

# 茶多酚对人癌细胞和人体细胞增殖及凋亡的实验研究

谢冰芬,冯公侃,朱孝峰,李志铭,刘宗潮\*

(中山大学 肿瘤防治中心,广东 广州 510060)

**摘要:**目的 选用 4种人癌细胞和 3种人体正常细胞进行试验,比较茶多酚(TP)对人肝癌细胞 Bel-7402等和人体肝细胞 CLC增殖周期的影响和诱导凋亡的作用。方法 用 MTT法测定 TP对人癌细胞和人体正常细胞的细胞毒作用,用流式细胞仪(FCM)观察 TP对细胞的周期改变和诱导凋亡作用。结果 TP对人癌细胞 Bel-7402, CNE1, KB和 H-29的 IC<sub>50</sub>依次为 68.2, 104.63, 119.83和 148.61 μg/mL;对人体正常细胞 CLC, HEK-293和 HD-MEC的 IC<sub>50</sub>均 > 400 μg/mL。150和 300 μg/mL TP处理 Bel-7402细胞 12, 24和 36 h,细胞凋亡率分别为 13.2%, 37.6%, 40.7%和 17.1%, 39.9%, 57.7%。表明 TP可诱导 Bel-7402细胞凋亡,使细胞周期停滞于 S-G<sub>2</sub>/M期,而对 CLC细胞无此作用。结论 TP对人癌细胞的细胞毒作用显著高于对人体正常细胞的作用,提示 TP对人癌细胞有一定的选择杀伤作用。

**关键词:**茶多酚(TP);细胞增殖;人癌细胞;诱导凋亡

中图分类号: R286.91 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2003)06-0540-04

## Experimental studies of tea polyphenols on proliferation and apoptosis in human cancer cells and human normal cells

XIE Bing-fen, FENG Gong-kan, ZHU Xiao-feng, LI Zhi-ming, LIU Zong-chao

(Cancer Center, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510060, China)

**Key words** tea polyphenols (TP); cells proliferation; human cancer cells; inducing apoptosis

绿茶及其提取物如茶多酚(TP)及儿茶素(EGCG)均有防癌抗癌作用<sup>[1-3]</sup>,最近流行病学研究表明,以TP为主要活性成分的绿茶可以通过各种途径抑制肝细胞癌变<sup>[4]</sup>。绿茶具有防癌和抗癌作用,但对人体正常细胞是否有影响,目前对此方面的报道极少。为了探讨茶多酚对人癌细胞和对人体正常细胞的作用,本研究选用了4种人癌细胞和3种人体正常细胞进行生长抑制试验,同时选用了人肝癌细胞 Bel-7402和人体肝细胞(CLC)进行增殖周期的影响及诱导凋亡的试验,从而进一步了解TP对人癌细胞和人体细胞作用的差异性。

### 1 材料

1.1 受试样品及试剂:茶多酚(tea polyphenol, TP):Sigma公司产品,儿茶素含量>60%,临用前用三蒸水配制;噻唑蓝(MTT)粉:Janssen Ohimica公司产品;氢化可的松胎牛血清蛋白(FBSP)表皮生长因子(EGF),MCDB-131培养液和RPMI-1640培养基:Sigma公司产品;顺铂(DDP):国内市售产品;流式细胞仪:Coulter Elite公司产品。

1.2 细胞株:人肝癌细胞株(Bel-7402),人鼻咽癌细胞(CNE1),人口腔癌细胞(KB),人结肠癌细胞(HT-29),人肝细胞(Chang Liver cell)和人胚肾上皮细胞(HEK-293),上述细胞株均由本所传代保种,人真皮毛细血管内皮细胞(HDMEC)由美国引进。除HDMEC细胞培养于含氢化可的松和EGF的MCDB-131培养基中外,其他6种细胞均培养于含10%小牛血清的RPMI-1640培养液中,于37℃,5%CO<sub>2</sub>条件下培养。

### 2 方法

2.1 MTT法检测TP对细胞生长的抑制作用:按文献进行试验<sup>[5]</sup>,取对数生长的各种人癌细胞和人体正常细胞于96孔培养板接种 $2 \times 10^4$ 细胞/孔,培养24h后加入25~400 μg/mL 5个浓度的TP,培养72h,实验结束前4h加入MTT液(5 mg/mL)20 μL/孔,再培养4h后,弃去上清液加入DM SO 0.1 mL/孔,置酶联仪570 nm波长测吸光度(A)值,计算细胞生长抑制率,并用“Pharmacologic Calculation System <46> Litchfield & Wilcoxon 计算

\* 收稿日期: 2002-09-30

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39870886和39900183);中山医科大学“211工程”重点学科建设基金资助项目(98069)

作者简介:谢冰芬(1940-),女,广东人,中山大学肿瘤防治中心副研究员,硕士研究生导师,1966年毕业于广州中山医学院,专业为肿瘤药理和肿瘤化疗,从事抗癌药物的体内外试验,合并化疗,增效减毒及抗癌作用机制研究(包括对DNA拓扑异构酶, DNA引物酶, DNA损伤和凋亡等研究)。近年来系统地研究了绿茶多酚、番荔枝内酯、紫草萘醌类衍生物等抗癌作用及机制研究。Tel (020) 87765368-7333; Fax: (022) 87754506

算机程序求出半数抑制浓度 (IC<sub>50</sub>) 进行比较

$$\text{细胞生长抑制率 (\%)} = (1 - A_{\text{实验组}} / A_{\text{对照组}}) \times 100\%$$

2.2 流式细胞仪测定细胞周期及凋亡: 分别收集经 TP 150 和 300 μg/mL 处理 12, 24 和 36 h 的 Bel-7402 细胞和 CLC 细胞, 胰酶消化, PBS 洗涤 2 次, 70% 冷乙醇固定, 碘化丙啶 (PI) 染色, 流式细胞仪进行荧光检测各细胞周期 DNA 含量和凋亡率。

### 3 实验结果

3.1 MTT 法测定 TP 对各种细胞的细胞毒作用: 用 25~ 400 μg/mL TP 处理各种人癌细胞 (Bel-7402, CNE<sub>1</sub>, KB 和 HT-29) 72 h, 对上述 4 种人癌细胞均有不同程度的生长抑制作用, 且抑制率随 TP 浓度的增加而增加 (P < 0.05)。它们的 IC<sub>50</sub> 分别为 68.2, 104.63, 119.83 和 148.61 μg/mL。上述浓度的 TP 对 3 种人体正常细胞 (CLC, HEK-293 和 HDMEC) 处理 72 h, 它们的生长抑制率均 ≤ 38% (在最高浓度 400 μg/mL TP 对上述 3 种人体正常细胞的生长抑制率分别为 38.0%, 34.6% 和 36.9%), IC<sub>50</sub> 均 > 400 μg/mL, 见表 1 和图 1。提示 TP 对人癌细胞的生长抑制作用明显高于对人体正常细胞的作用。另抗癌药顺铂 (DDP) 不管对人癌细胞 (IC<sub>50</sub> 为 1.89~ 3.44 μg/mL) 还是对人体正常细胞 (IC<sub>50</sub> 为 2.12~ 13.59 μg/mL) 均具有强的杀伤作用, 对两种细胞没有明显的选择性。

3.2 流式细胞术 (FCM) 检测细胞凋亡: 人肝癌细胞 (Bel-7402) 用 150 μg/mL TP 处理 12, 24 和 36 h 的凋亡率分别为 13.2%, 27.6% 和 40%, 在

表 1 TP 和 DDP 对人癌细胞和人体正常细胞生长的 IC<sub>50</sub> 值 μg mL<sup>-1</sup>

Table 1 IC<sub>50</sub> value of TP and DDP on growth of human cancer cell and human normal cell μg mL<sup>-1</sup>

药物	人癌细胞				人体正常细胞		
	Bel-7402	CNE <sub>1</sub>	KB	HT-29	CLC	HEK-293	HDM EC
TP	68.20	104.63	119.83	148.61	> 400	> 400	> 400
DDP	2.12	4.16	1.89	3.44	13.59	5.32	2.12

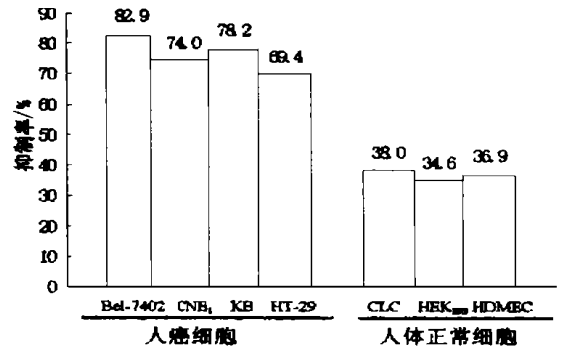
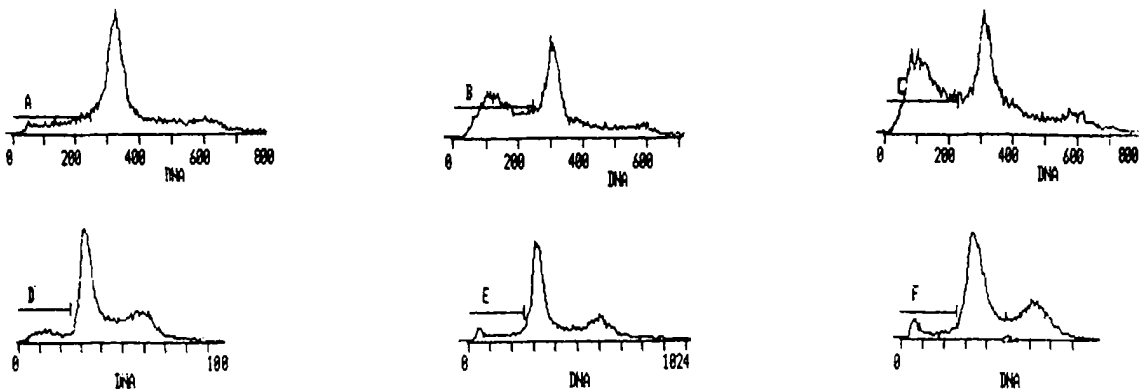


图 1 TP 400 μg/mL 对人癌细胞和人体正常细胞生长的影响

Fig. 1 Growth inhibitory effects of TP (400 μg/mL) against human cancer cell and human normal cell

DNA 含量频率直方图上可见典型的亚 G<sub>1</sub> 峰, 此峰随时间的延长而增大, 见图 2-A~ C; 用 300 μg/mL TP 处理 Bel-7402 细胞的凋亡率依次为 17.1%, 39.9% 和 57.7%。在未经 TP 处理的对照中, Bel-7402 在各时间点的凋亡率分别为 2.1%, 4.4% 和 6.3%。结果表明不同浓度的 TP 均可诱导 Bel-7402 细胞凋亡, 其凋亡率与 TP 浓度和作用时间呈依赖



A, B, C-Bel-7402 用 150 μg/mL TP 处理 12, 24 和 36 h 的凋亡峰; D, E, F-CLC 用 150 μg/mL TP 处理 12, 24 和 36 h 的凋亡峰

A, B, C-apoptosis peaks in 150 μg/mL TP treatment of Bel-7402 cells for 12, 24 and 36 h

D, E, F-apoptosis peaks in 150 μg/mL TP treatment of CLC cells for 12, 24 and 36 h

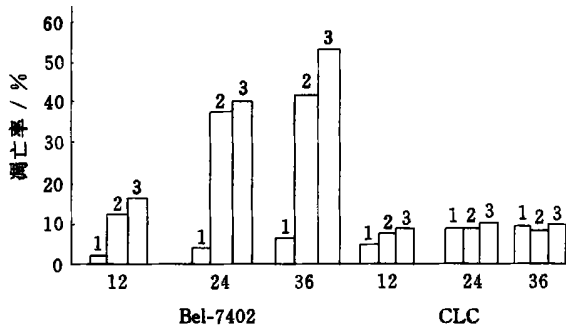
图 2 TP 诱导 Bel-7402 和 CLC 细胞的凋亡图 (FCM 检测)

Fig. 2 Chart of apoptosis of Bel-7402 and CLC cells induced by TP (FCM)

表 2 TP对 Bel-7402和 CLC细胞周期的影响  
Table 2 Effect of TP on Bel-7402 cdl and CLC cell cycle

细胞株	组别	12 h			36 h		
		G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M
Bel-7402	无药对照	49.1	47.1	9.2	61.5	34.6	3.9
	TP 300 $\mu$ g/mL	53.6	41.8	4.6	36.9	60.7	2.4
CLC	无药对照	53.4	34.2	12.4	56.5	31.2	12.3
	TP 300 $\mu$ g/mL	48.0	38.3	13.7	45.8	37.8	15.5

性,见图 3 在人体正常细胞 (CLC) 中,无药处理的细胞经培养 12, 24 和 36 h 的凋亡率分别为 4.8%, 8.9% 和 11.9%; 用 150 $\mu$ g/mL TP 处理的细胞凋亡率分别为 7.6%, 8.8% 和 10%; 用 300 $\mu$ g/mL TP 处理的细胞凋亡率分别为 8.6%, 12.4% 和 14.5%。无药对照组与其他 2 个 TP 剂量组间的凋亡率比较 (卡方检验) 无显著性差异 ( $P > 0.05$ ), 提示 150 和 300 $\mu$ g/mL 2 个浓度的 TP 对人体正常细胞无明显诱导凋亡的作用, 见图 2-D~F



1-对照 2-TP 150 $\mu$ g/mL 3-TP 300 $\mu$ g/mL

1-control 2-TP 150 $\mu$ g/mL 3-TP 300 $\mu$ g/mL

图 3 TP 诱导 Bel-7402 和 CLC 细胞的凋亡率

Fig. 3 Apoptosis rate of Bel-7402 cdl and CLC cells induced by TP

3.3 流式细胞术检测 TP 对 Bel-7402 和 CLC 两种细胞增殖周期的影响: 从表 2 可见, 300 $\mu$ g/mL TP 处理 Bel-7402 和 CLC 细胞 12 h 后, 两种细胞各周期的变化不明显, 但处理 36 h 后, 与对照组比较 Bel-7402 细胞的 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 细胞明显减少, S 期明显升高, G<sub>2</sub>/M 期减少, 提示 TP 可以使 Bel-7402 细胞周期阻滞于 S-G<sub>2</sub>/M 期; 而处理 CLC 细胞 36 h 后, CLC 细胞各周期细胞分布与对照组比较, 无明显改变, 表明 TP 对人癌细胞和人体正常细胞的增殖周期的影响有一定的差异性。

#### 4 讨论

结果表明, 25~400 $\mu$ g/mL TP 对 4 种人癌细胞均有不同程度的生长抑制作用, 且有浓度依赖性。TP 可诱导人肝癌细胞 (Bel-7402) 凋亡, 影响细胞

周期的进程, 使细胞周期停滞于 S-G<sub>2</sub>/M 期, 可能影响细胞的有丝分裂, 从而抑制细胞生长。而 TP 对 3 种人体正常细胞的生长抑制作用很弱, 对人体肝细胞 (CLC) 的诱导凋亡作用和增殖周期的进程影响不明显, 表明 TP 对人癌细胞和人体正常细胞的作用是有差异性的。此结果与 Ahmad 等<sup>[6]</sup>报道结果相似, TP 的主要成分 EGCG 可诱导人皮肤癌细胞 (ChaCaT) 凋亡, 而不诱导人表皮细胞 (MHEKS) 凋亡。另亦与郭建霞等报道<sup>[7]</sup> TP 可影响人肝癌细胞 (SMMC-7721) 周期进程, 阻于 S-G<sub>2</sub>/M 期, 和抑制肝癌细胞的核分裂, 而不影响人体肝细胞的结果是相符的。提示 TP 可选择性地杀伤癌细胞而对人体正常细胞损伤较小。

TP 可诱导鼻咽癌、胃癌、皮肤癌等多种人癌细胞凋亡<sup>[8-10]</sup>。诱导凋亡可能是 TP 的抗癌作用机制之一, 凋亡可能与 Caspase-3 的活化和 bcl-2 表达下调相关, 即 TP 可能通过影响信息传导通路来抑制细胞的增殖和诱导凋亡。TP 可选择性地杀伤癌细胞而对人体正常细胞影响较小, 可能是因为癌细胞的生物化学活性有别于原器官的正常组织, 增殖迅速, 周期短, 对 TP 敏感, 而人体正常组织细胞增殖慢, 周期长, 对 TP 不敏感。Tolkman 和 Gasparin 报道<sup>[11,12]</sup>, 实体肿瘤组织中的血管内皮细胞的倍增时间仅为 4 d, 而正常组织中的血管内皮细胞的倍增时间为 1 年, 表明 2 种细胞的增殖差异性。虽然 TP 对癌细胞有选择性杀伤作用的真正机制尚未清楚, 但本实验结果证明 TP 对人癌细胞和人体正常细胞的杀伤作用确实存在差异, 此差异对 TP 在肿瘤防治的开发方面有重要的意义, 值得进一步研究。

#### References

- [1] Xie B F, Liu Z C, Hao D L, et al. The studies of cytotoxic effect and antitumor effect by tea polyphenols (TP) [J]. *Chin J Cancer (癌症)*, 1998, 17(6): 418-420.
- [2] Brown M D. Green tea (*Camellia sinensis*) extract and its possible role in the prevention of cancer [J]. *Altern Med Rev*, 1999, 4(5): 360-370.
- [3] Yang C S, Chung J Y, Yang G, et al. Tea and tea polyphenols in cancer prevention [J]. *J Nutr*, 2000, 130 (2 S Suppl): 472S-478S.
- [4] Luo H T. Inhibitory effect of green tea on carcinogenesis in

- human liver cell [J]. *Tumor (肿瘤)*, 2001, 21(3): 229-232.
- [5] Hussain R F, Nouri A M, Oliver R T. A new approach for measurement of cytotoxicity using colorimetric assay [J]. *J Immunol Methods*, 1993, 160(1): 8996.
- [6] Ahmad N, Feyes D K, Nieminen A L, *et al.* Green tea constituent epigallocatechin-3-gallate and induction of apoptosis and cell cycle arrest in human carcinoma cells [J]. *N Engl J Med*, 1995, 333 1757.
- [7] Guo J X, Huang S Z, Zhang L S, *et al.* Effect of Chinese green tea polyphenols (GTP) on human liver cancer cell *in vitro* [J]. *Chin J Cancer (癌症)*, 1995, 14(6): 425-428.
- [8] Xie B F, Hao D L, Liu Z C, *et al.* The effects of tea polyphenol on DNA cleavage and cell cycle of human NPC cell line CNE2 cell [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 1999, 15(5): 424-427.
- [9] Luo F J, Hu Z, Deng X Y, *et al.* Tea polyphenols induce the activity of caspase-3 in nasopharyngeal carcinoma cells [J]. *Chin J Cancer (癌症)*, 2000, 19(12): 1082-1086.
- [10] Tan X H, Zhang Y L, Zhou D Y. EGCC induced apoptosis and expression change of bcl-2 protein in gastric and hepatic carcinoma cells [J]. *Chin J Cancer (癌症)*, 2000, 19(7): 638-641.
- [11] Foldman J. Seminars in medicine of the Beth Isreal Hospital, Boston. Clinical applications of research on angiogenesis [J]. *N Engl J Med*, 1995, 333 1757.
- [12] Gasprini G, Harris A L. Clinical importance of the determination of tumor angiogenesis in breast carcinoma much more than a new prognostic tool [J]. *J Clin Oncol*, 1995, 13(3): 765-782.

## 夏天无对小鼠学习记忆及脑内乙酰胆碱酯酶的影响

盛 瑞, 顾振纶, 蒋 航, 曹 奕\*

(苏州大学医学院 药理教研室, 苏州中药研究所, 江苏 苏州 215007)

**摘要:** 目的 阐明夏天无制剂对记忆障碍小鼠的学习记忆功能及对小鼠脑内乙酰胆碱酯酶 (AchE) 的影响。方法 以东莨菪碱造成小鼠记忆获得障碍和乙醇造成小鼠记忆再现障碍, 同时测定了小鼠脑内 AchE 的活性。结果 夏天无口服液及胶囊剂 0.5, 1, 2 mg/kg 对记忆障碍小鼠的学习记忆功能有不同程度的改善作用, 并可抑制小鼠脑内 AchE 活性。结论 夏天无口服液及胶囊剂能增强小鼠的学习记忆功能, 该作用可能与抑制 AchE 有关。

**关键词:** 夏天无; 学习记忆; 跳台法; 乙酰胆碱酯酶

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2003)06-0543-03

### Effects of *Rhizoma Corydalis Decumbentis* on learning and memory ability and brain acetylcholinesterase activity in mice

SHEN G Rui, GU Zhen-lun, JIANG Hang, CAO Yi

(Department of Pharmacology, Suzhou Institute of Chinese Materia Medica, Medical College of Suzhou University, Suzhou 215007, China)

**Key words** *Rhizoma Corydalis Decumbentis* (RCD); learning and memory ability; step down test; acetylcholinesterase (AchE)

阿尔茨海默病 (AD) 是严重危害老年人健康的疾病之一, 研究表明, 痴呆的发生与脑内神经递质的异常密切相关, 其中胆碱 (Ach) 系统尤为重要。胆碱能假说认为中枢胆碱系统功能下降导致认知功能受损。痴呆病人的认知能力受损程度与乙酰胆碱酯酶 (AchE) 活性相对增高及 Ach 的相对减少呈正相关, 而且胆碱能系统在认知功能的恢复中也起重要作用<sup>[1]</sup>。

夏天无 *Rhizoma Corydalis Decumbentis* (RCD) 具有降压镇痉, 活血化瘀, 行气止痛功效。临床主要

治疗脑梗死, 周围神经损害性瘫痪, 腰椎间盘突出症, 坐骨神经痛, 关节腰腿等疼痛及中小学生假性近视<sup>[2]</sup>。但对老年性痴呆的作用未见报道。本实验从夏天无中提取有效部位, 筛选实验发现其体外有较强的 AchE 抑制作用, 推测可能对动物的学习记忆功能产生影响。为此本实验探讨其对小鼠学习记忆等脑功能的作用, 同时检测小鼠脑组织中 AchE 活性, 以期阐明该药的作用机制, 为临床应用提供依据。

#### 1 材料

1.1 药物与试剂: 夏天无口服液及胶囊剂由苏州中

\* 收稿日期: 2002-10-05

基金项目: 苏州市科技局社会发展基金 (SS0126); 专利号: 02111103.0

作者简介: 盛 瑞 (1975-), 女, 江苏常州人, 苏州大学在读博士, 主要从事心血管药理研究。

Tel (0512) 65190599 E-mail sheng\_rui@163.com