

EGCG对人肝癌细胞株 HepG2 裸鼠移植瘤 COX-2、VEGF 和 bFGF 表达的调控

周 薇^{1*}, 戴奇刚², 邓 鑫³, 荣李君¹, 王英桂¹

(广东药学院 1.附属第二医院病理科, 广东 广州 510300; 2.附属第一医院放疗科, 广东 广州 510080; 3.广西中医学院附属瑞康医院科教科, 广西 南宁 530011)

摘 要:【目的】探讨表没食子儿茶素没食子酸酯 EGCG 对人肝癌细胞株 HepG2 裸鼠移植瘤生长和肿瘤血管生成的抑制作用及 EGCG 对移植瘤环氧合酶-2(COX-2)、血管内皮生长因子(VEGF)和碱性成纤维生长因子(bFGF)表达的调控。【方法】将肝癌细胞 HepG2 种植至裸鼠背部皮下, 10 d 后开始用不同浓度 EGCG 治疗, 38 d 后处死。观测裸鼠移植瘤的体积和质量。并采用间接免疫流式细胞术和 Western Blot 法检测移植瘤 COX-2、VEGF 和 bFGF 的表达, 用免疫组化法检测微血管密度(MVD)。【结果】①生理盐水组切除的移植瘤平均体积和质量分别是 $(1174.6 \pm 793.5) \text{ mm}^3$ 和 $(0.572 \pm 0.138) \text{ g}$, EGCG 50 mg/kg 组分别为 $(649.3 \pm 100.8) \text{ mm}^3$ 和 $(0.340 \pm 0.066) \text{ g}$, 两组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。EGCG 50 mg/kg 组抑瘤率为 40.56%。②生理盐水对照组和 EGCG 50mg/kg 组的 MVD 值分别为 23.24 ± 1.76 和 14.27 ± 1.25 , 两组差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 间接免疫荧光流式细胞术和 Western Blot 检测结果提示 EGCG 呈浓度依赖性地抑制人肝癌细胞 HepG2 移植瘤中 COX-2、VEGF 和 bFGF 的表达。【结论】EGCG 具有抑制人肝癌裸鼠移植瘤生长的作用; 同时能抑制肝癌移植瘤内新生血管内皮细胞的生长, 其机制可能与抑制 COX-2 的表达以及由此引起的 VEGF 和 bFGF 蛋白表达降低有关。

关键词: HepG2 细胞; 裸鼠移植瘤; 新生血管生成; COX-2; VEGF; bFGF

中图分类号: R73-3

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2013)03-0364-07

Regulation of EGCG on Expression of COX-2, VEGF, and bFGF in Nude Mice Xenografts Tumor of Human HepG2 Cells

ZHOU Wei^{1*}, DAI Qi-gang², DENG Xin³, RONG Luan-jun¹, WANG Ying-gui¹

(1.Department of Pathology, The Second Affiliated Hospital of Guangdong Pharmaceutical College, Guangzhou 510300, China;

2.Department of Radiotherapy, The First Affiliated Hospital of Guangdong Pharmaceutical College, Guangzhou 510080, China;

3.eartment of Science Education, Ruikang Hospital of Guangxi College of Chinese Traditional Medicine, Nanning 530011, China)

Abstract: 【Objective】To investigate the inhibitory effects of (-)-Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) on growth and tumor angiogenesis and regulations of EGCG on expression of COX-2 (cyclooxygenase-2), VEGF (vascular endothelial growth factor), and bFGF (basic fibroblast growth factor) in nude mice xenografts tumor of Human HepG2 Cells. 【Methods】HepG2 cells were transplanted into the dorsal subcutaneous tissue of athymic nude mice. The mice were treated with different concentrations of EGCG 10 days after transplantation, and were killed after 38 days. Tumor volume and weight were measured. Expression of COX-2, VEGF, and bFGF were detected by indirect immunofluorescence flow cytometry assay and Western blot and microvessel density (MVD) using immunohistochemical methods. 【Results】The average tumor volume was significantly smaller and the average tumor weight was significantly lighter in EGCG 50mg/kg group than in control group [$(1174.6 \pm 793.5) \text{ mm}^3$ vs $(649.3 \pm 100.8) \text{ mm}^3$ and $(0.572 \pm 0.138) \text{ g}$ vs $(0.340 \pm 0.066) \text{ g}$, $P < 0.05$]. The inhibitory rate of tumor growth was 40.56%. MVD values of the saline control group and the group of EGCG 50 mg/kg were (23.24 ± 1.76) and (14.27 ± 1.25) , the difference was statistically significant ($P < 0.01$); indirect immunofluorescence flow cytometry and Western Blot analysis results suggest that EGCG was concentration-dependently

收稿日期: 2012-11-28

基金项目: 广西壮族自治区科学技术厅青年基金 (桂科青 0832056)

作者简介: 周薇, 医学硕士, 主治医师, 主要从事肿瘤病理学研究, * 通信作者, 周薇

inhibited HepG2 cells transplanted tumors in the expression of COX-2, VEGF and bFGF. 【Conclusions】EGCG inhibits the growth and angiogenesis of HepG2 cell xenografts in small nude mice. Its mechanism may be related to the inhibition of COX-2 expression and the resulting VEGF and bFGF protein expression lower them.

Key words: HepG2 cells; xenografts; angiogenesis; COX-2; VEGF; bFGF

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci),2013,34(3):364-370]

绿茶具有抗血管生成作用,作为绿茶最重要的活性成分—表没食子儿茶素没食子酸脂(epigallocatechin gallate, EGCG)也显示具有抗血管生成活性^[1-2]。环氧合酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)已经成为肿瘤防治的新靶点之一,COX-2在细胞调控、免疫抑制、细胞凋亡、促进肿瘤新生血管生成及促进肿瘤浸润、转移等方面都有一定的作用,因此 COX-2 的抑制剂在肿瘤治疗中具有广阔的应用前景。既往研究及我们前期工作提示 EGCG 能够抑制肿瘤的生长和 VEGF 的表达及 EGCG 能通过抑制 COX-2 蛋白的表达诱导肝癌细胞的凋亡^[3-6],同时基于国内外的文献报道,COX-2 蛋白和 VEGF 蛋白表达具有相关性,且两者均具有促进肿瘤血管生成的作用^[7-8],因而,阐明两者之间的关系或许就能找出 EGCG 抗肿瘤血管生成的机理,为临床提供新的治疗靶点和理论依据。本研究采用体内模型方法研究 EGCG 对肝癌裸鼠移植瘤生长的抑制作用及对血管生成的抑制作用,旨在探讨 EGCG 在体内对 HepG2 肝癌细胞裸鼠移植瘤 COX-2、VEGF 和 bFGF 的蛋白表达的调控,为其在肝癌防治中的应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

人肝癌细胞株 HepG2 由中科院上海细胞库提供,用含 100 mL/L 小牛血清的 RPMI-1640 培养基(含青霉素 100 μg/mL、链霉素 100 μg/mL)在 37℃、饱和湿度和体积分数为 5%的 CO₂ 的恒温培养箱中培养。选取对数生长期细胞进行实验。

1.2 动物饲养

4 周龄 BALB/C 裸鼠,25 只,均为雄性,体重 14~16 g,购自广东省医学实验动物中心,实验动物质量合格证明编号:0066310,SPF 级屏障系统饲养。

1.3 药物和试剂

表没食子儿茶素没食子酸脂(EGCG,美国

Sigma 公司,纯度 95%)将其溶于 PBS 中,过滤除菌后于 4℃保存备用。阳性对照试剂为重组人血管内皮抑制素注射液(山东先声麦得津生物制药有限公司)。RPMI-1640 培养液为 Gibco 公司产品,新生牛血清购自杭州四季青生物工程公司。鼠抗人 COX-2、VEGF、bFGF 单克隆抗体、HRP 标记羊抗鼠 IgG 抗体和 FITC 标记羊抗鼠抗体 IgG 抗体均由北京中杉生物技术有限公司提供。即用型 SABC 试剂盒及 DAB 显色剂购自武汉博士德公司,CD31 单克隆抗体购自福州迈新公司。流式细胞仪为美国 BD 公司产品(FACS420),垂直电泳槽和电泳仪为德国伯乐产品。

1.4 裸鼠异种移植瘤模型构建

用无菌 PBS 调整 HepG2 细胞浓度为 1.5×10^7 个/mL,在裸鼠背部皮下接种 HepG2 细胞悬液 0.2 mL,用游标卡尺测量移植瘤最长径(L)和最短径(W),按公式 $V = L \times W^2 \times 0.52$ 计算瘤体积。待肿瘤体积达 100 mm³ 左右时,将裸鼠随机分为 5 组,每组 4 只。分别为生理盐水组即 A 组,重组人血管内皮抑素 3 mg/kg 组即 B 组,EGCG 10 mg/kg 组即 C 组,EGCG 30 mg/kg 组即 D 组,EGCG 50 mg/kg 组即 E 组。隔日按体质量腹腔注射给药 0.1 mL/10 g,连续给药 28 d,给药期间每 4 d 测量鼠体重及移植瘤体积。末次给药 48 h 后用颈椎脱臼法处死裸鼠,切取移植瘤,记录瘤重。

1.5 MVD 计数

石蜡包埋的 5 μm 厚肿瘤组织切片用于免疫组化检测,内皮细胞通过 CD31 多克隆抗体确认,肿瘤微血管密度通过 Weidner 的方法计算。血管内皮细胞染成棕黄色为阳性表达,与周围肿瘤细胞和结缔组织成份明显区别的任何一表现为棕染的内皮细胞或细胞丛为一个血管,只要结构不相连接,其分支结构也记为一个微血管。每例先在低倍镜下(×100)选择微血管密度最高的肿瘤区域,然后再高倍镜下(×400)随机计数 5 个视野内微血管数,再求其平均值作为血管密度。阴性对照染色中,用 PBS 代替一抗。

1.6 间接免疫荧光流式细胞术检测移植瘤细胞 COX-2、VEGF 和 bFGF 的表达情况

切取不同处理组组织块,网搓法制备单细胞悬液,取 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 细胞悬液, 1200 r/min , $r = 8 \text{ cm}$ 离心 5 min , PBS 洗涤后,悬浮于染色液(PBS+0.1% tritonX-100+10%羊血清)中 30 min ,以增加细胞膜的通透性,并封闭非特异性抗体结合部位。间接免疫荧光法标记,分别加入染色液 1:100 稀释的鼠抗人 COX-2、VEGF、bFGF 单抗各 $20 \mu\text{L}$ 后, 37°C 孵育 60 min 。同时设立阴性对照组:用 PBS 代替一抗。PBS 洗涤后加入染色液 1:200 稀释的 FITC 标记的二抗各 $20 \mu\text{L}$,混匀,避光室温孵育 30 min , PBS 洗涤,除去未结合的荧光抗体,将细胞重悬于 1 mL PBS 中,过滤后上机检测。测定数据按流式细胞仪所配置的软件进行数据处理。计数 10 000 个活细胞,以阳性细胞的平均荧光强度(MFI)表示细胞的蛋白表达量。

1.6 Western Blot 检测移植瘤细胞 COX-2、VEGF 和 bFGF 的表达

于 -80°C 冰箱中称取组织 0.2 g ,以预冷的 PBS 洗涤 3 次并用眼科剪将组织剪碎于 EP 管中,将组织转入匀浆器,再加入组织裂解液于 4°C 研磨,裂解 30 min ,离心,吸出上清液,考马斯亮兰蛋白定量。10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白后, 380 V 电转移 30 min ,蛋白转移至硝酸纤维素膜,5%脱脂奶粉封闭过夜,去离子水漂洗硝酸纤维素滤膜,加入一抗, 37°C 孵育 2 h , PBS 漂洗,在封闭液中稀释碱性磷酸酶标记的羊抗鼠二抗, 37°C 孵育 1 h , PBS 漂洗 3 次。滤膜放在新鲜配制的 NBT/BCIP 底物溶液中显色 20 min 。

1.7 统计学处理

采用 SPSS 15.0 统计软件进行数据处理,配对资料采用 t 检验,多组间比较采用方差分析。

2 结 果

2.1 EGCG 对裸鼠移植瘤生长的影响

4 周龄裸鼠接种后,于 $6 \sim 10 \text{ d}$ 肉眼可见移植瘤长出。25 只裸鼠无 1 例复种,均形成移植瘤,成瘤率为 100%。至实验结束 24 只存活良好,重组人血管内皮抑素组中 1 只因意外死亡未参加统计分析。实验结束时各组裸鼠体重均有小幅增加,实验组与生理盐水组相比无显著性差异。EGCG

高剂量组(50 mg/kg)的瘤重与生理盐水组相比抑瘤率为 40.56%,EGCG 高剂量组瘤重与生理盐水对照组结果见图 1 及表 1,两组结果有显著差异($P < 0.05$)。

2.2 EGCG 对移植瘤 MVD 表达的影响

CD31 抗体主要表达于血管内皮及单个内皮细胞,免疫组织化学染色结果显示与生理盐水对照组相比 EGCG 50 mg/kg 组肿瘤组织内 CD31 阳性染色的毛细血管数量显著减少(图 2),生理盐水对照组 MVD 值为 23.24 ± 1.76 ,EGCG 50 mg/kg 组 MVD 值为 14.27 ± 1.25 ,与对照组相比,差异有统计学意义($t = 3.77$, $P < 0.01$)。

2.3 EGCG 对移植瘤组织内 COX-2 的表达情况

间接免疫荧光流式细胞术结果显示,生理盐水对照组移植瘤组织中 HepG2 细胞的平均荧光强度比较高,COX-2 蛋白表达荧光强度为 57.05 ± 8.93 ,EGCG 10、30、 50 mg/kg 组移植瘤组织中 HepG2 细胞的平均荧光强度(Mean fluorescence intensity)呈浓度依赖性地下降,COX-2 蛋白表达荧光强度分别为 46.11 ± 7.98 、 25.65 ± 5.29 、 18.90 ± 4.88 。其中 30、 50 mg/kg 组与对照组相比,差异有统计学意义($P < 0.01$)。此结果表明 EGCG 可抑制移植瘤中 HepG2 细胞 COX-2 的表达(图 3A)。Western Blot 分析灰度扫描显示,对照组 COX-2 蛋白表达为 1.31 ± 0.04 ,EGCG 10、3、 50 mg/kg 组 COX-2 蛋白表达分别为 1.14 ± 0.02 、 0.93 ± 0.01 、 0.71 ± 0.03 ,其中 30、 50 mg/kg 组与对照组相比,差异有显著性($P < 0.01$)。此结果表明 EGCG 可呈浓度依赖性抑制移植瘤中 HepG2 细胞 COX-2 的表达(图 3B)。

2.4 EGCG 对移植瘤组织内 VEGF 和 bFGF 的表达情况

间接免疫荧光流式细胞术结果显示,生理盐水对照组移植瘤组织中 HepG2 细胞的 VEGF 蛋白平均荧光强度为 83.77 ± 9.05 ,EGCG 10、30、 50 mg/kg 组移植瘤组织中 HepG2 细胞 VEGF 蛋白表达荧光强度分别为 59.29 ± 7.45 、 46.90 ± 6.80 、 31.65 ± 5.34 。其中 10、30、 50 mg/kg 组与对照组相比,差异有统计学意义($P < 0.01$)。此结果表明 EGCG 可呈浓度依赖性抑制移植瘤中 HepG2 细胞 VEGF 的表达(图 4A)。Western Blot 分析灰度扫描显示,对照组 VEGF 蛋白表达为 1.23 ± 0.03 ,EGCG 10、30、 50 mg/kg 组 VEGF 蛋白表达分别为

表 1 EGCG 对人肝癌 HepG2 裸鼠移植瘤生长的抑制作用

Table 1 Inhibitory effect of EGCG on growth of human liver cancer HepG2 cell xenografts in small nude mice ($\bar{x} \pm s$)				
Group	Dose/(mg/kg)	Body mass/g	Tumor size/mm ³	Tumor mass/g
Control	—	26.30 ± 0.40	1 174.6 ± 793.5	0.572 ± 0.138
Human endostatin	3	24.70 ± 0.30	900.0 ± 962.2	0.340 ± 0.150
EGCG	10	27.05 ± 0.75	852.2 ± 330.9	0.383 ± 0.122
EGCG	30	26.50 ± 0.60	728.7 ± 349.6	0.375 ± 0.145
EGCG	50	26.40 ± 0.50	649.3 ± 100.8	0.340 ± 0.066 ¹⁾

Compared with NS group; 1) $P < 0.05$.

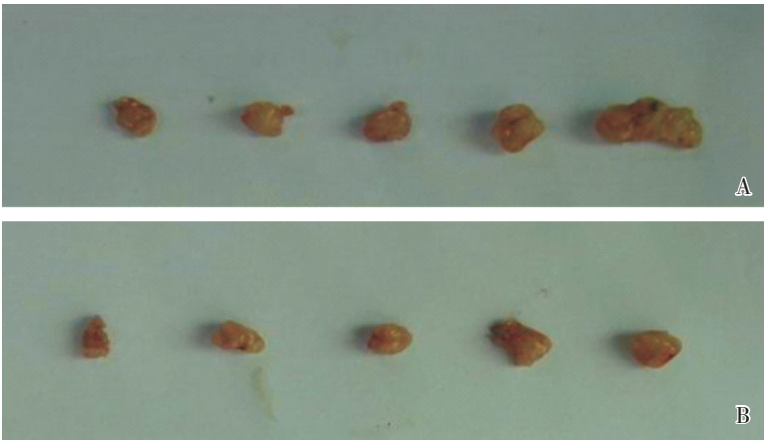


图 1 裸鼠移植瘤的形态学改变观察

Fig 1 The main morphology of xenograft tumor
A: Normal saline; B:EGCG 50 mg/kg

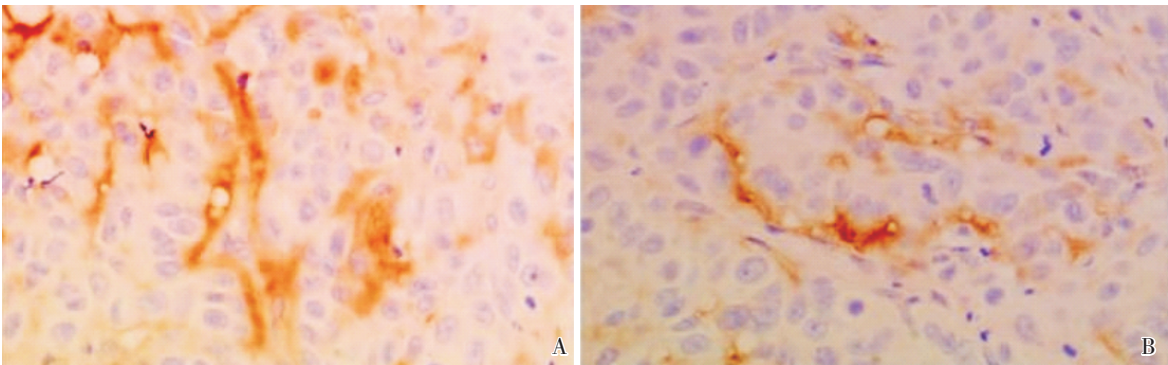


图 2 EGCG 抑制移植瘤组织中血管生成

Fig.2 Inhibition of tumor angiogenesis by EGCG (CD31-Ab × 200)

A: Control group; B:EGCG 50 mg/kg group.

1.18 ± 0.02、1.01 ± 0.01、0.69 ± 0.04，其中 50 mg/kg 组与对照组相比，差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。此结果也表明 EGCG 可抑制移植瘤中 HepG2 细胞 VEGF 的表达(图 4B)。

间接免疫荧光流式细胞术结果显示，生理盐水对照组移植瘤组织中 HepG2 细胞的 bFGF 蛋白

平均荧光强度为 79.06 ± 8.53,EGCG 10、30、50 mg/kg 组移植瘤组织中 HepG2 细胞 bFGF 蛋白表达荧光强度分别为 62.98 ± 7.05、41.44 ± 4.31、36.76 ± 4.99。其中 10、30、50 mg/kg 组与对照组相比，差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。此结果表明 EGCG 可呈浓度依赖性抑制移植瘤中 HepG2 细胞

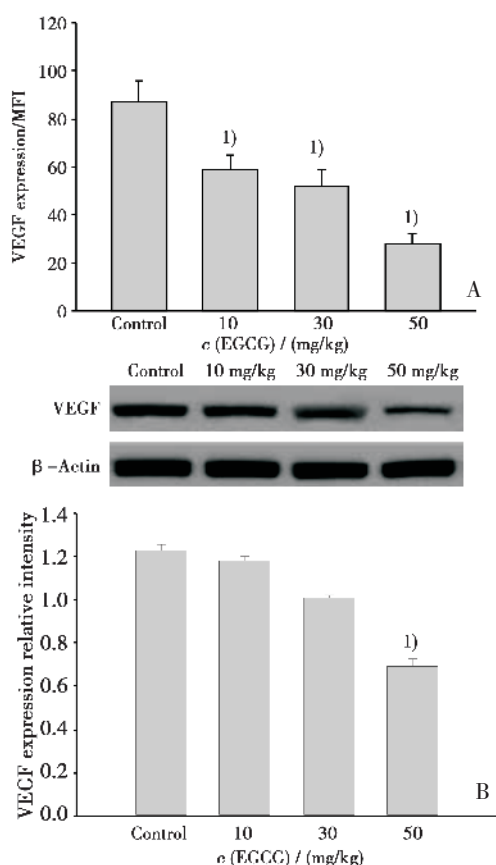


图 4 EGCG 处理组呈剂量依赖性地抑制移植瘤组织中 VEGF 蛋白平均荧光强度(A)和灰度值(B)的表达

Fig.4 EGCG treatment groups showed the mean fluorescence intensity (MFI) of VEGF protein expression (A) and VEGF protein gray value (B) in xenograft tumor cells dose-dependently inhibited

1) $P < 0.01$, vs NS group

bFGF 的表达(图 5A)。Western Blot 分析灰度扫描显示,对照组 bFGF 蛋白表达为 1.35 ± 0.03 , EGCG 10、30、50 mg/kg 组 bFGF 蛋白表达分别为 1.19 ± 0.03 、 0.74 ± 0.02 、 0.52 ± 0.01 , 其中 30、50 mg/kg 组与对照组相比,差异有统计学意义($P < 0.01$)。此结果也表明 EGCG 可抑制移植瘤中 HepG2 细胞 bFGF 的表达(图 5B)。

3 讨 论

肿瘤生长依赖于肿瘤组织内血管形成,在肿瘤直径超过 2~3 mm 后,必须依靠肿瘤自身形成新生血管来提供营养物质和氧气^[9]。肝细胞癌是富血管肿瘤,它的发生及发展离不开肿瘤新生血管形成。肿瘤细胞依靠分泌血管生长因子(VEGF、

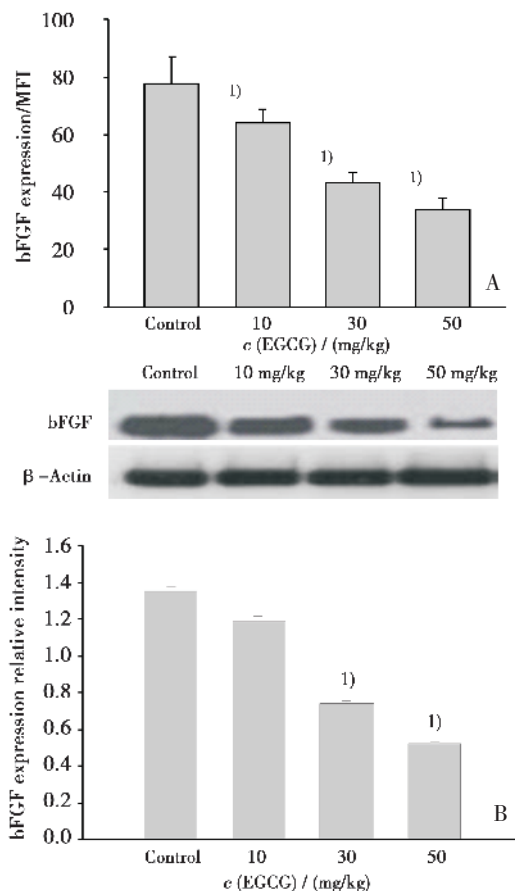


图 5 EGCG 处理组呈剂量依赖性地抑制移植瘤组织中 bFGF 蛋白平均荧光强度(A)和 B 灰度值(B)的表达

Fig.5 EGCG treatment groups showed the mean fluorescence intensity (MFI) of bFGF protein expression (A) and bFGF protein gray value(B) in xenograft tumor cells dose-dependently inhibited

1) $P < 0.01$, vs NS group

bFGF、PDGF 等)保证其自身生长^[10]。最近许多研究证实了血管生成与肝癌侵袭性之间的联系,抑制血管生成能显著抑制肿瘤的生长及转移。然而,目前所发现的血管生成抑制剂多为基因重组表达的蛋白制剂。由于蛋白类药物存在用药剂量大、提取具有活性的蛋白分子较为困难、容易受到病原微生物污染、价格昂贵等方面的问题,在实际的临床应用中受到一定的制约。茶叶是人们喜爱的天然饮料之一,实验研究表明,茶叶特别是绿茶具有明确的抗肿瘤作用。EGCG 作为绿茶的重要活性成分,在抑制肿瘤血管生成方面的作用最为突出,而其他成分的作用微弱甚至无作用。已经证实,饮用低浓度(0.01%)的 EGCG,即可达到抑制移植瘤血管生成的目的^[11]。本研究结果显示,经腹腔注射

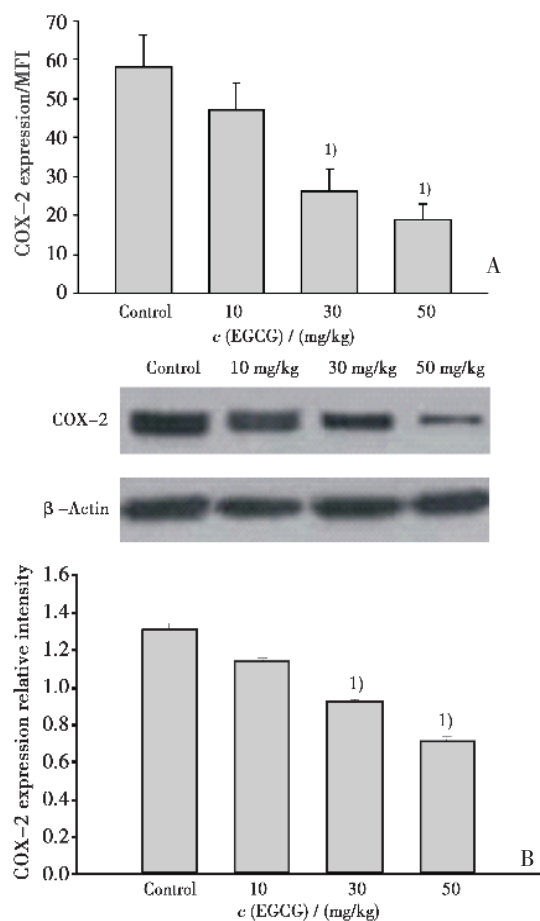


图3 EGCG处理组呈剂量依赖性地抑制移植瘤组织中COX-2蛋白平均荧光强度(A)和灰度值(B)的表达

Fig.3 EGCG treatment groups showed the mean fluorescence intensity (MFI) of COX-2 protein expression (A) and COX-2 protein gray value (B) in xenograft tumor cells dose-dependently inhibited

1) $P < 0.01$, vs NS group

EGCG可以显著抑制肝癌细胞株裸鼠移植瘤的生长,EGCG高剂量组(50 mg/kg)的瘤重与生理盐水组相比抑瘤率为40.56%,EGCG处理组移植瘤组织MVD也显著减少,这些结果提示EGCG可能通过抗血管生成抑制肝癌细胞株裸鼠移植瘤的生长。

COX-2是前列腺素合成过程中重要的限速酶,COX-2表达与肿瘤细胞的增殖、凋亡和血管形成密切相关。目前一系列研究发现COX-2在人的很多癌前病变和恶性肿瘤中高表达,如胃肠上皮化生、胃癌、结肠癌、食管癌、肝癌、鼻咽癌和乳腺癌等^[12]。COX-2过度表达与肿瘤新生血管形成密切相关,而COX-2抑制剂可以阻断其在血管生成

中的作用。既往研究表明,EGCG能抑制人前列腺癌雄性激素敏感的LNCaP细胞和雄激素不敏感的PC-3细胞丝裂原活化的COX-2的表达^[13]及EGCG可通过抑制COX-2的表达降低人黑色素瘤细胞的侵袭潜能^[14]。进一步研究发现,COX-2可能是通过诱导以VEGF为代表的促血管生长因子的表达,同时抑制血管内皮细胞的凋亡而促进了肿瘤血管形成^[15]。日本学者Tsuji等^[16]通过Caco-2细胞系的实验研究提出,体外转染COX-2基因的人结肠癌细胞在过度表达COX-2的同时,促血管生成因子VEGF、bFGF、PDGF、内皮素-1等均明显上调。本实验间接免疫荧光流式细胞术结果提示:EGCG可抑制移植瘤中HepG2细胞COX-2的表达;Western Blot分析EGCG可呈浓度依赖性抑制移植瘤中HepG2细胞COX-2的表达。

目前已知的刺激血管内皮细胞增殖的因子有VEGF、bFGF、PDGF等,其中血管内皮生成因子(VEGF)是一种高度特异性的有丝分裂原,能直接刺激新生血管的形成,被公认为是最重要和最强的促血管生成因子^[17]。同时VEGF也是一种血管通透性诱导因子,可增加微静脉和小静脉的通透性,是已知最强的血管通透剂。有学者提出VEGF不能作为肝细胞性肝癌(HCC)血管生成的独立指标,应与bFGF和Ang-2共同考虑,才能作为HCC新生血管生成的判断指标^[18]。bFGF是一种具有广泛生物学活性的多肽,通过细胞表面的受体对来源于外胚层和中胚层的细胞发挥促进细胞分裂增殖、细胞迁移和新生血管生成等作用。近年研究发现,bFGF可促进肿瘤组织或内皮细胞表达VEGF及其受体,间接促进血管生成。许多实质性肿瘤表达bFGF,提示bFGF对肿瘤新生血管生成起着重要作用,进而影响肿瘤的发生和发展、浸润和转移^[19-20]。本实验结果提示:EGCG可抑制移植瘤中HepG2细胞VEGF、bFGF蛋白的表达,并且VEGF、bFGF相互间有协同作用。

本研究探讨了EGCG抑制肝癌裸鼠移植瘤的生长、血管生成及通过抑制COX-2蛋白表达减少新生血管生成的机制。实验结果发现EGCG能抑制人肝癌HepG2细胞裸鼠移植瘤中COX-2的表达,同时可抑制裸鼠移植瘤中VEGF和bFGF的表达。抑制COX-2的表达及由此引起的VEGF和bFGF蛋白表达降低,在EGCG抗肝癌新生血管生成的机制中可能具有一定作用。

参考文献:

- [1] Jung YD, Ellis LM. Inhibition of tumour invasion and angiogenesis by epigallocatechin gallate (EGCG), a major component of green tea [J]. *Int J Exp Pathol*, 2001, 82(6): 309–316.
- [2] Butt MS, Sultan MT. Green tea: nature's defense against malignancies [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2009, 49(5): 463–473.
- [3] Zhou W, Dai QG, Li H, et al. Apoptosis induction of human gastric carcinoma cells by Epigallocatechin-3-gallate(EGCG) through down-regulation of Bcl-2, NF- κ B(p65) and the activation of Caspase-3 [J]. *J Mod Onc*, 2008, 16(4): 530–534.
- [4] Cao J, Luo ZY, Zhou W, et al. Experimental study on VEGF expression and MMP-2 activation in transplanted tumor inhibited by EGCG in vivo [J]. *Chin J Trad West Med*, 2006, 7(2): 421–423.
- [5] Shimizu M, Shirakami Y, Sakai H, et al. (–)-Epigallocatechin gallate inhibits growth and activation of the VEGF/VEGFR axis in human colorectal cancer cells [J]. *Chem Biol Interact*, 2010, 185(3): 247–252.
- [6] Chen XL, Wang Q, Cao LQ, et al. Epigallocatechin-3-gallate induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells. [J] *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2008, 88(36): 2524–2528.
- [7] Ninomiya I, Nagai N, Oyama K, et al. Antitumor and anti-metastatic effects of cyclooxygenase-2 inhibition by celecoxib on human colorectal carcinoma xenografts in nude mouse rectum [J]. *Oncol Rep*, 2012, 28(3): 777–784.
- [8] Zhu YM, Azahri NS, Yu DC, et al. Effects of COX-2 inhibition on expression of vascular endothelial growth factor and interleukin-8 in lung cancer cells [J]. *BMC Cancer*, 2008, 8(1): 218–228.
- [9] Granci V, Dupertuis YM, Pichard C. Angiogenesis as a potential target of pharmaconutrients in cancer therapy [J]. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2010, 13(4): 417–422.
- [10] Sufen G, Xianghong Y, Yongxia C, et al. bFGF and PDGF-BB have a synergistic effect on the proliferation, migration and VEGF release of endothelial progenitor cells [J]. *Cell Biol Int*, 2011, 35(5): 545–551.
- [11] Shirakami Y, Shimizu M, Adachi S, et al. (–)-Epigallocatechin gallate suppresses the growth of human hepatocellular carcinoma cells by inhibiting activation of the vascular endothelial growth factor-vascular endothelial growth factor receptor axis [J]. *Cancer Sci*, 2009, 100(10): 1957–1962.
- [12] Jang TJ, Min SK, Bae JD, et al. Expression of cyclooxygenase 2, microsomal prostaglandin E synthase 1, and EP receptors is increased in rat oesophageal squamous cell dysplasia and Barrett's metaplasia induced by duodenal contents reflux [J]. *Gut*, 2004, 53(1): 27–33.
- [13] Hussain T, Gupta S, Adhami VM, et al. Green tea constituent epigallocatechin-3-gallate selectively inhibits COX-2 without affecting COX-1 expression in human prostate carcinoma cells. [J] *Int J Cancer*, 2005, 113(4): 660–669.
- [14] Singh T, Katiyar SK. Green tea catechins reduce invasive potential of human melanoma cells by targeting COX-2, PGE2 receptors and epithelial-to-mesenchymal transition [J]. *PLoS One*, 2011, 6(10): e25224.
- [15] Ali-Fehmi R, Morris RT, Bandyopadhyay S, et al. Expression of cyclooxygenase-2 in advanced stage ovarian serous carcinoma: Correlation with tumor cell proliferation, apoptosis, angiogenesis, and survival [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2005, 192(3): 819–825.
- [16] Tsujii M, Kawano S, Tsuji S, et al. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells [J]. *Cell*, 1998, 93(5): 705–716.
- [17] Yao JL, Ryan CK, Francis CW, et al. Tissue factor and VEGF expression in prostate carcinoma: a tissue microarray study [J]. *Cancer Invest*, 2009, 27(4): 430–434.
- [18] Moon WS, Rhyu KH, Kang MJ, et al. Overexpression of VEGF and angiopoietin 2: a key to high vascularity of hepatocellular carcinoma? [J]. *Mod Pathol*, 2003, 16(6): 552–557.
- [19] Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, et al. Synergistic effect of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor in murine hepatocellular carcinoma [J]. *Hepatology*, 2002, 35(4): 834–842.
- [20] Wang GB, Zhou XY, Yuan T, et al. Significance of serum connective tissue growth factor in patients with hepatocellular carcinoma and relationship with angiogenesis [J]. *World J Surg*, 2010, 34(10): 2411–2417.

(编辑 徐杰)