

## 基础研究

DOI:10.3969/j.issn.0253-3626.2012.04.005

## EGCG 联合紫杉醇对肺癌 A549 细胞增殖、凋亡的影响

王江红,徐莉,董扬,郭述良

(重庆医科大学附属第一医院呼吸内科,重庆 400016)

**【摘要】目的:**研究表没食子儿茶素没食子酸酯[(-)-Epigallocatechin gallate,EGCG]及紫杉醇单独使用和联合使用时对肺癌 A549 细胞的形态、活性、细胞凋亡以及相关信号通路的影响。**方法:**不同浓度的 EGCG、紫杉醇单用及联合应用在不同时间作用于肺癌 A549 细胞,用细胞集落形成实验检测细胞活力、WST-1 法检测细胞增殖能力、Hoechst 33342 荧光法检测细胞凋亡的情况、流式细胞仪检测细胞凋亡率、Western blot 检测内质网应激标志蛋白 GRP78 表达。**结果:**①EGCG 和紫杉醇均能抑制肺癌 A549 细胞的增殖;EGCG 与紫杉醇联合的抑制率高于单用 EGCG 或紫杉醇组( $P < 0.05$ )。②EGCG 和紫杉醇均可诱导细胞凋亡,2 种药物联用后,诱导细胞凋亡作用显著增强。③蛋白免疫印迹实验显示 EGCG 和紫杉醇联合可能是通过内质网应激信号通路发挥作用。**结论:**EGCG、紫杉醇均可抑制人肺癌 A549 细胞的增殖、诱导细胞的凋亡,两者联合应用具有协同作用,能显著增强细胞凋亡作用。

**【关键词】**表没食子儿茶素没食子酸酯;紫杉醇;肺癌;凋亡

**【中国图书分类法分类号】**R734.2

**【文献标志码】**A

**【收稿日期】**2011-11-15

## Effects of (-)-epigallocatechin gallate combined with Paclitaxel on the proliferation and apoptosis of human lung cancer cell line A549

WANG Jianghong, XU Li, DONG Yang, GUO Shuliang

(Department of Respiratory Medicine, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University)

**【Abstract】****Objective:** To study the effects of combined and exclusive application of (-)-epigallocatechin gallate (EGCG) and Paclitaxel on the morphology, activity, apoptosis and possible signal pathway of human lung cancer cell line A549. **Methods:** EGCG and Paclitaxel with different concentrations were applied to human lung cancer cell line A549 exclusively and in combination at different periods. The cell activity was examined by cell colony formation assay, cell proliferation by WST-1 assay, cell apoptosis by Hoechst 33342 test, apoptosis rate by flow cytometry and expressions of GRP78 by western blot. **Results:** Both EGCG and Paclitaxel can inhibit the proliferation of lung cancer cell line A549. The inhibiting effect was more obvious if the two drugs were used in combination ( $P < 0.05$ ). Both EGCG and Paclitaxel can induce the apoptosis of lung cancer cell line A549. The inducing effect was more obvious if the two drugs were used in combination. The results of western blot indicated that the two drugs

**作者介绍:**王江红(1968-),女,主任医师,硕士,

**研究方向:**呼吸系统疾病的诊疗及介入治疗。

**通信作者:**郭述良,男,教授,Email:guosl999@sina.com。

**基金项目:**重庆市卫生局资助项目(编号:2010-2-026)。

克服耐受性的研究进展[J]. 中国医药科学,2011,1(15):43-45.

Nie J M, Xu Y J, Xing Y M, et al. The mechanisms of TRAIL resistance against tumor cells and researches for overcoming TRAIL resistance[J]. China Medicine and Pharmacy, 2011, 1(15):43-45.

[9] 赖国旗,邱宗荫,左国伟,等.肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体对人宫颈癌 HeLa 细胞的凋亡作用[J].中国实用妇科与产科杂志,2008,24(6):442-444.

Lai G Q, Qiu Z Y, Zuo G W, et al. Research of the apoptosis of TRAIL on cervical cancer HeLa cells[J]. Chinese Journal of Practical Gynecology and Obstetrics, 2008, 24(6):442-444.

[10] Kreimer A R, González P, Katki H A, et al. Efficacy of a bivalent HPV 16/18 vaccine against anal HPV 16/18 infection among young women: a nested analysis within the costa rica vaccine trial [J]. Lancet Oncol, 2011, 12(9):862-870.

[11] Lee S H, Kim J W, Lee H W, et al. Interferon regulatory factor-1 (IRF-1) is a mediator for interferon-gamma induced attenuation of telomerase activity and human telomerase reverse transcriptase (hTERT) expression[J]. Oncogene, 2003, 22(3):381-391.

[12] Clarke D T, Irving A T, Lambley E H, et al. A novel method for screening viral interferon-resistance genes[J]. J Interferon Cytokine Res, 2004, 24(8):470-477.

[13] Gopalan B, Shanker M, Chada S, et al. MDA-7/IL-24 suppresses human ovarian carcinoma growth in vitro and in vivo[J]. Mol Cancer, 2007, 2(6):11-20.

[14] Zheng M, Bocangel D, Doneske B, et al. Human interleukin 24 (MDA-7/IL-24) protein kills breast cancer cell via the IL-20 receptor and is antagonized by IL-10[J]. Cancer Immunother, 2007, 56(2):205-215.

(责任编辑:关蕴良)

may exert the effects through endoplasmic reticulum stress signal pathways. *Conclusion:* Both EGCG and Paclitaxel can inhibit the proliferation and induce the apoptosis of A549 cells, more obvious effects can be achieved if the two drugs are used in combination.

【Key words】(-)-epigallocatechin gallate; Paclitaxel; lung cancer; apoptosis

肺癌是当今对人类健康和生命威胁最大的恶性肿瘤之一,已成为绝大多数国家因癌症死亡的首要原因。就世界范围而言,肺癌的发病率正以每年 0.5% 的速度增长,我国的肺癌发病率也在持续增长。21 世纪,肺癌仍是全世界恶性肿瘤患者死亡的主要原因。

肿瘤的发生、发展与细胞凋亡有着密切的关系。许多抗肿瘤的药物都是通过诱导细胞凋亡来杀伤肿瘤细胞<sup>[1,2]</sup>。大量研究证实绿茶及其提取物具有防癌抗癌等多种功能,表没食子儿茶素没食子酸酯 [(-)-Epigallocatechin-3-gallate, EGCG] 作为绿茶提取物的成分之一,能通过诱导人肺癌细胞、胃腺癌细胞、大肠癌细胞、前列腺癌细胞、白血病细胞、鼻咽癌细胞等肿瘤细胞凋亡从而抑制肿瘤细胞的生长<sup>[1~4]</sup>。

紫杉醇是临幊上治疗晚期非小细胞肺癌 (Non-small-cell carcinoma, NSCLC) 的主要药物之一,具有较好的治疗效果。尽管如此,晚期 NSCLC 的治疗效果及多药耐药问题仍是亟需解决的临幊难题。已有不少研究发现 EGCG 与一些化疗药物联用时能显著增加肿瘤细胞对药物的敏感性<sup>[5]</sup>,具有良好的应用前景,本研究拟探讨不同浓度 EGCG 联合紫杉醇对肺癌 A549 细胞增殖、凋亡的影响,为临幊治疗提供更多实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂

EGCG、紫杉醇购自 Sigma 公司;改良型 RPMI1640 培养基为 Hyelone 公司产品;WST-1、Hoechst 33342 染色液、凋亡抑制剂 Z-VAD-FMK、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒等均购自碧云天生物技术有限公司。

### 1.2 细胞培养

人肺癌细胞 A549 由重庆医科大学附属第一医院传染病原学实验室(二)提供,将 A549 细胞接种在 50 ml 培养瓶中,用改良型 RPMI1640 培养液在 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 的孵箱中培养,细胞贴壁 80% 时传代,2~3 d 传代 1 次,取对数生长期细胞用于实验。

### 1.3 细胞集落形成实验

取对数生长期 A549 细胞,用 0.25% 的胰蛋白酶消化、反

复吹打、离心后制成细胞悬液,取样至细胞计数板,在显微镜下计数,调整细胞密度为 1 500 个细胞/孔,接种于 6 孔板中,十字方向反复晃动促使细胞均匀分散。置 6 孔板于 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养 24 h 后,弃去上清,分别加入含有不同浓度紫杉醇、EGCG 的培养液 2 ml,并设不加药物的对照组。其中 EGCG 终浓度为 5 μg/ml、紫杉醇组终浓度为 4 nmol/L。联合组中,取终浓度为 5 μg/ml EGCG 与终浓度为 4 nmol/L 的紫杉醇联合用药处理细胞。培养期间每 2 d 换 1 次液,培养 2 周后,弃去培养液, PBS 清洗 2 次。空气干燥。甲醇固定 15 min,弃甲醇后空气干燥。用 Giemsa 染液染色 30 min,流水缓慢洗去染液,加 PBS 1 ml 于白光下采集图像进行克隆形成的拍照观察。

### 1.4 WST-1 比色法

检测不同浓度 EGCG、紫杉醇单药及联合用药处理后不同时间点对肺癌 A549 细胞的生长抑制率。实验分为对照组、EGCG 组、紫杉醇组、EGCG 联合紫杉醇组。取对数生长期细胞,0.25% 胰酶消化后吹打成单细胞悬液,调整细胞密度至  $1.5 \times 10^3$  个/ml,接种于 96 孔板,每孔 100 μl。培养 24 h 后换液。对照组加含细胞的培养液;EGCG 组分别用 2、5 μg/ml 浓度的 EGCG 处理;紫杉醇组分别加入 2、4 nmol/L 紫杉醇;EGCG/紫杉醇组每孔 EGCG 和紫杉醇的终浓度分别为 5 μg/ml 和 2 nmol/L。每个浓度设置 3 个复孔。分别于第 2、4、6 天,在相应孔中加入 WST-1 100 μl,1.5 h 后置酶标仪上测 A<sub>450nm</sub> 的吸光值。计算各复孔吸光度的平均值,作为试验组或对照组的吸光度,计算细胞增殖抑制率,实验重复 3 次。抑制率 (%) = (1 - 实验孔吸光度值/对照孔吸光度值) × 100%。

### 1.5 Hoechst 33342 染色法

对数生长期 A549 细胞接种于 6 孔板中,贴壁后分别加 EGCG 5 μg/ml、紫杉醇 4 nmol/L、EGCG 5 μg/ml + 紫杉醇 4 nmol/L、凋亡抑制剂 Z-VAD-FMK 1 μmol/L + EGCG 5 μg/ml、凋亡抑制剂 Z-VAD-FMK 1 μmol/L + 紫杉醇 4 nmol/L + EGCG 5 μg/ml 等处理细胞 48 h,弃去上清, PBS 洗 2 遍,加 Hoechst 33242 荧光染料 1 ml,37 ℃ 孵育 15 min 后弃荧光染料, PBS 洗 3 遍,每孔再加入 PBS 各 1 ml,于倒置荧光显微镜下观察并拍照。其中凋亡抑制剂 Z-VAD-FMK 均在加入其他药物前 30 min 先加入到细胞培养液中。实验重复 3 次。

### 1.6 流式细胞仪 AnnexinV/PI 双染色法检测 A549 细胞凋亡

取对数生长期的 A549 细胞,按不同处理分 4 组:对照组、EGCG 组、紫杉醇组、EGCG 联合紫杉醇组,分别加入含有不同浓度的紫杉醇、EGCG(每组药物终浓度同 1.3),培养 48 h,收集细胞,调整细胞密度为  $5 \times 10^6$  个/ml,用 AnnexinV/

PI 双染色法处理, 流式细胞仪检测 A549 细胞凋亡情况。

### 1.7 蛋白免疫印迹杂交法 (Western blot) 检测凋亡相关蛋白 GRP78 的表达

于 24、48 h 分别收集经 EGCG、紫杉醇、EGCG 联合紫杉醇处理的 A549 肺癌细胞, EGCG 组、紫杉醇组及联合组的药物处理浓度同 1.3, 加入 RIPA 细胞裂解液、BAC 法定量蛋白、制备 SDS-PAGE 胶, 常规电泳、转膜、封闭、一抗 4 ℃孵育过夜、二抗室温孵育, 增强化学发光法显色, Lane1D 凝胶分析软件分析。设未用药物处理的细胞作为对照组,  $\beta$ -actin (43 kD) 作内参。

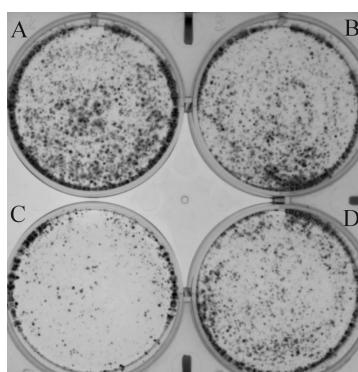
### 1.8 统计学分析

定量资料以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 的形式表示。首先采用 SPSS15.0 软件对重复测量数据在各时间点之间的关系是否满足 Huynh-Feldt 条件进行球形检验, 检验的结果为  $P > 0.05$ , 说明重复测量数据之间实际上不存在相关性, 资料满足 Huynh-Feldt 条件, 然后用一般线性模型 (General linear model, GLM) 的重复测量过程实现重复测量资料的方差分析, 并采用多因素方差分析过程实现每个时间点上组间的两两比较, 规定  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 细胞集落形成实验检测药物对 A549 细胞增殖活力的抑制作用

细胞集落形成实验中肺癌 A549 细胞经 EGCG 或紫杉醇处理后, 细胞克隆数与对照组相比均有减少, 而两药合用与单药处理细胞相比, 细胞克隆数减少更加显著, 表明 EGCG 联合紫杉醇能够极显著地抑制肺癌 A549 细胞的增殖活力。见图 1。



A. 对照细胞; B. EGCG (5  $\mu$ g/ml) 处理细胞 2 周; C. EGCG 联合紫杉醇处理细胞 2 周; D. 紫杉醇 (4  $\mu$ mol/L) 处理细胞 2 周  
用吉姆萨染液染色 30 min 后, 活细胞克隆被染成淡蓝色的点状, 白光下采集图像。集落数表示活细胞克隆数, 越多表明细胞形成克隆的能力越强, 越有活力

图 1 细胞集落形成实验

Fig. 1 Cell colony formation assay

### 2.2 WST-1 法检测药物对肺癌 A549 细胞的增殖抑制率

WST-1 法检测的数据表明 (见表 1、图 2) EGCG、紫杉醇单用及联合应用对肺癌 A549 细胞均有抑制作用, 其中 EGCG 与紫杉醇联合对肺癌 A549 细胞的增殖抑制作用较两药单用效果更好, 具有统计学差异。结果提示 EGCG 能够增强肺癌细胞 A549 对紫杉醇的药物敏感性。

表 1 各药物组处理肺癌细胞 A549 后增殖抑制率 ( $n=3, \bar{x} \pm s, \%$ )

Tab. 1 Growth inhibition rate of human lung cancer A549 cells treated with different drugs at different concentrations ( $n=3, \bar{x} \pm s, \%$ )

组别	2 d	4 d	6 d
对照组	0	0	0
EGCG (2 $\mu$ g/ml)	16.46 $\pm$ 4.55	20.51 $\pm$ 6.92 <sup>d</sup>	35.68 $\pm$ 6.46 <sup>e</sup>
EGCG (5 $\mu$ g/ml)	48.76 $\pm$ 6.73 <sup>c</sup>	70.70 $\pm$ 5.37 <sup>cd</sup>	75.21 $\pm$ 6.45 <sup>e</sup>
紫杉醇 (2 nmol/L)	18.20 $\pm$ 5.50	59.33 $\pm$ 8.32 <sup>d</sup>	63.66 $\pm$ 7.77 <sup>e</sup>
紫杉醇 (4 nmol/L)	45.32 $\pm$ 4.22 <sup>b</sup>	81.90 $\pm$ 2.24 <sup>bd</sup>	85.30 $\pm$ 3.58 <sup>be</sup>
联合用药组	71.83 $\pm$ 1.06 <sup>a</sup>	90.58 $\pm$ 0.68 <sup>ad</sup>	91.72 $\pm$ 0.51 <sup>ae</sup>

注: a, 与每个单药组分别比较,  $P < 0.05$ ; b, 与相同时间紫杉醇组 2 nmol/L 比较,  $P < 0.05$ ; c, 与相同时间 EGCG 2  $\mu$ g/ml 比较,  $P < 0.05$ ; d, 与相同浓度 2 d 比较,  $P < 0.05$ ; e, 与相同浓度 2、4 d 分别比较,  $P < 0.05$

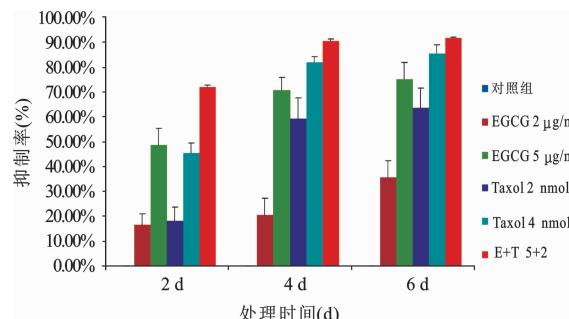
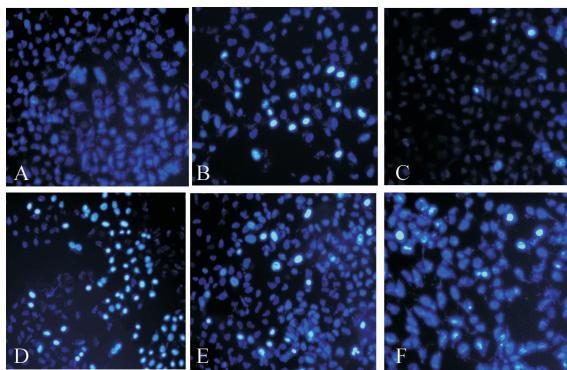


图 2 WST-1 法检测 EGCG、紫杉醇单用及联合应用对肺癌 A549 细胞的增殖抑制率

Fig. 2 Effects of exclusive and combined application of EGCG and Paclitaxel on the growth inhibition rate of A549 cells detecting by methods of WST-1

### 2.3 Hoechst 33342 荧光染色实验检测药物对 A549 细胞的凋亡作用

EGCG、紫杉醇单用及联合运用均使亮蓝色的凋亡细胞增加, 而 EGCG 联合紫杉醇处理细胞使凋亡细胞增加更为显著, 表明 EGCG 联合紫杉醇能够显著增加肺癌 A549 细胞的凋亡。而经凋亡抑制剂 Z-VAD-FMK 处理肺癌 A549 细胞 30 min 后, 再分别加入 EGCG 或 EGCG 联合紫杉醇均出现凋亡细胞明显减少, 提示 EGCG、EGCG 联合紫杉醇抑制肺癌 A549 细胞的增殖是通过诱导细胞凋亡这个途径发挥作用的。见图 3。Hoechst 33342 是一种可以穿透细胞膜的蓝色荧光染料, 在荧光显微镜下观察, 凋亡细胞的细胞核呈致密浓染, 或呈碎块状致密浓染 (亮蓝色), 而普通活细胞只是被淡染 (淡蓝色)。



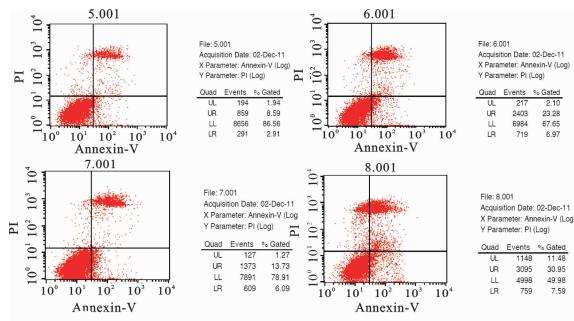
A. 对照细胞;B. EGCG(5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )处理细胞 48 h;C. 凋亡抑制剂 Z-VAD-FMK(1  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ) + EGCG(5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )处理细胞 48 h;D. EGCG 联合紫杉醇处理细胞 48 h;E. 紫杉醇(4 nmol/L)处理细胞 48 h;F. 凋亡抑制剂 Z-VAD-FMK(1  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ) + 紫杉醇(4 nmol/L) + EGCG(5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )处理细胞 48 h

图 3 Hoechst33342 荧光染色实验

Fig. 3 Heochst 33342 fluorescent staining test

#### 2.4 流式细胞仪 AnnexinV/PI 双染色法检测细胞凋亡率

单用紫杉醇 4 nmol/L 及 EGCG 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  各处理 A549 细胞 48 h, 细胞凋亡率分别为 19.82% 和 30.25%, 均高于空白对照组的 11.5%。EGCG 联合紫杉醇处理细胞 48 h, 细胞凋亡率增至 38.54% (图 4)。结果表明 EGCG、紫杉醇均能诱导细胞凋亡, 而两者联合可使凋亡率增加。



A. 空白对照组;B. EGCG(5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )处理细胞 48 h;C. 紫杉醇(4 nmol/L)处理细胞 48 h;D. EGCG 联合紫杉醇处理细胞 48 h

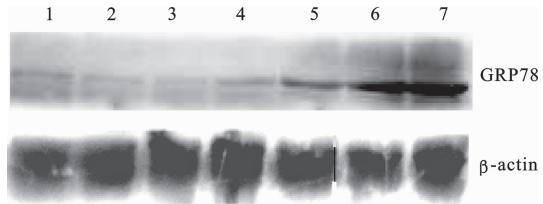
图 4 流式细胞术 AnnexinV/PI 双染色法检测细胞凋亡

Fig. 4 Cell apoptosis detected by flow cytometry with AnnexinV/PI double staining

#### 2.5 Western blot 检测凋亡相关蛋白 GRP78 的表达

有研究表明 EGCG 和紫杉醇都能够诱导内质网应激相关蛋白的表达变化, 检测了内质网应激标志蛋白 GRP78 的表达(图 5), 结果表明, EGCG 和紫杉醇单药及联合用药后都能诱导 GRP78 的表达增加, 而联合用药能更加显著增加其表达。因此初步推断 EGCG 和紫杉醇可能是通过内质网应激发挥联合药效。

结果显示 EGCG 和紫杉醇单独给药 48 h 后能显著诱导内质网应激蛋白 GRP78 的表达, 联合应用后更显著。



1. 对照细胞;2. EGCG(5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )处理细胞 24 h;3. 紫杉醇(4 nmol/L)处理细胞 24 h;4. EGCG 联合紫杉醇处理细胞 24 h;5. EGCG(5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )处理细胞 48 h;6. 紫杉醇(4 nmol/L)处理细胞 48 h;7. EGCG 联合紫杉醇处理细胞 48 h

图 5 Western blot 检测内质网应激标志蛋白 GRP78 的表达变化

Fig. 5 Expressions of endoplasmic reticulum stress sign GRP78 protein detected by western blot

### 3 讨 论

在肺癌的综合治疗中化疗占据着重要的地位, 而紫杉醇作为 NSCLC 化疗中最为常用的药物之一, 具有较好的疗效, 但其细胞毒性及多药耐药性促使人们努力寻找高效低毒的药物以增强其疗效, 提高患者的生存率。

绿茶提取物 EGCG 在体内外对多种肿瘤均具有抑制生长作用<sup>[6]</sup>, 其主要物质基础是茶多酚<sup>[3,7]</sup>。潘宏铭等<sup>[8]</sup>用二甲基肼诱发小鼠大肠癌, 给予茶多酚灌胃 20 周, 结果表明: 茶多酚对实验性大肠癌有明显的抑制作用。对人离体结肠癌细胞的实验研究<sup>[9]</sup>表明, EGCG 能抑制癌细胞的生长抑制胰岛素样生长因子 1 受体的活化, 为 EGCG 用于结肠癌、直肠癌的化学预防提供了依据。小鼠实验表明, EGCG 抑制肿瘤生长、微血管密度及肿瘤细胞增殖, 增加肿瘤细胞凋亡 1.9 倍<sup>[10]</sup>。另有研究显示 EGCG 可通过影响 HIF-1 $\alpha$  蛋白的表达、VEGF 蛋白的分泌和 VEGF mRNA 的表达来抑制肺癌血管生成<sup>[11]</sup>。近年来, 在 EGCG 对肿瘤的作用机制研究中主要热点为诱导细胞凋亡、细胞周期阻滞及肿瘤血管生成抑制这几个方面, 而对于 EGCG 联合其他化疗药物是否可提高肿瘤细胞对化疗药物敏感性的研究报道甚少。

通过细胞集落形成实验观察到 EGCG、紫杉醇单用及联合应用对 A549 细胞增殖活力均具有抑制作用, 其中联合用药能够显著抑制肺癌 A549 细胞的增殖活力。WST-1 实验结果也表明: EGCG、紫杉醇单用及联合应用对肺癌 A549 细胞增殖均具有抑制

作用,其中 EGCG 与紫杉醇联合对肺癌 A549 细胞的增殖抑制作用更为明显,与两药单用相比,具有统计学差异( $P < 0.05$ )。从实验数据可以看出无论 EGCG 组还是紫杉醇组,均随药物浓度的提高或时间的延长增殖抑制率均有所增加,但是否具有浓度依赖性和时间依赖性还需要增加浓度梯度及时间点作进一步的研究。肿瘤的发生不仅与细胞增殖失控相关,还与细胞凋亡有关<sup>[12]</sup>。为明确 EGCG、紫杉醇是否主要通过诱导细胞凋亡的途径抑制 A549 细胞增殖,进行了 Hoechst 33342 荧光染色实验,实验结果显示 EGCG 联合紫杉醇能显著诱导肺癌 A549 细胞的凋亡,而在用凋亡抑制剂 Z-VAD-FMK 抑制细胞凋亡通路后再加用 EGCG 或 EGCG + 紫杉醇,出现凋亡细胞明显减少,提示 EGCG、EGCG 联合紫杉醇抑制肺癌 A549 细胞的增殖都能通过诱导细胞凋亡这个途径发挥作用。通过流式细胞仪 AnnexinV/PI 双染色法检测细胞凋亡率,进一步证明了 EGCG 与紫杉醇联合与单药比较使肺癌 A549 细胞凋亡率明显增加。

许多研究表明在多种不同类型的肿瘤中存在内质网应激的激活。多种内质网应激相关蛋白在肿瘤中表达增高,内质网应激与多药耐药也有密切关系。而 GRP78 作为内质网的一种分子伴侣参与蛋白质的糖基化修饰、折叠和转运<sup>[13,14]</sup>。Ting L 等<sup>[5]</sup>发现 EGCG 能通过对 GRP78 的调控增加乳腺癌细胞对化疗药物紫杉醇的敏感性。Ermakowa SP 等<sup>[15]</sup>的研究也表明在乳腺癌细胞中 EGCG 能通过对 GRP78 的调控而抑制肿瘤细胞的生长。本实验蛋白印迹免疫结果显示,联合用药能够显著增加内质网应激标志蛋白 GRP78 的表达,表明这 2 种药物联合应用可能是通过内质网应激通路影响细胞凋亡,进而发挥药效的。但其具体的分子作用机制尚待我们进一步深入研究,而对其发挥作用的基因及其表达调控的探讨,有助于我们更好理解药物的作用机制,并使药物更好地应用于临床治疗。

## 参 考 文 献

[1] Sarcević B. Apoptosis in tumors [J]. Acta Med Croatica, 2009, 63

- (s2):43-47.
- [2] Burz C, Berindan-Neagoe I, Balacescu O, et al. Apoptosis in cancer: key molecular signaling pathways and therapy targets [J]. Acta Oncol, 2009, 48(6):811-821.
- [3] Khan N, Mukhtar H. Multitargeted therapy of cancer by green tea polyphenols [J]. Cancer Letters, 2008, 269(2):269-280.
- [4] Wu A H, Tseng C C, Van Den Berg D, et al. Tea intake, COMT genotype and breast cancer in Asian-American women [J]. Cancer Res, 2003, 63(21):7526-7529.
- [5] Luo T, Wang J, Yin Y, et al. (-)-Epigallocatechin gallate sensitizes breast cancer cells to paclitaxel in a murine model of breast carcinoma [J]. Breast Cancer Research, 2010, 12(1):R8.
- [6] Sarkadi B, Homolya L, Szakacs G, et al. Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoimmunity defense system [J]. Physiol Rev, 2006, 86(4):1179-1236.
- [7] Khan N, Adhami V M, Mukhtar H. Renew: green tea polyphenols in chemoprevention of prostate cancer: preclinical and clinical studies [J]. Nutr Cancer, 2009, 61(6):836-841.
- [8] 潘宏铭,吴金民,郑树. 茶多酚对二甲基肼诱发小鼠大肠肿瘤的抑制作用 [J]. 中华预防医学杂志, 2005, 29(6):356-360.
- Pan H M, Wu J M, Zheng S, et al. Inhibition of colorectal carcinoma induced dimethylhydrazine in mice with tea polyphenols [J]. Chinese Journal of Preventive Medicine, 2005, 29(6):356-360.
- [9] Shimizu M, Deguchi A, Joe A K, et al. EGCG inhibits activation of HER3 and expression of cyclooxygenase-2 in human colon cancer cells [J]. J Exp Ther Oncol, 2005, 5(1):69.
- [10] Jung Y D, Kim M S, Shin B A, et al. EGCG, a major component of green tea, inhibits tumour growth by inhibiting VEGF induction in human colon carcinoma cells [J]. Br J Cancer, 2001, 84(6):844-849.
- [11] 唐旭东,周新,李刚,等. 绿茶提取物 EGCG 对肺癌细胞 HIF-1 $\alpha$  和 VEGF 表达的影响 [J]. 中国药理通讯, 2009, 26(2):26-28.
- Tang X D, Zhou X, Li G, et al. The effect of green tea extractive EGCG on the expressions of HIF-1 $\alpha$  and VEGF in human lung cancer cell lines [J]. Chinese Pharmacologist, 2009, 26(2):26-28.
- [12] Fabregat I. Dysregulation of apoptosis in hepatocellular carcinoma cells [J]. World J Gastroenterol, 2009, 15(5):513-520.
- [13] Schröder M, Sutcliffe L. Consequences of stress in the secretory pathway: the ER stress response and its role in the metabolic syndrome [J]. Methods Mol Biol, 2010, 648:43-62.
- [14] Mearns G P, Zmijewska A A, Jope R S. HSP105 interacts with GRP78 and GSK3 and promotes ER stress-induced caspase-3 activation [J]. Cell Signal, 2008, 20(2):347-358.
- [15] Ermakova S P, Kang B S, Choi B Y, et al. (-)-Epigallocatechin gallate overcomes resistance to etoposide-induced cell death by targeting the molecular chaperone glucose-regulated protein 78 [J]. Cancer Res, 2006, 66(18):9260-9269.

(责任编辑:冉明会)