

茶氨酸硝香酰胺对人宫颈癌细胞生长的抑制作用

刘真真, 朱荣芹, 吴菲, 田绘绘, 季德鑫, 张华荣, 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: 前期研究发现本试验合成的茶氨酸衍生物茶氨酸硝香酰胺(TNC)具有显著抑制人肺癌细胞体内外生长的作用, 为进一步探索研究 TNC 的抗癌活性和作用的分子机制, 以其母体化合物茶氨酸为对照, 评估现 TNC 对人宫颈癌细胞生长的抑制作用。采用 MTT 方法检测不同浓度的 TNC 对人宫颈癌细胞生长的影响, 应用蛋白质印迹法检测解析这些癌细胞中与凋亡和生长密切相关蛋白的表达和药物可能作用的分子靶点。此外, 通过建立动物肿瘤模型, 评价 TNC 对荷瘤裸鼠体内人宫颈癌 HeLa 肿瘤生长的抑制效果。实验结果显示, TNC 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; TNC 抑制人宫颈癌细胞生长的分子机制可能与抑制 VEGFR2-NF- κ B 信号传导通路相关。本研究结果提示, TNC 具有应用于临床治疗和(或)辅助治疗高转移人宫颈癌的潜力。

关键词: 茶氨酸硝香酰胺; 茶氨酸; 人宫颈癌; 肿瘤体内外生长; 抑制作用

中图分类号: S571.1; R730.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X(2015)05-0686-06

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

LIU Zhenzhen, ZHU Rongqin, WU Fei, TIAN Huihui, JI Dexin, ZHANG Huarong, LIU Kun, ZHANG Guoying
(Laboratory of Molecular Pharmacology, School of Pharmacy, Yantai University, Yantai 264003)

Abstract: The purpose of this study is to investigate the inhibitory effects of TNC, a synthesized theanine derivative from our laboratory on the growth of human cervical cancer cells and the molecular mechanisms of action. The MTT assay was used to evaluate the effects of TNC on the growth of human cervical cancer cells. Western blotting was employed to analyze the protein expressions and the possible molecular targets of action related to the growth inhibition and apoptosis in the cervical cancer cells treated with TNC. In addition, an animal tumor mode was established to assess the inhibitory effects of TNC on human cervical tumor growth in tumor-bearing nude mice. The experimental results show that TNC has enhanced the growth inhibition of the cervical cancer cells and cervical tumor by multifold as compared with theanine without detectable toxicity to the mice. Suppression of VEGFR2 and NF- κ B signaling pathway may be the important molecular mechanism of TNC's and theanine's action against the growth of human cervical cancer cells. Our results suggest that TNC may have the therapeutic and/or adjuvant therapeutic application in the treatment of human cervical cancer.

Key words: TNC; theanine; human cervical cancer; tumor growth *in vitro* & *in vivo*; inhibition

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, 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。

收稿日期: 2015-07-08

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(ZR2015HM004)共同资助。

作者简介: 刘真真, 硕士研究生。

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

茶氨酸是山茶科植物茶叶特有的酰胺类物质, 在干茶叶中含量大约为 1%~2%^[1]。茶氨酸是谷氨酸盐的衍生物, 通过干扰谷氨酸盐的代谢来抑制癌细胞的生长^[2]。研究表明: 茶氨酸显著地抑制大鼠肝癌细胞的生长、侵袭和肿瘤的生长^[3-4]; 茶氨酸抑制大鼠肝癌转移作用甚至超过 2% 绿茶粉末^[3]。然而, 茶氨酸的高水溶性限制了它的抗癌作用。为此, 作者以茶氨酸为母体化合物, 对其化学结构进一步改造修饰, 成功获得了它的衍生物茶氨酸硝香酰胺 (TNC), 证实它具有显著的抑制肺癌细胞和肿瘤生长的作用^[5]。在目前的研究中, 我们以 TNC 与茶氨酸和抗癌制剂相比较, 重点探索研究它们对人宫颈癌细胞体内外生长的抑制作用与其作用的分子机制以及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 NF- κ B 抑制剂 Bay 和 PI3K/Akt 抑制剂 Ly294002(Ly)以及非必须氨基酸购自碧云天生物技术研究所; 胎牛血清、100 mg·L⁻¹ 链霉素、100 U·m⁻¹ 青霉素和 DMEM 培养基购自美国 Hyclone 公司; BCA 工作液、苔芬兰染色液、MTT、VEGFR2、NF- κ B、Bax、Bcl-2、 β -tubulin 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); TE2000-U 型倒置荧光显微镜(Nikon 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)。熔点用 XT3A-显微熔点仪测定, 温度未校正。质谱仪 TSQUANTUMACCE-SS 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-C18, 2.1×100 mm, 3.5 μ m。核磁共振谱 AVNCE-500 型核磁共振仪用测定, TMS 为内标。

1.2 实验方法

1.2.1 茶氨酸硝香酰胺 (TNC) 的合成 茶氨酸硝香酰胺合成线路如图 1 所示。取 L-茶氨酸 87 mg

(0.0005 mol)溶于无水乙醇 1 mL (0.7893 g; 0.017 mol), 搅拌下缓慢滴加 SOCl₂ 0.055 mL (0.0902 g; 0.000 76 mol), 室温下搅拌, TLC 监测反应 (TLC 条件: 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 269 mg (0.001 mol) 5-硝基香豆素-3-COOH, 取 20 mL 无水二氯甲烷, 1.07 mL DIPEA (二异丙基乙胺) (0.7918 g; 0.0061 mol), 383 mg EDCI (0.002 mol), 室温 (20~25℃) 搅拌反应, TLC 监测反应进度 (TLC 条件: 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, 石油醚装柱, V(丙酮):V(石油醚)=1:5 进行洗脱, 获得浅黄色粉末状固体为最终产物。

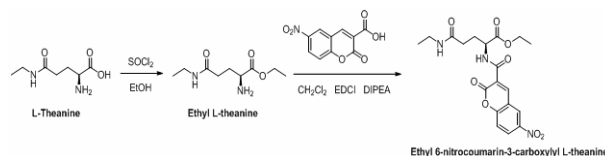


图 1 茶氨酸硝香酰胺 (TNC) 的制备方案

Figure 1 Scheme of preparation of ethyl 6-nitrocoumarin-3-carboxylate L-theanine (TNC)

1.2.2 细胞培养 取高转移的 HeLa 人宫颈细胞系 (购自中科院北京肿瘤研究所) 置于含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基中, 37℃、5% CO₂ 饱和湿度条件下常规培养, 细胞呈贴壁状态, 2~3 d 换培养液 1 次, 取对数生长期细胞用于实验。

1.2.3 MTT 法检测 TNC 和茶氨酸对 HeLa 细胞株生长的影响 根据作者已经报道的方法, 收集对数生长期 HeLa 细胞接种于 96 孔培养板 (100 μ L·孔⁻¹) 中, 每孔 3×10^3 个细胞。24 h 后加入茶氨酸、TNC 和茶氨酸终浓度分别为 16、64、125、250、500 μ mol·L⁻¹, 5 μ mol·L⁻¹ 的 Bay 和 25 μ mol·L⁻¹ 的 Ly, 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% CO₂ 培养箱中继续培养 48 h 后, 加入 10 μ L·孔⁻¹ MTT (5 g·L⁻¹) 溶液, 继续培养 4 h 后, 弃上清液, 加入 DMSO 150 μ L·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, 计算细胞相对生长率 (%) = (药物组 OD 值/空白对照组 OD 值×100%)。

1.2.4 蛋白印迹法检测 TNC 和茶氨酸对 HeLa 细胞中相关蛋白表达的影响 依据已经报道的方法^[5-6], 常规收集各组经上述不同浓度的茶氨酸、TNC、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 $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 PMSF 的 RIPA 裂解液中,冰浴下超声破碎, $12\ 000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 4°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°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。

1.2.5 肿瘤动物模型建立与检测 TNC 和茶氨酸对 HeLa 宫颈癌体内肿瘤生长的影响 根据报道的方法^[7],收集对数生长期的 HeLa 宫颈癌细胞并制备成浓度为 1.5×10^7 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ 的单细胞悬液,在裸鼠右大腿部皮下接种 0.2 mL 细胞悬液,每天观察各注射点有无红肿破溃。7 d 后,注射局部出现明显皮丘,10 d 后,所有裸鼠均出现直径 $10\sim 12 \text{ mm}$ 的皮下结节,移植瘤模型建立。使用该模型,开始实验用药,实验分阴性对照组(溶媒对照)、阳性抗癌药物顺铂组 ($1.5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)、茶氨酸组 ($60 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 和 TNC 组 ($60 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),腹腔注射,每日 1 次,每 2 日称小鼠体重,用药 28 d 后,处死小鼠,称量肿瘤重量和体积以及小鼠体重。病理解剖,检测评估组织病变等。

1.3 统计学处理

各项实验重复 3 次以上,采用 SPSS 16.0 统计学软件对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。

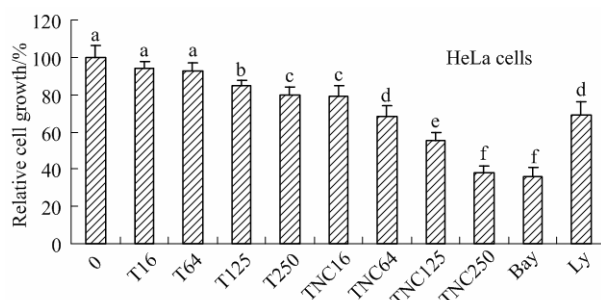
2 结果与分析

2.1 合成的茶氨酸硝香酰胺(TNC)结构鉴定

合成获得的浅黄色粉末状固体化合物为茶氨酸硝香酰胺, TNC 的分子结构特征如下:

m.p.: $165\text{--}167^\circ\text{C}$. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): 1.14 (t, 3H, $J = 7.2 \text{ Hz}$, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{NH}$), 1.31 (t, 3H, $J = 7.1 \text{ Hz}$, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$), 2.13–2.21 (m, 1H, $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CHCO}$), 2.30–2.45 (m, 3H, $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CHCO}$), 3.25–3.32 (m, 2H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{NH}$), 4.24 (q, 2H, $J = 7.1 \text{ Hz}$, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$), 4.76–4.81 (m, 1H, $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CHCO}$), 6.32 (br s, 1H, NH), 7.60 (d, 1H, $J = 9.0 \text{ Hz}$, chromene H8), 8.54 (dd, 1H, $J = 9.0, 2.5 \text{ Hz}$, chromene H7), 8.73 (d, 1H, $J = 2.5 \text{ Hz}$, chromene H5), 9.04 (s, 1H, chromene H4), 9.18 (br d, 1H, $J = 7.7 \text{ Hz}$, NH). $^{13}\text{C NMR}$: 13.9 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{NH}$), 14.5 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$), 28.2 ($\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CHCO}$), 32.2 (COCH_2), 34.2 (CH_2NH), 52.4 (OCH_2), 61.7 (CHCO),

117.8 (chromene C8), 118.3 (chromene C3), 119.9 (chromene C4 α), 125.6 (chromene C4), 128.3 (chromene C6), 144.3 (chromene C5), 147.4 (chromene C7), 157.4 (chromene C8 α), 159.5 (C=O at chromene C3), 160.3 (chromene C2), 170.9 (NHC=O), 171.1 (OC=O). ESI-MS m/z 420 [M+H], 442 [M+Na], 861 [2M+Na]. Anal. Calc. for $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_8$ (%): C 54.41; H 5.05; N 10.02. Found (%) C 54.19; H 5.00; N 9.87.



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

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

图 2 TNC 对人宫颈癌 HeLa 细胞生长的影响

Figure 2 Effects of Theanine (T) and TNC on the growth of human cervical cancer cells

2.2 茶氨酸和 TNC 对 HeLa 细胞生长的影响

如图 2 所示,经药物处理 48 h 后 MTT 结果显示: HeLa 细胞相对生长率随茶氨酸 (T) 和 TNC 浓度的增加而逐渐减少, TNC 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 ($P < 0.05$),抑制半数细胞生长的 IC_{50} 浓度较茶氨酸组低于 2 倍以上,并且呈现良好的剂量依赖关系,阳性对照组 NF- κB 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。

2.3 TNC 对 HeLa 细胞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 (T) 和 TNC 作用 HeLa 细胞 48 h 后可显著下调 VEGFR2 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 $250 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下,茶氨酸组的抑制率为 42%,而 TNC 组的抑制率为 70%;其中以 $250 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组对 VEGFR2 蛋白下调作用最明显; Bay 和 Ly 作为阳性对照对 VEGFR2 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 68% 和 72%。

如图 4 所示,不同浓度茶氨酸 (T) 和 TNC 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 TNC 组的抑制率为 60%; 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 63%和 62%。

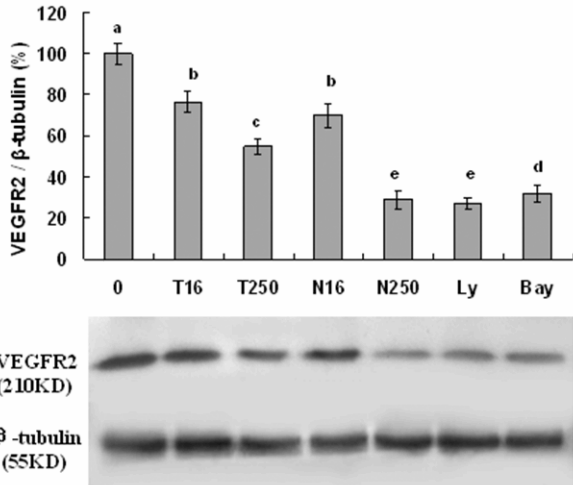


Figure 3 Effects of T and TNC on the receptor protein expression of VEGFR2 in HeLa cells

图 3 茶氨酸和 TNC 对 HeLa 细胞 VEGFR2 受体蛋白表达的影响

Figure 3 Effects of T and TNC on the receptor protein expression of VEGFR2 in HeLa cells

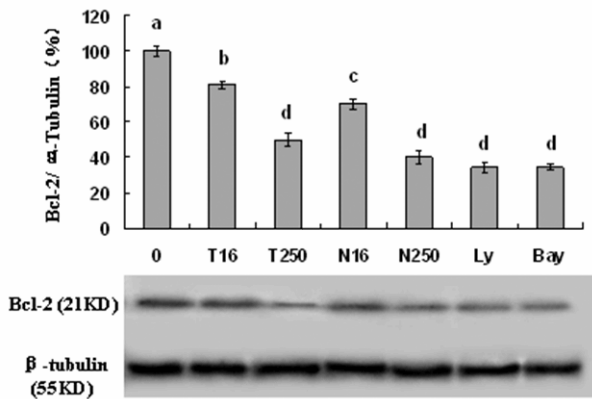


Figure 4 Effects of T and TNC on the Bcl-2 protein level in HeLa cells

图 4 茶氨酸和 TNC 对 HeLa 细胞凋亡相关蛋白 Bcl-2 影响

Figure 4 Effects of T and TNC on the Bcl-2 protein level in HeLa cells

如图 5 所示, 不同浓度茶氨酸 (T) 和 TNC 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 258%, 而 TNC 组的上调率为 355%; 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 250%和 312%。

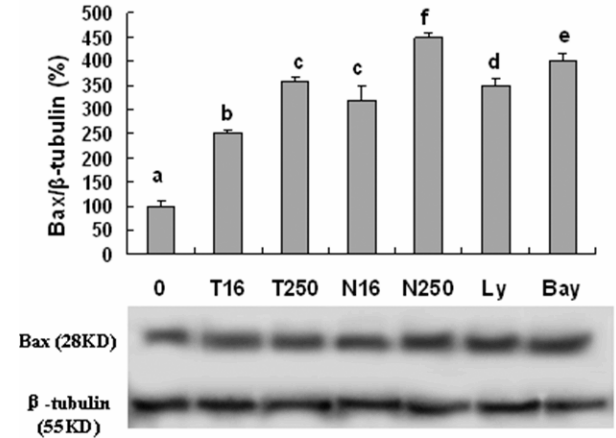


Figure 5 Effects of T and TNC on the Bax protein level in HeLa cells

图 5 茶氨酸和 TNC 对 HeLa 细胞凋亡相关蛋白 Bax 的影响

Figure 5 Effects of T and TNC on the Bax protein level in HeLa cells

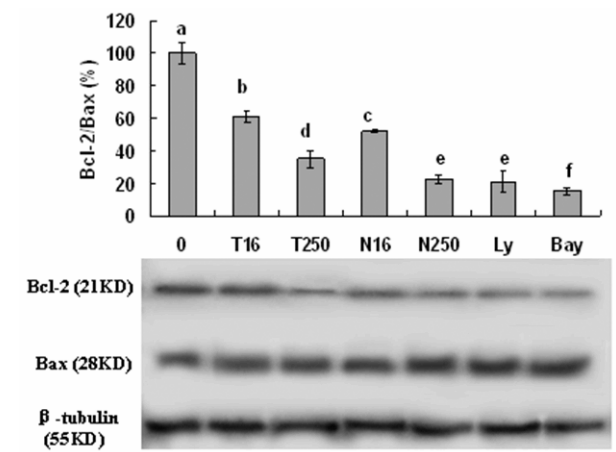
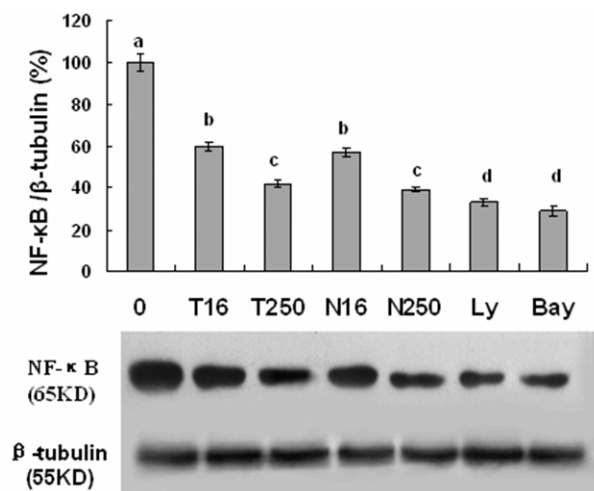


Figure 6 Effects of T and TNC on the protein Bcl-2/Bax ratio in HeLa cells

图 6 茶氨酸和 TNC 对 HeLa 细胞凋亡相关蛋白 Bcl-2/Bax 比率的影响

Figure 6 Effects of T and TNC on the protein Bcl-2/Bax ratio in HeLa cells

如图 6 所示, 不同浓度茶氨酸 (T) 和 TNC 作用 HeLa 细胞 48 h 后可减少抗凋亡蛋白 Bcl-2/促凋亡



$\bar{X} \pm SD$, $n=3$; 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 7 茶氨酸和其衍生物 TNC 对高转移的 HeLa 细胞核转录因子 NF-κB 蛋白表达的影响

Figure 7 Effects of T and TNC on the NF-κB protein expression in HeLa cells

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 66%,而 TNC 组的抑

制率为 75%; 阳性对照 Ly 和 Bay 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 76%和 86%。

如图 7 所示,不同浓度茶氨酸和 TNC 作用 HeLa 细胞 48 h 后可下调 NF-κB 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,其中以 $250 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组对 NF-κB 蛋白下调作用最明显;在同样 $250 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下,茶氨酸组的下调率为 52%,而 TNC 组的下调率为 60%;阳性对照 Bay 和 Ly 对 NF-κB 蛋白表达水平也表现为明显下调作用,其下调率分别为 62%和 64%。

2.3 TNC 对 HeLa 人宫颈癌体内肿瘤生长抑制作用

如表 1 所示,茶氨酸组、TNC 组、顺铂阳性对照组与阴性对照组相比,差异有统计学意义, TNC 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、TNC 给药组的抑瘤率分别为 36.8%、22.4%和 67.1%,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, TNC 抑制肿瘤效果超过茶氨酸近 3 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 TNC 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。

表 1 茶氨酸和其衍生物茶氨酸硝香酰胺对荷瘤裸鼠人宫颈癌 HeLa 肿瘤生长的抑制作用 (28 d 治疗结果)

Table 1 Inhibitory effects of theanine and its derivative TNC 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 No. of mice		裸鼠体重/g Weight of mice		肿瘤重量/g Weight of tumor $\bar{X} \pm SD$	肿瘤抑制率/% Inhibitory rate of tumor
			开始 Start	结束 End	开始 Start	结束 End		
对照 (溶媒)	-	ip	6	6	20.5 ± 1.2	23.6 ± 1.1	7.6 ± 1.5 ^a	-
顺铂阳性对照	1.5	ip	6	6	20.9 ± 1.1	21.4 ± 1.2	4.8 ± 0.8 ^b	36.8
茶氨酸	60	ip	6	6	20.8 ± 0.9	25.8 ± 1.3	5.9 ± 1.1 ^b	22.4
茶氨酸硝香酰胺	60	ip	6	6	20.6 ± 1.1	25.1 ± 1.2	2.5 ± 0.9 ^c	67.1

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

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

3 讨论与结论

在目前的研究中,我们证实:我们合成的茶氨酸衍生物茶氨酸硝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 2 倍多,在体内对人宫颈癌在裸鼠体内生长的抑制率是茶氨酸的近 3 倍。此外,我们进一步研究确认了茶氨酸硝香酰胺作用人宫颈癌的分子机制和药物可能的相关靶点

VEGFR2、NF-κB、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 VEGFR 受体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 VEGFR2。VEGFR2 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 VEGFR2 结合, 刺激自身的增殖。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^[9], VEGFR2 是 VEGF 的主要功能受体, 参与了缺血性疾病的血管新生、血管损伤后的重塑以及肿瘤的发生、迁移等诸多病理过程^[10]。本研究采用 Western Blotting 法检测了茶氨酸和茶氨酸硝香酰胺对 HeLa 人宫颈癌细胞株中 VEGFR2 蛋白表达的影响, 发现茶氨酸和茶氨酸硝香酰胺均能抑制 VEGFR2 蛋白的表达, 而且茶氨酸硝香酰胺与茶氨酸相比抑制作用更显著, 该结果提示 TNC 可能是通过下调 VEGFR2 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作用更重要^[11]。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^[12]。

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^[13-14], 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^[15]。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^[16]。本研究结果显示: 茶氨酸硝香酰胺明显下调了 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。

综上所述, 本研究结果表明: 茶氨酸硝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, 其作用机制可能与诱导 HeLa 细胞凋亡, 影响 VEGFR2- NF- κ B 信号传导通路蛋白表达有关, 其作用的靶点涉及到一系列重要的蛋白和酶的表达, 如下调 VEGFR2、NF- κ B 和 Bcl-2 蛋白的表达, 上调 Bax 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硝香酰胺等成为新型抗肿瘤药物提供有价值的科学依据。

参考文献:

- [1] Graham H N. Green tea composition, consumption and polyphenol chemistry [J]. *Prev Med*, 1992, 21(3): 334-350.
- [2] 杨建华. 茶氨酸抗肿瘤作用及其机制研究进展[J]. *国外医学肿瘤学分册*, 2004, 31(9): 686-687.
- [3] Zhang G, Miura Y, Yagasaki K. Effects of dietary powdered green tea and theanine on tumor growth and endogenous hypodiploidy in hepatoma-bearing rats [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2002, 66(4): 711-716.
- [4] Zhang G, Miura Y, Yagasaki K. Inhibitory effects of the theanine and sera from theanine-fed rats on receptor-mediated cancer cell beneath mesothelial-cell monolayers [J]. *Cytotechnology*, 2001, 36(1-3): 195-200.
- [5] Zhang G, Ye X, Ji D, et al. Inhibition of lung tumor growth by targeting EGFR/VEGFR-Akt/ NF- κ B pathways with novel theanine derivatives[J]. *Oncotarget*, 2014(5): 18; 8528-8543.
- [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(2): 163-176.
- [7] Zhang H, Liu G, Zeng X, et al. Fabrication of genistein-loaded biodegradable TPGS-b-PCL nanoparticles for improved therapeutic effects in cervical cancer cells[J]. *Int J Nanomedicine*. 2015, 10: 2461-73.
- [8] Choi JH, Oh YH, Park YW, 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] Gerber HP, Malik AK, Solar GP, et al. VEGF regulates haematopoietic stem cell survival by an internal autocrine loop mechanism[J]. *Nature*, 2002, 417(6892): 954-8.
- [10] Chin Y R, Toker A. Function of Akt/PKB signaling to cell motility, invasion and the tumor stroma in cancer [J]. *Cell Signal*, 2009, 21(4): 470-476.
- [11] Nicholson D W, Thornberry NA Apoptosis: Life and death decisions[J]. *Science*, 2003, 299(6504): 214-215.
- [12] 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.
- [13] Tsukahara S, Yamamoto S, Shew T T, et al. Inhalation of low level formaldehyde increases the bcl2/bax expression ratio in the hippocampus of immunologically sensitized mice[J]. *Neuroimmunomodulation*, 2006; 13(2): 63281.
- [14] 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.
- [15] 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): 3043271.
- [16] 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.