. Green tea extract reduces induction of p53 and apoptosis in UVB-irradiated human skin independent of transcriptional controls[J]. *Exp Dermatol*, 2009, 18(1): 69-77.

[5] 王岳飞, 梁善珠, 张士康, 等. 茶多酚抗辐射剂安全毒理学研究[J]. *茶叶科学*, 2011, 31(5): 405-410.

[6] 袁东杰, 魏媛媛, 徐志文. 茶多酚抑制鼻咽癌及辐射防护作用的研究进展[J]. *临床耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2014, 28(4): 281-284.

[7] 韩军, 南克俊, 赵新汉. 抗肿瘤药物研究方法学[M]//廖子君, 南克俊, 韩军. 现代肿瘤治疗药理学. 西安: 世界图书出版西安公司, 2002: 8.

[8] Niu G, Chen X. Vascular endothelial growth factor as an anti-angiogenic target for cancer therapy[J]. *Curr Drug Targets*, 2010, 11(8): 1000-1017.

[9] Shojaei F. Anti-angiogenesis therapy in cancer: current challenges and future perspectives[J]. *Cancer Lett*, 2012, 320(2): 130-137.

[10] Kristensen TB, Knutsson ML, Wehland M, et al. Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Therapy in Breast Cancer[J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(12): 23024-23041.

[11] Hayes DF, Miller K, Sledge G. Angiogenesis as targeted breast cancer therapy[J]. *Breast*, 2007, 16 Suppl 2: S17-19.

[12] Aita M, Fasola G, Defferrari C, et al. Targeting the VEGF pathway: antiangiogenic strategies in the treatment of non-small cell lung cancer[J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2008, 68(3): 183-196.

[13] 孙文忠, 魏媛媛, 曾曼丽, 等. 海带多糖和茶多酚对鼻咽癌细胞 HONE1 和 CNE2 增殖的影响[J]. *临床耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2013, 27(8): 425-428.

(收稿日期: 2015-04-17 修回日期: 2015-06-02)

(上接第 4079 页)

early childhood wheezing [J]. *Am J Clin Nutr*, 2007, 85: 853-859.

[9] Agrawal T, Gupta GK, Agrawal DK. Vitamin D deficiency decreases the expression of VDR and prohibitin in the lungs of mice with allergic airway inflammation[J]. *Exp Mol Pathol*, 2012, 93(1): 74-81.

[10] Geldmeyer-Hilt K, Heine G, Hartmann B, et al. 1, 25-dihydroxyvitamin D₃ impairs NF- κ B activation in human naive B cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 407(4): 699-702.

[11] Chen Y, Kong J, Sun T, et al. 1, 25-dihydroxyvitamin D₃

suppresses inflammation-induced expression of plasminogen activator inhibitor-1 by blocking nuclear factor- κ B activation[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2011, 507(2): 241-247.

[12] 李飞, 高金明. 维生素 D、维生素 D 受体与支气管哮喘[J]. *中华哮喘杂志*, 2010, 4(1): 38-43.

[13] Dickie LJ, Church LD, Coulthard LR, et al. 1, 25(OH)2D3 down-regulates intra-cellular Toll-like receptor 9-induced IL-6 production in human monocytes[J]. *Rheumatology*, 2010, 49(8): 1466-1471.

(收稿日期: 2015-04-10 修回日期: 2015-08-15)