

茶氨酸溴香酰胺对人宫颈癌细胞体内外生长的抑制作用

张华荣, 季德鑫, 刘欣, 陈林林, 孙富家, 田绘绘, 吴菲, 刘昆, 张国营*
(烟台大学药学院分子药理学实验室, 烟台 264005)

摘要: 将茶氨酸为母体合成的茶氨酸衍生物茶氨酸溴香酰胺 (TBrC) 与茶氨酸作比较, 评估茶氨酸溴香酰胺对人宫颈癌细胞体内外生长的抑制作用与其分子机制。应用 MTT 等方法检测不同浓度的 TBrC 对人宫颈癌细胞体外生长的影响, 运用蛋白质印迹法检测解析这些人宫颈癌细胞中与凋亡和生长密切相关蛋白的表达和药物可能的作用靶点。此外, 通过建立动物肿瘤模型, 评价 TBrC 对荷瘤裸鼠人宫颈癌生长的抑制效果。实验结果显示, TBrC 抑制人宫颈癌细胞体内外生长的活性超过其母体化合物茶氨酸多倍, 对小鼠生长无明显毒性; TBrC 作用的分子机制之一可能与抑制 VEGFR1-Bcl-2/Bax 信号传导通路相关。研究结果提示, TBrC 具有广泛应用于临床治疗和 (或) 辅助治疗人宫颈癌和其他癌症的潜力。

关键词: 茶氨酸溴香酰胺; 人宫颈癌; 体内外生长抑制; 药物靶点

中图分类号: S571.1; R730.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2014)01-0066-06

Inhibitory effects of TBrC against *in vitro* and *in vivo* growth of human cervical cancer cells

ZHANG Huarong, JI Dexin, LIU Xin, CHEN Linlin, SUN Fujia, TIAN Huihui, WU Fei, LIU Kun, ZHANG Guoying
(Laboratory of Molecular Pharmacology, School of Pharmacy, Yantai University, Yantai 264003)

Abstract: The aim of this study is to investigate the inhibitory effects of TBrC, a synthesized theanine derivative on the growth of human cervical cancer cells and the molecular mechanisms of action both *in vitro* and *in vivo*. MTT assay was used to evaluate the effects of TBrC on the *in vitro* growth of human cervical cancer cells. Western blotting was employed to analyze the protein expressions and the possible targets of action related to the growth inhibition and apoptosis in the human cervical cancer cells treated with TBrC. In addition, an animal tumor mode was established to assess the inhibitory effects of TBrC on human cervical tumor growth in tumor-bearing mice. The experimental results showed that TBrC enhanced the growth inhibition of the human cervical cancer cells and human cervical tumor by multifold as compared with its parental compound (theanine) without detectable toxicity to the mice. All these results suggest that TBrC may have a wide therapeutic and/or adjuvant therapeutic application in the treatment of human cervical cancer and other cancers.

Key words: TBrC; cervical cancer; growth inhibition *in vitro* & *in vivo*; drug targets

宫颈癌是女性生殖系统最常见的恶性肿瘤之一, 严重威胁着妇女的健康。2008 年国际癌症研究所(International Agency for Research on Cancer, IARC)统计, 全球每年新增宫颈癌病例集中在发展中国家^[1]。而我国统计资料显示, 近年来宫颈癌的发病率有上升的趋势, 并且发病人群逐渐年轻化。可见, 宫颈癌是严重威胁广大妇女身心健康的危险因素之一。宫颈癌的研究和临床治疗在 20 世纪下半

叶发展迅速, 但是进一步提高远期生存率尚未获得突破性进展。因此, 对宫颈癌的防治是临床上急需解决的重要问题, 其中, 开发新型防治宫颈癌的小分子靶向药物就是重要的研究战略之一。

茶氨酸是茶叶特征性的氨基酸, 具有一定的抗肿瘤活性^[2-6]。然而, 茶氨酸的高水溶性限制了它的抗癌作用。为此, 在先前的研究中, 我们以茶氨酸为母体化合物, 对其化学结构进一步改造修饰, 成

收稿日期: 2013-10-07

基金项目: 国家科技部十二五“863”项目(2012AA020206), 国家自然科学基金面上项目(30973553), 山东省科技攻关项目(2009GG10002087)和山东省自然科学基金项目(ZR2012HM016)共同资助。

作者简介: 张华荣, 季德鑫, 硕士研究生, 为共同第一作者。

* 通信作者: 张国营, 博士, 教授。E-mail: zhang_zhang6173@aliyun.com

功获得了它的衍生物茶氨酸溴香酰胺 (TBrC), 并通过实验证实茶氨酸溴香酰胺能够较其合成的母体化合物茶氨酸更显著地抑制高转移的肺癌体内外生长^[3]。为了进一步确认 TBrC 抗癌活性和作用的药物分子靶点, 扩大其防治肿瘤的应用范围, 在本研究中, 通过体内外实验研究, 评估了 TBrC 对人宫颈癌细胞生长的影响, 初步确认其作用的分子机制和可能的药物分子靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药品与试剂 茶氨酸溴香酰胺 (本实验室合成); 100 mg·L⁻¹ 链霉素、100 U·m⁻¹ 青霉素 (双抗); DMEM 高糖培养基 (Hyclone 公司); 茶氨酸、已灭活胎牛血清、DMSO、胰蛋白酶、NF- κ B 抑制剂 Bay、PI3K/Akt 抑制剂 Ly294002(Ly)、四甲基偶氮唑盐 (MTT) 及蛋白质分子 Marker (美国 Sigma 公司)。RIPA 细胞裂解液、PMSF, BCA 蛋白浓度测定试剂盒, ECL Plus 发光试剂盒、定影粉、显影粉 (碧云天生物技术研究所在)。PVDF 膜 (Millipore 公司)。医用 X 射线胶片 (柯达公司)。其他试剂均为国产分析纯。

一抗: Bcl-2、Bax、VEGFR1、 β -actin (美国 Cell Signaling Technology 公司)。

二抗: 辣根过氧化物酶标记山羊抗兔、辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 (碧云天生物技术研究所在)。

1.1.2 仪器 二氧化碳培养箱: 3111 型 (美国 Thermo 公司); 细胞培养塑料平板 (6 孔、24 孔及 96 孔) (Costar 公司); 台式高速冷冻离心机: 5810R 型 (德国 Eppendorf 公司); 倒置显微镜: CKX31 型 (日本 Olympus 公司); 倒置荧光显微镜: TE200-U 型 (日本 Nikon 公司); 酶标仪: SYNERGY HT 型 (BIO-TEK 公司); 小型垂直电泳槽 (美国 BIO-RAD 公司); 小型湿式电转移槽 (美国 BIO-RAD 公司); 数显恒温水浴锅: HH-60 型 (龙口先科仪器公司); 恒温磁力搅拌器: JB-3 型 (上海雷磁新泾仪器有限公司); 脱色摇床: TS-1 型 (江苏海门市基林贝尔仪器制造有限公司); OMEGA10 凝胶成像分析仪 (OMEGA 公司); 封口机: SF-B 型 (温州市兴业机械有限公司)。

1.1.3 细胞系和动物 人宫颈癌 (Hela) 细胞系购自中国医学科学院肿瘤研究所; SPF 级雌性裸鼠, 6~8 周龄, 体质量 (20 \pm 2)g, 由中国医学科学院实验动物研究所提供。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 人宫颈癌 Hela 细胞系复苏后在含有 10% 胎牛血清和 1% 双抗的 DMEM 培养液中, 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中常规培养, 取对数生长期细胞用于实验。

1.2.2 MTT 法检测 TBrC 对 Hela 细胞系生长的影响 用 0.25% 的胰蛋白酶消化对数生长期的 Hela 细胞, 用含 10% 胎牛血清的培养液使其成为密度为 2 \times 10⁴ 个·mL⁻¹ 的细胞悬液, 以 100 μ L·孔⁻¹ 接种于 96 孔板中。将 96 孔板放入 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 饱和湿度培养箱中培养 24 h 后分别加入茶氨酸和茶氨酸溴香酰胺每孔 1 μ L (用培养液配制), 使其终浓度为 16、64、125、250、500 μ mol·L⁻¹, 5 μ mol·L⁻¹ 的 Bay 和 25 μ mol·L⁻¹ 的 Ly, 设空白对照孔 (只加 100 μ L 培养液) 和对照孔 (只加细胞悬液 100 μ L 含 0.01% DMSO 的溶媒对照), 每组均设 3 个复孔, 置 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 饱和湿度培养箱内培养。实验重复 3 次。分别于加药 48 h 后取出 96 孔板, 每孔加入 10 μ L MTT (5 g·L⁻¹) 溶液, 4 h 后终止培养。弃上清液, 每孔加入 150 μ L DMSO, 室温震荡 10~15 min, 使结晶充分溶解。用酶标仪在参考波长 630 nm, 检测波长 570 nm 处测定每个孔的光密度 (OD) 值。计算相对存活率 = (各实验组 OD 值 / 细胞对照组 OD 值) \times 100%, 并按中效方程计算中效浓度 IC₅₀。

1.2.3 Western Blotting 检测细胞中相关蛋白的表达 依据已经报道的方法^[6-7], 常规收集各组经 16 和 250 μ mol·L⁻¹ 浓度的茶氨酸、TBrC、5 μ mol·L⁻¹ 的 Bay 和 25 μ mol·L⁻¹ 的 Ly 作用 48 h 的 Hela 细胞, 裂解于含有 1 mmol·L⁻¹ 的 PMSF 的 RIPA 裂解液中, 冰浴下超声破碎, 12000 r·min⁻¹, 4 $^{\circ}$ C 离心 20 min, 取上清, 用 BCA 法测定蛋白浓度。每个样品取总蛋白 40 μ g, 以 15% 的 SDS-PAGE 凝胶电泳分离。电泳后湿转法将蛋白转印至 PVDF 膜上, 7% 脱脂奶粉封闭后, 与适当稀释的一抗共孵, 4 $^{\circ}$ C 过夜; TBST 洗 3 次, 每次 5 min; 再与适当稀释的二抗室温共孵 1 h, 同法洗涤 3 次, ECL Plus 显色, 膜与 X-感光胶片在暗盒曝光。结果进行灰度扫描后, Quantity One 分析软件测定平均吸光度。

1.2.4 肿瘤动物模型建立与 TBrC 对荷瘤裸鼠细胞移植瘤生长的影响 Hela 人宫颈癌细胞置于含 10% 胎牛血清、100 U·mL⁻¹ 青霉素、100 mg·L⁻¹ 链霉素的 1640 培养基中, 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 饱和湿度条件下常规培养, 收集对数生长期的 Hela 细胞并制备成浓度为 2.5 \times 10⁷ 个·mL⁻¹ 的单细胞悬液, 接种于裸鼠右后大腿部皮下, 每只接种 0.2 mL 细胞悬液, 每天观察各

注射点处有无红肿破溃。14~15 d后,注射局部出现明显皮丘,所有裸鼠均出现直径8~10 mm的皮下结节后,移植瘤模型建立。于接种后第15天将已建立皮下移植瘤模型的小鼠随机分为4组,每组6只;实验分阴性对照组(溶媒对照)、顺铂阳性对照组(1.5 mg·kg⁻¹)、茶氨酸组(60 mg·kg⁻¹)和TBrC组(60 mg·kg⁻¹),腹腔注射,每日1次,顺铂阳性对照组每周用药5次;每2 d测量体重及瘤体大小,用游标卡尺量瘤体的长径a及短径b(mm),按体积公式 $V=ab^2/2$ (mm³),计算肿瘤的体积。用药29 d后,断颈处死小鼠,剥离瘤组织,称取瘤重,通过实验组移植瘤的瘤重与空白对照组瘤重相比较计算抑瘤率,即抑瘤率(%)=(1-实验组平均瘤重/对照平均瘤重)×100%。

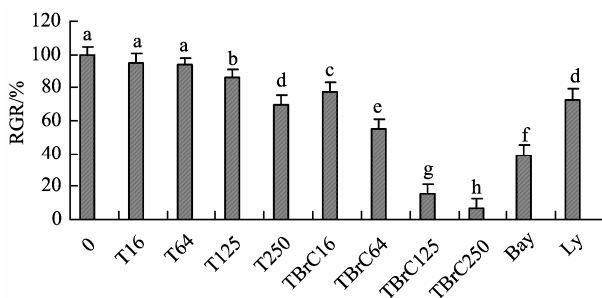
1.3 统计学处理

各项实验至少重复2~3次,采用SPSS 16.0统计学软件对实验结果数据进行分析,计算数据以 $\bar{x} \pm SD$ 表示,组间比较采用 One-Way ANOVA 和 Two-Way ANOVA 法进行分析。组间两两比较采用 Bonferroni 检验校正 p 值,以双侧 $P < 0.05$ 为有显著性差异的标准。

2 结果与分析

2.1 TBrC 对 HeLa 细胞生长的抑制作用

如图1所示,MTT结果显示:HeLa细胞相对生长率随茶氨酸(T)和TBrC浓度的增加而逐渐减少,TBrC对HeLa细胞生长有一定的抑制作用,与对照组和茶氨酸组相比均有显著差异($P < 0.05$),呈现良好的剂量依赖关系,阳性对照组NF- κ B抑制剂Bay和PI3K/Akt抑制剂Ly对HeLa细胞生长的抑制作用也显著。

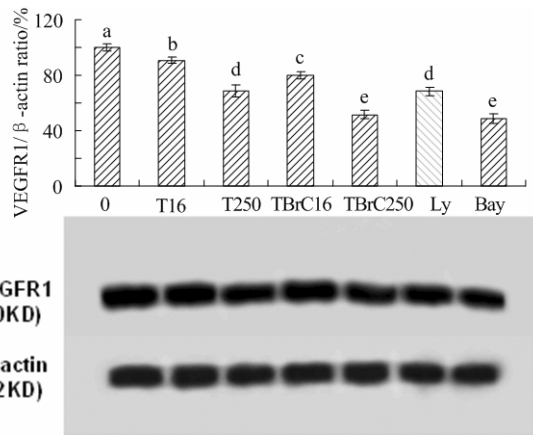


$\bar{x} \pm SD, n=6$; 不同字母(a-h)表示统计学差异显著($P < 0.05$)

$\bar{x} \pm SD, n=6$; Values with different letters (a-h) differ significantly ($P < 0.05$)

图1 TBrC对入宫颈癌HeLa细胞生长的影响

Figure 1 Effects of TBrC on the growth of human cervical cancer cells

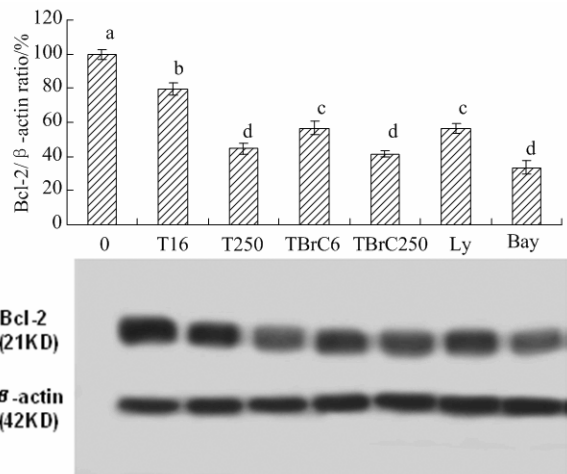


$\bar{x} \pm SD, n=3$; 不同字母(a-e)表示统计学差异显著($P < 0.05$)

$\bar{x} \pm SD, n=3$; Values with different letters (a-e) differ significantly ($P < 0.05$).

图2 TBrC对HeLa细胞VEGFR1受体蛋白表达的影响

Figure 2 Effects of TBrC on the receptor VEGFR1 protein expression in HeLa cells



$\bar{x} \pm SD, n=3$; 不同字母(a-d)表示统计学差异显著($P < 0.05$)

$\bar{x} \pm SD, n=3$; Values with different letters (a-d) differ significantly ($P < 0.05$)

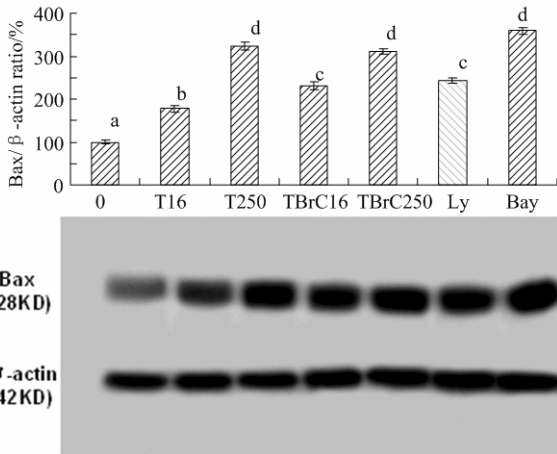
图3 TBrC对HeLa细胞凋亡相关蛋白Bcl-2的影响

Figure 3 Effects of TBrC on the protein Bcl-2 in HeLa cells

2.2 TBrC 对 HeLa 细胞中生长和凋亡相关蛋白表达的影响

如图2所示,不同浓度茶氨酸(T)和TBrC作用HeLa细胞48h后可显著下调VEGFR1受体蛋白的表达,与对照组相比有显著差异($P < 0.05$),且呈现良好的剂量依赖性,在同样250 μmol·L⁻¹浓度下,茶氨酸组的抑制率为32%,而TBrC组的抑制率为49%,是茶氨酸的1.5倍以上;其中以250 μmol·L⁻¹组对VEGFR1蛋白下调作用最明显;Bay和Ly作

为阳性对照对 VEGFR1 受体蛋白表达水平也表现为明显下调作用, 其抑制率分别为 58%和 28%。



$\bar{x} \pm SD, n=3$; 不同字母 (a-d) 表示统计学差异显著 ($P < 0.05$)。

$\bar{x} \pm SD, n=3$; Values with different letters (a-d) differ significantly ($P < 0.05$).

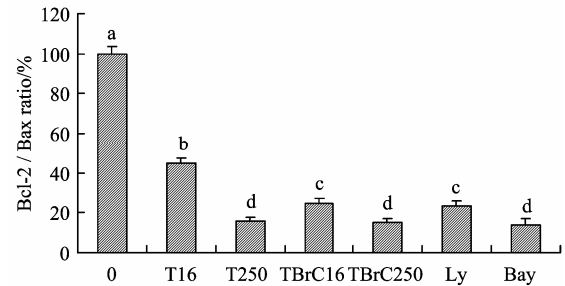
图 4 TBrC 对 HeLa 细胞凋亡相关蛋白 Bax 的影响

Figure 4 Effects of TBrC on the protein Bax in HeLa cells

如图 3 所示, 不同浓度茶氨酸 (T) 和 TBrC 作用 HeLa 细胞 48 h 后可下调抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达, 与对照组相比有显著差异 ($P < 0.05$), 且呈现良好的剂量依赖性, 其中以 $250 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组对 Bcl-2 下调作用最明显, 在同样 $250 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下, 茶氨酸组的抑制率为 55%, 而 TBrC 组的抑制率为 59%; 阳性对照 Bay 和 Ly 对 Bcl-2 蛋白表达水平也表现为明显下调作用, 其抑制率分别为 68%和 45%。

如图 4 所示, 不同浓度茶氨酸 (T) 和 TBrC 作用 HeLa 细胞 48 h 后可上调促凋亡蛋白 Bax 的表达,

与对照组相比有显著差异 ($P < 0.05$), 且呈现良好的剂量依赖性, 其中以 $250 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组对 Bax 上调作用最明显, 在同样 $250 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下, 茶氨酸组的上调率为 250%, 而 TBrC 组的上调率为 233%; 阳性对照 Bay 和 Ly 对 Bax 蛋白表达水平也表现为明显上调作用, 其上调率分别为 283%和 167%。



$\bar{x} \pm SD, n=3$; 不同字母 (a-d) 表示统计学差异显著 ($P < 0.05$)

$\bar{x} \pm SD, n=3$; Values with different letters (a-d) differ significantly ($P < 0.05$)

图 5 TBrC 对 HeLa 细胞凋亡相关蛋白 Bcl-2/Bax 比率的影响
Figure 5 Effects of TBrC on the protein Bcl-2/Bax ratio in HeLa cells

如图 5 所示, 不同浓度茶氨酸 (T) 和 TBrC 作用 HeLa 细胞 48 h 后可减少抗凋亡蛋白 Bcl-2/促凋亡蛋白 Bax 的比率, 与对照组相比有显著差异 ($P < 0.05$), 且呈现良好的剂量依赖性, 其中以 $250 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组对 Bcl-2/Bax 蛋白下调作用最明显, 在同样 $250 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下, 茶氨酸组的抑制率为 83%, 而 TBrC 组的抑制率为 86%; 阳性对照 Bay 和 Ly 对 Bcl-2/Bax 蛋白表达水平也表现为明显下调作用, 其抑制率分别为 86%和 76%。

表 1 茶氨酸和其衍生物茶氨酸溴香酰胺对荷瘤裸鼠人宫颈癌 HeLa 肿瘤生长的抑制作用

Table 1 Inhibitory effects of theanine and its derivative TBrC on the human cervical cancer HeLa tumor growth in tumor-bearing nude mice

化合物 Compound	给药剂量 /mg·kg ⁻¹ Dose	注射方式 Injection	裸鼠数量 Number of mice		裸鼠体重/g Weight of mice		肿瘤重量/g Weight of tumor	肿瘤抑制率/% Tumor inhibitory rate
			Start	End	Start	End		
对照 (溶媒) Control (vehicle)	-	ip	6	6	20.1±1.1	23.3±1.3	7.3±1.3 ^a	-
顺铂阳性对照 Positive control (Cis platin)	1.5	ip	6	6	19.8±0.6	21.9±1.1	4.6±0.5 ^b	37.0
茶氨酸 Theanine	60	ip	6	6	20.2±0.6	25.1±1.1	5.6±0.9 ^b	23.3
茶氨酸溴香酰胺 TBrC	60	ip	6	6	20.1±0.8	25.2±1.4	3.1±0.3 ^c	57.6

注: 29 d 治疗结果; SD, 标准偏差; 不同字母 (a-c) 表示统计学差异显著 ($P < 0.05$)。

Note: Treated for 29 days; SD: standard deviation; Values with different letters (a-c) differ significantly ($P < 0.05$). All statistical tests were two-sided.

2.3 TBrC 对 Hela 人宫颈癌体内肿瘤生长的抑制作用

如表 1 所示, 茶氨酸组、TBrC 组、顺铂阳性对照组与阴性对照组相比, 差异有统计学意义, TBrC 给药组肿瘤重量明显低于阳性对照组, 其差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。顺铂阳性对照组、茶氨酸组、TBrC 给药组的抑瘤率分别为 37.0%、23.3% 和 57.6%, 对荷瘤裸鼠体内 Hela 人宫颈癌肿瘤生长有显著性的抑制作用, TBrC 抑制肿瘤效果超过茶氨酸 2.4 倍。实验期间的小鼠体重变化和生长状况观察以及小鼠病理学解剖分析表明: 茶氨酸组和 TBrC 给药组的小鼠未见明显毒性, 而抗癌药物顺铂组的小鼠显示有一些毒副作用。

3 小结与讨论

在目前的研究中, 证实了本实验室合成的茶氨酸衍生物茶氨酸溴香酰胺比茶氨酸具有更强的对人宫颈癌细胞生长的抑制作用, 其体外对人宫颈癌细胞生长的抑制率是茶氨酸的 10 倍, 在体内对人宫颈癌在裸鼠体内生长的抑制率是茶氨酸的 2.4 倍以上。此外, 初步研究发现茶氨酸溴香酰胺作用人宫颈癌可能的分子机制和药物分子靶点之一是 VEGFR1, Bcl-2 和 Bax。

血管生成是恶性肿瘤生长和转移的基础。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是新生血管形成的中心调控因子, 功能强大并且能产生多种生物学效应, 是一类特异性血管内皮刺激因子, 它高效特异地作用于血管内皮细胞, 通过其在细胞表面的受体如 VEGFR1 等对其有强烈的促分裂作用和趋化作用, 与肿瘤的生长、迁移和侵袭密切相关^[8-10]。近年来的一系列研究相继发现, 某些肿瘤细胞不但能通过分泌 VEGF 来刺激内皮细胞的增殖促进血管的生成, 而且其自身也能表达 VEGFR1。VEGFR1 在体外可以被自身分泌的 VEGF 活化并引起肿瘤细胞的增殖和移动。这提示肿瘤细胞分泌的 VEGF 除了以旁分泌的形式作用于血管内皮细胞外, 可能还通过自分泌的途径与自身表达的 VEGFR1 结合, 刺激自身的增殖^[11-12]。造血细胞和内皮细胞是有着密切联系的, VEGF 对造血细胞的存活、发育、分化和迁移都起到了至关重要的作用。VEGF-A 可以促进造血干细胞的存活和分化^[13], 造血祖细胞及单核细胞的迁移可以通过 VEGFR1 通路来介导, VEGFR1 通路可能是通过调节造血祖细胞的迁移参与了肿瘤新生血管的形成^[14]。本研究采用 Western Blotting 法检测了茶氨酸和茶氨酸溴香

酰胺对 Hela 人宫颈癌细胞株中 VEGFR1 蛋白表达的影响, 发现茶氨酸和茶氨酸溴香酰胺均能抑制 VEGFR1 蛋白的表达, 而且茶氨酸溴香酰胺与茶氨酸相比抑制作用更显著, 是茶氨酸的 1.5 倍以上, 该结果提示 TBrC 作用的分子机制之一可能是通过下调 VEGFR1 受体蛋白的表达阻止肿瘤血管的生长来抑制肿瘤生长。肿瘤是一种细胞增殖和死亡均发生异常的疾病。实体肿瘤细胞主要有坏死和凋亡等死亡形式。目前一般认为, 在恶性肿瘤发生和发展过程中, 细胞凋亡抑制比细胞过度增殖所起的作用更重要^[15]。细胞凋亡不仅在肿瘤发生和发展中有重要意义, 而且化疗、放疗和生物治疗多为诱导凋亡来治疗肿瘤^[16]。

许多基因表达的蛋白参与细胞凋亡调控, 其中抗凋亡蛋白 Bcl-2 和促凋亡蛋白 Bax 对细胞凋亡起重要调节作用^[17-18], Bcl-2 和 Bax 等结合形成异构二聚体抑制细胞凋亡, Bax 表达水平的增加可拮抗 Bcl-2 的作用, 并促进细胞凋亡^[19]。Bcl-2/Bax 比例是否平衡是决定细胞进入凋亡与否的关键因素, 二者之间的相互作用决定了细胞死亡的阈值^[20]。本研究结果显示, 茶氨酸溴香酰胺明显下调了 Bcl-2/Bax 的比例, 促进了肿瘤细胞凋亡, 这可能是其抑制人宫颈癌 Hela 细胞体内外生长的重要作用机制之一。

值得讨论的是: 茶氨酸与茶氨酸溴香酰胺降低 Bcl-2/Bax 的比例差别不明显, 然而, 在体内外抑癌药效相差很大, 有几方面可能的原因。(1) 导致抑制癌细胞体内外生长的机制除细胞凋亡之外, 药物促进细胞自噬、细胞坏死、细胞周期停滞等也可能起重要作用, 茶氨酸溴香酰胺可能在这些方面较茶氨酸有更强的作用效果;(2) 茶氨酸溴香酰胺除了较茶氨酸有更强的抑制血管内皮生长因子受体 VEGFR1 表达的作用, 对其他与人宫颈癌细胞生长的受体和调控蛋白可能有更强的作用;(3) 茶氨酸溴香酰胺在细胞和动物体内可能会被酶分解为茶氨酸和溴代香豆素, 香豆素类化合物具有抗肿瘤作用^[21], 其作用的分子靶点可能不同于茶氨酸, 但二者共同作用可能会产生更强的体内外抑癌药效。本实验室目前正在进一步研究探索解析这些问题。

综上所述, 已经证实了茶氨酸溴香酰胺是一种有效抑制人宫颈癌 Hela 细胞体内外生长的抗癌活性成分, 其作用机制之一可能与诱导 Hela 细胞凋亡, 影响 VEGFR1-Bcl-2/Bax 信号传导通路蛋白表达有关, 其作用的分子靶点涉及到一系列重要的蛋白和酶的表达, 如下调 VEGFR1、Bcl-2 等蛋白的表

达, 上调 Bax 等蛋白的表达, 显著地抑制宫颈癌细胞生长、诱导凋亡, 从而发挥抗肿瘤作用。我们的研究结果将为扩大茶氨酸的应用、研发其衍生物如茶氨酸溴香酰胺等成为新型抗肿瘤药物提供有价值的科学依据。有关茶氨酸溴香酰胺作用的其他分子机制和作用的靶点有待进一步研究确认。

参考文献:

- [1] Jemal A, Bray F, Center M M, et al. Global cancer statistics[J]. *CA Cancer J Clin*, 2011, 61(2): 69-90.
- [2] 王小雪, 邱隽, 宋宇, 等. 茶氨酸的抗疲劳作用研究[J]. *中国公共卫生*, 2002, 18(3): 315-317.
- [3] Segesaka Y, Kakusa T, Kawamura K, et al. Pharmacological effect of theanine[J]. *The Organizing Committee of ISTS*, 1992: 362-365.
- [4] Zhang G, Miura Y, Yagasaki K. Effects of dietary powdered green tea and theanine tumor growth and endogenous hypolipidemia in hepatoma-bearing rats[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2002, 66(4): 711-716.
- [5] Zhang G, Miura Y, Yagasaki K. Inhibitory effects of theanine and sera from theanine-fed rats on receptor-mediated cancer cell beneath mesothelial-cell monolayers [J]. *Cytotechnology*, 2001, 36: 195-200.
- [6] Liu Q, Duan H, Luan J, et al. Effects of theanine on growth of human lung cancer and leukemia cells as well as migration and invasion of human lung cancer cells[J]. *Cytotechnology*, 2009, 59(3): 211-217.
- [7] Zhang G, Wang Y, Zhang Y, et al. Anti-cancer activities of tea epigallocatechin-3-gallate in breast cancer patients under radiotherapy[J]. *Current Molecular Medicine*, 2012, 12: 163-176.
- [8] Choi J H, Oh Y H, Park Y W, et al. Correlation of vascular endothelial growth factor-D expression and VEGFR-3-positive vessel density with lymph node metastasis in gastric carcinoma [J]. *Korean Medical Science*, 2008, 23: 592-597.
- [9] Onogawa S, Kitadai Y, Amioka T, et al. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF)-C and VEGF-D in early gastric carcinoma: correlation with clinicopathological parameters [J]. *Cancer Letters*, 2005, 226(1): 85-90.
- [10] Jho D, Mehta D, Ahmmed G, et al. Angiopoietin-1 opposes VEGF-induced increase in endothelial permeability by inhibiting TRPC1-dependent Ca^{2+} influx [J]. *Circ Res*, 2005, 96(12): 1282-1290.
- [11] Sato Y. VEGFR1 for lymphangiogenesis: an alternative signaling pathway[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008, 28(4): 604-605.
- [12] Herttuala S, Alitalo K. On the relationship of LDL and VEGFR1: not just a family affair [J]. *EMBO Rep*, 2007, 8(12): 1127-1128.
- [13] Gerber H P, Malik A K, Solar G P, et al. VEGF regulates haematopoietic stem cell survival by an internal autocrine loop mechanism [J]. *Nature*, 2002, 417(6892): 954-948.
- [14] Kaplan R N, Riba R D, Zacharoulis S, et al. VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche[J]. *Nature*, 2005, 438(7069): 820-827.
- [15] Nicholson D W, Thornberry N A. Apoptosis: Life and death decisions [J]. *Science*, 2003, 299(6504): 214-215.
- [16] Rosse T, Olivier R, Monney L. Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome c. [J]. *Nature*, 1998, 391(6666): 496-499.
- [17] Tsukahara S, Yamamoto S, Shew T T, et al. Inhalation of low level formaldehyde increases the bcl-2/bax expression ratio in the hippocampus of immunologically sensitized mice [J]. *Neuroimmunomodulation*, 2006, 13(2): 63281.
- [18] 王彤, 刘存志, 刘玉珍, 等. bcl2 /bax 基因调控机体细胞凋亡的机制研究进展[J]. *中国老年学杂志*, 2008, 28: 1658-1659.
- [19] Brooks C, Dong Z. Regulation of mitochondrial morphological dynamics during apoptosis by Bcl2 family proteins: a key in Bak [J]. *Cell Cycle*, 2007, 6(24): 3043-3047.
- [20] De Giorgi F, Lartigue L, Bauer M K, et al. The permeability transition pore signals apoptosis by directing bax translocation and multimerization [J]. *FASEB J*, 2002, 16: 607-609.
- [21] 刘芳, 兰支利, 邓芳, 等. 香豆素及其衍生物研究进展 [J]. *精细化工中间体*, 2006, 36: 7-11.