论著

文章编号:1000-5404(2005)12-1194-03

咖啡酸苯乙酯对大肠癌细胞 HCT116 细胞周期和 cyclin D1 表达的影响

谢家印[1],向德兵[1],何渝军[2],王 东[1],李增鹏[1],肖华亮[1],牟江洪[1],张沁宏[1] (第三军医大学大坪医院野战外科研究所:[1] 肿瘤中心,[2] 普通外科,重庆 400042)

提 要:目的 探讨咖啡酸苯乙酯(caffeic acid phenethyl ester, CAPE)对体外培养的大肠癌细胞 HCT116 细胞周期和 cyclin D1 表达的影响。**方法** 以人大肠癌细胞株 HCT116 为研究对象,PI 染色、流式细胞仪检测 CAPE 处理 24 h 后细胞周期分布,Western blotting、RT-PCR 检测 CAPE 处理 24、48 h 后 cyclin D1 表达的变化。**结果** 2.5、5.0、10 mg/L CAPE 处理 HCT116 细胞 24 h 后,G_0/G_1 期细胞百分率上升,S 期细胞百分率下降,呈剂量依赖性。2.5、5.0、10 mg/L CAPE 处理 HCT116 细胞 24、48 h 后 cyclin D1 蛋白和 mRNA 表达均降低,呈剂量和时间依赖性。**结论** CAPE 诱导 HCT116 细胞周期阻滞,其机制可能与其下调 cyclin D1 表达有关。

关键词: 细胞周期;cyclin D1;咖啡酸苯乙酯;大肠癌

中图法分类号: R329.24; R735.34; R914.4 **文献标识码:** A

Effects of caffeic acid phenethyl ester on cell cycle and cyclin D1 expression in human colorectal cancer cell line HCT116

XIE Jia-yin[1], XIANG De-bing[1], HE Yu-jun[2], WANG Dong[1], LI Zeng-peng[1], XIAO Hua-liang[1], MOU Jiang-hong[1], ZHANG Qin-hong[1] ([1]Cancer Center, [2]Department of General Surgery, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To study the effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on cell cycle, the expression of cyclin D1 in the cultured colorectal cancer cell line HCT116. **Methods** HCT116 cells were treated with CAPE at serial concentrations of 2.5, 5 and 10 mg/L. Cell cycle was analyzed by using flow cytometry (FCM) with propidium iodide (PI) labeling method. The expression of cyclin D1 was detected by Western blotting and RT-PCR. **Results** FCM analysis showed that G_0/G_1 phase rate increased, S phase rate decreased after HCT116 cells were exposed to CAPE (2.5, 5 and 10 mg/L) for 24 h, which were in a concentration-dependent manner. The mRNA and protein expressions of cyclin D1 decreased after HCT116 cells were exposed to CAPE for 24, 48 h, which were in a concentration- and time-dependent manner. **Conclusion** CAPE induced cell cycle arrest, which mechanism may be related to the significant down-regulation of cyclin D1 gene and protein expressions.

Key words: cell cycle; cyclin D1; caffeic acid phenethyl ester; colorectal cancer

咖啡酸苯乙酯(caffeic acid phenethyl ester, CAPE)作为蜂胶抗肿瘤的主要活性成分,对人白血病和多种实体瘤细胞有抑制增殖和诱导凋亡作用[1,2],可显著降低转基因小鼠(转染突变型 APC 基因)和致癌剂诱发的大鼠大肠肿瘤的发生率[3,4]。我们研究发现 CAPE 能明显抑制大肠癌细胞增殖,并诱导细胞凋亡[5],但其机制目前尚不清楚。本研究探讨 CAPE 对大肠癌 HCT116 细胞周期和 cyclin D1 表达的影响,进一步阐明其抗癌作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

大肠癌细胞 HCT116 购自美国 ATCC。CAPE、二甲亚砜(DMSO)、碘化丙啶(PI)为 Sigma 公司产品。RPMI1640 培养基、胎牛血清为 Hyclone 公司产品。Tripure RNA 提取试剂盒购自美国 Roche 公司,RT-PCR 试剂盒购自美国 Promega 公司,鼠 cyclin

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30100228),重庆市科委应用基础研究资助项目(20016824)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30100228) and the Research Project Foundation for Basic Research and Application of Scientific Committee of Chongqing (20016824)

作者简介: 谢家印(1964-),男,四川省安岳县人,博士研究生,主治医师,主要从事肿瘤基础及临床方面的研究。电话:(023)68757354

通讯作者: 向德兵,电话:(023)68757354

收稿日期: 2005-04-04;**修回日期:** 2005-05-09

D1 单克隆抗体购自美国 Santa cruz 公司。cyclin D1 引物由上海生工生物技术公司合成。

1.2　方法

1.2.1　细胞培养和处理　　HCT116 细胞置于 37 ℃，饱和湿度，含 50 ml/L CO_2 的孵箱中培养，培养液 RPMI1640 含有 100 ml/L 胎牛血清，1.0×10^5 U/L 青霉素和链霉素。根据细胞生长状况每 2 ~ 3 天换液 1 次，当细胞生长状态稳定，呈对数生长期时，用于实验。CAPE 临用前以 DMSO 溶解，用 RPMI1640 液稀释（RPMI1640 液中 DMSO 浓度小于 1 ml/L）。

1.2.2　细胞周期检测　　对数生长期的 HCT116 细胞接种于 6 孔培养板培养，24 h 后吸除原培养液，加入含 CAPE 浓度分别为 2.5、5.0、10 mg/L 的 RPMI1640 培养液，设培养液中不加药物（加相同浓度的 DMSO）为对照组，继续培养 24 h 后收集细胞，2 000 r/min 4 ℃离心 5 min 后弃上清，冷 PBS 重悬，离心，弃上清，用体积分数为 700 ml/L 冷乙醇固定，4 ℃过夜，染色前用 PBS 洗涤离心，去除固定液，用 RNaseA（终浓度 20 mg/L）消化，37 ℃ 水浴 30 min，再加入 PI 染色液（终浓度 50 mg/L），混匀，4 ℃避光染色 30 min，流式细胞仪上进行 DNA 含量和细胞周期分析，得出细胞各周期的百分率。

1.2.3　Western blot 分析　　将 HCT116 细胞浓度分别为 2.5、5.0、10 mg/L 的 CAPE 处理后，继续培养 24 h 和 48 h 后收集细胞，常规提取细胞总蛋白。取等量蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳（分离胶浓度为 10%，积层胶浓度为 5%）。电泳后转移至 PVDF 膜，5% 脱脂奶粉封闭后，加入 cyclin D1 一抗，4 ℃孵育 1 h 后室温下摇床孵育 1 h，加入 HRP 标记的羊抗小鼠二抗，室温下摇床孵育 1 h。以 ECL 试剂盒显色。用 Bio-Rad 公司 Quantity one 凝胶扫描分析系统扫描 X 线片，Labwork 3.0 图像分析软件进行图像分析，测定各条带光密度值，结果以积分光密度值（integral optical density，IOD）表示。

1.2.4　RT-PCR

1.2.4.1　总 RNA 的提取　　将 HCT116 细胞浓度分别为 2.5、5.0、10 mg/L 的 CAPE 处理后，继续培养 24 h 和 48 h 后收集细胞。PBS 冲洗两次，然后分别加 Tripure 1 ml，消化 5 min 后，收集在 Ep 管中，冰浴下超声破碎细胞 5 s × 3，每管加 100 μl 氯仿振荡 15 s，静置 10 min，12 000 r/min 4 ℃离心 15 min。收集透明的水相于新离心管中。每管加等体积异丙醇（－20 ℃预冷），混匀，12 000 r/min 4 ℃离心 10 min，弃上清，加 80% 乙醇 0.5 ml，混悬 5 s，洗涤沉淀，7 500 r/min 4 ℃离心 5 min，小心去除上清，沉淀置于干燥器中，抽真空 5 min。用 DEPC 处理的超纯水 10 μl 溶解沉淀。

1.2.4.2　RT-PCR　　RT 反应体系 50 μl，按照 Promega 公司试剂盒说明书进行。PCR 反应：cyclin D1 引物：上游：5′-TCTAAGATGAAGGAGACCATC-3′；　下　游：　5′-GCGGTAGTAGGACAGGAAGTTGTT-3′（354 bp）。GAPDH 引物：上游：5′-CCCATCACCATCTTCCAGGAGCG-3′；　下　游：　5′-AGATGGAGGAGTGGGTGTCGCTGT-3′（667 bp）。反应条件：94 ℃预变性 5 min，94 ℃变性 60 s，62 ℃退火 50 s，72 ℃延伸 50 s，末次循环后 72 ℃再延伸 10 min 后终止反应，共 28 个循环。

1.2.4.3　电泳及分析　　用 0.5 × TBE 制备 1.5% 琼脂糖凝胶，加入终浓度为 0.5 μg/ml 的 EB，取 PCR 产物 10 μl，上样缓冲液 2 μl，5 μl DNA marker 上样，80 V 恒压电泳，电泳完毕后，用 Bio-Red 公司凝胶扫描系统扫描，经美国 Gene 公司 Labwork 3.0 图像分析软件进行图像分析，测定各条带的积分光密度值 IOD，以 cyclinD1 电泳条带的 IOD 值与 GAPDH 电泳条带的 IOD 值之相对比值表示 cyclin D1 表达强度。

1.3　统计学处理

所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示，以 SPSS 10.0 统计分析程序进行方差分析和均数间多重比较。

2　结果

2.1　CAPE 对 HCT116 细胞周期的影响

HCT116 细胞经 2.5、5.0、10 mg/L 的 CAPE 作用 24 h 后，随着 CAPE 剂量的增加，G_0/G_1 期细胞逐渐增加，S 期细胞逐渐下降，5.0、10 mg/L 的 CAPE 组与对照组（0 mg/L）比较，差异有显著性，而 G_2/M 期改变不明显（表 1）。

表 1　CAPE 对 HCT116 细胞周期的影响（$\bar{x} \pm s$）

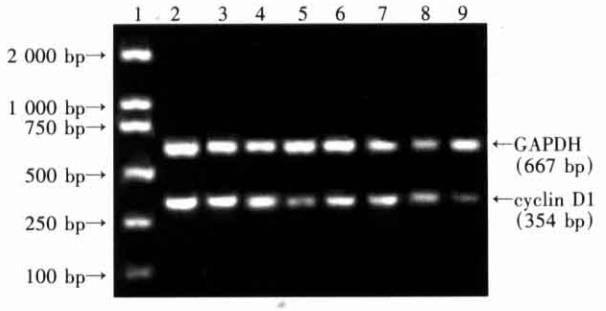
Tab 1　Effects of CAPE on HCT116 cell cycle（$\bar{x} \pm s$）

CAPE (mg/L)	G_0/G_1	G_2/M	S
0	0.40 ± 0.04	0.15 ± 0.04	0.45 ± 0.08
2.5	0.52 ± 0.06	0.16 ± 0.05	0.32 ± 0.02
5	0.56 ± 0.01**	0.15 ± 0.01	0.29 ± 0.01*
10	0.60 ± 0.01**	0.15 ± 0.05	0.25 ± 0.04*

*：$P < 0.05$，**：$P < 0.01$，*vs* control（0 mg/L CAPE）

2.2　CAPE 对 HCT116 细胞 cyclin D1 mRNA 表达的影响

RT-PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳显示出 667 bp 和 354 bp 两条带，667 bp 的条带为内参照 GAPDH，354 bp 条带为 cyclin D1 条带。不同浓度的 CAPE 作用 HCT116 细胞 24、48 h 后，细胞 cyclin D1 mRNA 水平均有不同程度的下降，随着 CAPE 浓度的增高，cyclin D1 mRNA 水平逐渐下降（图 1）。



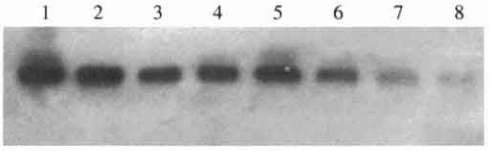
1：Marker；2 – 5：Control，2.5 mg/L CAPE，5.0 mg/L CAPE，10 mg/L CAPE at 24 h；6 – 9：Control，2.5 mg/L CAPE，5.0 mg/L CAPE，10 mg/L CAPE at 48 h

图 1　CAPE 对 HCT116 细胞 cyclin D1 mRNA 表达的影响

Fig 1　RT-PCR analysis of cyclin D1 mRNA expression in HCT116 cells at 24 h and 48 h after incubation with different concentrations of CAPE

2.3 CAPE 对 HCT116 细胞 cyclin D1 蛋白表达的影响

HCT116 细胞经不同浓度的 CAPE 作用 24、48 h 后，细胞 cyclin D1 蛋白含量均有不同程度的下降。随着 CAPE 浓度的增高，cyclin D1 蛋白含量逐渐下降(图 2)。



1－4：Control，2.5 mg/L CAPE，5.0 mg/L CAPE，10 mg/L CAPE at 24 h；5－8：Control，2.5 mg/L CAPE，5.0 mg/L CAPE，10 mg/L CAPE at 48 h

图 2 CAPE 对 HCT116 细胞 cyclin D1 蛋白表达的影响

Fig 2 Western blot analysis of cyclin D1 protein expression in HCT116 cells at 24 and 48 h after incubation with different concentrations of CAPE

3 讨论

CAPE 广泛存在于多种含树脂的植物和蜂胶中，对人白血病、口腔鳞癌、乳腺癌等肿瘤有抑制增殖和诱导凋亡作用。CAPE 的抗癌作用机制近年逐渐受到不少学者关注，Nomura 等[6]发现 CAPE 能明显诱导肿瘤细胞株 NCI-H388 和 SK-OV-3 等的凋亡，并且与其调节 P53 基因功能有关。Chen 等[1]研究发现，CAPE 对人白血病细胞 HL-60 具有明显的抑制生长和诱导凋亡作用，呈时间和浓度依赖性，CAPE 处理 HL-60 细胞后 72 h 后，凋亡率达 66.7%。其机制与 CAPE 上调 caspase-3 和 Bax 蛋白表达，下调 bcl-2 蛋白表达密切相关。CAPE 及其衍生物可抑制人宫颈癌细胞 ME180 生长，诱导细胞凋亡，其作用与影响 P53、rasP21 和 c-jun 的表达有关，并伴有 caspase-3 和 caspase-8 的激活[7]。

近年研究表明 CAPE 可显著降低转基因小鼠(转染突变型 APC 基因)和致癌剂诱发的大鼠大肠肿瘤的发生率[3,4]。我们研究发现 CAPE 体外能明显抑制大肠癌细胞增殖，并诱导细胞凋亡。CAPE 是否可调控细胞周期及其机制，目前尚少见文献报道。我们发现，CAPE 作用 HCT116 细胞 24 h 后，细胞受阻于 G_0/G_1 期，S 期细胞减少，且呈剂量依赖性。不同生物细胞的增殖周期时间不同，主要表现在 G_1 期持续时间的差异，而且 G_1 期的启动是细胞周期的关键。因此 G_1/S 期的调控尤为重要。G_1 期阻滞可使细胞生长周期延长，细胞的恶性增殖相应减慢。S 期即 DNA 合成期，可反映细胞的增殖情况。S 期细胞占细胞周期的比例增高则提示 DNA 合成活跃，细胞增殖活跃。一般而言，肿瘤细胞的 S 期比例较正常细胞要高，其增殖活性也较正常细胞高。我们的结果提示 CAPE 可调控大肠癌细胞的周期，使细胞受阻于 G_0/G_1 期，而不能进入 S 期，从而抑制细胞增殖活性。

cyclin D1 是一种细胞周期调控因子，与 CDK4 结合并被激活形成 CDK4-cyclin D1 复合物，促使 Rb 蛋白的磷酸化作用，正调节细胞增殖周期，在细胞周期 G_1/S 关卡的调控中起重要作用。在大肠癌组织中 cyclin D1 通常是过表达状态[8]，且与大肠癌患者预后密切相关[9,10]。我们对不同浓度的 CAPE 作用大肠癌 HCT116 后 cyclin D1 基因转录和蛋白含量进行观察，结果显示不同浓度的 CAPE 作用 HCT116 后，细胞 cyclin D1 mRNA 转录和蛋白含量均有不同程度的下降，随着 CAPE 浓度的增加和作用时间的延长，cyclin D1 的下降水平也逐渐增高。提示 CAPE 可能通过抑制 cyclin D1 的转录和蛋白表达，从而阻滞细胞周期于 G_0/G_1 期，发挥对肿瘤细胞抗增殖和诱导凋亡的作用。

参考文献：

[1] Chen Y J, Shiao M S, Hsu M L, *et al*. Effect of caffeic acid phenethyl ester, an antioxidant from propolis, on inducing apoptosis in human leukemic HL-60 cells[J]. J Agric Food Chem, 2001, 49(11): 5615－5619.

[2] Lee Y J, Liao P H, Chen W K, *et al*. Preferential cytotoxicity of caffeic acid phenethyl ester analogues on oral cancer cells [J]. Cancer Lett, 2000, 153(1-2): 51－56.

[3] Mahmoud N N, Carothers A M, Grunberger D, *et al*. Plant phenolics decrease intestinal tumors in an animal model of familial adenomatous polyposis [J]. Carcinogenesis, 2000, 21(5): 921－927.

[4] Borrelli F, Izzo A A, Di Carlo G, *et al*. Effect of a propolis extract and caffeic acid phenethyl ester on formation of aberrant crypt foci and tumors in the rat colon [J]. Fitoterapia, 2002, 73 (Suppl 1): S38－S43.

[5] 向德兵，何渝军，王 东，等. 咖啡酸苯乙酯诱导人大肠癌细胞凋亡的研究 [J]. 肿瘤防治杂志，2004，11(3)：229－232.

[6] Nomura M, Kaji A, Ma W, *et al*. Suppression of cell transformation and induction of apoptosis by caffeic acid phenethyl ester [J]. Mol Carcinog, 2001, 31(2): 83－89.

[7] Hung M W, Shiao M S, Tsai L C, *et al*. Apoptotic effect of caffeic acid phenethyl ester and its ester and amide analogues in human cervical cancer ME180 cells [J]. Anticancer Res, 2003, 23 (6C): 4773－4780.

[8] 向德兵，吴晓华，李增鹏，等. beta-catenin，cyclin D1 和 c-myc 在大肠癌组织中的表达 [J].世界华人消化杂志，2002，10(3)：305－308.

[9] McKay J A, Douglas J J, Ross V G, *et al*. Analysis of key cell-cycle checkpoint proteins in colorectal tumours [J]. J Pathol, 2002, 196(4): 386－393.

[10] 闫晓初，柳凤轩，贺光友，等. 大肠癌、大肠腺瘤 Cyclin D1、P16 和 PCNA 蛋白表达及其意义 [J].第三军医大学学报，2000，22(6)：534－537.

(编辑 冷怀明)