

doi:10.3969/j.issn.1000-9760.2012.04.006

EGCG 对 PLA-802 细胞中 TGF- β 1 和 Smad4 的抑制作用

张红梅¹ 徐芳芳¹ 卜宪敏¹ 崔文^{2△}

(¹ 济宁医学院附属第一人民医院, 山东 济宁 272011; ² 济宁医学院科研处, 山东 济宁 272067)

摘要 **目的** 观察表没食子儿茶素-3-没食子酸酯(epigallocatechin-3 gallate, EGCG)对人横纹肌肉瘤细胞株 PLA-802 细胞内 TGF- β 1/Smad4 mRNA 和蛋白水平的表达的影响, 探索 EGCG 抑制横纹肌肉瘤细胞生长的机制。**方法** 体外培养人横纹肌肉瘤细胞株 PLA-802, 并用不同浓度的 EGCG 作用不同的时间, 用 RT-PCR 和 Western blot 分别检测细胞内 TGF- β 1 和 Smad4 的 mRNA 和蛋白水平的表达。**结果** TGF- β 1 和其下游因子 Smad4 的 mRNA 和蛋白水平的表达明显受到 EGCG 的抑制, 且这种抑制作用呈浓度-时间依赖性 ($P < 0.05$)。**结论** EGCG 可能通过抑制 TGF- β 1 信号通路, 发挥其抑制 PLA-802 细胞生长的作用, 这或许将为临床治疗横纹肌肉瘤提供新的思路。

关键词 表没食子儿茶素-3-没食子酸酯; TGF- β 1 信号通路; PLA-802 细胞

中图分类号: R365; R364.3 **文献标志码**: A **文章编号**: 1000-9760(2012)08-251-03

Inhibitory effect of EGCG on the expression of TGF- β 1 and Smad4 in PLA-802 cells

ZHANG Hong-mei, XU Fang-fang, BU Xian-min, et al

(Jining First People's Hospital & the Affiliated Hospital of Jining Medical University, Jining 272011, China)

Abstract: Objective To observe the inhibitory effect of epigallocatechin-3 gallate (EGCG) on the expression of TGF- β 1 and Smad4 in human alveolar rhabdomyosarcoma cell line PLA-802. **Methods** Human alveolar rhabdomyosarcoma cell line PLA-802 was cultured and treated with EGCG at different concentration and different time points. RT-PCR and western blot were used to detect the expression of TGF- β 1 and Smad4 at mRNA and protein levels. **Results** The expression of TGF- β 1 and its downstream factor Smad4 at mRNA and protein levels were inhibited by EGCG, and the inhibitory effects of EGCG was in a concentration- and time-dependent manner ($P < 0.05$). **Conclusion** EGCG probably played an inhibitory effects on PLA-802 cells through inhibiting the activity of TGF- β 1 signaling pathway, which would provide an important therapeutic potential for treating human alveolar rhabdomyosarcoma.

Key words: EGCG, TGF- β 1 signaling pathway, alveolar rhabdomyosarcoma

横纹肌肉瘤(rhabdomyosarcoma, RMS)是一种具有骨骼肌分化倾向的原始间叶性恶性肿瘤。肉瘤细胞可以产生多种生长因子并表达相应受体, 它们在横纹肌肉瘤细胞发生发展中起着重要作用。Wang H^[1]等研究发现, 胚胎型横纹肌肉瘤可以分泌转化生长因子 β 1(transforming growth factor β 1, TGF- β 1), 并表达 TGF- β 1 相关受体以及下游的因子 Smads 2、3 和 4。更重要的是, 用 TGF- β 1 治疗可以部分抵消 mad4 敲除的影响^[2]。

TGF- β 1 是一种对各种细胞具有刺激或抑制作用的多功能细胞生长因子, 其信号通路中某一成分缺失可诱发上皮性肿瘤^[3]。在 TGF- β 1 信号转导中, TGF- β 1 与 T β RII 结合使之磷酸化, 活化的

T β RII 磷酸化 T β RI, 并与之结合形成四聚体, 后经 Smad 蛋白将信号传入核内, 激活特定靶基因, 调节细胞生长和分化^[4]。其中 Smad4 是 TGF- β 1/Smad 信号通路中的中枢信号转导分子, 起着重要的作用^[5]。关于 TGF- β 1 信号通路在横纹肌肉瘤中的研究较少, 目前主要集中在上皮性肿瘤的研究。由于在肉瘤中所表现的生物学作用与上皮性肿瘤截然不同, 所以有很多问题非常值得探讨。

表没食子儿茶素没食子酸酯(epigallocatechin-3-gallate, EGCG)是绿茶多酚类化合物的重要组成部分, 具有很强的抗氧化作用和抗肿瘤作用^[6]。许多流行病学研究都表明饮用绿茶同众多部位发生肿瘤的危险度偏低相关, 尤其是胃、食管、卵巢和乳腺等^[7-8]。但对横纹肌肉瘤的作用却少见

△ [通信作者] 崔文, E-mail: cuiwenmd@163.com

报道。因此,本研究旨在通过研究 EGCG 对人横纹肌肉瘤细胞株 PLA-802 细胞内 TGF- β 1/Smad4 的表达的影响,探索 EGCG 抑制横纹肌肉瘤细胞生长的机制,为治疗横纹肌肉瘤提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 PLA-802细胞用 DMEM(含10%的胎牛血清)培养基,于37℃、5%CO₂条件下培养。

1.1.2 试剂 EGCG、总 RNA 提取试剂 Biozol、RT-PCR 反应试剂盒、PVDF 膜(Millipore, US)、抗体 TGF- β 1 和 Smad4。

1.2 方法

1.2.1 RT-PCR 检测 设计和合成引物,TGF- β 1, 5'-GCT AAT GGT GGA CCG CAA CAA C-3' (sense), 5'-CAG CAG CCG GTT ACC AAG-3' (antisense); Smad4, 5'-CAG CTA TAA CTA CAA ATG GAG C-3'(sense), 5'-TTG TTC AAT GGC CGA TCC CAT-3' (antisense); β -actin, 5'-CTC GTC ATA CTC CTG CTT GCT G 3', 5'-CGG GAC CTG ACT GAC TACC TC 3'。按常规步骤提取总 RNA,然后进行反转录和 PCR 扩增。最后的产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,终产物片段长度为分别为 229、338、546bp。用 Bio-rad 凝胶成像系统软件分别测定 TGF- β 1, Smad4 和 β -actin mRNA 的吸光度,然后计算其比值表示结果,即:相对吸光度(A Value)=目的基因 mRNA 吸光度/ β -actin mRNA 吸光度。

1.2.2 Western blot 检测 收集细胞提取总蛋白,并测定蛋白的浓度为 1.35 ± 0.15 mg/ml。取蛋白样品,经过 SDS-PAGE 电泳后,将蛋白电转移至 PVDF 膜,以 5% 脱脂奶粉 TBST 液封闭后,加入一抗 4℃ 孵育过夜,洗涤后加入 HRP 标记的二抗室温孵育 1 h 后,ECL 底物化学发光显色后曝光显影。通过 Chemi DocXRS 化学发光成像系统,进行曝光分析,然后计算其比值表示结果,即:相对吸光度(A Value)=目的蛋白吸光度/ β -actin 蛋白吸光度。

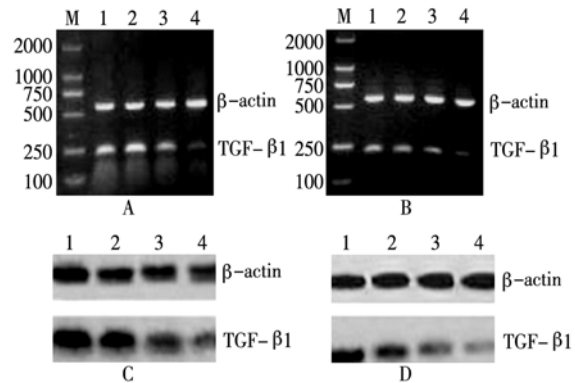
1.3 统计学方法

所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS11.0 进行数据分析。

2 结果

2.1 EGCG 对 PLA-802 细胞中 TGF- β 1 mRNA 和蛋白水平的抑制作用

检查结果显示,经 EGCG 处理后,PLA-802 细胞中 TGF- β 1 mRNA 和蛋白水平的表达较对照组有显著下降,差异有统计学意义($P < 0.05$),且这种抑制作用呈浓度-时间依赖性($P < 0.05$)(见图 1)。

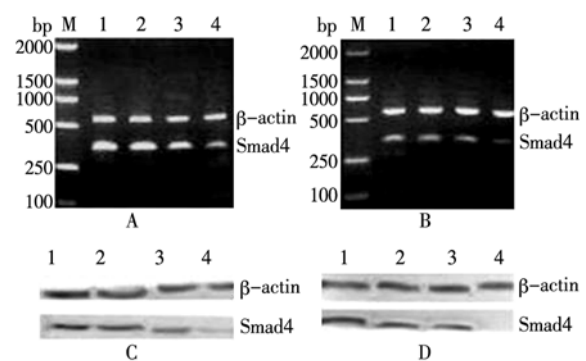


A:不同浓度的 EGCG 作用 24h 后对细胞内 TGF- β 1 mRNA 表达的影响 (M:Marker I;1. 对照组;2. 10 μ g/ml 组;3. 20 μ g/ml 组;4. 40 μ g/ml 组)
B:20 μ g/ml 的 EGCG 作用不同时间后对细胞内 TGF- β 1 mRNA 表达的影响 (M:Marker I;1. 对照组;2. 24 h 组;3. 48 h 组;4. 72 h 组)
C:不同浓度的 EGCG 作用 24h 后对细胞内 TGF- β 1 蛋白表达的影响 (1. 对照组;2. 10 μ g/ml 组;3. 20 μ g/ml 组;4. 40 μ g/ml 组)
D:20 μ g/ml 的 EGCG 作用不同时间后对细胞内 TGF- β 1 蛋白表达的影响 (1. 对照组;2. 24 h 组;3. 48 h 组;4. 72 h 组)

图 1 EGCG 对 PLA-802 细胞中 TGF- β 1 mRNA 和蛋白水平的表达的影响

2.2 EGCG 对 PLA-802 细胞中 Smad4 mRNA 和蛋白水平的抑制作用

检查结果显示,EGCG 处理后,PLA-802 细胞中 Smad4 mRNA 和蛋白水平的表达较对照组有显著下降,差异有统计学意义($P < 0.05$),且这种抑制作用也呈浓度-时间依赖性($P < 0.05$)(见图 2)。



A:不同浓度的 EGCG 作用 24h 后对细胞内 Smad4 mRNA 表达的影响 (M:Marker I;1. 对照组;2. 10 μ g/ml 组;3. 20 μ g/ml 组;4. 40 μ g/ml 组)
B:20 μ g/ml 的 EGCG 作用不同时间后对细胞内 Smad4 mRNA 表达的影响 (M:Marker I;1. 对照组;2. 24 h 组;3. 48 h 组;4. 72 h 组)
C:不同浓度的 EGCG 作用 24h 后对细胞内 Smad4 蛋白表达的影响 (1. 对照组;2. 10 μ g/ml 组;3. 20 μ g/ml 组;4. 40 μ g/ml 组)
D:20 μ g/ml 的 EGCG 作用不同时间后对细胞内 Smad4 蛋白表达的影响 (1. 对照组;2. 24 h 组;3. 48 h 组;4. 72 h 组)

图 2 EGCG 对 PLA-802 细胞中 Smad4 mRNA 和蛋白水平的表达的影响

3 讨论

TGF- β 1 在体内或体外具有广泛的生物学活性,它可以通过影响其下游的靶基因 Smads 家族的成员的表达而发挥功能^[9-10]。TGF- β 1 在胞内的激酶底物为 Smad 蛋白,其中,Smad4 是目前发现的唯一的 Co-Smad,活化的 Smad2、Smad3 蛋白只有在与 Smad4 结合形成转录复合物,才能进入细胞核,调节靶基因的转录,发挥普遍的抑制生长效应^[11]。目前研究表明:横纹肌肉瘤细胞可异常分泌 TGF- β 1, TGF- β 受体和表达其下游的分子 Smads^[1]。最近有研究结果显示,在成肌细胞中 TGF- β 1 是通过 Smad2 和 Smad4 复合物与 MEF2 (Myocyte enhancer-binding factor 2) 转录调节蛋白结合成的共调物来完成抑制肌源性分化,但尚未在肌源性肿瘤中得到证实。Ye L 等^[2]发现当短发夹 RNA 调节的内源性的 Smad4 表达沉默,就会阻断 TGF- β 1/Smad 信号分子的转导,横纹肌肉瘤细胞的生长就会受到抑制。而且,利用 TGF- β 1 治疗可以部分抵消 Smad4-shRNA 对细胞的生长抑制和诱导凋亡的作用。

EGCG 作为绿茶中的主要作用成分,是多效的生物活性物质,具有较强的抗肿瘤作用。它可以通过诱导肿瘤细胞凋亡、抑制端粒酶活性及抑制生长因子介导的细胞分裂素活化蛋白激酶(MAPK)依赖性和酪氨酸激酶依赖性信号转导通路等发挥其作用^[12-13]。但对间叶组织来源的肿瘤的作用却未见报道。因此,我们推测 EGCG 是否能够通过抑制 TGF- β 1/Smads 信号通路的活性而抑制 RMS 细胞的生长。本实验我们利用 EGCG 处理细胞后,发现随着 EGCG 药物浓度的增加和作用时间的延长,TGF- β 1 和 Smad4 mRNA 和蛋白水平的表达都显著减弱,且这种抑制作用有浓度-时间依赖性。这表明,EGCG 能够抑制 TGF- β 1/Smad4 信号通路的活性。

总之,外源性的 EGCG 对 PLA-802 细胞生长的抑制作用可通过阻断内源性的 TGF- β 1/Smad4 通路的活性实现,这或许将为临床治疗 RMS 提供一个理论。但是,EGCG 抑制 TGF- β 1/Smad4

信号通路的确切机制仍需要进一步研究,而体内研究也需要进一步开展,以便将来 EGCG 作为预防或治疗 RMS 的有效的药物提供更为充分的依据。

参考文献:

- [1] Wang H, Yang GH, Bu H, et al. Systematic analysis of the TGF- β /Smad signaling pathway in the rhabdomyosarcoma cell line RD. [J]. *Int J Exp Pathol*, 2003, 84: 153-163.
- [2] Ye L, Zhang H, Zhang L, et al. Effects of RNAi-mediated Smad4 silencing on growth and apoptosis of human rhabdomyosarcoma cells[J]. *Int J Oncol*, 2006, 29(5): 1149-1157.
- [3] Kaminska B, Wesolowska A, Danilkiewicz M. TGF β signaling and its role in tumor pathogenesis[J]. *Acta Biochim Pol*, 2005, 52(2): 329-337.
- [4] Goto N, Hiyoshi H, Ito I, et al. Estrogen and antiestrogens alter breast cancer invasiveness by modulating the transforming growth factor- β signaling pathway[J]. *Cancer Sci*, 2011, 102(8): 1501-1508.
- [5] Giampieri S, Pinner S, Sahai E. Intravital imaging illuminates transforming growth factor β signalling switches during metastasis[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(9): 3435-3439.
- [6] Milligan SA, Burke P, Coleman DT, et al. The green tea polyphenol EGCG potentiates the antiproliferative activity of c-Met and epidermal growth factor receptor inhibitors in non-small cell lung cancer cells[J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(15): 4885-4894.
- [7] Zhang M, Holman CD, Huang JP, et al. Green tea and the prevention of breast cancer: a case-control study in Southeast China[J]. *Carcinogenesis*, 2007, 28: 1074-1078.
- [8] Larsson SC, Wolk A. Tea consumption and ovarian cancer risk in a population-based cohort[J]. *Arch Intern Med*, 2005, 165(22): 2683-2686.
- [9] Tandon A, Tovey JC, Sharma A, et al. Role of transforming growth factor β in corneal function, biology and pathology[J]. *Curr Mol Med*, 2010, 10(6): 565-578.
- [10] Yang G, Yang X. Smad4-mediated TGF- β signaling in tumorigenesis[J]. *Int J Biol Sci*, 2010, 6(1): 1-8.
- [11] Padua D, Massagué J. Roles of TGF- β in metastasis [J]. *Cell Res*, 2009, 19(1): 89-102.
- [12] Kundu JK, Surh YJ. Epigallocatechin gallate inhibits phorbol ester-induced activation of F- κ B and CREB in mouse skin; role of p38 MAPK[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2007, 1095: 504-512.

(收稿日期 2012-06-11)