本文引用:郭海莉,白玉. 紫杉醇联合表没食子儿茶素没食子酸酯对肝癌细胞增殖及荷瘤裸鼠肿瘤生长的抑制作用[J]. 新乡医学院学报,2015,32(3):216-219.

【基础研究】

紫杉醇联合表没食子儿茶素没食子酸酯对肝癌细胞增殖及荷瘤裸鼠肿瘤生长的抑制作用

郭海莉[1], 白 玉[2]

(1. 麻城市人民医院药剂科,湖北 麻城 438300;2. 荆门市第一人民医院药剂科,湖北 荆门 448000)

摘要: **目的** 探讨表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)联合紫杉醇对肝癌 HepG2 细胞增殖及荷瘤裸鼠肿瘤生长的抑制作用。**方法** 将 HepG2 细胞分为对照组、EGCG 组、紫杉醇组、EGCG 联合紫杉醇组。噻唑蓝法观察不同药物干预对 HepG2 细胞增殖的抑制作用,流式细胞术检测 HepG2 细胞凋亡。构建肝癌细胞体外肿瘤球,比较各组药物对肿瘤球生长的抑制作用。构建裸鼠肝癌异位肿瘤模型,比较各组裸鼠肿瘤生长抑制率。**结果** 给药 24、48 h 后,EGCG 组、紫杉醇组、EGCG 联合紫杉醇组 HepG2 细胞增殖抑制率显著高于对照组($P<0.01$),EGCG 联合紫杉醇组 HepG2 细胞增殖抑制率显著高于 EGCG 组和紫杉醇组($P<0.01$)。EGCG 组、紫杉醇组、EGCG 联合紫杉醇组 HepG2 细胞凋亡率显著高于对照组($P<0.01$),EGCG 联合紫杉醇组 HepG2 细胞凋亡率显著高于 EGCG 组和紫杉醇组($P<0.01$)。EGCG 组、紫杉醇组、EGCG 联合紫杉醇组 HepG2 细胞肿瘤球生长抑制显著高于对照组($P<0.01$),EGCG 联合紫杉醇组 HepG2 细胞肿瘤球生长抑制显著高于 EGCG 组和紫杉醇组($P<0.01$)。EGCG 组、紫杉醇组、EGCG 联合紫杉醇组荷瘤裸鼠肿瘤质量显著低于对照组($P<0.01$),EGCG 联合紫杉醇组荷瘤裸鼠肿瘤质量显著低于 EGCG 组和紫杉醇组($P<0.01$)。EGCG 组、紫杉醇组、EGCG 联合紫杉醇组荷瘤裸鼠肿瘤生长抑制率显著高于对照组($P<0.01$),EGCG 联合紫杉醇组荷瘤裸鼠肿瘤生长抑制率显著高于 EGCG 组和紫杉醇组($P<0.01$)。**结论** EGCG 联合紫杉醇能够有效抑制肝癌细胞的增殖和肿瘤的生长。

关键词: 表没食子儿茶素没食子酸酯;紫杉醇;肝癌

中图分类号: R453 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-7239(2015)03-0216-04

Inhibition of paclitaxel combined with epigallo catechin gallate on hepatoma carcinoma cell multiplication and tumor growth in bearing cancer nude mice

GUO Hai-li[1], BAI Yu[2]

(1. *Department of Pharmacy, the People's Hospital of Macheng City, Macheng* 438300, *Hubei Province, China*; 2. *Department of Pharmacy, the First People's Hospital of Jingmen City, Jingmen* 448000, *Hubei Province, China*)

Abstract: **Objective** To explore the inhibition of epigallo catechin gallate (EGCG) combined with paclitaxel on HepG2 cell multiplication and tumor growth in bearing cancer nude mice. **Methods** The HepG2 cells were divided into control group, EGCG group, paclitaxel group, EGCG combined with paclitaxel group. The depressant effect of different drugs on HepG2 cell multiplication was detected by methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide assay. The apoptosis of HepG2 cell was detected by flow cytometry. The tumor spheres were constructed with HepG2 cell *in vitro*, then the inhibition of drug on tumor sphere growth was compared in the groups. HepG2 cells were xenografted in mice to establish the animal models, then the inhibition rate of tumor growth in nude mice was compared in the groups. **Results** Twenty-four and forty-eight hours after drug intervention, the inhibition rate of HepG2 cells multiplication in EGCG group, paclitaxel group and EGCG combined with paclitaxel group was significantly higher than that in control group ($P<0.01$); the inhibition rate of HepG2 cells multiplication in EGCG combined with paclitaxel group was significantly higher than that in EGCG group and paclitaxel group ($P<0.01$). The apoptosis rate of HepG2 cells in EGCG group, paclitaxel group and EGCG combined with paclitaxel group was significantly higher than that in control group ($P<0.01$); the apoptosis rate of HepG2 cells in EGCG combined with paclitaxel group was significantly higher than that in EGCG group and paclitaxel group ($P<0.01$). The depressant effect of HepG2 tumor sphere growth in EGCG group, paclitaxel group and EGCG combined with paclitaxel group was significantly higher than that in control group ($P<0.01$); the depressant effect of HepG2 tumor sphere growth in EGCG combined with paclitaxel group was significantly higher than that in EGCG group and paclitaxel group ($P<0.01$). The tumorous weight of bearing cancer nude mice in

DOI:10.7683/xxyxyxb.2015.03.005

收稿日期:2014-11-24

作者简介:郭海莉(1979-),女,湖北麻城人,主管药师,研究方向:药物学。

EGCG group, paclitaxel group and EGCG combined with paclitaxel group was significantly lower than that in control group ($P < 0.01$); the tumorous weight of bearing cancer nude mice in EGCG combined with paclitaxel group was significantly lower than that in EGCG group and paclitaxel group ($P < 0.01$). The inhibition rate of tumor growth of bearing cancer nude mice in EGCG group, paclitaxel group and EGCG combined with paclitaxel group was significantly higher than that in control group ($P < 0.01$); the inhibition rate of tumor growth of bearing cancer nude mice in EGCG combined with paclitaxel group was significantly higher than that in EGCG group and paclitaxel group ($P < 0.01$). **Conclusion** EGCG combined with paclitaxel can effectively inhibit the proliferation of HepG2 cells and the tumor growth.

Key words: epigallo catechin gallate; paclitaxel; hepatic carcinoma

肝癌是严重威胁人类健康的疾病之一,肝癌被发现时常常已处于晚期,错失了最佳手术时机。因此探寻有效的肝癌治疗手段显得尤为重要[1]。表没食子儿茶素没食子酸酯(epigallo catechin gallate, EGCG)是从茶叶中提取的一种抗肿瘤有效成分,具有良好的药理活性[2-3]。紫杉醇是来源于红豆杉属太平紫杉的一种细胞毒性物质,被广泛应用于乳腺癌[4]、前列腺癌[5]、卵巢癌[6]、胃癌[7]和非小细胞肺癌[8]的治疗。本研究旨在探讨 EGCG 联合紫杉醇对体外培养的肝癌细胞增殖和体内肿瘤生长的抑制作用。

1　材料与方法

1.1　实验动物　雄性裸鼠 24 只,体质量 20 ~ 25 g,6 ~ 8 周龄,购自武汉大学实验动物中心。

1.2　细胞与试剂　HepG2 细胞购自上海细胞研究所;胎牛血清和达尔伯克改良伊格尔培养基(Dulbecco′s modified Eagle′s medium, DMEM)购自赛默飞世尔生物化学制品(北京)有限公司;紫杉醇购自浙江海正药业股份有限公司,国药准字 900H51702;噻唑蓝(methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide, MTT)试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;EGCG 购自美国 Sigma 公司。

1.3　方法

1.3.1　MTT 法观察不同药物干预对 HepG2 细胞增殖的抑制作用　将 HepG2 细胞接种于 96 孔板中,随机分为 EGCG 组、紫杉醇组、EGCG 联合紫杉醇组和对照组,每组设 5 个复孔,培养 24 h 后分别加入无菌过滤后的 EGCG(50 μmol · L^{-1})、紫杉醇(8 μmol · L^{-1})、EGCG + 紫杉醇(EGCG 50 μmol · L^{-1},紫杉醇 8 μmol · L^{-1})、生理盐水 20 μL,分别培养 24、48 h 后取出,每孔加入 5 g · L^{-1} MTT 溶液 20 μL 孵育 4 h 后将孔板中液体倒出,每孔加入 200 μL 二甲亚砜,37 ℃避光振摇 15 min,用酶标仪在 490 nm 处测定各孔的吸光度值,计算细胞增殖抑制率[3,7]。

1.3.2　流式细胞仪检测 HepG2 细胞凋亡　将 HepG2 细胞接种于 96 孔板中,随机分为 EGCG 组、紫杉醇组、EGCG 联合紫杉醇组和对照组,每组设 5 个复孔,培养 24 h 后分别加入无菌过滤后的 EGCG(50 μmol · L^{-1})、紫杉醇(8 μmol · L^{-1})、EGCG + 紫杉醇(EGCG 50 μmol · L^{-1},紫杉醇 8 μmol · L^{-1})、生理盐水 40 μL。培养 24 h 后用磷酸盐缓冲液清洗细胞 3 次,异硫氰酸荧光素/碘化丙啶双染,流式细胞仪检测细胞凋亡。

1.3.3　肿瘤球生长抑制实验　将 HepG2 细胞以每孔 10^4 个接种于用低熔点琼脂糖预处理的 96 孔板中,移入 37 ℃、含体积分数 5% 的二氧化碳孵箱中培养,7 d 后成长为肿瘤球,然后随机分为 EGCG 组、紫杉醇组、EGCG 联合紫杉醇组、对照组,每组设 3 个复孔,分别加入 EGCG(50 μmol · L^{-1})、紫杉醇(8 μmol · L^{-1})、EGCG + 紫杉醇(EGCG 50 μmol · L^{-1},紫杉醇 8 μmol · L^{-1})和生理盐水 20 μL,给药后每天记录肿瘤球体积,给药后肿瘤球体积除以给药前肿瘤球初始体积即为肿瘤球体积变化率。

1.3.4　裸鼠肝癌异位肿瘤模型的建立及处理　取体质量 20 ~ 25 g 的雄性裸鼠,将 HepG2 细胞悬浊液皮下接种于裸鼠背部,7 d 后出现米粒大肿瘤证实接种成功。将优选后的 24 只荷瘤裸鼠随机分成 4 组:对照组(生理盐水 0.1 mL)、EGCG 组(30 mg · kg^{-1})、紫杉醇组(10 mg · kg^{-1})、EGCG 联合紫杉醇组(EGCG 30 mg · kg^{-1},紫杉醇 10 mg · kg^{-1}),每组 6 只;第 3、6、9、12 天腹腔注射给药,第 21 天处死裸鼠,取肿瘤,称质量,计算肿瘤抑制率[9]。

1.4　统计学处理　应用 SPSS 21.0 统计软件进行数据分析,实验数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两两比较采用 t 检验,多组间比较采用方差分析;检验水准 $\alpha = 0.05$。

2　结果

2.1　各组 HepG2 细胞增殖抑制率比较　结果见表 1。给药 24、48 h 后,EGCG 组、紫杉醇组、EGCG 联合紫杉醇组 HepG2 细胞增殖抑制率显著高于对照组($P < 0.01$),EGCG 联合紫杉醇组 HepG2 细胞增殖抑制率显著高于 EGCG 组和紫杉醇组($P < 0.01$)。

表 1 各组 HepG2 细胞增殖抑制率比较

Tab. 1 Comparison of the inhibition rate of HepG2 cells multiplication in the groups $(\bar{x} \pm s)$

组别	n	抑制率/%	
		给药 24 h	给药 48 h
对照组	5	3.3 ± 0.6	5.9 ± 0.7
EGCG 组	5	25.4 ± 2.2[a]	45.4 ± 3.7[a]
紫杉醇组	5	38.8 ± 4.6[a]	64.4 ± 5.7[a]
EGCG 联合紫杉醇组	5	61.8 ± 6.2[ab]	84.4 ± 4.9[ab]

注：与对照组比较[a]$P < 0.01$；与 EGCG 组和紫杉醇组比较[b]$P < 0.01$。

2.2 各组 HepG2 细胞凋亡率比较 结果见表 2。EGCG 组、紫杉醇组、EGCG 联合紫杉醇组 HepG2 细胞凋亡率显著高于对照组（$P < 0.01$），EGCG 联合紫杉醇组 HepG2 细胞凋亡率显著高于 EGCG 组和紫杉醇组（$P < 0.01$）。

表 2 各组 HepG2 细胞凋亡率比较

Tab. 2 Comparison of apoptosis rate of HepG2 cells in the groups $(\bar{x} \pm s)$

组别	n	HepG2 细胞凋亡率/%
对照组	5	1.2 ± 0.3
EGCG 组	5	17.8 ± 2.1[a]
紫杉醇组	5	33.1 ± 2.6[a]
EGCG 联合紫杉醇组	5	52.1 ± 3.2[ab]

注：与对照组比较[a]$P < 0.01$；与 EGCG 组和紫杉醇组比较[b]$P < 0.01$。

2.3 各组肿瘤球生长情况比较 结果见表 3。EGCG 组、紫杉醇组、EGCG 联合紫杉醇组 HepG2 细胞肿瘤球生长抑制显著高于对照组（$P < 0.01$），EGCG 联合紫杉醇组 HepG2 细胞肿瘤球生长抑制显著高于 EGCG 组和紫杉醇组（$P < 0.01$）。

表 3 各组肿瘤球生长变化率比较

Tab. 3 Comparison of the change rate of tumor sphere in the groups $(\bar{x} \pm s)$

组别	n	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d
对照组	3	1.05 ± 0.03	1.10 ± 0.04	1.17 ± 0.03	1.24 ± 0.05	1.32 ± 0.06	1.35 ± 0.04	1.38 ± 0.06
EGCG 组	3	1.02 ± 0.01	0.97 ± 0.04	0.93 ± 0.03[a]	0.87 ± 0.02[a]	0.83 ± 0.05[a]	0.82 ± 0.06[a]	0.80 ± 0.07[a]
紫杉醇组	3	0.95 ± 0.02	0.88 ± 0.03[a]	0.80 ± 0.05[a]	0.73 ± 0.06[a]	0.69 ± 0.07[a]	0.65 ± 0.04[a]	0.63 ± 0.03[a]
EGCG 联合紫杉醇组	3	0.92 ± 0.03	0.86 ± 0.05[a]	0.77 ± 0.04[ab]	0.67 ± 0.07[ab]	0.58 ± 0.06[ab]	0.47 ± 0.05[ab]	0.44 ± 0.08[ab]

注：与对照组比较[a]$P < 0.01$；与 EGCG 组和紫杉醇组比较[b]$P < 0.01$。

2.4 各组荷瘤裸鼠肿瘤生长抑制率比较 结果见表 4。EGCG 组、紫杉醇组、EGCG 联合紫杉醇组荷瘤裸鼠肿瘤质量显著低于对照组（$P < 0.01$），EGCG 联合紫杉醇组荷瘤裸鼠肿瘤质量显著低于 EGCG 组和紫杉醇组（$P < 0.01$）。EGCG 组、紫杉醇组、EGCG 联合紫杉醇组荷瘤裸鼠肿瘤生长抑制率显著高于对照组（$P < 0.01$），EGCG 联合紫杉醇组荷瘤裸鼠肿瘤生长抑制率显著高于 EGCG 组和紫杉醇组（$P < 0.01$）。

表 4 各组荷瘤裸鼠肿瘤生长情况比较

Tab. 4 Comparison of tumor growth of bearing cancer nude mice in the groups $(\bar{x} \pm s)$

组别	n	肿瘤质量/g	肿瘤抑制率/%
对照组	6	4.72 ± 0.33	0.0 ± 0.0
EGCG 组	6	3.48 ± 0.17[a]	26.3 ± 1.3[a]
紫杉醇组	6	2.54 ± 0.13[a]	46.2 ± 1.2[a]
EGCG 联合紫杉醇组	6	1.28 ± 0.12[ab]	72.9 ± 1.4[ab]

注：与对照组比较[a]$P < 0.01$；与 EGCG 组和紫杉醇组比较[b]$P < 0.01$。

3 讨论

目前肝癌的治疗方法主要包括手术治疗和药物治疗。紫杉醇是来源于红豆杉属太平紫杉的一种细胞毒性物质，被广泛应用于乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌、头颈部肿瘤和非小细胞肺癌的治疗。然而，化学治疗药物的使用剂量普遍偏大，往往对患者机体其他组织或器官的正常细胞产生严重的毒副作用[10]。中药联合其他药物治疗肿瘤，对于减轻患者临床症状，延长生存期，显示出良好的治疗效果和应用前景[11-12]。EGCG 是一种被广泛研究的抗肿瘤中药提取物。有研究显示，EGCG 对肺癌[9]、肝癌[13]和胃癌[14]等多种肿瘤细胞具有良好的抑制作用，是一种优良的抗肿瘤中药提取物。本研究旨在探讨 EGCG 联合紫杉醇对体外培养的肝癌细胞增殖和体内肿瘤生长的抑制作用。本研究结果显示，EGCG 和紫杉醇均能对肝癌细胞增殖产生抑制作用，EGCG 联合紫杉醇对肝癌细胞增殖的抑制作用大于 EGCG 和紫杉醇单独应用，二者能够发挥协同增效作用；EGCG 联合紫杉醇能够促进 HepG2 细胞的凋亡。本研究还构建了肝癌细胞体外肿瘤球模型，以模拟 EGCG 联合紫杉醇对肝癌实体肿瘤生长的抑制作用，结果显示，EGCG 联合紫杉醇对肿瘤球生长的抑制作用显著大于单独药物干预。体内荷瘤裸鼠肿瘤生长抑制实验结果显示，与对照组和各单独给药组相比，联合给药能够有效抑制肿瘤的生长。

参考文献：

[1] Pan Y, Ye S, Yuan D, *et al*. Hydrogen sulfide (H_2S)/cystathionine-lyase (CSE) pathway contributes to the proliferation of hepatoma cells [J]. *Mutat Res Fundam Mol Mech Mutagen*, 2014, 763: 10-18.

[2] 刘逸飞,胡玲娜,吴兴新,等. 表没食子儿茶素没食子酸酯对肝星状细胞 LX-2 中 STAT1 信号的影响[J]. 中药新药与临床药理,2011,22(4):355-359.
[3] Yu W X,Zhang Z C,Min D,*et al*. Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 19 promotes osteosarcoma growth and metastasis and associates with prognosis[J]. *Eu J Cancer*,2014,50(6):1125-1136.
[4] Zhang C X,He H W,Zhang H,*et al*. The blockage of Ras/ERK pathway augments the sensitivity of SphK1 inhibitor SKI Ⅱ in human hepatoma HepG2 cells[J]. *Biochem Biophysi Res Commun*,2013,434(1):35-41.
[5] Sharma G,Modgil A,Sun C,*et al*. Grafting of cell-penetrating peptide to receptor-targeted liposomes improves their transfection efficiency and transport across blood-brain barrier model[J]. *J Pharm Sci*,2012,101(7):2468-2478.
[6] Du W,Fan Y,Zheng N,*et al*. Transferrin receptor specific nanocarriers conjugated with functional 7 peptide for oral drug delivery[J]. *Biomaterials*,2013,34(3):794-806.
[7] 吴宏菊,李文会,赵晶,等. 紫杉醇节律化疗联合 EGCG 抑制胃癌生长和肿瘤血管生成的实验研究[J]. 中华肿瘤防治,2011,18(7):485-488.
[8] Yin Y,Wu X,Yang Z,*et al*. The potential efficacy of R8-modified paclitaxel-loaded liposomes on pulmonary arterial hypertension[J]. *Pharm Res*,2013,30(8):2050-2062.
[9] Jin Y,Song Y,Zhu X,*et al*. Goblet cell-targeting nanoparticles for oral insulin delivery and the influence of mucus on insulin transport[J]. *Biomaterials*,2012,33(5):1573-1582.
[10] Gao H,Yang Z,Cao S,*et al*. Tumor cells and neo-vasculature dual targeting delivery for glioblastoma treatment[J]. *Biomaterials*,2014,35(7):2374-2382.
[11] Liu C,Kelnar K,Liu B,*et al*. The microRNA miR-34a inhibits prostate cancer stem cells and metastasis by directly repressing CD44[J]. *Nat Med*,2011,17(2):211-215.
[12] Huile G,Shuaiqi P,Zhi Y,*et al*. A cascade targeting strategy for brain neuroglial cells employing nanoparticlesmodified with angiopep-2 peptide and EGFP-EGF1 protein[J]. *Biomaterials*,2011,32(33):8669-8675.
[13] Chen Y,Zhu X,Zhang X,*et al*. Nanoparticles modified with tumor-targeting scFv deliver siRNA and miRNA for cancer therapy[J]. *Mol Ther*,2010,18(9):1650-1656.
[14] Gao J Q,Lv Q,Li L M,*et al*. Glioma targeting and blood-brain barrier penetration by dual-targeting doxorubincin liposomes[J]. *Biomaterials*,2013,34(22):5628-5639.

(本文编辑:徐自超　英文编辑:徐自超)

(上接第 215 页)

[2] Kockx M M,De Meyer G R,Muhring J,*et al*. Apoptosis and related proteins in different stages of human atherosclerotic plaques[J]. *Circulation*,1998,97(23):2307-2315.
[3] 王亚娜,高莎,沈玺. 色素上皮衍生因子对氧诱导视网膜神经节细胞凋亡及 Bcl-2 表达的影响[J]. 眼科新进展,2014,34(6):501-505.
[4] 左侠,张坤,陈蕾,等. 骨髓间充质干细胞移植对环磷酰胺诱导卵巢损伤大鼠 Bax 及 Bcl-2 蛋白表达的影响[J]. 新乡医学院学报,2014,31(12):965-969.
[5] Wu S Y,Zhang B H,Tang C S,*et al*. Endothelin-1 is a potent regulator *in vivo* in vascular calcification and *in vitro* in calcification of vascular smooth muscle cells[J]. *Peptides*,2003,24(8):1149-1156.
[6] Naik V,Leaf E M,Hu J H,*et al*. Sources of cells that contribute to atherosclerotic intimal calcification:an *in vivo* genetic fate mapping study[J]. *Cardiovasc Res*,2012,94(3):545-554.
[7] Proudfoot D,Davies J D,Skepper J N,*et al*. Acetylated low-density lipoprotein stimulates human vascular smooth muscle cell calcification by promoting osteoblastic differentiation and inhibiting phagocytosis[J]. *Circulation*,2002,106(24):3044-3050.
[8] Shroff R C,McNair R,Figg N,*et al*. Dialysis accelerates medial vascular calcification in part by triggering smoothmuscle cell apoptosis[J]. *Circulation*,2008,118(17):1748-1757.
[9] Proudfoot D,Skepper J N,Hegyi L,*et al*. The role of apoptosis in the initiation of vascular calcification[J]. *Z Kardiol*,2001,90(3):43-46.
[10] 周俊,何湘珍,肖启国. 金樱子通过增加 Bcl-2/Bax 表达比抑制大鼠糖尿病性白内障晶状体上皮细胞的凋亡[J]. 眼科新进展,2014,34(4):314-318.
[11] 吴俭,金国强,杨利丽,等. 复方丹参注射液对感染性休克大鼠脑损伤时一氧化氮、B-细胞淋巴瘤-2 蛋白及 S100 的影响[J]. 中华实用儿科临床杂志,2014,29(10):758-760.
[12] 梁冰,曹永亮,郭爱华,等. Edaravone 对视网膜缺血-再灌注损伤大鼠 Bcl-2 和 Bax 表达的影响[J]. 眼科新进展,2013,33(4):316-318.
[13] 陶红芳,方建林,刘元生,等. 紫杉醇下调死亡结构域沉默子表达促进白血病细胞凋亡新机制研究[J]. 中华实用儿科临床杂志,2014,29(11):862-865.
[14] 张宝红,唐朝枢,杜军保,等. 钙化血管细胞凋亡基因的变化[J]. 北京大学学报,2003,35(1):45-49.
[15] 刘立新,王士雯,王宇玫,等. 体外血管钙化对细胞增殖的影响[J]. 中华老年心脑血管病杂志,2007,9(10):690-693.

(本文编辑:杨　博　英文编辑:杨　博)