

研究论文

表没食子儿茶素没食子酸酯通过活化p38 α 诱导
急性早幼粒细胞白血病NB4细胞凋亡淦柳根^{1,2} 刘北忠^{1,2} 单志灵² 肖春兰^{1,2} 徐 婷^{1,2} 宋 浩^{1,2} 李 浏² 杨 蓉² 钟 梁^{2*}¹重庆医科大学附属永川医院, 中心实验室, 重庆 402160;²重庆医科大学, 临床检验诊断学教育部重点实验室, 重庆市重点实验室, 重庆 400016)

摘要 该文研究了表没食子儿茶素没食子酸酯(epigallocatechin gallate, EGCG)诱导NB4细胞凋亡的可能分子机制。不同浓度梯度EGCG处理NB4细胞, 或预先用p38 α 抑制剂PD169316处理NB4细胞, 再用EGCG处理。用CCK-8(cell counting kit-8)方法检测细胞增殖情况, 用FITC-AnnexinV/PI双染色法检测细胞凋亡情况, 用Western blot检测p38 α 、P-p38 α 、Bcl-2和Bax蛋白质表达水平。结果显示, 随着EGCG浓度的升高, NB4细胞增殖率逐渐降低, 细胞凋亡率明显升高。P-p38 α 和Bax蛋白质表达水平升高, 与EGCG浓度呈正相关; 而Bcl-2蛋白质表达水平降低。p38 α 抑制剂处理后, NB4细胞增殖率升高, 凋亡率降低, Bax蛋白质表达水平降低, 而Bcl-2蛋白质表达水平无明显变化。以上结果表明, EGCG可能通过活化p38 α 诱导急性早幼粒细胞白血病NB4细胞凋亡。

关键词 EGCG; NB4细胞; 凋亡; p38 α

Epigallocatechin Gallate Induces Acute Promyelocytic Leukemia NB4 Cells
Apoptosis by Activation of p38 α Gan Liugen^{1,2}, Liu Beizhong^{1,2}, Shan Zhiling², Xiao Chunlan^{1,2}, Xu Ting^{1,2}, Song Hao^{1,2}, Li Liu², Yang Rong², Zhong Liang^{2*}¹Central Laboratory, Yongchuan Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 402160, China; ²Key Laboratory of Laboratory Medical Diagnostics, Ministry of Education, Faculty of Laboratory Medical, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract This study was aimed to investigate the molecular mechanism of NB4 cells apoptosis induced by epigallocatechin gallate (EGCG). NB4 cells were treated with EGCG in a dose-dependent manner. Or NB4 cells were pretreated with PD169316, an inhibitor of p38 α , then treated with EGCG. The proliferation of NB4 cells was detected by cell counting kit-8 (CCK-8) assay. The apoptosis of NB4 cells was measured by FITC-AnnexinV/PI. The protein levels of p38 α , P-p38 α , Bcl-2 and Bax were detected by Western blot. The results indicated that EGCG treatment significantly inhibited the viability of NB4 cells in a dose-dependent manner. In addition, EGCG treatment induced apoptosis, increased Bax and P-p38 α protein expression levels and decreased Bcl-2 protein expression levels. Pretreatment with PD169316 partially increased the viability of NB4 cells, meanwhile, blocked EGCG-induced apoptosis and inhibited EGCG-mediated increases in Bax expression, but not affected Bcl-2 expression. These results suggested that EGCG induced apoptosis in NB4 cells may through the activation of p38 α .

Keywords EGCG; NB4 cell; apoptosis; p38 α

收稿日期: 2016-01-20 接受日期: 2016-05-12

国家自然科学基金面上项目(批准号: 81171658)和重庆市自然科学基金计划重点项目(批准号: 2011BA5037)资助的课题

*通讯作者。Tel: 023-68485388, E-mail: liubeizhong@cqmu.edu.cn

Received: January 20, 2016

Accepted: May 12, 2016

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81171658) and the Natural Science Foundation of Major Project of Chongqing (Grant No.2011BA5037)

*Corresponding author. Tel: +86-23-68485388, E-mail: liubeizhong@cqmu.edu.cn

网络出版时间: 2016-07-25 15:33:48

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20160725.1533.012.html>

急性早幼粒细胞白血病主要特点是形成致癌性的早幼粒细胞白血病-维甲酸受体 α 融合蛋白(promyelocytic leukemia-retinoic acid receptor α , pml-rara)^[1]。pml-rara能够阻止NB4细胞的分化、凋亡,并且能够促进其不断增殖^[2]。虽然运用全反式维甲酸和三氧化二砷治疗急性早幼粒细胞白血病取得了重要的进展,但是由于耐药性的日益增强和药物本身的巨大毒性,使其在临床运用受到极大的限制^[3]。因此,寻找治疗急性早幼粒细胞白血病的新型药物和探索其分子机制变得极其重要。

表没食子儿茶素没食子酸酯(epigallocatechin gallate, EGCG)是绿茶的一种主要成分,近年来研究表明,其拥有显著的抗癌作用和用于多种癌症治疗的潜能^[4-5]。它能够通过多种信号通路诱导细胞凋亡和导致细胞周期阻滞,同时也能活化溶酶体系统,氧化应激系统和甲基化系统。例如,它能够诱导肝癌LM6细胞凋亡^[4],并且能够明显促进乳腺癌细胞凋亡而且已经进入临床应用阶段的研究^[5]。已有文献报道,EGCG能导致急性髓系白血病细胞周期阻滞和凋亡,表明其与白血病的发生发展密切相关^[6]。p38 MAPK信号通路在许多肿瘤的发生、发展和治疗上都有极其重要的作用。同时研究表明,EGCG能够通过p38MAPK信号通路抑制卵巢细胞癌的增殖^[7]。然而,目前关于EGCG引起白血病凋亡的分子机制尚不完全清楚。因此,本文主要研究EGCG诱导急性早幼粒细胞白血病NB4细胞凋亡的分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

EGCG购自于美国R&D SYSTEMS公司,溶解于磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)中,并在-40℃长期保存。p38 α 抑制剂PD169316购自美国MedChemExpress公司。NB4细胞株由重庆医科大学临床检验诊断学实验室保存。RPMI-1640、新鲜小牛血清购自Gibco公司。CCK-8试剂盒购自上海七海复泰生物科技有限公司。p38 α 抗体购自Cell Signaling Technology公司。P-p38 α (Tyr180/Tyr182)购自Millipore公司。 β -actin抗体购自武汉博士德生物工程有限公司。抗Bcl-2、Bax抗体购自沈阳万类生物科技有限公司。其他试剂均为国产分析纯。

1.2 细胞培养

NB4细胞培养于含有10%新鲜小牛血清、

100 μ g/mL青霉素和100 μ g/mL链霉素的RPMI-1640中,置于37℃、5% CO₂及饱和湿度的培养箱中培养。

1.3 细胞增殖实验

取生长良好的NB4细胞,按 1×10^5 /mL密度接种于96孔板,每孔0.1 mL。EGCG终浓度分别为0、10、20、30 μ mol/L。当与PD169316同时处理NB4细胞时,终浓度为10 μ mol/L PD169316预先处理0.5 h,然后再加入终浓度为30 μ mol/L EGCG,于培养箱中培养24 h后,测细胞增殖情况。每孔加入CCK-8试剂10 μ L后,于培养箱中培养2 h,于450 nm波长下检测吸光度值。细胞活率(%)=(实验组吸光度值-空白组吸光度值)/(对照组吸光度值-空白组吸光度值) $\times 100\%$ 。

1.4 细胞凋亡实验

取生长良好的NB4细胞,按 1×10^5 /mL密度接种于6孔板,每孔4 mL。EGCG终浓度分别为0、10、20、30 μ mol/L。当与PD169316同时处理NB4细胞时,终浓度为10 μ mol/L PD169316预先处理0.5 h,然后再加入终浓度为30 μ mol/L EGCG,于培养箱中培养。24 h后,收集细胞,用预冷PBS洗涤3遍后,流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

1.5 Western blot

收集各处理组NB4细胞,预冷PBS洗涤3次,用细胞裂解液、蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂一起裂解细胞,每隔10 min震荡,30 min后于4℃离心机按13 000 $\times g$ 离心30 min,取上清。蛋白浓度测定按照碧云天生物技术有限公司BCA试剂盒说明操作,测定波长562 nm。取等量蛋白样品跑SDS-PAGE电泳,电转于PVDF膜上,用5%的脱脂奶粉封闭2 h后,敷上一抗,4℃过夜。TBST洗涤2次,TBS洗涤1次,每次10 min,再敷二抗,常温2 h,TBST和TBS洗涤后,用Millipore试剂显色,曝光。

1.6 数据统计

实验所有数据用mean $\pm$ S.D.形式表示,数据用IBM SPSS Statistics 23软件处理, $P < 0.05$ 表示有显著差异, $P < 0.01$ 表示有极显著差异。

2 结果

2.1 EGCG对NB4细胞增殖的影响

分别用0、10、20、30 μ mol/L的EGCG处理NB4细胞,24 h后用CCK-8检测NB4细胞的增殖情况。结果显示,随着EGCG浓度的增加,NB4细胞的增殖率明显降低,说明EGCG对NB4细胞的增殖能力

具有明显的抑制作用($P<0.05$)(图1)。

2.2 EGCG对NB4细胞凋亡的影响

分别用0、10、20、30 $\mu\text{mol/L}$ 的EGCG处理NB4细胞,24 h后用FITC-Annexin V/IP双染色法检测NB4细胞的凋亡情况,结果显示,与对照组相比,10 $\mu\text{mol/L}$ 和20 $\mu\text{mol/L}$ 的EGCG对NB4细胞凋亡无明显影响,而30 $\mu\text{mol/L}$ 的EGCG显著促进NB4细胞凋亡($P<0.01$)(图2)。

2.3 EGCG对相关凋亡蛋白表达的影响

以0、10、20、30 $\mu\text{mol/L}$ 的EGCG处理NB4细胞,24 h后Western blot检测Bax和Bcl-2的表达情况,结果显示,在30 $\mu\text{mol/L}$ EGCG处理NB4细胞时,Bax表达水平显著升高($P<0.05$)(图3A),而Bcl-2表达水平显

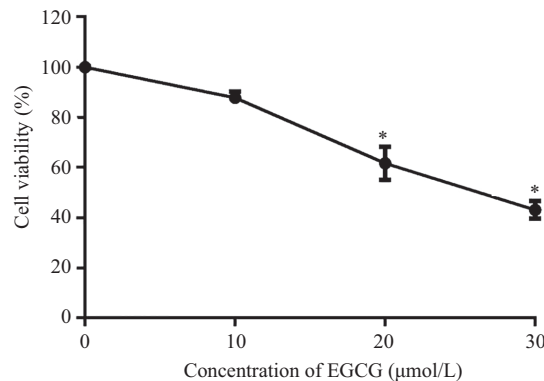
著降低($P<0.05$)(图3B)。

2.4 EGCG对p38 α 蛋白质磷酸化的影响

以不同浓度的EGCG处理NB4细胞24 h后,Western blot检测p38 α 和P-p38 α 的表达量,结果显示,在EGCG终浓度为10和20 $\mu\text{mol/L}$ 时,p38 α 和P-p38 α 的表达量与对照组相比无明显变化,但在EGCG终浓度为30 $\mu\text{mol/L}$ 时,与对照组相比,p38 α 表达量无明显变化,而P-p38 α 明显升高($P<0.05$)(图4)。

2.5 p38 α 抑制剂减弱EGCG对NB4细胞的抑增殖作用

NB4细胞预先用p38 α 抑制剂PD169316处理0.5 h,然后再用30 $\mu\text{mol/L}$ EGCG处理24 h后,CCK-8检测NB4细胞的增殖能力,结果显示,预先用抑制剂处理

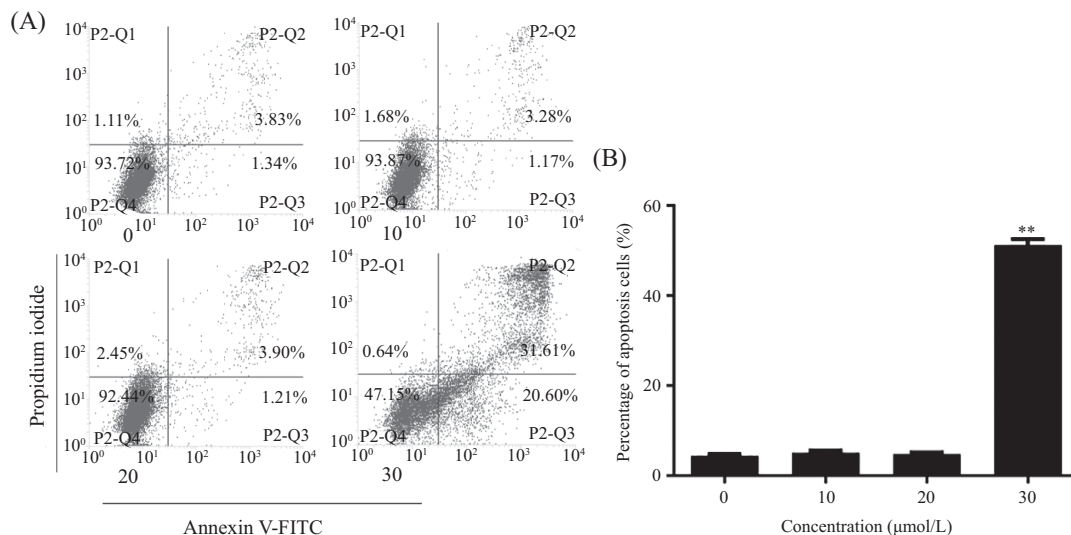


CCK-8检测NB4细胞活率。* $P<0.05$,与对照组(0 $\mu\text{mol/L}$ 组)比较。

The viability of NB4 cell was detected by CCK-8. * $P<0.05$ vs control group (0 $\mu\text{mol/L}$ group).

图1 EGCG对NB4细胞增殖的影响

Fig.1 Effect of EGCG on the proliferation of NB4 cells

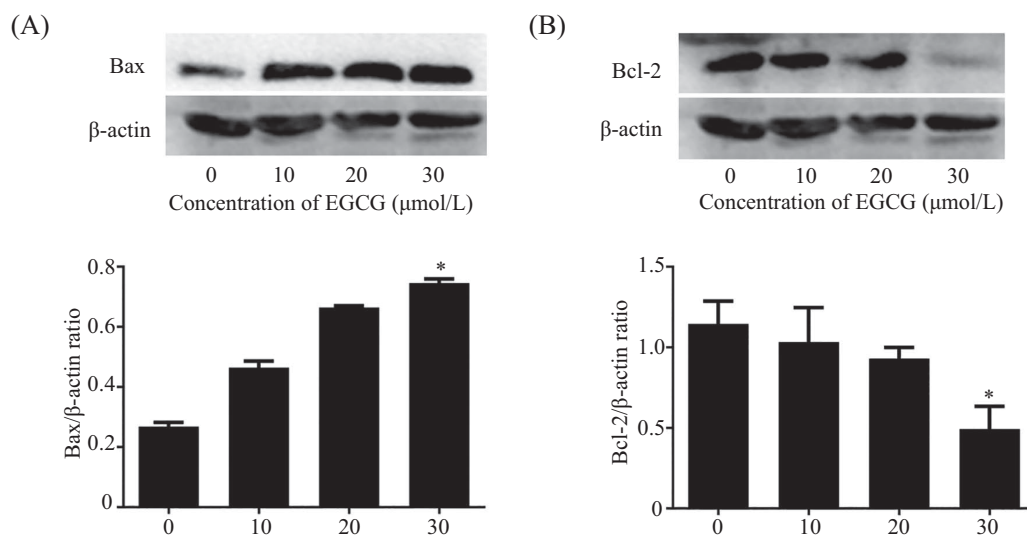


A: 流式细胞术检测细胞凋亡散点图; B: 凋亡细胞比例图。** $P<0.01$,与对照组(0 $\mu\text{mol/L}$ 组)比较。

A: representative scatter plot detecting apoptosis by flow cytometry; B: percentage of apoptotic cells. ** $P<0.01$ vs control group (0 $\mu\text{mol/L}$ group).

图2 EGCG对NB4细胞凋亡的影响

Fig.2 Effect of EGCG on the apoptosis of NB4 cells

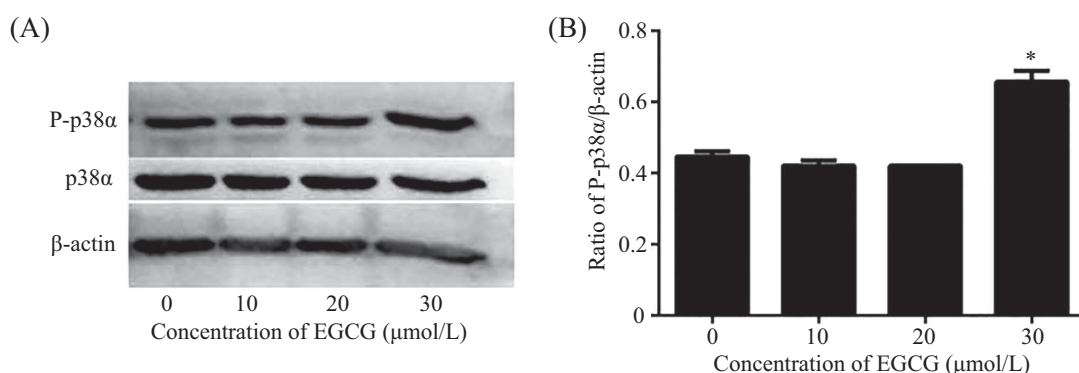


A: Western blot检测Bax蛋白质表达水平; B: Western blot检测Bcl-2蛋白质表达水平。* $P < 0.05$, 与对照组(0 μ mol/L组)比较。

A: the protein level of Bax detected by Western blot; B: the protein level of Bcl-2 detected by Western blot. * $P < 0.05$ vs control group (0 μ mol/L group).

图3 不同浓度EGCG处理NB4细胞24 h后Bax和Bcl-2蛋白质表达水平

Fig.3 Protein levels of Bax and Bcl-2 in NB4 cells after treated with different concentration of EGCG for 24 h

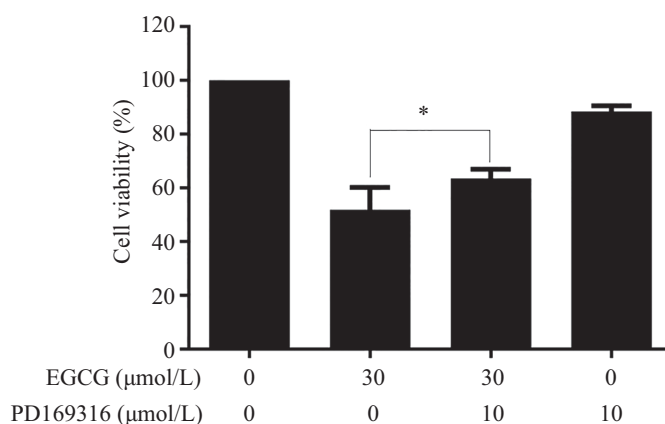


A: Western blot检测p38 α 和P-p38 α 蛋白质表达水平; B: P-p38 α 相对表达水平分析。* $P < 0.05$, 与对照组(0 μ mol/L组)比较。

A: the protein levels of p38 α and P-p38 α detected by Western blot; B: the relative level of P-p38 α protein. * $P < 0.05$ vs control group (0 μ mol/L group).

图4 EGCG对p38 α 蛋白质磷酸化的影响

Fig.4 Effect of EGCG on the level of p38 α phosphorylation

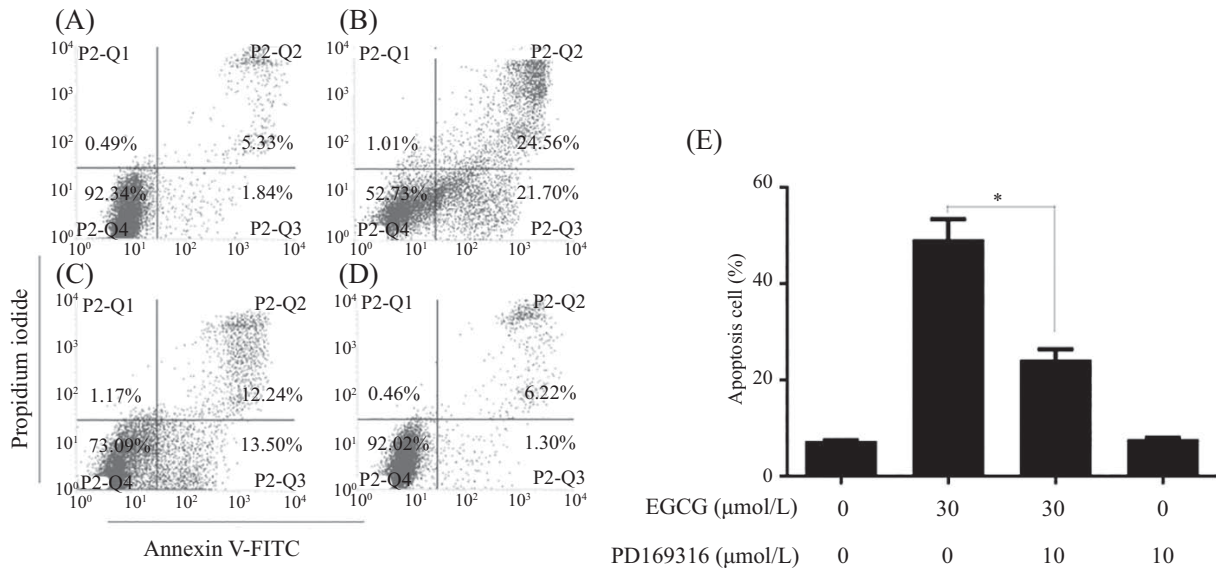


CCK-8检测NB4细胞活率。* $P < 0.05$ 。

The viability of NB4 cell was detected by CCK-8. * $P < 0.05$.

图5 PD169316减弱EGCG抑制的NB4细胞增殖

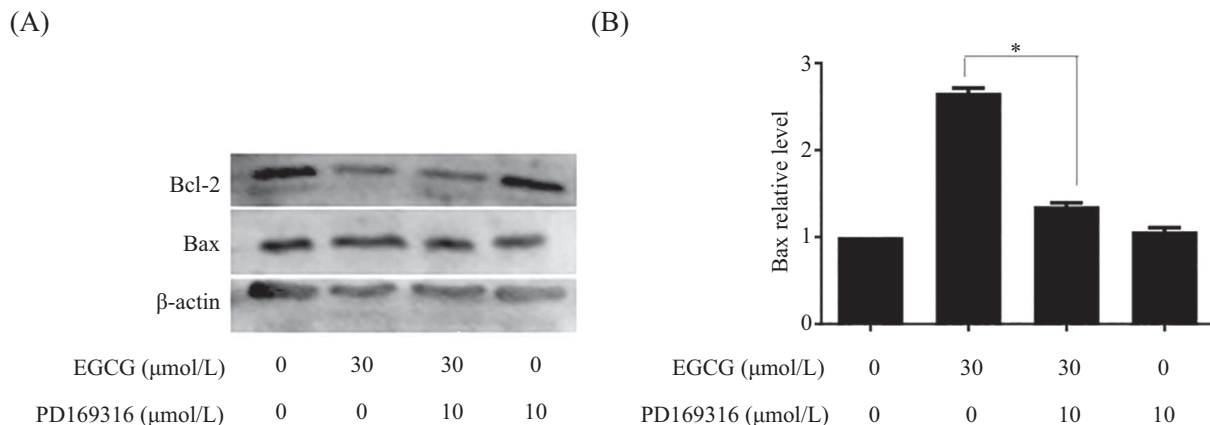
Fig.5 PD169316 weakened EGCG-inhibited NB4 cells proliferation



A: 空白对照(0 $\mu\text{mol/L}$ EGCG+0 $\mu\text{mol/L}$ PD169316)细胞凋亡情况; B: 30 $\mu\text{mol/L}$ EGCG+0 $\mu\text{mol/L}$ PD169316组细胞凋亡情况; C: 30 $\mu\text{mol/L}$ EGCG+10 $\mu\text{mol/L}$ PD169316组细胞凋亡情况; D: 0 $\mu\text{mol/L}$ EGCG+10 $\mu\text{mol/L}$ PD169316组细胞凋亡情况; E: 凋亡细胞比例图。* $P<0.05$ 。
A: the cell apoptosis of control group (0 $\mu\text{mol/L}$ EGCG+0 $\mu\text{mol/L}$ PD169316); B: the cell apoptosis of 30 $\mu\text{mol/L}$ EGCG+0 $\mu\text{mol/L}$ PD169316 group; C: the cell apoptosis of 30 $\mu\text{mol/L}$ EGCG+10 $\mu\text{mol/L}$ PD169316 group; D: the cell apoptosis of 0 $\mu\text{mol/L}$ EGCG+10 $\mu\text{mol/L}$ PD169316 group; E: percentage of apoptotic cells. * $P<0.05$.

图6 PD169316抑制EGCG诱导的NB4细胞凋亡

Fig.6 PD169316 inhibited EGCG-induced apoptosis of NB4 cells



A: Western blot检测Bax和Bcl-2蛋白质表达水平; B: Bax相对表达水平分析。* $P<0.05$ 。

A: the protein levels of Bax and Bcl-2 detected by Western blot; B: the relative level of Bax protein. * $P<0.05$.

图7 PD169316降低EGCG引起的Bax蛋白质表达

Fig.7 PD169316 decreased EGCG-mediated increases in Bax protein expression

的NB4细胞增殖率比单独用EGCG处理的细胞增殖率高($P<0.05$) (图5), 说明抑制剂PD169316能够减弱EGCG抑制NB4细胞的增殖能力。

2.6 p38 α 抑制剂减弱EGCG对NB4细胞的促凋亡作用

NB4细胞预先用p38 α 抑制剂PD169316处理0.5 h, 然后再用30 $\mu\text{mol/L}$ EGCG处理, 24 h后用FITC-AnnexinV/IP双染色法检测NB4细胞的凋亡, 结果显

示, 预先用抑制剂处理的NB4细胞凋亡比例较单独用EGCG处理的细胞凋亡比例低($P<0.05$)(图6), 说明抑制剂PD169316能够减弱EGCG促进NB4细胞凋亡的能力。

2.7 p38 α 抑制剂减弱EGCG对Bax蛋白的促表达作用

NB4细胞预先用p38 α 抑制剂PD169316处理0.5 h, 然后再用30 $\mu\text{mol/L}$ EGCG处理24 h后, Western blot

检测Bax和Bcl-2的蛋白质表达水平, 结果显示, Bax水平在预先用抑制剂处理的NB4细胞中较单独用EGCG处理的细胞中减少($P < 0.05$), 而Bcl-2无明显变化(图7), 说明抑制剂PD169316能够减弱EGCG促进Bax表达的能力, 但对Bcl-2的表达水平无明显影响。

3 讨论

细胞恶性增殖和凋亡受阻是急性早幼粒细胞白血病最主要的病理特征之一, 因此, 探讨其恶性增殖和凋亡受阻的分子机制能为其的临床治疗提供理论基础。近年来, 越来越多的研究发现, EGCG能够通过多种信号通路促进细胞凋亡来发挥其保护作用。例如, EGCG能通过抑制Akt信号通路来阻碍肝癌的形成^[8], 也能通过影响微管蛋白平衡来抑制HeLa细胞增殖^[9]。

本研究结果表明, 在较高浓度的条件下, EGCG能够诱导急性早幼粒细胞白血病细胞株NB4细胞凋亡。细胞凋亡是细胞的一种程序性死亡, 并不引起包括炎症在内的一系列有害机体的反应^[10], 因此其可能是药物治疗癌症的最理想靶点。Bcl-2家族的蛋白质水平对细胞凋亡的调控具有至关重要的作用, 而在这个家族中, 重中之重的是, Bcl-2和Bax这两个蛋白质^[11]。通常在细胞凋亡的情况下, 促凋亡蛋白Bax的表达会升高, 而抑凋亡蛋白Bcl-2会随之降低^[12]。本研究发现, 较高浓度的EGCG能够上调Bax蛋白质水平, 同时, 下调Bcl-2蛋白质水平, 与以前的研究结果相一致。

p38MAPK信号通路在肿瘤的发生发展中具有巨大的作用, 它能影响一系列的外部信号, 导致大量的细胞反应, 包括增殖、分化、炎症和凋亡^[13]。前期研究发现, p38MAPK通路是EGCG发挥抗癌作用的主要通路之一^[14]。EGCG能够通过促进p38和ERK信号通路来抑制口腔鳞状细胞癌细胞增殖^[15], 同时, 它也能通过活化p38MAPK信号通路促进人类子宫内膜腺癌细胞凋亡^[16]。本研究发现, EGCG能促进p38 α 蛋白质磷酸化, 从而抑制NB4细胞增殖和促进其凋亡, 并且在用p38 α 抑制剂PD169316预处理NB4细胞后发现, EGCG抑制NB4细胞增殖的能力和促进NB4细胞凋亡的能力减弱, Bax蛋白质水平也随之减少。以上结果说明, p38 α 可能是其诱导NB4细胞凋亡的机制之一。

综上所述, EGCG能抑制急性早幼粒细胞白血病NB4细胞增殖和诱导其凋亡, 且能促进p38 α 蛋白质磷酸化, 但p38 α 蛋白质水平无明显变化。在用p38 α 抑制剂PD169316预处理后, EGCG抑制NB4增殖的能力减弱, 诱导NB4细胞凋亡的能力也减弱, 且Bax蛋白质水平也减少。因此, 本研究结果提示, EGCG部分通过p38 α MAPK信号通路诱导急性早幼粒细胞白血病NB4细胞凋亡, 为其将来运用于白血病的临床治疗提供可靠的实验依据和理论基础。

参考文献 (References)

- 1 Ablain J, de The H. Revisiting the differentiation paradigm in acute promyelocytic leukemia. *Blood* 2011; 117(22): 5795-802.
- 2 Wang K, Wang P, Shi J, Zhu X, He M, Jia X, *et al.* PML/RAR α targets promoter regions containing PU.1 consensus and RARE half sites in acute promyelocytic leukemia. *Cancer Cell* 2010; 17(2): 186-97.
- 3 Lou Y, Ma Y, Sun J, Ye X, Pan H, Wang Y, *et al.* Evaluating frequency of PML-RARA mutations and conferring resistance to arsenic trioxide-based therapy in relapsed acute promyelocytic leukemia patients. *Ann Hematol* 2015; 94(11): 1829-37.
- 4 Zhang Y, Duan W, Owusu L, Wu D, Xin Y. Epigallocatechin-3-gallate induces apoptosis of hepatocellular carcinoma LM6 cells but not non-cancerous liver cells. *Int J Mol Med* 2015; 35(1): 117-24.
- 5 Zeng L, Holly JM, Perks CM. Effects of physiological levels of the green tea extract epigallocatechin-3-gallate on breast cancer cells. *Front Endocrinol* 2014; 5: 61-70.
- 6 Nakazato T, Ito K, Miyakawa Y, Kinjo K, Yamada T, Hozumi N, *et al.* Catechin, a green tea component, rapidly induces apoptosis of myeloid leukemia cells via modulation of reactive oxygen species production *in vitro* and inhibits tumor growth *in vivo*. *Haematologica* 2005; 90(3): 317-25.
- 7 Wang F, Chang Z, Fan Q, Wang L. Epigallocatechin3gallate inhibits the proliferation and migration of human ovarian carcinoma cells by modulating p38 kinase and matrix metalloproteinase2. *Mol Med Rep* 2014; 9(3): 1085-9.
- 8 Wubetu GY, Shimada M, Morine Y, Ikemoto T, Ishikawa D, Iwahashi S, *et al.* Epigallocatechin gallate hinders human hepatoma and colon cancer sphere formation. *J Gastroenterol Hepatol* 2016; 31(1): 256-64.
- 9 Chakrabarty S, Ganguli A, Das A, Nag D, Chakrabarti G. Epigallocatechin-3-gallate shows anti-proliferative activity in HeLa cells targeting tubulin-microtubule equilibrium. *Chem Biol Interact* 2015; 242: 380-9.
- 10 Gerschenson LE, Rotello RJ. Apoptosis: A different type of cell death. *FASEB J* 1992; 6(7): 2450-5.
- 11 王卫东. Bcl-2/Bax比率与细胞‘命运’. 中国肿瘤生物治疗杂志 (Wang Weidong. Bcl-2/Bax ratio and the ‘life or death fate’ of cells. *Chinese Journal of Cancer Biology*) 2007; 14(4): 393-6.
- 12 Shen ZT, Wu XH, Wang L, Li B, Zhu XX. Effects of gemcitabine on radiosensitization, apoptosis, and Bcl-2 and Bax protein expression in human pancreatic cancer xenografts in nude mice.

- Genet Mol Res 2015; 14(4): 15587-96.
- 13 Gupta J, Nebreda AR. Roles of p38 α mitogen-activated protein kinase in mouse models of inflammatory diseases and cancer. FEBS J 2015; 282: 1841-57.
- 14 Cerezo-Guisado MI, Zur R, Lorenzo MJ, Risco A, Martín-Serrano MA, Alvarez-Barrientos A, *et al.* Implication of Akt, ERK1/2 and alternative p38MAPK signaling pathways in human colon cancer cell apoptosis induced by green tea EGCG. Food Chem Toxicol 2015; 84: 125-32.
- 15 Lee JC, Chung LC, Chen YJ, Feng TH, Chen WT, Juang HH. Upregulation of B-cell translocation gene 2 by epigallocatechin-3-gallate via p38 and ERK signaling blocks cell proliferation in human oral squamous cell carcinoma cells. Cancer Lett 2015; 360(2): 310-8.
- 16 Manohar M, Fatima I, Saxena R, Chandra V, Sankhwar PL, Dwivedi A. (–)-Epigallocatechin-3-gallate induces apoptosis in human endometrial adenocarcinoma cells via ROS generation and p38 MAPK kinase activation. J Nutr Biochem 2013; 24(6): 940-7.