

茶多酚锰络合物诱导肝癌细胞凋亡的差异蛋白质表达

翁鹭娜^{1,2}, 蒙伟能², 季学涛², 李程², 黄河清²

(1. 厦门口岸药品检验所药理学室, 福建 厦门 361012; 2. 厦门大学生命科学学院生物化学与生物技术系, 福建 厦门 361005)

摘要: 目的 研究茶多酚锰络合物 (TP-Mn) 诱导肝癌细胞 HepG2 凋亡过程中差异蛋白质的表达。方法 HepG2 细胞分别与茶多酚 (TP) 700 mg·L⁻¹, TP-Mn 700 mg·L⁻¹, 茶多酚锗 (TP-Ge) 700 mg·L⁻¹ 作用 48 h 后, 光学显微镜法观察细胞形态的变化; 流式细胞仪检测细胞凋亡率; 双向聚丙烯酰胺凝胶电泳 (2D-PAGE) 法分离 HepG2 细胞表达的差异蛋白; 肽质量指纹法鉴定差异蛋白质。结果 光学显微镜检查发现, TP 和 TP-Mn 组 HepG2 细胞数量明显减少, 细胞皱缩变形, 并出现死亡细胞; TP-Ge 组 HepG2 细胞数量无明显减少。流式细胞仪检测发现, TP-Mn 组细胞凋亡率为 (30.1 ± 0.7)%, 明显高于 TP 组 (12.3 ± 0.4)% ($P < 0.05$)。2D-PAGE 结果显示, TP-Mn 诱导 HepG2 细胞凋亡过程中表达了多种差异蛋白质; 肽质量指纹法鉴定结果显示, 其中匹配率较高的差异蛋白质为 γ -肌动蛋白和酪氨酸 3/色氨酸 5-单加氧酶激活蛋白。结论 TP-Mn 具有诱导 HepG2 细胞凋亡的能力, 并有差异蛋白质表达。

关键词: 茶多酚锰; 蛋白质组学; 蛋白表达; 癌, 肝细胞; 细胞凋亡

中图分类号: R285, R966 文献标志码: A 文章编号: 1000-3002(2011)03-0285-04

DOI: 10.3867/j.issn.1000-3002.2011.03.013

茶多酚 (tea polyphenol, TP) 来源于茶叶, 由黄烷醇类、花色苷类、花黄素类、缩酸及缩酚酸类组成; 其中黄烷醇类又称为儿茶素类, 占 TP 总量的 70% ~ 80%。儿茶素主要由表没食子儿茶素没食子酸酯 [($-$)-epigallocatechin-3- o -gallate, EGCG]、表没食子儿茶素、表儿茶素没食子酸酯和表儿茶素等组成^[1-2]。大量实验结果发现, EGCG 或其他多酚单体不仅能产生诱导肿瘤细胞凋亡的药效, 而且具有杀菌效果^[3-4]。TP 分子内的多个邻位酚羟基可作为配体络合许多过渡金属离子, 如锗 (Ge) 和锰 (Mn) 等。近期研究发现, TP 和 TP-Ge 络合物均有诱导肺癌细胞凋亡的能力, 但后者诱导效率明显高于前者^[5]。本研究采用光学显微镜法和流式细胞术分别研究 TP-Mn 诱导 HepG2 细胞形态变化趋势和细胞凋亡率, 并采用蛋白质组学技术筛选和鉴定由 TP-Mn 诱导 HepG2 细胞凋亡表达的差异蛋白质, 为后续深入研究 TP-Mn 诱导肿瘤细胞凋亡的分子机制、揭示关键蛋白质结构与功能以及研制抗肿瘤新药提供依据。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (40776060); 教育部“长江学者与创新团队发展计划”基金项目 (PCSIRT-IRT0941)

作者简介: 翁鹭娜 (1972-), 女, 副主任药师, 硕士, 从事药品标准研究与药理学评价。黄河清 (1956-), 男, 教授, 博士生导师, 主要从事蛋白质结构与功能研究。

通讯作者: 黄河清, E-mail: hqhuang@xmu.edu.cn

1 材料与方法

1.1 药物、试剂及主要仪器

HepG2 细胞由中国科学院细胞研究所提供。TP 购自福建天宝生物化工厂; Ge 和 Mn 标准溶液由北京国家标准物质供应部提供; Mn 标准溶液, 批号 BW079815, Ge 标准溶液, 批号 GSB 04-1728-2004。硫酸锰购自国药集团化学试剂有限公司, 规格: AR 500 g。氧化锗购自上海医药采购供应站; 2,5-二羟基苯甲酸 (DHB) 购自美国 ICN 生物医学公司; 三氟乙酸 (分析纯) 等化学试剂购自上海生物工程有限公司和美国 Sigma 公司。参照文献 [1] 和 [5] 合成 TP-Mn 和 TP-Ge。

TE2000-S 型荧光倒置显微镜, 日本 Nikon 公司; EPICS XL 型流式细胞仪, 美国 Beckman Coulter 公司; Reflex III 型 MALDI-TOF 质谱仪, 德国 Bruker 公司。

1.2 HepG2 细胞分组及处理

细胞分为正常对照、TP 700 mg·L⁻¹、TP-Ge 700 mg·L⁻¹ 和 TP-Mn 700 mg·L⁻¹ 组, 分别作用 HepG2 细胞 48 h。

1.3 光学显微镜观察细胞凋亡形态及流式细胞仪分析 HepG2 细胞的凋亡率

将培养于 6 孔板的正常对照、TP 处理组; TP-Ge 组; TP-Mn 组细胞用 0.25% 的胰蛋白酶消化收集细

胞, PBS 漂洗后严格按照试剂盒说明书要求操作, 加入 1 ml PI 染色液, 4℃ 避光染色 30 min 后立即上机检测。

1.4 HepG2 细胞全蛋白质提取与分离

取培养 48 h 的 HepG2 细胞, 离心弃去培养液, 用 PBS 洗涤 3 次。按细胞质量和裂解液体积 1:3 的比例加入裂解液, 液氮反复冻融破碎细胞。随后 15 000 ×g 离心 20 min 取上清, 以每管 30 μl 于 -80℃ 冷冻保存备用。2D-PAGE 技术分离肿瘤细胞 HepG2 的全蛋白。参考文献 [6-7] 分离试剂配制和实验步骤。凝胶中的蛋白质染色选用常规的银染法。

1.5 差异蛋白质筛选和质谱鉴定

参考陈东仕等 [8] 和林志超等 [9] 描述的方法进行质谱数据检索和差异蛋白质鉴定。

1.6 统计学分析

实验结果数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS17.0 软件 *t* 检验进行统计学分析。

2 结果

2.1 TP-Mn 对 HepG2 细胞形态的影响

图 1A 为无任何处理的 HepG2 细胞。TP 处理的 HepG2 细胞形态无明显变化, 但透光性及折光性稍微减弱, 细胞数量明显减少 (图 1B)。TP-Ge 处理的 HepG2 细胞形态略有变化呈扁平的短梭形或多角形, 细胞单层排列呈“铺路石”状, 细胞透光性及折光性稍减低, 细胞数量无明显减少 (图 1C)。TP-Mn 组的 HepG2 细胞形态变化明显, 透光性和折光性差, 大部分细胞皱缩变形, 并有大量死亡细胞漂浮在培养液中, 总的细胞数量明显减少, 细胞凋亡明显 (图 1D)。

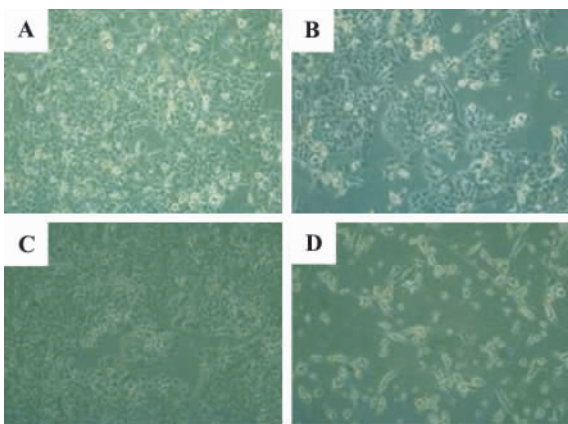


图 1 茶多酚锰络合物 (TP-Mn) 对 HepG2 细胞形态的影响 (×300)。细胞与药物作用 48 h。A: 正常对照组; B: TP 700 mg·L⁻¹; C: TP-Ge 700 mg·L⁻¹; D: TP-Mn 700 mg·L⁻¹。

Fig. 1 Effect of tea polyphenol-manganese (TP-Mn) on HepG2 morphological changes (×300)。

2.2 TP-Mn 对 HepG2 细胞凋亡率的影响

图 2 结果显示, HepG2 细胞的自然凋亡率为 (7.6 ± 0.7)%; TP, TP-Ge 和 TP-Mn 组, HepG2 细胞的凋亡率分别为 (12.3 ± 0.4)%、(7.0 ± 0.3)% 和 (30.1 ± 0.7)%。其中 TP 和 TP-Mn 处理组与正常对照组相比差异显著 (*P* < 0.05)。尤其是 TP-Mn 处理组, 其诱导的凋亡率是 TP 处理组的 2.5 倍。

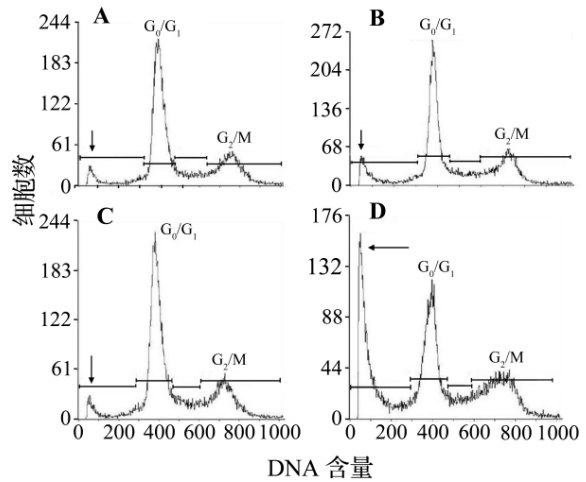


图 2 流式细胞术检测 TP-Mn 对 HepG2 细胞凋亡的影响。A: 正常对照; B: TP 700 mg·L⁻¹ 组; C: TP-Ge 700 mg·L⁻¹ 组; D: TP-Mn 700 mg·L⁻¹ 组。箭头示凋亡峰。

Fig. 2 Effect of TP-Mn on HepG2 apoptosis measured with flow cytometry。

2.3 TP-Mn 诱导 HepG2 差异蛋白的表达

未经任何处理的 HepG2 细胞蛋白质斑点数目为 1200 个, 其中多数蛋白质斑点分布在 pH 5~8 范围内, 少量蛋白质斑点分布在弱酸和弱碱区域内; 多数蛋白质的斑点分子量为 18~70 ku (图 3A)。TP 处理组总蛋白质斑点数目与未经任何处理的 HepG2 细胞很靠近, 但存在 11 种差异蛋白质, 其中图中显示的编码为 6, 7, 8, 12, 13, 14, 15, 20 和 21 号蛋白质斑点可视为上调蛋白, 而编码为 11, 19 号的斑点可视为下调蛋白 (图 3B)。TP-Mn 处理组蛋白质斑点数目与未经任何处理的 HepG2 细胞也很靠近, 其蛋白质分布也较为相似, 但存在 12 种差异蛋白质, 即图中显示的斑点编码为 5, 9, 10 和 20 号蛋白质斑点可视为上调蛋白, 而编码为 1, 2, 3, 4, 16, 17, 18 和 19 号为斑点可视为下调蛋白 (图 3C)。

肽质量指纹和数据库比对匹配率分析结果显示, 较高匹配率的蛋白质分别为图 3C 中编号为 18 和 19 的蛋白斑点, 分别为 γ -肌动蛋白和酪氨酸 3/色氨酸 5-加单氧化酶激活蛋白。

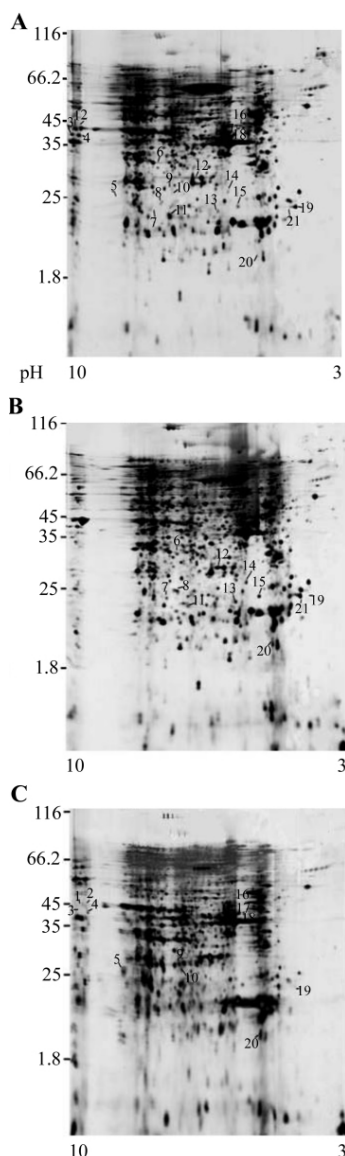


图3 TP-Mn 诱导 HepG2 细胞凋亡的 2D-PAGE 全蛋白图谱。A: 正常对照组; B: TP 100 mg·L⁻¹ 组; C: TP-Mn 700 mg·L⁻¹ 组。
Fig. 3 2D-PAGE proteome map of HepG2 apoptosis induced by TP-Mn.

3 讨论

本研究结果发现, TP 和 TP-Mn 都具有诱导 HepG2 细胞凋亡的能力, 尤其是 TP-Mn 其诱导的 HepG2 细胞凋亡率达到(30.1 ± 0.67) %。前期的研究表明 TP-Ge 只能诱导肺癌细胞凋亡^[5]; 本研究也表明 TP-Ge 诱导 HepG2 细胞凋亡的能力很有限, 不具备广谱性药效的特点。而 TP-Mn 则具有广谱性药效的特点。

TP 中的主要成分 EGCG 诱导肿瘤细胞凋亡的重要机制之一是抑制肿瘤细胞中端粒酶的活性^[10]。酪氨酸 3-β-色氨酸 5-单加氧酶激活蛋白可以调节端

粒酶在细胞内的着陆点, 从而抑制细胞凋亡^[11]。HepG2 细胞经 TP-Mn 处理后, 使该酶表达量降低, 阻碍了端粒酶在肿瘤细胞内与靶蛋白结合, 抑制了端粒酶活性, 最终导致肿瘤细胞凋亡。此外, 细胞内的 γ 肌动蛋白表达量下调, 也导致肌动蛋白纤丝遭到破坏, 从而使细胞的正常状态发生改变, 加速 HepG2 细胞的凋亡^[12]。

本研究利用蛋白质组学技术初步探讨了 TP-Mn 抗肿瘤分子机制, 为进一步深入研究找到了切入点, 但还不够深入和全面, 相关的 TP-Mn 诱导 HepG2 细胞途径和分子机制, 还需要借助其他生物化学和细胞生物学分析技术进一步佐证和研究。

参考文献:

- [1] 黄河宁, 李安章, 翁露娜, 林庆梅, 黄河清, 郑忠辉, 等. 茶多酚锰合成、表征及络合和诱导肿瘤细胞凋亡的研究[J]. 高等学校化学学报, 2007, 28(6): 1072-1076.
- [2] Bazinet L, Labbé D, Tremblay A. Production of green tea EGC- and EGCG-enriched fractions by a two-step extraction procedure [J]. *Sep Purif Technol*, 2007, 56(1): 53-56.
- [3] Sharma V, Gulati A, Ravindranath SD, Kumar V. A simple and convenient method for analysis of tea biochemicals by reverse phase HPLC [J]. *J Food Compos Anal*, 2005, 18(6): 583-594.
- [4] Masukawa Y, Matsui Y, Shimizu N, Kondou N, Endou H, Kuzukawa M, et al. Determination of green tea catechins in human plasma using liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2006, 834(1-2): 26-34.
- [5] 黄河宁, 胡晓慧, 黄河清, 颜利, 陈东仕, 欧阳高亮, 等. 质谱技术研究儿茶素及儿茶素-锗多聚体特性[J]. 分析化学, 2006, 34(1): 52-56.
- [6] 黄河宁, 李程, 谢笠升, 黄河清. 茶多酚锰壳聚糖微球的制备、控释和诱导肝癌细胞凋亡的研究[J]. 高等学校化学学报, 2008, 29(8): 1592-1597.
- [7] 黄琳, 陈东仕, 颜利, 方财王, 黄河清. 在镉盐胁迫下用蛋白质组学技术筛选与鉴定海兔亚口腔神经节的差异蛋白质[J]. 高等学校化学学报, 2009, 30(2): 314-319.
- [8] 陈东仕, 黄河清, 吴韩志, 蔡宗苇. 优化分离与鉴定蓝斑背肛海兔口腔神经节蛋白质组[J]. 高等学校化学学报, 2006, 27(7): 1257-1261.
- [9] 林志超, 林青, 朱峰, 黄河清. 电泳和质谱技术研究 4 种胰脏铁蛋白的亚基类型和等电点特性[J]. 色谱, 2009, 27(1): 96-101.

- [10] Berletch JB, Liu C, Love WK, Andrews LG, Katiyar SK, Tollefsbol TO. Epigenetic and genetic mechanisms contribute to telomerase inhibition by EGCG [J]. *J Cell Biochem*, 2008, **103**(2): 509-519.
- [11] Zhang P, Chan SL, Fu W, Mendoza M, Mattson MP. TERT suppresses apoptosis at a premitochondrial step by a mechanism requiring reverse transcriptase activity and 14-3-3 protein-binding ability [J]. *FASEB J*, 2003, **17**(6): 767-769.
- [12] Gourlay CW, Ayscough KR. The actin cytoskeleton in ageing and apoptosis [J]. *FEMS Yeast Res*, 2005, **5**(12): 1193-1198.

Differential protein expression during apoptosis induced by tea polyphenol-manganese in human hepatoma cells

WENG Lu-na^{1,2}, MENG Wei-neng², JI Xue-tao², LI Cheng², HUANG He-qing²

(1. Pharmacology Department, Xiamen Coastal Institute for Drug Control, Xiamen 361012, China;

2. Department of Biochemistry and Biotechnology, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: **OBJECTIVE** To investigate the differential protein expression during apoptosis induced by tea polyphenol-manganese (TP-Mn) in HepG2 cells. **METHODS** HepG2 cells were exposed to TP 700 mg·L⁻¹, TP-Ge 700 mg·L⁻¹ and TP-Mn 700 mg·L⁻¹ for 48 h, respectively. Morphologic changes in HepG2 cells were tested by optical microscope, the number of apoptosis rates were analyzed by flow cytometry, and the differential proteins were identified by peptide mass fingerprinting (PMF). **RESULTS** Optical microscope examination revealed that the number of HepG2 cells was significantly reduced in TP and TP-Mn groups; the cells appeared shrunken and deformed, and these were dead cells. However, the number of HepG2 cells was not significantly reduced in TP-Ge group. The apoptosis rate of HepG2 cells in TP-Mn group was (30.1 ± 0.7)%, which was significantly higher than in TP group (12.3 ± 0.4)% ($P < 0.05$) revealed by flow cytometry. 2D-PAGE showed that multiple differential proteins could be expressed in HepG2 cells during apoptosis induced by TP-Mn. Peptide mass fingerprinting and database searching showed that γ -actin and tyrosine 3-/tryptophan 5-monoxygenase activation proteins were of high score matching. **CONCLUSION** TP-Mn can induce HepG2 cell apoptosis, and multiple differential proteins can be expressed in HepG2 cells during the apoptosis.

Key words: tea polyphenol-manganese; proteomics; protein expression; carcinoma, hepatocellular; apoptosis

Foundation item: The project is supported by National Natural Science Foundation of China (40776060); and by Program for Changjiang Scholars and Innovative Research Team in University (PCSIRT IRT 0941)

Corresponding author: HUANG He-qing, E-mail: hqhuang@xmu.edu.cn

(收稿日期: 2010-06-30 接受日期: 2011-01-25)

(本文编辑: 乔虹)