

# 茶氨酸衍生物茶溴香酰胺脂质体对人肺癌细胞生长和迁移的抑制作用

闫春燕<sup>1</sup>, 刘辉<sup>2</sup>, 朱荣芹<sup>1</sup>, 刘真真<sup>1</sup>, 李 箐<sup>1</sup>, 孙考祥<sup>1</sup>,  
杨美玲<sup>1</sup>, 盖 静<sup>1</sup>, 郑晓慧<sup>1</sup>, 吴犇昊<sup>3</sup>, 张国营<sup>1\*</sup>

- (1. 烟台大学药学院分子药理学实验室, 烟台大学新型制剂与生物技术药物研究山东省高校协同创新中心, 分子药理和药物评价教育部重点实验室(烟台大学), 烟台 264005;  
2. 烟台市毓璜顶医院药学部, 烟台 264001; 3. 山东营东颖昊生物科技有限公司, 烟台 264670)

**摘 要:** 为了探索研究茶氨酸衍生物茶溴香酰胺制备的脂质体(TBrC-L)对人非小细胞肺癌 A549 细胞生长和迁移的抑制作用与其分子机制, 采用薄膜分散法制备了 TBrC-L, 通过 MTT 法检测不同浓度的 TBrC-L 对人肺癌 A549 细胞生长的抑制作用; 使用流式细胞术检测 TBrC-L 对人肺癌 A549 细胞凋亡的诱导作用; 利用 Transwell chamber 法观察 TBrC-L 对人肺癌 A549 细胞迁移作用的影响; 应用蛋白质印迹法检测人肺癌 A549 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。实验结果显示, TBrC-L 对人肺癌 A549 细胞生长和迁移有显著的抑制作用, 促进肿瘤细胞凋亡、抑制肿瘤细胞生长和迁移可能是其抗人肺癌作用的重要机制, 其作用的分子机制涉及到抑制 EGFR、VEGFR1、VEGFR2 和 Met 受体介导的 Akt 和 NF- $\kappa$ B 信号传导通路, 本研究结果提示, TBrC-L 具有应用于临床治疗和(或)辅助治疗人肺癌的潜力。

**关键词:** 茶溴香酰胺脂质体; 人肺癌; 生长和迁移; 抑制作用机制

中图分类号: S571.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X(2018)01-0015-10

## Inhibitory effects of theanine derivative TBrC-prepared liposome on the growth and migration of human lung cancer cells

YAN Chunyan<sup>1</sup>, LIU Hui<sup>2</sup>, ZHU Rongqin<sup>1</sup>, LIU Zhenzhen<sup>1</sup>, LI Zheng<sup>1</sup>, SUN Kaoxiang<sup>1</sup>,  
YANG Meiling<sup>1</sup>, GE Jing<sup>1</sup>, ZHENG Xiaohui<sup>1</sup>, WU Benhao<sup>1</sup>, ZHANG Guoying<sup>1</sup>

- (1. Laboratory of Molecular Pharmacology, School of Pharmacy, Yantai University, Collaborative Innovation Center of Advanced Drug Delivery System and Biotech Drugs in Universities of Shandong, Key Laboratory of Molecular Pharmacology and Drug Evaluation (Yantai University), Ministry of Education, Yantai University, Yantai 264005; 2. Department of Pharmacy, Yuhuangding Hospital of Yantai, Yantai 264001; 3. Shandong Yingdong Yinghao Biotechnology Inc, Yantai 264670)

**Abstract:** This study is to investigate the inhibitory effects of theanine derivative TBrC-prepared liposome (TBrC-L) on the growth and migration of human non-small-cell lung cancer (NSCLC) A549 cells and its molecular mechanism. The MTT assay and flow cytometry were used to detect the effects of different concentrations of TBrC-L on the growth and apoptosis of human lung cancer A549 cells, respectively. The transwell chamber assay and western blot were applied to determining the effects of TBrC-L on the cancer cell migration and related protein expressions, respectively. The results showed that TBrC-L significantly inhibited the cancer cell growth and migration and induced apoptosis in human lung cancer A549 cells. The suppression of the cancer cell growth and migration as well as the induction of apoptosis may be the important anticancer activities of TBrC-L against the human lung cancer A549 cells. The molecular mechanism of TBrC-L action may be involved in restraining the EGFR-, VEGFR1-, VEGFR2- and Met-mediated signaling transduction pathways of Akt and NF- $\kappa$ B in the human

收稿日期: 2017-08-31

基金项目: 国家科技部十二五“863”项目(2012AA020206), 十三五国家重点研发计划项目(2017YFB0702600)和山东省自然科学基金项目(ZR2015HM004)共同资助。

共同第一作者: 闫春燕, 硕士研究生。E-mail: yancy0611@163.com; 刘辉, 主管药师。E-mail: 1140219250@qq.com

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

cancer cells. The results suggested that TBrC-L may have the potential to be used in clinical treatment and/or adjuvant treatment of human non-small-cell lung cancer.

**Key words:** TBrC-L; human lung cancer; growth and migration; mechanisms of inhibition

肺癌是威胁人类健康的重大慢性疾病之一,尤其是近年来世界各地肺癌的发病率和死亡率呈逐渐上升趋势。肺癌是一种常发于支气管黏膜上皮组织的恶性肿瘤,其发病率和死亡率居高不下,其中,占肺癌总数的80%以上的为非小细胞肺癌,5年的生存期仅有15%左右<sup>[1]</sup>。目前肺癌的治疗方法有外科手术、化疗、放射治疗和中医药治疗、分子靶向治疗等<sup>[2]</sup>。早期肺癌以外科手术为主,但是约80%的患者在确诊时就已属于中晚期,癌细胞已发生了远处转移,此时最好的治疗方法就是化疗,但化疗会抑制骨髓造血系统,使白细胞和血小板下降,机体易并发感染甚至死亡<sup>[3]</sup>。随着抗肺癌药物的发展,研发分子靶向药物和药物新剂型如纳米脂质体治疗肺癌越来越受到关注。与传统化疗无选择性杀伤细胞相比,分子靶向药物和纳米脂质体新药治疗针对肿瘤细胞发挥作用,从而提高了肿瘤治疗的精确性,减少了毒副作用,增加了患者生存质量<sup>[4]</sup>。

本研究课题组前期以茶氨酸为母体化合物合成了它的衍生物茶溴香酰胺(TBrC),并已证实其具有抑制小鼠肺癌肿瘤和人宫颈癌生长的作用<sup>[5-6]</sup>。为了探索其临床治疗人非小细胞肺癌的潜力,研发抗癌新药,本研究将TBrC制备成纳米脂质体剂型(TBrC-L)以提高药物溶解性,增强其靶向性,减少药物潜在的毒副作用。在此基础上,进一步实验研究TBrC-L对人非小细胞肺癌A549细胞生长和迁移的影响与其作用的分子机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 药品与试剂** PI3K (Phosphatidylinositol 3-kinase) /Akt 抑制剂 Ly294002 (Ly) 和 NF-κB (Nuclear factor-kappaB) 抑制剂 Bay11-7082 (Bay) 及非必须氨基酸购自碧云天生物技术研究; 胆固醇购自阿拉丁公司; 氢化大豆磷脂酰胆碱购自德国 Lipoid GmbH; 二甲基亚砜(DMSO) 购自天津科密欧公司; 紫杉醇脂质体(P-L) 购自烟台毓璜顶医院; 胎牛血清、100 mg·L<sup>-1</sup> 链霉素、100 mg·L<sup>-1</sup> 青霉素和 DMEM 培养基购自美国 Hyclone 公司; BCA 工作液、MTT 试剂、相关抗体 EGFR (Epidermal growth factor receptor)、VEGFR1 (Vascular endothelial growth factor receptor-1)、VEGFR2 (Vascular en-

dothelial growth factor receptor-2)、NF-κB、Met (Mesenchymal-epithelial transition factor)、Akt、pAkt (Ser 473), Bax (Bcl-2 Associated X protein)、Bcl-2 (B cell lymphoma-2)、caspase-3 (Cysteine aspartate-specific protease-3)、PARP-1 (Poly ADP-ribose polymerase-1)、p53、p21、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)和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。

**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(Biotek 公司); 小型垂直电泳槽、电转移槽 (BIO-RAD 公司); 离心机 (Eppendorf 公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 茶溴香酰胺纳米脂质体(TBrC-L)的制备** 以茶溴香酰胺(结构式如图1所示)为原料,采用薄膜分散法<sup>[7]</sup>制备茶溴香酰胺纳米脂质体。称取适量茶溴香酰胺、卵磷脂和胆固醇置于250 mL的烧瓶中,倒入适量氯仿溶解完全,于40℃水浴中减压旋蒸除去氯仿后继续旋蒸30~40 min,直至形成一层均匀干燥的薄膜。而后加入适量生理盐水,在37℃的水浴锅中旋转水化2 h,后在超声波中超声震荡2 h,使膜完全脱落,即可得到茶溴香酰胺纳米脂质体混悬液。

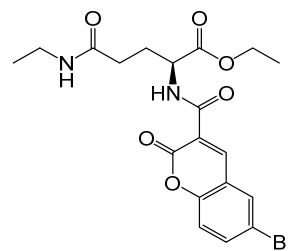


图1 茶溴香酰胺的化学结构式  
Figure 1 Chemical structure of TBrC

载药纳米脂质体制备过程涉及的影响因素很多,以载药脂质体的包封率为参考指标<sup>[8]</sup>,依次对磷脂与胆固醇的质量比、脂药比、有机相用量、水相用量分别针对各因素不同水平进行了筛选,前一因素的最优水平在后一因素筛选时采用,每个因素每个水平制备3份平行样品,以最佳优化的处方制备茶溴香酰胺纳米脂质体用于实验研究。

**1.2.2 细胞培养** 取出冻存的人非小细胞肺癌

A549 细胞(购自中科院上海细胞所), 迅速置于 37 °C 水浴中, 至细胞悬液完全融化后, 转移至含培养基的无菌离心管中, 离心弃去上清, 再加至含 10% 胎牛血清和 1% 双抗的 DMEM 培养基中, 在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度条件下进行常规培养, 直至细胞呈贴壁状态, 每 2~3 d 换培养液 1 次, 至细胞处于对数生长期时, 取细胞用于实验。

**1.2.3 MTT 法检测 TBrC-L 对人非小细胞肺癌 A549 细胞系生长影响** 根据已经报道的方法<sup>[9-10]</sup>, 收集对数生长期的人肺癌 A549 细胞, 调整细胞浓度为  $2 \times 10^4$  个·mL<sup>-1</sup>, 以 100 μL·孔<sup>-1</sup> (每孔  $2 \times 10^3$  个) 接种于 96 孔板中。在培养箱中培养过夜, 24 h 后加入终浓度为 16、250 μmol·L<sup>-1</sup> 的 TBrC-L 以及 10 μM 的阳性对照紫杉醇脂质体 (P-L), 同时设置空白对照组 (只加细胞悬液 100 μL 含 0.01% DMSO 的溶媒对照), 每组药物浓度均设 3 个复孔, 置 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度培养箱内培养 48 h、72 h 后取出 96 孔板, 每孔加入 10 μL MTT (5 g·L<sup>-1</sup>) 溶液, 继续培养 4 h 后终止培养。弃上清液, 加入 DMSO 150 μL·孔<sup>-1</sup>, 室温避光震荡 10~15 min, 使结晶充分溶解。使用酶联免疫检测仪在参考波长 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) × 100%, 并按中效方程计算中效浓度 IC<sub>50</sub>。

**1.2.4 流式细胞术检测 TBrC-L 对人肺癌 A549 细胞凋亡的影响** 依据已经报道的 Annexin V-FITC 荧光双染色方法<sup>[9-10]</sup>, 取对数生长期的 A549 细胞, 以  $5 \times 10^4$ ·孔<sup>-1</sup> 接种于 24 孔板中。置于培养箱中培养过夜、次日加样。设置空白对照组, 16 和 250 μmol·L<sup>-1</sup> 的 TBrC-L 组, 10 μmol·L<sup>-1</sup> 的 P-L 以及 Bay 组。细胞培养 48 h 后, 用胰酶消化细胞并收集, 在 2 000 r·min<sup>-1</sup> 的条件下离心 5 min, 除去上清液, 再加入 500 μL 的 Binding Buffer 悬浮细胞。然后加入 5 μL 的 Annexin V-FITC 混匀后, 再加入 5 μL 的 Propidium Iodide 染液进行染色, 混匀, 避光, 室温孵育 15 min。1 h 内流式细胞仪检测。

**1.2.5 体外迁移实验检测 TBrC-L 对人肺癌 A549 细胞迁移影响** 根据已经报道的方法稍优化<sup>[9-10]</sup>, 把 Transwell 小室置于 24 孔板内, 将 Fibronectin 按 50 μL·孔<sup>-1</sup> 均匀铺在小室底部聚碳酸酯膜上, 37 °C 孵育 2 h 后置于超净工作台中风干。收集预先饥饿 24 h 的细胞, 上室按  $2.5 \times 10^5$  个·mL<sup>-1</sup> 密度加入 200 μL (50 000 个细胞) 细胞悬液, 并同时分别加入 16 和 250 μmol·L<sup>-1</sup> 的 TBrC-L 以及 10 μmol·L<sup>-1</sup> 的紫杉醇脂质体 (P-L) 组、及 2 μmol·L<sup>-1</sup> 的 Bay 和空白对照组,

下室加入 660 μL 含 10% FBS 的培养液, 37 °C 孵育 6 h。取出小室, 加入 70% 预冷甲醇, 固定后风干。Propidium Iodide (PI) 染色 1 h, 去除没有迁移的细胞, 于荧光显微镜 (×200) 下计数迁移细胞数, 每孔计数上中下左右 5 个不同视野的透过细胞数, 计算平均值, 每组平行设 3 孔。以迁移细胞的相对数目表示肿瘤细胞的迁移能力。

相对迁移率 (%) = (实验组迁移细胞数 / 对照组迁移细胞数) × 100%

**1.2.6 Western Blotting 法检测 TBrC-L 对人肺癌 A549 细胞中相关蛋白表达的影响** 依据已经报道的方法<sup>[9-10]</sup>, 常规收集各组经上述不同浓度的 TBrC-L、2 μmol·L<sup>-1</sup> 的 Bay 和 75 μmol·L<sup>-1</sup> 的 Ly 作用 48 h 的 A549 细胞, 裂解于含有 1 mmol·L<sup>-1</sup> PMSF 的 RIPA 裂解液中, 冰浴下超声破碎, 14 000 r·min<sup>-1</sup>, 4 °C 离心 10 min, 取上清, 用 BCA 法测定蛋白度。每个样品取总蛋白 50 μg, 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。

### 1.3 统计学处理

各项实验至少重复 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 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 为有统计学意义。

## 2 结果与分析

### 2.1 制备 TBrC-L 处方的单因素考察结果

#### 2.1.1 磷脂与胆固醇的质量比对 TBrC-L 的影响

固定处方中其他因素不变, 即药脂比, 氯仿和生理盐水量不变, 按磷脂与胆固醇质量比分别为 8:1、10:1、12:1 制备脂质体, 测定包封率。实验结果表明, 其他条件固定, 当磷脂与胆固醇的质量比增加时, 脂质体包封药物的包封率有先增加后减少的趋势, 所以磷脂与胆固醇的质量比选用 10:1。结果见图 2A。

**2.1.2 脂药比对 TBrC-L 的影响** 固定处方中其他因素不变, 即磷脂与胆固醇质量比为 10:1, 氯仿与生理盐水量不变, 按脂药比分别为 4:1, 5:1, 6:1 制备脂质体。结果表明 (图 2B), 其他条件固定, 当脂药比增加时, 药物包封率先增加后减少, 所以

脂药比选用 5:1。

2.1.3 有机相用量对 TBrC-L 的影响 图 3A 表明, 其他条件固定, 当有机相体积增加时, 脂质体包载

药物的包封率有减少的趋势, 有机相用量过多会影响脂质体膜的形成, 所以有机相用量选择 10 mL。

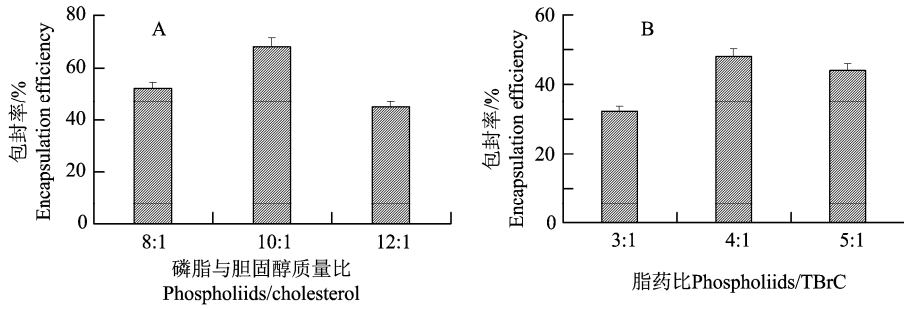


图 2 磷脂与胆固醇质量比(A)和脂药比(B)对 TBrC-L 包封率的影响 (n=3)

Figure 2 Effects of phospholipids/cholesterol (A) and phosphatidylcholine/TBrC (B) on encapsulation efficiency of TBrC-L(n=3)

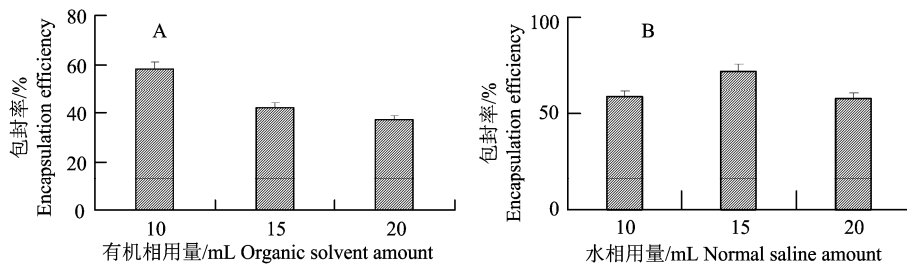
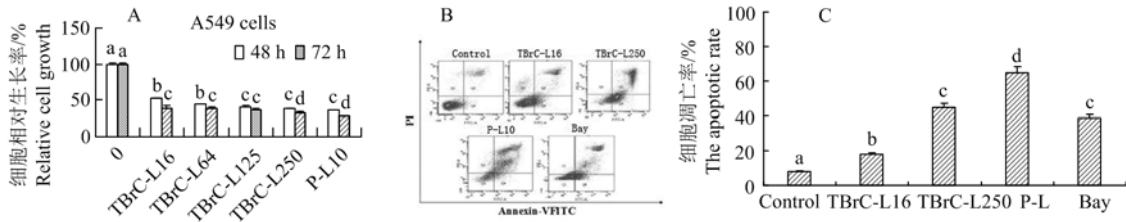


图 3 有机相用量(A)和水相用量(B)对 TBrC-L 包封率的影响 (n=3)

Figure 3 Effects of organic solvent (A) and normal saline (B) on encapsulation efficiency of TBrC-L(n=3)

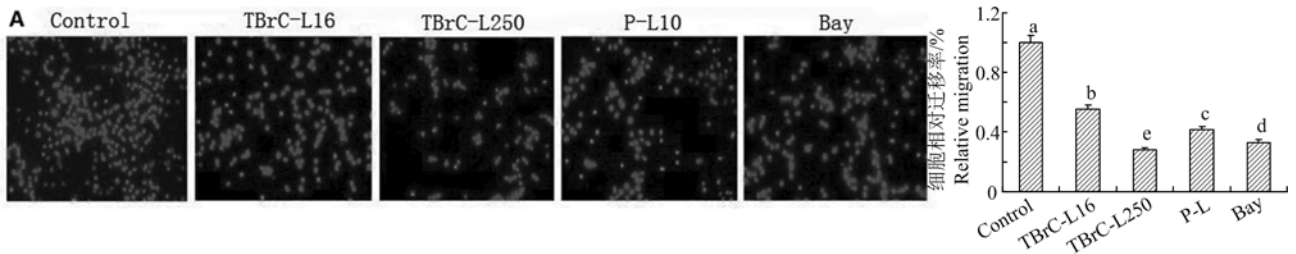


A:细胞相对生长率; B:细胞凋亡; C:细胞凋亡率 ( $\bar{X} \pm SD, n=3$ ; 不同字母 (a~d) 表示统计学差异显著;  $P < 0.05$ 。下同

A:The relative cell growth; B: The apoptosis in cells; C: The apoptosis rate in cells ( $\bar{X} \pm SD, n=3$ ; Values with different letters (a-d) differ significantly;  $P < 0.05$ . The same below)

图 4 TBrC-L 对 A549 细胞生长和凋亡的影响

Figure 4 Effects of TBrC-L on the growth and apoptosis in A549 cells



A: 细胞迁移; B: 细胞相对迁移率 A: The migration of cells; B:The relative migration of cells

图 5 TBrC-L 对 A549 细胞迁移的影响

Figure 5 Effects of TBrC-L on the migration of A549 cells

2.1.4 水相用量对 TBrC-L 的影响 图 3B 表明, 其他条件固定, 当水相体积增加时, 脂质体包载药物

的包封率有先增加后减少的趋势, 所以水相用量选择 15 mL。

## 2.2 MTT 法检测 TBrC-L 对 A549 细胞生长的抑制作用

MTT 结果显示: A549 细胞的相对生长率随 TBrC-L 浓度的增加而逐渐减少, TBrC-L 对 A549 细胞生长有一定的抑制作用, 与空白对照组有显著差异 ( $P < 0.05$ ) (图 4A), 呈现良好的剂量和时效依赖关系; 阳性对照组紫杉醇脂质体 (P-L) 对 A549 细胞的生长也有显著的抑制作用。

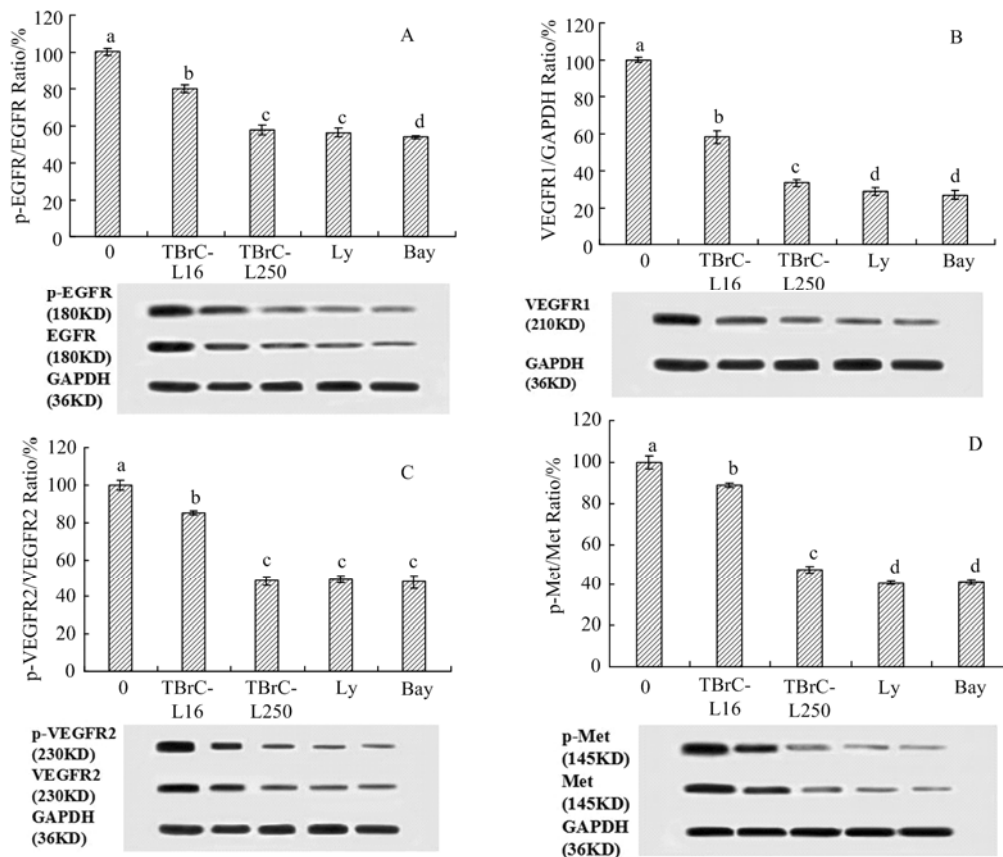
## 2.3 流式细胞术检测 TBrC-L 对人肺癌 A549 细胞凋亡的影响

采用流式细胞术检测 TBrC-L 对人肺癌 A549 细胞凋亡的影响, 并分析了其引发的细胞凋亡的百分比大小。结果表明, A549 细胞在给以 16、250

$\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 TBrC-L、 $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 P-L 以及 Bay 处理 48 h 后, 均出现了细胞凋亡。并且  $250\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  TBrC-L 能使 45% 的细胞发生凋亡 (图 4B), 阳性对照 P-L 和 Bay 显示了有效地诱导癌细胞凋亡 (图 4C)。

## 2.4 TBrC-L 对人肺癌 A549 细胞迁移的影响

Transwell 小室迁移实验结果表明: 与溶媒对照组相比, 16、 $250\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 TBrC-L、 $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 P-L 以及 Bay 均显示出对 A549 细胞的迁移具有抑制作用。阳性对照组 P-L ( $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 和 Bay 的迁移抑制率分别为 54% 和 66%, 而  $250\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 TBrC-L 的迁移抑制率为 72%, 抑制效果最为明显 (如图 5A 和 5B) 所示。



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

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

图 6 TBrC-L 对 A549 细胞受体 EGFR(A)、VEGFR1(B)、VEGFR2(C) 和 c-Met(D) 蛋白表达和 (或) 磷酸化水平的影响  
Figure 6 Effects of TBrC-L on the receptor protein expressions and phosphorylation of EGFR(A), VEGFR1(B), VEGFR2(C) and/or c-Met (D) in A549 cells

## 2.5 TBrC-L 对 A549 细胞系中生长和凋亡相关蛋白表达的影响

如图 6A 所示, 不同浓度 TBrC-L 作用 A549 细胞 48 h 后可显著下调表皮生长因子受体 (EGFR) 的表达及其磷酸化水平, 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, 以  $250\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 TBrC-L 组对 p-EGFR/EGFR 下调作用更明显, 抑制率为 55%; PI3K/Akt 抑制剂 Ly294002 (Ly) 和 NF- $\kappa$ B 抑制剂 Bay11-7082 (Bay) 作为阳性对照, 对 EGFR 受体蛋白表达水平和其磷酸化水

平也表现为明显下调作用,抑制率分别为 52%和 62%。

如图 6B 所示,不同浓度 TBrC-L 作用 A549 细胞 48 h 后均使血管内皮细胞生长因子受体-1 (VEGFR1) 受体蛋白的表达降低,与对照组相比有显著差异 ( $P<0.05$ ),且呈现良好的剂量依赖性,250  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 TBrC-L 组对 VEGFR1 蛋白下调作用更明显,抑制率为 67%; PI3K/Akt 抑制剂 Ly294002(Ly)和 NF- $\kappa$ B 抑制剂 Bay11-7082(Bay)作为阳性对照,均明显抑制 VEGFR1 受体蛋白的表达,其抑制率分别为 71%和 73%。

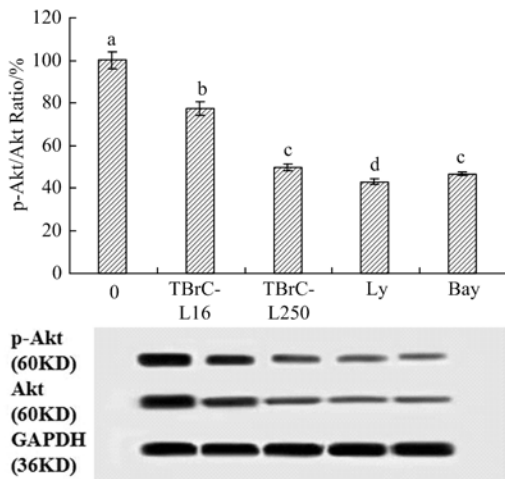


图 7 TBrC-L 对 A549 细胞 Akt 蛋白表达和磷酸化水平影响  
Figure 7 Effects of TBrC-L on the Akt protein expression and phosphorylation in A549 cells

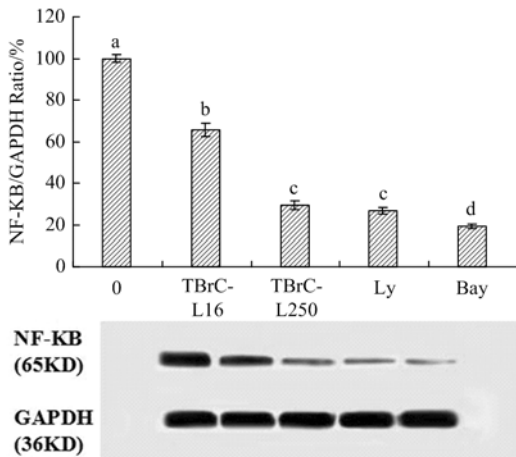


图 8 TBrC-L 对 A549 细胞 NF- $\kappa$ B 蛋白表达的影响  
Figure 8 Effects of TBrC-L on the NF- $\kappa$ B protein expression in A549 cells

如图 6C 所示,不同浓度 TBrC-L 作用 A549 细胞 48 h 后可使血管内皮细胞生长因子受体-2 (VEGFR2) 的表达及其磷酸化水平下调明显,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,以 250  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 TBrC-L 组对 p-VEGFR2/ VEGFR2 的比值下调作用最明显,抑制率为 52%; Ly 和 Bay 作为阳性对照,对 p-VEGFR2/ VEGFR2 的比值也表现为明显下调作用,其抑制率分别为 51%和 53%。

如图 6D 所示,不同浓度 TBrC-L 作用 A549 细胞 48 h 后可使肝细胞生长因子受体 Met 表达量和磷酸化水平降低,与溶媒对照组相比有显著差异 ( $P<0.05$ ),且呈现良好的剂量的依赖性,以 250  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 TBrC-L 对 Met 蛋白表达和磷酸化水平的下调作用更明显,抑制率为 53%; 阳性对照 Ly 和 Bay 对 Met 蛋白表达和磷酸化的抑制率分别为 60%和 59%。

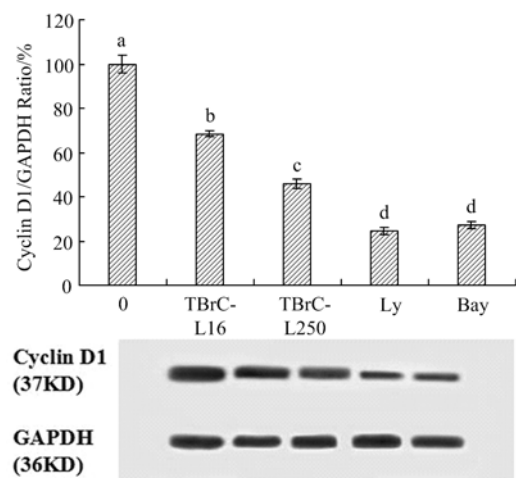


图 9 TBrC-L 对 A549 细胞 Cyclin D1 蛋白表达的影响  
Figure 9 Effects of TBrC-L on the Cyclin D1 protein expression in A549 cells

如图 7 所示,不同浓度 TBrC-L 作用 A549 细胞 48 h 后可使 Akt 激酶表达量和磷酸化水平下调,与空白对照组相比有显著差异 ( $P<0.05$ ),且呈现良好的剂量的依赖性,以 250  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 TBrC-L 对 Akt 蛋白表达和磷酸化水平的下调作用更明显,抑制率为 51%; 阳性对照 Bay 和 Ly 对 Akt 激酶蛋白表达和磷酸化的抑制率分别为 54%和 57%。

如图 8 所示,不同浓度 TBrC-L 作用 A549 细胞 48 h 后可使核转录因子 NF- $\kappa$ B 蛋白的表达下调,与对照组相比有显著差异 ( $P<0.05$ ),且呈现良好的剂量的依赖性,其中 250  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 TBrC-L 对 NF- $\kappa$ B 蛋白下调作用更明显,抑制率为 71%; 阳性对照 Ly 和 Bay 对 NF- $\kappa$ B 蛋白表达水平具有明显下调作用,其抑制率分别为 73%和 81%。

如图 9 所示,不同浓度 TBrC-L 作用 A549 细胞 48 h 后均能下调细胞周期相关蛋白 Cyclin D1 的表

达量, 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  $250 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 TBrC-L 对 Cyclin D1 蛋白下调作用更明显, 抑制率为 55%; 阳性对照 Ly 和 Bay 对 NF- $\kappa$ B 蛋白表达水平具有明显下调作用, 其抑制率分别为 76% 和 73%。

如图 10A 所示, 不同浓度 TBrC-L 作用 A549 细胞 48 h 后可降低抗凋亡蛋白 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  $250 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 TBrC-L 对 Bcl-2/Bax 蛋白表达的抑制率为 88%;

阳性对照 Bay 和 Ly 对 Bcl-2/Bax 的比率也表现为明显下调作用, 其抑制率都为 92%。

如图 10B 所示, 不同浓度 TBrC-L 作用 A549 细胞 48 h 后, Caspase-3 的表达量增加, 且呈现良好的剂量依赖性, 与对照组相比有显著差异 ( $P < 0.05$ ), 其中  $250 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 TBrC-L 组对 Caspase-3 蛋白表达的上调明显, 上调了 4 倍; 阳性对照 Ly 和 Bay 也明显增加 Caspase-3 的表达量, 分别上调了 4.6 和 4.3 倍。

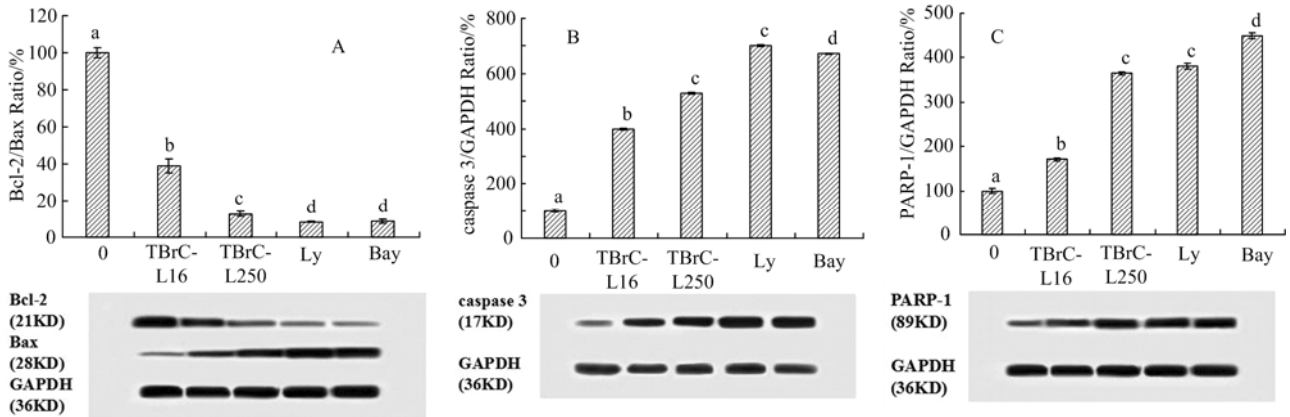


图 10 TBrC-L 对 A549 细胞凋亡相关蛋白 Bcl-2/Bax 的比率(A)、caspase-3(B)和 PARP-1(C)表达的影响

Figure 10 Effects of TBrC-L on the protein expressions of Bcl-2/Bax ratio(A), caspase-3(B) and PARP-1(C) in A549 cells

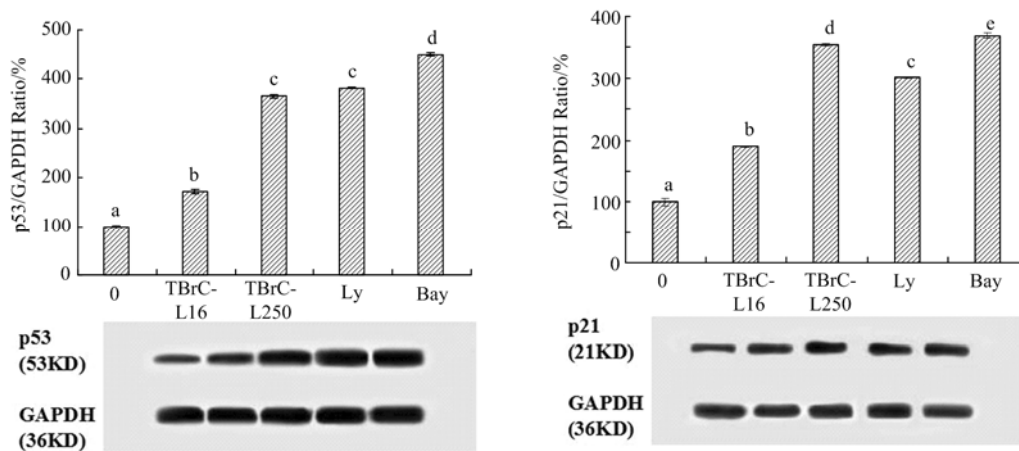


图 11 TBrC-L 对 A549 细胞 p53(A)和 p21(B)蛋白表达的影响

Figure 11 Effects of TBrC-L on the protein expressions of p53(A) and p21(B) in A549 cells

如图 10C 所示, 不同浓度 TBrC-L 作用 A549 细胞 48 h 后均使 PARP-1 的表达量明显增加, 且呈现良好的剂量依赖性, 与对照组相比有显著差异 ( $P < 0.05$ ), 其中  $250 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 TBrC-L 组对 PARP-1 蛋白表达的上调明显, 上调了 4.4 倍; 阳性对照 Ly 和 Bay 也明显增加 PARP-1 的表达量, 分别上调了 4.4 和 4.9 倍。

如图 11A 所示, 不同浓度 TBrC-L 作用 A549

细胞 48 h 后, 肿瘤抑制蛋白 p53 的表达量增加, 且呈现良好的剂量依赖性, 与对照组相比有显著差异 ( $P < 0.05$ ), 其中  $250 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 TBrC-L 组对 p53 蛋白表达的上调明显, 上调了 3.6 倍; 阳性对照 Ly 和 Bay 也明显增加 p53 的表达量, 分别上调了 3.8 和 4.4 倍。

如图 11B 所示, 不同浓度 TBrC-L 作用 A549 细胞 48 h 后, 细胞周期抑制蛋白 p21 的表达量增加,

且呈现良好的剂量依赖性,与对照组相比有显著差异( $P < 0.05$ ),其中  $250 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 TBrC-L 组对 p21 蛋白表达的上调明显,上调了 3.4 倍;阳性对照 Ly 和 Bay 也明显上调了 p21 的表达量,分别上调了 3 倍和 4 倍。

### 3 讨论与结论

脂质体是由脂质双分子层构成的封闭囊泡,它具有很多优点,如具有细胞的亲和性和靶向性、缓释性、减低药物毒性、提高药物稳定性、透皮吸收效率高、可以携带药物进入细胞、避免耐受性和改变给药途径等,因此脂质体成为研发抗癌新药、提高疗效的重要手段之一<sup>[11]</sup>。本研究课题是基于前期研究合成的茶氨酸衍生物茶溴香酰胺(TBrC),并将其制成纳米脂质体的剂型 TBrC-L,通过实验确认,与溶媒对照组相比,TBrC-L 表现出显著的抑制人非小细胞肺癌 A549 细胞生长和迁移的活性。

抑制肺癌细胞快速生长和非正常增殖是临床抗癌药物治疗的重要手段之一,由于细胞毒药物的毒副作用导致临床肿瘤患者生存质量下降,研发新型抗肿瘤药物对于提高生存质量及减少死亡,意义重大。本研究制备的纳米脂质体显示了显著抑制人非小细胞肺癌细胞生长的活性,具有与实验中阳性对照的临床常用抗癌药物紫杉醇脂质体类似的抑制人肺癌生长和诱导其凋亡的抗肺癌活性。此外,肿瘤的转移是导致全球肿瘤患者死亡率排前列的肺癌病理学主要原因,而迁移是肿瘤转移过程中关键的步骤之一,能够抑制肺癌细胞迁移的候选药物,潜在着抑制肺癌转移的生物功能,本研究揭示了 TBrC-L 抑制人肺癌转移的潜力,意义重大。

EGFR 位于细胞膜的表面,是一种比较经典的跨膜单链形式的糖蛋白,同时也是一种酪氨酸激酶受体,属于 I 型受体酪氨酸激酶超家族。信号传导通路改变在肿瘤发生发展中发挥着重要的作用,研究发现 EGFR 在非小细胞肺癌、结直肠癌等多种肿瘤中的表达均上调,通过信号转导途径控制肿瘤生长,并与新生血管生成、肿瘤的侵袭和转移等有密切的关系,是目前较为实用的肿瘤标志物之一,也是研发抗癌药物重要的作用靶点<sup>[12]</sup>。EGFR 和 EGF、B 细胞生长因子、TGF- $\alpha$  等配体结合形成二聚体的形式,促使 EGFR 的酪氨酸残基发生自磷酸化,即磷酸化的表皮生长因子受体( $p$ -EGFR)。 $p$ -EGFR 能引起下游信号通路的磷酸化级联反应,目前研究较为明确的与其相关的主要有 3 条信号通路:① Ras-MAPK (有丝分裂原活化蛋白激酶) 信号通路,

该信号通路与增殖激活有关;② PI3K-Akt 通路信号传导途径,该通路与细胞移动性的增强有关;③ JAK-STAT 通路,该通路在调节细胞周期及凋亡中发挥重要作用。这些信号通路激活基因的转录,从而调控细胞增殖、分化和生存等生物学行为<sup>[13]</sup>。因此, $p$ -EGFR 的形成对 EGFR 的信号转导通路有着重要的意义。本研究结果显示:TBrC-L 明显下调了  $p$ -EGFR 磷酸化和 EGFR 蛋白表达的水平,可能是其抑制人非小细胞肺癌 A549 细胞生长的重要作用机制之一。

血管生成是恶性肿瘤生长和转移的基础,而肿瘤血管生成是一个受很多因素调控的复杂过程,是一系列血管生长刺激因子和抑制因子共同作用的结果。VEGF 作为新生血管形成的中心调控因子,能够高效特异地作用于血管内皮细胞,可促进肿瘤部位新生血管的生成,与肿瘤的生长、迁移和侵袭密切相关<sup>[14-15]</sup>。VEGFR1 是血管内皮细胞生长因子受体中的一员,其通过微弱的酪氨酸激酶活性发挥了各种生物学功能。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<sup>[16]</sup>,肿瘤细胞异常表达的 VEGFR1 具有促进肿瘤发生、发展的作用。VEGFR2 是介导血管内皮细胞增殖分化的酪氨酸激酶受体,在血管生成、血管损伤后的修复以及肿瘤的发生、发展等过程中起促进作用<sup>[17]</sup>。

原癌基因 Met 编码的蛋白间质表皮转化因子被认为是 EGFR-TKI 耐药的重要原因之一<sup>[18]</sup>。据现有研究显示,当细胞过度表达 Met 蛋白时,通常会引起肿瘤细胞的侵袭、转移的发生<sup>[19]</sup>。研究表明:TBrC-L 不仅能够抑制受体 VEGFR1 和 VEGFR2 蛋白的表达,而且也明显抑制 Met 的表达,这可能抑制了有这些受体介导的信号传导通路,从而抑制了人非小细胞肺癌 A549 细胞的过度生长,促进其凋亡。

Akt 位于多个信号转导通路的核心位置,是 PI3K/Akt 信号转导通路中与人类恶性肿瘤密切相关的下游主要效应靶基因。PI3K 活化的 Akt 可以通过磷酸化作用激活或抑制其下游靶蛋白 caspase-3、NF- $\kappa$ B 和 p53 等,可以促进细胞生长增殖与细胞周期的进程、抑制细胞凋亡、提高细胞的缺氧耐受性、促进肿瘤细胞迁移和组织血管生成等,从而导致多种肿瘤的发生<sup>[20]</sup>。本研究结果显示 TBrC-L 可以下调 pAkt/Akt 的表达,提示 TBrC-L 可能通过影响 PI3K/Akt 信号通路,来抑制人肺癌 A549 细胞生长和迁移的。

核转录因子 NF- $\kappa$ B 蛋白具有重要的转录激活



作用。NF- $\kappa$ B 的主要存在形式是 p65 和 p50 蛋白形成的异源二聚体, 而无活性的 p65/p50 被异常激活后, 与肿瘤的发生、发展多个过程密切相关<sup>[21]</sup>, 因此在许多肿瘤中均可见到 NF- $\kappa$ B 的异常活化。近来研究表明, NF- $\kappa$ B 主要通过调节许多粘附、侵袭转移相关因子的转录而参与肿瘤的侵袭转移<sup>[22]</sup>。NF- $\kappa$ B 与肺癌细胞凋亡的关系密切, 参与多种凋亡相关基因的转录调控<sup>[23]</sup>。本研究结果显示: TBrC-L 可明显下调 NF- $\kappa$ B 蛋白的表达, 从而抑制肿瘤细胞生长, 促进其凋亡, 这也可能是其抗肿瘤作用的分子机制之一。

Cyclin D1 蛋白是一种重要的周期调控蛋白因子, 常与其他癌基因和抑癌基因产物相互作用导致肿瘤的发生, 当 Cyclin D1 蛋白过度表达, 可使细胞持续性增殖<sup>[24-25]</sup>。有研究表明, Cyclin D1 基因表达被抑制后, 能够明显抑制血管内皮生长因子的表达, 进而抑制肿瘤细胞的浸润和转移<sup>[26]</sup>。同时, 多项研究显示, 在乳腺癌、非小细胞肺癌、头颈部鳞状细胞癌等肿瘤组织中 Cyclin D1 均表现为过表达, 过表达 Cyclin D1 的肿瘤细胞更具有侵袭力, 淋巴结转移率更高, 预后更差<sup>[27]</sup>。本研究检测结果表明, 经 TBrC-L 作用后, 人非小细胞肺癌 A549 细胞中的 Cyclin D1 蛋白表达水平下调, 提示 TBrC-L 可能通过下调 Cyclin D1, 阻滞细胞周期, 抑制肿瘤细胞生长。

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<sup>[28-29]</sup>, 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<sup>[30]</sup>。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<sup>[31]</sup>。本研究结果显示: 茶溴香酰胺脂质体 (TBrC-L) 明显下调了 Bcl-2/Bax 的比例, 这可以促进肿瘤细胞凋亡, 可能是其抑制人肺癌 A549 细胞生长的重要作用机制之一。

Caspase-3 是介导细胞凋亡的重要效应分子, 是凋亡的主要执行蛋白<sup>[32]</sup>。PARP 作为 caspase-3 作用的底物, 它的水解产物的增加和 caspase-3 表达水平的提高意味着凋亡的增加<sup>[33]</sup>。本研究结果显示, TBrC-L 上调了 caspase-3 和 PARP-1 蛋白表达水平的表达, 可能激活了 caspase 介导的细胞凋亡途径, 在一系列相关因子的参与下, 最终导致细胞发生不可逆凋亡, 由此可见 caspase-3 可能是茶氨酸溴香酰胺的一个作用靶点, 在临床研究上具有重要的意义。

p53 蛋白是一种转录调节因子, 主要通过调节细胞周期以及调控凋亡过程而达到抑制肿瘤细胞无限增殖的功能。p21 是细胞周期抑制蛋白, 受 p53 调控, 本研究结果显示, TBrC-L 显著增强 p53 和 p21 蛋白的表达, 这可能是其促进人肺癌 A549 细胞凋亡, 抑制肿瘤生长的重要分子机制之一。

综上所述, 本研究制备的茶溴香酰胺脂质体 (TBrC-L) 是一种有效抑制人非小细胞肺癌 A549 细胞生长和迁移的抗癌活性成分, 其作用机制可能与诱导 A549 细胞凋亡, 影响受体 EGFR/VEGFR/Met 介导的 Akt 和 NF- $\kappa$ 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 p-EGFR/EGFR、VEGFR1、VEGFR2、Met、Bcl-2、CyclinD1、Akt 和 NF- $\kappa$ B 蛋白的表达, 上调 Bax, caspase-3, PARP-1, p53 和 p21 蛋白的表达, 显著地抑制高转移的人非小细胞肺癌细胞生长和迁移, 从而发挥抗肿瘤作用。研究结果将为扩大茶氨酸的应用、研发其衍生物如茶溴香酰胺纳米脂质体成为新型抗肿瘤药物提供有价值的科学依据。

## 参考文献:

- [1] 张璐, 于正洪, 史兆荣. 中药注射液治疗肺癌研究进展[J]. 现代肿瘤医学, 2011, 19(11): 2349-2351.
- [2] World Health Organization. National cancer control programmes: policies and managerial guidelines[M]. 2nd ed. Geneva: World Health Organization, 2007, 27: 117-126.
- [3] PARKIN D M, BRAY F, FERLAY J, et al. Global cancer statistics, 2002[J]. Ca-Cancer J Clin, 2005, 55(2): 74-108.
- [4] SHAN S, FLOWERS C, PELTZ C D, et al. Preferential extravasation and accumulation of liposomal vincristine in tumor comparing to normal tissue enhances antitumor activity[J]. Cancer Chemoth Pharm, 2006, 58(2): 245-255.
- [5] JI D, WANG Y, ZHANG H, et al. Suppression of proliferation and migration in highly-metastatic lung cancer cells as well as tumor growth by a new synthesized compound TBrC and its molecular mechanisms of action[J]. Cytotechnology, 2014, 66(6): 899-911.
- [6] LIU J, SUN Y, ZHANG H, et al. Theanine from tea and its semi-synthetic derivative TBrC suppress human cervical cancer growth and migration by inhibiting EGFR/Met-Akt/NF- $\kappa$ B signaling[J]. Eur J Pharmacol, 2016, 791: 297-307.
- [7] 陈柳华, 甘礼华, 赵云辉, 等. 氟比洛芬脂质体的制备及其载药性能研究[J]. 同济大学学报(自然科学版), 2011, 39(7): 1079-1083.
- [8] FRIEDMAN M, MACKEY B E, KIM H J, et al. Structure-activity relationships of tea compounds against human cancer cells[J]. J Agr Food Chem, 2007, 55(2): 243-53.
- [9] 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):211-7.
- [10] ZHANG G, WANG Y, ZHANG Y, et al. Anti-cancer activities of tea epigallocatechin-3-gallate in breast cancer patients under radiotherapy[J]. *Curr Mol Med*, 2012, 12(2): 163-176.
- [11] 杨彤. 新型脂质体的研究进展[J]. *医药导报*, 2009, 28(3): 336-338.
- [12] DAVIS M A, IRETON R C, REYNOLDS A B. A core function for p120-catenin in cadherin turnover[J]. *J Cell Biol*, 2003, 163(3):525.
- [13] WEI X. Mechanism of EGER-related cancer drug resistance.[J]. *Anti-Cancer Drug*, 2011, 22(10):963-970.
- [14] 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]. *J Korean Med Sci*, 2008, 23(4): 592.
- [15] 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 Lett*, 2005, 226(1): 85-90.
- [16] 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.
- [17] LU D, JIMENEZ X, ZHANG H, et al. Selection of high affinity human neutralizing antibodies to VEGFR2 from a large antibody phage display library for antiangiogenesis therapy[J]. *Int J Cancer*, 2002, 97(3): 393-399.
- [18] ENGELMAN J A, ZEJNULLAHU K, MITSUDOMI T, et al. MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling[J]. *Science*, 2007, 316(5827): 1039-1043.
- [19] VOORT R V D, TAHER T E I, DERKSEN P W B, et al. The hepatocyte growth factor/ met pathway in development, tumorigenesis, and B-cell differentiation[J]. *Adv Cancer Res*, 2000, 79: 39-90.
- [20] 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.
- [21] 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.
- [22] AGGARWAL B B, SUNG B. NF- $\kappa$ B in cancer: A matter of life and death[J]. *Cancer Discov*, 2011, 1(6): 469.
- [23] 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.
- [24] MOTOKURA T, BLOOM T, KIM H G, et al. A novel cyclin encoded by a bcl1-linked candidate oncogene.[J]. *Nature*, 1991, 350(6318): 512.
- [25] LIU E, LI X, YAN F, et al. Cyclin-dependent kinases phosphorylate human Cdt1 and induce its degradation[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(17): 17283-17288.
- [26] ELY S, LIBERTO M D, NIESVIZKY R, et al. mutually exclusive Cdk4-Cyclin D1 and Cdk6-Cyclin D2 pairing inactivates Rb and promotes cell cycle dysregulation in multiple myeloma[J]. *Blood*, 2005, 106(11): 501-512.
- [27] BENZENO S, NARLA G, ALLINA J, et al. Cyclin-dependent kinase inhibition by the KLF6 tumor suppressor protein through interaction with cyclin D1[J]. *Cancer Res*, 2004, 64(11): 3885-3891.
- [28] TSUKAHARA S, YAMAMOTO S, TINTINWINSHWE, et al. Inhalation of low-level formaldehyde increases the Bcl-2/Bax expression ratio in the hippocampus of immunologically sensitized mice[J]. *Neuroimmunomodulat*, 2006, 13(2):63-68.
- [29] 王彤, 刘存志, 刘玉珍, 等. bcl-2/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(16): 1658-1660.
- [30] BROOKS C, DONG Z. Regulation of mitochondrial morphological dynamics during apoptosis by bcl-2 family proteins: a key in bak?[J]. *Cell Cycle*, 2007, 6(24): 3043.
- [31] DE G 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(6): 607-609.
- [32] 彭福森, 谢文彪. Caspase-3 与肝癌细胞凋亡[J]. *社区医学杂志*, 2007, 5(3): 54-56.
- [33] KOH D W, DAWSON T M, DAWSON V L. Mediation of cell death by poly(ADP-ribose) polymerase-1[J]. *Pharmacol Res*, 2005, 52(1): 5-14.