

表没食子儿茶素没食子酸酯对 H₂₂ 肝癌荷瘤小鼠肿瘤生长的抑制作用

彭 静¹, 陈 曦²

(1. 乐山职业技术学院中医教研室, 四川 乐山 614000; 2. 乐山市市中区人民医院中医科, 四川 乐山 614000)

摘要: 研究表没食子儿茶素没食子酸酯对 H₂₂ 肝癌荷瘤小鼠肿瘤生长的抑制作用。**方法** 小鼠按体质量随机分为正常组、模型组、5-氟尿嘧啶组 (20 mg/kg)、表没食子儿茶素没食子酸酯高剂量 (80 mg/kg) 及低剂量组 (40 mg/kg), 每组 10 只。常规方法建立 H₂₂ 肝癌荷瘤小鼠模型, 次日给药, 持续给药 7 d; 5-氟尿嘧啶组腹腔注射给药, 表没食子儿茶素没食子酸酯组灌胃给药。检测荷瘤小鼠瘤重、脾脏指数、胸腺指数、血常规、血清白细胞介素-2 (IL-2)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 及瘤组织血管内皮生长因子 (VEGF)、基质金属蛋白酶 2 (MMP2)、MMP9 等指标。**结果** 与模型组比较, 表没食子儿茶素没食子酸酯高、低剂量组小鼠瘤重降低 ($P<0.01$), 而脾脏指数、胸腺指数及白细胞数增加 ($P<0.05$, $P<0.01$), 表没食子儿茶素没食子酸酯高、低剂量组小鼠血清 IL-2、TNF- α 水平增加 ($P<0.05$, $P<0.01$), 而瘤组织 VEGF、MMP2 及 MMP9 表达降低 ($P<0.01$)。**结论** 表没食子儿茶素没食子酸酯可以明显抑制荷瘤小鼠的肿瘤生长, 该作用与提高免疫力及抑制 VEGF、MMP2、MMP9 表达有关。

关键词: 表没食子儿茶素没食子酸酯; 肝癌; 免疫

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2021)04-1037-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2021.04.040

表没食子儿茶素没食子酸酯是从绿茶中提取的多酚类化合物, 具有干预代谢酶活性、保护心脑血管功能、调节免疫内分泌、降低氧化应激水平及抗肿瘤等多种生物学活性, 得到人们越来越多的关注^[1]。表没食子儿茶素没食子酸酯的抗肿瘤作用被广泛研究, 其具有抗胃癌、肺癌及神经胶质瘤等作用^[2-4]。表没食子儿茶素没食子酸酯具有较高的体内抑瘤活性, 能够通过抗氧化作用抑制 H₂₂ 小鼠肿瘤增长^[5]。此外, 表没食子儿茶素没食子酸酯可以联合紫杉醇、多柔比星等化疗药物, 通过细胞周期阻滞、诱导凋亡等作用, 发挥协同抗肝癌效果^[6-7]。本研究拟在进一步明确表没食子儿茶素没食子酸酯抗肝癌作用的基础上, 重点关注其对免疫功能与 VEGF、MMP2、MMP9 表达的影响, 进一步阐明抗肝癌机制。

1 材料

1.1 瘤株与动物 小鼠肝癌 H₂₂ 细胞, 购自美国 ATCC 公司。SPF 级昆明种小鼠, 体质量 20~22 g, 购自北京维通利华实验动物公司, 动物生产许可证号 SCXK (京) 2014-0004。

1.2 药物与试剂 表没食子儿茶素没食子酸酯 (批号 170718, 纯度>98.0%), 购自四川维克奇生物科技有限公司; 5-氟尿嘧啶 (批号 20180109), 购自上海阿拉丁生化科技有限公司; 白细胞介素-2 (IL-2) 及肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 检测试剂盒 (批号分别为 180624、181008), 购

自南京建成生物工程研究所; 血管内皮生长因子 (VEGF)、基质金属蛋白酶 2 (MMP2) 及 MMP9 抗体 (批号分别为 G0815、SC-13595、SC-16840), 购自美国 Santa 公司; 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 抗体 (批号 20181204), 购自杭州华安生物科技有限公司。

1.3 仪器 BSC-1100IIA2-X 生物安全柜 (济南鑫贝西生物技术有限公司); I160 型 CO₂ 培养箱 (美国 Forma 公司); CX31 生物显微镜 (日本奥林巴斯公司); HC-2518RHC 高速冷冻离心机 (安徽中科中佳仪器公司); Mini-PROTEAN 蛋白电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司); HBS-1096A 酶标仪 (南京德铁实验设备有限公司)。

2 方法

2.1 H₂₂ 肝癌荷瘤小鼠模型建立及分组、给药 小鼠按体质量随机分为正常组、模型组、5-氟尿嘧啶组及表没食子儿茶素没食子酸酯高剂量、低剂量组, 每组 10 只。采用 10% 胎牛血清 (含 100 U/mL 双抗), 在饱和湿度、5% CO₂、37 °C 条件下培养 H₂₂ 肝癌细胞至对数生长期, 于小鼠腹腔中接种。小鼠腹部膨大后, 处死小鼠, 无菌操作抽取腹水, 并调整至 1×10⁶/mL, 模型组、5-氟尿嘧啶组、表没食子儿茶素没食子酸酯高剂量及低剂量组小鼠右腋下接种 0.2 mL, 正常组小鼠相同位置注射等体积生理盐水。接种次日给药, 5-氟尿嘧啶组腹腔注射 20 mg/kg 5-氟尿嘧啶, 表没食子儿茶素没食子酸酯高剂量及低剂量组分别灌胃

收稿日期: 2019-08-12

基金项目: 乐山市重点科技计划项目 (19SZD207)

作者简介: 彭 静 (1982—), 女, 硕士, 副主任医师, 研究方向为中医药治疗肿瘤。Tel: 13628183808, E-mail: pengjingls@126.com

80、40 mg/kg的表没食子儿茶素没食子酸酯，持续 7 d；正常组及模型组小鼠灌胃等体积的生理盐水。

2.2 抑瘤率及脏器指数计算 末次给药 24 h 后称定小鼠体质量，随后摘眼球取血，分装。一部分用于血液常规指标测定，一部分离心后分离血清，用于 IL-2 及 TNF-α 水平测定。颈椎脱臼法处死小鼠，完整剥离瘤块、脾脏及胸腺，精密称重，分别计算抑瘤率、脾脏及胸腺指数。抑瘤率=[(模型组平均瘤质量-药物处理组平均瘤质量)/模型组平均瘤质量]×100%，脾脏指数=脾脏质量/体质量，胸腺指数=胸腺质量/体质量。

2.3 血液常规指标测定 取“2.2”项下分装的小鼠血液，采用小动物全自动血细胞分析仪测定各组小鼠血液中血红蛋白水平及红细胞数、白细胞数。

2.4 血清 IL-2 及 TNF-α 水平测定 取“2.2”项下分装的血清，按照试剂盒说明书中的操作步骤，采用酶联免疫吸附法（ELISA）测定各组小鼠血清 IL-2 及 TNF-α 水平。

2.5 瘤组织 VEGF、MMP2 及 MMP9 表达测定 取各组小鼠瘤组织，匀浆，提取瘤组织总蛋白并定量。采用 SDS-PAGE 电泳进行目的蛋白的分离，经转膜、封闭后，加入 VEGF、MMP2、MMP9（1：1 000）抗体，4℃放置 12 h。

表 1 表没食子儿茶素没食子酸酯对荷瘤小鼠体质量、瘤重及抑瘤率的影响 ($\bar{x}\pm s$ ， $n=10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	体质量/g		瘤质量/g	抑瘤率/%
		实验前	实验后		
正常组	—	19.24±2.18	27.86±2.75	—	—
模型组	—	20.05±1.82	26.54±3.39	1.13±0.21	—
5-氟尿嘧啶组	20	20.61±2.31	21.22±4.02 ^{##}	0.54±0.07 ^{##}	52.2
表没食子儿茶素没食子酸酯高剂量组	80	19.73±1.79	26.10±3.26	0.72±0.09 ^{##}	36.3
表没食子儿茶素没食子酸酯低剂量组	40	20.35±1.64	27.07±2.66	0.80±0.12 ^{##}	29.2

注：与模型组比较，[#] $P<0.05$ ，^{##} $P<0.01$ 。

3.2 表没食子儿茶素没食子酸酯对荷瘤小鼠脏器指数的影响 与正常组比较，模型组小鼠脾脏指数、胸腺指数均降低（ $P<0.01$ ）；与模型组比较，5-氟尿嘧啶组小鼠脾脏指数、胸腺指数均进一步降低（ $P<0.01$ ），而表没食子儿茶

表 2 表没食子儿茶素没食子酸酯对荷瘤小鼠脏器指数的影响 ($\bar{x}\pm s$ ， $n=10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	脾脏指数/(mg·g ⁻¹)	胸腺指数/(mg·g ⁻¹)
正常组	—	5.15±0.66	3.56±0.46
模型组	—	3.41±0.52 ^{**}	2.62±0.47 ^{**}
5-氟尿嘧啶组	20	2.78±0.41 ^{##}	1.38±0.22 ^{##}
表没食子儿茶素没食子酸酯高剂量组	80	4.71±0.57 ^{##}	3.40±0.59 ^{##}
表没食子儿茶素没食子酸酯低剂量组	40	4.25±0.45 ^{##}	3.02±0.53 [#]

注：与正常组比较，^{**} $P<0.01$ ；与模型组比较，[#] $P<0.05$ ，^{##} $P<0.01$ 。

3.3 表没食子儿茶素没食子酸酯对荷瘤小鼠血液常规指标的影响 各组小鼠血液血红蛋白水平、红细胞数变化无差异（ $P>0.05$ ）。与正常组比较，模型组小鼠血液白细胞数增加（ $P<0.05$ ）；与模型组比较，5-氟尿嘧啶组小鼠白细胞数降低（ $P<0.01$ ），而表没食子儿茶素没食子酸酯高、低剂量组小鼠白细胞数增加（ $P<0.05$ ， $P<0.01$ ）。上述结果说明，表没食子儿茶素没食子酸酯可以增加荷瘤小鼠的白细胞数，提升小鼠的免疫能力。见表 3。

洗膜后，HRP 标记的二抗继续孵育 4 h，洗膜后进行曝光显影。蛋白相对表达量为目的蛋白灰度值与内参 GAPDH 蛋白灰度值之比。

2.6 数据统计 通过 SPSS 20.0 软件进行处理，计量数据采用（ $\bar{x}\pm s$ ）表示，单因素方差分析用于多组间比较，组间两两比较，方差不齐时采用 Dunntt’s T3，方差齐时采用 LSD 检验。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 表没食子儿茶素没食子酸酯对荷瘤小鼠体质量、瘤质量及抑瘤率的影响 实验前，各组小鼠体质量无差异（ $P>0.05$ ）。实验后，与正常组比较，模型组小鼠体质量差异无统计学意义（ $P>0.05$ ）；与模型组比较，5-氟尿嘧啶组小鼠体质量降低（ $P<0.01$ ），而表没食子儿茶素没食子酸酯高、低剂量组小鼠体质量差异无统计学意义（ $P>0.05$ ），说明 5-氟尿嘧啶严重影响荷瘤小鼠的生长，对荷瘤小鼠机体存在明显的损伤。与模型组比较，5-氟尿嘧啶组及表没食子儿茶素没食子酸酯高、低剂量组小鼠瘤重降低（ $P<0.01$ ），抑瘤率分别为 52.2%、36.3%、29.2%，说明 5-氟尿嘧啶及表没食子儿茶素没食子酸酯均可以明显抑制荷瘤小鼠的肿瘤生长。见表 1。

素没食子酸酯高、低剂量组小鼠脾脏指数、胸腺指数增加（ $P<0.05$ ， $P<0.01$ ）。上述结果说明，表没食子儿茶素没食子酸酯可以增加小鼠免疫器官的质量，提升小鼠的免疫能力。见表 2。

3.4 表没食子儿茶素没食子酸酯对荷瘤小鼠血清 IL-2 及 TNF-α 水平的影响 ELISA 检测结果发现，与正常组比较，模型组小鼠血清 IL-2、TNF-α 水平均降低（ $P<0.01$ ）；与模型组比较，5-氟尿嘧啶组小鼠血清 IL-2、TNF-α 水平进一步降低（ $P<0.01$ ），而表没食子儿茶素没食子酸酯高、低剂量组小鼠血清 IL-2、TNF-α 水平增加（ $P<0.05$ ， $P<0.01$ ）。上述结果说明，表没食子儿茶素没食子酸酯可以通过提高免疫因子的水平，提升小鼠的免疫能力。见表 4。

表 3 表没食子儿茶素没食子酸酯对荷瘤小鼠血液常规指标的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)				
组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	血红蛋白/(g·L ⁻¹)	红细胞/(×10 ¹² ·L ⁻¹)	白细胞/(×10 ⁹ ·L ⁻¹)
正常组	—	85.03±12.21	5.43±0.52	5.28±0.61
模型组	—	83.53±11.48	5.25±0.46	6.49±0.81**
5-氟尿嘧啶组	20	82.37±14.40	5.15±0.81	2.51±0.42 [#]
表没食子儿茶素没食子酸酯高剂量组	80	84.57±9.77	5.30±0.64	8.54±1.05 ^{##}
表没食子儿茶素没食子酸酯低剂量组	40	87.24±10.35	5.56±0.76	7.16±0.87 [#]

注:与正常组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$ 。

表 4 表没食子儿茶素没食子酸酯对荷瘤小鼠血清 IL-2 及 TNF-α 水平的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)			
组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	IL-2/(pg·mL ⁻¹)	TNF-α/(pg·mL ⁻¹)
正常组	—	36.23±4.11	67.34±7.58
模型组	—	18.72±3.46**	53.10±7.16**
5-氟尿嘧啶组	20	14.24±3.52 ^{##}	45.75±5.75 ^{##}
表没食子儿茶素没食子酸酯高剂量组	80	25.12±4.50 ^{##}	66.63±6.83 ^{##}
表没食子儿茶素没食子酸酯低剂量组	40	22.48±3.91 ^{##}	61.21±8.65 [#]

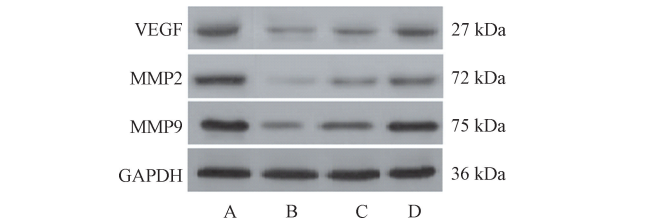
注:与正常组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$ 。

3.5 表没食子儿茶素没食子酸酯对荷瘤小鼠瘤组织 VEGF、MMP2 及 MMP9 蛋白表达的影响 与模型组比较,5-氟尿嘧啶组及表没食子儿茶素没食子酸酯高、低剂量组

小鼠瘤组织 VEGF、MMP2 及 MMP9 蛋白表达均降低($P<0.01$),其中 5-氟尿嘧啶组下降幅度更为明显。见表 5、图 1。

表 5 表没食子儿茶素没食子酸酯对荷瘤小鼠瘤组织 VEGF、MMP2 及 MMP9 表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)				
组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	VEGF	MMP2	MMP9
模型组	—	0.42±0.06	0.56±0.08	0.83±0.12
5-氟尿嘧啶组	20	0.11±0.02 ^{##}	0.07±0.01 ^{##}	0.18±0.02 ^{##}
表没食子儿茶素没食子酸酯高剂量组	80	0.15±0.03 ^{##}	0.14±0.02 ^{##}	0.30±0.04 ^{##}
表没食子儿茶素没食子酸酯低剂量组	40	0.24±0.03 ^{##}	0.26±0.04 ^{##}	0.65±0.08 ^{##}

注:与模型组比较,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$ 。



注 A~D 分别为模型组、5-氟尿嘧啶组、表没食子儿茶素没食子酸酯高剂量组、表没食子儿茶素没食子酸酯低剂量组。

图 1 各组小鼠瘤组织 VEGF、MMP2、MMP9 表达

4 讨论

机体的免疫能力与肿瘤的发生、发展密切相关。脾脏及胸腺是最主要的免疫器官,研究发现,荷瘤小鼠脾脏及胸腺常出现萎缩,而免疫促进剂可使其质量得到部分恢复^[8]。本研究结果发现,表没食子儿茶素没食子酸酯可以增加小鼠免疫器官的质量,也可以升高白细胞数,具有提升小鼠免疫能力的作用。为进一步确认表没食子儿茶素没食子酸酯的抑瘤作用及免疫保护作用,本研究对各组小鼠血清 IL-2 及 TNF-α 水平进行了检测。IL-2 是机体内重要的细胞免疫因子,在机体免疫系统中起到中心调节的作用,可以刺激免疫细胞活化,促进 T 细胞的增殖和分化,提高机体免疫功能^[9]。研究发现,贞芪酪蛋白肽复合物可以提

高 Lewis 肺癌荷瘤模型小鼠血清 IL-2 水平,发挥抗 Lewis 肺癌作用^[10]。TNF-α 是目前已知的具有抗肿瘤作用最强的细胞免疫因子,其可以促进 T 细胞产生炎症因子,增强宿主免疫功能,诱导细胞凋亡;也可以直接杀伤肿瘤血管内皮细胞,发挥抗肿瘤作用^[11]。研究发现^[12],白花丹醌具有体内抗肝癌 H₂₂ 移植性肿瘤模型小鼠肿瘤活性,其机制可能与增加 TNF-α 的水平有关。因此,IL-2 和 TNF-α 的水平可直接反映机体的免疫功能和抗肿瘤活性。本研究结果发现,表没食子儿茶素没食子酸酯可以通过提高免疫因子 IL-2 和 TNF-α 的水平,提升小鼠的免疫能力;而免疫能力的提高是表没食子儿茶素没食子酸酯发挥抗肝癌作用的潜在机制。

VEGF 能诱导蛋白水解酶、间质胶原酶等促使新生血管形成,从而为肿瘤生长提供基础^[13-14]。研究^[15]发现,化痰消瘤方通过降低 VEGF 的表达,抑制 Lewis 肺癌瘤体生长。在生理条件下,基质金属蛋白酶(MMPs)的降解、分泌及活性受到严格的调节和控制,而在肿瘤的发生、发展进程中,MMP2 及 MMP9 等表达异常增加,进而引起肿瘤的生长^[16]。大量研究证实,多种恶性肿瘤的生长与 MMP2、MMP9 的异常高表达有关^[17]。研究发现,姜黄素通过抑制外周血和肿瘤组织中 MMP2、MMP9 的表达,发挥抗宫颈癌作用^[18]。本研究结果发现,表没食子儿茶素没食子酸酯高、低剂量组小鼠瘤组织 VEGF、MMP2 及 MMP9 表达均降低,进一步提示其具有抑制 H₂₂ 肝癌荷瘤小鼠肿

瘤生长的潜在作用。

肝癌起病隐匿、进展迅速，是影响人类健康的重大疾病之一，借助化学药物进行的化疗是中、晚期肝癌的主要治疗手段。传统化疗药物由于不良反应大，对机体损害严重，整体效果难以令人满意^[19]。本研究结果最终表明，表没食子儿茶素没食子酸酯可以明显抑制 H₂₂ 肝癌荷瘤小鼠的肿瘤生长，该作用与提高免疫力及抑制 VEGF、MMP2、MMP9 表达有关。此发现，为把表没食子儿茶素没食子酸酯开发成为具有抗肝癌作用的临床药物提供了理论依据。

参考文献：

[1] 葛 建,林 芳,李明揆,等. 表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)生物活性研究进展[J]. 安徽农业大学学报, 2011, 38(2): 156-163.

[2] 丁 峰,刘学政,李 娟. 表没食子儿茶素没食子酸酯对裸鼠 MGC-803 细胞移植瘤抑制作用及机制研究[J]. 中药药理与临床, 2016, 32(3): 33-37.

[3] 吴秀芝,袁 芳. 表没食子儿茶素没食子酸酯联合多柔比星对肺癌 A549 细胞增殖与荷瘤裸鼠肿瘤生长的抑制作用[J]. 中国药房, 2015, 26(10): 1353-1356.

[4] 彭 超,罗祎敏,陈延群. 表没食子儿茶素没食子酸酯对星形神经胶质瘤 U87MG 细胞基质金属蛋白酶-2 及核因子 κB 活性影响研究[J]. 中国现代医学杂志, 2015, 25(20): 27-31.

[5] 孙若思,梁 惠,孙黎玮,等. 表没食子儿茶素没食子酸酯抑瘤活性及抗氧化作用研究[J]. 滨州医学院学报, 2014, 37(2): 84-86.

[6] 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.

[7] 欧冰凝,林晓贞,梁 钢,等. 表没食子儿茶素没食子酸酯对裸鼠肝癌移植瘤细胞凋亡作用的研究[J]. 时珍国医国药, 2012, 23(8): 1854-1855.

[8] Wu H, Chen B, Peng B. Effects of intratumoral injection of immunoactivator after microwave ablation on antitumor immunity in a mouse model of hepatocellular carcinoma[J]. *Exp Ther Med*, 2018, 15(2): 1914-1917.

[9] Xu T, Meng X M, Yao H W, *et al.* IL-2 is a gradually proved potential therapeutic target for hepatocellular carcinoma[J]. *Dig Liver Dis*, 2014, 46(3): 289-290.

[10] 吴建军,金 玉,张延英,等. 贞芪酪蛋白肽复合物对 Lewis 肺癌荷瘤小鼠抗瘤作用及对 IL-2、TNF 的影响[J]. 中成药, 2012, 34(12): 2271-2274.

[11] Alves A F, Baldissera V D, Chiela E C F, *et al.* Altered expression of COX-2 and TNF-α in patients with hepatocellular carcinoma[J]. *Rev Esp Enferm Dig*, 2019, 111(5): 364-370.

[12] 张吉仲,李利民,刘 圆. 白花丹醌对 H₂₂ 肝癌的抑制作用和对荷瘤小鼠血清中 IL-2 和 TNF-α 的影响[J]. 华西药杂志, 2012, 27(4): 402-403.

[13] Li Z, Ding J, Zhao X, *et al.* Combination therapy of hepatocellular carcinoma by DNA shuffling-based VEGF vaccine and doxorubicin[J]. *Immunotherapy*, 2018, 10(11): 951-969.

[14] Li X, Zhang D, Guan S, *et al.* Efficacy of anti-VEGF agents in the treatment of elderly hepatocellular carcinoma: a systematic review[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(54): 93179-93185.

[15] 蒋艳玲,郑锡军,孙宏新. 化痰消瘤方对荷 Lewis 肺癌小鼠 nm-23, VEGF 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(17): 157-161.

[16] Liu J, Wen X, Liu B, *et al.* Diosmetin inhibits the metastasis of hepatocellular carcinoma cells by downregulating the expression levels of MMP-2 and MMP-9[J]. *Mol Med Rep*, 2016, 13(3): 2401-2408.

[17] Huang C F, Teng Y H, Lu F J, *et al.* β-Mangostin suppresses human hepatocellular carcinoma cell invasion through inhibition of MMP-2 and MMP-9 expression and activating the ERK and JNK pathways [J]. *Environ Toxicol*, 2017, 32 (11): 2360-2370.

[18] 江 红,毛小刚. 姜黄素对小鼠宫颈癌皮下移植瘤模型外周血和肿瘤组织 MMP2、MMP9、VEGF 表达的影响[J]. 临床和实验医学杂志, 2016, 15(9): 832-835.

[19] Rimassa L, Danesi R, Pressiani T, *et al.* Management of adverse events associated with tyrosine kinase inhibitors: Improving outcomes for patients with hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Treat Rev*, 2019, 15(5): 20-28.