

# 茶氨酸和其衍生物茶氨酸氯香酰胺对高转移的人乳腺癌细胞生长的抑制作用

吴菲, 田绘绘, 季德鑫, 张华荣, 刘真真, 朱荣芹, 刘昆, 姚建文, 张国营\*

(烟台大学药学院 分子药理学实验室, 烟台 264005)

**摘要:** 旨在评估茶氨酸(T)和本实验室合成的新颖的茶氨酸衍生物-茶氨酸氯香酰胺(TCIC)对高转移的人乳腺癌MDA-MB-231细胞生长的抑制作用,并对其进行作用的机制进行初步探究。采用MTT法检测不同浓度的T和TCIC对MDA-MB-231细胞体外生长的影响,采用Western blotting对MDA-MB-231细胞中与癌细胞凋亡相关蛋白的表达以及药物作用可能的分子靶点进行检测。结果显示,随着浓度的增高,T和TCIC对人乳腺癌MDA-MB-231细胞体外生长的抑制作用逐渐增强,TCIC的抑制作用要明显强于T;T和TCIC均能够下调抗凋亡蛋白Bcl-2的表达水平,同时上调促凋亡蛋白Bax的表达水平,使Bcl-2/Bax比率减少。此外,T和TCIC均能抑制血管内皮生长因子受体VEGFR1和核转录因子NF- $\kappa$ B的表达,而TCIC的抑制作用要明显强于T。T和TCIC对这些蛋白水平的调节作用可能是抑制MDA-MB-231细胞生长的重要机制之一。这些结果表明,T和TCIC对治疗高转移的人乳腺癌可能具有广阔的应用前景。

**关键词:** 茶氨酸; 茶氨酸氯香酰胺; 高转移人乳腺癌; 体外抑制

中图分类号: S571.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X(2014)06-0911-06

## Inhibitory effects of theanine and TCIC on the growth of human breast cancer cells

WU Fei, TIAN Huihui, JI Dexin, ZHANG Huarong, LIU Zhenzhen,

ZHU Rongqin, LIU Kun, YAO Jianwen, ZHANG Guoying

(Laboratory of Molecular Pharmacology, School of Pharmacy, Yantai University, Yantai 264005)

**Abstract:** This study was to assess the inhibitory effects of theanine (T) and TCIC (a synthesized novel theanine derivative) on the growth of highly-metastasis human breast MDA-MB-231 cells and explore the mechanisms of such an inhibition. The MTT assay was used to evaluate the effects of different concentrations of T and TCIC on the grown of *in vitro* MDA-MB-231 cells. Western blot analysis was employed to detect the expressions of apoptosis-related proteins and the possible targets of drug actions in the MDA-MB-231 cells. The experimental results showed that the inhibitory effects of T and TCIC on the growth of MDA-MB-231 cells are gradually enhanced with the increase of the concentrations. TCIC showed a much stronger inhibition of cell growth than T. T. TCIC down-regulated the expression level of antiapoptotic Bcl-2 protein and up-regulated the expressions of proapoptotic Bax protein, leading to the reduction of Bcl-2/Bax ratio. In addition, T and TCIC reduced the protein level of NF- $\kappa$ B and VEGFR1. TCIC exhibited much stronger effects on regulating these proteins than T. The expression regulation of these proteins by TCIC and T might be one of the important mechanisms of the cell growth suppression. All these findings suggested that T and TCIC may have potential to the treatment of highly-metastasis human breast cancer.

**Key words:** theanine; TCIC; human breast cancer; growth inhibition *in vitro*

收稿日期: 2014-03-05

基金项目: 国家科技部十二五“863”项目(2012AA020206), 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: 吴菲, 硕士研究生。

\* 通信作者: 张国营, 博士, 教授。E-mail: zhang\_zhang6173@aliyun.com

乳腺癌因恶性肿瘤细胞非正常增殖和侵袭、破坏乳房正常组织、进一步发展引发转移和死亡,乳腺癌已成为全世界女性最常见的癌病之一,全球每年约有50万人死于乳腺癌<sup>[1]</sup>。虽然自20世纪90年代全球乳腺癌死亡率呈现出下降趋势,但乳腺癌仍是当前社会的重大公共卫生问题。

茶氨酸通常是指L-茶氨酸(L-theanine),是茶叶中特有的一种氨基酸,具有预防老年痴呆症、帕金森氏症及传导性神经功能紊乱等疾病;减少血浆胆固醇和增加肠道有益菌群;改善睡眠、降压安神和抗氧化等作用<sup>[2]</sup>。近年来,有研究表明茶氨酸具有一定的抗肿瘤活性,其中Sadzuka等发现茶氨酸有辅助抗癌活性<sup>[3]</sup>,Zhang等研究了绿茶粉末(PGT)和茶氨酸的直接抗癌作用<sup>[4]</sup>。但是,由于茶氨酸自身的脂溶性较小,不易被人体吸收,影响其生物活性的发挥。本实验室以茶氨酸为母体化合物,对其化学结构进一步改造,成功获得了它的衍生物茶氨酸氯香酰胺(TCIC)。在此基础上,进一步研究了茶氨酸以及茶氨酸氯香酰胺的抗癌作用。本研究展示了TCIC的化学合成方法,比较了TCIC与茶氨酸对高转移的人乳腺癌MDA-MB-231细胞生长的抑制作用,并初步探究其作用的分子机制和药物作用可能的分子靶点。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料

**1.1.1 药品与试剂** 人乳腺癌细胞(MDA-MB-231)购自中国科学院上海细胞库;非必需氨基酸、NF- $\kappa$ B抑制剂Bay和PI3K/Akt抑制剂Ly294002(Ly)购自碧云天生物技术研究所;胎牛血清、100 mg·L<sup>-1</sup>链霉素、100 U·m<sup>-1</sup>青霉素和DMEM培养基购自美国Hyclone公司;BCA工作液、MTT、Bax、Bcl-2、VEGFR1、NF- $\kappa$ B抗体、辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔、ECL Plus发光试剂盒购自美国Cell Signaling Technology Inc.公司;薄层色谱(TLC)采用烟台市化学工业研究所的薄层色谱预制硅胶(60GF254,厚0.2 mm),柱层析硅胶(200~300目)由烟台市化学工业研究所研制。所用试剂为市售化学纯或分析纯商品。

**1.1.2 仪器** 3111型二氧化碳培养箱(Thermo公司);全自动酶标仪(Bio-Tek公司);小型垂直电泳槽、电转移槽(BIO-RAD公司);离心机(Eppendorf公司);熔点用XT3A-显微熔点仪测定,温度未校正。质谱仪为TSQ QUANTUM ACCESS型三重四极杆串联质谱仪,配有ESI源以及Xcalibur数据处理软件(美

国Thermo Fisher公司);Agilent 1100自动进样液相色谱系统,包括四元输液泵,自动进样器,柱温箱(美国Agilent公司);色谱柱为Waters Xterra-C<sub>18</sub>,2.1×100 mm,3.5  $\mu$ m。核磁共振谱用AVNCE-500型核磁共振仪测定,TMS为内标。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 茶氨酸氯香酰胺(TCIC)的合成** 茶氨酸氯香酰胺合成线路如图1所示。取L-茶氨酸87 mg(0.5 mmol)溶于1 mL(0.7893 g;17 mmol)无水乙醇,搅拌下缓慢滴加SOCl<sub>2</sub> 0.055 mL(0.0902 g;0.76 mmol),室温下搅拌,TLC监测反应(TLC条件为氯仿:甲醇=5:1,茚三酮染色)进度。待反应完全时,减压蒸干用无水二氯甲烷旋蒸几次,去除易挥发杂质,即得茶氨酸乙酯。取第一步全部反应产物(茶氨酸乙酯),称取224 mg(1 mmol)5-氯代香豆素-3-COOH,取20 mL无水二氯甲烷,1.07 mL DIPEA(二异丙基乙胺)(0.7918 g;6.1 mmol),383 mg EDCI(2 mmol),室温(20~25℃)搅拌反应,TLC监测反应进度(TLC条件为石油醚:丙酮=1:1)。待反应完全,减压蒸除溶剂,得粗品。将粗品进行柱分离,V(丙酮):V(石油醚)=1:5进行洗脱,获得白色粉末状固体为最终产物。

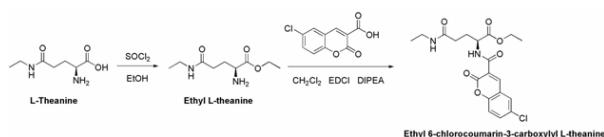


图1 茶氨酸氯香酰胺(TCIC)的合成  
Figure 1 The synthesis of TCIC from theanine

**1.2.2 细胞培养** 取高转移的人乳腺癌MDA-MB-231细胞,接种于含10%胎牛血清的DMEM培养基中,于37℃、5% CO<sub>2</sub>饱和湿度条件下进行常规培养,至细胞贴壁。2~3 d更换1次培养液,取对数生长期细胞用于实验。

**1.2.3 MTT法检测茶氨酸和TCIC对人乳腺癌MDA-MB-231细胞体外生长的抑制作用** 按照作者已报道的方法<sup>[5]</sup>,收集对数生长期MDA-MB-231细胞接种于96孔培养板(100  $\mu$ L·孔<sup>-1</sup>)中,每孔3×10<sup>3</sup>个细胞。24 h后加入终浓度分别为16、64、125和250  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup>的茶氨酸、TCIC,5  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup>的Bay和25  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup>的Ly,同时设空白对照组(加入等体积的溶媒),每个药物浓度设3个复孔。在37℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱中继续培养48 h后,加入10  $\mu$ L·孔<sup>-1</sup> MTT(5 g·L<sup>-1</sup>)溶液,继续培养4 h后,弃上清液,加入

DMSO 150  $\mu\text{L}\cdot\text{孔}^{-1}$ , 避光振荡 15 min, 使用酶联免疫检测仪检测 570 nm 波长 (参考波长 630 nm) 处各孔的吸光度 (OD) 值。同样方法处理 72 h 给药组。计算细胞相对增长率 (%) = (药物组 OD 值/空白对照组 OD 值  $\times$  100%)。

**1.2.4 蛋白印迹法检测茶氨酸和 TCIC 对 MDA-MB-231 细胞中相关蛋白表达的影响** 依据作者已报道的方法<sup>[6]</sup>, 常规收集各组经上述不同浓度的茶氨酸、TCIC、5  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 Bay 和 25  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 Ly 作用 48 h 的 MDA-MB-231 细胞, 裂解于含有 1  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 PMSF 的 RIPA 裂解液中, 冰浴下超声破碎, 12000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ , 4 $^{\circ}\text{C}$  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  $\mu\text{g}$ , 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 $^{\circ}\text{C}$  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。

### 1.3 统计学处理

以上所述各项实验均重复 3 次以上, 采用 SPSS 16.0 统计学软件对所有实验结果数据进行分析, 计量数据以 ( $\bar{x} \pm \text{SD}$ ) 表示, 采用 ANOVA 和 Bonferroni test 检验, 以  $P < 0.05$  具有统计学意义。

## 2 结果与分析

### 2.1 合成的茶氨酸氯香酰胺 (TCIC) 结构鉴定

合成获得的白色粉末状固体化合物为茶氨酸氯香酰胺, 其分子式  $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_6\text{Cl}$ , MW 为 408; 熔点 m.p. 为 118 ~ 120  $^{\circ}\text{C}$ , 经核磁共振和质谱 ( $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$  和 MS) 分析确认其分子结构特征:  $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 1.12 (*t*,  $J = 7.25$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.28 (*t*,  $J = 7.2$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2.15-2.40 (*m*, 4H,  $\text{CH}_2$ ), 3.26 (*m*, 2H,  $\text{NH-CH}_2$ ), 4.14 (*m*, 1H,  $\text{NH-CH}$ ), 4.21 (*q*,  $J = 7.1$  Hz, 2H,  $\text{O-CH}_2$ ), 5.47 (*br*, 1H,  $\text{NH}$ ), 6.91 (*d*,  $J = 8.6$  Hz, 1H, coumarin-8H), 7.25-7.28 (*m*, 2H, coumarin-5H,7H), 8.33 (*s*, coumarin-4H), 12.93 (*s*, 1H,  $\text{NH}$ ).  $^{13}\text{C-NMR}$   $\delta$ : 14.1 ( $\text{CH}_3$ ), 14.8 ( $\text{CH}_3$ ), 29.1 ( $\text{CH}_2$ ), 32.0 ( $\text{CH}_2$ ), 34.4 ( $\text{CH}_2$ ), 61.6 ( $\text{CH}$ ), 70.0 ( $\text{CH}_2$ ), 118.7 (C), 119.3 (CH), 123.4 (C), 130.9 (CH), 132.7 (CH), 159.6 (C), 166.3 (C), 170.7 (C), 171.2 (C). ESI-MS (*m/z*): 407.1 [M-H].

### 2.2 MTT 法检测茶氨酸和 TCIC 对 MDA-MB-231 细胞生长的抑制作用

MTT 结果显示 (如图 2): 随茶氨酸和 TCIC 浓度

的增加及药物作用时间的延长, MDA-MB-231 细胞相对增长率逐渐降低, 表明茶氨酸和 TCIC 对 MDA-MB-231 细胞的生长均有明显的抑制作用, 且 TCIC 的抑制作用要强于茶氨酸, 与对照组相比两者均有显著差异 ( $P < 0.05$ ), 且呈现出良好的剂量/时间依赖关系。

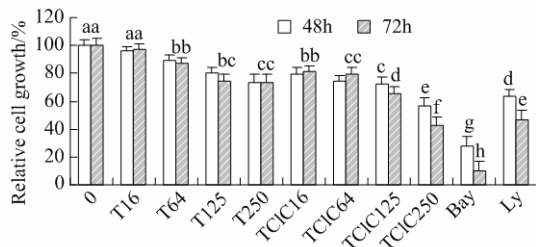


Figure 2 Effects of theanine (T) and TCIC on the growth of highly-metastatic human breast cancer MDA-MB-231 cells

Figure 2 茶氨酸 (T) 和其衍生物 TCIC 对高转移的人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞生长的影响

Figure 2 Effects of theanine (T) and TCIC on the growth of highly-metastatic human breast cancer MDA-MB-231 cells

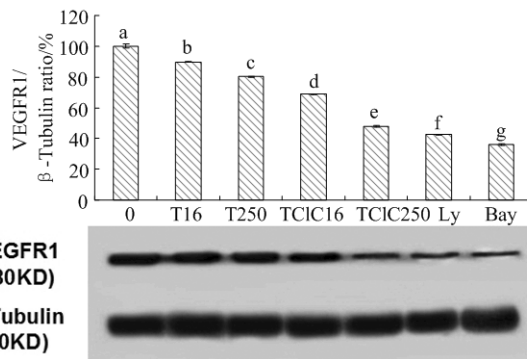


Figure 3 Effects of theanine (T) and TCIC on the protein expressions of VEGFR1 receptor in MDA-MB-231 cells

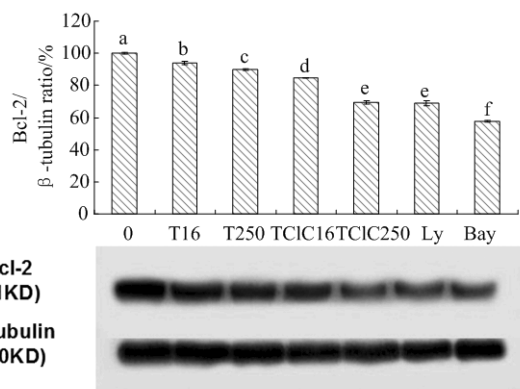
Figure 3 茶氨酸 (T) 和 TCIC 对 MDA-MB-231 细胞 VEGFR1 受体蛋白表达的影响

Figure 3 Effects of theanine (T) and TCIC on the protein expressions of VEGFR1 receptor in MDA-MB-231 cells

### 2.3 茶氨酸和 TCIC 对 MDA-MB-231 细胞系中生长和凋亡相关蛋白表达的影响

如图 3 所示, 不同浓度茶氨酸和 TCIC 作用 MDA-MB-231 细胞 48 h 后可显著下调血管内皮生长因子受体 VEGFR1 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关系, 浓度同为 250  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时, 茶氨酸组的抑制率为 20%, 而 TCIC 组的抑制率为 47%; 其中以 250

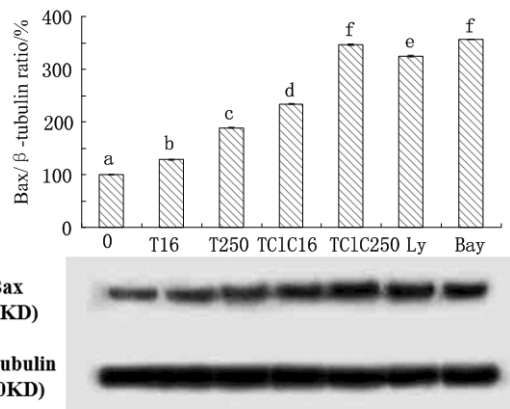
$\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组对 VEGFR1 蛋白下调作用最明显; NF- $\kappa$ B 抑制剂 Bay 和 PI3K/Akt 抑制剂 Ly294002(Ly)作为阳性对照对 VEGFR1 受体蛋白表达水平也表现为明显下调作用, 抑制率分别为 58%和 65%。



$\bar{x}\pm SD, n=3$ ; 不同字母(a-f)表示统计学差异显著( $P < 0.05$ )  
 $\bar{x}\pm SD, n=3$ ; Values with different letters (a-f) differ significantly ( $P < 0.05$ )

图 4 茶氨酸(T)和 TCIC 对 MDA-MB-231 细胞 Bcl-2 蛋白表达的影响

Figure 4 Effects of theanine (T) and TCIC on the expressions of Bcl-2 protein in MDA-MB-231 cells



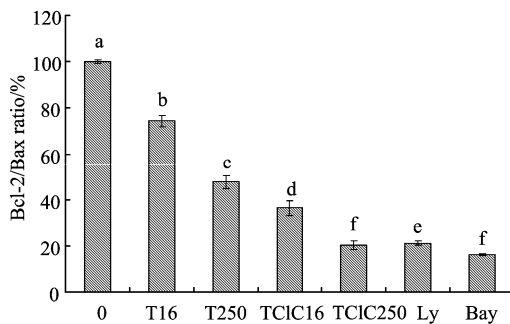
$\bar{x}\pm SD, n=3$ ; 不同字母(a-f)表示统计学差异显著 ( $P < 0.05$ )  
 $\bar{x}\pm SD, n=3$ ; Values with different letters (a-f) differ significantly ( $P < 0.05$ )

图 5 茶氨酸(T)和 TCIC 对 MDA-MB-231 细胞 Bax 蛋白表达的影响

Figure 5 Effects of theanine (T) and TCIC on the expressions of Bax protein in MDA-MB-231 cells

如图 4 所示, 不同浓度茶氨酸和 TCIC 作用 MDA-MB-231 细胞 48 h 后可显著下调抗凋亡 Bcl-2 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关系, 浓度同为  $250 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时, 茶氨酸组的抑制率为 14%, 而 TCIC 组的抑制率为 36%; 其中以  $250 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  组对 Bcl-2 蛋白下

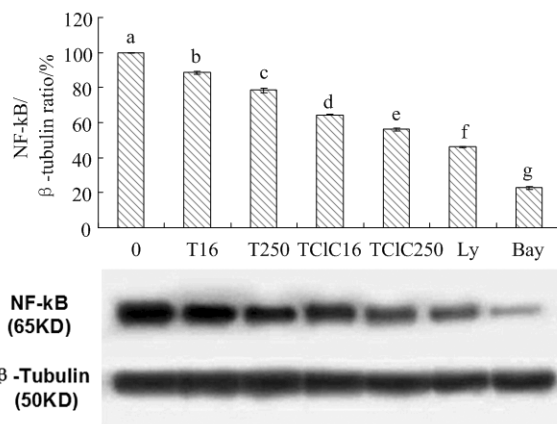
调作用最明显; Ly 和 Bay 作为阳性对照对 Bcl-2 蛋白表达水平也呈现出明显的下调作用, 抑制率分别为 36%和 43%。



$\bar{x}\pm SD, n=3$ ; 不同字母(a-f)表示统计学差异显著 ( $P < 0.05$ )  
 $\bar{x}\pm SD, n=3$ ; Values with different letters (a-f) differ significantly ( $P < 0.05$ )

图 6 茶氨酸(T)和 TCIC 对 MDA-MB-231 细胞凋亡相关蛋白 Bcl-2/Bax 比率的影响,

Figure 6 Effects of theanine (T) and TCIC on the apoptosis-associated protein Bcl-2/Bax ratio in MDA-MB-231 cells



$\bar{x}\pm SD, n=3$ ; 不同字母(a-g)表示统计学差异显著 ( $P < 0.05$ )  
 $\bar{x}\pm SD, n=3$ ; Values with different letters (a-g) differ significantly ( $P < 0.05$ )

图 7 茶氨酸(T)和 TCIC 对 MDA-MB-231 细胞 NF-κB 蛋白的影响,

Figure 7 Effects of theanine (T) and TCIC on the expressions of NF-κB protein in MDA-MB-231 cells

如图 5 所示, 不同浓度茶氨酸和 TCIC 作用 MDA-MB-231 细胞 48 h 后可显著上调促凋亡蛋白 Bax 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关系, 浓度同为  $250 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时, 茶氨酸组的上调率为 87%, 而 TCIC 组的上调率为 236%; 其中以  $250 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  组对 Bax 蛋白上调作用最明显; Ly 和 Bay 作为阳性对照对 Bax 蛋白表达水平也表现为明显上调作用, 上调率

分别为 215% 和 238%。

如图 6 所示, 不同浓度茶氨酸和 TCIC 作用 MDA-MB-231 细胞 48 h 后可下调抗凋亡蛋白 Bcl-2、上调促凋亡蛋白 Bax 的表达, 从而使 Bcl-2/Bax 蛋白比率降低, 与对照组相比有显著差异( $P < 0.05$ ), 且呈现良好的剂量依赖关系, 其中以  $250 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  组对 Bcl-2/Bax 蛋白比率下调作用最明显, 浓度同为  $250 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时, 茶氨酸组的抑制率为 55%, 而 TCIC 组的抑制率为 84%; Ly 和 Bay 作为阳性对照对 Bcl-2/Bax 蛋白比率也表现为明显下调作用, 其抑制率分别为 80% 和 85%。

如图 7 所示, 不同浓度茶氨酸和 TCIC 作用 MDA-MB-231 细胞 48 h 后可下调核转录因子 NF- $\kappa$ B 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关系, 浓度同为  $250 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时, 茶氨酸组的抑制率为 22%, 而 TCIC 组的抑制率为 47%; 其中以  $250 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  组对 NF- $\kappa$ B 蛋白下调作用最明显; Ly 和 Bay 作为阳性对照对 NF- $\kappa$ B 蛋白表达水平也表现为明显下调作用, 其抑制率分别为 57% 和 80%。

### 3 小结与讨论

近年来, 在人们生活水平不断提高的同时, 环境、精神及遗传等因素导致的疾病也呈现不断上升的趋势, 其中乳腺癌已成为一个世界范围内的严重危害妇女健康的恶性肿瘤之一, 我国其发病率也呈现出不断上升的趋势, 在许多城市乳腺癌已跃居女性恶性肿瘤的第一位, 而且发病年龄也越来越年轻化。近年来, 随着医药科学技术的进步, 乳腺癌的临床治疗进入到了一个新的阶段, 除了传统的手术治疗方法外, 药物方法也逐渐丰富起来<sup>[7-8]</sup>。

肿瘤的生长和转移依赖于肿瘤血管的生成, 它是一个包括血管内皮细胞增殖、迁移及细胞基质降解等多步骤的复杂过程。其中血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 在血管形成中起着重要的调控作用, 它不仅能促进血管的生成和发生, 还能增加血管通透性, 维护血管正常状态及完整性<sup>[9-11]</sup>。VEGFR1 作为 VEGF 的受体, 在病理状况下起着正向调控 VEGF 的作用。在一些自身表达 VEGFR1 的肿瘤细胞中, VEGF 能够通过 VEGFR1 促进肿瘤细胞的增殖及抗凋亡作用<sup>[12]</sup>。另外 VEGFR1 还可能通过调节造血祖细胞的迁移参与了肿瘤新生血管的形成<sup>[13]</sup>。本研究发现茶氨酸和茶氨酸氯香酰胺均能抑制 VEGFR1 的表达, 并且茶氨酸氯香酰胺的抑制作用较茶氨酸更显著, 该结果

表明茶氨酸和茶氨酸氯香酰胺可能是通过下调 VEGFR1 的表达来抑制肿瘤血管的生长, 进而表现出抗肿瘤活性。

肿瘤细胞是无限增殖的细胞, 肿瘤的发生发展不仅与细胞异常增殖和分化有关, 更与细胞凋亡的异常密切相关<sup>[14]</sup>。Bcl-2 基因是细胞凋亡基因家族中的一员, 它能抑制细胞的凋亡, 从而延长细胞的存活时间<sup>[15]</sup>。Bax 基因是促进细胞凋亡的一类基因, 其自身不能直接诱导细胞凋亡, 但能明显加速死亡信号进而引起细胞凋亡<sup>[16]</sup>。当 Bax 表达水平增加时可拮抗 Bcl-2 的作用, 进而促进细胞凋亡的发生<sup>[17]</sup>; Bcl-2/Bax 的比值决定了细胞凋亡是否发生<sup>[18]</sup>。本研究发现茶氨酸和茶氨酸氯香酰胺均可降低 Bcl-2/Bax 的比例, 而且茶氨酸氯香酰胺与茶氨酸相比作用更显著。研究结果表明茶氨酸和茶氨酸氯香酰胺可能是通过下调 Bcl-2/Bax 的比值, 诱导 MDA-MB-231 细胞发生凋亡, 进而抑制肿瘤生长。

NF- $\kappa$ B 是核转录因子中重要的一组蛋白, 具有重要的转录激活作用。有研究表明, NF- $\kappa$ B 参与调节许多粘附、侵袭转移以及凋亡相关因子的转录从而抑制肿瘤的生长与转移<sup>[19-20]</sup>。Trede 等<sup>[21]</sup>用鬼臼亚乙苷作用于人 T 细胞和早幼粒白血病细胞, 可活化 NF- $\kappa$ B 并诱导细胞凋亡。Luiz 等<sup>[22]</sup>的研究也证实 NF- $\kappa$ B 在肿瘤的生长, 逃逸细胞凋亡等方面发挥关键作用。本研究发现茶氨酸和茶氨酸氯香酰胺均能抑制 NF- $\kappa$ B 的表达, 而且茶氨酸氯香酰胺较茶氨酸抑制作用更明显。该结果表明茶氨酸和茶氨酸氯香酰胺可能是通过下调 NF- $\kappa$ B 的表达, 从而抑制肿瘤细胞生长, 促进其凋亡。

综上所述, 茶氨酸和茶氨酸氯香酰胺是一种有效抑制 MDA-MB-231 细胞生长的抗肿瘤活性成分, 其作用机制可能与诱导 MDA-MB-231 细胞凋亡, 抑制肿瘤血管的生成, 影响细胞凋亡信号传导通路中蛋白的表达有关, 其作用的靶点涉及到重要的蛋白和酶的表达, 如下调 VEGFR1、NF- $\kappa$ B 和 Bcl-2 等蛋白的表达, 上调 Bax 等蛋白的表达, 进一步诱导凋亡、抑制乳腺癌细胞生长, 从而发挥抗肿瘤的作用。我们的研究结果表明: 茶氨酸及其衍生物如茶氨酸氯香酰胺作为新颖的抗肿瘤药物候选化合物, 在肿瘤的临床治疗中具有进一步研究和开发的价值。

### 参考文献:

- [1] 顾伯康. 中医外科学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1995.
- [2] Bradshaw D M, Arceci R J. Clinical relevance of

- trans-membrane drug efflux as a mechanism of multidrug resistance[J]. *J Clin Oncol*, 1998, 16 (11): 3674-3690.
- [3] Sugiyama T, Sadzuka Y. Enhancing effects of green tea components on the antitumor activity of adriamycin against M5076 ovarian sarcoma[J]. *Cancer Lett*, 1998, 133(1): 19-26.
- [4] Zhang G, Miura Y, Yagasaki K, et al. Effects of dietary powdered green tea and theanine on tumor growth and endogenous hyper lipidemia in hepatoma-bearing rats[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2002, 66(4): 711-716.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] 沈镇宙, 陆劲松. 乳腺癌临床研究新进展[J]. *中国癌症杂志*, 2001, 11(5): 388.
- [8] 刘卫里, 武军宏. 乳腺癌的研究进展[J]. *社区医学杂志*, 2007, 5(18): 21.
- [9] Li Q F, Reis E D, Zhang W X, et al. Accelerated flap pre-fabrication with vascular endothelial growth factor[J]. *J Reconstr Microsurg*, 2000, 16(1): 45-49.
- [10] Roberts W, Palade G. Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor [J]. *J Cell Sci*, 1995, 108(6): 2369-2379.
- [11] Van der Zee R, Murohara T, Lou Z, et al. VEGF / VPF augments no release from quiescent rabbit and human vascular endothelium [J]. *Circulation*, 1997, 95(4): 1030-1037.
- [12] Yang A D, Camp E R, Fan F, et al. Vascular endothelial growth factor receptor-1 activation mediates epithelial to mesenchymal transition in human pancreatic carcinoma cells[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(1): 46-51.
- [13] 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.
- [14] 李娜, 高俊岩, 刘敏. 细胞凋亡与肿瘤的关系研究进展[J]. *当代医学*, 2009, 15(16): 13-14.
- [15] Trusolino L, Bertotti A, Comoglio P M. A signaling adapter function for  $\alpha 6 \beta 4$  integrin in the control of HGF-dependent invasive growth[J]. *Cell*, 2001, 107(5): 643-654.
- [16] Cheng E H, Kirsch D G, Clen R J, et al. Conversion of bcl-2 to a bax like death effector by caspases[J]. *Science*, 1997, 278: 1966-1968.
- [17] Brooks C, Dong Z. Regulation of mitochondrial morphological dynamics during apoptosis by Bcl-2 family proteins: a key in Bak[J]. *Cell Cycle*, 2007, 24(6): 3043-3047.
- [18] 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.
- [19] Nagai S, Washiyama K, Kwrimoto M, et al. Aberrant nuclear factor-kappa B activity and its participation in the growth of human malignant astrocytoma[J]. *Neurosurg*, 2002, 96(5): 909-917.
- [20] 王绩英, 赵雪强, 王昌明, 等. 三氧化二砷通过抑制 NF- $\kappa$ B 增强 TRAIL 诱导 A549 细胞凋亡的作用研究[J]. *四川大学学报: 医学版*, 2012, 43(6): 834-838.
- [21] Trede N S, Tsytsykova A V, Chatila T, et al. Transcriptional activation of the human TNF- $\alpha$  promoter by superantigen in human monocytic cells role of NF- $\kappa$ B[J]. *J Immunol*, 1995, 155(2): 902-908.
- [22] Luiz F, Wang Y, Czibere A. NF-kappa B-mediated repression of growth arrest and DNA-damage-inducible proteins 45 alpha and gamma is essential for cancer cell survival[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(37): 13618-136123.